

В. БЕЙЛИС

# ПРИРОДА ДЕЙСТВИЯ ЭНЗИМОВ

ПЕРЕВОД С АНГЛИЙСКОГО  
В. А. ЭНГЕЛЬГАРДА

ПОД РЕДАКЦИЕЙ  
ПРОФ. А. Н. БАХА



ГОСУДАРСТВЕННОЕ ИЗДАТЕЛЬСТВО  
МОСКВА \* 1927 \* ЛЕНИНГРАД

# СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ЕСТЕСТВОЗНАНИЯ

Под общим редакц. А. Д. Архангельского, В. Ф. Кагана, Н. К. Кольцова,  
В. А. Костицына, П. П. Лазарева, Л. А. Тарасевича

===== КНИГА 37 =====

В. БЕЙЛИС

ПРИРОДА  
ДЕЙСТВИЯ ЭНЗИМОВ



ГОСУДАРСТВЕННОЕ ИЗДАТЕЛЬСТВО

*Отпечатано в 1-й Образ-  
цовой типографии Госизда-  
та. Москва, Пятницкая, 71.  
Тираж 3000. Гиз № 15531  
Главлит № 57618.*

## ПРЕДИСЛОВИЕ АВТОРА.

Основой для настоящей небольшой монографии послужили лекции, читанные в разное время в Лондонском Университете. Это обстоятельство может служить объяснением тому, что некоторые, еще спорные взгляды в книге изложены с быть может излишней определенностью. Мне кажется, что лучше проводить одну определенную точку зрения, нежели нагромождать хаос противоречивых мнений. Но в то же время надо быть готовым изменить свои взгляды, когда факты опровергнут их. В своем изложении я предпочитал не скрывать тех трудностей, которые подчас возникают при работе в области энзимологии; точно также я не уклонялся от того, чтобы приводить взгляды, с которыми я лично не согласен. Вполне возможно при этом, что случайно или по незнанию я упустил некоторые факты, имеющие более или менее существенное значение.

Отдельные вопросы, имеющие непосредственное отношение к теории действия энзимов, в частности свойства коллоидов и законы адсорбции, я в своих лекциях излагал значительно подробнее, здесь же остановился на них лишь постольку, поскольку это представлялось необходимым для общего развития темы.

В приведенном в конце списка литературы я отнюдь не стремился дать полную библиографию. Здесь помещены только работы, цитированные в тексте и имеющие непосредственное отношение к затронутым вопросам.

Детальное описание свойств многочисленных известных в настоящее время отдельных энзимов в книге не проводится, так как она посвящена общим свойствам, в большей или меньшей мере присущим всем вообще энзимам.

В. М. БЕЙЛИС.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

	<i>Стр.</i>
<b>Глава первая. Общие понятия о катализе . . . . .</b>	<b>1—12</b>
Биохимические реакции . . . . .	—
Катализ . . . . .	—
Механическая модель . . . . .	3
Характерные черты катализаторов . . . . .	6
Катализ при обратимых реакциях . . . . .	7
Механизм действия катализаторов . . . . .	10
Катализ в гетерогенной системе . . . . .	11
Катализаторы—химические вещества, а не свойства веществ . . . . .	12
<b>Глава вторая. Энзимы как катализаторы . . . . .</b>	<b>13—26</b>
Исторический обзор . . . . .	—
Определение . . . . .	14
Терминология . . . . .	16
Каталитические свойства энзимов . . . . .	17
Различие в конечных продуктах . . . . .	19
Конечный результат не зависит от количества катализатора . . . . .	21
Действие энзима проявляется при ничтожных количествах его . . . . .	24
Действие на обратимые реакции . . . . .	—
Разрушение при нагревании . . . . .	26
<b>Глава третья. Физические и химические свойства энзимов . . . . .</b>	<b>27—48</b>
Энзимы как коллоиды . . . . .	—
Природа коллоидального состояния . . . . .	—
Ультрамикроскоп . . . . .	28
Свойства, зависящие от развития поверхности . . . . .	—
Способность к диффузии . . . . .	31
Гистерезис . . . . .	32
Электрический заряд коллоидов . . . . .	—
Электрический заряд энзимов . . . . .	33
Адсорбция . . . . .	34
Стойкость суспензий . . . . .	37
Осмотическое давление . . . . .	—
Влияние электролитов . . . . .	38
Сложные коллоидальные системы . . . . .	39
Физические и химические моменты . . . . .	—
Очистка энзимов . . . . .	40
Энзимы не представляют собою протеинов . . . . .	41
Энзимы как свойства . . . . .	44
Действие нагревания . . . . .	45
Отличие от протоплазматического действия . . . . .	46
Антисептики . . . . .	—
Новообразование энзимов . . . . .	47

Стр.	
<b>Глава четвертая. Общие методы получения и исследования энзимов . . . . .</b>	<b>49—61</b>
Извлечение из клеток . . . . .	—
Способы получения ткалевого сока . . . . .	50
Очистка препаратов . . . . .	52
Биологический метод . . . . .	—
Осаждение . . . . .	53
Выпаривание . . . . .	54
Исследование действия энзимов . . . . .	—
Оптическая деятельность . . . . .	—
Показатель преломления . . . . .	55
Спектро-фотометрия . . . . .	56
Изменение вязкости . . . . .	—
Дилатометрические измерения . . . . .	57
Определение молекулярной концентрации . . . . .	—
Выделение газа . . . . .	—
Изменение электрической проводимости . . . . .	58
Обнаружение трипсина . . . . .	59
Определение силы энзима . . . . .	—
Способы прекращения действия энзимов . . . . .	60
<b>Глава пятая. Обратимость энзимных реакций . . . . .</b>	<b>52—93</b>
Влияние воды . . . . .	63
Синтез, производимый инвертазой . . . . .	64
Значение синтетического процесса . . . . .	65
Синтезы, производимые липазой . . . . .	66
Синтез углеводов и глюкозидов . . . . .	69
„Синтезирующие энзимы“ . . . . .	77
„Ложное равновесие“ . . . . .	82
Равновесие при энзиматических реакциях является истинным . . . . .	88
Синтез протеинов . . . . .	89
Синтез при помощи аминокислот . . . . .	92
Асимметрический синтез . . . . .	—
<b>Глава шестая. Скорость реакции и условия, от которых она зависит . . . . .</b>	<b>94—138</b>
Применение математики в биологии . . . . .	—
Закон действия масс . . . . .	95
Мономолекулярные реакции . . . . .	96
Ньютоновский закон скоростей . . . . .	—
Логарифмическая кривая . . . . .	—
Приложение к энзиматическим процессам . . . . .	97
Гидролиз тростникового сахара энзимами и кислотами . . . . .	98
Причины отклонения от обычного закона . . . . .	99
Зависимость скорости реакции от концентрации энзима . . . . .	105
Соединение энзима с продуктами реакции . . . . .	107
Значение обратимости реакции . . . . .	108
„Фактор интенсивности“ . . . . .	111
Равновесие, достигаемое в присутствии липазы . . . . .	112
Активность энзима . . . . .	114
Аутокаталит . . . . .	116
Итоги . . . . .	118
Диффузия в гетерогенных системах . . . . .	119
Общее уравнение для энзимных реакций . . . . .	120
Температура . . . . .	123
Осаждение при нагревании . . . . .	128

	Стр.
Концентрация субстрата . . . . .	130
Концентрация энзима . . . . .	131
Влияние электролитов . . . . .	135
Антисептики . . . . .	137
<b>Глава седьмая. Характер действия энзимов . . . . .</b>	<b>139—178</b>
Катализ в гетерогенных системах . . . . .	—
Природа адсорбции . . . . .	142
Химические теории адсорбции . . . . .	143
Общая теория действия энзимов . . . . .	146
Доказательства адсорбции энзимами . . . . .	147
Аутокатализ . . . . .	161
Влияние температуры . . . . .	—
Адсорбирование всех компонентов реакционной системы . . . . .	162
Ложное равновесие . . . . .	163
Положение равновесия . . . . .	164
Специфическая адсорбция . . . . .	167
О специфичности энзимов . . . . .	169
Зимоиды . . . . .	178
<b>Глава восьмая. Конзимы и антиэнзимы . . . . .</b>	<b>179—189</b>
Лакказа . . . . .	—
Липаза . . . . .	—
Зимаза . . . . .	181
Антисинтезы . . . . .	183
Непереваривание слизистой оболочки пищеварительного тракта . . . . .	188
<b>Глава девятая. Зимогены . . . . .</b>	<b>190—194</b>
Трипсиноген . . . . .	—
Пепсиноген . . . . .	192
Зимоген липазы . . . . .	193
<b>Глава десятая. Окислительные процессы и комплексные системы . . . . .</b>	<b>195—208</b>
Окислительные энзимы . . . . .	—
Каталазы . . . . .	196
Оксидазы . . . . .	—
Редуказы . . . . .	200
Сопряженные реакции . . . . .	201
Функция хлорофилла . . . . .	202
Свертывание крови . . . . .	204
Спиртовое брожение . . . . .	205
Гидролиз генцианазы . . . . .	—
Гидролиз раффинозы . . . . .	206
Гидролиз крахмала . . . . .	—
Протеокластические системы . . . . .	—
Энзимы, расщепляющие аргинин . . . . .	207
Общие выводы . . . . .	—
<b>Литературный указатель . . . . .</b>	<b>209—227</b>

## ГЛАВА ПЕРВАЯ.

### ОБЩИЕ ПОЗНАНИЯ О КАТАЛИЗЕ.

#### БИОХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ.

Одной из наиболее бросающихся в глаза особенностей химических реакций, протекающих в живом организме, является та легкость, с которой подчас весьма стойкие вещества подвергаются расщеплению. Так, например, глюкоза окисляется до углекислоты, воды, белок расщепляется на аминокислоты. При обычных лабораторных условиях потребовались бы сильнейшие реактивы, вроде хромовой и кипящей соляной кислот, чтобы произвести эти разложения. На этот факт, хорошо известный всем, работающим по биохимии, еще в самом начале развития этой науки, обращал особенное внимание Шенбейн<sup>240</sup>).

Насколько сильны эти действующие в живом организме агенты, можно иллюстрировать следующим фактом: по опытам Ф. Аристонга<sup>15</sup>), препарат лактазы расщепляет в течение одного часа при 37° такое количество молочного сахара, которое при помощи двунормальной соляной кислоты при той же температуре удается гидролизовать только в течение пяти недель.

#### Катализ.

Химики знают, что подобные явления могут вызываться и определенными химическими реактивами, и такие реакции со временем Берцелиуса известны под именем каталитических. Значение их возрастает с каждым днем. Водород и кислород, например, при обычной температуре соединяются так медленно, что не удается обнаружить образования воды; для того, чтобы оно произошло, нужно внести в смесь пламя

или пропустить электрическую искру. Но присутствия ничтожного количества мелко раздробленной платины достаточно, чтобы соединение элементов произошло при комнатной температуре. Точно так же процессы окисления, вызываемые перекисью водорода, во многих случаях протекают сами по себе очень медленно, но чрезвычайно ускоряются следами железа или марганца. Другим примером, представляющим интерес в связи с действием энзимов, может служить гидролиз тростникового сахара кислотами (ионами водорода).

Для того чтобы лучше уяснить себе лежащую перед нами задачу, мы обратимся сперва к таким катализитическим реакциям, при которых нам известна химическая природа как реагирующих веществ, так и самого катализатора; здесь нам легче будет ознакомиться со всеми характерными особенностями катализитического процесса.

Для этого нам удобнее будет разделить все реакции на два класса.

1. Существует большое количество реакций, протекающих, практически говоря, почти мгновенно; это будут главным образом реакции между ионами. Когда мы прибавляем хлорид к раствору азотокислого серебра, тотчас выпадает осадок. Или когда сильная кислота нейтрализуется сильным основанием, соединение происходит мгновенно, как нам хорошо известно из наших методов титрования.

2. С другой стороны, мы имеем такие реакции, как, например, омыление эфиров едкой щелочью, при которых протекает известное, вполне измеримое, время, прежде чем будет достигнуто конечное состояние.

Катализаторы как раз и являются веществами, изменяющими скорость реакций второго рода (ср. Оствальд<sup>288</sup>); это изменение может произойти как в сторону ускорения, так и в сторону замедления. Реакция, когда она протекает без участия катализатора, может идти или с измеримой скоростью, или, напротив, настолько медленно, что надо применить наиболее совершенные методы, чтобы показать, что она вообще имеет место. Термин „катализ“ обычно употребляется именно при ускорении таких, самопроизвольно весьма медленно протекающих реакций, хотя теоретически к этой же категории мы должны отнести все явления изменений скорости реакции в присутствии какого-либо постороннего ве-

щества, при условии, что последнее не входит в состав продуктов реакции, а по окончании ее остается в прежнем, неизмененном виде.

Как примеры катализитических реакций можно привести: инверсию (гидролиз) тростникового сахара кислотой (Н-ионом), многочисленные реакции, вызываемые катализитическим действием мелко раздробленной платины, и окисления, производимые перекисью водорода в присутствии солей железа и марганца. Как пример замедления реакции можно привести прекращение самопроизвольного окисления фосфора на воздухе, вызываемое следами паров эфира; подобного рода действие называется „отрицательным катализом“.

### Механическая модель.

Существует ряд явлений, которые на первый взгляд могут быть приняты за катализитические, но которые надо строго отличать от последних. Механическая модель поможет нам лучше выяснить это. Если мы поместим медную гирьку, например в 500 г, на верхний конец наклонно поставленной полированной стеклянной пластинки, то мы всегда найдем известный уклон, при котором гирька начнет медленно скользить вниз. Это может служить примером всякой реакции, протекающей во времени. Если мы теперь покроем нижнюю поверхность слоем масла (масло будет играть роль катализатора), то скорость скольжения гири значительно повысится. Мы видим, что как в одном, так и в другом случае гиря не остается на верху пластинки, а рано или поздно достигает ее нижнего конца. Но мы можем задержать ее наверху при помощи какого-нибудь рычажка или зажима, — в этом случае груз останется наверху до тех пор, пока не будет выключено задерживающее приспособление. Ни скорость движения груза ни энергия, развиваемая им при этом и зависящая от веса груза и высоты спуска, никоим образом не зависят от той работы, которую пришлось произвести при выключении задерживающего приспособления. Типичным примером такого устранения „первоначальной задержки“ может служить кристаллизация пересыщенных растворов, которые могут оставаться неизменными сколько угодно времени, пока в них не внесут кристаллик соответствующего вещества.

Если в переохлажденный раствор уксусной кислоты, находящейся в длинной трубке, ввести с одного конца кристаллик этой кислоты, то весь раствор затвердевает; как показал Мур<sup>264)</sup>, скорость распространения этого затвердевания совершенно не зависит от количества внесенных кристаллов. Иначе обстоит дело при истинных катализитических процессах; хотя работа, производимая грузом при его падении по наклонной плоскости, никоим образом не зависит от количества масла (катализатора), скорость падения в известных пределах прямо пропорциональна ему. Подобная зависимость является характерной вообще для всех катализитических процессов.

Разумеется, нельзя думать, что такой грубый пример может объяснить все характерные особенности катализитического процесса, но в нем имеются еще два поучительных момента, кроме уже указанных. Во-первых — уменьшение количества катализатора, пристающего к стеклу по мере того, как груз скользит вниз; подобное явление, как мы дальше увидим, часто наблюдается при катализитических процессах. Второй момент особенно важен в связи с некоторыми энзиматическими реакциями. Он заключается в следующем: хотя присутствие катализатора не может ни увеличить ни уменьшить общего количества энергии, развивающейся в течение реакции, все же характер этой энергии может изменяться. Если, груз, предоставленный самому себе, медленно спускается, то почти вся энергия выделится в виде тепла при трении груза о поверхность наклонной плоскости, и, дойдя до нижнего конца ее, груз будет обладать лишь очень малой кинетической энергией. Наоборот, если мы уменьшим трение при помощи масла, то весь почти запас энергии груза при достижении им конца наклонной плоскости мы будем иметь в виде кинетической энергии, и лишь ничтожное количество ее превратится в тепловую при трении. Далее, мы можем заметить, что первые количества масла производят гораздо более заметный эффект, чем дальнейшее прибавление даже значительных порций. Мы увидим впоследствии, что подобное явление часто наблюдается и при энзимах.

Из всего высказанного следует, что катализатор может только изменить скорость уже протекающей реакции. На это можно бы возразить, что иногда, повидимому, и самое начало

реакции вызывается присутствием катализатора: например соединение кислорода с водородом наступает только при внесении в смесь губчатой платины. Однако есть данные, заставляющие предполагать, что и в отсутствии катализатора, при обыкновенной температуре, эта реакция, хотя и весьма медленно, все же протекает. Здесь мы должны иметь в виду то огромное ускорение химических реакций, которое наблюдается при повышении температуры,— скорость большинства реакций приблизительно удваивается при повышении температуры на 10 градусов. Таким образом, если мы обозначим скорость реакции при  $0^{\circ}$  через 1, при  $10^{\circ}$  она будет равняться 2, при  $20^{\circ}$  — 4, при  $100^{\circ}$  —  $1 \times 2^{10} = 1\,024$ . При  $500^{\circ}$  уже можно обнаружить образование воды в смеси кислорода и водорода, и Боде́нштейн<sup>69</sup>, показал, что если мы скро́стъ реа́кции при  $689^{\circ}$  обозначим через 163, то при  $482^{\circ}$  она будет всего лишь 0,28. Ясно, что при комнатной температуре реакция должна ити так медленно, что обычными способами ее не удастся обнаружить,— потребовались бы столетия для того, чтобы образовался один миллиграмм воды. Более прямое доказательство мы имеем в газовом элементе Грова: развивающаяся электрическая энергия может зависеть только от того, что между газами и при обыкновенной температуре происходит химическая реакция.

Другим примером самопроизвольно весьма медленно протекающей реакции может служить разложение метилацетата: если смешать его с водой и оставить при обыкновенной температуре, то он постепенно гидролизируется, образуя алкоголь и уксусную кислоту. Когда разложится определенное количество соединения, дальнейшее разложение прекращается,— наступает состояние равновесия. Обычно это состояние будет достигнуто лишь по прошествии нескольких дней, но если мы в качестве катализатора прибавим небольшое количество соляной кислоты, то процесс закончится в течение нескольких часов.

Можно было бы возразить, что в первом из приведенных примеров соединение водорода с кислородом может происходить только в присутствии паров воды, которые, повидимому, действуют как катализатор. Точно так же гидролиз эфиров водою можно приписать действию имеющегося в ней иона водорода. Однако подобная точка зрения совершенно не

меняет нашего рассуждения, так как скорость реакции чрезвычайно увеличивается новым веществом, которое действует как дополнительный катализатор и которое может быть исследовано самостоятельно.

Мы знаем, что некоторые реакции, которые протекают несомненно без всякого участия какого бы то ни было катализатора, идут так медленно, что только с большим трудом удается их обнаружить (ср. Армстронг<sup>20</sup> и<sup>21</sup>).

Кроме того не надо забывать, что, как указывает Дж. Дж. Томсон и другие авторы, иногда катализатор может вызвать и начало реакции. Это, в сущности говоря, не стоит в прямом противоречии со взглядами Оствальда. Если мы обратимся к нашей механической схеме, то мы увидим, что при известном уклоне стеклянной пластинки трение между ней и грузом окажется настолько значительным, что скольжение не сможет начаться до тех пор, пока мы не уменьшим его давлением масла. Однако само понятие „трение“ заключает в себе представление о движении или по крайней мере о силах, способных его вызвать. Действительно, можно представить себе, что груз сдвигается на неизмеримо малое расстояние, но дальнейшее продвижение останавливается встречаемым сопротивлением. С этой точки зрения определение катализатора формулировалось бы следующим образом. Катализатор есть вещество, способное изменить скорость реакции, уже протекающей или могущей ити без участия внешней энергии, при условии, что будут устранены известные задерживающие моменты. Различие между действием масла, уменьшающего трение, и выключением какого-нибудь задерживающего приспособления состоит в том, что влияние масла оказывается во все время спуска груза по наклонной плоскости, между тем как выключение первоначальной задержки имеет лишь мгновенное значение для начала движения, на скорость которого оно в дальнейшем не оказывает никакого влияния.

#### ХАРАКТЕРНЫЕ ЧЕРТЫ КАТАЛИЗАТОРОВ.

Мы должны упомянуть еще о нескольких особенностях катализаторов. Подобно азотной кислоте при камерном способе получения серной кислоты, энзимы, если только они не разрушаются побочными реакциями, могут быть обнаружены

по окончании реакции в реакционной смеси в неизменном виде; они не входят в состав конечных продуктов реакции, и эти продукты, вообще говоря, будут те же, какие получились бы, если бы реакция протекала без участия катализатора.

Раз прибавление катализатора ведет только к тому, что скорее достигается результат, который все равно был бы достигнут — только в более продолжительное время — и без катализатора, то ясно, что малые количества катализатора дадут тот же конечный результат, что и большие, если мы только соответственно увеличим время. Часто это может служить надежным признаком, позволяющим отличить реакцию, протекающую в силу химического взаимодействия, от каталитического процесса. В первом случае количество продукта реакции будет в точности пропорционально количеству прибавленного испытуемого вещества. Если же прибавленное вещество действует как катализатор, то такой пропорциональности не будет, и влияние больших или меньших количеств катализатора скажется только на скорости образования конечных продуктов реакции. Разумеется, последнее утверждение справедливо только для таких процессов, в течение которых катализатор не разрушается и действие его не парализуется продуктами реакции. Такие процессы известны, и разумеется в этом случае конечный результат будет в известной степени зависеть от количества катализатора; с подобными явлениями нам придется встретиться при изучении некоторых энзимных реакций.

Хотя ускорение реакции пропорционально количеству катализатора, все же ничтожнейшие количества его уже могут быть обнаружены. Так, например, согласно Бредигу, и Бернеку<sup>80</sup>), коллоидальная платина может разложить в миллион раз большее по весу количество перекиси водорода; Вроде нашел<sup>81</sup>), что при реакции между перекисью водорода и иодистоводородной кислотой можно обнаружить каталитическое действие молибденовой кислоты при содержании ее в одну грамм-молекулу на 31 000 000 литров.

#### Катализ при обратимых реакциях.

Естественно может возникнуть такой вопрос: не влияет ли катализатор на положение равновесия, если катализируемая реакция принадлежит к числу обратимых? Бергело и Пеан

де Сэн-Жиль,<sup>20)</sup> показали, что если смешать 1 моль (грамм-молекулу) этилового спирта с одним молем уксусной кислоты, то начинается реакция, которая идет до тех пор, пока смесь не примет состава:  $\frac{1}{3}$  моля спирта +  $\frac{1}{3}$  моля кислоты +  $\frac{1}{3}$  моля эфира +  $\frac{1}{3}$  моля воды. Тот же самый результат будет достигнут, если смешать 1 моль этилацетата с 1 молем воды. Таким образом во всякой смеси этих четырех веществ протекают с различной скоростью две противоположные реакции до тех пор, пока концентрации реагирующих веществ не достигнут вполне определенной величины, при которой скорости обеих реакций окажутся равными.

Допустим теперь, что мы прибавили какой-нибудь катализатор, например соляную кислоту. Ясно, что если только обе реакции не ускорятся в одинаковой степени, то точка равновесия окажется перемещенной. Но это может произойти только при условии поглощения или отдачи энергии, так как всякое перемещение точки равновесия связано с изменением осмотического давления раствора. Поэтому, если наше определение катализатора как вещества, не отдающего и не поглощающего энергию, остается в силе, то отсюда следует, что он должен одинаково ускорить как гидролитический, так и синтетический процессы. Это было экспериментально доказано Кноблаухом<sup>21)</sup> для реакций образования и разложения эфиров в присутствии соляной кислоты. Что касается неизменения точки равновесия, то доказательство этого было дано Келихеном<sup>217)</sup>. Он исследовал катализическое действие оснований на обратимый процесс полимеризации ацетона и показал, что положение точки равновесия при разведенных растворах не зависит ни от природы ни от концентрации щелочи. Точно так же Турбаба<sup>22)</sup> нашел, что равновесие между альдегидом и паральдегидом не зависит от количества или природы катализатора, будь то серный ангидрид, сернокислый цинк, соляная, щавелевая или фосфорная кислоты.

Вышеприведенные положения перестают быть обязательными в том случае, если катализатор в течение реакции каким-либо образом изменяет свое состояние в физическом или химическом отношении. Изменения первого рода особенно важны при действии энзимов. Армстронг<sup>23)</sup> и<sup>24)</sup> показал, что если обратимый процесс протекает с образованием проме-

жущего соединения между катализатором и субстратом, то положение, в силу которого обе противоположные реакции должны одинаково ускоряться, становится недействительным. Другими словами, если катализатор к концу реакции окажется в ином физическом или химическом состоянии, чем он был в начале ее, то он или получил или отдал известное количество энергии, а в таком случае вполне возможно изменение положения точки равновесия. В связи с этим надо подчеркнуть, что большинство реакций, протекающих под действием энзимов, почти термонейтральны, за исключением реакций окисления и восстановления. Это значит, что реакции эти для своего завершения требуют очень небольших количеств энергии.

Мы знаем, какую большую роль играет при коллоидальном состоянии поверхностьная энергия. Герцог<sup>(10)</sup> справедливо указывает, что эта поверхностьная энергия может обусловить различие в положении равновесия при коллоидальном катализаторе (например липаза при гидролизе эфиров) по сравнению с равновесием, устанавливающимся в том случае, когда катализатор находится в состоянии истинного раствора (например при кислоте).

Рассматривая состояние равновесия при обратимых реакциях с кинетической точки зрения, мы должны прийти к следующему заключению: если процесс такого рода ускоряется присутствием катализатора, то всякое изменение точки равновесия, кроме практически полного перемещения ее в одну какую-нибудь сторону, укажет нам, что катализатор повлиял как на синтетический, так и на гидролитический процессы. Например, в случае уксусноэтилового эфира самопроизвольная скорость обеих реакций очень мала, — равновесие достигается только по истечении нескольких недель. Если же мы прибавим кислоты, то для этого достаточно будет нескольких часов. Вспомним, что положение точки равновесия зависит от относительной скорости обеих реакций подобно тому, как место встречи двух путников, идущих навстречу друг другу, зависит от скорости их передвижения. Если бы кислота ускоряла только, скажем, реакцию гидролиза, увеличивая скорость его — как это и есть на самом деле, — примерно в сто раз, а на синтетическую реакцию не влияла вовсе, то равновесие неизбежно установилось бы при таком соотношении реагирующих веществ, когда на сто

частей продуктов гидролиза имелась бы всего одна часть продуктов синтеза; всякий избыток продуктов синтетической реакции сверх этого одного процента указывал бы на то, что и синтетическая реакция тоже ускорена. Таким образом для доказательства, что оба компонента обратимой реакции ускоряются катализатором, нет необходимости, чтобы точка равновесия осталась той же, как при некатализированной реакции. Другими словами, при известных условиях катализатор может влиять на одну реакцию больше, чем на другую, но во всяком случае обе должны ускоряться, так как иначе произошло бы совершенное изменение хода реакции в одном каком-нибудь направлении. Исследуя синтетические способности энзимов, это всегда следует иметь в виду, особенно принимая во внимание, что энзиматические реакции протекают в гетерогенной системе, где изменения, могущие повлиять на положение точки равновесия, особенно легко могут иметь место. С этим обстоятельством часто недостаточно считаются.

### Механизм действия катализаторов.

Весьма вероятно, что целый ряд катализитических реакций может быть объяснен образованием промежуточных соединений. Остwald (ср. Броде<sup>83</sup>) указал, что для того, чтобы эта теория могла считаться правильной, необходимо для каждого данного случая доказать, что сумма скоростей образования промежуточных соединений меньше, чем скорость основной реакции, когда она протекает без катализатора. Такое доказательство и было дано Броде<sup>83</sup>). Иодистоводородная кислота разлагается с измеримой скоростью перекисью водорода; скорость этой реакции в огромной степени увеличивается в присутствии молибденовой кислоты как катализатора. Можно доказать химически, что при этом образуется ряд надмолибденовых кислот, и скорость их образования можно измерить. Эти кислоты очень быстро разлагают иодистоводородную кислоту, так что сумма обеих реакций—образования надмолибденовых кислот при действии перекиси водорода на молибденовую кислоту и разложение ими иодистоводородной кислоты—требует гораздо меньше времени, чем прямое разложение последней перекисью водорода.

Но теория промежуточных соединений не годится для объяснения всех случаев. Так, например, Тафель<sup>358)</sup> показал, что катализитическое действие соляной кислоты при образовании эфиров метилового спирта не может быть объяснено образованием, в качестве промежуточного соединения, хлористого метила  $\text{CH}_3\text{Cl}$ , как это предполагалось. Во-первых, при условиях реакции это соединение вообще не образуется в сколько-нибудь измеримых количествах, а во-вторых, оно оказалось неспособным при прибавлении его вместо соляной кислоты играть роль катализатора.

Хотя некоторые случаи катализа в гетерогенной системе могут быть удовлетворительно объяснены образованием промежуточных соединений, все же, как указывает Денхам<sup>310)</sup>, известен только один случай гетерогенного катализа, когда образование промежуточного соединения действительно удалось доказать. Когда катализатор является в виде отдельной фазы, как это имеет место при энзимах, — надо искать других объяснений.

### КАТАЛИЗ В ГЕТЕРОГЕННОЙ СИСТЕМЕ.

Было бы излишним подробно обсуждать все теории, предложенные для объяснения катализа. Но на одну из них, приобретающую, в связи с коллоидальным состоянием энзимов, особое значение, следует обратить внимание. Это — гипотеза о конденсации реагирующих веществ в поверхностном слое на границе фаз, при чем увеличение скорости реакции может быть обусловлено повышением концентрации. Подобная гипотеза была высказана Фарадэем для объяснения действия платины на смесь кислорода и водорода.

Фарадэй<sup>140)</sup> приводит веские доказательства в пользу этого предположения. Он показывает, что действие платины не может быть объяснено образованием промежуточных окислов, так как если электролитическим путем сделать ее поверхность химически чистой, соединяя металл с положительным или отрицательным полюсом батареи, то активность металла особенно возрастает. Действительно, здесь является необходимым очистить поверхность от различных посторонних веществ, адсорбированных ею из атмосферы. Помимо соединения кислорода с водородом платина способствует

также соединению окиси азота с водородом, при чем окисызываются, что и другие („быть может все“) поверхности, если они достаточно чисты, обладают таким же свойством.

Поскольку энзимы являются коллоидами, все реакции, катализируемые ими, протекают в гетерогенной системе, состоящей минимум из двух фаз. Факторами, влияющими на скорость таких реакций, помимо чисто химических процессов, являются и физические моменты, как, например, диффузия, адсорбция и т. д. Поэтому целесообразнее будет подробнее разбираться в механизме этих реакций несколько позднее, когда мы познакомимся со свойствами коллоидов.

### Катализаторы — химические вещества, а не свойства веществ.

Прежде чем перейти к ознакомлению с энзимами, как особым классом катализаторов, надо обратить внимание еще на один пункт. Некоторые теории относительно природы энзимов утверждают, что всякому веществу соответствующими приемами можно придать свойства катализатора; однако все катализаторы, о которых шла речь в этой главе, представляют собою вполне определенные химические вещества. В настоящее время мы не можем этого сказать про энзимы. Но мы не можем из-за этого отказывать им в определенном химическом строении, по крайней мере до тех пор, пока не будет показано, что вещество определенного состава в известное время обладает свойствами энзима, а в другой момент, не претерпев никаких химических изменений, окажется лишенным этих свойств.

Как примеры органических соединений определенного состава, могущих служить катализаторами, можно привести аминокислоты (ср. работу Дэкина<sup>104</sup>) и никотин (Файя и с<sup>136</sup>).

Более подробные сведения обо всех явлениях катализа можно найти в 10 и 11 главах „Химической статики и динамики“ Меллора, в книге „Катализ“ Райделя и Тэйлора, а также в объемистом труде Г. Вокер „Die Katalyse“.

## ГЛАВА ВТОРАЯ.

### ЭНЗИМЫ КАК КАТАЛИЗАТОРЫ.

#### Исторический обзор.

Еще в начале развития физиологии были выделены из тканей живых организмов вещества, обладавшие свойствами неорганических катализаторов. В 1830 г. Дюбренфо<sup>117)</sup> приготовил экстракт из солода, превращавший крахмал в сахар, подобно тому как это делают крепкие кислоты (Кирхгоф<sup>211)</sup>). Три года спустя Пайэн и Иэрсо осадили алкоголем из подобного экстракта вещество, которое можно было высушить и сохранять и которое обладало сильным действием на крахмал<sup>296)</sup>. Они назвали его „диастазой“.

Когда стали известны другие вещества с подобными свойствами, то их называли „ферментами“ ввиду сходства вызываемых ими процессов с теми, какие наблюдаются при спиртовом брожении (ферментации).

После того как Пастер показал, что спиртовое брожение вызывается присутствием живого организма, диастазу и подобные ей вещества стали называть „растворимыми, или неорганизованными, ферментами“, в отличие от живых организмов вроде дрожжей, которые назывались „организованными ферментами“.

Хотя многие физиологи, как, например, Траубе, держались того мнения, что организованные ферменты обязаны своим действием присутствию внутри них растворимых ферментов, такое двоякое употребление термина „фермент“ давало повод к некоторой путанице. Это побудило Кюне<sup>223)</sup> предложить новое название. Мы приведем цитату из его интересной работы.

„Последнее подразделение (на организованные и неорганизованные ферменты) не заслужило общего признания;

с одной стороны, вещества вроде птиалина, диастазы и т. д. нельзя было называть ферментами, так как это имя уже было дано дрожжам и другим организмам (Брюкке); с другой стороны, указывалось, что нельзя называть, например, дрожжи ферментом, потому что в таком случае все вообще организмы, вплоть до человеческого тела, подошли бы под этот термин (Гоппе-Зейлер). Не останавливаясь на том, почему имя „фермент“ вызвало так много споров, я пользуюсь случаем, чтобы предложить новое название. Я предлагаю наиболее хорошо изученные вещества из разряда так называемых „неорганизованных ферментов“ назвать термином „энзимы“. Я не хочу вкладывать в этот термин содержание какой-нибудь гипотезы, а просто констатирую, что „в дрожжах“ (по-гречески „эн зюмэ“) имеется какое-то вещество, обладающее свойствами, общими всему классу „ферментативных веществ“. Новое имя отнюдь не предполагается применить только для обозначения инвертина дрожжей; оно должно указать, что и более сложные организмы, из которых мы можем получить энзимы — вроде пенсина, трипсина и т. д., не столь уж коренным образом отличаются от одноклеточных, как некоторые это склонны предполагать“.

Поэтому в настоящей монографии мы неизменно будем пользоваться термином „энзим“.

Эфронт<sup>122)</sup> употребил термин „биохимический катализатор“ как эквивалент „энзима“. Это имеет некоторое преимущество в том отношении, что обращает внимание на самую природу агентов, но для постоянного употребления термин несколько длинноват. Может быть удобнее было бы название „биокатализатор“.

### О ПРЕДЕЛЕНИИ.

Таким образом мы можем теперь определить энзимы как катализаторы, производимые живым организмом. Этим мы отнюдь не хотим заранее предрешить невозможность получения их в будущем лабораторным путем; если будет синтетически приготовлено вещество, обладающее свойствами трипсина, то мы с полным правом назовем его тем же именем. При исследовании энзимов происхождение их не имеет существенного значения.

Армстронг<sup>18)</sup> предлагает следующим образом развить данное выше определение: энзимы суть „избирательные, коллоидальные катализаторы, находящиеся в живых клетках и разрушаемые нагреванием“. Я не могу согласиться с такими ограничениями, хотя бы из-за этого определение несколько теряло в отчетливости. Мы должны помнить, что с фактической стороны ограничение энзимов от других катализаторов производится лишь в целях известного удобства и имеет свои отрицательные стороны. Когда известно станет химическое строение энзимов, то они попрежнему останутся энзимами, хотя бы и происходили не из живого организма. Быть может в будущем нам придется отказаться от термина энзим или фермент как названия особого класса веществ.

Далее, прилагать термин „избирательный“ к такому энзиму как эмульсин, действующему на целый ряд различных субстратов, кажется не совсем правильным, да, кроме того, известны простые неорганические катализаторы, которые с полным правом можно назвать избирательными; так, например, реакция между перекисью водорода и серноватокислым натрием катализируется, с одной стороны, ионами иода, а с другой — молибденовой кислотой (с р. А贝尔<sup>19)</sup>). Согласно Девиллю и Дебрэ<sup>20)</sup>, родий в известном состоянии действует как катализатор на муравьиную кислоту, разлагая ее на двуокись углерода и водород; платину в такое состояние привести не удается. Фальк<sup>21)</sup> приводит веские доводы в пользу того, что кажущаяся специфичность липазы обусловливается химическим действием на нее различных субстратов. Этот вопрос будет подробнее разобран в дальнейшем.

Употребление слова „коллоидальный“ тоже, по-моему, неудачно. Некоторые типичные неорганические катализаторы, как, например, гидрозоль платины, действительно находятся в коллоидальном состоянии. Энзимы большей частью тоже находятся в коллоидальном состоянии, но в некоторых случаях приходится дочустить возможность, что активная часть энзима представляет собою не колloid, а только входит в состав адсорбционного соединения с некоторыми коллоидальными веществами. Что касается разрушения при нагревании, то это, действительно, во многих случаях может служить удобным признаком, но потребная для разрушения

температура настолько сильно колеблется в зависимости от различных условий, что представляется нежелательным считать этот признак за обязательный для всякого энзима. Да и некоторые неорганические катализаторы чувствительны к нагреванию.

В данном выше определении сказано, что энзимы ведут себя как катализаторы; поэтому мы прежде всего должны посмотреть, насколько это утверждение справедливо. Как было указано Тэйлором<sup>366)</sup>, не мало затруднений, испытанных при изучении энзимов как катализаторов зависело от того, что недостаточно хорошо отдавали себе отчет в самом содержании понятия „катализ“.

Берцелиус<sup>65)</sup> в своей книге „Учебник химии“ уже обращал внимание на сходство энзимов и катализаторов. Он говорит следующее: „Нам пришлось убедиться, что превращение сахара в углекислоту и спирт, как это происходит при брожении в присутствии нерастворимого тела, которое мы называем ферментом, не может быть объяснено тем-нибудь вроде реакции двойного обмена между сахаром и ферментом: но если мы обратимся к известным нам явлениям из неорганического мира, то мы найдем чрезвычайно похожий процесс в разложении перекиси водорода под влиянием платины, серебра или фибринна; вполне естественно предположить, что в случае фермента мы имеем аналогичный процесс“. И далее: „Мы имеем право, основываясь на фактах, утверждать, что в живом организме, в его тканях и жидкостях, протекают тысячи каталитических процессов“.

Подобные же взгляды высказывались многими физиологами, например Карлом Людвигом, Траубе, Бунге и другими.

### Т Е Р М И Н О Л О Г И Я.

Раньше чем перейти к дальнейшему развитию, занимающего нас вопроса, надо будет вкратце ознакомиться с терминологией, которой придется пользоваться при описании энзиматических процессов. Прежде всего потребуется название для тех веществ, на которые энзиды проявляют свое действие. К сожалению, до сих пор не было предложено ни одного действительно удачного термина. В тех случаях, когда рассматривается гидролитическое действие, можно бы ноль-

зоваться термином „гидролит“, но это название неприменимо при явлениях окисления, внутримолекулярного расщепления, а также при синтетических процессах, например при образовании дисахарида из глюкозы под влиянием мальтазы. В общем, термин „субстрат“, применяемый многими авторами, будет наиболее удобным. Против названия „зимолит“, предложенного Левенхардтом и Пирсом<sup>239</sup>), можно возразить, что он применим только при энзимах, но не при других катализаторах, а такое ограничение, по-моему, нежелательно.

Что касается названия самого энзима, то для этого Дюкло предложил пользоваться окончанием „аза“, приставляемым к названию субстрата, на который данный энзим действует; таким образом, например, лактаза будет энзим, ускоряющий гидролиз молочного сахара — лактозы. Было бы неудобным упразднять давно принятые названия, как пепсин, трипсин и т. д., но вообще следует по возможности придерживаться предложенного Дюкло правила.

Стало обычным говорить об энзиме, действующем, скажем, на белок или крахмал, как о протеолитическом или амилолитическом; но, как указал Армстронг, эти названия составлены неправильно. Амилолитическое — по аналогии с „электролитическим“ — означало бы разложение при помощи крахмала. Чтобы избежать неправильного употребления слов, Армстронг<sup>22)</sup> предлагает, когда мы говорим о действии энзима на соответствующий субстрат, вместо окончания „литическое“ употреблять „клиническое“.

Эйлером<sup>129</sup>) было предложено окончание „эза“ для обозначения синтезирующих энзимов. Это надо признать совсем неудачным. Еще не доказано, что такие энзимы вообще существуют самостоятельно, а не являются теми же ферментами, которые производят гидролиз. Поэтому новый термин представляется излишним.

### КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭНЗИМОВ.

Не только с теоретической, но и с практической точки зрения важно знать, какие свойства мы можем ожидать у вещества, являющегося энзимом. Можно предполагать, что неизвестное вещество, если оно представляет собою энзим,

будет в большей или меньшей степени обладать свойствами, присущими катализаторам вообще.

Мы видели, что в сущности говоря, есть только два свойства, присущих всем катализаторам: во-первых, способность изменять скорость самопроизвольно протекающей реакции, а не вызывать появление новой, и, во-вторых, не входить в состав конечных продуктов катализируемой ими реакции. Из этих двух признаков последний особенно важен. В катализитической реакции нет пропорциональности между количеством катализатора и количеством образовавшихся конечных продуктов. Катализатор или появляется неизмененным в конце реакции, как это бывает в типичных случаях, или иногда может изменяться или разрушаться побочными реакциями, не имеющими никакого отношения к главной. Некоторые другие свойства катализаторов или вытекают из двух вышеуказанных или же, хотя и встречаются часто, все же не являются существенными. Мы теперь посмотрим, как эти свойства проявляются у энзимов.

Часто нелегко бывает ответить на вопрос, вызывают ли энзимы новую реакцию или только ускоряют уже происходящую. Положение, вообще говоря, то же, что при действии платины на смесь кислорода и водорода; там мы могли доказать, что и при комнатной температуре реакция идет, хотя и чрезвычайно медленно. Большая часть энзимов действует как гидролитические агенты, при чем обычно реакция протекает в присутствии большого избытка воды. Нам известно, что вода содержит водородные и гидроксильные ионы, обладающие гидролизующим действием и концентрация их, очень малая при  $0^\circ$ , быстро возрастает с повышением температуры. Следующие цифры покажут это.

Грамм-ионы водорода на литр воды при:

$0^\circ$	$0,35 \times 10^{-7}$
$18^\circ$	$0,80 \times 10^{-7}$
$50^\circ$	$2,48 \times 10^{-7}$

(Кольрауши).

На самом деле, при  $100^\circ$  вода способна гидролизовать тростниковый сахар с образованием глюкозы и фруктозы, с вполне измеримой скоростью. Мунк<sup>271)</sup> показал, что при  $150^\circ$  салицин гидролизуется водой. Поэтому справедливо

будет утверждать, что такой же процесс происходит и при обычной температуре, только очень медленно. Впрочем были описаны случаи, когда и при такой температуре удавалось наблюдать соответственные изменения. Агацотти<sup>11)</sup> нашел, что растворы крахмала при обычной температуре изменяются, при чем образуются декстрины и сахар. Брэйлсфорд Робертсон<sup>322)</sup> наблюдал, что растворы казеината аммония, предоставленные самим себе, медленно изменяют свою электропроводность, подобно тому как это происходит при действии на них трипсина.

Мы уже указали в предыдущей главе, что законы катализа не изменяются в том случае, если реакция, ускоряемая испытуемым катализатором, уже протекает под влиянием другого катализатора; в приведенных нами примерах такими побочными катализаторами служат водородные или гидроксильные ионы.

### Различие в конечных продуктах.

Нам могут встретиться некоторые затруднения, на которых следует остановиться. Во многих случаях энзимы доводят гидролитический процесс не так далеко, как кислоты. Амилаза солода переводит крахмал в мальтозу, между тем как кислоты превращают его в глюкозу; трипсин расщепляет белки до сложных полипептидов, которые могут быть далее разложены на аминокислоты действием другого энзима — эрепсина. Можно привести еще другие примеры, но и этих достаточно. Возражение это несомненно существенно, но некоторые соображения помогут нам разобраться в этом вопросе. Во-первых, возможно, что все указанные реакции дошли бы до конца, если бы были созданы соответствующие условия; мы увидим далее, что часто энзимная реакция останавливается благодаря накоплению продуктов реакции, и если последние удалить или даже просто разбавить реагирующую смесь водой, то реакция идет дальше. Возможно также, что позднейшие стадии реакции протекают очень медленно, и для того, чтобы их обнаружить, надо значительно продлить время наблюдения. Очень поучительно в этом отношении действие пепсина. До последнего времени полагали, что он не способен вести гидролиз белка далее стадии

пептонов; теперь установлено, что при более продолжительном действии гидролиз может пойти и дальше (ср. Хираяма<sup>197</sup>). Точно также экстракт солода может, если реакция идет достаточно долго, довести разложение крахмала вплоть до глюкозы. Образование алкоголя из сахара представляет другой трудный случай. Оказывается, что разные энзимы образуют из одного и того же субстрата различные вещества. Мы можем получить некоторые указания из приведенного в предыдущей главе примера со скользящим по наклонной плоскости грузом; там уже указывалось, что хотя общее количество энергии не зависит от количества катализатора (масла), все же формы, в которых эта энергия проявится, могут быть различными: в одном случае это будет тепловая, в другом — кинетическая энергия.

Во всяком случае до настоящего времени остается невыясненным, почему одна часть реакции одинаково ускоряется двумя различными энзимами, — например, образование пептонов пепсином и трипсином, между тем как другая часть, например, образование аминокислот, одним из них ускоряется очень значительно, а другим — лишь в ничтожной степени.

В связи с этим могут дать некоторые указания опыты Дюкло<sup>115</sup>). Оказалось, что в присутствии едкого натра глюкоза на свету разлагалась с образованием этилового спирта, между тем как при замене едкого натра гидроокисью кальция образовалась молочная кислота. При кальции реакция останавливается, не дойдя до конца. Возможно, что причиной этого явления является различие в физических свойствах молочнокислых натра и кальция. Во всяком случае нет необходимости допускать коренное различие в действии кислот и энзимов только потому, что одни доводят гидролиз дальше, чем другие.

Интересное сравнение действия пепсина и разведенной соляной кислоты приводится Абдергальденом и Штайнбеком<sup>6</sup>). Ни пепсин ни кислота не действуют на пептон; на нативный белок — яичный или сывороточный альбумин и желатину — они действуют приблизительно одинаково, но если белок коагулирован кипячением, то желудочный сок переваривает его, между тем как кислота оказывается неспособной вызвать гидролиз. Из этого очевидно,

что физическое состояние субстрата имеет большое влияние для действия на него различных катализаторов.

По всей совокупности своих свойств энзимы могут быть отнесены только к группе катализаторов. Поэтому мы можем не придавать особенно большого значения тем незначительным различиям, которые наблюдаются у некоторых энзимов по сравнению с более простыми неорганическими катализаторами.

Совершенно ясно, что здесь не может быть речи о стехиометрической химической реакции, так как энзим не входит в состав конечных продуктов и количество последних не зависит от количества прибавленного энзима. С другой стороны, простое „устранение задерживающего приспособления“ исключается тем хорошо известным всякому работавшему с энзимами фактом, что действие, поскольку это касается скорости реакции, прямо пропорционально концентрации энзима.

В общем, принимая во внимание, как мало мы еще знаем вообще о самой природе катализитических процессов, надо полагать, что те противоречия и неясности, о которых мы сейчас говорили, рано или поздно будут разъяснены.

#### КОНЕЧНЫЙ РЕЗУЛЬТАТ НЕ ЗАВИСИТ ОТ КОЛИЧЕСТВА КАТАЛИЗАТОРА.

Следующим вопросом, которым нам придется заняться, будет отношение количества энзимов к конечному результату катализируемой им реакции. Мы уже видели, что при обычном катализе результат этот не зависит от количества катализатора, при условии, что последний не исчезает из сферы реакции, пока она не дойдет до конца. Рис. 1 покажет это на действии трипсина. Кривые представляют собою изменение электропроводности 5% раствора казеина под влиянием различных количеств одного и того же препарата трипсина. Изменение электропроводности, как я показал<sup>42)</sup>, пропорционально количеству образовавшихся пептонов и аминокислот. В кривых мы должны обратить внимание на несколько моментов. Вплоть до восемнадцатой минуты скорость изменения прямо пропорциональна концентрации энзима, как это видно из различной крутизны подъема кривых;

по мере того как реакция идет дальше, одна за другой кривые сливаются с той, которая соответствует наибольшему содержанию энзима, и, наконец, все достигают одного и того же предела. Кривая, соответствующая наименьшему содержанию трипсина, за время наблюдения не достигла этой высоты, вероятно потому, что трипсин, как вещество довольно нестойкое, разрушился. Последнее обстоятельство указывает нам, что нужно быть осторожным при оценке опытов, имею-

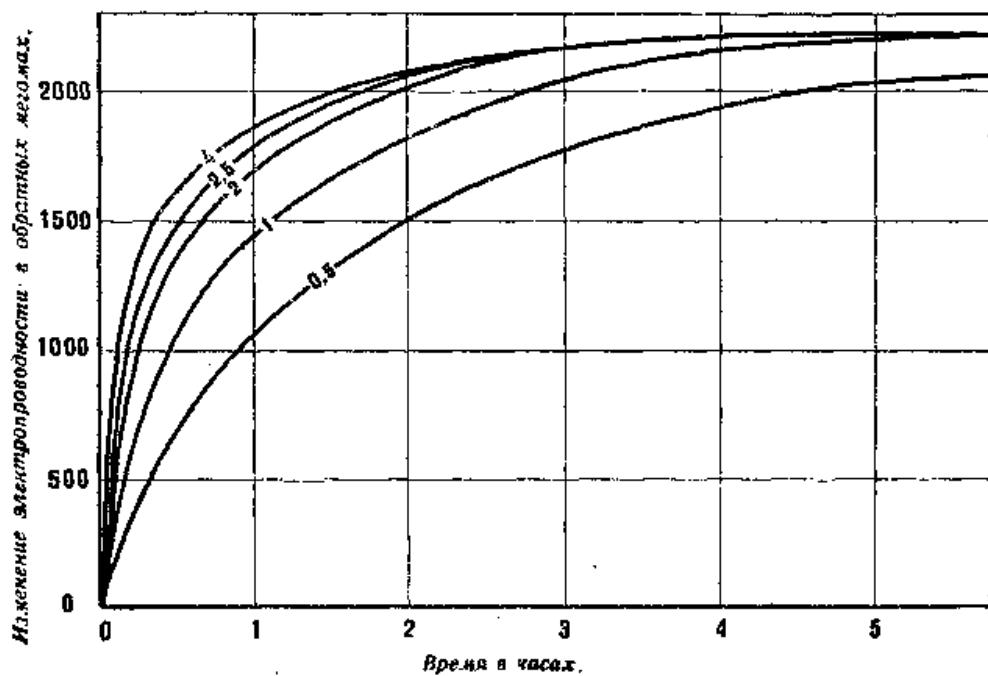


Рис. 1.

щих целью установить соотношение между количеством энзима и конечным результатом. Одно время некоторые исследователи отрицали, что бухнеровская зимаза — спиртообразующее вещество дрожжей — обладает свойствами энзима. Но если мы внимательнее рассмотрим таблицы, приведенные на стр. 160—162 бухнеровской книги „Zymasegärung“, то мы увидим нечто весьма похожее на то, что мы имели при трипсине. Вероятно зимаза разрушается протеокластическим энзимом, находящимся в дрожжевом соку. Впрочем, что касается зимазы, то, как показали последние работы Бухнера и Клатта <sup>91</sup>), уменьшение активности долго хранившихся растворов может зависеть от разрушения кофермента (Гарден и Йоиг, ср. ниже главу 8); прибавление кипя-

ченого сока восстанавливает активность. Многие энзимы, например амилазу, удается по окончании реакции обнаружить в неизмененном виде, и они могут действовать на ново-прибавленный субстрат. Даже трипсин в присутствии больших количеств субстрата или конечных продуктов расщепления белка разрушается не очень быстро. Этим иногда пользуются для извлечения энзимов из содержащих их клеток; так, например, пепсин можно выделить из слизистой оболочки желудка, давая ткани перевариваться в присутствии кислоты при 40°.

То обстоятельство, что малые количества энзима, если соответственно продолжить время опыта, могут произвести такое же действие, как и большие количества, дало возможность автору, совместно со Старлином<sup>52</sup>), выяснить спорный вопрос о природе энтерокиназы. Это вещество, открытое Шеповалниковым в кишечном соке<sup>53</sup>), обладает способностью превращать неактивный зимоген панкреатического сока в активный трипсин. Павлов считает энтерокиназу за энзим, Делезен и другие авторы объясняют его действие химическим соединением с зимогеном, при чем образуется новое вещество — трипсин. Если последний взгляд правилен, то количество образовавшегося трипсина должно точно соответствовать количеству взятой энтерокиназы. Мы нашли обратное. Различные количества энтерокиназы, от 0,0001 куб. см до 1,6 куб. см на 10 куб. см кишечного сока, если дать им действовать в течение двух дней, образуют, в пределах ошибки опыта, одинаковые количества трипсина. При таком методе необходимо, чтобы наименьшая взятая доза испытуемого вещества (энтерокиназы) не могла дать соединения со всем количеством вещества, подлежащего изменению (зимогена трипсина), иначе, даже в случае образования истинного химического соединения, не было бы разницы между действием большого или малого количества. Результаты такого рода опыта приведены в следующей таблице. (См. табл. на стр. 24.)

В первой графе указано количество раствора энтерокиназы в 11,6 куб. см кишечного сока, в дальнейших — длина столбика желатины в меттовских трубочках, переваренного в течение указанного в верхней строке времени.

Количество прибавленной энзимокиназы в куб. см.	Первые 6 часов	Следующие 18 часов	Следующие 24 часа
0,1	0	4,1	10,5
0,4	2	10,0	9,25
1,6	3	11,0	9,0

Там, где трипсин рано образовался, произошло, благодаря отсутствию сколько-нибудь значительных количеств субстрата или продуктов реакции, частичное разрушение энзима.

### Действие энзима проявляется при ничтожных количествах его.

В предыдущей главе приведены были примеры, какие малые количества катализатора уже проявляют свое действие. Это конечно не так удивительно, если катализатор остается неизмененным; все же поразительно, что такие малые количества вообще могут проявлять свое действие. При ферментах мы встречаемся с подобными же явлениями. Согласно О'Сёлливану и Томсону<sup>291</sup>), инвертаза способна гидролизовать количество сахара в 200 000 раз превышающее ее собственный вес; 1 весовая часть сычуга, по Гаммарстену, может свернуть 400 000 частей казеина и т. д. Если мы припомним, что препараты содержат лишь небольшое количество самого энзима и много посторонних примесей, то активность энзимов покажется нам еще более удивительной.

### Действие на обратимые реакции.

В дальнейшем мы увидим, что есть веские основания отнести реакции, катализируемые энзимами, к числу обратимых. Поэтому важно знать, будет ли энзим, ускоряющий реакцию разложения, также действовать и на противоположный, синтетический процесс, подобно тому как мы это видели при неорганических катализаторах, например при водородных ионах. Вопрос этот будет детально разбираться в одной из дальнейших глав, так что здесь я ограничусь только указанием, что для многих энзимов подобное синтетическое действие доказано. Мальтаза образует глюкозу из мальтозы и дисахарид из глюкозы; эмульсин гидролизует глюкозид глицерина и при других условиях синтезирует

его из глюкозы и глицерина; липаза ускоряет гидролиз этилбутират, а также и образование его из масляной кислоты и этилового спирта и т. д.

Что касается положения равновесия, то мы видели, что если действие катализатора сводится к образованию промежуточных соединений, то положение равновесия не будет непременно тем же, что при самопроизвольно протекающей реакции или даже при реакции, протекающей под действием другого катализатора. Зная, что действие энзима часто сопровождается образованием промежуточных соединений (о характере этих соединений мы будем говорить дальше), мы не удивимся, что положение равновесия, достигнутое, например, при действии липазы, будет иным, чем то, которое получится под влиянием ионов водорода (ср. Дитц<sup>112</sup>).

Исследуя действие эмульсина на глюкозид глицерина, я нашел<sup>113</sup>, что концентрация энзима не влияла на положение равновесия и что, следовательно, энзим сам по себе не входит в состав конечных продуктов реакции. Но это не объясняет вопроса, почему при коллоидальном катализаторе равновесие будет иным, чем при кислоте. Ответ на это будет дан дальше.

Интересны следующие замечания Ван'-т-Гоффа<sup>381</sup>: „Теория химического равновесия может найти применение и здесь (т.-е. в органической химии), и это уже осуществилось. Принимая во внимание разнообразие соединений и медленность реакций, не легко выбрать подходящий материал для наблюдений; поэтому, может быть, будет полезно обратиться к заслуживающим самого большого внимания энзимным реакциям. Как показали последние исследования, они прекрасно могут служить для вышеуказанной цели. Во-первых, Фишер<sup>142</sup>) показал, что под влиянием ферментов органические реакции направляются по строго определенному пути, чем избегается нежелательное разнообразие получающихся продуктов. С другой стороны, результаты последних опытов Тамманна<sup>380, 381 и 382</sup>), Дюкло<sup>110</sup>) и в особенности Гилля<sup>193</sup>) не могут быть удовлетворительно истолкованы, если не принимать во внимание законы равновесия. Тамман показал, что под влиянием эмульсина амигдалин расщепляется лишь частично, но если удалить продукты гидролиза, то процесс снова начинает идти дальше. Формулы

реакций, которые приводит Дюкло, также заставляют думать о том, что получается состояние равновесия. Наконец Гиллю, повидимому, удалось добиться синтеза мальтозы \*) из глюкозы под влиянием энзима дрожжей. Из теоретических соображений следует, что если фермент не претерпевает во время своего действия никаких изменений, то должно быть достигнуто некоторое положение равновесия, а не полное разложение субстрата, и что, следовательно, синтетическая реакция также должна была ускориться. Основываясь на теории равновесия, мы вправе задать себе вопрос, не может ли под влиянием зимазы, при некотором превышающем известный предел давлении углекислоты, из спирта и углекислоты образоваться глюкоза; или не окажется ли трипсин в состоянии при условиях, предусматриваемых теорией равновесия, образовать протеины из тех продуктов гидролиза, которые он дает при обычных условиях<sup>4</sup>.

В работе „О синтезирующем действии ферментов“ <sup>382)</sup> Ван-Гофф подробнее развивает свои взгляды по этому вопросу.

#### Разрушение при нагревании.

В противоположность большинству неорганических катализаторов, энзимы, как правило, инактивируются при температурах между 60 и 100°, в зависимости от различных условий.

Поскольку это свойство не является всеобщим, на него нельзя смотреть как на надежный признак энзимного характера данной реакции. Если способность вызывать известное действие исчезает после нагревания, то можно с полной уверенностью предполагать, что это действие обусловлено энзимом или присутствием живых организмов. Но устойчивость по отношению к нагреванию еще не исключает возможности, что процесс вызывается энзимом. Как мы увидим дальше, теплота действует на коллоидальные составные части энзима, обусловливая коагуляцию и осаждение их.

Явление „температурного оптимума“, не наблюдаемое у большинства других катализаторов, зависит, как будет показано дальше, от наступающего при повышении температуры частичного разрушения энзима.

\*) Дисахарид, который Гилль принял за мальтозу, в действительности оказался изомальтозой. Прим. ред.

## ГЛАВА ТРЕТЬЯ.

### ФИЗИЧЕСКИЕ И ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭНЗИМОВ.

---

#### Энзимы как коллоиды.

Одним из наиболее важных физических свойств энзимов является их коллоидальная природа. Выражается она в том, что энзимы не способны к диффузии, — они или совершенно не проходят через пергамент или проходят только чрезвычайно медленно. Это единственная особенность, отличающая энзимы от других органических катализаторов, например аминокислот, в опытах Дэкина или органических оснований в работе Файяnsа, о которых мы упоминали в конце первой главы. Так как многие другие качества энзимов зависят от их коллоидной природы, то надо будет уделить немного места рассмотрению общих свойств коллоидальных растворов, поскольку это будет иметь отношение к природе и характеру действия энзимов.

#### Природа коллоидального состояния.

Первое, что поражает наблюдателя при ознакомлении с коллоидальными растворами, это возможность „растворить“ заведомо, в обычном смысле слова, нерастворимые вещества, вроде металлической платины или сернистого мышьяка; получающиеся при этом растворы оказываются стойкими, но они во многом отличаются от истинных растворов. Резличными способами удается показать, что вещество в таком растворе находится в виде мельчайших, „ультрамикроскопических“ частичек, настолько малых, что при обычном способе рассматривания в микроскоп мы их не увидим.

Энзимы относятся к тому классу колloidов, которые носят название эмульсоидов и в которых обе фазы гетеро-

геннои системы отличаются только количеством содержащейся в каждой из фаз воды. Они представляют собой суспензии частиц вещества, содержащих различные, обыкновенно довольно значительные количества воды, как бы впитанной ими. Таким образом частицы эти как бы приближаются к жидкому состоянию. Взвешены они в весьма слабом растворе того же вещества в воде [ср. Гарди<sup>110</sup> и Квинке<sup>314</sup>].

Лучшим доказательством того, что мы имеем дело с веществом в мелкораздробленном состоянии, является метод Фарадэя-Тиндаля. Он состоит в пропускании через жидкость сильного луча света. Если жидкость содержит взвешенные частички, то путь луча обозначается, если посмотреть сбоку, в виде яркой полосы. При стойких коллоидальных растворах, не осаждающихся при стоянии, свет, исходящий под прямым углом от луча, оказывается поляризованным; это указывает, что частички, отражающие свет, меньше, чем средняя длина световой волны падающего луча.

### УЛЬТРАМИКРОСКОП.

Если в опыте Фарадэя-Тиндаля при помощи оптических приспособлений сделать луч очень ярким и узким и пропустить его через коллоидальный раствор, помещенный в соответствующем сосуде на столике микроскопа, то, употребляя средней силы увеличительную систему, например объектив в 4 м.м и 4-й окуляр, во многих коллоидальных растворах можно увидеть отдельные частицы, в виде блестящих рассеивающих свет кружков, находящихся в оживленном броуновском движении. Подобного рода прибор известен под именем ультрамикроскопа Зидентопфа и Уигмонди<sup>344</sup>.

### СВОЙСТВА, ЗАВИСЯЩИЕ ОТ РАЗВИТИЯ ПОВЕРХНОСТИ.

Если сравнить частицы, например коллоидальной платины, полученные по способу Бредига путем распыления платиновых электродов вольтовой дугой под водою, с таким же количеством платины в виде проволоки или жести, погруженной в воду, то станет ясным, что различие между

нами будет заключаться в огромном увеличении поверхности в первом случае. Согласно Зидентопфу и Нигмонди<sup>344</sup>, в некоторых коллоидальных растворах золота частички обладают диаметром всего в одну миллионную часть сантиметра; если золотой шарик с радиусом в один миллиметр разбить на частицы такой величины, то поверхность их составляла бы площадь в 100 м<sup>2</sup>.

Можно бы предположить, что если раздробление вести все дальше, вплоть до молекулярных размеров, то все явления, зависящие от увеличения поверхности, будут проявляться все резче и резче. На самом деле, однако, этого нет. Хотя мы ничего не знаем о том, что из себя представляют молекулярное состояние, все же известно, что в этом состоянии вещества перестают проявлять свойства, присущие материи, когда она ограничена поверхностями. В то же время надо помнить, что нет резких переходов от материи в виде доступных простому глазу частиц через частицы ультрамикроскопические к молекулам. Такие свойства, как осмотическое давление, способность к диффузии и т. д., встречаются во всех состояниях, отличаясь лишь количественно, в зависимости от величины частиц. Так, например, осмотическое давление, являющееся функцией числа отдельных частиц (молекул, ионов или комплексов) в единице объема, разумеется, будет расти по мере раздробления вещества; те же явления, которые зависят от поверхности, могут обнаруживаться только до тех пор, пока частицы обладают свойствами, обычно присущими нераздробленной материи.

В одном отношении, повидимому, имеется действительное различие. Атом или молекулу, если они несут электрический заряд, мы называем ионом. Коллоидальные частицы тоже могут нести заряд. Но в то время, как величина и знак заряда для каждого иона оказываются постоянными, у коллоидальных частиц и то и другое могут произвольно меняться. Причину этого явления мы скоро узнаем.

Главнейшей характерной особенностью коллоидов, как мы указали, является огромное развитие поверхности. Поэтому мы должны познакомиться с теми свойствами, которые от этого зависят. Из них большее всего обращает на себя внимание поверхностное натяжение. Если мы погрузим твердое тело в жидкость, то пленка на поверхности их соприкосно-

вения представляется как бы натянутой. Всякая свободная поверхность жидкости обладает этим свойством. В существовании этого натяжения мы можем легко убедиться, взяв проволочное кольцо, привязав поперек его кусок нити, так чтобы она свободно висела, и погрузив кольцо в мыльную воду; когда мы вынем кольцо, то на нем останется тонкая пленка, в которой будет плавать нить; если теперь разорвать пленку, коснувшись ее кусочком фильтровальной бумаги с одной стороны нити, то последняя тотчас осталосью частью пленки растягивается в дугу. Представим себе, что коллоидальные частицы взвешены в жидкости, в которой растворено какое-нибудь вещество, поникающее поверхностное натяжение (подобным действием обладает целый ряд различнейших веществ); ясно, что если это вещество сконцентрируется на поверхности жидкости вокруг частиц, то поверхностное натяжение здесь понизится. Так как уменьшение поверхностного натяжения сопровождается выделением свободной энергии, то, согласно второму закону термодинамики, упомянутый выше процесс действительно будет иметь место (ср. Виллард Гиббс<sup>153</sup>). Явление это известно под именем „адсорбции“; оно играет большую роль у всех коллоидов, и вообще всюду, где имеются поверхности соприкосновения между твердыми, жидкими и газообразными веществами. Наглядно это явление можно продемонстрировать, взяв раствор какой-нибудь краски вроде „конгс-рот“ (конго красная) и погрузив в него кусок фильтровальной бумаги; через некоторое время (кажется, что краска сконцентрировалась в бумаге, и если раствор был не слишком крепок, то он может почти совсем обесцветиться, тк как вся краска будет извлечена бумагой). Подобный процесс несомненно играет большую роль в обмене клеток, в которых главная часть протоплазмы состоит из коллоидов, при чем вещества, необходимые для существования клетки, обычно доставляются ей в виде очень разведенных растворов. Как мы скоро увидим, и для действия энзимов поверхностное натяжение имеет большое значение.

Необходимо помнить, что множество процессов, влияющих на поверхностную энергию, разыгрывается на поверхностях раздела между двумя фазами; сюда относятся: появление электрических зарядов, изменение растворимости, сжимаемо-

сти и т. д. Все они должны приниматься во внимание, когда рассматриваются факторы, влияющие на адсорбцию (ср. Оствальд<sup>290</sup>). Общее правило таково, что если какой-нибудь процесс понижает поверхностное натяжение, то он всегда и стремится произойти.

### Способность к диффузии.

В связи с лежащими перед нами задачами нам надо будет остановиться несколько больше на некоторых свойствах коллоидов.

На первом месте стоит способность к диффузии. Тот окончательно установленный Старлингом<sup>355 и 356</sup> и Муром и Роофом<sup>218</sup>) факт, что коллоиды обладают, хотя и очень небольшим, но все же измеримым осмотическим давлением, доказывает, что частицы их находятся в движении, которым и обусловлено осмотическое давление. Следовательно они не могут быть лишены способности к диффузии. Действительно, найдено, что гемоглобин медленно диффундирует в студень из желатины. Что касается способности коллоидов проникать через перепонки, то это зависит исключительно от структуры последних (главным образом от величины пор). Конго-рот, обнаруживающий обычные свойства коллоидов, проникает через одни сорта пергамента и совершенно задерживается другими. У анилиновых красок способность к диффузии колеблется в самых широких пределах, в зависимости от величины их ультрамикроскопических частиц. Точно так же, хотя большая часть энзимов не проходит через пергамент, инвертаза до известной степени способна диализировать; диастаза, приготовленная Френкелем и Гамбургом<sup>147</sup>) из солода, давала в ультрамикроскопе светлый конус, т.-е. содержала лишь столь малые частицы, что они не могли быть раздельно видимы; при диализе она оказалась разделенной на два энзима, из которых один, осахаривавший растворимый крахмал, проходил через пергамент, а другой, растворивший крахмал, задерживался. Епрочем, Воль и Глисс<sup>108</sup>) не считают также толкование обязательным. Ясно, что вещество, проходящее через пергамент, более раздроблено, или, пользуясь терминологией колloidной химии, более высокодисперсно, чем то, которое

задержано перепонкой. Неудивительно, что относительно большая поверхность диффундирующего вещества делает его и более активным, так как, как мы дальше подробнее укажем, действие энзима в значительной степени разыгрывается на его поверхности. Разумеется, что растворение крахмала есть предварительная стадия перед превращением его в сахар.

### ГИСТЕРЕЗИС.

Вторую особенность коллоидальных растворов, на которую следует обратить внимание, представляют явления так называемого „гистерезиса“. Тогда как раствор хлористого натра всегда остается одним и тем же, что бы мы с ним раньше ни делали — кипятили, замораживали, долго хранили и т. д.— коллоидные растворы от таких воздействий до известной степени меняют свои свойства. Другими словами, они нестойки и могут самопроизвольно изменяться. Так, энзимы в растворах постепенно теряют свою активность. Многие, например трипсин, даже высушенные на воздухе, оказываются нестабильными и могут сохраняться только в эксикаторе, в темном и прохладном месте.

Встряхиванием можно инактивировать сырчужный фермент, как это показал Шмидт-Нильсен<sup>337</sup>); вероятно это зависит от явления коагуляции на поверхности, описанного Ромсденом<sup>316</sup>.

### ЭЛЕКТРИЧЕСКИЙ ЗАРЯД КОЛЛОИДОВ.

Многие коллоиды как органические, так и неорганические обладают положительным или отрицательным электрическим зарядом, а незаряженные легко принимают заряд под действием электролитов. Сернистый мышьяк, получаемый из опусканием сероводорода в мышьяковистую кислоту, несет отрицательный заряд; гидроокись железа, приготовленная путем диализирования раствора хлорного железа, заряжена положительно; конг-рот заряжено отрицательно, другая краска — „нахт-блау“ — положительно; сывороточный глобулин в нейтральном растворе не заряжен, в кислом растворе приобретает положительный, а в щелочном — отрицательный заряды. Коагулированный яичный альбумин, как

показал Гарди<sup>170</sup>), и натуальный альбумин из сыворотки (Паули<sup>262</sup>) при близкой к нейтральной реакции оказываются незаряженными. Более поздние исследования Паули и Гандовского<sup>263</sup> и Михаэлиса<sup>265</sup>) показали, что при действительно нейтральной реакции сывороточный альбумин электроотрицателен и теряет свой заряд при очень слабокислой реакции, при концентрации водородных ионов равной  $10^{-6}$  норм., что соответствует разведению одной части уксусной кислоты в 10000 частей воды. Эта величина дает нам, как указывает Михаэлис, представление о степени кислотной или щелочной диссоциации.

Причины заряда могут быть различны, в зависимости от природы вещества. Если оно состоит из частичек, диссоциирующих при растворении, то заряд несомненно зависит от этого факта. Гидроокись алюминия, отдавая отрицательно заряженный гидроксильный ион, сама остается с избытком положительного заряда. Амфотерные тела, вроде протеинов, могут, как мы видели, заряжаться то положительно то отрицательно. В случае различных нейтральных порошкообразных веществ, исследованных Перрэном<sup>300</sup>), — каолина, соры, хлористого серебра, и т. д., — оказалось возможным сообщить им тот или другой заряд, подщелачивая или подкисляя воду, в которой они взвешивались. Повидимому тут порошок адсорбирует гидроксильные или водородные ионы, которые и сообщают ему свой заряд. Большинство нерастворимых порошков или твердых тел при погружении в воду заряжаются отрицательно, как это показал Квинке, но при помощи кислоты мы можем изменить знак заряда на обратный (Перрэн). Наличие заряда легче всего обнаружить, подвергая раствор действию электрического поля в трубке между двумя электродами, особенно пользуясь методом Уетхэма<sup>395</sup>); коллоидальные частицы направляются тогда к полюсу, противоположному заряду частицы (ср. исследования Гарди<sup>170, 172 и 173</sup>).

#### ЭЛЕКТРИЧЕСКИЙ ЗАРЯД ЭНЗИМОВ.

Есть указания, что энзимы несут электрический заряд. Это вполне вероятно, но пока нет уверенности, что мы действительно имеем дело с чистыми энзимами, пожалуй, несколько преждевременно придавать этому обстоятельству

большое значение. Михаэлис<sup>25)</sup> нашел, что диастаза солода может быть заряжена положительно и отрицательно, в зависимости от реакции среды. Пепсин, который электротрищателен в нейтральном растворе, можно зарядить положительно при помощи кислоты. Трипсин отрицательно заряжен в нейтральном и щелочном растворе, положительно — в кислом. По Исковеско<sup>26)</sup>, пепсин даже после диализа электроположителен; то же самое касается каталазы. Лёб<sup>234)</sup> указывает, что пепсин и трипсин электролитически диссоциированы — первый как слабая щелочь, второй — как слабая кислота. Но Исковеско считает, что эта гипотеза не может объяснить все экспериментальные данные.

Согласно Михаэлису и Давидсону<sup>256)</sup>, изоэлектрическая постоянная ( $I$ ) для пепсина равняется приблизительно  $5,5 \times 10^{-3}$ ; другими словами, при такой концентрации водородных ионов пепсин движется в электрическом поле к обоим полюсам. Если выразить это в собственной кислотности пепсина, то мы получим (принимая  $R$  за константу диссоциации пепсина):

$$R = 5 \times 10^9,$$

$$\text{так как } I = \frac{R^2}{K^\nu},$$

где  $K^\nu$  есть константа диссоциации воды.

### Адсорбция.

Мы уже видели, что коллоиды путем адсорбции могут захватывать различные вещества, в том числе и другие коллоиды. Процесс этот идет и тогда, когда оба вещества не заряжены, но он сильно уменьшается или увеличивается, если вещества несут одинаковые или различные электрические заряды. Такие „адсорбционные соединения“, или „коллоидальные комплексы“, как они иногда называются, играют большую роль в деятельности энзимов, да и вообще в физиологической химии. Чтобы лучше понять их природу, или, вернее, их характерные качества, обратимся к примеру. Если смешать электроотрицательный сернистый мышьяк с электроположительной гидроокисью железа в таких количествах, чтобы полученная смесь была электронейтральна, то оба вещества выпадут в виде колloidного комплекса, и жид-

кость над осадком будет прозрачна и бесцветна. Иногда указывалось, что осадок растворим в избытке того или другого коллоида. Но если мы поставим ряд опытов, начиная с избытка одного вещества и кончая избытком другого, то мы увидим, что приведенное утверждение неправильно выражает истинное положение вещей. Предположим, что мы так подобрали наш ряд, что нейтральная смесь и полное осаждение приходятся в середине ряда; тогда мы увидим, что и во всех других смесях тоже произошло осаждение, только количество осадка правильно убывает в обе стороны ряда, т.-е. по мере увеличения избытка того или другого коллоида. Далее, так как оба коллоида отличаются друг от друга окраской, то по оттенку осадка мы увидим, что он состоит из разных количеств обоих компонентов, в зависимости от того, который из них был в избытке. То же самое касается жидкости над осадком,— она всюду состоит из смеси обоих коллоидов. Мы должны принять, что образовался ряд новых коллоидов, представляющих из себя адсорбционные соединения первоначальных двух; соединения эти образованы в самых разнообразных пропорциях. Этим они отличаются от обычных химических соединений, которые образуются всегда в строго определенных соотношениях. Состав же коллоидных соединений меняется, завися от количества отдельных коллоидов в смеси (ср. Оствальд<sup>286</sup>).

Важной особенностью адсорбционных процессов является закон, которому подчиняется образование комплексов. Чтобы лучше понять его, обратимся опять к конкретному примеру. Пикриновая кислота растворяется в воде и эфире, притом в первой менее, чем во втором; при определенных количествах воды, эфира и кислоты, определенное количество, например четыре пятых пикриновой кислоты, окажутся растворенными в эфире. Увеличим теперь вдвое количество кислоты, оставив количества воды и эфира неизмененными; всем известно, что количество кислоты удвоится одинаково как в эфире, так и в воде; это — пример физического распределения в силу различной растворимости. Возьмем теперь чисто химическую реакцию — между азотнокислым серебром и соляной кислотой. Если к раствору ляписа прибавить достаточно количества соляной кислоты, то все серебро будет осаждено, и дальнейшая прибавка кислоты уже не вызовет

никакого осадка. Наконец возьмем случай адсорбционной реакции между коллоидами — целлюлозой в виде фильтровальной бумаги и слабым раствором конго-рот. Через некоторое время окажется, что часть краски, но не вся, осадилась на бумаге, т.-е. реакция имеет нечто общее как с химической, так и с физической: с физической в том отношении, что часть краски осталась в растворе; с химической потому, что произошло известное осаждение, как с хлористым серебром. В противоположность чисто физическому процессу, при количественном исследовании окажется, что при удвоении количества краски бумагой связается краски не удвоенное количество, а несколько меньше, именно первоначальное количество, умноженное на некоторый корень из двух; во многих адсорбционных процессах корень этот оказывается меньше квадратного. Если выразить это в алгебраической форме, то окажется, что при увеличении концентрации раствора в 2 раза, количество адсорбированного вещества увеличится не в 2 раза, а в 2 в степени  $\frac{1}{n}$ , где  $n$  больше единицы и обычно меньше двух, в среднем от 1,4 до 1,7. Ясно, что мы можем говорить об адсорбции во всех случаях, покуда  $n$  меньше бесконечности; в последнем случае мы будем иметь чисто химическую реакцию;  $\frac{1}{n}$  тогда равнялось бы нулю, а всякое число в нулевой степени равно единице; другими словами: количество хлористого серебра всегда одно и то же, независимо от концентрации соляной кислоты. Если  $n$  равно единице, то мы получим выражение для физического распределения, согласно растворимости.

Мы видим, таким образом, что существенной особенностью адсорбционных процессов является образование относительно большего количества соединения в разведенных растворах, чем в концентрированных. Много важных фактов из области химии коллоидов, особенно, например, из отношений токсинов к антитоксинам, находят себе объяснение в приведенном законе.

Интересно посмотреть, что означает приведенное выше выражение, если  $\frac{1}{n}$  меньше единицы; оно должно относиться к случаям, когда в более крепких растворах образуется больше адсорбционного соединения. Хотя подобные случаи и редки, все же, повидимому, они иногда встречаются.

Легко представить себе, что хотя адсорбция может произойти и между незаряженными коллоидами или между несущими одинаковый заряд, процесс значительно облегчается, если оба тела заряжены противоположно. Это наглядно видно на отношении бумаги к коллоидальным краскам. В воде бумага заряжена отрицательно (ср. Винкельман. Руководство физики, 2-е изд., 1905, стр. 955). Конго-рот тоже заряжено электроотрицательно, поэтому адсорбция почти отсутствует; нахт-блау, которое заряжено положительно, адсорбируется очень сильно (Бэйлисс<sup>41</sup>).

### Стойкость суспензий.

Прежде чем перейти к влиянию электролитов на коллоиды, мы кратко упомянем о факторах, обусловливающих стойкость коллоидальных суспензий. Таких факторов указано много, и, несомненно, что часто они действуют совместно. Мы видели, как уничтожение электрического заряда влечет за собой выпадение коллоидов; Гарди<sup>171</sup>) высказал предположение, что одноименно заряженные частицы благодаря взаимному отталкиванию более стойко удерживаются в жидкости. Но есть много незаряженных коллоидов, которые тоже очень стойки, так что должны быть еще какие-то условия, обеспечивающие эту стойкость. Вероятно незначительность размеров частиц тоже препятствует осаждению благодаря большому трению; наконец надо помнить, что частицы находятся в постоянном движении, подобно частицам газа; об этом можно судить по их осмотическому давлению, а также по тому, что они способны диффундировать в направлении, обратном действию силы тяжести,— гемоглобин проникает в трубку, наполненную застывшей желатиной, даже если ее подвесить отверстием вниз в раствор упомянутого вещества.

### Осмотическое давление.

Согласно эйнштейновской теории броуновского движения, справедливость которой недавно исчерпывающе доказана опытами Перрэна<sup>301, 302, 303 и 304</sup>), кинетическая энергия частицы тождественна с энергией молекулы жидкости, в которой она сuspendedирована, и, следовательно, с энергией

всякой другой молекулы. Поскольку дело идет об осмотическом давлении частицы, молекулы и ионы представляются таким образом равнозначными, и величина производимого ими эффекта будет зависеть только от числа их в единице объема.

Если коллоиды электрически диссоциированы, как это имеет место у многих красок и солей протеинов, то главная роль в создании осмотического давления — подчас весьма значительного, несомненно приходится на долю ионов (Рооф<sup>319</sup> и 320), Бэйлисс<sup>44</sup>). Так как органический ион подобных солей благодаря своей величине не может проникнуть сквозь пергаментную перегородку осмометра, то и неорганический ион не может пройти сквозь нее, задерживаясь электростатической силой притяжения, существующей между противоположно заряженными ионами. Неорганический ион может проникнуть в перепонку лишь настолько, насколько это позволит электростатическая сила; он как бы образует слой на противоположной поверхности пергамента; слой этот известен под именем «двойного слоя Гельмгольца».

Относительная роль в образовании общего осмотического давления, приходящаяся на коллоидальные частицы, молекулы и ионы, подчиняется сложному закону равновесия, пока еще недостаточно изученному.

Если бы один из ионов мог проникать через перепонку, а другой задерживался, то по обе стороны перепонки образовалась бы разность потенциалов, и получилась бы возможность вечного движения.

### Влияние электролитов.

Мы уже видели, что заряженный колloid может осадить колloid противоположного заряда; неудивительно, что и электролиты обладают такою же способностью. Сернистый мышьяк, будучи электроотрицателен, осаждается положительными ионами. Электроположительная гидроокись железа осаждается ионами отрицательными. Прибавляя электролит, хотя бы хлористый натр, мы вводим и положительный и отрицательный ионы, которые должны обладать противоположным действием. Как нам убедиться, что осаждение обусловливается ионом, заряженным обратно по сравнению с осаждаемым колloidом? Ответ на это мы получим, сравнивая действие ряда различных солей с одинаковыми катио-

нами или анионами. Хлористый, сернокислый и фосфорно-кислый натрий на отрицательные коллоиды действуют почти одинаково, тогда как на положительные коллоиды действие сульфата больше чем вдвое сильнее хлорида, а фосфат действует в три с лишним раза сильнее.

Прежде уже указывалось, что органические коллоиды, например сывороточный глобулин, можно кислотой зарядить положительно, а щелочью отрицательно. В таком виде, в случае положительного заряда, они осаждаются отрицательными коллоидами или ионами, вроде сернистого мышьяка или иона железистосинеродистой кислоты; если же они заряжены отрицательно, то осаждать их будут положительные коллоиды или ионы.

### СЛОЖНЫЕ КОЛЛОИДАЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ.

Нетрудно представить себе, что если мы будем иметь смесь различных коллоидов и электролитов, с какой мы встречаемся, например, в живой клетке, то все явления усложняются до чрезвычайности, и естественно, что мы пока о них знаем еще очень мало. Как пример можно привести сравнительно простой случай с двумя коллоидами и одним электролитом. Бумага и конго-рот, оба электроотрицательные, обладают лишь слабым адсорбционным средством друг к другу; присутствие положительных ионов вызывает сильную адсорбцию, между тем как анионы почти не оказывают действия. Если взять электроотрицательную бумагу и положительно заряженную краску, то и здесь оказывается действие катионов, только в обратном смысле, — без них адсорбция значительно сильнее (Бэйлисс<sup>41</sup>). Объяснение в обоих случаях одно и то же, — катион, обладающий обратным по сравнению с бумагой зарядом, уменьшает или даже изменяет знак заряда последней. Это благоприятствует адсорбции электроотрицательной краски и уменьшает адсорбцию при электроизложительной краске.

### ФИЗИЧЕСКИЕ И ХИМИЧЕСКИЕ МОМЕНТЫ.

Очень важно помнить, что ко всем коллоидным реакциям надо подходить и с физической и с химической стороны. Некоторые коллоиды обладают как бы избирательным адсорб-

ционным сродством друг к другу, которое нельзя считать чисто химическим, так как оно подчиняется законам адсорбции, а не закону постоянных отношений. Факт этот особенно важен, когда дело идет об энзимах.

Надо обратить внимание, что многие реакции одинаково хорошо и с одинаковым правом могут быть рассматриваемы как явления чисто химические и как явления коллоидально- и физико-химические. Эти точки зрения нельзя считать противоположными, но подход к вопросу различен. Так, например, хорошо известный факт осаждения белка железистосинеродистым калием и уксусной кислотой можно объяснить нерастворимостью в кислоте образовавшегося соединения белка с ферроцианидом; или можно сказать, что белок, при нейтральной реакции являющийся незаряженным и потому мало чувствительным к небольшим количествам электролитов, будучи заряжен положительно действием водородного иона кислоты, осаждается четырехвалентным анионом железистосинеродистого калия.

Не следует забывать, что физические свойства поверхности зависят и от химической природы вещества, образующего эту поверхность. Дальше мы увидим, что вероятно энзимы проявляют свое действие, концентрируя реагирующие вещества на своей поверхности. В таком случае, если химическая природа энзимов не имеет значения в смысле вступления их в химическую реакцию с субстратом, она все же может в известной мере содействовать или противодействовать адсорбции.

#### Очистка энзимов.

Итак, энзимы — коллоиды, и как таковые они увлекают с собою, путем адсорбции, всевозможные вещества, находившиеся в растворе, из которого мы их желаем выделить. Поэтому неудивительно, что амилаза и инвертаза при обычных способах получения дают реакции на углеводы, а пепсин и трипсин — белковые реакции. Но опыт показал, что по мере очистки энзимы дают все меньше характерных реакций и в то же время они становятся все более нестабильными. Потеря активности по мере очистки может в некоторых случаях зависеть от того, что при этом удаляются необязательные для деятельности энзима вещества — электро-

литы, ко-энзимы и т. д.; так, амилаза не действует в отсутствии нейтральных солей, липаза печени без желчнокислых солей, пепсин без кислоты. Если иметь этот факт в виду, то можно после очистки восстановить активность энзима, прибавляя необходимые вещества.

Надо помнить, что некоторые энзимы могут по своему характеру быть близкими к субстрату, на который они действуют, так как мы дальше увидим, что между отдельными энзимами и соответствующими субстратами существует очень тесная связь.

Повидимому наиболее чистыми препаратами энзимов являются в настоящее время инвертаза Осборна<sup>285</sup>), амилаза Френкеля и Гамбурга<sup>147</sup>) и пепсин Пекельхаринга<sup>297</sup> \*). О способах их очистки мы будем говорить в следующей главе, а теперь посмотрим, какими свойствами обладают такие очищенные препараты.

#### Энзимы не представляют собою протеинов.

Инвертаза Осборна не давала ни одной белковой реакции, кроме осадков с сернокислой медью, уксуснокислым свинцом и фосфорновольфрамовой кислотой; миллионову, ксантоопротеиновую и биуретовую реакции она давала очень слабо. Таким образом она по природе своей не белковое вещество. Но оказалось невозможным освободить ее нацело от углевода; последний был затем признан Келле за маннозу<sup>218</sup>). Однако, по Зальковскому<sup>333</sup>), инвертаза не содержит ни гумми ни каких-либо других углеводов, так что в настоящее время еще нельзя решить, являются ли они необходимой составной частью или нет. Интересно, что амилаза Френкеля и Гамбурга тоже содержала небольшое количество углевода, только не маннозу, а пентозу. Она тоже не давала белковых реакций — ни биуретовой ни ксантоопротеиновой и лишь слабый намек на миллионову реакцию.

Инвертазу не удавалось получить без золы, но количество последней колебалось. Энзим всегда содержал азот.

\* ) Наиболее чистыми энзимными препаратами теперь надо считать пероксидазу и инвертазу Вильштеттера и его сотрудников.

По сообщению Эйлера, Линдберга и Меландера<sup>133)</sup>, самый чистый из полученных ими препаратов инвертазы содержал маннозу, но поразительно мало азота. Наиболее активный препарат содержал его всего 0,36%. Этот препарат был почти вдвое активнее полученного О'Сэлливаном и Томсоном, который содержал 4,2% азота. В дальнейшей работе Эйлер и Кулльберг<sup>132)</sup> показали, что азотистый компонент удается удалить диализом, при чем активность энзима еще возрастает. В противоположность этому Мэтьюз и Гленн<sup>146)</sup> склонны видеть в инвертазе соединение протеина с углеводом, так как их препараты всегда давали слабую биуретовую реакцию и активность их шла приблизительно пропорционально с содержанием азота. Однако опыты Эйлера заставляют думать, что азот не является необходимой составной частью инвертазы.

Мэтьюз и Гленн<sup>146)</sup> предлагают теорию строения энзимов, близко подходящую к бертрановской, с которой мы скоро познакомимся. Они рассматривают энзимы как соединение коллоида с активным началом; первый по природе своей близок к субстрату, а действующее начало, например у диастазы и инвертазы, является протеином.

Шибрам<sup>112)</sup> приготовил диастазу по несколько измененному методу Френкеля и Гамбурга и считает, что она состоит из иолипептида с 7—8% азота, сравнительно простого строения, и углевода, редуцирующего только после гидролиза. Но не приводится доказательства, что оба эти компонента необходимы для действия энзима.

Далее, Бейеринк<sup>34)</sup> показал, что амилаза не может заменить собою ни углеводы ни азотсодержащие вещества в питательной среде для дрожжей или бактерий.

Непсин Пекельхаринга в довольно концентрированных растворах давал большинство реакций на белок, но не содержал фосфора, чем не подтверждается взгляд, будто бы энзимы представляют собою нуклеопротеиды. Препарат содержал мало золы — всего 0,1%. Он вращал плоскость поляризации влево и был чрезвычайно активен: 0,001 миллиграммма в 6 куб. см 0,2% соляной кислоты растворяла ключок фибрина при 37° меньше, чем в двадцать часов. Одной из наиболее любопытных особенностей препарата

является, что он был почти нерастворим в воде, но легко растворялся в 0,2% соляной кислоте.

В общем, новидимому, разные энзимы имеют различный химический состав, как это и можно было предполагать. Некоторые из них как будто бы принадлежат к неизвестному пока классу химических соединений; они содержат в своей молекуле азот и углеводы.

Можно еще указать, что, согласно Розенталеру<sup>230)</sup>, эмульсин не осаждается железистосинеродистым калием с уксусной кислотой, а Хата<sup>174)</sup> нашел, что энзимы легче осаждаются солями ртути, чем обычные белки.

Те очищенные энзимы, о которых говорилось выше, были получены в настолько концентрированных растворах, что должны бы, будь они веществами белкового характера, давать все характерные для протеинов реакции. Этим опровергается приводимое иногда возражение, что энзимы обнаруживают свое действие в столь сильном разведении, что нельзя ожидать, чтобы они давали белковые реакции.

С другой стороны, Михаэлис и Давидсон<sup>258)</sup> утверждают, что трипсин обладает всеми свойствами полученного Гаммарстеном из поджелудочной железы нуклеопротеида. Оптимум коагуляции для последнего лежит при очень слабокислой реакции (концентрация водородных ионов равна  $2,6 \times 10^{-4}$ ), то есть так близко от изоэлектрической точки трипсина ( $[H] = 1,35 \times 10^{-4}$ ), что можно принять упомянутое вещество за тождественное с трипсином. Но надо принять во внимание, что величины концентраций ионов водорода фактически в одной случае вдвое больше, чем в другом. Осадок действительно обладал триптическими свойствами, но и прозрачная жидкость над ним тоже, так что более чем вероятно, что трипсин просто был захвачен в силу адсорбции. Кроме того подобный же осадок, полученный из экстрактов поджелудочной железы, не содержащих трипсина, не обладал триптическим действием. Авторы объясняют эту инактивность небольшим химическим изменением препарата. Утверждают также, что ни один адсорбент не может связать такие значительные количества трипсина. Но как можно было узнать истинное количество энзима? Весьма вероятно, что он составлял лишь ничтожную долю осадка. Наконец, указывалось, что если растворить осадок в слабой щелочи, то

он не давал биуретовой реакции; этот факт уже совсем противоречит предполагаемой белковой природе энзима. И он г<sup>407)</sup> нашел, что впрыскиваниями трипсина не удается вызвать образования антитрипсина, что также противоречит предположению об его белковой природе, потому что известно, что инъекции белков влекут за собою образование специфических антител.

Бергран с 1897 г.<sup>62)</sup> проводит взгляд, что энзимы представляют соединение двух компонентов. В докладе перед французской Ассоциацией содействия наукам он излагает свою теорию следующим образом: один из компонентов способен сам по себе, но лишь в незначительной степени, вызывать характерную для данного энзима реакцию; необходимо присутствие второго вещества, чтобы повысить активность до измеримых пределов. Первым компонентом, в зависимости от случая, является кислота, щелочь, соли кальция, магния и т. д. Второй компонент — более сложное вещество, коллоидального характера, часто приближающееся к белкам. Впоследствии мы встретимся с более подробными указаниями на то, что подобные энзимы действительно существуют. Взгляда на энзимы как на вещества комплексного характера придерживаются также Е. Ф. и Г. Е. Армстронги<sup>19)</sup>.

### Энзимы как свойства.

Если принять во внимание, как по мере очистки энзимы все более и более теряют характер какого-нибудь определенного химического соединения, то становятся отчасти понятными взгляды, высказанные Де-Йагером<sup>203)</sup> и Артюсом<sup>32)</sup>. Эти авторы говорят, что энзимы не представляют собою определенных химических веществ, но что различнейшим соединениям можно придать свойства, благодаря которым данное вещество будет действовать, как энзим. Таким образом мы имеем дело не с веществами, а со свойствами. Утверждалось даже, что действие может проявляться на расстоянии. Но опыты, приводимые в подтверждение этого взгляда, никак нельзя назвать убедительными. Я сам повторил один из них, но ни разу не получил тех результатов, о которых говорят авторы. Опыт настолько интересен, что стоит привести его. Раствор пепсина в соляной кислоте

наливается в закрытую с одного конца трубку из пергамента, а трубка помещается в сосуд с раствором соляной кислоты той же крепости. Затем в обе жидкости кладутся кусочки сваренного куриного белка, и все оставляется на несколько дней при 37°. Пепсин не может проникнуть через пергамент, однако утверждалось, что через некоторое время белок во внешней жидкости оказывается переваренным. Я нашел, что, вопреки этим указаниям, белок остается совершенно нетронутым, хотя наружная жидкость дает сильную биуретовую реакцию благодаря диффузии продуктов переваривания из заключенной внутри пергаментной трубки смеси. Быть может в опытах авторов в диффузииных трубках имелись ускользнувшие от внимания отверстия. Нечто подобное этой теории предлагает Барендrecht<sup>28)</sup>, рассматривающий энзимы как радиоактивные вещества и приписывающий их действие соответственному излучению.

Уже говорилось, что неорганические, а также и некоторые органические катализаторы являются веществами вполне определенного химического строения и действуют они во многих случаях путем образования промежуточных соединений опять-таки определенного состава; поэтому, по крайней мере до тех пор, пока не будет доказано обратное, мы имеем полное основание принимать, что и коллоидальные органические катализаторы, или энзимы, тоже являются веществами определенного строения.

В то же время нет ничего невероятного в том, что если бы два соединения различного химического состава обладали свойством одинаково концентрировать на своей поверхности какое-нибудь вещество, то вызываемое этим действие было бы одно и то же. В таком случае мы могли бы говорить об энзимах как о свойствах поверхностей, но отсюда еще далеко до признания „действия на расстоянии“.

#### Действие нагревания.

В противоположность неорганическим катализаторам, энзимы, как правило, разрушаются, если подвергнуть их действию высокой температуры. Потребная для этого температура значительно колеблется смотря по обстоятельствам, оставаясь в общем ниже 100°. Одни энзимы оказываются

более чувствительными, другие — менее. Свойство это несомненно зависит от коллоидальной природы самих энзимов или каких-то тесно с ними связанных веществ. Новейшие наблюдения, о которых подробнее будет говориться дальше, указывают, что разрушение при нагревании не является обязательным признаком всякого энзима. Некоторые энзимы, при известных условиях, могут переносить температуру кипячения воды. Представляется весьма вероятным, что по крайней мере в некоторых случаях инактивирование при нагревании зависит от изменения одного только компонента коллоидальной системы, часть которой составляет энзим. Поэтому влияние нагревания не может служить надежным отличительным признаком, по которому можно бы судить, имеем ли мы дело с энзимом или нет. Строго говоря, только катализитические свойства можно считать таким решающим признаком.

#### Отличие от протоплазматического действия.

Исно, что действие нагревания не может помочь нам решить, имеем ли мы дело с энзиматическим процессом или с деятельностью живой клетки. Возможно, что разница здесь только кажущаяся, но во всяком случае в настоящее время мы знаем ряд процессов, вызываемых живыми клетками, и которые мы не можем вызвать действием энзимов. Кроме того, если даже все клеточные функции зависят от энзимов, то ведь клетки размножаются, следовательно увеличивается и количество энзимов, и течение реакции в обоих случаях будет различно.

#### Антисептики.

При помощи антисептиков мы можем провести такое разграничение. Жизнь протоплазмы становится невозможной при таких количествах антисептиков, которые совсем, или почти совсем, не влияют на деятельность энзимов. В то же время надо иметь в виду, что некоторые энзимы очень чувствительны к отдельным антисептикам, вроде формальдегида. В общем, наиболее безвредными, повидимому, являются толуол и крезол.

В некоторых случаях фильтрованием через пористую глину или беркфельдовские свечи можно избавиться от присут-

ствия живых клеток, но так как все коллоиды более или менее сильно адсорбируются поверхностями, то при этом всегда происходит сильная потеря очищаемого вещества, по крайней мере до тех пор, покуда фильтр не насытится энзимом.

### Новообразование энзимов.

Есть указания, что можно добиться образования энзима которого раньше в данных клетках не было. Дюкло<sup>121)</sup> нашел что *Pennicillium glaucum*, выращиваемый на молочно-кислом кальции, образует только инвертазу; если выращивать его на крахмале, то он образует кроме того и амилазу; при культивировании его на молоке можно обнаружить образование протеокластического энзима. Абергальден и Капфбергер<sup>2)</sup> обнаружили, что при впрыскивании яичного белка, лошадиной сыворотки, пептона из шелка, желатины, казеина и т. д. в плазме появляется энзим, могущий гидролизовать глицил-тирозин; инъекции лактозы и других углеводов влекут за собою образование энзимов, гидролизирующих углеводы. Предполагается, что это явление представляет собою защитительное мероприятие организма, имеющее своей целью удаление из крови веществ, которые не могут быть использованы. Оптический метод, употреблявшийся для обнаружения протеокластического действия, основан на наблюдении весьма малых изменений вращательной способности сыворотки; принимая во внимание всю сложность реакций, происходящих при прибавлении к сыворотке постороннего белка, я полагаю, что эти опыты нуждаются в проверке. Из прежних работ того же автора известно, что красные кровяные тельца содержат известное количество протеокластического энзима, так что даже если результаты его опытов правильны, то они могут указывать на небольшой гемолиз или повышенную проницаемость эритроцитов, так что нет надобности обязательно принимать новообразование энзима.

„Реакция на беременность“, зависящая, как принимается, тоже от одного из таких „оборонительных энзимов“, вызвала множество разноречивых заключений. Обобщая имеющиеся данные, я прихожу к заключению, что реакция эта не специфична и потому легко приводить к ложным выводам.

Если бы удалось доказать, что при впрыскивании известных веществ удается вызвать появление до тех пор заведомо отсутствовавших энзимов, то теория оборонительных приспособлений могла бы считаться более вероятной; пока что подобного доказательства еще не дано.

Вопрос этот близко соприкасается с проблемой непосредственного приспособления. Легко видеть, что приобретение какими-нибудь бактериями способности использовать необычный питательный материал можно объяснить тем, что с самого начала имелось некоторое количество бактерий, обладавших этой способностью; при культивировании на новой среде эти особи имеют преимущество, в силу естественного подбора количество их все увеличивается, между тем как другие погибают.

Есть еще один вопрос, касающийся химической природы энзимов, на котором следует остановиться. Часто встречаются энзимы, например лактаза в миндале, способные гидролизировать такой субстрат, с которым они наверное никогда в естественных условиях не встречались; или если бы они встретились, то в результате их действия образовались бы ядовитые продукты, — вспомним, например, об амигдализе, встречающейся в кишечнике позвоночных.

Эти факты указывают или на то, что энзимы могут образовываться чисто случайно как побочные продукты метаболизма, совершенно независимо от того, будет ли им в дальнейшем какое-нибудь употребление, или же, что энзимы далеки от специфичности, так что энзим, предназначенный для какой-либо определенной реакции, чисто случайно и независимо от своей основной способности может вызывать и еще какую-либо, подчас совершенно другого характера реакцию.

---

## ГЛАВА ЧЕТВЕРТАЯ.

### ОБЩИЕ МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ИССЛЕДОВАНИЯ ЭНЗИМОВ.

В задачи этой книги не входит подробно излагать все разнообразные способы получения и очистки энзимов, для этого надо обратиться к оригинальным работам. Все же полезно будет указать главнейшие принципы, на которых эти методы основаны, так как они до известной степени могут пролить свет и на самую природу энзимов.

#### Извлечение из клеток.

Большая часть энзимов заключена в клетках; поэтому ясно, что надо их тем или иным способом оттуда извлечь. Некоторые энзимы, впрочем, прямо находятся в растворе, что делает извлечение их из органов излишним; таковы пепсин в желудочном соке, трипсин (или вернее его зимоген) в соке поджелудочной железы, эрепсин в кишечном соке, птиалин в слюне. Сок некоторых плодов, например ананаса и растения папайя, тоже содержит протеокластические энзимы.

Если извлекать ткани или органы водой (лучше всего с примесью хлороформа или толуола), то одни энзимы переходят в раствор, а другие нет. Иными словами, при этом клеточная оболочка настолько изменяется, что начинает пропускать, например, такой энзим, как инвертазу; но все же и в этом случае больший выход энзима получится, если дрожжевые клетки предварительно подвергнуть аутолизу. Многие энзимы вообще не удается получить, пока клетки не будут разрушены. К таким относятся зимаза дрожжей и различные аутолитические энзимы животных тканей. (ср. Вернон <sup>366</sup>). Впрочем Лебедев <sup>21)</sup> показал, что дрожжи, если их известным образом высушить, начинают

отдавать зимазу воде. Вообще говоря, все методы получения энзимов можно подразделить на две главные группы, в зависимости от того, является ли исследуемый энзим „интрацеллюлярным“ или нет.

Иногда, когда удается получить энзим простой экстракцией, оказывается более выгодным употреблять глицерин или слабый раствор спирта; этим избегается вредное влияние продолжительного действия на энзим воды; к числу таких случаев можно отнести получение трипсина (вернее трипсингенна) из поджелудочной железы.

При получении дисахараз из слизистой оболочки пищеварительного тракта достаточно уже сравнительно небольшого разрушения структуры ткани, чтобы обеспечить выход энзима в экстрагирующую жидкость; этого можно достигнуть, растирая ткань с песком и извлекая затем полученную кашицу водой. Из дрожжей эти же энзимы легко извлекаются, если предварительно дрожжи высушить (ср. Крофт Гилл<sup>103</sup>) и Э. Фишер<sup>142</sup>). Для этого дрожжи распределяются тонким слоем на стеклянных или пористых пластинках и возможно быстрее высушиваются в токе сухого подогретого воздуха; если по высушиванию дрожжи нагреть до 60 или 70°, то последующее извлечение энзимов водою или щелочью еще более облегчается, вероятно, благодаря большему разрушению клеток. В сухом виде энзимы переносят значительно более высокую температуру, чем в присутствии воды. Полученные указанным путем сухие дрожжи могут сохраняться продолжительное время, не утрачивая своих энзиматических способностей.

В других случаях, при так называемых „интрацеллюлярных“ энзимах, необходимо более основательное разрушение структуры содержащих их клеток. Для этого существуют три главных метода.

#### Способы получения тканевого сока.

Первый метод был предложен Бухнером<sup>90</sup>), которому удалось, пользуясь им, впервые получить энзим спиртового брожения. Способ состоит в том, что исследуемое вещество тщательно стирается в ступке с мелким песком и инфузорной землей; полученная густая масса затем выжимается

в гидравлическом прессе при давлении до 300 атмосфер. Инфузорная земля служит, во-первых, фильтром, а кроме того во время выжимания она служит как бы опорой для клеток, позволяя выступать содержащемуся в них соку наружу. Надо сказать, что благодаря большой поверхности инфузорная земля адсорбирует довольно значительные количества энзима, так что если после первого выжимания растереть массу с солевым раствором и вновь отжать, то можно получить еще некоторое количество активного сока.

В некоторых случаях весь энзим остается в отжимаемой массе; подобное явление описано Абергальденом и Прингсгейном<sup>3)</sup> для протеокластических энзимов некоторых грибов. Вероятно энзим в этих случаях оказывается нерастворимым в клеточном соку, который поэтому конечно будет инактивным. Отсутствие какого-либо энзима в соке, выжатом из ткани, еще не доказывает таким образом что ткань эта данного энзима вообще не содержит. Некоторые улучшения метода и технические указания можно найти в работе Оффринга<sup>279</sup>.

Второй метод, предложенный Роулэндом<sup>331</sup>), состоит в том, что клетки смешиваются с песком и эту смесь помещается весьма быстро вращающееся зубчатое колесо. При этом, повидимому, песчинки с большой силой ударяются о клетки и разбивают их на части. Одна из модификаций этого метода особенно удобна для извлечения энзимов из бактерий. Клетки замораживаются в твердую массу при помощи жидкого воздуха и в таком виде растираются в стальной ступке специальной машиной.

Третий, последний по времени, метод является дальнейшим развитием предыдущего. Он был выработан Веховским<sup>397</sup> и применен им совместно с Винером<sup>398</sup> для исследования разрушающего мочевую кислоту энзима из печени и почек. Метод этот особенно удобен для обработки животных тканей. Исследуемая ткань режется на мелкие куски и протирается через частое сито для удаления соединительной ткани, сосудов и пр. Полученную массу распределяют тонким слоем на стеклянных пластинках и быстро высушивают в струе сухого теплого воздуха. Образовавшуюся пленку сокрывают со стекла и при помощи особой мельницы растирают ее под толуолом в мельчайший порошок. Взвесь

фильтруют под уменьшенным давлением и промывают толуолом для удаления липоидных веществ. По испарении толуола остается тонкий сухой порошок, который можно хранить. Для извлечения энзимов его настаивают с водой, слабой кислотой или щелочью, в зависимости от природы исследуемых энзимов и условий их растворимости.

### ОЧИСТКА ПРЕПАРАТОВ.

Полученные тем или иным способом растворы энзимов заключают в себе, помимо энзимов, еще целый ряд посторонних веществ. Дальнейшей задачей является по возможности очистить энзим, удалив эти случайные примеси. Неорганические соли и другие диффундирующие вещества легко удаляются диализом. Иногда оказывается, что в течение этой операции активность раствора постепенно падает. Обычно это приписывается диффузии энзима через пергамент или разрушению его. Но есть и другая возможность — именно удаление коэнзима; поэтому необходимо в таких случаях исследовать и наружную жидкость.

### БИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД.

Эффронт<sup>122)</sup> предложил чрезвычайно остроумный способ для удаления белков и отдельных углеводов. В дальнейшем метод был еще улучшен Френкелем и Гамбургом<sup>147)</sup> в их работе об амилазе. Метод этот может быть назван „биологическим“. Как уже указывалось выше, согласно опытам Бейеринка, амилаза не может служить питательным материалом для дрожжей. Поэтому если к раствору амилазы, содержащему какие-либо белки и углеводы, прибавить дрожжи, то последние разложат названные вещества, энзим же останется нетронутым. В своих опытах Френкель и Гамбург искусственно повышали потребность дрожжей в азотистых веществах, предварительно культивируя их на бедной азотом среде. Особенно интересно было бы испытать этот метод при протеокластических энзимах, — если они действительно являются протеинами, то они смогут служить источником азота для микроорганизмов. Впрочем, конечно, энзимы могут служить источником азота и не будучи белками.

Я произвел в этом направлении несколько опытов, показавших, что трипсин не может служить источником азота для дрожжей. Не желая придавать этому наблюдению слишком большое значение, я только считаю его лишним доказательством белковой природы энзимов.

### Осаждение.

Обычно после того, как раствор энзима был предварительно несколько очищен от посторонних веществ, например путем диализа, прибегают к осаждению энзима тем или другим способом. Каково бы ни было вещество, при помощи которого мы осаждаем энзим, слишком долгое соприкосновение с ним оказывается для энзима вредным. Повидимому меньше всего разрушаются энзимы при осаждении ацетоном или спиртом с эфиром, хотя в некоторых случаях, например при зимазе и других интрацеллюлярных энзимах, необходимо отфильтровывать спирт как можно скорее.

Другим часто употребляемым методом является насыщение сернокислым аммонием.

Давно применяемым и часто очень удобным методом является увлечение энзима в адсорбированном виде каким-либо аморфным порошком или осадком. Если вспомнить то, что говорилось, когда шла речь о коллоидальных адсорбционных процессах, то станет ясным, что наилучшие результаты метод адсорбции энзимов даст в том случае, когда энзим и адсорбирующее вещество будут электрически заряжены и заряды их будут разного знака. Большое значение при этом будут иметь электролиты. Так как большинство твердых веществ заряжено по отношению к воде электроотрицательно, то раствор энзима следует подкислить, чтобы сообщить ему положительный заряд. Мы видим, действительно, что, например, Михаэлис и Рона<sup>280</sup>, предлагая свой метод удаления из жидкости белков или осаждения энзимов при помощи эмульсии мастики, указывают, что жидкость следует предварительно слегка подкислить; некоторые энзимы, например трипсин, для успешного осаждения требуют еще прибавления известного количества электролита.

Следует упомянуть еще о предложенном Якоби способе захватывания энзимов осадком фосфорнокислого урина.

## ВыПАРИВАНИЕ.

Если желают выпарить досуха раствор энзима, то это необходимо производить при уменьшенном давлении и возможно низкой температуре. Особенно пригоден для этой цели прибор Шульце и Толленса, описанный в книге Ласкар-Кона<sup>1)</sup>. В нем выпариваемый раствор стекает по каплям в очень разреженном пространстве вдоль стеклянной спирали. При этом, как я могу подтвердить на основании собственного опыта, получается очень быстрое испарение, даже если температура не превышает 40°.

Другой удобный способ был предложен Хладиком<sup>198)</sup>.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ ЭНЗИМОВ.

При исследовании действия энзимов перед нами могут стоять две задачи. Во-первых, нас могут интересовать те вещества, которые образуются под влиянием действия энзима. Или же можно изучать скорость энзиматической реакции и различные условия, от которых течение реакции зависит.

В первом случае, разумеется, приходится пользоваться различными химическими методами, в зависимости от природы получающихся продуктов. Рассматривать все эти методы не входит в задачи настоящей монографии, но на одном из них я вкратце остановлюсь ввиду его значительного теоретического интереса. Это введенный недавно Сёреинсоном<sup>349)</sup> способ определения деятельности протеокластических энзимов. Он основан на наблюдении Шиффа, что при действии формальдегида на аминокислоты группа NH<sub>2</sub> нейтрализуется, превращаясь в NCH<sub>2</sub>. К продуктам переваривания белка прибавляют избыток формальдегида и определяют количество свободных карбоксильных групп, как обычно, путем титрования щелочью. Таким образом можно проследить увеличение количества аминокислот и полипептидов во мере гидролиза протеина.

## ОПТИЧЕСКАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ.

В том случае, когда желают следить за ходом реакции и когда нужно произвести большое количество определений за сравнительно небольшой промежуток времени, приходится.

<sup>1)</sup> Arbeitsmethoden der anorganischen Chemie.

поскольку это является возможным, прибегать к физическим методам, например к определению оптической деятельности. Разумеется, при выборе метода надо стремиться к наблюдать те свойства, которые в течение реакции всего сильнее изменяются. Так, например, при изучении гидролиза дисахаридов можно пользоваться или поляриметром или же исследовать редуцирующую способность продуктов реакции. Если наблюдаемые изменения незначительны — например, при исследовании обратимости процесса, то может оказаться полезным введение предложенного Крофт Гиллом так называемого „оптического фактора“; он представляет собою частное от деления удельного вращения на редуцирующую способность. Так как при превращении глюкозы в дисахарид первая величина возрастает, а вторая падает, то изменения оптического фактора будут значительнее, чем каждой из величин в отдельности. Кроме того этот способ уменьшает значение ошибок отдельных определений. Что касается способов определения редуцирующей способности сахаров, то наиболее надежным является метод Аллина в его различных модификациях. Описание метода можно найти у А. Броуна<sup>85)</sup>. Указания о том, как готовить растворы энзимов, если в дальнейшем в них будет производиться определение сахара, имеются в работе А. Плимиера<sup>86)</sup>. Бертраном<sup>83)</sup> предложено очень удобное и дающее точные результаты видоизменение весового метода. Закись меди растворяется в сернокислой окиси железа, и образовавшееся соединение закиси жел за определяется титрованием перманганатом.

Иногда удается пользоваться оптическим методом при изучении действия протеокластических энзимов, особенно если брать в качестве субстрата растворы полипептидов, как это было сделано Абдергальденом и Фишером<sup>84)</sup> и Эйлером<sup>86)</sup>. Ринг<sup>818)</sup> применил этот метод для исследования действия пепсина и трипсина. Наконец можно пользоваться оптическим методом и для обнаружения действия эмульсина на глюкозиды.

#### ПОКАЗАТЕЛЬ ПРЕЛОМЛЕНИЯ.

Можно также определять показатель преломления, но при интересующих нас реакциях он изменяется обычно лишь весьма мало.

### Спектро-фотометрия.

Другой оптический метод, именно колориметрия и спектрофотометрия, нашел довольно широкое применение. При помощи этого метода удобно, например, определять вызываемое иероксидазой превращение лейкобазы малахитовой зелени в окрашенный пигмент (ср. Чигляж и Фурт<sup>102</sup>). При помощи спектро-фотометра Клугом<sup>213</sup> и мою<sup>40</sup>) было изучено появление биуретовой реакции. Надо сказать, что в применении этого метода к изучению цветных реакций в настоящее время имеется довольно много трудностей, относительно которых мы должны отослать читателя к оригинальным работам. Возможно, что удастся его применить при триптофановой и миллионовой реакциях.

### Изменение вязкости.

Изменения вязкости при энзиматических процессах резче всего проявляются при действии протеокластических энзимов на протеины; мы знаем, что растворы большинства нативных белков отличаются значительной вязкостью, которая уменьшается по мере гидролиза (ср. Спиргге<sup>352</sup>). Надо сказать, что область применения методов, основанных на измерении степени вязкости, довольно ограничена, так как эти методы не дают нам никаких указаний на самый химизм происходящих процессов. Для примера возьмем действие трипсина на какой-нибудь белок. Если мы будем определять вязкость реакционной смеси и параллельно количество неосаждаемых танином азотистых веществ, то окажется, что долгое время после того, как вязкость достигла постоянной величины и более не изменяется, еще продолжается дальнейшее нарастание количества аминокислот и пептонов (Бэйлисс<sup>40</sup>). Другими словами, если бы мы судили о ходе реакции только по изменению вязкости, то мы считали бы процесс установившимся в то время, как на самом деле он еще продолжался. Это же самое можно сказать и относительно других методов, в основу которых положено изменение физического состояния субстрата; таковы методы Грютцнера<sup>166</sup> и Вернона<sup>383</sup>), где наблюдается разжижение фибрина, метод Ферми с разжижением

желатины и различные модификации Меттовского метода, основанного на переваривании коагулированного в капиллярных трубках белка. Переведенный в раствор фибрин оказывается еще настолько мало расщепленным, что коагулируется при кипячении. Что касается желатины, то она под влиянием трипсина чрезвычайно быстро теряет свою способность застывать на холоду. Я нашел, что уже после 5—6-минутного действия энзима желатина перестает застывать, между тем как химические изменения, произшедшие за это время, насколько можно об этом судить по ничтожному изменению электропроводности, должны быть весьма незначительны. Указанные методы могут главным образом служить для качественного обнаружения протеокластических энзимов или для сравнения относительной активности различных растворов одного и того же энзима.

#### ДИЛАТОМЕТРИЧЕСКИЕ ИЗМЕРЕНИЯ.

В тех случаях, когда энзиматическая реакция сопровождается изменениями объема, можно следить за ее течением при помощи так называемого дилатометра. Описание метода в применении к исследованию энзимов можно найти в работе Вант-Гоффа<sup>382)</sup>.

#### ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ.

Исследуя изменения количества молекул в реакционной смеси, мы во многих случаях можем получить весьма ценные данные о деятельности энзимов. Для этого можно пользоваться или определением точки замерзания (ср. Окер-Блом<sup>382</sup>) или измерять упругость паров. В качестве примера применения этого метода можно привести работу Бенсона и Уэлльса<sup>383</sup>); авторы исследовали аутолитический процесс путем ряда определений точки замерзания.

#### ВЫДЕЛЕНИЕ ГАЗА.

Если при энзиматической реакции происходит выделение газа, как, например, при действии зимазы на глюкозу, то очень удобным для количественного наблюдения этого процесса является прибор Гардена, Томсона и Йонга<sup>384</sup>).

### Изменения электрической проводимости.

Последний метод, о котором мы здесь упомянем, основан на изменении электропроводности. Сьюквист<sup>146)</sup> показал, что электропроводность раствора протеина изменяется под влиянием пепсина. Это наблюдение было подтверждено Окер-Бломом<sup>282)</sup>, установившим также, что под влиянием трипсина электропроводность повышается. Уже он указывал на большие удобства этого метода, но почему-то до последнего времени в области изучения энзимов метод этот не получил широкого распространения. Несколько наблюдений при помощи его были сделаны В. Анри и Ларгье де Банселем<sup>184)</sup> над действием трипсина на желатину. Мною<sup>40</sup> и<sup>42</sup>) этот метод был применен для более тщательного изучения действия того же энзима при различных условиях. При этом обнаружилось полное совпадение кривых, полученных путем определения азота в фильтрате после осаждения реакционной смеси танином, и тех, которые получались на основании измерения электропроводности; несомненно, что как в том, так и в другом случае ход кривых обусловлен количеством образующихся аминокислот и пептонов. Метод применим и при других протеокластических энзимах, действие которых протекает в нейтральной или щелочной среде. В кислых растворах изменение электропроводности протекает несколько иначе, благодаря тому, что продукты гидролиза связывают больше кислоты, чем сам субстрат; поэтому в первое время происходит понижение электропроводности, обусловленное уменьшением количества водородных ионов. В дальнейшем наблюдается повышение электропроводности; в точности ход кривой пока еще не изучен.

Этим же методом можно прослеживать действие липазы на эфиры низших жирных кислот, так как по мере увеличения количества свободной кислоты электропроводность должна сильно повышаться.

Такое же повышение электропроводности наблюдается при расщеплении мочевины уреазой.

Метод этот, разумеется, неприменим при энзимах, действующих на углеводы, так как тут не происходит увеличения количества электролитов. Исключением является ги-

дролиз синигрина мирозином, во время которого образуется кислый сернокислый калий.

Для определения электропроводности можно применять обычный способ Кольрауша, но удобнее пользоваться модификацией Уэтгэма<sup>396</sup>); она устранист необходимость пользования электродами, покрытыми платиновой чернью,ющими разлагать некоторые вещества; кроме того при этой модификации можно обходиться обычными элементами и гальванометром.

### Обнаружение трипсина.

Абдергальден и Шиттенгельм<sup>5)</sup> показали, что трипсин очень легко обнаружить при помощи пептона „Рош“, представляющего собою продукт неполного гидролиза шелка. Этот полипептид содержит много тирозина, легко отщепляемого триптическими энзимами, но не гепсином. Благодаря своей малой растворимости тирозин быстро выпадает в виде кристаллического осадка. (Ср. также: Абдергальден и Штейнбек<sup>6)</sup> и книгу Плиммера „Химическое строение протеинов“.)

### Определение силы энзима.

Сравнение силы различных энзимных препаратов лучше всего производить, определя время, потребное для достижения определенного превращения. Это удобнее и точнее, чем измерять превращение, произшедшее в единицу времени. Особенно важно это при реакциях, протекающих в несколько стадий; только таким образом тогда и удается получить правильные выводы. Примерами таких реакций могут служить гидролиз крахмала амилазой и все протеокластические процессы. Если реакция в двух сравниваемых опытах не достигла одного и того же предела, то точно учесть относительную активность испытуемых энзимов мы не сможем, так как различные стадии реакции протекают с весьма различной скоростью.

Так, например, при действии трипсина образование альбумоз происходит очень быстро, и так же быстро последние превращаются в пептоны. Дальнейшее же расщепление пептонов на аминокислоты идет значительно медленнее, однако

некоторые аминокислоты отщепляются уже на самых первых стадиях. Из этого видно, как сложна данная реакция и как трудно получить сравнимые результаты, если учитывать только действие, произведенное энзимом в единицу времени. Единственным надежным путем здесь будет, как указано выше, определение времени, которое потребуется, чтобы при данном энзиме получить определенный эффект.

### Способы прекращения действия энзимов.

Чтобы закончить эту главу, мы коснемся еще одного практического вопроса. Для того чтобы определить, как далеко прошла известная реакция, при применении большинства описанных в этой главе методов необходимо в определенный момент остановить действие энзима. Только при определении электропроводности и при оптическом методе мы можем производить определения, не останавливая течения реакции. Является далеко не безразличным, каким путем мы оборвем реакцию. Часто поступают таким образом, что нагревают реакционную смесь до кипения. Это может повести к грубым ошибкам. Мы знаем, что активность энзимов чрезвычайно возрастает по мере повышения температуры. Так как раствор не сразу достигает температуры кипения, то прежде чем энзим окажется разрушенным высокой температурой, он еще будет проявлять свое действие, и даже в значительно большей мере, чем в течение самого опыта. Если реакция может быть остановлена только путем разрушения энзима нагреванием, то лучше всего влиять испытуемый раствор тонкой струей в кипящую воду. Если нежелательно разводить опытную смесь водой, то можно ее заморозить и в таком виде сохранять, пока не будет приступлено к соответствующему определению. Когда условия это позволяют, удобнее всего останавливать деятельность энзима прибавлением тех или иных химических реагентов. В опытах с инвертазой можно прибавлять аммиак — он не только останавливает реакцию, но и устраняет так называемую биротацию глюкозы, мгновенно приводя систему в состояние равновесия. При пепсине можно прибавлять щелочь, при трипсине — кислоту. Само собой разумеется, что если в дальнейшем приходится пользоваться какими-либо осаждающими средствами, вроде танина

или фосфорно-вольфрамовой кислоты, то можно остановить действие энзима просто прибавлением этих реагентов.

Как уже указывалось, большим преимуществом метода, основанного на определении электропроводности, является то, что при пользовании соответствующими сосудами можно следить за ходом реакции, не нарушая ее течения. То же самое касается метода определения вязкости, а также и поляризационного метода. Надо только следить за поддержанием постоянной температуры; при оптическом методе это достигается применением поляризационных трубок, окруженных муфтой, по которой циркулирует вода определенной температуры.

Вообще поддержание постоянной температуры при изучении энзиматических реакций чрезвычайно важно. Указания относительно того, как этого достигнуть, можно найти, например, в книге Оствальда и Лютера „Физико-химические измерения“.

## ГЛАВА ПЯТАЯ.

### ОБРАТИМОСТЬ ЭНЗИМНЫХ РЕАКЦИЙ.

В первой главе указывалось, что в реакциях, приводящих к состоянию подвижного равновесия, например, между метилуксусным эфиром, уксусной кислотой, метиловым спиртом и водой, как гидролиз эфира, так и синтез его ускоряются присутствием катализатора, скажем, соляной кислоты. Поэтому, если только энзимы не занимают особого места среди других катализаторов, мы вправе ожидать, что и они будут ускорять синтетические процессы.

Вопрос этот настолько важен, что мы останавливаемся на нем вторично. Раз энзимы являются катализаторами, и если ускоряемая ими реакция принадлежит к числу обратимых, то тот же агент, который производит гидролиз, должен быть способен вызывать и синтетический процесс. Всякий раз, когда мы видим, что течение реакции не изменилось нацело в одну какую-нибудь сторону, а ведет к достижению известного равновесия, мы вправе утверждать, что энзим повлиял как на гидролитический, так и на синтетический процессы. Наблюдения показывают, что всегда достигается одно и то же положение равновесия независимо от того, какое количество энзима мы берем, пользуемся ли мы различными препаратами его, ослабляем ли его частично действием различных реагентов и т. д. Невозможно поэтому предполагать, что во всех этих случаях мы будем иметь два разных энзима — один гидролизирующий, а другой синтезирующий, всегда в равных количественных соотношениях.

Все эти рассуждения относятся, разумеется, только к обратимым реакциям. Но, как на это указывает Дж. Дж. Томсон<sup>374)</sup>, теоретически все реакции являются обратимыми,

а кажущаяся необратимость некоторых из них зависит только от несовершенства наших методов наблюдения. Подобный же взгляд развивает в своей книге и Нернет<sup>274)</sup>.

Мы знаем, что во многих случаях в живом организме разыгрываются процессы, несомненно относящиеся к разряду обратимых реакций. Особенно наглядно в этом отношении накопление некоторых веществ, в качестве запасного материала, в нерастворимой форме — например, крахмала и гликогена. При известных условиях вещества эти синтезируются из сахаров, а по мере потребности организма могут вновь гидролизироваться.

После того как Крофт-Гилл<sup>193)</sup> впервые доказал, что синтетический процесс может протекать под влиянием энзима, было найдено множество аналогичных случаев, перечислять которые здесь представляется излишним. В общем создается такое впечатление, что при помощи любого энзима возможно вызвать соответствующий синтетический процесс, вопрос только в подыскании надлежащих условий реакции.

### Влияние воды.

Среди этих условий главным образом надо обратить внимание на влияние воды. Метилацетат можно, в закупоренной склянке, хранить сколько угодно времени, он при этом ничуть не изменяется. Но в присутствии хотя бы малейшего количества воды часть его гидролизируется, и чем больше воды мы возьмем, тем дальше будет ити этот процесс, тем больше будет образовано уксусной кислоты и алкоголя. Другими словами, чем больше будет воды, тем ближе будет достигнутое состоянию равновесия к полному гидролизу (см. ри.: 2, стр. 70).

Поскольку энзимы являются коллоидами, все реакции, в которых они участвуют, протекают в гетерогенной системе, состоящей по крайней мере из двух фаз. Фаза, заключающая в себе энзим, содержит меньше воды, чем раствор субстрата. Представим себе, что вещества, из которых энзим синтезирует новое соединение, более растворимы в коллоидной фазе, чем в воде. Тогда, в силу закона распределения, они сконцентрируются в этой фазе; так как она содержит сравнительно мало воды, то ясно, что создавшиеся условия должны

быть весьма благоприятны именно для синтетического процесса. Подобным же образом могут действовать адсорбция и концентрация веществ на поверхности энзима.

### Синтез, производимый инвертазой.

При многих энзимных реакциях, в частности, например, при действии инвертазы, получается впечатление, что гидролитический процесс доводится до конца. Что это не так, показали опыты Виссера<sup>289</sup>). Если гидролизовать 0,25 % раствор сахарозы при помощи соляной кислоты, то конечное вращение будет —3,420°, что указывает, что жидкость содержит только глюкозу и фруктозу, т.-е. что произошел полный гидролиз. Если же гидролизовать такой же раствор тростникового сахара инвертазой, то конечное вращение будет равняться —3,26°. Из этого видно, что инвертаза довела гидролиз не до конца, а до определенного состояния равновесия. При обратной постановке опыта оказалось, что раствор, содержащий глюкозу и фруктозу и имевший вначале вращение —12,46°, будучи подвергнут в течение двух месяцев действию инвертазы, обнаружил уменьшение вращательной способности: она равнялась —12,29°. На основании этого изменения можно заключить, что при действии инвертазы достигается состояние равновесия, когда будет гидролизовано около 99% имевшейся сахарозы; наоборот, если мы дадим инвертазе действовать на смесь глюкозы и фруктозы, то начнется синтетический процесс, при чем опять положение равновесия наступит, когда в жидкости будет 1% тростникового сахара. Вспомним, что положение равновесия определяется отношением скоростей гидролитической и синтетической реакций; нам станет ясным, насколько в приведенном примере скорость первого процесса больше скорости второго. Виссер нашел, что для 0,5 % растворов тростникового сахара константа равновесия, т.-е. отношение скоростей двух реакций, равна 50; поэтому если при гидролизе 0,5 % раствора сахарозы инвертазой равновесие будет достигнуто через шесть дней, то обратная реакция — синтез в смеси глюкозы и фруктозы — достигнет состояния равновесия только через 10 месяцев ( $50 \times 6$  дней).

### ЗНАЧЕНИЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА.

Мы видели, что гидролитическое действие энзимов значительно превышает синтетическое. Можно бы поэтому думать, что последнее вообще не имеет практического значения. Нетрудно убедиться, что это не так. Для примера возьмем амилазу, которая, подобно инвертазе, доводит гидролитический процесс почти до конца. Представим себе, что и тут, при действии энзима на мальтозу или декстрин, наступит состояние равновесия, когда количество синтезированного крахмала достигнет 1%. Но так как крахмал нерастворим, то он по мере образования будет уходить из сферы реакции, равновесие, таким образом, будет постоянно нарушаться, и взамен выделившегося в нерастворимом виде продукта синтеза будут образовываться все новые количества его. Как уже указывалось, скорость синтетической реакции мала; поэтому количество образованного в единицу времени крахмала будет невелико, но во всяком случае оно будет и не настолько ничтожным, чтобы им можно было совершенно пренебречь. Рассмотренный процесс можно считать аналогичным явлением осаждения хлорида в виде серебряной соли. По мнению Крофт-Гилла<sup>193 и 194</sup>, весьма вероятно, что накопление крахмала в растениях или гликогена в животном организме происходит именно указанным путем.

В прорастающих семенах гидролиз и потребление крахмала регулируются зародышем. Если его удалить, то гидролиз крахмала прекращается. По всем вероятиям мы здесь имеем дело с подвижным равновесием при обратимой реакции. Пфеффер и Ганстен<sup>305</sup> удаляли в прорастающих семенах кукурузы и ячменя зародыш, а на его место помещали маленький столбик из гипса. При этом оказалось, что если поместить свободный конец столбика в небольшую каплю воды, то уменьшения количества крахмала в зерне не наблюдается; если же взять большее количество воды, то крахмал постепенно исчезает. В первом случае благодаря тому, что продукты гидролиза не удалялись, скоро достигалось состояние равновесия; во втором же — по мере образования они путем диффузии удалялись из сферы реакции, которая поэтому беспрепятственно могла продолжаться.

Образование нерастворимых веществ не является единственным условием, при котором синтетический процесс может достигнуть значительных размеров. Продукт синтеза может удаляться из сферы реакции путем диффузии — например, с током крови, или потребляться в какой-нибудь другой, самостоятельной реакции.

### Синтезы, производимые липазой.

Изученное Кэстлем и Левенхартом<sup>209)</sup> действие липазы на эфиры низших жирных кислот может служить одним из простейших примеров обратимых процессов. Поэтому мы на нем несколько остановимся. Может показаться странным, что мы не начинаем с того процесса, на котором впервые обнаружена была синтетическая способность энзима, — с действия мальтазы на глюкозу, изученного Крофт-Гиллом. Но там дело усложняется образованием двух оптически изомерных дисахаридов, так что мы к этой реакции вернемся несколько позднее.

Образование этилбутиратов из масляной кислоты и алкоголя под влиянием липазы легко можно обнаружить просто по запаху образующегося эфира, который резко отличается от запаха спирта и масляной кислоты. Вот что пишут Кэстль и Левенхарт: „Если смешать свежеполученный водный экстракт поджелудочной железы с слабым раствором (0,1 до 0,05 %) масляной кислоты и добавить этилового спирта так, чтобы его содержание равнялось приблизительно 1,5%, то уже при комнатной температуре и в присутствии антисептических веществ скоро можно обнаружить появление характерного запаха этилбутиратов; если экстракт из железы предварительно прокипятить, то этот запах никогда не появляется“. Если поставить опыт с большими количествами, то можно отdestиллировать образовавшийся эфир и обратно гидролизировать его тем же энзимом. При этом, когда мы гидролизируем этилбутират липазой, реакция никогда не идет до конца, а всегда достигается определенное состояние равновесия. Любопытно, что если производить гидролиз этилбутиратов при помощи липазы, процесс останавливается раньше, чем при гидролизе соляной кислотой (ср. Дитц<sup>112)</sup>). Как уже указывалось в первой главе, нельзя делать отсюда

заключения, что энзимы не подчиняются общим законам катализа. Подобная разница может зависеть от того, что в течение реакции липаза образует какие-либо соединения с субстратом или продуктами гидролиза или же, что более вероятно, положение равновесия изменяется благодаря поверхностной энергии (ср. стр. 9 и 82).

Известно, что липаза поджелудочного сока способна гидролизовать как низшие эфиры, так и более высокомолекулярные, в частности различные жиры. Надо ожидать, что она будет их и синтезировать. Это предположение было подтверждено опытами А н р и о<sup>162)</sup>, которому удалось при помощи липазы получить маслянокислый эфир глицерина — монобутирин; впоследствии были получены и типичные жиры: моно- и триолеиновые эфиры глицерина (Потте-вэн<sup>310 и 311)</sup>.

Уже Левенхарт<sup>237)</sup> подчеркивал большое значение синтетической деятельности липазы для организма. В процессе пищеварения принятый с пищей жир подвергается в кишечнике гидролизу. В клетках же слизистой оболочки кишечника мы встречаем снова жир в виде маленьких капель. Ясно, что клетки должны обладать каким-нибудь средством, дающим им возможность из всосанных из кишечника продуктов гидролиза вновь синтезировать жир. Если бы клетки кишечной стенки содержали липазу, то она могла бы проявить значительное синтетическое действие, так как благодаря нерастворимости жира последний по мере образования удалялся бы из сферы реакции. И, действительно, Левенхарту удалось выделить липазу из слизистой оболочки кишечника свиньи; этот же энзим затем был выделен из печени и других органов, в которых обычно происходит отложение жира. Гамзик<sup>161)</sup> показал, что липаза, выделенная из кишечной стенки, печени и легкого, обладает синтетическим действием. Если кровь, омывающая клетки органов, оказывается содержащей мало жирных кислот и глицерина — в силу ли повышенного отложения жира в одном каком-нибудь месте, или при усиленном окислении его, например, при голодании,—то липаза тотчас восстанавливает нарушенное равновесие, гидролизируя тот жир, который раньше, благодаря ее синтезирующей деятельности, откладывался в виде запасов.

Брэдлей<sup>74)</sup> сравнил относительное содержание липазы в разных органах с количеством находившегося в них жира и не нашел никакого параллелизма между этими величинами. Он указывает, что результаты его опытов не говорят в пользу гипотезы о синтезировании жира липазой. Но они и не опровергают ее. Ведь количество энзима не влияет на положение равновесия, оно может только отзываться на скорости реакции; а так как отложение жира большей частью происходит очень медленно, то скорость образования его не имеет особенно большого значения. Несколько затруднительно объяснить действие молочной железы, содержащей очень мало липазы, меньше, например, чем мозг или селезенка. С подобным же затруднением мы встретимся, когда речь будет ити о лактозе молока. Вероятно возможно, впрочем, что образование молока является чисто секреторным процессом, в котором энзимы не принимают никакого участия. Синтез отнюдь не является всегда результатом катализического действия,— так, например, метилглюкозид образуется при действии щелочи на метилсульфат в присутствии глюкозы. Не надо забывать также, что в организме животных при помощи крови поддерживается связь между всеми органами, так что синтетический процесс может ити в одном месте, а продукты синтеза будут накапливаться или сецернироваться в другом. Это даже облегчит синтетический процесс, благодаря постоянному удалению синтезируемых веществ из сферы реакции.

Тиле<sup>75)</sup> утверждает, что в печени, почках, селезенке и мускулах содержится липаза, могущая гидролизовать только лецитин, но совершенно не действующая на жиры. Но на самом деле из приводимых им опытов видно только, что в смеси жиров и лецитина последний скорее гидролизируется, чем первые; если липазы будет достаточное количество, как, например, в поджелудочном соке, то обнаружится и расщепление жиров. Опыта с эмульсией одних жиров, без лецитина, автор, повидимому, неставил. Приводится еще опыт с аутолизом при 4°; оказалось, что никакого гидролиза не произошло; при такой низкой температуре его странно было бы вообще ожидать.

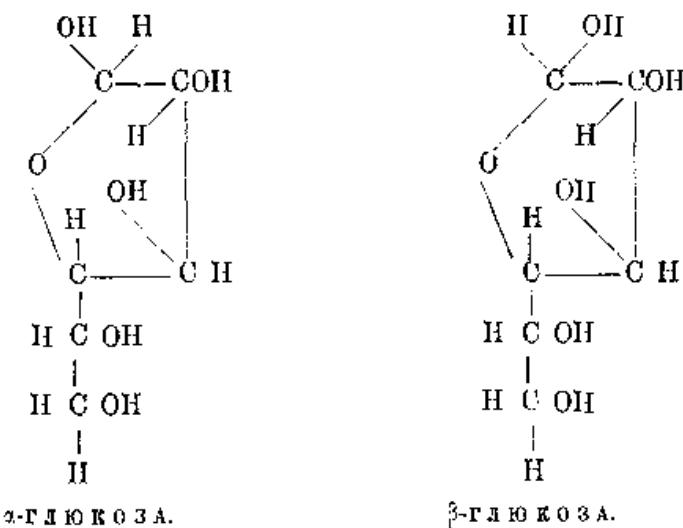
Интересно, что, согласно исследованиям Вейнланда<sup>76)</sup>, образование и разложение жиров в личинке Calliphora, про-

исходящие под влиянием энзимов, вполне подчиняются законам подвижного равновесия.

Роль воды как фактора, определяющего положение равновесия при гидролизе и синтезе жира липазой, прекрасно иллюстрируется кривыми рис. 2, заимствованного из работы Армстронга и Госнэя<sup>20</sup>). Исно видно, что количества глицерина, олеиновой кислоты и олеина, находящиеся в реакционной смеси при достижении равновесия, меняются в зависимости от количества воды.

### Синтез углеводов и глюкозидов.

Раньше чем перейти к сравнительно сложным процессам синтеза углеводов, придется сказать несколько слов относительно стереохимии глюкозидов. Установлено, что вещества эти построены по типу внутреннего ангидрида, подобно  $\gamma$ -лактону. Глюкоза тоже имеет такое же строение и, благодаря этому, может существовать в двух оптических изомерных формах, известных под именем  $\alpha$ - и  $\beta$ -глюкоз. Как видно из приводимых формул, изомеры эти отличаются один от другого положением групп OH и H при конечном углеродном атоме.



Одна из этих форм, именно  $\alpha$ -глюкоза, обладает большим удельным вращением, чем  $\beta$ -форма. Когда глюкоза сохраняется в твердом виде, то большая часть ее находится в виде  $\alpha$ -формы; когда мы растворим глюкозу в воде, то

Свободная кислота в %.

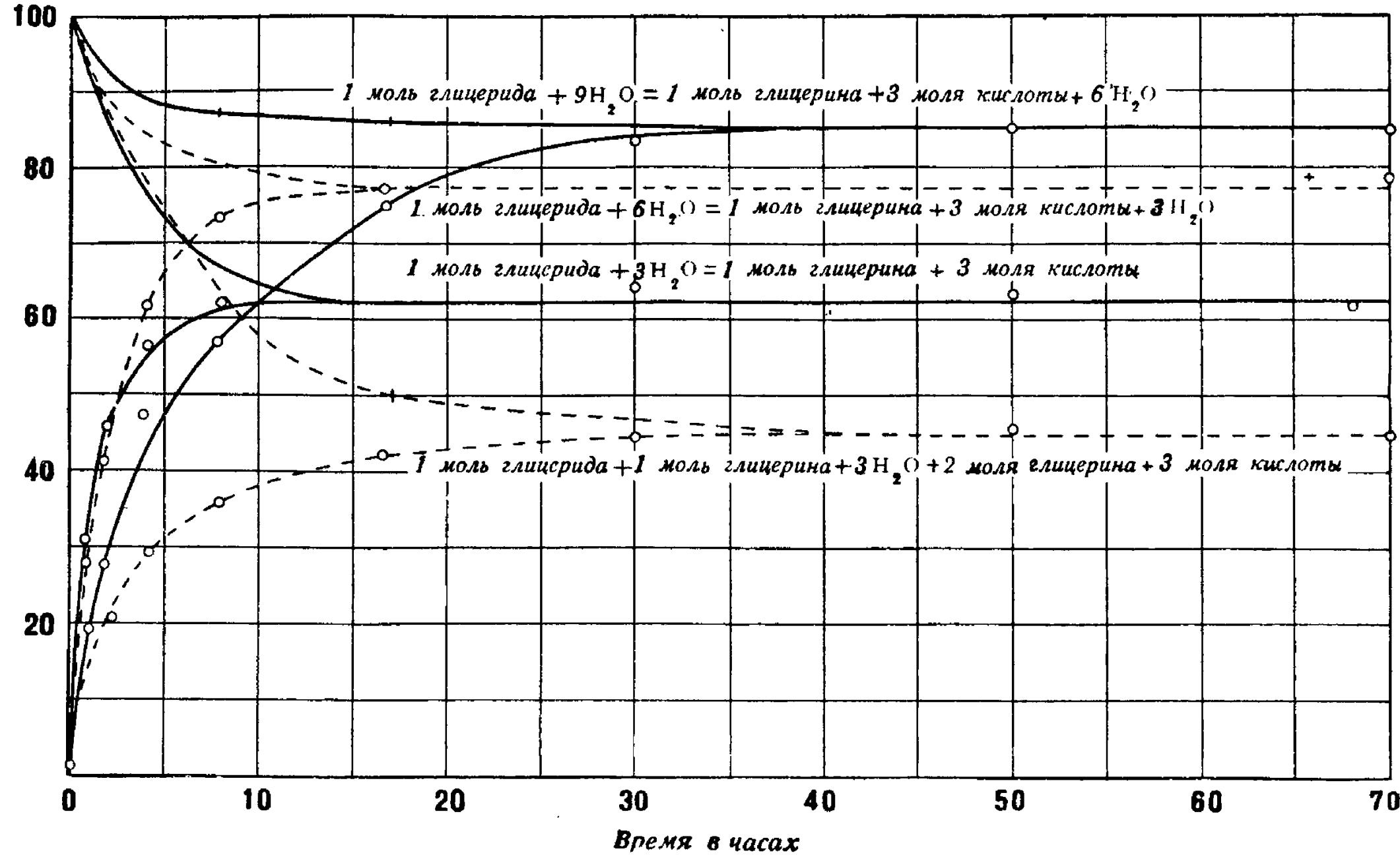


Рис. 2.

раствор сначала будет обладать высоким удельным вращением. Постепенно оно будет падать, пока не достигнет некоторой определенной величины, указывающей, что в жидкости установилось состояние равновесия между количествами обоих изомеров. Согласно Танре, в 10% растворе глюкозы, когда установится равновесие, содержится 3,7%  $\alpha$ -формы и 6,3%  $\beta$ -формы. Эмиль Фишер нашел, что если на раствор глюкозы в метиловом спирту (такой раствор содержит, как мы принимаем, оба изомера) действовать соляной кислотой, то образуются два глюкозида. Один из них —  $\alpha$ -метилглюкозид, образуется из  $\alpha$ -глюкозы, путем замещения верхней группы OH метилом —  $\text{CH}_3$ , второй —  $\beta$ -метил-глюкозид — совершенно аналогичным образом образуется из  $\beta$ -глюкозы.

Дальнейшие подробности относительно стереохимии глюкозидов читатель может найти в посвященной этому вопросу монографии Франклэнда Аристронага.

Как показал Фишер, во всех дрожжах имеется энзим, гидролизирующий мальтозу. Значение этого энзима станет ясным, если вспомнить, что главный энзим дрожжей — зимаза, не может действовать на дисахариды. Гидролизирующий мальтозу энзим, называемый мальтазой, не следует смешивать с инвертазой. Когда стали исследовать действие мальтазы на метилглюкозиды, то оказалось, что она способна разлагать только  $\alpha$ -метилглюкозид, совершенно не действуя на  $\beta$ -изомер. Наоборот, эмульсин — энзим, находящийся, между прочим, в горьком миндале и гидролизирующий большинство встречающихся в природе глюкозидов, например, салицин, амигдалин и др., расщепляет только  $\beta$ -метилглюкозид, оставляя  $\alpha$ -форму нетронутой. Отсюда сделали заключение, что мальтоза имеет строение  $\alpha$ -глюкозида, а естественные глюкозиды, вроде салицина, являются  $\beta$ -глюкозидами.

Как только что сказано, мальтаза гидролизирует мальтозу, расщепляя ее на две молекулы глюкозы. Мы вправе ожидать, что если прибавить мальтазы к крепкому раствору глюкозы, то под влиянием синтетической деятельности энзима образуется известное количество мальтозы. Вначале предполагали, что так оно и есть на самом деле (ср. Крофт Гилл<sup>192</sup>). Но в дальнейшем, когда стали исследовать образовавшийся дисахарид, то оказалось, что он только отчасти состоит из мальтозы. Остальная часть его предста-

вляла собою какой-то другой сахар, который назвали „ревертозой“. Эммерлинг<sup>124)</sup>, а затем Ф. Армстронг<sup>16)</sup> установили, что этот новый сахар является изомальтозой, т.-е. оптическим изомером мальтозы. Изомальтоза гидролизируется эмульсином, что подтверждает, что она представляет собою глюкозид  $\beta$ -глюкозы. Согласно гипотезе Вант-Гоффа<sup>18)</sup>, которой придерживается и Крофт-Гилл, энзим может синтезировать только то соединение, которое он при других условиях разлагает; иначе мы не могли бы поставить энзимы наряду с другими катализаторами. Надо поэтому внимательнее остановиться на анализе имеющихся данных. Изомальтоза гидролизируется, как уже указано, эмульсином, но не мальтазой; неожиданным может показаться факт, что в опытах Крофт-Гилла продукты синтеза практически нацело могли быть гидролизованы тем же препаратом энзима, под влиянием которого они образовались из глюкозы. Приведем результаты одного из опытов. Оптический фактор (ср. выше, гл. IV) 45% раствора глюкозы первоначально равнялся 0,525; после того как раствор этот подвергли действию дрожжей, оптический фактор возрос до 0,676; это указывало, что произошел синтетический процесс, в результате которого образовалось около 15% мальтозы. Раствор этот вскипятили, 10 куб. см его развели водой до 200 куб. см, прибавили немного того же препарата дрожжей, который брался вначале, и оставили все стоять при 28° на десять дней. Оптический фактор упал при этом до 0,537, т.-е. произошел почти полный гидролиз. В контролльном опыте, где препарат дрожжей был инактивирован кипячением, оптический фактор под конец равнялся 0,675, т.-е. остался практически без изменения. Дальнейшие опыты показали, что если сбраживать продукты синтеза при помощи дрожжей, содержащих определенно только мальтазу, например, *Saccharomyces ellipsoideus* I, то гидролизуется лишь часть дисахаридов, по всем вероятиям, именно только мальтоза. Мне кажется, что приведенные факты объясняют образование изомальтозы. Прежде всего надо отметить, что в первых опытах Крофт-Гилла в качестве энзима брались обычные пивные дрожжи и они были в состоянии гидролизовать все количество синтезированного ими дисахарида, между тем как чистая мальтаза расщепляла только часть. Уже сам Крофт-

Гилл высказывал предположение, что в своих опытах он имел дело со смесью нескольких энзимов; позднее было установлено, что, действительно, многие дрожжи содержат эмульсин (ср. Анри и Од<sup>189</sup>); нетрудно убедиться, что обычные прессованные дрожжи при 38° быстро гидролизируют амигдалин. Таким образом мы приходим к выводу, что в разобранном нами случае образование изомальтозы объясняется присутствием в дрожжах эмульсина, мальтоза же образуется мальтазой.

Весьма сходный случай описывают Фишер и Армстронг<sup>145</sup>). При действии лактазы из кефира на смесь глюкозы и галактозы они получили не лактозу, как можно было ожидать, а изолактозу. Но если обратиться к приводимой в их работе таблице, то можно видеть, что в более разведенных растворах продукт синтеза гидролизируется тем же энзимом или, вернее, той же смесью их, которая при других условиях вызвала упомянутый синтез. Отсюда ясно, что употреблявшийся для опытов препарат лактазы содержал энзим, могущий гидролизировать изолактозу, и нет никаких оснований принимать, что синтез произведен не этим, а каким-нибудь другим энзимом.

Прямо противоположный взгляд был высказан Ф. Армстронгом<sup>16</sup>). Этот автор считает, что как правило энзимы синтезируют как раз такие соединения, которые они не могут гидролизовать. По моему мнению, такой взгляд способен только затемнить весь разбираемый вопрос. У нас есть много причин, чтобы считать его неприемлемым. Как было показано Крофт-Гиллом, при действии мальтазы на глюкозу достигалось состояние равновесия, когда приблизительно 15% глюкозы оказывалось превращенным в дисахарид; дальнейшего увеличения количества синтезированного дисахарида не наблюдалось. Если бы синтезированное вещество не гидролизовалось энзимом, то как объяснить, что синтетическая реакция на известной стадии останавливается? Так как образовавшийся дисахарид, согласно взглядам Армстронга, не подвергается действию энзима, то он как бы уходит из сферы реакции, и последняя должна была бы ити до тех пор, пока вся глюкоза не превратилась бы в дисахарид. Допуская, что вещество, выделенное Армстронгом из продуктов синтеза при действии вытяжки из дрожжей на глюкозу,

действительно является изомальтозой, мы должны помнить, что в этих опытах употреблялись обыкновенные пивные дрожжи, содержащие, согласно Анри и Оду, эмульсин. Надо также обратить внимание на то, что количество этого вещества было невелико и что, по мнению Файянаса<sup>136</sup>), не исключена возможность действия энзима на оба оптические изомера, только с различной скоростью. Мне кажется, что последнее предположение лучше всего может объяснить не только разбираемый нами случай, но и некоторые другие, казавшиеся непонятными. В подтверждение этого взгляда можно привести наблюдение Докса и Нэйдига<sup>115</sup>), показавших, что как живой грибок *Aspergillus*, так и вытяжка из него гидролизируют и  $\alpha$ - и  $\beta$ -метилглюказиды, но первый расщепляется, приблизительно, в шестнадцать раз медленнее второго.

В своей монографии Армстронг, возражая мне, указывает, что я не принимаю во внимание того обстоятельства, что положение равновесия может зависеть от соединения энзима с сахаром. Мне кажется, этим никак нельзя объяснить, почему синтетический процесс останавливается, когда, как в опытах Крофт-Гилла, 15% глюкозы превратится в дисахарид. Задерживающее влияние глюкозы и постепенное ослабление энзима только несколько задержали бы момент достижения равновесия. По мере превращения глюкозы в дисахарид концентрация углеводов в растворе постепенно уменьшается, но уменьшение это очень незначительное, — если бы вся имевшаяся глюкоза превратилась в дисахарид, то концентрация вместо начальных 45% равнялась бы 42,7%; если же на синтез пойдет 15% глюкозы, то концентрация понизится всего лишь до 44,65%. Как бы то ни было, я тоже признаю, что необходимо еще дальнейшее экспериментальное исследование затронутого вопроса.

Против моего истолкования результатов опытов Крофт-Гилла можно еще возразить, что количество образовавшейся „ревертозы“ или изомальтозы всегда значительно превышало количество мальтозы. Сам Крофт-Гилл дает указания на причину этого явления. Он отмечает, что употреблявшиеся для опытов дрожжи содержали амилазу или декстриназу; под влиянием синтетического действия этих энзимов часть мальтозы должна была превратиться в де-

кстрины. Во время разделения продуктов синтеза действительно были обнаружены декстриноподобные вещества.

Если придерживаться взгляда Файянаса<sup>136</sup>), что один и тот же энзим может гидролизовать как мальтозу, так и изомальтозу — только первую значительно скорее, чем вторую,— то легко будет объяснить синтез оптически деятельных соединений, особенно если принять, что сам энзим оптическиден. Можно предположить, что при синтетическом процессе изомальтоза будет образовываться быстрее, чем другой изомер — мальтоза и поэтому к моменту достижения равновесия количество первой будет больше, чем второй. Возможно также, что оба изомера синтезируются с одинаковой скоростью, но так как мальтоза быстрее гидролизируется, то ее при состоянии равновесия окажется меньше, чем изомальтозы.

Теперь мы обратимся к работам, посвященным синтезу глюкозидов под влиянием эмульсина. Как указывает Вант-Гофф<sup>382</sup>), на основании исследований Меншуткина над скоростью этерификации, можно предполагать, что глюкозиды первичных спиртов будут синтезироваться легче, чем глюкозиды вторичных, а эти, в свою очередь, легче, чем глюкозиды третичных спиртов. Мне удалось непосредственно подтвердить это, исследуя образование глюкозидов изоамилового (первичного) спирта и соответствующего третичного алкоголя — диметилэтилкарбинола. Встречающиеся в природе глюкозиды — салицин, арбутин и др.— в качестве одного из компонентов содержат соединения, обладающие строением третичных спиртов. Поэтому надо ожидать, что даже в концентрированных растворах равновесие наступит, когда содержание глюкозида будет не более 5—10%. Предпринятые в этом направлении опыты показали, что действительно реакция достигает состояния равновесия при почти полном гидролизе. Постановка опытов не исключала возможности и небольшого синтетического процесса; Вант-Гофф указывает, что ему удалось, при продолжавшемся значительное время опыте, обнаружить, хотя и медленный, синтетический процесс. Мне кажется непонятным утверждение Армстронга, что эти опыты окончательно исключают возможность установления равновесия в обратимой системе. Подробнее я остановился на этом вопросе в моей работе о синтетическом действии энзимов<sup>47</sup>). Когда Вант-Гофф взял

для опытов первичный спирт, — глицерин, то тут легко удалось получить синтез глюкозида до 60—70%. И сам обнаружил это явление раньше, чем познакомился с работой Вант-Гоффа, и применил эту реакцию для разрешения некоторых вопросов, о которых речь будет идти впоследствии. Здесь достаточно отметить, что в результате синтеза образуется  $\beta$ -глюкозид, т.-е. та форма, которая гидролизируется эмульсином.

Буркело и Бридель<sup>71)</sup> при помощи эмульсина синтезировали целый ряд глюкозидов первичных спиртов; при этом были разъяснены и некоторые важные вопросы, касающиеся действия энзимов вообще. Авторы выделили глюкозиды в кристаллическом виде и с достаточной достоверностью установили их строение; этим опровергнуто возражение Армстронга<sup>17)</sup>, утверждавшего, что продукты синтетической деятельности энзимов не были достаточно хорошо выделены и изучены.

Тем же авторам удалось получить при помощи мальтазы из дрожжей ряд  $\alpha$ -глюкозидов; при этом оказалось, что положение равновесия будет одно и то же, независимо от того, в каком направлении вести реакцию — в сторону синтеза или гидролиза. Из различнейших первичных спиртов мальтаза образует  $\alpha$ -глюкозиды; было бы поэтому странно ожидать, чтобы из глюкозы она образовывала  $\beta$ -глюкозид (изомальтозу).

Таким образом мы приходим к заключению, что нет никаких оснований принимать, что синтезируемые энзимами вещества чем-либо отличаются от тех, которые теми же энзимами гидролизируются.

Брэдлей и Келлерсбергер<sup>76 и 72)</sup> сравнивали содержание энзима гликогеназы в различных органах с содержанием в тех же органах гликогена; никакого параллелизма при этом установить не удалось. Наиболее богатые гликогеназой ткани подчас совсем не содержали гликогена, а содержащие много гликогена иногда оказывались совершенно лишенными гликогеназы. Как мы уже указывали выше, когда речь шла о липазе, подобные результаты не могут опровергнуть предположения, что синтетические процессы в тканях протекают под влиянием энзимов. При оценке их надо постоянно иметь в виду то сообщение, которое поддерживается

между отдельными органами при помощи циркулирующей крови. С другой стороны, было установлено, что все растительные ткани, содержащие крахмал, неизменно содержат также и амилазу; последняя встречается иногда и в тканях, лишенных крахмала. Тут мы должны подчеркнуть, что в растениях сообщение между отдельными тканями далеко не так полно, как в животном организме.

Мы уже говорили, что Брэдлей установил отсутствие в молочной железе липазы. Этот же автор показал <sup>15)</sup>, что упомянутая железа не содержит и лактазы. Повидимому, образование лактозы обусловлено не зависящей от энзима деятельностью протоплазмы клеток железы или же молочный сахар образуется где-либо в другом месте и только приносится с кровью к железе, где и выделяется. Вообще весь вопрос образования молока в настоящее время еще является совершенно невыясненным.

#### „Синтезирующие энзимы“.

Высказывалось предположение, что синтетические процессы вызываются особыми энзимами, неспособными производить гидролиз. До сих пор, однако, ни один такой энзим не был выделен <sup>\*)</sup>). При современном состоянии наших знаний гипотеза о существовании подобных энзимов является совершенно излишней, и потому мы вполне можем ее вообще отбросить. Все явления подвижного равновесия, наблюдаемые при энзиматических процессах, определенно говорят против предположения о существовании особых синтезирующих энзимов. Во всех работах, посвященных занимающему нас вопросу,—Крофт-Гилла, Виссера, Дитца, Буркело и моих—неизменно оказывалось, что положение равновесия всегда оставалось одним и тем же, независимо от количества энзима и при различных препаратах его. Если предполагать, что препараты эти представляют собою смесь синтезирующего и гидролизующего энзимов, то представляется весьма мало вероятным, чтобы всегда эти оба энзима находились

<sup>\*)</sup> Один энзим, обладающий только синтетическим действием, обнаружен в дрожжах. Это — открытая Нейбергом (Neuberg) карболитаза, обуславливающая непосредственное соединение между собою углеродных цепей определенных органических соединений. *Прим. перев.*

в точно одинаковых количественных соотношениях. Кроме того уже отмечалось, что синтетическое действие энзимов проявляется особенно ясно при тех условиях, которые, согласно теории обратимых реакций, сами по себе наиболее благоприятны для синтеза: например при значительной концентрации продуктов гидролиза.

Розенталер<sup>329)</sup> однако утверждает, что ему удалось выделить из эмульсина энзим, который гидролизирует бензальдегид-циангидрин, но совершенно не может его синтезировать. К сожалению, приводимые автором данные относительно его опытов настолько скучны, что не позволяют сделать никакого вывода по затронутому, чрезвычайно сложному вопросу. При полунасыщении раствора эмульсина сернокислым аммонием выпадает осадок; отфильтрованная от этого осадка жидкость обладает только гидролизирующими свойствами, осадок же, по растворении в воде, проявляет как гидролитическое, так и синтезирующее действие. Нацело отмыть осадок от примеси предполагаемого гидролизирующего энзима не удается. Тут прежде всего надо отметить, что повидимому в одном случае действие энзима определялось в присутствии значительного количества — до полунасыщения — сульфата аммония, а в другом — энзим брался в водном растворе.

Такая разница в условиях реакции несомненно могла отразиться на деятельности энзима. Разделение двух предполагаемых веществ можно было также произвести при помощи сернокислой меди; при повышении температуры они разрушались с различной скоростью.

Я повторил эти опыты<sup>47)</sup>, пользуясь для обнаружения деятельности энзима реакцией образования глицерин-глюкозида; реакция эта гораздо удобнее применявшейся Розенталером и дает более ясные результаты. То, что в фильтрате обнаруживается только гидролизирующий энзим, объясняется просто ослаблением энзима во время предшествующей обработки; ведь гидролитическое действие энзима обнаруживается уже при незначительных количествах его, между тем как для обнаружения, при сравнительно небольшом сроке наблюдения, синтетического процесса приходится брать всегда концентрированные растворы энзима. Действительно, если полученные при обработке по Розенталеру сильно разведенные растворы энзима упарить при низкой температуре

и уменьшенном давлении, то легко было обнаружить их синтетическое действие. Так как мои опыты ставились в присутствии избытка глицерина, то я перед выпариванием энзима прибавлял к нему немного глицерина и получал таким образом крепкий глицериновый раствор энзима.

Далее, если придерживаться точки зрения Розенталера, достигаемое при действии эмульсина положение равновесия обусловлено нахождением в препарате гидролизирующего и синтезирующего энзимов во вполне определенном количественном соотношении. Согласно утверждению того же автора, оба эти энзима неодинаково чувствительны к высокой температуре. Поэтому надо ожидать, что при действии на смесь глюкозы и глицерина препарата энзима, предварительно ослабленного нагреванием, положение равновесия окажется иным, чем при действии не нагревавшегося препарата. Между тем мне удалось показать <sup>47)</sup>, что положение равновесия в обоих случаях оказывается совершенно одинаковым, только при ослабленном препарате оно достигается по истечении более значительного времени, благодаря частичному разрушению эмульсина.

Крайбл <sup>222)</sup> также не мог подтвердить наблюдений Розенталера относительно синтеза бензальдегид-циангидрина.

Некоторые соображения по поводу истолкования опытов с синтезом оптически деятельных соединений будут приведены ниже, когда будет рассматриваться вопрос о специфичности.

Несколько странного взгляда придерживается Эйлер <sup>127 и 128)</sup>. Опыты Бэйтцке и Нейберга <sup>56)</sup> показали, что при подкожных впрыскиваниях кроликам эмульсина в сыворотке их появляется антиэмульсин; это новое вещество оказалось способным из глюкозы и галактозы синтезировать молочный сахар. Основываясь на этих опытах, Эйлер обобщает сделанные наблюдения и высказывает мысль, что все вообще антиэнзимы обладают синтезирующей способностью. Между тем сами авторы опытов не склонны обобщать свои результаты, тем более, что полученная аналогичным путем антилипаза никакого синтетического действия не проявляла. В дальнейшем даже была признана недоказанной синтетическая способность самого антиэмульсина (ср. Кока <sup>98)</sup>.

Подобные слишком быстрые заключения часто могут только завести на ложный путь, и во всяком случае совершенно неправильно на основании единичных наблюдений создавать общие законы.

Повторяя опыты Бэйтке и Нейберга<sup>46</sup>), я пришел к заключению, что при впрыскивании кроликам эмульсина образуется не антиэмульсин, а просто преципитин против находящегося в качестве примеси в препаратах энзима какого-то протеина. Это антитело дает с протеином осадок, а самый энзим остается в растворе, ничуть не теряя своей активности. Факт этот подтверждает предположение, что энзимы не являются белковыми веществами; может быть им удастся воспользоваться для очистки препаратов энзимов от посторонних белков.

Сыворотка кроликов, иммунизированных эмульсином, задерживает действие эмульсина совершенно в той же мере, как и сыворотка нормальных животных (ср. Коха<sup>48</sup>). Мои опыты показали, что это задерживающее действие обусловлено уменьшением концентрации водородных ионов. Если привести эту концентрацию к прежней величине, то активность энзима полностью восстановится. Далее, если раствору эмульсина сообщить ту же реакцию, которая получается при прибавлении „иммунной“ сыворотки, то и задержка окажется совершенно одинаковой. Удобнее всего получать определенной кислотности или щелочности реакцию путем прибавления одно- и двуметаллических фосфорнокислых солей в известных пропорциях. Предполагалось, что антиэмульсин содержится в глобулиновой фракции сыворотки. Я убедился, что содержащиеся в этой фракции вещества не оказывали никакого влияния на действие эмульсина; вместе с тем они не изменяли и концентрацию H-ионов.

Излишне говорить, что я не мог найти никаких намеков на образование лактозы. То, что приводят по этому поводу Бэйтке и Нейберг, весьма мало убедительно, а в позднейшей работе они сами высказывают предположение, что наблюдавшийся синтез зависел не от антиэнзима, а вызывался остатками неразрушившегося в организме Розенталеровского „синтезирующего“ эмульсина; гидролизующий же эмульсин, по их мнению, за то же самое время уже исчез из крови. Как я уже говорил, существование двух видов эмульсина является чисто воображаемым.

Помимо недостаточности экспериментальных доказательств, надо еще указать, что приписывание антителу химических свойств, противоположных свойствам соответствующего антигена, противоречит Эрлиховскому понятию об „антителе“. Антитело проявляет свое действие путем нейтрализации, осаждения и т. д. соответствующего антигена. Так, например, при впрыскивании инородного белка образуется антитело, дающее с растворами этого белка осадок; оно называется „преципитином“. Истинным антиэмультином было бы такое образование в результате инъекций эмульсина вещества, которое, действуя на эмульсию, делало бы его инактивным. Если эмульсин гидролизирует лактозу, то настоящим антителом будет не такое, которое синтезирует молочный сахар, а то, которое препятствует энзиму производить гидролиз, а это далеко не одно и то же. Мы уже видели, что энзим может вызывать как гидролитический, так и синтетический процессы, в зависимости от того, в каком положении по отношению к состоянию равновесия находилась система в момент прибавления энзима. Если придерживаться взгляда Бэйтца и Нейберга, развитого затем далее Эйлером, то придется признать, что вещество (энзим) может являться своим собственным антителом.

В связи с этим следует упомянуть о заявлении Эйлера<sup>129</sup>), что некоторые экстракты дрожжей содержат энзим, синтезирующий гексозо-фосфат, но не могущий это соединение гидролизовать. Для обозначения этого энзима и было предложено окончание „эза“, о котором упоминалось во второй главе. Но уже раньше Гарден и Йонг<sup>167</sup>) описали энзим, гидролизировавший гексозо-фосфаты; он был найден ими в экстрактах, подобных тем, с которыми работал Эйлер. В данном случае положение еще весьма не ясно, и нет оснований предлагать новый термин, особенно если принять во внимание, что термин этот до известной степени указывает, будто энзимы не подчиняются обычным законам катализа. Пока не будут приведены более веские доказательства противного, мы вправе приписывать одному и тому же энзиму и синтетические и гидролитические функции, поскольку энзимы являются истинными катализаторами. Тем самым устраняется необходимость в новом названии.

Что касается гипотетических синтезирующих агентов, то относительно их можно с уверенностью сказать следующее. Когда дело идет об обратимых реакциях,—а именно такие были исследованы Розенталером и Бэйтце и Нейбергом,—то вещество, ускоряющее течение реакции только в одном направлении, не может быть истинным катализатором.

### „Ложное равновесие“.

**Ивляются ли энзимы компонентами находящейся в равновесии системы?**

Здесь мы остановимся на двоякого рода фактах, побудивших некоторых исследователей ответить на поставленный в заголовке вопрос в утвердительном смысле.

Во-первых, положение равновесия, достигнутое при действии энзима, обычно отличается от положения, достигаемого при неорганических катализаторах, например при действии кислоты. На это уже указывалось выше (ср. стр. 9), и тогда же отмечено было, что для такого перемещения равновесия достаточно очень незначительных количеств энергии; источником этой энергии вполне может явиться имеющаяся в гетерогенной системе энергия поверхностного натяжения.

В своей работе, посвященной каталитическим реакциям, протекающим с образованием промежуточных соединений, Абель<sup>8 и 9</sup>) указывает, что при энзиматических процессах часть такого промежуточного продукта может к моменту достижения равновесия оказаться неразложенной. Таким образом энзим оказался бы частью находящейся в равновесии системы и, согласно закону действия масс, мог бы влиять на положение равновесия. Но надо помнить, что активная масса энзима крайне мала по сравнению с массой остальных компонентов системы, поэтому обусловленное законом действия масс влияние энзима на положение равновесия может быть лишь весьма ничтожным. Чем лучше становятся методы очистки энзимов, тем меньшие количества их необходимы для достижения определенного эффекта. Адсорбция на самом энзиме или на сопутствующих веществах тоже могла бы иметь влияние, но оно во всяком случае будет едва уловимым.

Во-вторых, различные наблюдатели находили, что в зависимости от взятого количества энзима реакция может протекать более или менее полно. Но я должен сказать, что при тщательном изучении полученных этими исследователями результатов я ни разу не нашел определенного доказательства, что действительно состояние равновесия было достигнуто.

Часто в подтверждение взгляда, что энзимы приводят к состоянию „ложного равновесия“, т.е. что существует количественная зависимость между количеством энзима и конечным результатом реакции, цитируют работы Тамманна (360, 361 и 362), кстати сказать, весьма тщательные и ценные. Но сам Таммани вовсе не истолковывает своих результатов в указанном смысле. Его задачей являлось выяснить скорость самопроизвольного разрушения энзима и влияние на этот процесс продуктов вызываемой энзимом реакции. Насколько я мог заметить, Таммани в своей работе совершенно не касается вопроса о равновесии и даже ни разу не употребляет этого термина. Совершенно ясно, что если энзим перестал проявлять свое действие — благодаря ли разрушению или вследствие временного инактивирования, — то дальнейшее течение реакции останавливается. Вызванное накоплением продуктов реакции инактивирование, — если только оно не перешло в разрушение энзима, — может быть устранено удалением этих продуктов, а иногда даже просто разведением реакционной смеси. После этого реакция может продолжаться далее. Прекращение действия энзима в таких случаях не является результатом наступившего равновесия, обусловленного противоположной, синтетической реакцией, а зависит от действия на энзим известных химических соединений. Вообще говоря, возобновление реакции при удалении образовавшихся продуктов может зависеть от нарушения равновесия, но чаще дело идет об устраниении вредного влияния этих продуктов на энзим.

Надо отметить, что во всех случаях, где предполагалось достижение „ложного равновесия“, в опытах употреблялись малые количества энзима. Если мы обратимся к рис. 1 на стр. 22, то нетрудно увидеть, что кривая, соответствующая наименьшему содержанию энзима, как будто бы тоже дает указание на достижение ложного равновесия. На самом деле,

продолжение кривой, не уместившееся на странице, подошло гораздо ближе к пределу, достигнутому при больших концентрациях энзима, чем это можно было предполагать на основании ее первоначального подъема. Для всех остальных кривых достигнутая высота, определяющая положение равновесия, совершенно одинакова. При этом важно отметить, что разница в концентрациях энзима была очень значительна, как это видно из различной скорости гидролиза, и об избытке энзима ни в одном случае говорить не приходится.

Когда мы работаем с малыми количествами энзимов, то по мере уменьшения этих количеств результаты наших наблюдений становятся все менее надежными и достоверными. Это зависит от нескольких причин. Прежде всего, в более поздних стадиях реакции, когда концентрация субстрата значительно понизилась, течение реакции, в силу закона действия масс, очень замедляется, даже если энзим имеется в большом количестве. Еще сильнее будет это замедление, если мала и концентрация энзима. На многих кривых, приводимых Тайманном, можно заметить, что при сравнительно малом подъеме их они все-таки продолжают, хотя и медленно, подниматься до самого конца чертежа. Если бы произвести еще наблюдения, например через неделю, то мы несомненно обнаружили бы дальнейший подъем. Кроме того сам Тайманн отмечает, что при небольших количествах энзима последний к концу опыта оказывался разрушенным. Я могу подтвердить этот факт специальными опытами, сделанными над эмульсином. Под конец опыта я сгущал опытную смесь выпариванием под уменьшенным давлением и мог убедиться, что действительно не оставалось никаких следов энзима. Следует иметь еще в виду, что некоторые реакции протекают, хотя и с незначительной, но все же измеримой скоростью, и сами по себе — без участия энзимов. Это обстоятельство привносит новые затруднения; оно несомненно могло оказаться в опытах Брэдлея<sup>13)</sup>, где количество гидролизированного триолеина как будто бы оказывалось пропорциональным количеству взятой в опыт липазы. Во время моих неопубликованных опытов над гидролизом триацетина липазой из „Панкреатина Ренания“ я сделал следующее наблюдение. Вплоть до четвертого дня скорость гидролиза была пропорциональна концентрации липазы, так что кривые, изображавшие ги-

дролиз при трех различных концентрациях энзима, к этому времени достигли различной высоты. Начиная с этого дня кривые, соответствовавшие меньшим количествам липазы, стали подниматься очень медленно, притом, повидимому, с одинаковой скоростью, между тем как кривая, относившаяся к большому количеству энзима, продолжала нарастать почти попрежнему. Возможно, что с течением времени все кривые достигли бы одинаковой высоты, но чрезвычайно медленное течение реакции не позволило бы решить, достигнуто ли состояние равновесия под действием энзима или же благодаря самопроизвольному процессу. Из всего сказанного можно вывести заключение, что при малых количествах энзима, благодаря различным источникам ошибок, невозможно притти к надежным выводам.

Само собой разумеется, что нельзя ожидать какого-либо, катализитического действия от энзима после того, как последний потерял свою активность. В этом случае прибавление нового количества энзима может поалечь дальнейшее течение реакции. Несколько труднее объяснить те случаи, когда подобный же эффект вызывался прибавлением нового количества субстрата. Тут представляется несколько возможностей. Во-первых, могло установиться настоящее подвижное равновесие, хотя, например, при трипсине или эмульсине это мало вероятно. Если при этом энзим еще присутствует в более или менее значительном количестве, то, по закону действия масс, прибавка субстрата повлечет за собой возобновление гидролиза. Возможно также, что, благодаря малому количеству энзима, реакция течет весьма медленно. В таком случае прибавление субстрата увеличит скорость реакции настолько, что ее можно будет обнаружить. Влияние разведения или, напротив, увеличения концентрации зависит от первоначальной концентрации субстрата. Если она была мала, то повышение ее ускорит течение реакции; но выше известного предела, как мы увидим дальше, повышение концентрации субстрата уменьшает скорость реакции, вероятно, просто в силу механических причин. В этом случае разведением реакционной смеси можно реакцию ускорить. Более подробные исследования по этому вопросу крайне желательны.

Говоря о действии продуктов реакции на энзимы, интересно отметить, что, судя по опытам Тамманна, это действие

не зависит от какого-либо химического сродства между энзимом и упомянутыми продуктами. Оказывается, что одни из них — например, бензальдегид, гидрохинон, синильная кислота — оказываются вредными для энзима, другие, вроде глюкозы, алкоголя и глицерина, повидимому, на энзимы не влияют. При бензальдегиде происходит прямо осаждение энзима, и вполне возможно, что и другие вещества влияют на энзимы, изменяя их коллоидальное состояние. Эфир, который не принадлежит к числу продуктов реакции, вызываемой эмульсином, тоже обладает вредным действием на него.

Известный теоретический интерес представляет вопрос о влиянии температуры на положение равновесия. В опытах с глицерин-глюкозидом, где не было никакого сомнения в достижении состояния истинного подвижного равновесия, я не мог обнаружить никакого влияния изменения температуры. Так как эта исследуемая реакция была практически термонейтральна, то, согласно Вант-Гоффовскому принципу подвижного равновесия, можно было заранее предвидеть, что изменение температуры не повлечет заметного изменения в положении равновесия. Тамман же<sup>361)</sup> в опытах с гидролизом салицина нашел, что при температурах ниже 30°, равновесие устанавливается при меньшей степени гидролиза, чем при более высокой температуре. Так как реакция гидролиза салицина термонейтральна или даже слегка экзотермична (ср. Герцог<sup>110</sup>) то, по правилу Вант-Гоффа, надо было бы ожидать при высокой температуре или той же степени гидролиза или несколько меньшей величины, чем при низкой температуре. Вероятнее всего, что, благодаря медленному действию энзима при низкой температуре, в опытах Таммана действительное состояние равновесия еще не достигалось. Возможно также, что за более продолжительное время наблюдения, в опыте, ставившемся при низкой температуре, энзим успел разрушиться раньше, чем было достигнуто состояние равновесия. Следовало бы сначала достигнуть равновесия, например при температуре около 46°, а затем охладить, прибавив, если нужно, еще энзима.

Нам остается еще коснуться здесь работы Брэйлсфорда Робертсона<sup>342)</sup> относительно действия крепких раствор-

ров пепсина на продукты пептического переваривания казеина. При этом образуется осадок, который принимается за „парануклеин“. Количество осадка пропорционально количеству прибавленного пепсина. Автор истолковывает свои наблюдения в том смысле, что существует особая синтезирующая форма пепсина и что величина произведенного энзимом действия пропорциональна количеству энзима. При изучении этого явления я нашел<sup>47)</sup>, что оно вовсе не является результатом действия энзима, а просто представляет собою случай осаждения одного коллоида другим. Наблюдается оно не у всех препаратов пепсина, и если предоставить растворенный пепсин на некоторое время самоперевариванию, то способность вызывать образование осадка совершенно утрачивается, между тем как протеолитическое действие полностью сохраняется. С другой стороны, можно разрушить пепсин щелочью, сохранив в то же время осаждающую способность. Из продуктов переваривания казеина главное участие в образовании осадка принимает, повидимому, нуклеин; что именно является преципитирующем агентом в препаратах пепсина, я пока сказать не могу; можно только указать, что вещество это переваривается пепсином.

Надо сказать несколько слов по поводу работы Гэй и Робертсона<sup>161)</sup>. Опыты их заключались в следующем. Если впрыскивать животным парануклеин, то удается вызвать у них повышенную чувствительность (анафилаксию) по отношению к синтетическому парануклеину, полученному действием пепсина на продукты пептического переваривания.

Если же для подготовительных впрыскиваний брать раствор упомянутых продуктов гидролиза, то анафилаксии против парануклеина не получается. Мне кажется, что объяснить это можно следующим образом. Парануклеин, употреблявшийся для подготовительных инъекций (авторы не указывают, каким путем он был получен) — содержал то вещество, — вероятно, как я уже говорил, нуклеин, — которое является главным компонентом коллоидального комплекса, выпадающего при действии пепсина на продукты гидролиза. В таком случае, при повторной инъекции, вызывавшей явления анафилаксии, вводили то же вещество, что и при подготовительных впрыскиваниях. Растворы же продуктов

пептического переваривания не вызывают анафилаксии потому, что содержат очень мало нуклеина. Необходимо было бы испытать, не будет ли употреблявшийся для опытов парануклеин осаждаться пепсином, а также попробовать, не получится ли анафилаксии против синтетического парануклеина после втирываний вещества, осаждаемого из раствора продуктов пептического переваривания 0,2%, соляной кислотой. Я могу отметить, что вещество это в слабых концентрации не осаждается уксусной кислотой.

Если энзим составляет часть находящейся в равновесии системы, то прибавление нового количества энзима должно изменить положение равновесия. Я неоднократно проверял это и ни разу не мог обнаружить ни малейшего изменения.

Наконец по поводу предполагаемого „ложного равновесия“, в котором будто бы участвуют сами энзимы, надо еще указать, что энзимы не могут считаться растворимыми в обычном смысле этого слова, а образуют отдельную фазу в системе; поэтому они не могут принимать участия в химическом равновесии; единственное, о чем может идти речь, это о влиянии поверхностной энергии. Вопрос о равновесии в гетерогенной системе чрезвычайно сложен. Он был изучен Уиллардом Гиббсом<sup>153)</sup>; ознакомление с ним требует больших математических познаний. В дальнейшем мы встретимся с многочисленными доказательствами того, что при энзиматических реакциях мы действительно имеем дело с гетерогенными системами.

#### Равновесие при энзиматических реакциях является истинным.

Впервые это было доказано Крофт-Гиллом, установившим, что положение равновесия, достигаемое под влиянием действия мальтазы, будет одним и тем же, берется ли в качестве исходного продукта глюкоза или дисахарид (мальтоза). Аналогичные результаты были получены Буркело и Бриделем<sup>71)</sup> при действии эмульсина на  $\beta$ -этилглюкозид, Яландером при липазе из семян клещевины, и мною<sup>47)</sup> при реакции расщепления и синтеза  $\beta$ -глицерин-глюкозида. Виссер<sup>389)</sup> пришел к тому же выводу, изучая действие эмульсина на салицин; надо сказать, что в этом

случае положение равновесия так близко от состояния полного гидролиза, что нельзя быть вполне уверенным в полученных результатах. Впрочем, данные, полученные Буркело и Бриделем<sup>71)</sup>, хорошо совпадают с данными Виссера. Виссер же<sup>389)</sup> обнаружил образование тростникового сахара при действии инвертазы на соответствующие моносахариды.

Робертсон, Ирвин и Добсон<sup>321)</sup> нашли, что при действии энзимов, извлеченных из листьев и ствola сахарной свекловицы, на крепкий раствор инвертированного сахара происходит образование сахарозы, достигающее 6%. Интересно, что в самом корне свекловицы, в период накопления сахара, названные исследователи не могли обнаружить присутствия инвертазы.

### Синтез протеинов.

До сих пор мы еще не касались синтетической способности протеокластических энзимов. Как было отмечено Литсом<sup>230)</sup>, многие факты, относящиеся к синтезу протеинов в организме, указывают, что мы имеем дело с обратимым энзиматическим процессом. Из опытов Леви<sup>242)</sup>, а также Энрикэса и Ганзена<sup>187)</sup> известно, что животные могут поддерживать азотистое равновесие, получая в качестве источника азота только продукты триптического или эрептического переваривания белка. Заменить эти продукты продуктами кислотного гидролиза не удается. Мы приведем слова Литса: «Повидимому, существуют определенные связи между отдельными компонентами белковой молекулы, которые не разрушаются действием энзимов, а если разрыв этих связей будет произведен, например при кислотном гидролизе, то организм уже не способен восстановить эти связи. Подобные комплексы, которые клетка не способна ни разложить ни заново построить, несомненно, должны существовать; они являются центрами, вокруг которых группируются остальные составные части протеиновой молекулы, когда происходит синтез белка. Такой взгляд приводит нас к предположению, что синтетический процесс обусловливается тем же агентом, который вызывает и гидролиз, и как при других обратимых энзимных процессах, предел гидролитической способности определяет

собою и предел способности синтетической". Подробное исследование гидролиза протеинов при помощи пепсина, трипсина и кислот можно найти в работе Энрикеса и Г'ялдбэка<sup>186)</sup>.

Очень трудно получить прямое доказательство синтеза протеинов. Условия тут весьма запутаны, и пока они не будут более основательно изучены, трудно ожидать удовлетворительных результатов по вопросу о синтезе белков.

Тэйлор<sup>365)</sup> описал синтез протамина при действии полученного из моллюска трипсина на продукты триптического переваривания того же протамина. Мы уже упоминали о предполагаемом синтезе парапуклеина пепсином.

Быть может, следует рассматривать как продукты синтетической реакции вещества, известные под именем пластеинов. Данилевский показал<sup>106)</sup>, что при действии сычужного энзима на растворы пептона Витте образуется осадок; позднейшие наблюдатели обнаружили это же явление при действии пепсина и папаина. Эти "пластеины" образуются при условиях, наиболее благоприятных для синтетического процесса; количество полученного продукта возрастает по мере увеличения концентрации пептона. Полученные пластеины не являются аналогичными с белками, из которых был получен пептон; так, например, пластеин, полученный из казеинового пептона, при кислотном гидролизе дает другие количества аминокислот, чем исходный казеин. Впрочем, если принять во внимание все разнообразие могущих получиться при гидролизе продуктов, то последнее обстоятельство не покажется удивительным.

Энрикес и Г'ялдбэк<sup>185)</sup> на основании тщательного изучения действия пепсина на концентрированные растворы пептона приходят к заключению, что синтетический процесс, действительно, имеет место; его удается проследить, пользуясь методом титрования с формалином по Сёреисену. Чем глубже расщеплен белок, тем проще построеннымми оказываются синтезированные продукты, но зато тем в большем количестве они образуются. Особенно ясно это сказывается при пользовании в качестве исходного материала продуктами кислотного гидролиза казеина. В некоторых слу-

чаях синтезированное вещество содержит лишь немногим больше свободных  $\text{NH}_2$  групп, чем нативный белок. При подобных опытах надо иметь в виду возможность выпадения комплексного коллоида при действии каких то составных частей некоторых препаратов пепсина на продукты гидролиза казеина (ср. стр. 87). Я заметил, что подобное явление наблюдается и с пептоном Витте. Энрикес и Г'ялдбэк утверждают, что в их постановке опытов подобная ошибка была исключена; то обстоятельство, что результаты титрования с формалином изменяются в сторону, соответствующую синтетическому процессу, во всяком случае служит надежным подтверждением правильности выводов авторов. Вероятно, благодаря тому, что продукты синтетической реакции по мере образования выпадают в виде осадка и удаляются таким образом из сферы действия, процесс идет настолько далеко, что его удается обнаружить.

Крепкий раствор продуктов триптического переваривания казеина в присутствии трипсина обнаруживает постепенное снижение электропроводности, что также указывает на синтетический процесс.

Опыты Абергальдена и Рона<sup>4)</sup>, поставленные с целью убедиться, не произойдет ли образования полипептидов из соответствующих аминокислот под влиянием энзимов различных тканей, не привели ни к каким определенным результатам.

Прямые доказательства энзиматического синтеза протеинов пока весьма скучны; известным подтверждением возможности такого процесса могут служить те явления, которые наблюдаются при переваривании белка трипсином; мы встречаемся здесь как раз с тем, что должно бы наблюдаваться при обратимой реакции, достигающей состояния равновесия. Во-первых, мы видим, что реакция замедляется по мере накопления продуктов гидролиза; во-вторых, если удалить эти продукты путем диализа или даже просто уменьшить их концентрацию, разводя реакционную смесь водой, то можно наблюдать дальнейшее течение реакции, которая перед этим, казалось бы, уже остановилась. Впрочем при трипсине продукты гидролиза оказывают задерживающее влияние на течение реакции еще и тем, что уменьшают щелочность реакционной смеси.

### Синтез при помощи аминокислот.

Мы уже упоминали о чрезвычайно важном синтезе, описанном Дэкином<sup>104)</sup>, где роль катализатора исполняли аминокислоты. Если эта реакция обратима, то крайне интересно было бы установить, не будет ли тот же катализатор ускорять и гидролитический процесс. Я нашел, что цинамилиден-малоновая кислота, образующаяся в концентрированных растворах коричного альдегида и малоновой кислоты под катализическим влиянием гликоколла, является веществом очень нестойким и легко окисляемым. Этот синтетический процесс, как и надо было ожидать, сопровождается уменьшением электропроводности. Разведенные же растворы полученной путем этого синтеза кислоты обнаруживают постепенное повышение электропроводности, которое ускоряется, если прибавить в качестве катализатора гликоколл. Впрочем, пока мы не знаем ближе химизма наблюдаемого процесса, придавать этим фактам особенно большое значение нельзя.

### Асимметрический синтез.

Розенталером<sup>329)</sup> описан интересный случай асимметрического синтеза, осуществляемого при помощи эмульсина. Если в определенных условиях действовать эмульсином на смесь бензальдегида и синильной кислоты, удается обнаружить образование оптически деятельного бензальдегид-циангидрина.

Наблюдение это было подтверждено Аристронгом и Хортоном<sup>24)</sup>, я же получил отрицательный результат. Точно придерживаясь указаний автора, я испытал два различных препарата эмульсина, но ни разу не мог наблюдать образования какого-либо оптически деятельного вещества. Действуя моими препаратами энзима на рацемический бензальдегид-циангидрин, я получил симметрический гидролиз, а не расщепление только одного какого-либо оптического изомера. Так же легко гидролизировался и амигдалин.

Любопытно, что Бредиг и Фиске<sup>112)</sup> обнаружили подобный асимметрический синтез, пользуясь в качестве катализатора оптически деятельными основаниями. Если брать правовращающий хинин, то образуется правовращающий

циангидрин. Если же взять хинидин, который вращает плоскость поляризации влево, то получится левовращающий циангидрин.

Говоря о работе Розенталера, следует упомянуть еще, что Бредиг и Фиске, пользуясь его методом, не смогли получить убедительных результатов; некоторые возражения против этого метода были сделаны также Виртом<sup>400</sup>). Поэтому, хотя результаты Розенталера являются вполне правдоподобными и были подтверждены Армстронгом, все же к ним следует отнестись с известной осторожностью.

Большинство описанных в этой главе энзиматических синтезов, за исключением производимых липазой, являются симметрическими. Образование оптически деятельного циангидрина особенно интересно потому, что при этом из двух оптически недеятельных веществ, благодаря действию оптически активного катализатора, образуется вещество, которое тоже оптически активно. Мы должны предполагать, что подобный катализатор будет ускорять образование одного изомера в большей степени, чем другого, хотя все-таки образовываться будут оба. И, действительно, Розенталер нашел, что под конец реакции опытная смесь становилась оптически недеятельной. То же самое нашел и Дэкин<sup>103</sup>), при гидролизе оптически деятельных эфиров липазой.

## ГЛАВА ШЕСТАЯ.

### СКОРОСТЬ РЕАКЦИИ И УСЛОВИЯ, ОТ КОТОРЫХ ОНА ЗАВИСИТ.

---

Основной функцией энзимов как катализаторов является изменение скорости реакции. Поэтому, изучая действие энзимов, мы должны, помимо исследования получающихся в результате энзиматической реакции продуктов, знать и все те факторы, которые так или иначе влияют на скорость реакции.

#### ПРИМЕНЕНИЕ МАТЕМАТИКИ В БИОЛОГИИ.

При разборе стоящей перед нами задачи нам придется несколько раз прибегать к помощи математических формул. Ввиду того, что многие высказываются против введения математики в биологию, мы считаем нужным сказать несколько слов о той пользе, которую может принести математическая обработка биологических исследований.

Нельзя не согласиться, что математический анализ не может открыть новых фактов. Но, тем не менее, выражение результатов опыта в виде математической формулы часто обнаруживает, что исследуемое явление подчиняется известным общим законам; без помощи математики мы этого иногда вообще не смогли бы установить. Аррениус указывает<sup>31)</sup>, что математическая обработка дает нам также возможность обнаружить, все ли факторы, влияющие на данное явление, приняты нами во внимание; примеры этому мы увидим в настоящей главе. Даже эмпирическая формула может помочь начать выяснить, зависят ли какие-либо отклонения от ошибок опыта или от чего-либо другого.

Часто цитируют слова Гэксли, сравнивавшего математику с мельницей, которая не может из гороха сделать крупу чакту.

К сожалению, при этом склонны забывать, что материал, после того, как он прошел через мельницу, значительно более удобен для употребления, чем в непереработанном виде.

### Закон действия масс.

Закон действия масс гласит, что скорость реакции пропорциональна концентрациям реагирующих молекул. Для того чтобы молекулы могли прореагировать, они должны притти в соприкосновение, встретиться друг с другом. Совершенно ясно, что количество таких встреч в единицу времени будет тем больше, чем больше молекул содержится в единице объема, т.-е. чем выше их концентрация. Поэтому, если в течении реакции изменяется только один какой-либо род молекул, то скорость реакции в каждый данный момент будет пропорциональна количеству оставшегося к этому моменту еще неизмененным вещества. Примером такой реакции может служить гидролиз сахарозы под влиянием иона водорода. Правда, на каждую молекулу инвертированного сахара расходуется одна молекула воды, но так как реакция протекает в присутствии большого избытка воды, то последним фактором можно пренебречь. Если обозначить через  $x$  количество сахара, инвертированного за время  $t$ , то средняя скорость реакции за это время будет  $\frac{x}{t}$ ; если, далее, обозначить концентрацию сахарозы к моменту  $t$  через  $C$ , то, так как скорость реакции пропорциональна этой концентрации, мы сможем написать:  $\frac{x}{t} = kC$ , где  $k$  есть некоторая константа.

Но, благодаря непрерывному гидролизу сахара, концентрация его в два следующие один за другим промежутка времени не будет одной и той же, так что приведенное уравнение будет справедливо только в том случае, если  $t$  так мало, что изменение концентрации за этот промежуток времени окажется неизмеримо малым.

В дифференциальном исчислении подобная зависимость выразится уравнением:  $\frac{dx}{dt} = kC$ , или, так как  $x$  пропорционально  $C$ :  $-\frac{dC}{dt} = kC$ . Здесь знак минус указывает, что  $C$  (концентрация сахарозы) со временем уменьшается. Знаки  $dx$  и  $dt$

не надо рассматривать как произведение двух величин; они означают только, что  $x$  и  $t$  должны быть так малы, чтобы скорость реакции не изменилась за время  $t$ .

### Мономолекулярные реакции.

Реакции, подобные описанной, при которых изменяется концентрация только одного какого-либо вещества, называются мономолекулярными; течение их определяется приведенным уравнением.

Для того чтобы применить это уравнение на практике, надо найти способ прилагать его к экспериментальным данным, при которых время  $t$  достаточно велико, чтобы быть измеренным. Эта задача разрешается путем интегрирования. В пределах настоящей монографии невозможно подробно изложить этот метод; интересующиеся могут познакомиться с ним по книге Меллора „Химическая статика и динамика“. Достаточно будет сказать, что посредством этого метода складывается очень большое число бесконечно малых величин, например все величины  $\frac{dx}{dt}$  за определенный промежуток времени, скажем, за десять минут. Произошедшее за это время изменение концентрации определяется одним из описанных выше методов.

### Ньютоновский закон скоростей.

Следует обратить внимание на то, что всякий процесс, стремящийся к достижению состояния равновесия, по мере приближения к этому состоянию, все больше и больше замедляется, как будто бы сила, вызывающая процесс, все ослабевает. Примерами могут служить: выравнивание температуры между соприкасающимися холодным и горячим телом, течение воды в трубке, соединяющей два сосуда с разными уровнями жидкости, и, наконец, обратимые химические реакции. Закон этот иногда называется „Ньютоновым законом скоростей“.

### Логарифмическая кривая.

При рассматриваемых нами процессах скорость реакции в каждый данный момент зависит от скорости ее в предшествовавший момент; если изобразить течение такого процесса

графически, то мы получим так называемую логарифмическую кривую, т.-е. такую кривую, в которой одни координаты, например абсциссы, представляют собою ряд чисел, а другие, например ординаты — логарифмы этих чисел. Этим объясняется, почему интеграл дифференциального уравнения, характеризующего мономолекулярную реакцию, имеет логарифмическую форму.

Интеграл этот можно выразить различным образом; для наших целей — при исследовании действия энзимов,— где начальное и конечное состояния часто не удается точно определить, удобнее всего следующая форма:

$$k = \frac{1}{t_2 - t_1} \log \frac{C_1}{C_2}$$

Здесь  $k$  есть скорость реакции,  $C_1$  и  $C_2$  — концентрации субстрата в моменты  $t_1$  и  $t_2$  (время считается от начала реакции). Как легко видеть на основании любых двух измерений, произведенных в течение реакции, можно определить величину  $k$ .

Другой вид того же интеграла, из которого в существости выведена и первая форма, тоже часто оказывается полезным.

$$k = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a - x}$$

Здесь  $t$  есть время, истекшее с начала реакции,  $a$  — начальная концентрация субстрата и  $x$  — количество субстрата, израсходованное за время реакции; следовательно  $a - x$  будет представлять собою концентрацию субстрата к моменту  $t$ .

#### Приложение к энзиматическим процессам.

Казалось бы, что при гидролизе мы имеем дело с изменением концентрации только одного вещества и что, следовательно, скорость гидролитического процесса должна подчиняться законам мономолекулярной реакции. Но надо помнить, что если гидролитический процесс протекает под влиянием энзима, то он происходит в гетерогенной системе, а именно, как мы увидим далее, на поверхности энзима. Величина

активной массы остается нам неизвестной; поэтому, если мы находим, что действие данного энзима подчиняется законам мономолекулярной реакции, то это должно зависеть от каких-то других условий, чем при гомогенной системе. Уже В. Анри<sup>183)</sup> указывал, что при энзимах мы имеем дело с системой из двух фаз, и что, следовательно, закон действия масс не является здесь безусловно применимым.

Тем не менее изучение энзиматических реакций с точки зрения закона действия масс, часто дает очень ценные результаты. Так, например, зависимость скорости реакции от относительной концентрации энзима и субстрата иногда имеет большое как практическое, так и теоретическое значение.

### Гидролиз тростникового сахара энзимами и кислотами.

Приводимая ниже таблица покажет нам данные, получаемые при мономолекулярной реакции, протекающей в гомогенной системе (гидролиз тростникового сахара кислотой); константа скорости реакции, вычисленная при помощи приведенного выше уравнения, остается, в пределах ошибки опыта, за все время наблюдения постоянной.

Время в минутах	Вращение	Константа скорости реакции
0 . . . . .	16,75° . . . . .	0,001330
30 . . . . .	41,00 . . . . .	1332
60 . . . . .	35,75 . . . . .	1352
90 . . . . .	30,75 . . . . .	1379
120 . . . . .	26,00 . . . . .	1321
150 . . . . .	22,00 . . . . .	1371
210 . . . . .	15,00 . . . . .	1465
330 . . . . .	2,75 . . . . .	1463
510 . . . . .	- 7,00 . . . . .	1386
630 . . . . .	- 10,00 . . . . .	
со . . . . .	- 18,75 . . . . .	

Если мы теперь вместо кислоты возьмем энзим инвертазу и будем вычислять константу скорости реакции, пользуясь тем же самым уравнением, то мы получим следующие результаты (В. Анри<sup>181)</sup>).

Время в минутах	Отношение количества инвер- тированного сахара к началь- ному количеству сахара	Константа скорости реакции
66 . . . . .	0,084 . . . . .	0,00058
168 . . . . .	0,220 . . . . .	64
334 . . . . .	0,426 . . . . .	72
483 . . . . .	0,581 . . . . .	77
696 . . . . .	0,746 . . . . .	85
1 356 . . . . .	0,952 . . . . .	97

Мы видим, что константа правильно возрастает.

Теперь возьмем ряд данных, полученных Ф. Армстронгом<sup>13)</sup> при гидролизе молочного сахара лактазой.

Время в часах	Константа скорости реакции
1 . . . . .	0,0640
2 . . . . .	0,0543
3 . . . . .	0,0460
5 . . . . .	0,0310
24 . . . . .	0,0129

В этом случае, в противоположность предыдущему, константа с течением времени падает.

Наконец я приведу еще таблицу, относящуюся к моим опытам над трипсином:

1-е 10 минут . . . . .	$k = 0,0079$
2-е 10 " . . . . .	0,0046
3-и 10 " . . . . .	0,0032
4-е 10 " . . . . .	0,0022
5-е 10 " . . . . .	0,0016
7-е 10 " . . . . .	0,0009
9-е 10 " . . . . .	0,0007

Здесь мы опять имеем уменьшение величины  $k$  по сравнению с тем, что должно бы получаться, если бы реакция протекала, как мономолекулярная.

#### Причины отклонения от обычного закона.

Чем могут объясняться эти отклонения от общего закона мономолекулярных реакций?

Прежде всего надо сказать, что случаи, когда скорость реакции в какой-либо данный момент оказывается большей, чем то можно было ожидать на основании уравнения моно-

молекулярной реакции, бывают довольно редкими. Обычно при энзимах наблюдается постепенное уменьшение скорости реакции; с разбора этих случаев мы и начнем.

Различие между тремя рассмотренными случаями особенно резко выступит, если изобразить результаты в виде кривых. На приводимом рис. 3 кривая *A* изображает действие инвертазы, согласно опытам В. А нри; цифры на левой стороне таблицы указывают количество инвертированного сахара

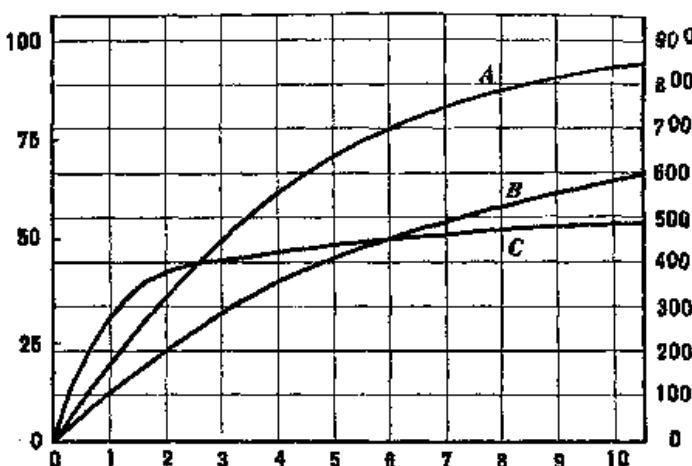


Рис. 3.

в процентах. Кривая *B* представляет настоящую логарифмическую кривую, соответствующую гидролизу сахара кислотой. Наконец кривая *C* соответствует изменению электропроводности при действии трипсина на казеин; данные получены в одном из моих опытов: ординатами здесь служит электропроводность, выраженная в обратных мегомах; оно отмечено цифрами на правой стороне рисунка. Цифры на абсциссе указывают время в часах и относятся ко всем кривым.

1. *Исчезновение энзима.* Опыт показывает, что во многих случаях в течение реакции количество энзима уменьшается. Так как между силой каталитического действия и количеством катализатора всегда существует прямая зависимость — хотя, как мы дальше увидим, и не всегда линейная,— то ясно, что по мере уменьшения количества катализатора скорость реакции будет падать быстрее, чем то бы следовало, если бы изменилась только концентрация субстрата.

Мы уже знаем, что в чистых растворах большинство энзимов оказываются нестабильными; присутствие субстрата или продуктов, получающихся в результате энзиматической реакции, в значительной мере предохраняет энзимы от разрушения. Трипсин принадлежит к числу наиболее нестабильных энзимов; как показал Вернон<sup>384)</sup>, в 0,4% растворе соды в течение часа разрушается до 70% трипсина. Между тем, пользуясь методикой, предложенной В. Ари<sup>182)</sup>, я на ряде опытов мог убедиться, что в присутствии продуктов переваривания в течение шести часов не наблюдается никакой убыли трипсина. Она начинает обнаруживаться лишь начиная с седьмого часа и то в очень незначительной степени. Постановка опытов была следующая: к раствору казеина было прибавлено определенное количество трипсина. Через известные промежутки времени из реакционной смеси брались пробы, которые в небольшом сосудике помещались в кипящую воду, чем достигалось разрушение энзима. Одновременно производилось определение электропроводности основной реакционной смеси. Затем к взятым пробам с инактивированным энзимом прибавлялся трипсин с таким расчетом, чтобы концентрация его в точности равнялась начальной концентрации энзима в реакционной смеси. Таким образом, при прочих совершенно одинаковых условиях, мы в основном опыте имели энзим, находившийся более или менее продолжительное время в растворе, а в пробах — свеже прибавленный энзим. Если бы за время, истекшее с начала опыта, произошло некоторое разрушение энзима, то в пробах с свеже прибавленным трипсином реакция должна была бы идти быстрее, чем в основном опыте. На деле этого не оказалось — до седьмого часа нельзя было обнаружить никакой разницы в течении реакции в основном опыте и в пробах, т.-е. за это время не наступило сколько-нибудь заметного разрушения трипсина. Подобные же результаты были получены Тамханном с эмульсионом.

2. *Влияние продуктов реакции.* Таким образом отклонение кривой, изображающей течение энзиматической реакции, от логарифмической кривой должно быть обусловлено помимо возможного разрушения энзима еще какими-то другими причинами. Опыт показал, что такой причиной является влияние продуктов реакции. Если мы прибавим их к реакционной

смеси, то скорость реакции замедлится совершенно так же, как если бы они образовались в результате нормально протекающей реакции.

При трипсине влияние продуктов реакции сводится главным образом к понижению концентрации гидроксильных ионов; в разведенных растворах, как показал Уольтерс<sup>81)</sup>, влияние их значительно слабее.

В других случаях реакционные продукты могут прямо разрушать или осаждать энзим; так действует, например, бензальдегид на эмульсин.

*3. Соединение энзима с субстратом.* Влияние продуктов реакции на энзим может проявляться, помимо двух указанных способов, еще различными другими путями. Прежде всего, имеющиеся данные заставляют предполагать, что энзим, раньше чем проявить свое действие, вступает в какое-то соединение с субстратом. Так как энзимы действуют как на гидролитический, так и на синтетический процессы, то подобное же соединение они должны давать и с продуктами гидролиза, ибо, если для гидролитического процесса необходимо соединение энзима с субстратом, то для синтетического должно иметь место соединение с продуктами гидролиза.

Первая попытка дать объяснение механизму каталитического процесса была сделана очень давно — в 1806 году, когда Клеман и Дэзорм<sup>97)</sup> предложили свою теорию относительно действия азотистой кислоты при окислении сернистого газа в серную кислоту. Авторы высказали предположение, что азотистая кислота образует какое-то соединение с сернистым газом (в настоящее время это соединение известно под именем нитросульфоновой кислоты), которое распадается, при чем образуется серная кислота, а катализатор — азотистая кислота — освобождается в неизмененном виде. Действительные доказательства существования таких соединений между катализатором и субстратом были даны лишь сравнительно недавно Броде<sup>88)</sup>. Эта же теория образования промежуточных соединений в настоящее время может считаться наиболее применимой для объяснения действия энзимов. Надо оговориться, что эти промежуточные соединения между энзимом и субстратом не должны обязательн<sup>о</sup> носить химический характер.

Повидимому, обычно энзим вступает в связь с определенной химической группой субстрата. Чем в меньшем количестве веществ соответствующая химическая группировка встречается, тем более выраженной будет „специфичность“ энзима. Так, инвертаза вступает в связь только с фруктозой, мальтаза — только с веществами, имеющими строение  $\alpha$ -глюкозидов, и т. д. Особенно резко выступает это тесное взаимоотношение энзима и субстрата у различных извлекаемых из дрожжей дисахараз; они были исследованы Э. Фишером<sup>142)</sup> и послужили основанием для известного сравнения энзима и субстрата с ключом и замком. Такая строгая специфичность заставляет предполагать известное сходство некоторых частей энзима и субстрата; принимая во внимание, что специфичность распространяется даже на оптические антиподы, мы вправе ожидать, что сами энзимы оптически деятельны. Последнее предположение подтверждается исследованием Дэкина<sup>103)</sup> над гидролизом оптически деятельных эфиров липазой из печени. Оказалось, что если действовать липазой на рацемическую смесь изомерных эфиров миндальной кислоты, то правый изомер гидролизируется быстрее, нежели левый. Поэтому первое время относительное содержание в реакционной смеси правой миндальной кислоты будет больше, чем левой, и жидкость становится оптически активной. По мере течения реакции количества правой и левой кислот постепенно сравниваются, так что к концу опыта смесь опять оказывается оптически недеятельной. Единственным объяснением этих фактов может служить предположение, что энзим сам оптически деятелен и образует какое-то соединение с гидролизуемыми эфирами. Вот что говорит по этому поводу Дэкин: „В первую фазу реакции правый и левый изомеры соединяются с энзимом; последний, как мы принимаем, сам оптически деятелен; поэтому скорость соединения его с правым и левым изомерами будет различна. Во второй стадии реакции происходит гидролиз образовавшихся комплексов (энзим + эфир). Комплекс (энзим + правый эфир), благодаря оптической активности энзима, нельзя рассматривать как оптический антипод комплекса (энзим + левый эфир); следовательно и здесь скорость реакции (гидролиза) будет для этих двух комплексов различна“.

Я хотел бы попутно обратить внимание на то, что здесь, в противоположность эмульсину, действующему только на  $\beta$ -метил-глюкозид, липаза оказывается способной гидролизовать оба изомера, только с различной скоростью. Это обстоятельство заставляет думать, что соединение энзима с субстратом имеет в данном случае не химический, а скорее физический характер.

В своем отношении к оптическим изомерам энзимы не отличаются от химических катализаторов, с известным нам химическим строением.

Бредиг и Фаянс<sup>78)</sup> показали, что правая и левая камфорные кислоты, будучи растворены в ацетофеноне, медленно разлагаются с выделением CO<sub>2</sub>. Реакция эта значительно ускоряется в присутствии оснований, играющих роль катализатора. При оптически недеятельных основаниях обе кислоты разлагаются с одинаковой скоростью. Если же взять в качестве катализатора оптически активную базу, например никотин, то оказывается, что скорость разложения правой кислоты будет на 17% больше, чем для левой. Обычный никотин вращает влево; было бы очень интересно установить, будет ли правовращающий никотин ускорять разложение левой кислоты в большей мере, чем правой (ср. также последнюю, более полную работу Фаянса<sup>136)</sup>).

Бредиг и Фиске<sup>79)</sup> получили асимметрический синтез бензальдегид-циангидрина. Когда в качестве катализатора брались оптически деятельные основания, то знак вращения полученного синтетического продукта зависел от знака вращения катализатора.

Работами Фишера с сотрудниками<sup>144)</sup>, Абергальдена и других установлено, что существует ясно выраженное „сродство“ энзима к определенным оптически активным группам. Работы указанных авторов касались отношения трипсина к различным ди- и трипептидам. В настоящее время еще не представляется возможным установить общее правило относительно того, какие из этих соединений поддаются действию трипсина, а какие нет; можно лишь указать, что расщепляются только полипептиды, состоящие из тех аминокислот, которые встречаются в природе. Полипептиды, содержащие тирозин или лейцин (а также, в несколько меньшей степени, содержащие аланин), вообще говоря, расщеп-

пляются легче других, но при этом наблюдается ряд любопытнейших особенностей. Так, аланил-глицин гидролизируется трипсином, а на глицил-аланин последний совершенно не действует; *l*-лейцил-*l*-лейцин расщепляется, между тем как ни *l*-лейцил-*d*-лейцин, ни *d*-лейцил-*l*-лейцин не поддаются действию трипсина. Таких примеров можно привести множество; более подробные данные по этому вопросу можно найти во второй части монографии Плиммера „Химическое строение протеинов“.

В этом, как и во многих других случаях кажущейся большой специфичности энзимов надо иметь в виду, что, быть может, сами реакции протекают с большей или меньшей легкостью. Если энзим, гидролизируя одно вещество, оказывается неспособным расщепить другое, весьма сходное по химическому строению с первым, то это может зависеть просто от того, что второе вещество вообще оказывается более стойким, труднее поддающимся разложению. К этому вопросу мы еще вернемся впоследствии.

Дальнейшее доказательство соединения энзима с субстратом было дано О'Сэлливаном и Томсоном<sup>21)</sup>. Они нашли, что в присутствии тростникового сахара инвертаза переносит, не разрушаясь, температуру на 25° выше, чем в чистом растворе. Авторы считают, что этот факт можно объяснить только образованием соединения энзима с сахаром.

#### ЗАВИСИМОСТЬ СКОРОСТИ РЕАКЦИИ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ ЭНЗИМА.

Только допущением образования соединений энзима с субстратом можно объяснить те явления, которые наблюдаются в начальных стадиях действия некоторых энзимов, если концентрация последних по отношению к концентрации субстрата очень мала. Дюクロ<sup>118 и 121)</sup> установил, что при этих условиях скорость реакции (гидролиз тростникового сахара инвертазой) не подчиняется закону действия масс, — количество инвертированного сахара было прямо пропорционально времени, так что, например, во вторые десять минут гидролизовалось столько же сахара, как и в первые десять; вместо логарифмической кривой получалась прямая линия. Далее, как показали опыты А. Броуна<sup>84)</sup>, если гидроли-

зировать инвертазой растворы сахара различной концентрации, то в начале опыта количество инвертированного в единицу времени сахара всюду оказывается приблизительно одинаковым. Между тем, согласно закону действия масс, оно должно было бы быть пропорционально концентрации субстрата. Броун объясняет это тем, что соединение между инвертазой и сахаром не распадается мгновенно, а существует некоторое определенное время; таким образом известное количество энзима в единицу времени может разложить вполне определенное число молекул субстрата; всякий избыток субстрата, сверх того количества, которое нужно, чтобы весь энзим мог вступить с ним в соединение, не будет влиять на количество инвертированного в единицу времени сахара. Если же отношение концентрации энзима к концентрации субстрата становится меньше некоторой определенной величины, то количество гидролизованного сахара делается пропорциональным концентрации последнего, и при графическом изображении мы получим логарифмическую кривую.

Этого же вопроса касается работа Г. Броуна и Глендиннинга<sup>86)</sup> относительно действия амилазы на крахмал. Авторы указывают, что если концентрация амилазы мала по сравнению с концентрацией крахмала, то в начальных стадиях реакции, когда имеется большой избыток негидролизованного субстрата, количество крахмала в единице объема будет сильно превышать количество соединения „амилаза + крахмал“; поэтому первое время концентрация последнего соединения будет почти постоянной, и в равные промежутки времени будут гидролизоваться одинаковые количества субстрата. В дальнейшем, когда концентрация крахмала уменьшится, количество комплексов „амилаза + крахмал“, а следовательно и скорость гидролиза, начнут подчиняться закону действия масс. Экспериментальные данные вполне подтверждают эти воззрения.

Аналогичные результаты были получены Ф. Армстронгом<sup>13)</sup> при опытах с лактазой, мальтазой и эмульсином. Приводимые ниже цифры показывают количества молочного сахара, гидролизованного одним и тем же — очень небольшим — количеством лактазы в различной крепости растворах лактозы.

Концентрация сахара в %	Разложившее количество в %	Абсолютное количество гидролизированного сахара
10 . . . . .	22,2 . . . . .	2,22
20 . . . . .	10,0 . . . . .	2,18
30 . . . . .	7,7 . . . . .	2,21

Совершенно другой результат дали опыты, в которых количество энзима по отношению к субстрату было более значительно:

Содержание молочного сахара в 100 куб. см	Количество, разложенное в течение 3 часов	Константа скорости реакции
1,0 грамм . . . . .	0,185 . . . . .	0,0296
0,5 , . . . . .	0,098 . . . . .	0,0298
0,2 , . . . . .	0,0416 . . . . .	0,0337

Мы видим, что количество гидролизированного сахара в точности пропорционально концентрации его; скорость реакции всюду приблизительно одинакова.

#### Соединение энзима с продуктами реакции.

Доказательства возможности соединения энзима с продуктами реакции сводятся в общем к тому же, что приводилось в подтверждение существования соединений между энзимом и субстратом; только в данном случае доказательства имеют несколько более косвенный характер.

О'Сэлливан и Томсон в цитированной уже выше работе показали, что инвертаза предохраняется от действия высокой температуры не только тростниковым сахаром, но и продуктами гидролиза его. Трипсин в чистом растворе значительно менее стоек, чем в присутствии субстрата или продуктов переваривания. Подобное предохраняющее действие было установлено мною совместно со Старлином<sup>51)</sup> для пептона, Верноном<sup>52)</sup> — для амиокислот.

Как показали исследования Ф. Аристронга<sup>14)</sup>, при различных полисахарах продукты гидролиза обнаруживают ясно выраженное задерживающее действие на энзим. Любопытно при этом, что обычно на известный энзим наиболее сильное влияние оказывают как раз те сахара, которые образуются в результате действия этого энзима: фруктоза, на-

пример, задерживает действие инвертазы, мало влияя на другие энзимы; галактоза почти совсем не влияет на действие мальтазы, а значительно угнетает лактазу, и т. д.

Надо все же сказать, что здесь специфичность действия значительно меньше, чем одно время склонны были принимать. Можно даже вообще усомниться, что наблюдаемые явления задержки обусловлены химическим сродством между энзимом и продуктами реакции. Так, например, Филош<sup>306)</sup> показала, что фруктоза гораздо сильнее задерживает действие мальтазы, чем глюкоза. Эмульсин, как мы знаем, расщепляет множество различных глюкозидов; общим во всех расщепляемых им веществах является только присутствие глюкозы. Поэтому, если принять существование химического сродства между энзимом и продуктами реакции, то мы могли бы предполагать, что наиболее сильным задерживающим действием на эмульсин будет обладать глюкоза, а другие компоненты глюкозидов окажутся сравнительно мало деятельными. На деле наблюдается как раз обратное. В смысле действия на энзимы глюкоза оказывается веществом в значительной степени безразличным. Разумеется, в концентрированных растворах, как компонент обратимой реакции, глюкоза будет проявлять задерживающее влияние просто в силу закона действия масс.

#### Значение обратимости реакции.

Если мы обратимся к данным, полученным Ф. Армстронгом, то мы заметим, что оба получающиеся в результате гидролиза вещества оказывают задерживающее влияние на энзим; при этом обычно одно из них в большей мере, чем другое. Это объясняют обыкновенно тем, что энзим дает с определенным сахаром особого рода соединение и таким образом удаляется из сферы реакции. Исследуя отношение энзима к различным сахарам, пришли к заключению, что энзим соединяется с сахаром не в одной какой-либо точке молекулы, а по всему ее протяжению; если в каком-нибудь месте структура энзима не подходит к строению молекулы сахара, то гидролиз не может произойти. Возьмем в качестве примера отношение  $\alpha$ - и  $\beta$ -метилглюкозидов к мальтазе и эмульсину; это отношение можно иллюстрировать схемой,

изображенной на рис. 4. Мы видим, что, например, эмульсин „не подходит“ к молекуле  $\alpha$ -глюкозида только в самой верхней части; то же самое касается малтазы и  $\beta$ -глюкозида. И такого незначительного несоответствия в конфигурации уже достаточно, чтобы энзим не мог проявить на данное вещество своего действия. Надо, конечно, помнить, что приводимые формулы и рисунки, изображенные в плоскости, не дают нам представления об истинной пространственной форме молекул. Это лишь своего рода стенографическая передача экспериментальных данных.

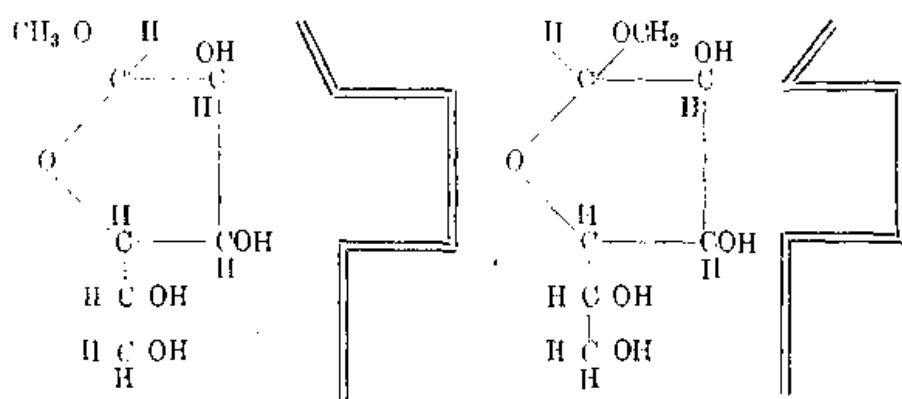


Рис. 4.

Сходные результаты были получены Абдергальденом и Жигоном<sup>1)</sup> при изучении действия дрожжевого сока на глицил-*l*-тироzin. Прибавление *d*-аланина, *d*-валина, *l*-лейцина, *l*-тироzина, триптофана и  $\beta$ -глютаминовой кислоты задерживало течение реакции; все эти аминокислоты, входя в состав полипептидов, могут быть отщепляемы действием исследуемого энзима. Те же аминокислоты, которые не поддаются действию энзима, например *l*-аланин и *d*-лейцин, никакой задержки реакции не вызывают. Иначе говоря, аминокислоты, входящие в состав расщепляемых энзимом полипептидов, могут известным образом соединяться с энзимом, тем самым выводя его из сферы реакции.

Тамман<sup>360</sup>) показал, что при действии эмульсина на амигдалин реакция замедляется при прибавлении любого из образующихся в результате гидролиза соединений; недавно мне удалось установить, что при действии того же энзима

на арбутин (глюкозид гидрохинона), реакция замедляется при прибавлении как глюкозы, так и гидрохинона, притом почти в совершенно одинаковой степени. Под влиянием эмульсина в некотором объеме 0,2 л раствора арбутина в течение 25 часов при 37,5° было гидролизовано 26,6% начального количества субстрата. В другом опыте к такому же раствору было прибавлено столько гидрохинона, что концентрация его равнялась 0,1 н; гидролизовано в этом случае было всего лишь 15%. В третьем опыте вместо гидрохинона была прибавлена глюкоза в такой же концентрации; гидролиз равнялся 13,5%. Наконец в четвертом опыте были прибавлены и гидрохинон и глюкоза, оба в таком количестве, что концентрация каждого из них равнялась 0,05 н; в этом случае было гидролизовано 13,25% имевшегося арбутина. Мы знаем, что эмульсин расщепляет большое число различных глюкозидов. Принимая во внимание все разнообразие компонентов, входящих в состав глюкозидов, трудно представить себе, чтобы энзим мог вступать в соединение со всеми этими, столь несходными между собою в химическом отношении веществами. Надо поэтому попытаться дать какое-либо другое объяснение описанным выше явлениям задержки энзиматических реакций. Опыты Буркело<sup>11)</sup> показали, что гидрохинон, задерживающий гидролиз арбутина, не влияет на скорость расщепления салицина; из этого можно заключить, что задержка обусловлена только законом действия масс, а отнюдь не связыванием энзима подходящими к нему по конфигурации молекулами продуктов гидролиза.

Насколько в настоящее время известно, все катализируемые энзимами реакции принадлежат к числу обратимых, отличаясь только положением достигаемого равновесия. В некоторых случаях, например при инвертазе, это положение равновесия так близко к состоянию полного гидролиза, что только особенно тщательное наблюдение может показать, что процесс не дошел до конца. Вернемся к типичному случаю обратимой реакции, представляющей уравнением: эфир + вода ⇌ кислота + спирт. Представим себе, что в начале реакции мы имеем только воду и эфир, а катализатором будет служить липаза. Первое время гидролиз будет идти быстро, а обратная реакция — образование эфира — будет равна нулю. Но как только образуется хотя бы небольшое

количество кислоты и спирта, начнется синтетическая реакция; сперва она будет идти очень медленно, но, по мере накопления продуктов гидролиза, скорость ее будет все возрастать. Между тем скорость гидролитической реакции благодаря уменьшению концентрации субстрата будет постепенно падать. В конце концов скорости обеих противоположных реакций сравняются, и наступит состояние равновесия. Если мы будем обращать внимание только на гидролитический процесс, то заметим, что по мере течения реакции он как бы встречает все более сильное противодействие; поэтому получаемые в течение опыта данные будут представлять собою разность между двумя противоположными процессами. Б. Мур<sup>265)</sup> справедливо указывает, что даже в тех случаях, когда гидролиз доходит почти до конца, замедляющее влияние противоположного синтетического процесса по мере приближения к состоянию равновесия будет сказываться все сильнее и сильнее.

Таким образом мы должны рассматривать истинную скорость реакции в каждый данный момент как разность скоростей двух противоположных процессов. Мы видим также, что каждый из этих процессов может быть ускорен прибавлением в одном случае субстрата, а в другом — продуктов гидролиза.

#### „ФАКТОР ИНТЕНСИВНОСТИ“.

В двух приведенных выше примерах для вычисления константы скорости гидролитической реакции можно пользоваться формулой, в которой принято во внимание и влияние синтетического процесса; но оказывается, что и тут будет наблюдаться такое же нарастание или уменьшение константы, как и в том случае, когда при вычислении влияние синтетической реакции совершенно не принимается во внимание. Очевидно, что изменение константы зависит от каких-то других причин. Виссер<sup>266)</sup> вводит понятие об „интенсивности“ действия энзима; оказалось, что если ввести в уравнение соответствующие факторы, то удается получить почти полное постоянство константы скорости, даже если совершенно не принимать во внимание синтетического процесса. Мы сейчас узнаем, какое содержание следует вкладывать в понятие „фактор интенсивности“. Нас не должно

удивлять, что в двух рассмотренных примерах синтетическая реакция почти не влияет на скорость гидролиза. Так как положение равновесия очень близко от состояния полного гидролиза, то скорость синтетической реакции должна быть очень мала; некоторые приблизительные числовые данные по этому поводу мы приводили в главе пятой.

### Равновесие, достигаемое в присутствии липазы.

Дитцом<sup>112)</sup> были произведены очень ценные наблюдения над действием липазы из поджелудочной железы. Для того чтобы не усложнять течения реакции, все опыты производились с одноатомными спиртами и одноосновными кислотами. Главным образом автор пользовался изоамиловым спиртом и нормальной масляной кислотой. Спирт и вода обычно брались в избытке — около пяти молекул воды и восьми молекул спирта; поэтому и гидролиз и синтез можно было рассматривать как мономолекулярные реакции, что значительно упрощало расчеты. Чтобы быть уверенным, что действительно было достигнуто состояние равновесия, опыты ставились одновременно в двух направлениях: с одной стороны, к водному раствору эфира прибавлялся спирт, а с другой — к такой же концентрации раствору масляной кислоты в спирте прибавлялась вода.

Первое, на что мы должны обратить внимание, это — что положение равновесия оказывалось одним и тем же, независимо от того, каким путем шла реакция — от эфира ли или от кислоты. Далее оказалось, что при препаратах энзима различной активности положение равновесия оставалось неизменным, хотя скорость реакции колебалась в зависимости от активности энзима. Точно так же не влияло на положение равновесия количество взятого энзима. Тут можно напомнить, что аналогичные результаты были получены Виссером в опытах с инвертазой и эмульсином.

Когда опыты ставились с иными начальными концентрациями субстрата, то получавшиеся результаты не соответствовали тому, что можно было ожидать на основании закона действия масс. В следующей главе мы дадим одно из возможных объяснений этого явления.

Что касается скорости реакций, то при небольшом содержании воды в масляной кислоте образование эфира следовало логарифмическому уравнению реакции первого порядка; поэтому можно было пренебречь скоростью обратной реакции — гидролиза эфира.

Если исходить из масляной кислоты, то, по мере повышения концентрации воды, далеко не вся кислота идет на образование эфира, — значительная часть ее остается свободной. При обратной постановке опыта, когда исходным продуктом является эфир, часть его гидролизуется. Таким образом удается измерить константы скоростей обеих реакций. Если пользоваться при этом формулой для мономолекулярных реакций, то величина констант, в пределах ошибок опыта, остается постоянной. Ниже мы приводим таблицу, заимствованную из работы Дитца. В ней  $t$  обозначает время в часах,  $T$  — количество кислоты в миллиолях на литр,  $k_1$  — константу скорости синтетической реакции, и  $k_2$  — константу гидролитической реакции. Процесс протекал в амиловом спирту, содержавшем 8% воды.

Образование эфира			Гидролиз эфира		
$t$	$T$	$k_1$	$t$	$T$	$k_2$
0,00	197,70	—	0,00	0,00	—
1,58	187,40	0,015	2,95	6,86	0,0055
4,00	177,60	0,012	7,20	13,14	0,0049
7,00	160,80	0,013	16,40	24,25	0,0046
10,40	147,00	0,013	23,65	30,23	0,0045
15,05	126,50	0,014	45,07	40,30	0,0047
24,48	98,51	0,014	88,83	44,40	—
31,62	88,03	0,014	—	45,90 Среднее: 0,0048	
96,30	48,51	—			
—	45,90 Среднее: 0,014				

Результаты этих опытов наглядно представлены в кривых рис. 5, стр. 114. В нем на абсциссе нанесено время в часах, а на ординате — концентрация масляной кислоты. Верхняя кривая соответствует гидролитическому процессу, а нижняя — синтетическому. Кривая  $C$  показывает тот ход реакции, который наблюдался бы, если бы процесс шел до конца в одном направлении.

Положение равновесия может быть определено двумя способами: или как отношение концентраций реагирующих

веществ или же как отношение скоростей двух противоположных реакций.

Если воспользоваться данными вышеприведенной таблицы, то на основании относительных концентраций реагирующих веществ мы получим для положения равновесия величину 3,3; отношение констант скоростей двух реакций равно 3,4; совпадение, как мы видим, весьма удовлетворительно; надо оговориться, что такое хорошее совпадение удается получить далеко не всегда.

Мы так долго останавливались на опытах Дитца потому, что они дают нам анализ сравнительно простого случая;

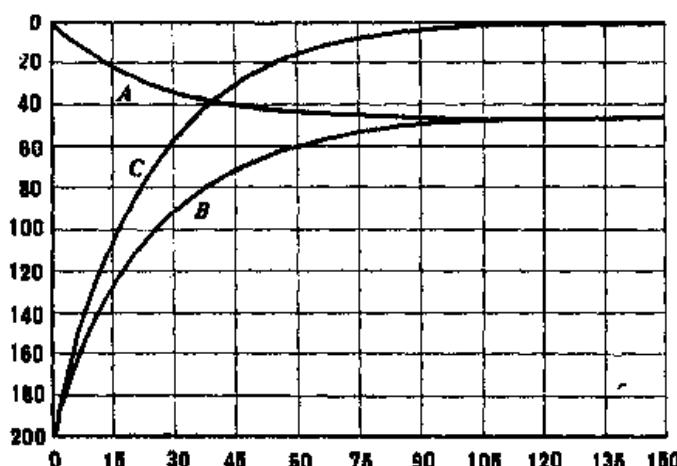


Рис. 5.

в дальнейшем эти результаты помогут нам разобраться и в более сложных явлениях.

Приведенные на рис. 6 кривые представляют течение реакций в системе „глицерин — глюкоза — глюкозид глицерина“ в присутствии эмульсина. Мы видим почти полное сходство с кривыми рис. 5.

#### Активность энзима.

Мы уже говорили о введенном Виссером понятии „интенсивности действия“ энзима. При липазе этот фактор интенсивности, оставаясь все время постоянным, не влияет на течение процесса, что позволяет при вычислении констант скоростей реакций пользоваться обычным уравнением; по

во многих других случаях он может в течение энзиматического процесса возрастать или уменьшаться, изменения этим скорость реакции. Самое простое изменение фактора интенсивности состоит в изменении концентрации энзима. Мы знаем, что скорость реакции пропорциональна этой концентрации; поэтому если во время реакции каким-либо образом уменьшится активная масса энзима, то течение процесса

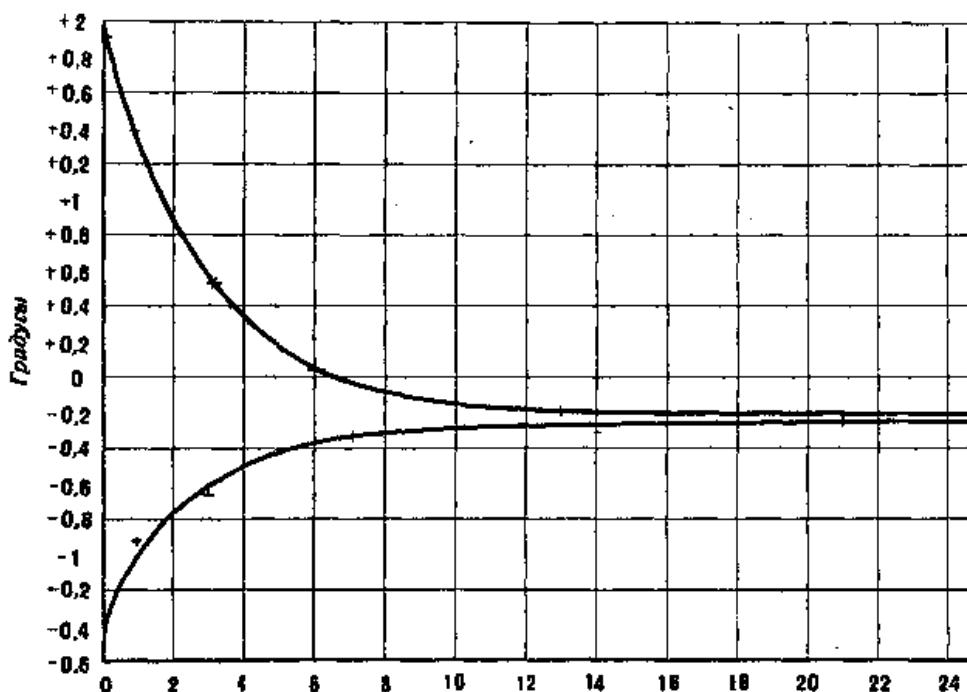


Рис. 6. Ординаты — оптическое вращение, абсциссы — время в днях.

замедлится. Подобным действием обладают, например, продукты энзиматических реакций: связывая часть энзима, они уменьшают его концентрацию. Но активность энзима может быть понижена не только уменьшением его количества. Так, например, трипсин чрезвычайно чувствителен к присутствию щелочи (гидроксильных ионов). В кислых и нейтральных растворах он практически совершенно инактивен, щелочь же сильно благоприятствует его действию. Как показывают приводимые ниже цифры, повышение активности в известных пределах прямо пропорционально концентрации щелочи. 2,5% раствор казеина подщелачивался различными количествами аммиака, добавлялся трипсин, и через час производилось определение электропроводности смеси.

Концентрация амиака	Изменение электропроводности
0,05 нормальной . . . . .	1 770 обр. мегомов
0,03      "      . . . . .	1 365      "
0,01      "      . . . . .	680      "

Дальнейшие подробности относительно влияния реакции среды на активность энзимов можно найти в весьма обстоятельной работе Сёренсена<sup>350</sup>).

### Аутоокатализ.

Как известно, при гидролизе протеинов трипсином образуется довольно значительное количество свободных аминокислот. Некоторые из них — например аспарагиновая и глутаминовая — являются сравнительно сильными кислотами, могущими заметно понизить концентрацию гидроксильных ионов в реакционной смеси. Недавно мне пришлось наблюдать, что при невысокой начальной щелочности раствора (2 куб. см амиака уд. в. 0,880 на литр 10% раствора казеина) реакционная смесь в результате гидролиза приняла кислую на лакмус реакцию. Несомненно, что подобное изменение щелочности среды должно сильно повлиять на активность энзима, а следовательно, и на скорость реакции.

Б. Робертсон и Шмидт<sup>325</sup>) исследовали изменение концентрации гидроксильных ионов в течение переваривания протеинов трипсином. Оказалось, что пока концентрация гидроксильных ионов оставалась выше  $10^{-6}$ , изменение ее протекало согласно формуле мономолекулярных реакций. В области между указанной концентрацией и нейтральной реакцией изменение щелочности принимало характер бимолекулярной реакции. Между этими двумя областями существует небольшая промежуточная зона, где процесс следует некоторому особому уравнению.

При действии инвертазы на тростниковый сахар благодаря какому-то фактору интенсивность действия энзима возрастает по мере того, как процесс идет дальше. Это видно из того, что константа скорости реакции, если вычислять ее по обычному логарифмическому уравнению, не остается постоянной, а неуклонно увеличивается (ср. В. Анири<sup>180</sup>). Вить может объяснение этому явлению можно найти в на-

блодении Кулльгрена<sup>224)</sup>, показавшего, что аналогичное нарастание константы скорости реакции имеет место и при инверсии сахара водой при 100°. В этом случае увеличение константы зависело от образования, в качестве побочного продукта, какой-то кислоты, ускорявшей гидролиз. Правда, пока еще не доказано образование такой кислоты при действии инвертазы, но оно во всяком случае вполне возможно. А так как небольшие количества кислоты благоприятствуют действию энзима, то образование подобного побочного продукта могло бы объяснить увеличение активности энзима в течение реакции.

Хедсон<sup>199)</sup> утверждает, что гидролиз сахара инвертазой строго следует уравнению мономолекулярной реакции. По его мнению, наблюдавшееся В. Анри нарастание константы зависело от того, что автор не принимал во внимание мультиратации продуктов гидролиза, главным образом глюкозы, так что определения производились раньше, чем устанавливалось равновесие.

Однако, по мнению Сёренсена<sup>350)</sup>, Хедсон придает факту мультиратации слишком большое значение. Своими опытами Сёренсен установил, что течение реакции зависит от концентрации ионов водорода. При очень низких концентрациях ( $P_h =$  от 6,6 до 6,3)<sup>1)</sup> с течением времени наблюдается очень значительное увеличение константы скорости. При высоких концентрациях водородных ионов —  $P_h = 3,68$ , константа, как и в опытах Армстронга с лактазой, постепенно уменьшается. Между этими пределами, например при  $P_h = 3,92$ , — на всем протяжении реакции константа сохраняет постоянную величину. Надо отметить, что в этих опытах концентрация водородных ионов колебалась между той, какая имеется в воде, и такой, которая соответствует 0,001-нормальной соляной кислоте.

Для аналогичных явлений, наблюдающихся и при чисто химических реакциях, Оствальдом<sup>288)</sup> было предложено название „аутокатализ“. Если действовать на эфир водой, то

<sup>1)</sup> Эти величины представляют собою, по терминологии Сёренсена, экспоненты концентрации ионов водорода. Значение их станет ясным, если вспомнить, что для дистиллированной воды, в которой концентрация водородных ионов равна  $10^{-7,07}$ , экспонент будет 7,07, а для 0,001-нормальной кислоты он будет 3.

первое время гидролиз совершается очень медленно, но по мере того как в реакционной смеси появляется свободная кислота, скорость реакции все больше и больше увеличивается. Опыт показал, что в смеси метилацетата с водой при 40° происходит гидролитическое расщепление эфира; скорость гидролиза, по мере увеличения концентрации уксусной кислоты, все повышается, так что к концу опыта константа скорости была в тридцать раз больше, чем в начале. Такого рода явления называются положительным аутокаталитизмом. Но известны и такие случаи, когда количество катализатора в течение реакции убывает; в качестве примера можно привести переход оксикислот в соответствующие лактоны (Анри<sup>188</sup>). При этом количество ионов водорода, служащих катализатором, уменьшается, и скорость реакции постепенно падает. В этом случае мы имеем дело с отрицательным аутокаталитизмом.

Собственно говоря, аутокаталит нельзя считать совершенно тождественным с теми явлениями, которые наблюдаются при энзимах. В первом случае происходит увеличение или уменьшение количества самого катализатора, между тем как при энзиматических реакциях образуются вещества, которые сами по себе не являются катализаторами, а влияют на скорость реакции, только уменьшая или увеличивая активность энзима. Но все же оба ряда явлений настолько сходны между собой, что их — хотя бы просто в целях большего удобства — можно называть одним именем.

### Итоги.

Все факторы, влияющие на скорость энзимных реакций, можно разделить на две главные группы:

#### 1. Факторы, замедляющие течение реакций.

a) Обратимость реакции.

b) Соединение энзима с продуктами реакции.

c) Отрицательный аутокаталит. Этот фактор, как и предыдущий, может повести к временному инактивированию энзима.

d) Разрушение или другие сильные изменения свойств энзима, необратимое инактивирование.

## 2. Факторы, ускоряющие течение реакции.

а) Соединение всего количества энзима с субстратом, когда последний присутствует в большом избытке. В этом случае начальная часть кривой, изображающей течение реакции, представляет собою прямую линию.

### б) Положительный аутокатализ.

Все эти моменты, влияющие на действие энзима, за исключением первого — обратимости реакции, входят в предложенное Виссером понятие „фактора интенсивности“ энзима. Значение отдельных факторов может сильно изменяться при различных энзимах. На положение равновесия влияет только первый фактор — обратимость реакции, все же остальные моменты на положении равновесия совершенно не сказываются. Если вычислять константу скорости реакции по обычному логарифмическому уравнению мономолекулярной реакции, то при наличии замедляющих факторов мы обнаружим постепенно уменьшение вычисленных величин, тогда как ускоряющие моменты обусловят постепенное нарастание величины константы. В качестве примера второго рода случаев, которые, вообще говоря, довольно редки, можно привести гидролиз сахара инвертазой.

## Диффузия в гетерогенных системах.

До сих пор, разбирая кинетику действия энзимов, мы условно принимали, что реакция протекает в гомогенной системе, т.-е. в истинных растворах. Между тем известно, что энзимы являются коллоидами; они образуют суспензию ультрамикроскопических твердых частичек в жидкости, так что система, в состав которой они входят, будет гетерогенной. Дитц<sup>112)</sup> считает, что в исследованном им случае вся реакция протекала именно в твердой фазе, заключавшей в себе энзим. Буркело и Бридель<sup>113)</sup> показали, что эмульсин может производить гидролиз в 90% спирте, в котором этот энзим совершенно нерастворим. Необходимо отметить, что скорость диффузии субстрата и продуктов гидролиза так велика по сравнению со скоростью самой реакции, что влиянием диффузии на течение реакции можно совершенно пренебречь. Обычно фаза, содержащая энзим, так

мелко раздроблена, что расстояния, на протяжении которых должна происходить диффузия, бесконечно малы. Условия действия энзимов в значительной степени приближаются к тем, которые наблюдались Левенгерцем<sup>240</sup>) при гидролизе различных эфиров соляной кислотой в гетерогенной системе, состоявшей из воды и бензина. При этом можно было установить, что равновесие между реагирующими веществами, распределенными в двух различных фазах, устанавливается чрезвычайно быстро. Гидролиз происходит в той фазе, где скорость его больше,—в случае Левенгерца в водном растворе соляной кислоты, при лигназе же—в частичках энзима. Можно ли то же самое сказать и про все другие энзимы—в настоящее время еще решить трудно.

Вот что говорит по этому поводу Аррениус<sup>31</sup>): „Изучение скорости реакций, протекающих в гетерогенной системе, показывает, что они по своему течению почти не отличаются от тех, которые имеют место в истинных растворах. При изучении реакций в гетерогенных системах это наблюдение неоднократно подтверждалось. Оно объясняется тем, что в условиях опытов диффузия происходит так быстро, что она совершенно не влияет на химический процесс. Но если вести опыт в капиллярных трубках, то, разумеется, условия изменяются; поэтому, например, метод Метта совершенно непригоден для точных количественных исследований“.

Косвенным доказательством того, что диффузия играет незначительную роль в энзимных реакциях, может служить очень высокий температурный коэффициент этих реакций; диффузия же как чисто физический процесс отличается небольшим температурным коэффициентом.

#### ОБЩЕЕ УРАВНЕНИЕ ДЛЯ ЭНЗИМНЫХ РЕАКЦИЙ.

Читателю легче будет усвоить все сказанное на предыдущих страницах, если ознакомиться, хотя бы в кратких чертежах с предложенным Б. Муром<sup>265</sup>) общим дифференциальным уравнением, приложимым ко всем энзимным реакциям. Вспомним, что при гидролитическом процессе мы имеем дело с мономолекулярной реакцией, а при обратном, синтетическом, процессе—с реакцией бимолекулярной. Допустим, что реакция—например между инвертазой и тростниковым саха-

ром или эмульсином и салицином — идет только в сторону гидролиза, доходит до конца и что за время реакции интенсивность действия энзима не изменяется. В таком случае скорость реакции выразится уравнением:

$$\frac{dx}{dt} = K(a - x),$$

где  $x$  — концентрация продуктов гидролиза в момент  $t$ ,  $K$  — константа скорости реакции,  $a$  — начальная концентрация субстрата и, следовательно ( $a - x$ ) — концентрация его в момент  $t$ . Но мы видели, что не всегда можно пренебречь синтетической реакцией; поэтому если мы желаем иметь уравнение, полностью изображающее ход энзимной реакции, то мы должны ввести в него соответствующий фактор. Как только что указывалось, обратная реакция — по крайней мере в рассматриваемом нами случае — является бимолекулярной; скорость ее пропорциональна произведению концентраций реагирующих веществ. Так как последние присутствуют в эквимолекулярных количествах, то можно, не вводя для них отдельных обозначений, представить произведение концентраций их просто как квадрат концентрации одного из продуктов гидролиза. Принимая еще во внимание, что скорость синтетической реакции будет, вообще говоря, отличаться от скорости реакции гидролитической, мы получим следующее уравнение:

$$\frac{dx}{dt} = K_1(a - x) - K_2 x^2,$$

где  $K_1$  — константа скорости гидролитической реакции, а  $K_2$  — константа синтетической реакции.

Далее, с течением реакции, активность энзима может изменяться в ту или иную сторону; это изменение активности зависит от изменений состава реакционной смеси, или, выражаясь математическим языком, оно является функцией концентрации субстрата. Если пользоваться прежними обозначениями, то концентрация субстрата для гидролитического процесса будет выражаться через ( $a - x$ ), а для синтетического — через  $x$ ; активность энзима мы обозначим через  $e$ . В качестве приближенного значения искомого нами фактора  $B$ . А при предложил следующее выражение:

$$e \cdot \frac{x}{a} \cdot \frac{a - x}{a}.$$

Здесь  $\frac{x}{a}$  указывает, как далеко прошла реакция гидролиза, а  $e^{\frac{a-x}{a}}$  указывает степень произошедшего синтеза. Таким образом в нашем уравнении начальные величины ( $a - x$ ) и  $x$  должны быть увеличены или уменьшены (в зависимости от того, нарастает или падает активность энзима) на величины:  $e^{\frac{x}{a}} \cdot (a - x)$  и, соответственно,  $e^{\frac{a-x}{a}} x$ . В окончательной форме наше уравнение тогда примет вид:

$$\frac{dx}{dt} = K_1 \left( 1 + e^{\frac{x}{a}} \right) (a - x) - K_2 \left( 1 + e^{\frac{a-x}{a}} \right) x^2.$$

Сам Мур говорит, что это уравнение слишком сложно, чтобы им можно было пользоваться для обработки экспериментальных данных и интегрирования. Но зато оно охватывает все возможные случаи. Оно показывает, что при малом  $x$  течение реакции приближается к прямой; оно подходит для тех случаев, когда реакция течет быстрее, чем бы то следовало на основании обычного логарифмического уравнения, как, например, в опытах А. Анри; оно объясняет уменьшение константы, наблюдавшееся, например, в позднейших стадиях опытов Армстронга и Бэйлиса; оно применимо и к состоянию равновесия, когда наблюдаемая скорость реакции равна нулю. Наконец оно же характеризует и обратную реакцию, течение которой под конец тоже приближается к прямой.

Приложение этого уравнения ко всем возможным случаям завлекло бы нас слишком далеко; интересующихся этим вопросом читателей мы должны отослать к оригинальным трудам Мура. Укажем только, что в уравнении можно произвести некоторые упрощения. Так, например, без особенной ошибки  $e$  может быть принято равным единице. Во всяком случае, испытываешь большое удовлетворение, видя, что даже такие сложные реакции, как энзимные, могут быть выражены математической формулой. Особенно ценно, что формула эта является не чисто эмпирической, а что многие входящие в нее факторы основаны на определенных экспериментальных данных.

Исходя из своих опытов с уреазой, Ван Слайк и Келлен<sup>348)</sup> предложили уравнение для вычисления скорости

энзимных реакций. Уравнение состоит из двух членов; первый выражает время, необходимое для того, чтобы энзим соединился с субстратом, а второй член — то время, которое требуется для разложения образовавшегося соединения. Предполагается, что оба процесса подчиняются закону действия масс. Первый процесс — если только не брать слишком разведенных растворов мочевины — протекает почти мгновенно. Помимо того, что авторы не принимают во внимание гетерогенного характера системы, надо еще, как справедливо указывает Фальк<sup>188</sup>), отметить, что константы уравнения получены из тех же опытов, к которым уравнение затем прилагалось. Ван Слайд и Келлен отрицают влияние физических факторов, например диффузии и адсорбции, на деятельность энзимов; судя по некоторым замечаниям, авторы считают, что эти явления не подчиняются точным законам.

Теперь мы перейдем к рассмотрению таких влияющих на действие энзимов факторов, которые поддаются произвольному экспериментальному изменению. К ним относятся температура, начальные концентрации субстрата и энзима и прибавление посторонних веществ, в частности электролитов и антисептиков. О том, каким путем перечисленные факторы оказывают свое действие на энзим, речь будет идти в следующей главе.

#### ТЕМПЕРАТУРА.

Согласно установленному Вант-Гофом закону, скорость большинства химических реакций при повышении температуры на  $10^{\circ}$  увеличивается в два-три раза. Таким образом, если скорость при  $10^{\circ}$  равнялась двум, то при  $20^{\circ}$  она будет 4, при  $30^{\circ}$  — 8 и т. д. Если изобразить это увеличение скорости графически, то мы получим кривую, поднимающуюся сперва отложо, затем все круче и круче и быстро переходящую почти в вертикаль.

Энзимы не представляют исключения из этого правила; для большинства из них температурный коэффициент довольно высок. Так, для эмульсина Тамман установил величину 7,14 (в пределах между  $60^{\circ}$  и  $70^{\circ}$ ). Для трипсина, при температуре между  $20^{\circ}$  и  $30^{\circ}$ , я нашел температурный коэффициент равным 5,3. Это значит, что для достижения одного

и того же результата при  $20^{\circ}$  требовалось в 5,3 раза больше времени, чем при  $30^{\circ}$ .

Любопытно, что, согласно опытам Эйлера и Бэт аф Угглес<sup>130</sup>), при гидролизе сахара инвертазой температурный коэффициент оказывается почти вдвое меньше, чем при кислотном гидролизе. То же самое относится и к липазе и мальтазе: кислотный гидролиз этилбутираты и мальтозы при повышении температуры ускоряется в большей степени, чем энзиматический.

Это увеличение активности энзима при повышении температуры имеет свой предел. До известной температуры, — меняющейся в зависимости от различных условий, — активность энзима возрастает, а при дальнейшем повышении скорость реакции начинает вновь падать. Температура, при которой энзим развивает максимальное действие, называется оптимальной температурой. В этом явлении склонны иногда видеть нечто загадочное, отличающее энзимы от других катализаторов; поэтому следует выяснить его причины.

Некоторые указания могут дать исследования Эрнста<sup>225</sup>) над действием Бредиговской коллоидальной платины на смесь кислорода и водорода. При этой каталитической реакции можно также установить температурный оптимум, совершенно как при энзиматических процессах. Как энзимы, так и Бредиговский раствор платины являются коллоидами; поэтому сама собой напрашивается мысль, что именно коллоидальное состояние и обусловливает чувствительность к температуре.

Ф. Блэкмен<sup>68)</sup> произвел ряд очень ценных опытов над ассимиляцией углерода зелеными листьями; эти опыты дают полное объяснение интересующему нас вопросу. Правда, действие хлорофилла только отчасти может быть сведено к энзиматическим процессам, но сходство явлений так велико, что не может быть сомнений, что все, относящееся к одному ряду явлений, приложимо и к другому. Если перейти известную температурную границу, то скорость процесса ассимиляции замедляется; это зависит от того, что некоторые коллоидальные вещества, участвующие в процессе, коагулируются. Какой характер имеет это разрушение активных веществ, нам сейчас не интересно; важно только, что, прежде чем наступит полное разрушение, всегда наблюдается частич-

ное ослабление. Здесь выступает вся важность „фактора времени“, которому Блэкмен совершенно справедливо придает такое большое значение. Уже Закс<sup>332)</sup> определенно указывал, что чем выше температура, тем быстрее наступает разрушение; непродолжительное действие высокой температуры может еще не вызвать полного разрушения, которое наступает при более низкой температуре, если она действует более продолжительное время. Результаты указанной работы об ассимиляции углерода сводятся к следующему:

1. При высокой температуре (для листьев лавровицневого дерева — выше 30°) скорость ассимиляции не сохраняет своей первоначальной величины, а постепенно падает.
2. Чем выше температура, тем быстрее происходит это падение.
3. При каждой данной температуре скорость падения всего больше в первые моменты, а затем постепенно замедляется.

Это изменение скорости ассимиляции делает невозможным непосредственное экспериментальное определение начальной скорости при данной температуре: для того чтобы получить измеримые результаты, надо дать реакции продолжаться некоторое время, а за это время начальная скорость изменится. Но мы можем получить эту величину косвенным путем. Для этого мы можем, пользуясь данными, полученными при более низких температурах, построить так называемую кривую Вант-Гоффа. Ниже 25° скорость ассимиляции, как показывают последовательные определения, не падает с течением времени, а остается постоянной. Благодаря этому, производя определение скорости ассимиляции при различных, отличающихся друг от друга на 10° температурах, мы сможем установить соответствующий температурный коэффициент. Для листьев лавровицневого дерева этот коэффициент равен 2,1. На рис. 7, заимствованном из работы Блэкмена, нанесенная пунктиром кривая дает нам вычисленные для более высоких температур величины соответствующих начальных скоростей ассимиляции.

Как только что указывалось, при высоких температурах первоначальная скорость ассимиляции быстро падает. Чтобы

установить скорость этого падения, были предприняты определения скорости асимиляции при различных температурах — 30,5, 37,5, 40,5°; при каждой из указанных температур производился ряд определений через известные промежутки времени. Результаты этих наблюдений изображены

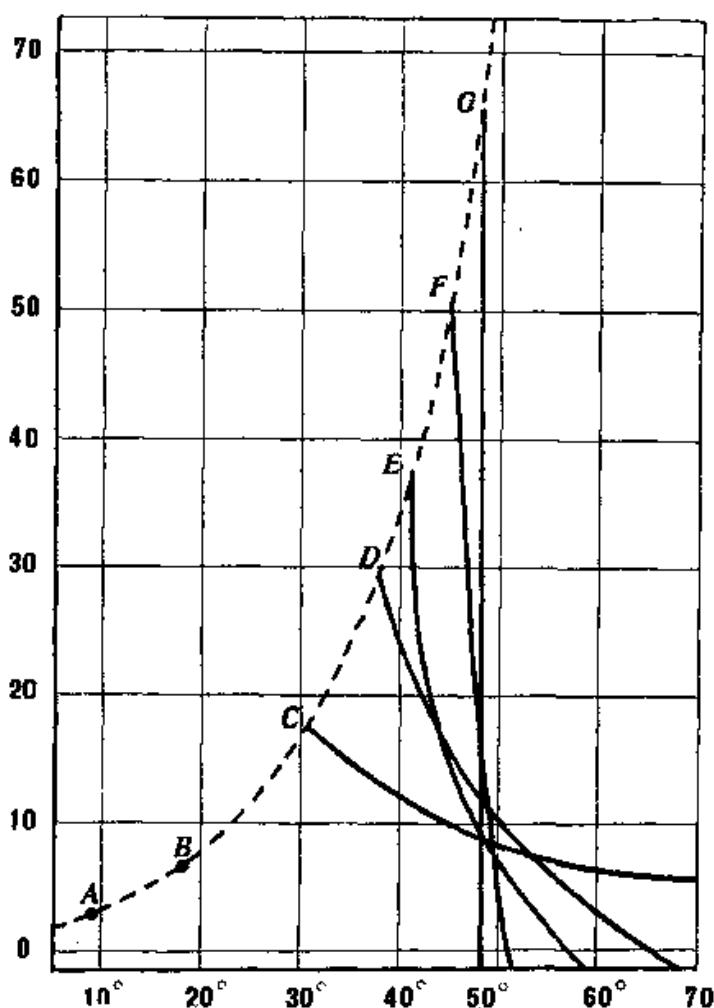


Рис. 7.

на рис. 7 сплошными линиями; при этом на абсциссе откладывалось время — каждая клетка соответствует двум часам. Началом кривых служат соответствующие точки кривой, вычисленной теоретически, на основании закона Ван Гоффа.

При взгляде на диаграмму сразу бросается в глаза, что теоретически вычисленные величины начальных скоростей

и скорости, найденные экспериментальным путем, хорошо ложатся на одной кривой. „Таким образом мы убеждаемся чисто графическим путем, что оба метода — теоретическое вычисление и эксперимент — дают совпадающие величины для начальных скоростей ассимиляции при разных температурах. Это может служить достаточным доказательством того, что эти скорости действительно существуют“, хотя они и держатся слишком непродолжительное время для того, чтобы быть непосредственно измеренными.

При 45° скорость ассимиляции уменьшается так быстро, что не удается получить никаких достоверных данных,— уже через очень малый промежуток времени процесс падает до нуля (ср. кривую, начинающуюся от точки F). В конце концов мы должны дойти до такой температуры, при которой даже произведенное в самые первые моменты определение не обнаружит никакого ассимиляторного процесса: самую низкую температуру, при которой это произойдет, мы назовем температурой разрушения. Мы вправе предположить, что при этой температуре в первые секунды каждый хлоропласт развивает максимальную ассимиляторную активность, но активность эта немедленно падает, и притом так стремительно, что достигает нуля почти мгновенно (например в течение 100 сек., если принять этот срок за условную единицу времени при определении температуры разрушения). На нашей диаграмме за такую температуру принято 48°; соответствующая кривая, начинающаяся в точке G, падает вертикально вниз.

Из приведенных выше результатов можно сделать два важных вывода. Во-первых, что „температурный оптимум“ не есть постоянная величина: он будет меняться в зависимости от того, сколько времени протекло между достижением опытной смесью данной температуры и тем моментом, когда производится определение. Во-вторых, мы видим, что понятие „температурный оптимум“ указывает лишь на тот факт, что при известной температуре вызванное повышением температуры увеличение активности может на некоторое время компенсировать наступающее при этих условиях разрушение энзима. Поэтому можно признать, что понятие температурного оптимума как в практическом, так и в теоретическом отношении имеет весьма мало значения.

### Осаждение при нагревании.

В своей работе, посвященной „фибрин-ферменту“, Реттгер<sup>317)</sup> устанавливает, что это вещество не есть энзим. Тем не менее полученные автором результаты могут дать ряд ценных указаний по вопросу о влиянии высокой температуры на энзимы. Обычно принимается, что вещества, обладающие способностью вызывать свертывание, теряют эту способность при нагревании. Реттгер показал, однако, что это происходит только в том случае, если в жидкости существует коагулируемый при нагревании белок; по всем вероятиям, получающийся осадок протеина путем адсорбции захватывает „фермент“. Если обработать такую инактивированную смесь слабым раствором едкого натра, то активность восстанавливается. Нам кажется, что необходимо исследовать экспериментально вопрос, не окажутся ли энзимы менее чувствительными к нагреванию, если предварительно удалить коагулирующие при повышении температуры посторонние примеси. Как известно, в присутствии сахара инвертаза переносит, не разрушаясь, более высокую температуру, чем в чистом растворе. Я недавно исследовал, не зависит ли это от того, что сахар препятствует преципитации каких-либо примесей белкового характера. Для опытов я пользовался сравнительно чистым препаратом от Мерка; даже в отсутствии сахара раствор энзима еще не коагулировал при 65° (в опытах Томсона и О'Сёллиvana энзим терял свою активность при 55°). Коагуляция, в отсутствии сахара, началась только при 80°, а при 100° жидкость стала совершенно мутной. В присутствии же тростникового сахара при 80° не наблюдалось никаких изменений, а при 100° наступило лишь легкое помутнение<sup>1)</sup>. При других энзимах дело обстоит, по-видимому, иначе. Так, например, трипсин в щелочном растворе инактивируется при нагревании, при чем никакой преципитации не обнаруживается. Кроме того, если бы действительно энзим всегда просто захватывался преципитатом, то можно было бы извлечь его оттуда, подобно тому, как это удавалось Реттгеру с „фибрин-ферментом“<sup>2)</sup>.

<sup>1)</sup> Ср. Воль и Глиэм<sup>402).</sup>

<sup>2)</sup> Шмидт<sup>333</sup>, утверждает, что трипсин, в присутствии пептона или желатины, выдерживает, не разрушаясь, кипячение, а, согласно Граме-

Что касается температуры разрушения, то уже указывалось, что разные энзимы отличаются различной чувствительностью к нагреванию. Так, согласно Френкелю и Гамбургу, диастаза из солода состоит из двух энзимов. На это же указывал Дюкло<sup>121)</sup>. Один из энзимов, названный Дюкло амилазой, действует на крахмал, превращая его только в декстрин; второй энзим — декстриназа — гидролизирует декстрин до мальтозы. Судя по опытам Броуна и Герона<sup>87)</sup>, а также Кельдаля<sup>212)</sup>, декстриназа легче разрушается высокой температурой, чем амилаза. По крайней мере только этим можно объяснить, что если действовать на крахмал диастазой, которая предварительно была нагрета до 68°, мы получим больше декстрина и меньше мальтозы, чем при действии не нагревавшегося препарата. Попутно можно также отметить любопытный факт, что при действии диастазы на крахмал реакция останавливается, когда в реакционной смеси получится 80,8% мальтозы и 19,2% декстрина. Вероятно это объясняется обратным превращением мальтозы в декстрин, так как если прибавить к опытной смеси дрожжей, сбраживающих мальтозу, то весь декстрин гидролизируется нацело (Броун<sup>85)</sup>). Очевидно, что по мере сбраживания мальтозы декстриназа гидролизирует все новые количества декстрина, вплоть до полного исчезновения его.

Макенни в своей работе<sup>245)</sup> высказывает предположение, что наблюдавшаяся в опытах Броуна и Герона остановка реакции при 80,8% мальтозы и 19,2% декстрина зависела не от достижения состояния равновесия, а просто от недостаточной активности энзима. Если усилить действие диастазы солода прибавлением небольшого количества кислоты, то весь крахмал превращается в сахар, и декстрина в реакционной смеси не обнаруживается. Возможно также, что в упоминавшихся опытах с брожением действие диастазы усиливалось благодаря тому, что дрожжи вырабатывали кислоту. Недавно я повторил эти опыты и нашел, что под влиянием диастазы образуется больше мальтозы, чем при указанном Броуном и Героном положении равновесия;

и ицкому<sup>153)</sup>, энзимы, инактивированные нагреванием, через некоторое время восстанавливают свою активность; Отта<sup>280)</sup> и де Оуза<sup>281)</sup> не могли подтвердить этих наблюдений.

может быть это зависело от более продолжительного срока наблюдения. В присутствии дрожжей весь крахмал оказался гидролизированным; при этом, в подтверждение мнения Макениа, было обнаружено образование уксусной кислоты. Последняя была выработана или дрожжами или какими-нибудь примешанными к ним микроорганизмами.

### Концентрация субстрата.

Если бы энзиматическая реакция протекала в гомогенной системе с образованием промежуточных соединений, то скорость реакции, согласно закону действия масс, была бы пропорциональна концентрации субстрата. На самом же деле это наблюдается только в исключительных случаях. Обычно при определенном количестве энзима скорость реакции остается постоянной при весьма различных концентрациях субстрата. Это можно видеть на опытах Армстронга с лактазой, в работе Ван-Слайка и Кэллена<sup>318)</sup> с уреазой и в работе Нельсона и Восбурга<sup>278)</sup> с инвертазой.

Когда концентрация субстрата мала по сравнению с концентрацией энзима, то до известных пределов скорость реакции возрастает пропорционально увеличению концентрации субстрата (ср. стр. 106).

Когда субстрат тоже представляет собою колloid, например при действии трипсина на желатину, то скорость гидролиза по мере увеличения концентрации субстрата даже понижается. Это можно иллюстрировать следующей табличкой; в ней указывается изменение электропроводности за промежуток времени в 25 минут при действии трипсина на желатину; концентрация последней указана в первом столбце.

Концентрация желатины в $\text{g}/\text{dL}$	Изменение электропроводности
10 . . . . .	130 обр. мегомов
8 . . . . .	170 "
4 . . . . .	240 "
2 . . . . .	280 "

Невление это, вероятно, объясняется каким-то неизвестным влиянием повышения вязкости. При казеине оно не так резко выражено, — в начальных стадиях скорость реакции

остается одинаковой при 8%, 5% и 4%; при 10% реакция течет несколько медленнее, чем при 8%.

Во время моих опытов с синтезом глицерин-глюкозида<sup>47)</sup> я нашел, что скорость реакции прямо пропорциональна концентрации глюкозы. Что же касается глицерина, то уже Вант-Гофф указывал, что наибольшая скорость наблюдается, когда отношение количеств глицерина и воды равно 4 : 1. Мои результаты вполне подтверждают это. Однако, как и следует ожидать на основании закона действия масс, при большем количестве глицерина к моменту достижения равновесия образуется больше глюкозида, но зато реакция требует больше времени. Последнее обстоятельство, несомненно, зависит от вязкости глицерина.

### Концентрация энзима.

Этот вопрос очень важен, тем более, что иногда на основании результатов отдельных определений пытаются установить относительные количества энзима в испытуемых растворах.

При неорганических катализаторах обычно оказывается, что скорость реакции находится в прямой линейной пропорциональности с количеством прибавленного катализатора. Но это во всяком случае не является общим правилом.

При энзимах отдельными исследователями были получены весьма противоречивые данные. Некоторые, например Нельсон и Восбург при инвертазе, Ван-Слайн и Кэллен при уреазе, нашли линейную зависимость; другие же находили, что более высокие концентрации относительно менее активны, чем низкие. Шютц и Борисов<sup>342)</sup>, дошли даже до того, что формулировали закон, согласно которому активность раствора энзима пропорциональна квадратному корню из его концентрации.

Из сказанного на предыдущих страницах ясно вытекает, что все эти противоречивые законы, в сущности, могут быть справедливы, только они относятся к различным относительным количествам энзима и субстрата или, если реакция начинается в присутствии большого избытка субстрата, к различным стадиям этой реакции.

Пока концентрация энзима мала по сравнению с концентрацией субстрата, скорость реакции находится в прямой линейной зависимости от количества энзима. По мере того как количество субстрата убывает, зависимость начинает изменяться, — в малых концентрациях энзим оказывается относительно активнее, чем в больших. Так называемый „закон Шютца-Борисова“ представляет частный случай такой зависимости. Вообще говоря, отношение активности раствора энзима к его концентрации меняется в зависимости от условий; большей частью она выражается корнем, только не второй, а несколько меньшей степени. Значение такой экспоненциальной формулы, в которой одна из переменных входит в показатель степени, будет рассматриваться в следующей главе.

Для изучения этого вопроса был поставлен ряд опытов, в которых исследовалось действие трипсина на казеин; относительные количества трипсина колебались в этих опытах от 0,5 до 4. Представленные на рис. 1 кривые являются графическим изображением результатов этих опытов. При взгляде на диаграмму сразу становится ясным, что относительная активность растворов энзима разной концентрации сильно изменяется в зависимости от стадии реакции. Так, в первые 20—40 минут после начала реакции крутизна подъема (а она характеризует скорость реакции) у кривой 2 значительно больше, чем у кривой 0,5; между 220 и 240 минутами наблюдается как раз обратное соотношение. Далее, можно заметить, что в этот же период — между 220 и 240 минутами — крутизна подъема кривых 4, 2,5 и 2 оказывается одинаковой, так что можно было бы предполагать, что мы всюду имеем одну и ту же концентрацию энзима.

Если обратиться к цифровым данным, на основании которых построены кривые рис. 1, то мы увидим, что реакция практически останавливается, когда электропроводность увеличивается до 2200 обратных мегомов; поэтому можно принять, что изменение электропроводности на 800 обр. мегомов составит приблизительно  $\frac{1}{3}$  максимального изменения. В приводимой ниже таблице в первом столбце указаны относительные количества трипсина; во втором — время в минутах, протекшее от начала реакции до того момента, когда изменение электропроводности достигло величины 800 обр. мего-

мов; в третьем столбце приведены соответствующие величины времени, вычисленные при допущении, что между концентрацией и активностью энзима существует линейная зависимость. В качестве субстрата в этих опытах служил 2,5% раствор казеината аммония.

Содержание трипсина	Наблюденное время	Вычисленное время
4	4,5	5
2,5	7,5	8
2	10	10
1	19	20
0,5	37	40

Аналогичный опыт с 5% раствором желатины дал следующие результаты:

Содержание трипсина	Наблюденное время	Вычисленное время
10	2,5	2,67
5	4,8	5,3
2,5	5,9	10,6
1	29,7	26,7
0,5	51	53,4
0,25	96	106,8

Подчеркнутая величина несомненно представляет собою ошибку опыта. Как видно, линейная зависимость между концентрацией и активностью в этой начальной стадии опыта выступает с достаточной ясностью.

Следующая таблица дает ряд дальнейших данных из того же опыта с казеином. Эти данные относятся к позднейшей стадии, — они указывают время, потребовавшееся при различных концентрациях энзима для того, чтобы изменить электропроводность с 1300 до 1800 обр. мегомов.

Относительное содержание трипсина	Потребовавшееся для реакции время	Средняя скорость	Удельная активность	
			найденная	вычисленная на основании закона Шютца Борисова
4	41	21	6	(6)
2,5	48	20,8	8,3	7,6
2,0	55	18,2	9,1	9,3
1,0	81	12,4	12,1	12,7
0,5	144	7	14	17,5

Один взгляд на цифры второго столбца показывает, что линейная зависимость больше не сохраняется. Если вычислить среднюю скорость реакции за время наблюдения, то мы получим цифры третьего столбца, из которых видно, что малые концентрации относительно активнее, чем большие. Всего яснее это станет, если вычислить удельную активность, т.-е. активность, отнесенную на единицу количества энзима. Соответствующие цифры приведены в четвертом столбце таблицы, а в пятом даны те же величины, вычисленные на основании закона Шютца-Борисова. Мы видим, что на данной стадии реакции закон этот дает вполне удовлетворительные результаты.

Из приведенных данных можно вывести заключение, что практически нельзя принимать ни линейной ни экспоненциальной зависимости между концентрацией энзима и его активностью. Только опыт может показать, какой из этих законов применим при данном соотношении количеств энзима и субстрата. Тот факт, что отдельные исследователи формулируют свои результаты в виде различных, подчас противоречивых законов, объясняется тем, что они работали с разными относительными количествами энзима и субстрата, или -- что в сущности сводится к тому же -- производили свои наблюдения на разных стадиях реакции.

Если бы в приведенном опыте с трицином мы стали сравнивать время, потребовавшееся при различных концентрациях энзима, для изменения начальной электропроводности на 1800 обр. мегомов, то мы нашли бы, что зависимость между этим временем и соответствующей концентрацией энзима займет некоторое промежуточное место между линейной и такой, которая по „закону Шютца-Борисова“ выражается квадратным корнем. Ряд измерений, произведенных в опыте с желатиной, показал, что это отношение приблизительно равно корню, но только не второй, а 1,5 степни.

Уже в 1879 г. Къельдалль<sup>212)</sup> опубликовал ряд данных, выраженных им также и в виде кривых, которые ясно показывают, что зависимость между активностью раствора энзима и его концентрацией меняется в течение реакции; первое время наблюдается прямая линейная зависимость; затем отношение выражается экспоненциальной (показательной) функцией; наконец снова устанавливается линейная зависимость.

Этот же автор показал, что при одинаковых относительных концентрациях энзима и субстрата кривая скорости реакции всегда имеет одну и ту же форму.

Филаш<sup>306)</sup>, в результате своей чрезвычайно тщательной работы над амилазой и мальтазой, приходит к следующей эмпирической формуле, выражющей зависимость между активностью названных энзимов и их концентрациями:

$$x = Bc - A c^2.$$

Здесь через  $x$  обозначена активность,  $c$  есть концентрация энзима, а  $A$  и  $B$  — две константы. Формула эта представляет собою выражение общего экспоненциального закона адсорбции, о значении которого будет говориться в следующей главе.

Хедин<sup>175)</sup> нашел, что при трипсине получаемый эффект прямо пропорционален концентрации энзима, при условии, что субстрат взят в избытке, или, другими словами, в начале реакции. Согласно предложенному этим автором „закону времени“, для того чтобы получить одинаковый эффект, время переваривания должно быть обратно пропорционально количеству взятого трипсина.

Изучая действие липазы из семян клещевины, Джэландер<sup>205)</sup> приходит к выводу, что при этом энзиме отношение активности к концентрации только приблизительно подчиняется закону квадратного корня.

Интересно было бы выяснить, окажутся ли приведенные выше закономерности приложимы и к синтетической деятельности энзимов; теоретически мы вправе ожидать этого. В моих опытах с глицерином и глюкозой<sup>47)</sup> я нашел, что при отношении количеств эмульсина 1:4:12 скорости реакции соответственно были: 1:3,6:6,3.

Для более детального ознакомления с кинетикой энзиматических реакций настоятельно можно рекомендовать работу Герцога<sup>100)</sup>.

### Влияние электролитов.

Так как энзимы являются колloidами, то они очень чувствительны по отношению к электролитам. Кооль<sup>99 и 100)</sup> подробно исследовал влияние электролитов на гидролиз крахмала птиалином слюны. Оказалось, что небольшие количества

кислоты и нейтральные соли сильных одноосновных кислот ускоряют процесс, а большие количества кислоты и нейтральные соли слабых кислот замедляют его. Сходные, но не совсем тождественные явления наблюдаются при инвертазе. В общем, повидимому, электроположительные ионы ускоряют реакцию, а электроотрицательные замедляют ее. Действие электролитов направлено не на субстрат, а на самий энзим.

Согласно Бангу<sup>37)</sup>, в отсутствии хлористого натра активность птиалина очень значительно уменьшается. Этот же автор исследовал влияние на птиалин фосфорнокислых солей.

Здесь же можно упомянуть о работе Пэви и Байуотерса<sup>38)</sup>. В некоторых случаях при отсутствии того или иного электролита энзим оказывается совершенно инактивным; так, пепсин не может проявить своего действия без ионов водорода<sup>1)</sup>, а трипсин без гидроксильных ионов. В этих случаях электролит играет роль вещества, которое, как мы узнаем дальше, носит название ко-энзима.

Михаэлис и Давидсон<sup>39)</sup> за оптимальную для действия трипсина концентрацию водородных ионов принимают  $10^{-8}$ ; это соответствует, по щелочности, 0,00000001-молярному раствору едкого натра.

Штаркенштейн<sup>33) и 34)</sup> недавно показал, что амилаза печени при отсутствии нейтральных солей оказывается совершенно инактивной.

Оптимальной реакцией для липазы печени является, как установил Терруэн<sup>36)</sup>, такая, которая соответствует 0,07-молярному раствору едкого натра.

В некоторых случаях известные вещества действуют как специфические активаторы,—например аспарагин при амилазе (ср. Эффрон<sup>122</sup>). Другой чрезвычайно любопытный случай представляет влияние синильной кислоты на папаин. Как показали Мендель и Блуд<sup>250</sup>), протеокластическое действие этого энзима синильной кислотой значительно

<sup>1)</sup> Шютц утверждает, что пентическое переваривание может происходить и без свободной кислоты. Из его опытов вытекает только, что переваривание может идти при таких количествах соляной кислоты, которые еще не сообщают применяемому в качестве субстрата яичному белку кислоты на конго реакции; однако последнее обстоятельство еще вовсе не значит, что в жидкости вообще нет свободных ионов водорода.

усиливается. Единственным другим веществом, обладающим подобным же действием, оказался сероводород. Извлечение что нельзя не признать загадочным. Несомненно, что мы имеем тут дело не со специфическим ко-энзимом. Единственным общим свойством, отличающим оба названные вещества от других слабых кислот, является их редуцирующая способность, но трудно представить себе, каким образом она может влиять на гидролиз протеинов.

### Антисептики.

Подробное изложение вопроса о влиянии антисептических веществ на энзимы не входит в задачи настоящей книги. Мы только вкратце остановимся на нем, так как иногда применение антисептиков позволяет нам решить вопрос — имеем ли мы перед собой результат жизнедеятельности клеток или действие неорганизованного энзима. Как наиболее пригодное для этой цели вещество Э. Фишер предложил толуол. Это соединение в химическом отношении весьма индифферентно, не проявляет никакого разрушающего действия на энзимы и в то же время препятствует развитию протоилазматических образований, исключая, таким образом, влияние живых клеток. Может ли толуол "убивать" клеточную протоплазму — на этом вопросе мы не будем останавливаться. Несомненно, что энзимы могут вступать в различной сложности комплексные соединения с составными частями клеток: с одной стороны, мы имеем, например, липазу и инвертазу, а с другой — тесно связанную с протоплазмой зимазу. Во всяком случае, если вещество, проявляющее катализическое действие, подчиняется обычным химическим законам, то мы вправе рассматривать его как энзим. Если же на сцену выступают явления роста, то течение процесса будет подчиняться другим законам.

Слэттер<sup>347)</sup> показал, что рост дрожжей следует простому логарифмическому закону, выражаемому такой формулой:

$$K = \frac{1}{t} \log_e \frac{N + n}{N}.$$

В ней  $K$  есть константа роста,  $N$  — начальное число клеток, а  $n$  — прирост за время  $t$ .

Подробные данные о действии антисептиков на трипсин читатель может найти в работе Кауфмана<sup>210</sup>.

Надо всегда помнить, что одно и то же антисептическое вещество может оказаться безвредным для одного энзима и в то же время вредно действовать на другой. Объяснить этот факт при теперешнем состоянии наших знаний еще не представляется возможным.

## ГЛАВА СЕДЬМАЯ. ХАРАКТЕР ДЕЙСТВИЯ ЭНЗИМОВ.

### Катализ в гетерогенных системах.

Мы уже указывали, что при всех энзиматических процессах катализатор (энзим) присутствует в виде отдельной фазы. Поэтому процесс должен протекать на поверхности соприкосновения твердой и жидкой фаз; отсюда — част., употребляемое выражение: „контактный катализ“. Общая теория гетерогенного катализа разработана Денхэмом<sup>10</sup>), Лэнгмюром<sup>228</sup>), Льюисом<sup>232</sup>) и Вэнкрофтом<sup>36</sup>).

Так как вещества, между которыми должна произойти реакция, диспергированы в растворе, то в первую стадию процесса они должны накопиться вблизи поверхности твердой фазы. Поэтому в тех случаях, когда катализатор присутствует в виде сравнительно больших масс, скорость диффузии будет в значительной степени влиять и на скорость реакции. Если же, как это всегда имеет место при энзимах, катализатор раздроблен на мельчайшие частицы и находится в виде коллоидальной суспензии, то влияние диффузии отходит на второй план; Броуновское движение частиц энзима еще более уменьшает значение диффузии. Надо, впрочем, сказать, что диффузию, может быть, все-таки следует принимать во внимание; так, опыты Нельсона и Гриффина<sup>272</sup>) привели к замечательному результату: оказалось, что инвертаза обладала совершенно одинаковой активностью как в виде коллоидального раствора, так и в адсорбированном состоянии — на угле или гидроокиси алюминия. В данном случае некоторый свет могло бы пролить исследование температурного коэффициента. Надо также, как указывают и сами авторы, помнить о возможности повышения концентрации водородных ионов на поверхности угля.

Во второй стадии реагирующие вещества концентрируются на поверхности частичек энзима в силу адсорбции (ср. стр. 34). Это происходит почти мгновенно.

Наконец в последней стадии между сконцентрировавшимися на поверхности энзима веществами начинается химическая реакция. При коллоидных катализаторах эта стадия протекает всего медленнее, и сю главным образом обуславливается скорость всей реакции.

Мы знаем, что результатом действия энзима является значительное ускорение катализируемой реакции; перед нами встает вопрос, каким образом это ускорение вызывается. Здесь существуют две точки зрения — химическая и физическая. Вторую правильнее будет назвать теорией поверхностной концентрации.

Согласно химической гипотезе, между субстратом и веществом энзима образуется химическое соединение; это промежуточное соединение распадается, при чем субстрат оказывается расщепленным, а энзим появляется в прежнем, неизмененном виде. Действительно, при некоторых катализитических процессах, протекающих в гомогенной системе, были изолированы и изучены соответствующие промежуточные соединения. Но, как указывает Денхэм<sup>110</sup>), известен только один случай гетерогенного катализа, когда удалось установить образование подобного промежуточного соединения, это — периодически протекающее катализитическое разложение перекиси водорода ртутью. Но даже и в этом случае нельзя с уверенностью утверждать, что образовавшаяся перекись ртути действительно является необходимой промежуточной стадией при разложении перекиси водорода. Все это явление очень своеобразно, оно связано с изменениями электрического потенциала и электролитическим разложением. При разложении перекиси водорода платиной, иридием, осмием, и палладием металлы эти, если их предварительно насытить водородом, оказываются более активными, чем в обычном виде. Вряд ли здесь можно предполагать образование промежуточных соединений; большая активность гидрогенизованных металлов может быть объясняется большей химической чистотой их поверхности (по этому поводу ср. приведенные на стр. 11 взгляды Фарадея).

Что касается энзимов, то тут образование промежуточных соединений химического характера остается чистой гипотезой.

Физическая теория объясняет возрастание скорости реакции увеличением активных масс реагирующих веществ, благодаря повышению их концентрации на поверхности энзима или другого катализатора. Если мы дальше поставим себе вопрос, почему одни вещества адсорбируются данной поверхностью, а другие нет, то приходится признать, что физические свойства поверхности могут зависеть от химической природы веществ. Кроме того, как указывает Гарди (ср. Дрюри<sup>116</sup>), в процессе конденсации на поверхности могут участвовать и молекулярные силы, а это повлечет за собою повышение химического потенциала реагирующих веществ.

В дальнейшем мы можем изучать явления, наблюдаемые при эпизматических процессах, придерживаясь той точки зрения, что действие энзимов зависит от концентрирования на их поверхности реагирующих веществ; мы будем помнить, что хотя и не доказано, что вслед за адсорбцией наступает химическое соединение субстрата с поверхностью энзима, возможность подобного процесса все же не исключена.

Мы позволим себе воспользоваться несколько элементарным примером, который до некоторой степени поможет нам разобраться в явлениях гетерогенного катализа. Представим себе „реакцию“ между ягодой земляники и несколькими находящимися по соседству с нею улитками. Как только улитка, поetzя около ягоды, почувствует присутствие вкусной пищи, так тотчас же начнет двигаться по направлению к ней. Это, так сказать, предварительная стадия, соответствующая диффузии. Во второй стадии, соответствующей адсорбции, улитка прилепляется к ягоде; этот процесс проходит очень быстро — как только улитка доползла до ягоды. До сих пор никаких химических изменений еще не произошло. В следующей — последней — стадии начинается поедание ягоды улиткой, с последующим гидролизом, и т. д. Скорость последнего процесса, очевидно, зависит от числа „адсорбированных“ ягодой улиток. Но легко представить себе, что скорость уничтожения ягоды не будет находиться в линейной зависимости от числа улиток: чем больше будет число

последних, тем сильнее они будут мешать друг другу, и в конце концов, когда вся ягода окажется окруженной улитками, дальнейшее увеличение числа их уже не отразится на скорости поедания ягоды, так как новоприбывающие улитки не смогут добраться до нее.

В одной из моих работ<sup>45)</sup> я разбираю несколько случаев, в которых скорость реакции до известной степени контролируется адсорбцией. Интересно в биологическом отношении дезинфицирующее действие супемы Моравита<sup>268)</sup>, основываясь на экспериментальных данных Кренига и Науля, показал, что зависимость между концентрацией раствора супемы и его действием на бактерии, подчиняется тому же экспоненциальному закону, как и явления адсорбции. Таким образом сила действия яда пропорциональна тому количеству его, которое адсорбировалось телами бактерий.

### И ГИРОДА АДСОРБЦИИ.

Что адсорбционные соединения действительно существуют, можно демонстрировать следующим предложенным мною<sup>43, 44)</sup> опытом: хорошо известно, что различные коллоидальные гидраты окисей металлов, например алюминия или железа, будучи прибавлены к растворам красок, увекают с собою последние в осадок. Этим свойством гидроокисей часто пользуются для просветления различных растворов. Если диализировать свободную кислоту конго-рот, то получается коллоидальный раствор синего цвета. При прибавлении к такому раствору какой-либо гидроокиси металла происходит осаждение, при чем осадок, как можно судить по его синему цвету, содержит конго-рот в виде свободной кислоты (в недиссоциированном виде конго-рот обладает синим цветом). Таким образом осадок содержит одновременно кислоту (конго) и основание (гидроокись), оба в свободном состоянии в виде адсорбционного соединения. Можно отцентрифугировать осадок и вновь взвесить в воде — окраска его не изменится. Но если нагреть такую взвесь до 100°, то быстро образуется солеобразное соединение, обладающее, как все соли конгограта, красным цветом. Этот же процесс, только значительно медленнее, происходит и при комнатной температуре. Особенно демонстративно протекает опыт, если пользоваться

гидроокисью алюминия, так как тогда изменения окраски наиболее наглядны. Гидроокись не должна содержать ни свободной кислоты ни свободной щелочи; в первом случае соли вообще не образуется, а во втором она образуется сразу, даже до нагревания. Ивление это представляет собою случай взаимного осаждения двух противоположно заряженных коллоидов — гидрат окиси алюминия заряжен положительно, а кислота конго-рот отрицательно.

Не может быть никаких сомнений, что на поверхности, разграничающей раствор от взвешенных в нем твердых частиц, действительно происходит конденсация растворенных в жидкой фазе веществ (ср. Уилард Гиббс<sup>152</sup>). Правило Гиббса гласит, что если какое-либо вещество, накапливаясь в поверхностном слое жидкости, понижает поверхностное натяжение, то это вещество действительно всегда будет стремиться сконцентрироваться в поверхностном слое. Правило это вытекает из общего принципа Карно-Клаузиуса, согласно которому свободная энергия системы всегда стремится уменьшиться. В наиболее общем виде мы встречаемся с этим же принципом в так называемом втором законе термодинамики; он основан на всей совокупности нашего опыта, и мы не знаем ни одного случая, который противоречил бы этому закону. Правда мы можем представить себе, что в какой-нибудь другой части вселенной, недоступной нашему наблюдению, свободная энергия может стремиться к увеличению; мы вправе только утверждать, что в доступной нашему наблюдению части вселенной этого никогда не происходит.

Исходя из термодинамических соображений, Гиббс вывел формулу, которой должно подчиняться накопление растворенных веществ в поверхностном слое жидкости. Справедливость этой формулы была подтверждена Льюисом<sup>222</sup>, для адсорбции анилина на поверхности ртути, а также Доннаном и Баркером<sup>113</sup>) при их опытах с адсорбцией нониловой кислоты и сапонина на границе фаз вода — воздух. Но в тех случаях, когда адсорбируемое вещество является коллоидом или несет электрический заряд, то помимо изменения поверхностного натяжения приходится принимать во внимание и другие факторы. Вольфганг Оствальд<sup>220</sup>) следующим образом обобщил правило Гиббса: накопление

вещества в поверхностном слое жидкости всегда будет иметь место в тех случаях, когда при этом уменьшается потенциал какого бы то ни было вида энергии. В таком виде это правило предусматривает не только изменение механической энергии поверхностного натяжения, но также и электрические, термические и химические изменения. Во многих случаях поверхностная адсорбция стоит в несомненной зависимости от химического строения вещества. При настоящем состоянии наших знаний мы еще не можем ответить на вопрос, насколько приведенные закономерности сохраняют свою силу при все большем и большем — вплоть до молекулярных размеров — раздроблении твердой фазы.

В некоторых случаях экспоненциальный закон, которому подчиняется образование адсорбционных комплексов, усложняется еще тем обстоятельством, что к адсорбции присоединяются явления „твёрдых растворов“, сопровождающиеся медленной диффузией адсорбированного вещества в глубь частиц твердой фазы. К подобного рода случаям можно отнести описанную Треверсом<sup>376)</sup> „окклюзию“ газов углем.

Согласно Дэвису<sup>108)</sup>, при адсорбции иода углем тоже играют роль оба фактора — во-первых, адсорбция в поверхностном слое — она протекает весьма быстро, почти мгновенно, а во-вторых, образование, в результате медленной диффузии, твердого раствора иода в угле. Второй процесс, который можно назвать абсорбцией, идет очень медленно, — равновесие устанавливается лишь через несколько дней.

Надо, впрочем, иметь в виду, что может быть мы в обоих приведенных случаях имеем дело не с медленной диффузией внутрь твердой фазы, а просто с образованием химического соединения; именно такого взгляда придерживается Фрейндлих<sup>148)</sup> относительно взаимодействия иода и угля.

Самой характерной отличительной особенностью всех явлений адсорбции является тот закон, который выражает зависимость между составом адсорбционного соединения и концентрацией входящих в это соединение веществ. Так, если взять конкретный пример, количество краски, воспринятое окрашиваемой тканью, не находится в линейной зависимости от концентрации раствора этой краски: из слабых растворов ее адсорбируется относительно больше, чем из крепких.

Зависимость между степенью адсорбции и концентрацией какого-либо вещества в растворе выражается экспоненциальной формулой; в связи с этим интересно отметить (на это обратил внимание Фрейндлих<sup>145</sup>), что зависимость между изменением поверхностного натяжения и концентрацией тоже выражается экспоненциальной формулой.

### ХИМИЧЕСКИЕ ТЕОРИИ АДСОРБЦИИ.

Некоторые случаи адсорбции несомненно удается свести к закону действия масс. Но для этого приходится прибегать к вспомогательным гипотезам, которые не могут быть обоснованы экспериментальными данными. Особенно это касается вопроса о числе молекул, вступающих в реакцию; число это обычно устанавливается произвольно так, чтобы оно согласовалось с результатами опыта, и иногда оно оказывается даже дробным. В других случаях адсорбционные явления можно поставить в связь с распределением вещества между различными фазами гетерогенной системы. Но и здесь приходится прибегать к произвольным допущениям относительно того, как велико число ассоциированных между собою молекул в отдельных фазах. Нернст<sup>274</sup>) приводит пример подобного случая и указывает, что иначе как адсорбцией его объяснить невозможно.

Барджер и Старлинг<sup>39</sup>) получали окрашенные в синий цвет адсорбционные соединения иода; при образовании этих соединений с несомненностью можно было установить связь между химическим строением поверхности и ее адсорбционной способностью.

Лэнгмюром<sup>228</sup>) был высказан своеобразный, можно сказать чисто химический, взгляд на природу и свойства поверхности. Мы коснемся его лишь вкратце, подробности можно найти в руководстве Льюиса по физической химии. Согласно Лэнгмюиру, молекулы поверхностного слоя расположены таким образом, что части их, обладающие наибольшим дополнительным средством, оказываются направленными во внутрь. Химические процессы обусловливаются электромагнитным полем, окружающим атомы; поэтому поверхностная энергия, или натяжение, может служить мерилом потенциальной энергии наружного силового поля. Отдельные молекулы всегда стремятся расположиться так, чтобы величина этого

силового поля была наименьшей из всех возможных. К образующим поверхностный слой атомам могут присоединяться другие атомы или молекулы, при чем, в зависимости от числа и расположения их, поверхность может быть или вся покрыта, как бы пасынчена ими, или частично оставаться свободной. Нельсон и Вэзбург<sup>273)</sup> нашли, что теория эта не могла быть полностью приложена к полученным авторами при опытах с инвертазой результатам; и видимому, нужны еще некоторые дополнительные гипотезы. Необходимо подчеркнуть, что при всех энзимах и других гетерогенных катализаторах конечным результатом является реакция между веществами, приходящими в соприкосновение на поверхности катализатора, а отнюдь не реакция между этими веществами и самим катализатором.

### Общая теория действия энзимов.

Выше (ср. стр. 11) мы уже упоминали о том, каким образом Фарадэй объясняет действие платины, ускоряющей реакцию между водородом и кислородом. Он предполагает, что, благодаря конденсации газов на поверхности металла, молекулы их приходят в такое близкое соприкосновение между собою, что становится возможной химическая реакция. Правда, против такого объяснения были сделаны некоторые возражения; но та необыкновенная ясность мысли и проницательность, которые всегда проявлял Фарадэй при истолковании сущности наблюдаемых им явлений, заставляют нас полагать, что в данном случае мнение его в основе своей правильно. Мы знаем теперь, что смесь водорода и кислорода не находится в состоянии равновесия; поэтому можно несколько изменить Фарадэеву теорию следующим образом. Благодаря значительному увеличению активных масс реагирующих веществ на поверхности металла, равновесие здесь достигается очень скоро. Так как состав адсорбированного на поверхности слоя зависит от состава всей массы газа, то образовавшаяся в результате реакции вода путем диффузии постоянно удаляется из поверхностного слоя, на место ее адсорбируются новые количества кислорода и водорода, и так процесс идет до тех пор, пока не будет достигнуто окончательное равновесие.

Эта теория была распространена на различные гетерогенные реакции, при которых катализатор является в виде твердой фазы, а реагирующие вещества находятся в растворе. Само собой напрашивается приложение этой же теории и к энзимам. Повидимому автор настоящей книги первый высказал взгляд, что скорость реакции в различных стадиях процесса является функцией степени адсорбции. Основанием для этой гипотезы послужил экспоненциальный закон, устанавливающий зависимость между концентрацией энзима и скоростью реакции<sup>11)</sup>. Впрочем, как мы увидим дальше, значение этого факта остается еще не совсем ясным, и можно найти другие, более убедительные доказательства. Пока можно отметить, что тщательные исследования Нельсона и Воздурга<sup>273)</sup> над инвертазой привели авторов к заключению, что скорость инверсии сахара определяется тем количеством его, которое адсорбировано энзимом. Многие другие исследователи, работавшие с различнейшими энзимами, пришли к тому же заключению; те же исследователи, которые не приняли адсорбционную теорию полностью, все-таки должны признать, что при энзимах мы всегда имеем дело с явлениями, зависящими от действия поверхностной энергии. Достаточно будет цитировать слова Армстронга, Бэнджамина и Хортона<sup>274)</sup>: „Все опыты, проведенные в течение настоящей работы, новидимому, оправдывают донущение, что энзиматический процесс протекает не между находящимися в истинном растворе веществами, а имеет место на поверхности коллоидальных частиц, взвешенных в растворе гидролита“ (ср. также Армстронг<sup>19)</sup>).

#### Доказательства адсорбции энзимами.

Прежде всего рассмотрим те — прямые и косвенные — доказательства, которые говорят нам, что такая адсорбция действительно происходит.

**1.— Адсорбционные соединения.** В тех случаях, когда реакция течет медленно, иногда удается изолировать адсорбционное соединение между субстратом и энзимом раньше, чем успели произойти химические изменения.

Как показал Осборн<sup>286)</sup>, кальциевая соль казеина не проходит через фильтр из пористой глины; трипсин же таким

фильтром не задерживается. Я нашел <sup>41)</sup>, что если прибавить трипсин к раствору казеината кальция и затем фильтровать смесь через свечу Веркфельда, то фильтрат не содержит ни трипсина ни казеина. Сам по себе факт этот указывает лишь на то, что образовалось какое-то соединение. При повторении этого опыта с амилазой из солода, оказалось, что и здесь фильтрат не содержит энзима. Трудно предположить, чтобы амилаза тоже вступала в химическое соединение с казеином.

Филош <sup>206)</sup> приходит к выводу, что явления, наблюдаемые при мальтазе и инвертазе, лучше всего объясняются гипотезой образования адсорбционных соединений между энзимом и субстратом.

Несомненное образование адсорбционного соединения наблюдалось при амилазе и крахмале. Предоставленный самому себе 2% раствор крахмала не изменяется в течение многих дней. При прибавлении же небольшого количества амилазы происходит уже в течение первого получаса образование осадка. Оказалось, что этот осадок содержит почти целиком все количество крахмала и энзима. После образования осадка начинался гидролиз крахмала.

К аналогичному выводу приходит Ван-Лэр <sup>225)</sup>, который сравнивает соединение крахмала и амилазы с адсорбцией конго-рота фильтровальной бумагой.

Следующий остроумный опыт, показывающий, что адсорбция может произойти и без химической реакции, описан Штаркенштейном <sup>254)</sup>. Если освободить амилазу печени путем диализа от всех солей, то она оказывается инактивной. Такой препарат взбалтывался сначала с раствором растворимого крахмала, а затем с рисовым крахмалом в порошке; смесь центрифугировали и фильтровали. Фильтрат должен был, помимо растворимого крахмала, содержать и соединение амилазы с ним, если только такое соединение образовалось. Однако по прибавлении поваренной соли и нагреванию образования сахара не наблюдалось,—следовательно энзима в фильтрате не было. Пока к осадку рисового крахмала не прибавляли соли, образования сахара тоже не происходило; но после прибавления соли и нагревания смеси до 40° можно было обнаружить образование большого количества сахара. Таким образом весь энзим был адсорбирован рисовым крахмалом.

Воль и Глиссон<sup>402)</sup> показали, что различные явления, связанные с задерживающим влиянием мальтозы и других веществ на действие амилазы, легко можно объяснить, если принять гипотезу об адсорбции этих веществ на поверхности коллоидального катализатора. В некоторых случаях приходится принимать во внимание и электрические заряды энзима и субстрата (ср. ниже — «электрическая адсорбция»).

Джеленцер<sup>205)</sup> тоже приходит к заключению, что явления, наблюдавшиеся им при опытах с лизазой из клещевины, могут быть объяснены только образованием адсорбционных соединений.

2.—*Концентрация субстрата*. При инвертазе, как показали опыты Нельсона и Воздурга<sup>273)</sup>, только при очень разведенных растворах сахара скорость реакции увеличивается по мере повышения концентрации субстрата. Это увеличение скорости реакции достигает своего максимума, когда содержание сахара дойдет до 5%; дальнейшее повышение концентрации уже не увеличивает скорости реакции. Если мы изобразим это графически, то получим совершенно такую же кривую, как при адсорбции, где обычно под конец достигается полное «насыщение» поверхности.

Аналогичные результаты были получены Армстронгом в опытах с лактазой (ср. стр. 106).

Денхэм<sup>110)</sup> указывает на то, как хорошо могут быть объяснены полученные Армстронгом при различных концентрациях лактозы результаты с точки зрения адсорбционной теории. Сахара, вообще говоря, мало понижают поверхностное натяжение; поэтому, согласно правилу Гиббса, они лишь в очень малой степени будут адсорбироваться, быстро будет достигнута предельная концентрация, и дальнейшее повышение ее уже не повлияет на степень адсорбции, так как не будет больше изменяться поверхностное натяжение. Когда будет достигнута эта предельная концентрация, то количество сахара, адсорбированного энзимом, а следовательно и скорость реакции окажутся постоянными, независимо от дальнейшего повышения концентрации субстрата. В более разведенных растворах количество адсорбированного сахара является экспоненциальной функцией его концентрации.

Михаэлис и Рона<sup>263)</sup> показали, что хотя сахар мало изменяет поверхностное напряжение, он все же в значительной степени адсорбируется углем. Авторы высказывают предположение, что это объясняется изменением сжимаемости или растворимости на границе двух фаз.

При энзимах мы очень часто встречаемся с тем фактом, что повышение концентрации субстрата за известным пределом не влияет на скорость реакции. Особенно хорошо выражено это явление при уреазе (ср. Ван-Слайк и Кэллен<sup>348</sup>); вероятно это зависит от того, что в данном случае адсорбция мала и быстро достигается та концентрация, при которой наступает полное гасыщение поверхности энзима.

**3.— Концентрация энзима.** В предыдущей главе мы видели, что нельзя установить общего закона относительно зависимости между скоростью реакции и концентрацией энзима; в некоторых случаях имеется прямая линейная зависимость, большую же частью такая линейная зависимость наблюдается только в известных стадиях реакции или при определенном соотношении количеств энзима и субстрата. Вообще говоря, зависимость эта выражается некоторой экспоненциальной формулой, частным примером которой может служить Шютц-Борисовский „закон квадратного корня“. В дополнение к уже цитированным работам можно указать еще на исследование Палладина, показавшего, что при трипсине зависимость иногда выражается корнем степени  $\frac{2}{3}$ . Л. Иэнс<sup>134</sup>) нашел, что при разложении перекиси водорода каталазой крови „закон квадратного корня“ оказывается приложимым лишь в очень ограниченной области.

Как общее правило, можно сказать, что при высоких концентрациях активность энзима, если перечислить ее на единицу количества энзима, оказывается меньшей, чем при концентрациях более низких. Несомненно, что это связано с адсорбцией, но объяснить, какого рода эта связь, в настоящее время еще представляется затруднительным.

Что указанные выше закономерности зависят от коллоидальной природы энзимов и, следовательно, сводятся к явлениям адсорбции, можно видеть из следующего, отмеченного Бредигом и Бернекком<sup>80</sup>), факта: каталитическое разложение перекиси водорода коллоидальными металлами тоже

подчиняется экспоненциальному закону, тогда как, например, при инверсии сахара ионами водорода существует линейная зависимость.

Так как действие энзима проявляется на поверхности его частичек, то ясно, что активная концентрация энзима не всегда может быть выражена его массой. Это было бы только в том случае, если бы при этом степень дисперсности (т.-е. размер поверхности на единицу массы) оставалась постоянной. Нельсон и Воздург обнаружили, что при известных условиях активность раствора инвертазы не падала при его разведении. Повидимому в более разведенных растворах активная поверхность сохраняла прежнюю величину благодаря увеличению степени дисперсности.

Мы вправе ожидать, что экспоненциальный характер зависимости будет еще более выражен в том случае, когда субстрат тоже является коллоидом. При этом показатель экспоненциальной формулы не будет оставаться неизменным на всем протяжении реакции,—он будет постепенно изменяться, по мере того как благодаря расщеплению коллоидального субстрата на неколлоидальные вещества—например амино-кислоты—будет изменяться относительная поверхность реагирующих веществ. При такой сложной системе часто даже трудно установить, который из компонентов является адсорбёром, а который—адсорбируемым веществом. Как показал Шмидт<sup>336</sup>), то простое уравнение адсорбции, которое было приведено на предыдущих страницах, может быть применимо только в определенных, довольно узких пределах концентраций реагирующих веществ.

Обыкновенно при составлении уравнения, выражающего ход адсорбции, за неременную принимают концентрацию адсорбируемого вещества. На первый взгляд могло бы показаться, что между размером адсорбирующей поверхности и количеством адсорбированного вещества должна существовать простая линейная зависимость, при условии, конечно, что концентрация адсорбируемого вещества остается постоянной. В некоторых случаях—например при инвертазе—это действительно имеет место. В других случаях, когда зависимость между скоростью реакции и концентрацией энзима выражается формулой не первой, а меньшей степени, это может происходить от того, что активная поверхность энзима

так велика, что при имеющемся налицо количестве субстрата она оказывается не нацело насыщенной. Гипотеза эта отчасти подтверждается той ясно экспоненциальной зависимостью, которая всегда наблюдается в позднейших стадиях реакции (ср. опыты с трипсином, стр. 135); с другой стороны, надо признать, что правдоподобность этого объяснения несколько уменьшается тем обстоятельством, что обычно — кроме самых поздних стадий реакции — количество энзима чрезвычайно мало по сравнению с количеством субстрата.

*4.— Действие энзимов в нерастворенном виде.* В связи с рассматриваемым сейчас вопросом необходимо отметить следующее чрезвычайно любопытное обстоятельство. Во многих случаях удается показать, что энзимы могут проявлять свое действие в таких средах, в которых они в обычном смысле слова нерастворимы,— они остаются в виде осадка, который можно отфильтровать на обычном бумажном фильтре. Мы рассмотрим относящиеся сюда случаи, сгруппировав их по отдельным энзимам. Само собой разумеется, что необходимым условием является, чтобы субстрат мог быть растворен в той среде, которая применяется для опыта.

*Липаза.* Мы приведем здесь один из опытов Дитца<sup>112)</sup>.

К смеси амилового спирта и масляной кислоты был добавлен препарат энзима. Если выразить кислотность смеси в кубических сантиметрах раствора едкого барита, требовавшихся для ее нейтрализации, то в начале опыта она равнялась 6,5 куб. см. Через 2 ч. 46 мин. кислотность равнялась 5,28 куб. см. Тогда из смеси было взято 20 куб. см, отфильтровано, и прозрачный фильтрат, уже не содержащий энзима, был снова поставлен в термостат. Через дальнейшие 23 ч. 46 мин. кислотность исходной смеси равнялась всего 1,79 куб. см раствора барита, между тем как фильтрат сохранил прежнюю кислотность — 5,30 куб. см.

Берцеллер<sup>59)</sup> показал, что липаза из поджелудочной железы совершенно нерастворима в жирах, жирных кислотах и в эфирных растворах жиров. При применении всех этих субстратов реакция, очевидно, может происходить только на поверхности частичек энзима.

Согласно исследованиям Никлу<sup>227)</sup> и Танака<sup>268)</sup> липаза из семян клещевины нерастворима в воде. Поэтому если брать субстрат в виде водного раствора, то действие энзима

может развиваться только на поверхности соприкосновения жидкой фазы с твердыми частицами энзима. Это наблюдение я вполне подтвердил <sup>48)</sup>.

*Эмульсин.* Как показали Буркело и Бридель <sup>71)</sup>, эмульсин может проявлять и гидролитическое и синтетическое действие в 90% алкоголе. Авторы установили, что в спирту такой крепости эмульсин совершенно нерастворим. Мои опыты <sup>47)</sup> вполне подтверждают это. Я извлекал 5 граммов эмульсина в течение нескольких дней 75% и 90% спиртом; после отфильтрования спирт был выпарен при 35° и растворен в 2—3 куб. см воды; он не обладал ни малейшим действием на амигдалин. На самый эмульсин продолжительное воздействие спирта не оказывает вредного влияния.

*Инвертаза.* Высушенные при помощи ацетона дрожжи оказываются способными гидролизировать тростниковый сахар в 80% спирту, несмотря на то, что если профильтровать опытную смесь, то в фильтрате энзима совершенно не содержится (Бэйлис <sup>48)</sup>).

Нельсон и Гриффин <sup>272)</sup> показали, что инвертаза в адсорбированном на угле состоянии сохраняет свою активность.

*Лактаза.* Энзим может действовать в 70% спирту (Бэйлис <sup>48)</sup>).

*Уреаза.* Действует в 80% и даже — хотя и в более слабой степени — в 89% спирту (Бэйлис <sup>48)</sup>).

*Пероксидаза из хрена* в 75% спирту, в котором она совершенно нерастворима, может в присутствии перекиси водорода окислить гвааконовую кислоту.

*Каталаза* из крови, также как и платиновая чернь, действует в 90% алкоголе.

*Папаин* переваривает фибрин в 70% спирту, а глиадин — даже в 80%.

*Пепсин и трипсин.* Суспензии этих энзимов в 80% алкоголе оказываются значительно более активными, чем отфильтрованная из такой суспензии жидкость; все же и последняя тоже содержит некоторое количество энзима, вероятно в виде коллоидального раствора (Бэйлис <sup>48)</sup>).

5.—*Вытеснение с поверхности.* Бэнкрофт <sup>36)</sup> обращает внимание на тот факт, что при реакциях между газообразными телами поверхность катализатора легко инактивируется

если присутствуют посторонние, сильно адсорбируемые газы. Вопрос этот подробнее разработан Лэнгмюиром<sup>228)</sup>. Как мы отмечали выше, уже от Фарадэя не ускользнуло, что поверхность платины легко может быть „спорчена“ накоплением на ней загрязнений из воздуха.

Вполне естественно, что с аналогичными явлениями мы встречаемся и при энзимах. Раз скорость реакции есть функция количества адсорбированного субстрата, то ясно, что если в реакционной системе имеется какое-либо вещество, адсорбируемое сильнее, чем субстрат, то часть последнего окажется вытесненным этим веществом с поверхности энзима.

Как известно, различные спирты и уретаны оказывают задерживающее действие на некоторые энзимы. Мейергоф<sup>251)</sup> установил, что степень этой задержки при различных представителях гомологического ряда оказывается пропорциональной понижению поверхностного натяжения. Свои опыты Мейергоф производил с инвертазой. Он нашел<sup>49)</sup>, что сапонин вытесняет адсорбированную углем мочевину и замедляет в то же время гидролиз мочевины уреазой. Что сапонин не разрушает самой уреазы, можно видеть из того, что в конце концов вся мочевина все-таки оказывается разложенной. Подобным же образом действуют взятые в определенных концентрациях растворы желчиокислых солей и амиловый спирт.

Другие примеры действия различных веществ на уреазу можно найти в работе Онодера<sup>233)</sup>; свои результаты автор также истолковывает как следствие изменения адсорбции.

Выше, на стр. 32, мы упоминали о возможности инактивировать раствор сырьевого энзима путем взбалтывания. Шмидт-Нильсену<sup>338)</sup> удалось установить, что это инактивирование объясняется адсорбией энзима на поверхности между воздухом и раствором в образовавшейся при взбалтывании пене. Если перед взбалтыванием прибавить к раствору некоторое количество сапонина, то инактивирования не происходит. При адсорбции, вещество, сильно понижающее поверхностное натяжение, вытесняет с поверхности те вещества, которые понижают поверхностное натяжение в меньшей степени. Сапонин очень сильно понижает поверхностное натяжение,—быть может это объясняется тем, что он выделяется на поверхности в твердом виде. Поэтому, скон-

пившись на поверхности, он уже не дает адсорбироваться на ней сырому энзиму.

Возможно, что и некоторые антисептики подобным же образом могут действовать на энзимы; мы знаем, что многие из этих веществ заметным образом понижают поверхностное натяжение.

Наконец может еще случиться, что продукты реакции сильно адсорбируются энзимом; в таком случае они могут до известной степени вытеснять субстрат и этим вызывать замедление реакции (ср. Бэнкрофт<sup>36</sup>). Процесс этот может даже пойти так далеко, что реакция совершенно остановится и получится впечатление ложного равновесия, положение которого будет зависеть от количества энзима.

*Температурный коэффициент для задерживающих факторов.* То объяснение, которое мы только что дали для некоторых явлений задержки, находит себе подтверждение в следующем факте. Как известно, поверхностное натяжение характеризуется отрицательным температурным коэффициентом. Поэтому при низкой температуре сапонина должно адсорбироваться относительно больше, чем при высокой, и благодаря этому задерживающее действие его при низкой температуре должно оказываться сильнее. Опыт подтверждает это — я нашел<sup>40</sup>), что задержки при 0 и при 40° относились как 68:48. Далее можно предвидеть, что сапонин должен изменить температурный коэффициент всей реакции в целом. Это тоже подтвердилось, — без сапонина этот коэффициент равнялся 2,23, а в присутствии сапонина 2,59.

6.— *Предохраняющее действие при нагревании.* То, что присутствие тростникового сахара предохраняет инвертазу от вредного действия высокой температуры, обычно рассматривается как доказательство образования химического соединения между энзимом и субстратом. Мне казалось интересным исследовать, не окажет ли простая адсорбция такое же предохраняющее действие. Действительно, если прибавить к раствору трипсина некоторое количество животного угля, то можно обнаружить довольно значительное предохраняющее действие последнего, — при нагревании в течение 10 минут до 60° в той пробе, к которой был прибавлен уголь, трипсина разрушилось на одну седьмую меньше, чем в контроле.

ной пробе; при этом надо еще отметить, что по отношению к трипсину уголь является сравнительно плохим адсорбёром.

7.—*Изменение степени дисперсности.* Так как действие энзима сосредоточивается на его поверхности, то ясно, что чем больше будет число частиц, на которое раздроблена данная масса энзима, тем выше будет его активность.

Весьма возможно, хотя это и трудно доказать прямым путем, что многие из описанных в предыдущих главах явлений повышения или понижения активности энзимов зависят именно от изменений в степени дисперсности их. Разрушение при нагревании во многих случаях является следствием коагуляции, а самопроизвольное уменьшение активности энзимов может быть обусловлено явлением агрегации коллоидных частиц.

Можно было бы надеяться, что удастся несколько разъяснить этот вопрос посредством ультрамикроскопа; но так как мы никогда не имеем дела с чистыми растворами энзима, то трудно учесть, происходят ли наблюдаемые изменения в частицах энзима и ти же в частицах каких-либо сопутствующих веществ. Поэтому полученные результаты подчас бывает трудно правильно истолковать; все же, по нашему мнению, о некоторых из этих результатов стоит упомянуть.

Чезана<sup>11)</sup> установил, что нагревание трипсина в течение часа до 42° повышает его активность. Под ультрамикроскопом можно было обнаружить увеличение степени дисперсности.

Агацотти<sup>11)</sup> опубликовал ряд произведенных им при помощи ультрамикроскопа наблюдений над действием энзимов. По мнению автора, наблюдения его подтверждают гипотезу об образовании соединений между энзимом и субстратом; надо оговориться, что приведенные автором данные допускают различные толкования. Не вдаваясь в подробности, укажем только, что под конец реакции можно было обнаружить небольшое число сравнительно крупных частичек, не подвергавшихся расщеплению. Частицы эти, превосходящие по размерам частицы энзима или субстрата, автор рассматривает как коллоидальный комплекс энзима с какими-то продуктами реакции. Те изменения, которые происходят в первые моменты по прибавлении энзима к субстрату, настолько сложны, что из них нельзя вывести

никакого заключения относительно того, действительно ли происходит соединение энзима с субстратом.

Вот как представляется, согласно Дж. Александру<sup>12)</sup>, действие диастазы на зерна картофельного крахмала, если наблюдать процесс под ультрамикроскопом: „Можно было видеть, как находившиеся в растворе, оживленно двигавшиеся ультрамикроскопические частички диастазы постепенно накапливались вокруг зерен крахмала; спустя некоторое время очертания этих зерен принимали первоначальный, как бы обгрызенный вид“. В настоящее время мы еще очень мало знаем об истинном значении тех явлений, которые мы наблюдаем при помощи ультрамикроскопа; надо поэтому быть особенно осторожным, давая им то или иное истолкование.

Мы уже указывали, что обратимость реакции и адсорбция реакционных продуктов могут служить причинами уменьшения скорости энзиматического процесса. К числу таких замедляющих факторов следует прибавить еще изменение степени дисперсности энзима под влиянием продуктов реакции.

В следующей главе мы подробнее остановимся на чрезвычайно любопытном случае повышения активности липазы в присутствии желчнокислых солей; повидимому это повышение активности обусловлено увеличением степени дисперсности. Частицы коллоида всегда стремятся соединиться в более крупные агрегаты, так как это ведет к уменьшению поверхностной энергии; желчнокислые соли, которые сами понижают поверхностное напряжение, естественно препятствуют этому стремлению агрегироваться. Нетрудно видеть, что должен существовать известный антагонизм между этим лизагрегирующим влиянием и тем стремлением захватить часть активной поверхности энзима, о котором мы говорили выше. Действительно, Оподера<sup>283)</sup> мог показать, что в низких концентрациях амиловый синтет повышает активность уреазы, а в более высоких — угнетает действие этого энзима.

**Растворимость энзимов.** Растворимость некоторых энзимов стоит в несомненной связи с диспергирующей способностью растворителя. Дитц<sup>112)</sup>, например, показал, что посредством воды можно нацело извлечь из поджелудочной железы трипсин, липаза же при этом из ткани не вымывается.

Зато она легко растворяется в глицерине, а также, согласно Рамоиу, в эфирной вытяжке из печени. Как указывает Леве<sup>24)</sup>, в последнем случае мы имеем дело не с истинным растворением, а с адсорбцией энзима лецитином.

Глицерин, являющийся, как известно, одним из лучших растворителей для энзимов, обладает значительной диспергирующей способностью. То обстоятельство, что в креком глицерине некоторые энзимы хорошо сохраняются, объясняется, вероятно, низкой концентрацией воды в таких растворах.

*Влияние электролитов.* В предыдущей главе указывалось, что электролиты могут известным образом влиять на адсорбцию. Когда энзим и субстрат оба являются коллоидами и оба несут одноименный электрический заряд, то обусловленное этим зарядом взаимное отталкивание будет препятствовать образованию адсорбционного соединения. Примером подобного случая могут служить мои опыты с конго-ротом, о которых говорилось выше: отрицательно заряженная фильтровальная бумага почти не адсорбирует конго-рот, которое тоже электроотрицательно; но если изъять заряд бумаги прибавлением электролитов (главное значение тут имеют катионы), то она оказывается способной адсорбировать большие количества краски. То же самое наблюдается, если вместо конго-рота взять другой электроотрицательный колloid — сернистый мышьяк. Вероятно, что во многих случаях действие электролитов на энзимы тоже объясняется изменением заряда. Согласно В. Ари и Исковеско<sup>200)</sup>, трипсин заряжен электроотрицательно; в полном соответствии с этим стоит мое наблюдение, что адсорбция этого энзима бумагой усиливается при прибавлении сернокислого кальция<sup>41)</sup>.

Надо еще сказать несколько слов о так называемой „электрической адсорбции“. Мои опыты, о которых упоминалось выше (ср. стр. 37), были первым систематическим исследованием в этой области. Влияние электрического заряда на адсорбцию может проявляться двояким образом. Во-первых, если адсорбирующая поверхность, с одной стороны, и находящиеся в жидкой фазе ионы или коллоидальные частицы — с другой, заряжены разноименно, то накопление ионов или частиц на поверхности облегчается; наоборот,

одноименные заряды препятствуют адсорбции. Поэтому все факторы, могущие — количественно или качественно — изменить заряд, будут сильно влиять на степень адсорбции.

Во-вторых, мы вправе ожидать, что будут происходить такие процессы, которые ведут к уменьшению разности потенциалов отдельных фаз; это вытекает из правила Гиббса, ибо в этом случае уменьшается общее количество свободной энергии всей системы; таким образом, как общее правило, можно сказать, что те ионы, которые увеличивают разность потенциалов между адсорбирующими и адсорбируемыми веществами, будут благоприятствовать адсорбции; и, обратно, — ионы, уменьшающие эту разность потенциалов, будут препятствовать адсорбции. Более подробное изложение этого вопроса читатель найдет у В. Оствальда<sup>29)</sup>.

Мною были произведены опыты с целью выяснить влияние электролитов на адсорбцию трипсина различными электроотрицательными поверхностями. В качестве адсорбированных были испытаны казеин, крахмал и фильтровальная бумага, а электролитом служил фосфорнокислый кальций. При всех трех упомянутых веществах трипсин сильнее адсорбировался в присутствии кальцевой соли, чем без нее. Любопытно, что фильтровальная бумага адсорбировала больше трипсина, чем казеин, который, как известно, принадлежит к числу легко расщепляемых трипсином субстратов. Михаэлис и Эренрейх<sup>25)</sup> нашли, что в щелочном и нейтральном растворе диастаза солода адсорбируется электроположительной гидроокисью алюминия и не захватывается электроотрицательным каолином. Но если мы, прибавив кислоты, изменим заряд диастазы на обратный, то изменяется и ее отношение к адсорбентам — в кислом растворе она адсорбируется каолином и не адсорбируется гидроокисью алюминия. Интересно отметить, что, согласно опытам Поттевэна<sup>31)</sup> и Канитца<sup>20)</sup>, ионы кальция повышают активность как трипсина, так и липазы; такое неспецифическое действие очевидно зависит от того, что субстрат начинает сильнее адсорбироваться энзимом. Однако указанное активирующее действие катионы проявляют только в малых концентрациях; при более высоких концентрациях они уже оказывают вредное действие на энзим. Этот факт тоже находит себе аналогию в явлениях, наблюдавшихся при обычной

адсорбции, например, при адсорбировании конго-рота бумагой. Здесь, если концентрация кальция превысит 0,005-молярной, то краска осаждается, и образовавшиеся частицы совершенно не адсорбируются бумагой; адсорбция возможна только, пока частицы коллоида не соединились в слишком крупные комплексы.

Значение электролитов как фактора, облегчающего образование адсорбционного соединения, видно из следующего наблюдения Филош<sup>306</sup>): Как показали Бнерри, Джайя и Ари<sup>67</sup>, диализированный поджелудочный сок не действует на крахмал. При смешении такого сока с раствором крахмала не происходит и образования осадка; но стоит прибавить поваренной соли, как образовавшееся адсорбционное соединение эпизима с крахмалом выпадает в виде осадка и начинается гидролиз.

Согласно Исковеско<sup>201</sup>), пепсин даже после диализа сохраняет положительный электрический заряд; но если такой раствор вскипятить, то заряд исчезает. Мы уже упоминали о произведенных Михаэлисом и Давидсоном определениях изоэлектрической точки (ср. стр. 34). Впрочем Некельхаринг и Рингер<sup>209</sup>) считают, что положение изоэлектрической точки при разных препаратах пепсина не остается постоянным.

В 1910 г. я произвел ряд опытов с целью выяснить, не влияет ли прибавление электролитов на величину показателя уравнения, выражающего адсорбционный процесс. В опытах с конго-ротом и фильтровальной бумагой я нашел, что при прибавлении электролитов величина  $\pi$  возрастает и приближается к той величине, которую имеет этот показатель при необратимых химических реакциях, т.-е. к бесконечности. При аналогичных опытах с трипсином<sup>45)</sup> наблюдалось такое же нарастание величины  $\pi$ . Другими словами, в присутствии, например, сернокислого кальция разница в относительной активности растворов трипсина различной концентрации будет менее выражена, чем в отсутствии этого электролита. Но под конец реакции получаются обратные результаты, так что в общем влияние электролитов следует считать явлением весьма сложным.

Помимо указанного влияния на степень адсорбции, действие электролитов на коллоиды может выражаться в оса-

ждении их или, наоборот, в повышении степени дисперсности (последнее наблюдается при некоторых эмульсиях). Возможно, что оптимальная концентрация ионов водорода для каждого энзима соответствует максимальной дисперсности; впрочем в настоящее время это допущение является еще чисто гипотетическим.

Подводя итоги всему вышесказанному, приходится признать, что влияние электролитов складывается из различных моментов, в зависимости от исследуемого случая, так что нельзя дать никаких общих правил или закономерностей. В следующей главе мы увидим, что некоторые энзимы в отсутствии электролитов оказываются совершенно инактивными.

### АУТОКАТАЛИЗ.

Можно предполагать, что упоминавшиеся в предыдущей главе явления аутокатализа тоже объясняются изменением поверхности энзима; как и при действии электролитов, условия здесь так сложны, что очень трудно дать этому явлению сколько-нибудь удовлетворительное истолкование.

### ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ.

Превычайно высокий температурный коэффициент большинства энзимных реакций заставляет предполагать, что помимо ускорения химической реакции нагревание влияет и на самий энзим, увеличивая его активную поверхность; с одним таким случаем мы уже встречались выше, когда речь шла о трипсине.

Возражая против адсорбционной теории, Брэйлсфорд Робертсон<sup>322)</sup> указывал, что адсорбция, как физический процесс, отличается малым температурным коэффициентом, между тем как для энзиматических реакций,— а также и для большинства химических реакций вообще—коэффициент этот сравнительно высок. Возражение это, по моему, неосновательно, так как протекающая под влиянием энзима химическая реакция сама уже испытывает большое ускорение при повышении температуры. Кроме того нельзя так безоговорочно пользоваться величиной этого коэффициента в качестве критерия при решении вопроса,— имеем ли мы

дело с физическим или химическим процессом. В некоторых случаях температурный коэффициент химической реакции может быть очень мал; например для реакции омыления этилацетата едким баритом он равен 1,45 на каждые  $10^{\circ}$  (Траутц и Фолькманн<sup>375</sup>). Эта величина почти равняется температурному коэффициенту диффузии 1,28. Сравнительно высоким температурным коэффициентом обладает и другой физический процесс — абсорбция (всасывание) жидкости пористым телом. Чикк и Мартин<sup>386</sup>) показали, что процесс коагуляции протеинов тоже отличается высоким температурным коэффициентом.

#### АДСОРБИРОВАНИЕ ВСЕХ КОМПОНЕНТОВ РЕАКЦИОННОЙ СИСТЕМЫ.

Если придерживаться взгляда, что быстрое достижение равновесия обусловлено концентрированием реагирующих веществ на поверхности энзима, то следует допустить, что на этой поверхности адсорбируются все компоненты реакционной системы, не исключая и воды. Справедливость этого предположения была доказана Аррениусом и его сотрудниками (ср. Уильямс<sup>390</sup>), изучавшими адсорбцию в растворах, содержащих смесь различных веществ.

Энзимы повидимому принадлежат к числу эмульсионных коллоидов; последние обладают, как известно, способностью связывать воду путем набухания (имбибции, или впитывания). Пока остается еще спорным вопрос, происходит ли связывание воды только этим способом или также и путем конденсации ее на поверхности коллоидальных частиц. На основании своих опытов над крахмалом Нозняк<sup>390</sup>) приходит к заключению, что процесс может итти как тем, так и другим путем, в зависимости от концентрации воды в жидкой фазе. При моих опытах<sup>47)</sup> с эмульсином и желатиной я нашел, что оба эти вещества могут извлекать воду даже из 90% алкоголя; повидимому вода связывалась только путем поверхностной адсорбции, так как не обнаруживалось никаких признаков имбибции,— частички энзима не набухали и после отфильтрования спирта казались сухими и рассыпчатыми, а желатина оставалась ломкой.

Джэллендер<sup>205)</sup> указывает, что частички препарата липазы из касторового семени не набухали ни в воде, ни в разведенной уксусной кислоте, ни в смеси олеиновой и уксусной кислот. Но в присутствии нейтральных жиров энзим начинал связывать воду. Автор предполагает, что жир и вода одновременно адсорбируются на поверхности энзима и здесь вступают между собою в реакцию.

Если помимо веществ, непосредственно участвующих в реакции, в реакционной смеси находятся еще какие-либо посторонние вещества, то и они в большей или меньшей степени будут адсорбироваться на поверхности энзима. Мы уже говорили о том, как будут влиять эти вещества если они адсорбируются очень сильно. Если среди адсорбированных веществ будут гидроксильные или водородные ионы, то они смогут в таком адсорбированном на поверхности состоянии проявить свое каталитическое действие. Уже в 1872 г. Виттих<sup>201)</sup> высказывал предположение, что действие пепсина обусловлено активированием кислоты: такое мнение несомненно имеет нечто общее с только что приведенными соображениями относительно адсорбции. Аналогичного взгляда придерживаются Мелланби и Уллэй<sup>247)</sup> относительно действия амилазы из поджелудочной железы. По мнению авторов, активность энзима обусловлена тем, что он присоединяет к себе ион водорода. В некоторых отношениях эти взгляды напоминают теорию Бертрана (ср. стр. 44). Но трудно представить себе, чтобы действие тех энзимов, оптимум которых лежит при нейтральной реакции, тоже обусловливалось концентрированием на их поверхности ионов водорода.

#### Ложное равновесие.

Бэнкрофтом<sup>26)</sup> было указано, что если продукты реакции сильно адсорбируются катализатором, то активная поверхность последнего будет все более и более уменьшаться, реакция будет идти все медленнее и может даже совершенно остановиться, не достигнув истинного состояния равновесия. В некоторых случаях (ср. например, стр. 83 и 84) может даже создаться впечатление, что конечный результат зависит от количества катализатора.

### ПОЛОЖЕНИЕ РАВНОВЕСИЯ.

Проф. Гопкинс указал мне, что все компоненты реакционной системы должны адсорбироваться в тех же относительных количествах, в каких они находятся в жидкой фазе в момент достижения равновесия; в противном случае на поверхности энзима должно было бы установиться состояние равновесия, отличное от того, которое существует в жидкой фазе. В настоящее время мы еще очень мало знаем об условиях равновесия, и возможно, что в разных фазах положение равновесия может быть различным.

Тут надо отметить следующий чрезвычайно интересный факт, обнаруженный Дитцем<sup>112)</sup>. Уже раньше достаточно подробно указывалось, что при действии липазы устанавливается истинное равновесие. Положение равновесия не зависит ни от того, в каком направлении ведется реакция, ни от количества энзима. Поэтому может показаться странным, что если взять в качестве катализатора кислоту, то равновесие устанавливается при другом соотношении реагирующих веществ нежели при липазе; при кислоте, когда реакция протекает в гомогенной системе, равновесие достигается, когда реакционная смесь содержит 85,5% эфира, между тем как в гетерогенной системе, при липазе, равновесие устанавливается при 75% эфира. Казалось бы, как указывает и сам Дитц, что в этом случае можно обойти второй закон термодинамики; прибавляя поочередно то кислоту то энзим, мы могли бы вызывать образование известного количества теплоты, которое, в свою очередь, можно было бы обратить в работу. Но мы знаем, что это возможно только при условии доставления системе некоторого количества энергии извне. Если эта энергия черпается из энзима, то последний должен под конец реакции находиться в каком то ином состоянии, чем в начале. Опыты, поставленные с целью установить такое изменение энзима, кончились вполне отрицательным результатом. Новидимому объяснение этого парадоксального явления кроется в каких-то еще не выясненных изменениях поверхностной энергии.

Сходное явление было отмечено Виссером в его работе об инвертазе; только там в присутствии кислоты гидролиз идет дальше, чем под влиянием энзима. Возможно, что в этих

примерах мы имеем дело с частным случаем общего закона,— быть может всегда положение равновесия, достигаемое под влиянием энзимов, отличается от того, которое наступает, если катализатором служит, например, кислота. При всех попытках объяснить это явление надо иметь в виду несколько важных обстоятельств. Так, очень характерно, что в обоих приведенных примерах, несмотря на различие в положении равновесия при энзиматическом и кислотном катализе, положение это для каждого из катализаторов оказывается постоянным, не завися от количества катализатора. Дж. Дж. Томсон<sup>374)</sup> показал, что в поверхностном слое изменяется не только скорость реакции, но и положение равновесия. Согласно Остwaldу<sup>289)</sup>, в присутствии веществ с сильно развитой поверхностью положение равновесия при гидролизе солей жирных кислот изменяется. Благодаря тому, что свободная жирная кислота адсорбируется поверхностью, степень гидролиза соли увеличивается.

Выше (ср. стр. 9) указывалось, что, благодаря почти полной термонейтральности катализируемых энзимами реакций, достаточно самых незначительных количеств энергии, чтобы изменить положение равновесия. Гилл<sup>196)</sup>, пользуясь очень тонкой методикой, определил количество теплоты, образующейся при гидролизе крахмала амилазой. Оно оказалось меньше 0,5 калорий на грамм вещества. Если вспомнить, что теплота сгорания крахмала равна приблизительно 5 000 калорий на грамм, то мы увидим, как ничтожно мала первая величина.

Фрейндлих<sup>148)</sup> обращает внимание на следующий факт: в опытах Дитца оказалось, что разница в положении равновесия, достигаемого при липазе и при кислоте, будет тем больше, чем больше воды содержит реакционная смесь. Можно предположить, что энзим адсорбирует или впитывает некоторое количество воды; в таком случае окажется, что в том месте, где именно и устанавливается равновесие, т.е. на поверхности энзима, концентрация воды будет больше, чем в окружающей среде; это повлечет за собою смещение равновесия в сторону более полного гидролиза, как это и наблюдается на самом деле; при кислотном же гидролизе вода равномерно распределена по всей системе. Необходимы дальнейшие исследования вопроса об адсорбции различных

веществ из их смеси. Прибавляя животный уголь к находившейся в состоянии равновесия системе „эфир — вода“, я не мог обнаружить изменения положения равновесия. Повидимому в этом случае все компоненты системы адсорбировались в таких же относительных количествах, в каких они находились в растворе. Конечно отсюда еще не следует, что то же самое будет наблюдаться и при всяком другом адсорбере.

Во всяком случае мы вправе утверждать, что нет никаких фактов, которые противоречили бы высказанному нами в настоящей главе взгляду, именно, что действие энзимов сводится к более быстрому достижению состояния химического равновесия; положение этого равновесия может отличаться от того, которое достигается при медленном, самопроизвольном течении реакции или устанавливается под влиянием гомогенного катализатора, например кислоты. При теперешнем состоянии нашего знания мы еще не можем решить, каким образом развивается действие энзима; может быть оно сводится к конденсированию реагирующих веществ на поверхности энзима путем простой физической адсорбции; возможно также, что адсорбция эта сопровождается химической реакцией между адсорбируемым веществом и адсорбирующей поверхностью с образованием нестойких промежуточных соединений; наконец возможно, что сама адсорбция, как это полагает Лэнгмюир, является до известной степени химическим процессом.

Если принять во внимание, что физические свойства поверхности зависят и от химической природы вещества, то наиболее вероятной будет гипотеза о чисто физической адсорбции. Когда мы изучаем явления, разыгрывающиеся в пределах молекул, то мы попадаем в область, в которой трудно определить,—что зависит от химической природы атома и что от его физических свойств.

Несомненно, самым серьезным возражением против чисто физической теории является столь сильно выраженная специфичность некоторых энзимов. В следующих двух отделах этой главы мы подробнее остановимся на этом вопросе и покажем, что ему склонны придавать слишком большое значение.

### СИЕЦИФИЧЕСКАЯ АДСОРБЦИЯ.

Мы уже указывали, что есть основания предполагать, что при явлениях адсорбции играют большую роль химические взаимоотношения. Вспомним Фишеровское сравнение с ключом и замком,— оно пояснит нам, что химическая конфигурация поверхностей или молекул, образующих эти поверхности, может явиться решающим фактором, обуславливающим возможность тесного соприкосновения между этими поверхностями. Если воспользоваться несколько грубым примером, то можно сказать, что поверхность, образованная округленными возвышениями или выступающими остриями, не может плотно соприкоснуться с плоской поверхностью (ср. также Старлинг<sup>357)</sup>).

Значение конфигурации для действия энзимов подтверждается также отношением энзимов к оптическим изомерам. Это можно

илюстрировать рис. 8, на котором чисто схематически изображено отношение оптически изомерных глюкозидов к мальтазе и эмульсину.

Так как тела трех измерений не могут быть представлены на плоскости, то надо принять, что изображенные на схеме фигуры могут быть перемещаемы только в пределах плоскости рисунка. При этом условии легко видеть, что мальтаза может вступить в тесное соприкосновение с  $\alpha$ -глюкозидом, но не „подходит“ к  $\beta$ -глюкозиду; эмульсин же, который можно считать за зеркальное изображение мальтазы, по своей структуре соответствует  $\beta$ -глюкозиду.

И в более простых случаях, когда мы имеем дело с несомненной адсорбцией, иногда наблюдаются явления специфичности. Так, мне удалось показать<sup>41)</sup>, что желатина адсорбирует значительно больше фуксина, чем конго-рота, между тем как фильтровальной бумагой обе эти краски адсорбируются в совершенно одинаковой степени. Желатина

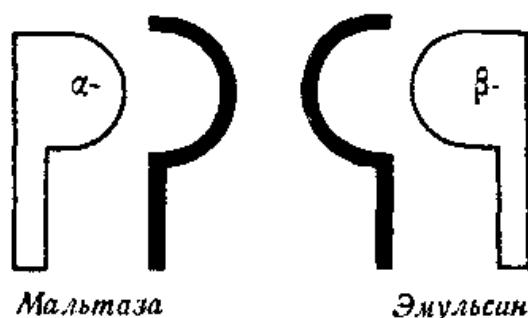


Рис. 8.

легче адсорбирует кальцевые соли, чем соли калия. Шенбейн<sup>389)</sup> нашел, что если погружать полоски фильтровальной бумаги в растворы различных солей, то вода всюду подымается по бумаге на одинаковую высоту, а растворенные в ней соли — на разную; так, калий, например, подымается выше, чем кальций или барий.

Михазелис и Гона<sup>240, 261 и 262)</sup> предложили метод осаждения белковых веществ путем прибавления к их растворам эмульсии мастики. Осаждая этим способом растворы пептона Витте, Цунтц<sup>408)</sup> обнаружил, что одни из содержащихся в пептоне белковых веществ образуют адсорбционное соединение с мастикой и выпадают, а другие нет. Несомненно, что мы тут имеем дело с чисто физическим явлением, так как трудно предположить, чтобы белки вступали в химическое соединение с мастикой.

Дэвис<sup>108)</sup> удалось показать, что даже в таком простом случае, как адсорбция иода углем, существует известная специфичность. Пользуясь углем разного происхождения, Дэвис установил, что, при прочих равных условиях, количество свободного, оставшегося неадсорбированным иода равнялось:

При угле из кокосовых орехов . . . . .	1,276
“ “ , костей . . . . .	0,522
“ “ , сахара . . . . .	0,799

Автор указывает далее, что, в то время как адсорбция меняется в зависимости от характера поверхности, т.-е. является как бы специфичной, „фактор диффузии“ при всех препаратах угля остается постоянным. Этот факт приобретает особое значение в связи с тем, что говорилось выше о влиянии конфигурации поверхности. Возможно, что то, что Дэвис принимает за диффузию, на самом деле является химической реакцией между углем и иодом, но для нас этот вопрос в данном случае значения не имеет.

При энзимах мы тоже встречаемся с определенно выраженным „адсорбционным средством“. Прекрасный пример мы имеем в опытах Хедина<sup>177)</sup>. Согласно этому автору, в селезенке содержатся две протеазы; из смеси этих обоих энзимов уголь адсорбирует оба в одинаковом количестве, а инфузорная земля — только  $\alpha$ -протеазу, совершенно не захватывая

$\beta$ -протеазы. Надо сказать, что  $\beta$ -протеаза действует в кислой среде, а  $\alpha$ -протеаза — в щелочной; возможно, что они обладают электрическими зарядами разного знака, чем и объясняется различное отношение их к адсорбирующим веществам (ср. Бэйлисс<sup>41</sup>). В своих опытах с инвертазой Михаэлис<sup>252</sup>) тоже установил, что этот энзим одними веществами адсорбируется, а другими нет.

Было бы неправильным предполагать, что наблюдающаяся в некоторых случаях „специфичность“ адсорбции обусловлена только химическими факторами. Влияние поверхностного натяжения, электрические заряды и целый ряд других моментов, все это, комбинируясь различным образом, может дать, в зависимости от условий, самые разнообразные результаты. Мы обращаем внимание на ряд ценных указаний по этому вопросу, которые можно найти в книгах Ван Беммеленна<sup>57</sup> и Фрейндлиха<sup>148</sup>).

В качестве примеров якобы „специфичной“ адсорбции мы укажем на опыты Велера и Плюддемана<sup>403</sup>). Бензойная кислота адсорбируется как углем, так и красной окисью железа приблизительно в одинаковой степени. Уксусную кислоту эти же вещества адсорбируют в десять раз слабее, чем бензойную. Окись хрома адсорбирует и бензойную и уксусную кислоту в одинаковой мере, а платиновая чернь может адсорбировать лишь очень незначительные количества этих кислот, притом уксусной кислоты больше, чем бензойной. Во всех этих случаях вряд ли приходится допускать возможность химического взаимодействия.

Геффкен<sup>152</sup>) показал, что коллоидальный гидрат окиси железа поглощает (путем адсорбции) двуокись углерода, но не может адсорбировать кислород. Бэнкрофт<sup>36</sup>) считает возможным, что под влиянием различных катализаторов могут получаться различные конечные продукты, в зависимости от того, как эти продукты адсорбируются тем или иным катализатором.

### О специфичности энзимов.

До сих пор мы молча принимали общераспространенную гипотезу о чрезвычайной специфичности энзимов. Теперь мы должны остановиться на некоторых фактах, которые покажут

нам, что нельзя принимать эту гипотезу так безоговорочно, скорее надо отнестись к ней с известной долей осторожности.

В настоящее время склонны принимать существование нового энзима всякий раз, как оказывается, что какое-либо вещество, прежде считавшееся недоступным действию энзимов, поддается действию какого-либо новооткрытого или даже уже ранее известного препарата. Так, например, утверждают, что эмульсин состоит по крайней мере из четырех отдельных энзимов — бензианазы, амигдалазы,  $\beta$ -глюказы и глюко-лактазы.

Необходимы еще дальнейшие исследования, чтобы можно было с уверенностью сказать, что мы здесь действительно имеем дело с различными энзимами, а не с одним и тем же, действие которого может проявляться различным образом, в зависимости от внешних условий опыта. Если препарат содержит четыре энзима, то надо попробовать отделить их друг от друга, а затем испытать полученные отдельные энзимы при совершенно одинаковых условиях. В работе Розенталера о „синтезирующем“ эмульсине последнее условие не было выполнено; поэтому полученным автором результатам нельзя придавать особенно большого значения.

Армстронг и Хортон<sup>26)</sup> исследовали препараты эмульсина, полученные из выращенного на разных почвах клевера. При этом оказалось, что если исследовать действие этих препаратов на целом ряде глюкозидов, то между отдельными препаратами наблюдаются известные различия. По моему, необходимо выяснить, не может ли действие одного и того же энзима несколько изменяться в зависимости от присутствия в реакционной смеси тех или иных посторонних веществ.

Мне могут указать, что я, несмотря на всеобщее признание теории специфичности, слишком мало уделяю внимания учению о „ключе и замке“. Но мне кажется, что с М. Эмиль Фишер вовсе не хотел придать своей теории такое утрированное значение, как это сделали его последователи. Он производил свои опыты в течение слишком короткого времени, и не исключена возможность, что какой-либо определенный энзим, помимо того субстрата, который он расщепляет легче всего, окажется в состоянии расщеплять и другие, только значительно медленнее. Далее, надо помнить, что помимо ключей существуют и отмычки, могущие открывать

различные замки. Такую возможность допускают даже и Армстронги<sup>23)</sup>.

Здесь уместно будет привести несколько слов самого Э. Фишера. Указав, что разные энзимы по отношению к одному и тому же субстрату обладают различной активностью, Фишер далее говорит: „В настоящее время мы еще ничего не знаем о причинах этого различия. Возможно, что, как это было доказано для диастазы, эмульсии и некоторые другие энзимы представляют собою смесь различных энзимов. Но можно также представить себе, что одна и та же молекула, вступая в реакцию с той или иной группой атомов, может проявлять различные энзиматические функции. Возможно также, что химическая группа, обусловливающая действие энзима, в одном случае оказывается более активной, чем в другом, в зависимости от небольших различий в строении“.

К этому вопросу надо подходить не столько со стороны статики, сколько со стороны динамики; следовало бы больше заниматься изучением скоростей реакций, чем подбираньем ключей к замкам. Если вспомнить данное Оствальдом определение катализа, то станет ясным, что аналогия с ключом и замком не очень удачна; ведь замок, как долго бы мы ни ждали, никогда самопроизвольно не откроется. Многие из новейших работ показывают, что чисто структурно-химический подход едва ли принесет много пользы при разрешении трудного вопроса о природе действия энзимов. Впрочем в некоторых случаях вопрос строения несомненно может играть роль, например, при образовании промежуточных соединений между энзимом и субстратом (если только такие соединения действительно образуются).

При разрешении вопроса о специфичности мы наталкиваемся на целый ряд чисто экспериментальных трудностей. Если, например, какой-либо очищенный препарат действует и на мальтозу и на амигдалин, только на последний значительно слабее, чем на первую, то приверженцы теории строгой специфичности будут утверждать, что в препарате просто есть небольшая примесь эмульсина. Во всяком случае не следует терять надежды, что эти трудности удастся преодолеть.

Своими очень тщательными исследованиями Файя и с<sup>136)</sup> показал, что все экспериментальные данные, полученные

при изучении действия разных энзимов на оптически изомерные соединения, а также при изучении синтетического действия энзимов, легче всего объясняются, если допустить, что один и тот же энзим действует на оба изомера, только с различной скоростью. Отсюда, конечно, не следует заключать, что мальтаза и эмульсин суть одно и то же. Можно только сказать, что оба эти энзима действуют как на  $\alpha$ -, так и на  $\beta$ -глюкозиды, но мальтаза скорее расщепляет  $\alpha$ -изомер, а эмульсин, наоборот,  $\beta$ -глюкозиды. С другой стороны, возможность, что оба энзима представляют собою одно и то же вещество, тоже не исключается, только в настоящее время мы не имеем никаких доказательств в пользу такого допущения. Более подробную математическую разработку этой теории читатель найдет в оригинальной работе Файянаса; мы же здесь упомянем лишь о нескольких фактах, на которые сам автор обращает внимание.

Вспомним уже цитированную работу Дэкина о липазе. В ней автор установил, что оба изомерных эфира миндальной кислоты гидролизируются липазой, только с различной скоростью; под конец все-таки оба оказывались разложенными в одинаковой степени, и при достижении равновесия система оказывалась оптически инактивной. Таким образом для липазы гипотеза Файянаса всецело приложима. Правда разница в скорости гидролиза в этом случае гораздо меньше, чем бы это должно было быть, например, при мальтазе и эмульсине, но Файянс указывает, что это различие в скорости гидролиза двух изомеров может колебаться в самых широких пределах.

Аналогичные факты наблюдаются и при гидролизе полипептидов, и мы уже указывали на своеобразно „избирательное“ отношение триптаз к этим субстратам. Так как здесь эти явления трудно объяснить близким сходством химического строения энзима и субстрата, то более вероятно, что мы в данном случае имеем дело с различиями чисто физического характера.

Отнюдь нельзя считать за общее правило, что живые организмы действуют только на один какой-либо оптический изомер. Как показали Нейберг<sup>276)</sup> и Прингсхейм<sup>277)</sup>, бактерии и плесени могут использовать оба компонента рацемических кислот. Оксидазы из грибов окисляют, хотя

и с разной скоростью, оба изомера различных аминокислот. Согласно Доксу и Нейдигу<sup>115)</sup>, экстракты из гриба *Aspergillus* разлагают как  $\alpha$ -, так и  $\beta$ -глюкозиды, но тоже с неодинаковой скоростью. Кондо<sup>212)</sup> нашел, что печень может синтезировать аминокислоты из кетокислот и аммиака даже в том случае, если вводимая кислота не принадлежит к числу встречающихся в составе белков организма. Так как примененные в этих опытах изомеры в природе не встречаются, то, если допускать существование особого энзима, надо принять, что организм в течение своей эволюции выработал такой агент, который ни разу не мог проявить своего действия, пока этот организм не попал в руки экспериментатора.

Мне могут указать на присутствие некоторых энзимов в таких местах, где им или никогда не представляется возможность проявить свое действие или же, если бы даже они получили эту возможность, то продукты вызванной этими энзимами реакции оказались бы ядовитыми для всего организма. Сюда относятся: эмульсин, найденный Бриссемаром и Комбом<sup>82)</sup> в пищеварительном канале позвоночных; сырчужный энзим в растениях (возможно, впрочем, что он идентичен с папаином); лактаза в миндальных орехах и т. д. Факт этот можно объяснить двояким образом. Во-первых, если принять, что соответствующее действие вызывается действительно присутствием названных энзимов, то можно предположить, что энзимы эти образуются в процессе метаболизма как случайные побочные продукты, вне зависимости от того, найдут ли они себе какое-либо применение в экономии организма. Во-вторых, возможно, что наблюдаемые действия зависят не от присутствия соответственных энзимов — эмульсина, сырчуга и пр., — а вызываются какими-либо другими энзимами, обладающими, помимо данной, еще и другой, так сказать главной, функцией. Разумеется, как в том, так и в другом случае мы должны отказаться от понятия о специфичности или, по крайней мере, толковать его в очень широком смысле.

Прежде часто утверждали, что в том или ином случае мы имеем дело или с одним только эмульсином или с одной только мальтазой; за последнее время появился ряд работ, указывающих, что в этих случаях удается обнаружить и действие,

приписываемое другому из названных энзимов. Я упомяну об энзимах дрожжей, слизистой оболочки пищеварительного канала (ср. Бриссемар и Комб<sup>82)</sup>) и т. д.

Теперь мы перейдем к синтетической деятельности энзимов. Файянс указывает, что если какой-либо определенный энзим действует на два оптических изомера с различной скоростью, то при достижении состояния равновесия один изомер будет находиться в большем количестве, чем другой; мы получим то, что Розенталер<sup>329)</sup> описывает как асимметрический синтез. Файянс далее говорит, что результаты Розенталера легко объясняются, если допустить, что катализатор сам оптическиителен; благодаря этому отпадает предположение о существовании двух разных энзимов. По отношению к оптическим изомерам синтезирующее действие энзима не должно обязательно соответствовать по силе гидролитическому; а раз это так, то дана возможность образования оптически деятельного вещества. Возьмем для примера мальтазу. Она гидролизирует мальтозу быстрее, чем изомальтозу; но вполне возможно, что при синтетическом действии этот же энзим будет легче синтезировать именно изомальтозу. В таком случае, когда реакция будет идти в сторону синтеза, то при достижении равновесия количество мальтозы скажется меньше, чем изомальтозы. То же самое получится и в том случае, если оба изомера синтезируются с одинаковой скоростью, но один из них легче гидролизируется. Розенталер, изучая образование под влиянием действия энзимов оптически деятельного бензальдегид-циангидрина, нашел, что под конец оба изомера содержались в реакционной смеси в одинаковом количестве.

Мне представляются совершенно непонятными те положения, на которых базируются Армстронг и Хортон<sup>25)</sup>, когда они утверждают, что опыты Файянса не имеют никакого отношения к энзимам. Эти авторы считают, что применявшиеся Файянсом в его опытах оптически деятельные основания будто бы вовсе не играют роли катализаторов. Между тем из работы Файянса<sup>136)</sup> ясно видно, что эти основания не входят в состав конечных продуктов реакции и что действие их не стоит ни в какой стехиометрической зависимости по отношению к субстрату. Нас совершенно не касается вопрос, каков истинный механизм

действия этих оснований; мы знаем, что катализитическое действие может быть обусловлено, между прочим, и образованием промежуточных соединений.

При чтении работы Армстронга и Хортона об энзимах типа эмульсина<sup>30)</sup> невольно возникает целый ряд возражений.

При действии эмульсина на амигдалин в первой стадии эмульсин производит тот же эффект, что и мальтаза: он отщепляет амигдонитрилглюкозид. Этот же результат можно получить посредством серной кислоты. Не приходится поэтому говорить об особенной специфичности указанного действия.

Армстронг и Хортон сами не решаются говорить о „сходстве конфигурации“ эмульсина и глюкозы и повидимому допускают возможность, что один и тот же энзим при разных условиях может проявлять различное действие. Поэтому авторы подчеркивают, что опыты с энзимами следует производить по возможности при совершенно одинаковых условиях.

Далее Армстронг и Хортон останавливаются на действии энзимов на фазео-лунатин. Они высказывают мнение, что это вещество представляет собою  $\beta$ -глюкозид, а не  $\alpha$ -глюкозид, как то принимает Денстан. Однако несмотря на то, что фазео-лунатин является по мнению авторов  $\beta$ -глюкозидом, он почти не расщепляется эмульсином. Гораздо сильнее действует энзим, выделенный из тех же бобов, что и сам фазео-лунатин; энзим этот, названный „фазео-лунатазой“, может расщеплять амигдонитрил-глюкозид, но почти не действует на амигдалин. Авторы объясняют это тем, что препарат не содержит „амигдалазы“. Но непонятно, почему этот энзим, гидролизируя амигдонитрил-глюкозид, не может расщепить в том же месте молекулу амигдалина, образуя дисахарид и бензальдегид-циангидрин?<sup>1)</sup>.

Приходится выдвигать еще новую гипотезу, что, для того чтобы могла действовать фазео-лунатаза, надо сперва отщепить одну молекулу глюкозы. Наконец и „ $\beta$ -глюказу“ тоже считают состоящей из целого ряда специфичных энзимов.

<sup>1)</sup> Это действие производит энзим, который можно извлечь из улиток (Джайлс).

Когда читаешь, что энзим, действующий на  $\beta$ -глюкозиды, есть  $\beta$ -глюказа, что те вещества, которые  $\beta$ -глюказа расщепляет, суть  $\beta$ -глюкозиды, а те, на которые она не действует, не являются  $\beta$ -глюкозидами, то, право, все это рассуждение напоминает нам заколдованный круг.

Нам представляется вполне возможным, что в известных условиях энзимы могут изменять вращательную способность оптически деятельных веществ; ведь мы знаем, что при помощи неорганических катализаторов легко можно вызвать рацемизацию, а энзимы, как мы видели, по силе своего действия даже превосходят эти катализаторы.

Полагая, что разные оптические изомеры расщепляются различными энзимами, пытались изолировать эти энзимы из предполагаемой смеси их путем фракционированного осаждения или же путем осторожного нагревания, в расчете, что одни из этих энзимов разрушатся при более низкой температуре, чем другие. Такая методика может привести к неправильным выводам; допустим, что оба изомера расщепляются одним и тем же энзимом, только с различной скоростью; тогда можно представить себе, что в результате осаждения или нагревания активность энзима будет настолько понижена, что более медленно протекающую реакцию вообще не удастся за время наблюдения обнаружить. Мне удалось показать <sup>47)</sup>, что именно в этом обстоятельстве кроется объяснение полученных Розенталером результатов, приведших автора к предположению о существовании двух разных — синтезирующего и гидролизирующего — эмульсинов.

Работами последнего времени до некоторой степени разъяснен вопрос о действии химозина и липазы. Основываясь на экспериментальных данных, Павлов и Паращук <sup>294)</sup> высказали взгляд, что створаживающее действие является лишь особым проявлением пептической функции, наблюдаемым при определенных условиях — при нейтральной реакции, и в присутствии в качестве субстрата кальциевой соли казеина. Взгляд этот, хотя пока еще и не общепризнанный, подтверждается многими исследователями (ср. Оппенгеймер <sup>284</sup>). Мисс Портэр <sup>308</sup>) обнаружила в препаратах химозина вещество, которое задерживает пептическое действие, но не препятствует створаживающему действию пепсина. Это дает автору повод утверждать, что мы имеем дело со

смесью двух различных энзимов. Однако надо помнить, что свертывание молока является чисто коллоидальной реакцией, и вероятно не имеет никакого отношения к основной функции пепсина. Это обстоятельство очень затрудняет решение вопроса. По моему, отсутствие параллелизма в силе свертывающего и пептизирующего действия еще не говорит против предположения, что оба эти свойства принадлежат одному и тому же веществу. Куврер<sup>101)</sup> показал, что при свертывании казеина никакого гидролиза не происходит. Дальнейшие указания по этому вопросу можно найти в работах Ван Дама<sup>102)</sup>, Функа и Нимана<sup>103)</sup> и Ракочи<sup>104)</sup>.

Оппенгеймером<sup>104)</sup> было высказано мнение, что простые эфиры, с одной стороны, и высшие жиры — с другой, расщепляются не одним и тем же энзимом, а разными; даже монобутирин и амиловосалициловый эфир гидролизируются, по мнению этого автора, отдельными энзимами. В качестве одного из главных доказательств в пользу этого взгляда приводится тот факт, что при различных субстратах прибавление желчнокислых солей оказывает разное влияние на активность энзима. Но Терруэн<sup>105)</sup> установил, что при сравнении действия этих солей необходимо брать эфиры одной и той же кислоты; так, для гидролиза триацетина (уксуснокислый эфир глицерина) и уксуснокислых эфиров метилового, этилового, пропилового и амилового спиртов оптимум концентрации желчнокислых солей оказался в точности одним и тем же. Отсюда автор заключает, что во всех случаях мы имеем дело с одним и тем же энзимом. Разумеется, когда система окажется гетерогенной, как это будет при применении высших жиров, условия будут уже не те, что при системе гомогенной, и вполне вероятно, что оптимальная концентрация желчнокислых солей тоже окажется иной.

Фальк и Нельсон<sup>106)</sup> нашли, что аминокислоты могут гидролизировать эфиры, и считают это действие специфичным, так как одни кислоты расщепляют определенный эфир, а другие этого сделать не могут. Способность расщеплять эфиры не зависит от силы кислоты, и пока еще не удается поставить эту способность в какую-либо связь с химическим строением: так, фенилаланин, например, сильнее действует на метилуксусный эфир, чем гликоколл. Вероятно главную

роль здесь играют физические моменты, например поверхностное натяжение.

Надо иметь в виду еще следующее обстоятельство. Хорошо известно, что из нескольких весьма сходных реакций одни могут протекать легко, а другие лишь с большим трудом. Так, например, среди глюкозидов одни гидролизируются как кислотами, так и энзимами сравнительно легко, а другие — значительно труднее.

Поэтому, если мы видим, что данный энзим не может вызвать какой-либо определенной реакции, то причина этому может быть лежит не в энзиме, а в том, что данная реакция вообще протекает с трудом. Вспомним о действии мальтазы на мальтозу и на метилглюкозид или о действии уреазы на мочевину и уретан.

### Зимоиды.

Коршун<sup>220</sup>), исследуя взаимоотношения между химозином и его антителом, обнаружил, что путем фильтрования через фильтр из пористой глины можно разделить раствор энзима на несколько фракций, которые, отличаясь друг от друга по своей свертывающей силе, обладали, однако, одинаковой способностью связывать антитело. Другими словами, исходный раствор содержал какую-то модификацию энзима, потерявшую свою специфическую способность вызывать свертывание, но сохранившую способность реагировать с антителом; эта модификация является аналогичной эрлиховским „токсоидам“. В течение своих работ<sup>40</sup>) я наткнулся на некоторые факты, показывающие, что подобные модификации образуются и из трипсина при нагревании его в течение одного дня до 25°; я предложил назвать такие изжененные энзимы „зимоидами“.

Йонг<sup>407</sup>), исследуя антитрипсин крови, обнаружил ряд явлений, похожих на те, которые наблюдал Коршун; однако ему не удалось доказать присутствия зимоидов. Упомянем здесь еще о посвященной вопросу о зимоидах работе Бэрна и Крамера<sup>53</sup>).

Возможно, что многие факты, с которыми мы встретимся в следующей главе, говоря об антиэнзимах, объясняются адсорбирующим действием потерявших свою активность энзимов.

## ГЛАВА ВОСЬМАЯ. КОЭНЗИМЫ И АНТИЭНЗИМЫ.

### Лакказа.

Именно при лакказе впервые был употреблен термин „коэнзим“. Этим термином Бертран<sup>62)</sup> охарактеризовал соли марганца, которые, будучи прибавлены даже в ничтожных количествах, значительно усиливают действие лакказы. Правда, не удалось доказать, что в отсутствии солей марганца лакказа становится совершенно инактивной; поэтому правильнее говорить не о коэнзиме, а только об „акцелераторе“. Аналогичный случай мы имеем при амилазе, — здесь акцелератором служит аспарагин. Бертран применяет термин „коэнзим“ и к кальциевым солям, которые, повидимому, необходимы для действия пектазы.

### Липаза.

Магнус<sup>243)</sup> обнаружил, что если подвергнуть экстракт из печени диализу, то липопластическая способность, которой экстракт первоначально обладал, постепенно утрачивается; по прибавлении же диализата эта способность восстанавливается. Этот опыт показывает, что „липокластическая система“, содержащаяся в экстракте печени, состоит по крайней мере из двух компонентов, каждый из которых в отдельности инактивен. Диализированный инактивный экстракт удается реактивировать прибавлением прокипяченого экстракта, а также прибавлением экстракта, из которого все белки удалены уксуснокислым уранилом. Активирующее вещество оказалось растворимым в алкоголе, нерастворимым в эфире и не содержалось в золе печени. Недиализирующий компонент разрушается кипчением, так что его мы вправе рас-

сматривать как собственно энзим, а диализирующее вещество может быть названо коэнзимом. По сравнению с другими коэнзимами химическое строение коэнзима липазы известно лучше всего. Тевенхарт<sup>238)</sup> показал, что свойствами коэнзима обладают желчнокислые соли; согласно опытам Фюрта и Шютца<sup>150)</sup>, такими же свойствами обладает и гликохолевокислый натр.

Магнусу<sup>244)</sup> удалось далее показать, что синтетически полученные желчнокислые соли обладают таким же действием, как и выделенные из организма. Этот факт важен потому, что он исключает в зможность участия еще какого-либо коэнзима, который мог бы быть примешан к выделенным из организма солям.

Нельзя предполагать, что действие желчнокислых солей сводится только к тому, что они облегчают эмульгирование жиров; как показали опыты Терруэна<sup>367-371)</sup>, соли эти оказывают такое же влияние и на гидролиз растворимых эфиров. Этот же исследователь установил, что действие желчнокислых солей направлено не на субстрат, а на самий энзим. При прибавлении желчнокислых солей к поджелудочному соку активность липазы сперва быстро возрастает, а затем, при более продолжительном действии, начинает постепенно падать; скорость этого разрушения липазы прямо пропорциональна концентрации желчнокислых солей, так что не приходится думать о самопроизвольном инактивировании энзима. Де Жонж<sup>216)</sup> тоже пришел к заключению, что желчнокислые соли действуют непосредственно на энзим. Возможно, что это действие желчнокислых солей на липазу обусловлено тем, что они, сильно понижая поверхностное натяжение, препятствуют агрегации частичек энзима или даже действуют диспергирующим образом. Этим достигается сохранение или даже увеличение активной поверхности энзима.

Розенгейм и Шоу-Макэнзи<sup>327)</sup>, а также Бейтце и Нейберг<sup>55)</sup> нашли, что сыворотка также усиливает действие липазы.

В связи с теорией синтетического действия энзимов приобретает большое значение наблюдение Хамзика<sup>160)</sup>. Этот автор установил, что желчнокислые соли ускоряют и синтез триолеина, производимый липазой поджелудочной

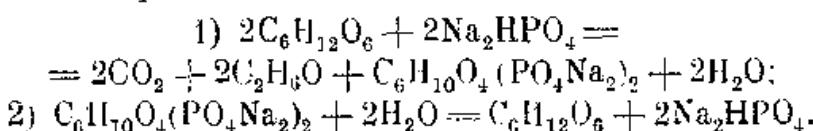
железы и кишечного сока. Впрочем, согласно Терруну<sup>367-371</sup>), гидролитический и синтетический процессы ускоряются не в одинаковой мере, так что в присутствии желчнокислых солей положение равновесия перемещается в сторону более полного гидролиза. В опытах названного автора оказалось, что по истечении 926 часов в пробе, содержащей примесь желчнокислых солей, было гидролизировано почти вдвое больше субстрата, чем в контрольной пробе без солей. К сожалению, автор не указывает, сохранил ли во второй пробе энзим свою активность до конца опыта или нет; возможно, что энзим оказался разрушенным или инактивированным раньше, чем реакция дошла до конца.

### Зимаза.

В целом ряде работ<sup>163-169</sup>) Харден и Ионг исследовали коэнзим зимазы. Если фильтровать полученный по способу Бухнера дрожжевой сок через желатиновый фильтр, то желатина задерживает все коллоиды. Естественно предполагать, что в числе этих коллоидов задержится и зимаза. Вопреки ожиданиям, остаток на фильтре оказывается инактивным. Но стоит прибавить к нему немного фильтрата,— который сам по себе тоже инактивен,— чтобы получить смесь, обладающую сильною сбраживающей способностью. Находящийся в фильтрате коэнзим проходит через перепонки диализаторов и не разрушается кипячением. Он исчезает из дрожжевого сока в процессе брожения, а также при аутолизе этого сока. Если к смеси сахара и инактивированной зимазы прибавить лишь немного коэнзима, то выделение углекислого газа скоро прекращается, прибавление нового количества коэнзима вызывает дальнейшее выделение газа. Надо сказать, что в настоящее время мы еще не знаем полностью природу этого коэнзима. Вначале, когда было установлено, что растворимые неорганические фосфаты значительно увеличивают активность обыкновенного дрожжевого сока, полагали, что эти соли и являются коэнзимом. Опыт показал, что это не так,— освобожденный путем фильтрования от коэнзима дрожжевой сок удается реактивировать прибавлением кипяченого сока, но не прибавлением фосфатов. Кроме того сок, предварительно подвергнутый аутолизу и

затем вскипченный, уже не обладает реактивирующей способностью, хотя он и содержит большие количества фосфатов. Дальнейшее исследование показало, что мы имеем перед собой сложную систему, в которой участвуют по крайней мере два коэнзима. Фосфаты для действия зимазы необходимы, но кроме них необходимо присутствие еще какого-то вещества, природа которого пока еще не выяснена<sup>1)</sup>.

Участие фосфатов в реакции проявляется, невидимому, следующим образом:



Разумеется, все эти реакции происходят под влиянием энзимов.

#### Влияние диализа на поджелудочный сок.

Биерри, Джайа и В. Ари<sup>6)</sup> установили, что если подвергнуть поджелудочный сок диализу, то он теряет свою способность расщеплять крахмал или мальтозу. Прибавлением определенных электролитов удается эту утраченную способность восстановить. При исследовании различных солей было далее выяснено, что главное значение при реактивировании принадлежит анионам; среди последних сильнее всего действуют ионы хлора и брома; соответственно этому, хлориды калия и натрия обладают сильным реактивирующими действием, а сернокислые соли тех же металлов почти совершенно лишены этого влияния.

Согласно Штаркенштейну<sup>352 и 354)</sup>, амилаза печени тоже утрачивает свою активность при диализе; реактивировать ее можно прибавлением хлористого натрия. Автор отмечает, что нейтральные соли, повидимому, вообще повышают активность гидролизирующих энзимов; по отношению к окислительным энзимам он такого влияния солей обнаружить не мог.

Одно время предполагали, что амилаза солода при диализе не теряет своей активности, но Вюлькэн и Лиз-

<sup>1)</sup> Согласно Бухнеру<sup>38)</sup>, этот коэнзим представляет собою эфир фосфорной кислоты.

бо нн<sup>280</sup> показали, что это зависит от недостаточно полного удаления электролитов. Если диализ сопровождается пропусканием электрического тока, который увлекает электролиты сквозь перепонку диализатора, то и амилаза солода тоже инактивируется; как и при других препаратах амилазы, здесь тоже удается реактивировать энзим, прибавляя хлориды калия натрия или кальция, а также азотнокислый натрий.

### Антиэнзимы.

Довольно трудно ответить на вопрос, существуют ли действительно настоящие антиэчзимы в том смысле, в каком употребляется понятие об антителе в учении об иммунитете. Так как сплошь и рядом — часто без всяких оснований — для объяснения экспериментальных данных допускают существование таких антиэнзимов, то мы считаем необходимым сказать о них несколько слов.

Под антителом подразумевается вещество, вероятно, очень сложного строения, которое образуется в организме в ответ на введение того или иного чуждого этому организму вещества — „антитела“. Антитело характеризуется тем, что оно определенным образом реагирует со своим антигеном, и притом *только* с ним. Все антитела разрушаются при нагревании. Что касается того, какие вещества могут служить антигенами, то, повидимому, всякий чуждый организму белок при парентеральном введении может вызвать образование соответствующего антитела. Некоторые исследователи утверждают, что липоиды и глюкозиды тоже могут играть роль антигенов; однако авторы не приводят достаточно убедительных доказательств того, что употреблявшиеся в их опытах препараты действительно совершенно не содержали примеси белков. Эрлих<sup>123)</sup> рассматривает антигены как высокомолекулярные соединения, принадлежащие к той же группе, что и пищевые вещества. Они каким-то особым, своеобразным образом непосредственно воспринимаются клеточной протоплазмой. Все же остальные вещества, не вызывающие образования антител, действуют на организм только соответственно их химическому или физическому характеру. Сюда относится большинство лекарственных средств, а также вещества, известные под названием гормонов.

За последнее время накапляется все больше фактов, указывающих на то, что энзимы являются веществами не белкового характера и что строение их проще, чем это раньше принималось. Уже это говорит против того, что энзимы могут служить антигенами. Мои опыты с иммунизацией эмульсином (ср. стр. 80), давшие совершенно отрицательный результат, побудили меня внимательнее пересмотреть те доказательства, которые приводятся в пользу антигенной природы энзимов. Именно против эмульсина впервые якобы был найден антиэнзим. Хильдебранд<sup>192)</sup> обнаружил, что сыворотка животных, иммунизированных эмульсином, задерживала действие этого энзима на глюказиды. Мне удалось показать, что эта задержка вызывается просто изменением концентрации ионов водорода. К сожалению, на это обстоятельство до последнего времени обращалось мало внимания, а между тем мы знаем, как чувствительны энзимы к изменениям реакции среды. Вероятно, что во многих случаях „анти-действия“ сводятся именно к изменению концентрации водородных ионов. Так, Тэйзен<sup>272)</sup> доказал, что способность сыворотки задерживать действие сырчужного энзима зависит, помимо явлений адсорбции (о них мы еще будем говорить ниже), главным образом от изменения реакции среды.

Судя по опытам Ота<sup>281)</sup>, сыворотка кроликов, иммунизированных эмульсином, сильнее задерживает действие этого энзима, чем сыворотка нормальных кроликов. Так как постановка опытов не исключала возможности колебаний концентрации водородных ионов, то выводы автора не особенно убедительны. В качестве дальнейшего доказательства Хильдебранд приводит свое наблюдение, что у нормальных кроликов на месте инъекций эмульсина появляется довольно значительное воспаление; после же предварительной иммунизации этого не происходит. В моих опытах я никогда не наблюдал воспаления; вероятно препарат, которым пользовался Хильдебранд, содержал кроме эмульсина еще какие-либо посторонние белки, которые конечно могли вызвать образование антител. Дальнейшие доказательства основываются на действии сыворотки иммунизированных животных на некоторые химические соединения; но условия соответствующих опытов очень сложны, и результаты их

гораздо легче объяснить не синтетическим действием антиэмульсина,— как это делает Хильдебранд,— а таким же действием самого эмульсина, служившего для иммунизации. То же самое можно сказать относительно результатов, полученных Хэмэлайненом и Сьюстромом<sup>157)</sup>.

Я только что указывал, что многие „анти-свойства“ объясняются изменением реакции среды. Казалось бы, что это объяснение неприменимо в тех случаях, когда в результате иммунизации задерживающие свойства сыворотки усиливаются. Но надо принять во внимание, что и в нормальных условиях эта задерживающая сила сыворотки колеблется в довольно значительных пределах; поэтому никогда нельзя быть уверенным, что усиление задержки действительно вызвано инъекциями энзима, а не произошло от каких-либо других причин.

В опытах Йонга<sup>167)</sup> иммунизация животных трипсином вела к образованию преципитина, дававшего осадок с содержавшимся в препарате энзима белком; однако никакого изменения антитриптической силы сыворотки при этом не наблюдалось.

При прибавлении к раствору энзима адсорбирующих веществ активность этого раствора естественно должна понизиться, благодаря уменьшению концентрации энзима в жидкой фазе. Очень наглядно можно демонстрировать это на трипсине и угле. Хедин<sup>176)</sup> нашел, что в этом случае процесс всецело подчиняется обычным законам адсорбции; особенно интересно, что, согласно опытам Янсон-Блоома<sup>164)</sup>, это зависящее от адсорбции, „анти-действие“ угля легко может быть устранено прибавлением сапонина; мы уже упоминали, что сапонин предохраняет сырчужный энзим от инактивирования при взбалтывании. Повидимому большинство антиэнзимов не отличается особенно выраженной специфичностью, и мы видели, с другой стороны, что при обычной адсорбции часто наблюдаются явления, симулирующие „специфичность“ действия. Некоторые авторы, например Гамбургер<sup>158)</sup>, предлагают обозначать подобное вызываемое адсорбцией удаление энзима из сферы реакции термином „отклонение“ энзима; по-моему, введение этого нового термина представляется совершенно излишним.

Кэткарту<sup>23)</sup> удалось установить, что антитрипсин сыворотки выделяется вместе с альбуминами ее; между тем мы

знаем, что большинство истинных антител находится в глобулиновой фракции сыворотки. По всем вероятиям мы имеем дело просто с адсорбцией трипсина, в результате чего уменьшается его активная концентрация. Хедин показал<sup>176)</sup>, что антитрипсин сыворотки никогда не инактивирует всего количества прибавленного трипсина; малые количества антитрипсина оказывают относительно более сильное влияние, чем большие. В этих отношениях наблюдается полный параллелизм с действием угля. Термолабильность антитрипсина, заставившая некоторых исследователей отнести его к разряду истинных антител, вероятно зависит от изменения физического состояния — уменьшения поверхности, коагуляции и т. д.

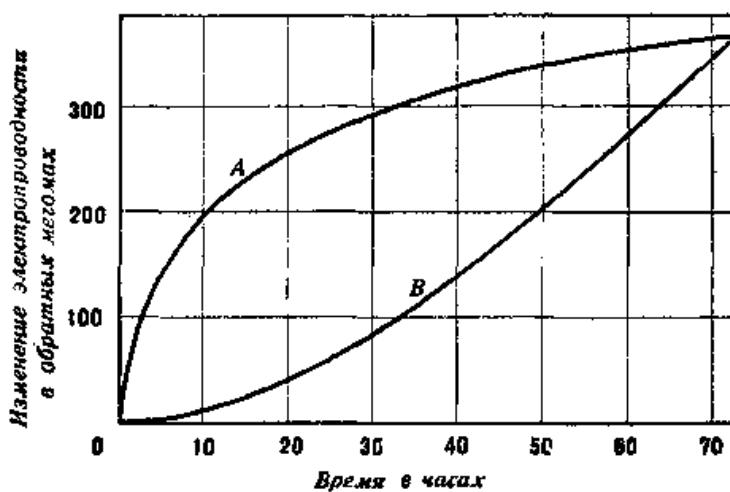


Рис. 9.

На основании своих опытов Розенталь<sup>328)</sup> приходит к заключению, что антитриптическое действие сыворотки обусловлено присутствием продуктов гидролиза белка. Насколько это мнение правильно, трудно сказать, так как опыты автора мало убедительны.

Если действовать трипсином на сырой сывороточный или яичный альбумин, то в течение первых нескольких часов нельзя обнаружить никакого гидролиза. Но постепенно энзим начинает проявлять свое действие и активность его все возрастает, так что кривая скорости реакции обращена к абсциссе своей выпуклой стороной — ср. кривую B на рис. 9. Кривая A представляет течение реакции в том случае, если белок предварительно был нагрет до 100°.

Можно видеть, что под конец обе кривые сходятся в одной точке. Повидимому объяснение кроется в следующем. Сырой белок, в силу неизвестных пока причин, труднее переваривается трипсином, но зато обладает способностью адсорбировать его. По мере того как белок постепенно расщепляется и тем переводится в вещества, не способные адсорбировать трипсин, все большие количества последнего освобождаются, и активность раствора соответственно возрастает. Вообще известно, что нативный альбумин труднее расщепляется энзимами, чем коагулированный.

Несомненно, что целый ряд веществ обладает способностью задерживать действие тех или иных энзимов, но это еще не дает права называть все эти вещества антиэнзимами. Термин антиэнзим следовало бы употреблять только в тех случаях, когда задерживающее вещество выработано организмом в ответ на введение соответствующего энзима.

Присутствием антитриптических веществ Вейнланд<sup>392)</sup> объясняет тот факт, что паразитирующие в кишечнике глисты не перевариваются поджелудочным соком. Это анти триптическое вещество было выделено и изучено Хамилем<sup>159)</sup>. При кислой и нейтральной реакции оно выдерживает кипячение, при щелочной же быстро разрушается. Оно растворимо в спирту, если только последний не крепче 85%, и дialisируется через перепонки. Ясно, что это вещество не имеет ничего общего с антителами в смысле теории Эрлиха. Я мог подтвердить наблюдение Дастра<sup>107)</sup>, что этот „антитрипсин“ в процессе переваривания постепенно разрушается. Если к смеси трипсина и казеина прибавить столько экстракта из кишечных глистов, чтобы совершенно остановить действие энзима, то по прошествии нескольких дней, если хранить смесь в теплом месте, трипсин вновь приобретает свою активность. Мы уже указывали, что при кипячении в щелочной среде этот экстракт быстро утрачивает свои задерживающие свойства; весьма вероятно, что то же самое, только более медленно, происходит и при более низкой температуре.

Бухнер и Хэн<sup>89)</sup> описали антитриптическое вещество, найденное ими в дрожжах. В данном случае вещество это, повидимому, действует не на энзим, а вступает в какое-то соединение с субстратом; оно предохраняет зимазу, а также

казеин и желатину от действия содержащейся в дрожжах эндотрипазы; желатина, кроме того, становится недоступной действию пепсина и трипсина. Это антитриптическое вещество не дает реакций на белок, не разрушается кипячением, но теряет свое предохраняющее действие под влиянием липазы. Авторы считают его за эфир какой-то органической кислоты.

Хедин<sup>179)</sup> обнаружил образование антилаба после инъекций сычужного энзима или его зимогена. Автор указывает, что полученный антилаб не является антителом в эрлиховском смысле, так как при впрыскиваниях зимогена, который сам уже содержит антилаб, последнего в организме иммунизированного животного образуется больше, чем при впрыскиваниях активного энзима. Вопрос этот очень сложен, и интересующихся мы должны отослать к оригинальной работе.

#### НЕПЕРЕВАРИВАНИЕ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПИЩЕВАРITЕЛЬНОГО ТРАКТА.

В слизистой оболочке желудка Вейнланд<sup>392 и 393)</sup> нашел антипепсин, а в слизистой кишечника — антитрипсин; автор полагает, что эти вещества предохраняют оболочки от переваривающего действия желудочного и кишечного соков. На основании некоторых, еще неопубликованных, работ Хамилля и моих собственных я считаю присутствие антитрипсина в слизистой оболочке кишечника весьма сомнительным; присутствие же антипепсина в слизистой оболочке желудка Хамилль подтверждает.

Клуг<sup>215)</sup> полагает, что слизистая кишечника не переваривается пищеварительными энзимами благодаря присутствию в ней муцина, который связывает энзимы, образуя с ними адсорбционные соединения.

Если это действительно так, то подобным же действием должны обладать и другие коллоиды, попадающие в пищеварительный тракт. Можно предполагать, что в силу закона действия масс большая часть энзимов связывается именно этими веществами. С несомненностью установлено, что если путем впрыскивания секретина вызвать обильное выделение поджелудочного сока при пустом кишечнике, то наблюдаются

сильные разрушения слизистой оболочки, выражающиеся в десквамации эпителия и даже в геморрагиях. По всем вероятностям это зависит от отсутствия в кишечнике пищевых масс, которые в обычных условиях связывают энзимы, а кроме того благодаря своей кислой реакции уменьшают щелочность поджелудочного сока и тем несколько умеряют активность протеолитических энзимов.

## ГЛАВА ДЕВЯТАЯ.

### ЗИМОГЕНЫ.

Взаимоотношения между энзимом и коэнзимом отличаются до известной степени обратимым характером. Мы видели, что липаза из печени, в том виде как она находится в первоначальной вытяжке, обладает полной активностью; после диализа она свою активность теряет, по прибавлении же желчнокислых солей активность вновь восстанавливается.

Переход же инактивного зимогена в активный энзим представляет собою необратимый процесс. Все энзимы образуются в результате жизнедеятельности протоплазмы; несомненно, что в процессе образования на известной стадии они еще не обладают катализитическими свойствами готового энзима. В тех случаях, когда их удается выделить на этой стадии и затем чисто химическим путем превратить в активные энзимы, мы и говорим о зимогенах.

### ТРИПСИНОГЕН.

Совместно со Старлингом<sup>50)</sup> я показал, что трипсин выделяется поджелудочной железой в виде зимогена. В кишечнике, под влиянием энзима энтерокиназы, трипсипоген превращается в активный трипсин. По своим свойствам — за исключением протеокластической способности — трипсиноген мало чем отличается от трипсина.

На основании опытов Делезена<sup>100)</sup>, можно считать установленным, что помимо энтерокиназы трипсиноген может быть активирован прибавлением солей кальция. То количество кальция, которое содержится в поджелудочном соке, уже само по себе вызывает медленный переход зимогена в энзим, прибавление большего количества кальция солей значительно ускоряет этот процесс. Б. Аиртон<sup>33)</sup> подтвердила эти

наблюдения и установила далее, что самопроизвольное активирование поджелудочного сока зависит, кроме кальциевых солей, еще от присутствия какого-то другого фактора. При удалении кальциевых солей осаждением фактор этот разрушается, так что декальцинированный поджелудочный сок уже не удается активировать новым прибавлением соответствующей соли.

На основании своих весьма тщательных наблюдений Мелланби и Вуллэй<sup>247)</sup> приходят к заключению, что во всех случаях активирование трипсиногена производится энтерокиназой. Они считают последнюю за протеокластический энзим, который действует лучше всего при нейтральной реакции и легко разрушается щелочью. Трипсиноген, по мнению авторов, представляет собою соединение трипсина с белком; по мере того как энтерокиназа разрушает последний, трипсин освобождается и таким образом становится активным. Надо сказать, что представляется несколько неясным, почему белок, перевариваемый энтерокиназой, не расщепляется самим трипсином. Активирующее действие известковых солей авторы объясняют тем, что благодаря выпадению углекислого кальция и образованию соответствующей нейтральной соли натрия щелочная реакция поджелудочного сока нейтрализуется, чем создаются более благоприятные условия для действия энтерокиназы. Последняя содержится во многих тканях, в том числе и в поджелудочной железе, из которой она выделяется в поджелудочном соке; благодаря щелочной реакции этого сока энтерокиназа обычно быстро разрушается, чем и объясняется слабая способность поджелудочного сока к самопроизвольному активированию. В сыворотке содержится какое-то вещество, задерживающее действие энтерокиназы. Так как авторы для обнаружения этого вещества пользовались реакцией свертывания молока,— а это явление, как мы знаем, является чисто коллоидальным процессом,— то трудно сказать, имеем ли мы перед собой истинное антитело или же все сводится к адсорбции энтерокиназы каким-либо коллоидом.

Скорость активирования трипсиногена энтерокиназой сначала сравнительно мала, затем быстро возрастает и только под конец опять немного замедляется. Повидимому мы имеем дело с аутоактивитическим процессом. Вернон<sup>388)</sup> высказал

предположение, что это ускорение реакции обусловлено одним из промежуточных веществ, образующихся при переходе трипсиногена в трипсин. Гипотезу эту трудно проверить, так как готовый трипсин ускоряющим действием не обладает. Ход кривой, изображающей течение этой реакции, весьма своеобразен: скорость реакции, вместо того, чтобы постепенно падать, наоборот, почти до самого конца возрастаёт.

### ПЕПСИПОГЕН.

Зимоген пепсина впервые был получен Лэнглеем и Эдкинсом<sup>227</sup>). При прибавлении к раствору пепсиногена соляной кислоты зимоген быстро превращается в активный энзим. Пользуясь тем, что пепсин гораздо легче разрушается щелочью, чем пепсиноген (ср. Лэнглей<sup>228</sup>), удается обнаружить последний и в тех случаях, когда в испытуемом растворе одновременно имеется активный энзим. Насколько легко пепсиноген превращается в пепсин, можно видеть на следующем примере: весь пепсиноген, содержащийся в водной вытяжке из слизистой оболочки желудка кошки, можно, прибавлением 0,1% соляной кислоты, в течение одной минуты превратить в пепсин.

Глесснером<sup>154</sup>) был предложен способ получения и очистки пепсиногена, состоящий в следующем: Слизистая оболочка свиных желудков оставляется для аутолиза на несколько недель при щелочной реакции и температуре около 40°. Из аутолизата удаляют муцин, осаждая его уксусной кислотой, а затем осаждают белки уксусно-кислым уранилом. При этом в осадок увлекается в адсорбированном состоянии и весь пепсиноген. Экстрагируя осадок слабым раствором соды, переводят большую часть пепсиногена в раствор. Осаждение уранилом и извлечение содой повторяют еще раз, а затем сгущают раствор при 40°. Полученное вещество из всех белковых реакций давало,— да и то очень слабо,— только дне— небольшой осадок с солями ртути и фосфорновольфрамовой кислотой. Надо полагать, что оно не белковой природы, а потому и пепсин, получающийся из зимогена действием соляной кислоты, вряд ли может быть белковым веществом.

Из физических свойств пепсиногена следует отметить его оптическую активность, — он слегка вращает плоскость поля-

ризации влево. Мы уже указывали, что есть основания полагать, что энзимы вообще являются оптически деятельными веществами. Пепсиноген адсорбируется инфузорной землей, глиноземом и фибрином; крахмал и песок его не адсорбируют. Этим подтверждается известная „специфичность“ адсорбции, — ведь если и можно говорить о большем химическом „сродстве“ пепсина к фибрину, чем к крахмалу, то по отношению к инфузорной земле и песку такое объяснение совершенно неприложимо. Правда, инфузорная земля обладает гораздо большей активной поверхностью, чем песок, и это может обусловить кажущуюся „специфичность“ адсорбции, но все же, помимо размера, надо принимать во внимание и другие свойства поверхности.

Любопытно отметить, что в данном случае наблюдается большое сходство между энзимом и его зимогеном. Глэсснер указывает, что легкость и полнота, с которой протекает переход зимогена в активное состояние под влиянием даже очень слабых растворов кислоты, заставляют думать, что мы имеем дело с очень простым химическим процессом.

Из работы Хедина<sup>178)</sup> видно, что слизистая оболочка желудка содержит вещество, препятствующее действию съеженного энзима. Вещество это разрушается кислотой, и возможно, что в щелочных вытяжках из слизистой оболочки мы имеем не зимоген лаба, а соединение его с этим антилабом. Странно только, что в таком щелочном растворе сам лаб не разрушается, между тем как после активирования кислотой он становится очень чувствительным к щелочи. Автор пытается объяснить это тем, что в щелочном растворе энзим находится в виде химического соединения со своим антителом.

### Зимоген липазы.

Иошио Танака<sup>179)</sup> установил, что в покоящихся семенах клещевины липаза содержится в виде зимогена; кислота, активирующее действие которой отмечалось уже и прежними авторами, необходима только для перевода зимогена в активное состояние, сама же липаза действует лучше всего при нейтральной реакции. В дальнейшей работе<sup>180)</sup> тот же автор выяснил оптимальные условия для превращения зимогена в активный энзим и предложил метод, позво-

ляющий получать высоко активные препараты липазы, долгое время сохраняющие свою силу: 100 грамм семян, освобожденных от жира прессованием или экстракцией, растираются в течение 30 минут при 30—35° с 600—700 куб. см 0,1*n* уксусной кислоты (или с 500 куб. см 0,1*n* серной кислоты); смесь фильтруют, остаток на фильтре промывают водой, в которой липаза совершенно нерастворима, и высушивают при температуре не выше 40°.

## ГЛАВА ДЕСЯТАЯ.

### ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ И КОМПЛЕКСНЫЕ СИСТЕМЫ.

В предыдущих главах мы познакомились с несколькими случаями, когда, несмотря на одновременное присутствие энзима и субстрата, характерная для данного энзима реакция не наступает. Для того чтобы энзим мог проявить свое действие, в этих случаях необходимо еще присутствие третьего вещества: при липазе и зимазе — соответствующих коэнзимов, а при трипсине и пепсине — гидроксильных или водородных ионов.

#### Окислительные энзимы.

Другой характер имеют те комплексные системы, в которых участвуют окислительные энзимы. Читатель, вероятно, заметил, что все энзимы, о которых до сих пор шла речь, вызывают гидролитические процессы. Механизм действия окислительных энзимов и в настоящее время еще не выяснен окончательно, а до работы Баха и Шода<sup>35)</sup> в этом вопросе царила полная неопределенность. Хотя гипотеза, предложенная названными авторами, не может пока объяснить всех фактов, встречающихся в области окислительных процессов, все же ее несомненно следует признать за наиболее отвечающую современным воззрениям<sup>1)</sup>.

Говоря о процессах окисления, мы будем встречаться с тремя родами веществ:

- 1) Органические перекиси и перекись водорода.
- 2) Пероксидазы.
- 3) Каталазы.

1) Ср. очень обстоятельные свидки у Кэстля<sup>208)</sup> и у Вольфа<sup>209)</sup>.

Из них только последние две группы веществ принадлежат к энзимам. Как каталаза, так и пероксидаза разлагают перекись водорода на воду и кислород; но, в то время как каталаза выделяет кислород в молекулярном, сравнительно мало активном виде, пероксидаза разлагает перекись водорода с выделением так называемого „активного“ — вероятно находящегося в атомном состоянии — кислорода. Молекула кислорода состоит из двух атомов, а так как каждая молекула перекиси отдает только один атом кислорода, то каталаза очевидно действует сразу на две молекулы перекиси. Дальнейшее различие между каталазой и пероксидазой состоит в том, что первая действует только на перекись водорода, а пероксидаза разлагает также и целый ряд органических перекисей. Только этим можно объяснить, что действие пероксидазы проявляется в таких условиях, где нет никаких оснований предполагать присутствие перекиси водорода. Бах и Шода непосредственно экспериментальным путем подтвердили правильность своей гипотезы, показав, что пероксидаза способна разлагать этил-гидропероксид.

### К а т а л а з ы .

Значение каталазы для экономии организма до настоящего времени еще совершенно не выяснено и представляется до некоторой степени загадочным, так как большая часть окисляющихся в организме веществ, вроде глюкозы, молочной и мочевой кислот и т. д., не может быть окислена молекулярным кислородом. Между тем каталаза чрезвычайно широко распространена в животном и растительном царствах. Возможно, что при процессах окисления в качестве побочного продукта образуется перекись водорода; ввиду ее ядовитого действия на протоплазму, необходимо разлагать ее по мере образования, что и выполняется каталазой.

### О к с и д а з ы .

Одна пероксидаза, без перекиси, не может служить окислительным агентом. Необходимо одновременное присутствие обоих компонентов, чтобы могла образоваться активная окислительная система. Такая окислительная система иногда кратко называется „оксидазой“. Для того чтобы процесс

окисления мог итти продолжительное время, необходимо, чтобы перекись, по мере расщепления ее пероксидазой, могла восстанавливаться, вновь соединяясь с кислородом. Так оно и происходит на самом деле; это можно видеть, например, из того, что окисление гвяжевой смолы картофелем при отсутствии кислорода скоро останавливается.

При некоторых катализитических окислительных процессах пероксидаза может заменять собою неорганический катализатор. Так, например, если взять смесь молочной кислоты и перекиси водорода, то окислительный процесс будет итти очень медленно. Прибавление ничтожного количества сернокислого железа вызывает сильнейшее ускорение реакции. Совершенно такое же ускорение наблюдается, если вместо железной соли прибавить пероксидазу, получаемую, например, из хрена. С другой стороны, прибавление солей марганца или железа часто значительно усиливает действие различных „оксидаз“. Если прибавить к этому, что в золе окислительных энзимов обычно удается обнаружить присутствие железа или марганца, то невольно возникает предположение, что действие окислительных энзимов сводится к переведению названных элементов в особенно активное, в смысле проявления катализитического действия, состояние.

Дони-Эно<sup>114)</sup> описывает способ получения искусственной лакказы. Для этого смесь, содержащая 10 г гуммиарбика, 1 г муравьинокислого марганца и 0,4 г кристаллической двууглекислой соды в 50 куб. см воды, осаждается спиртом. Осадок вновь растворяется в воде и еще раз осаждается алкоголем. Полученное вещество вероятно представляет собою коллоидальный комплекс, содержащий гидрат окиси марганца. Оно обладает всеми свойствами описанной Бертраном лакказы и приблизительно одинаковой с ней активностью. Роль гуммиарбика, повидимому, сводится к поддержанию гидрата окиси марганца в высоко дисперсном состоянии, обусловливающем большую активную поверхность. Опыты Дони-Эно следуют признать чрезвычайно интересными и важными, не только как осуществление синтеза энзима, но и как доказательство того, что несомненный адсорбционный комплекс может быть растворяем и осаждаем, не теряя при этом своих свойств. Повторные осаждения и растворения, если они производятся все время при одних и

тех же условиях, не дают нам гарантии, что мы в результате такой очистки получим определенный химический индивидуум, а не некоторую смесь веществ.

Перрэн<sup>300</sup>) высказал предположение, что оксидазы, или, вернее, пероксидазы, представляют собою соединение гидрозоля гидрата окиси железа или марганца, который сам по себе нестойек, с некоторым гидрофильным коллоидом, сообщающим всей системе устойчивость. На примере молочной кислоты и перекиси водорода мы видели, что действительно соли марганца и железа могут проявлять, подобно пероксидазе, сильное окислительное действие. К аналогичным выводам пришли, на основании своих опытов, Рёман и Шаммине<sup>326</sup>).

В общем механизм окислительных процессов можно представить себе следующим образом. В тканях содержатся вещества, могущие окисляться молекулярным кислородом. Благодаря тому, что при этом освобождается некоторое количество энергии, часть этих веществ образует нестойкие перекиси. Пример подобной реакции мы имеем при окислении бензальдегида кислородом воздуха. Для таких, содержащихся в тканях, легко окисляющихся веществ, Бахом было предложено название „оксигеназы“. Дальнейшее активирование переведенного оксигеназой в перекисную форму кислорода производится пероксидазой. Последняя, повидимому, представляет собою коллоидальный гидрат окиси железа или марганца, поддерживаемый в активном, мелко раздробленном состоянии другим, гидрофильным, коллоидом. Пероксидаза разлагает перекись, освобождая кислород в „активном“ состоянии. Мы еще не знаем, что представляет собою это „активное“ состояние; повидимому в создании его участвуют и электрические силы; по крайней мере, самопроизвольное окисление бензальдегида сопровождается ионизацией газа, вызывающей конденсацию водяного пара. Рамсэй высказала предположение, что активность кислорода проявляется в тот момент, когда он, отдавая или принимая электрические заряды, меняет свою валентность. Можно также думать, что активность веществ *in statu nascendi* обусловлена тем, что в этот момент освобождающаяся при реакции энергия может быть использована для других процессов прежде, чем она обратится в теплоту.

Эйлер и Болин<sup>131)</sup> нашли, что лакказа выдерживает кипячение. Они же показали, что соли оксикислот в присутствии марганца легко окисляют гидрохинон. Что некоторые минеральные соли могут играть роль пероксидаз, было показано Вольфом<sup>405)</sup>.

Мы не можем согласиться с Эйлером и Болином, когда они говорят, что с выяснением строения энзима последний перестает для нас быть энзимом. Энзимы представляют собою только один из видов катализаторов. Если их и рассматривают и изучают отдельно от других катализаторов, то только ради удобства, принимая во внимание, что они вырабатываются живой клеткой и по большей части являются веществами неизвестного химического строения,

Из опытов Герцога и Мейера<sup>191)</sup> создается впечатление, что при данном количестве герекиси водорода количество окисленного субстрата пропорционально количеству прибавленной пероксидазы. Это зависит от того, что перекись вредно действует на пероксидазу, так что при малых количествах энзима она к концу опыта оказывается весь разрушенным. Что количество окисленного субстрата оказывается пропорциональным количеству перекиси, то это представляется совершенно естественным, так как ведь перекись доставляет тот кислород, за счет которого происходит окисление.

С точки зрения Баха-Шода трудно объяснить очень выраженную специфичность многих оксидаз. Так, согласно Бертрану, лакказа легко окисляет гидрохинон и пирогаллол, но совершенно не действует на резорцин и феноглюции; она не действует также на тирозин, который легко окисляется другим энзимом — тирозиназой. Удовлетворительного объяснения этим фактам пока еще не дано. Можно было бы ожидать, что освобождаемый пероксидазой активный кислород всегда обладает одинаковой окислительной способностью. Возможно, что причина специфичности кроется в характере второго компонента окислительной системы — именно оксигеназы. Можно бы думать, что необходимо известное соответствие в структуре перекиси (оксигеназы) и субстрата, которое обеспечило бы тесное соприкосновение между ними и тем облегчило бы непосредственный переход активированного кислорода.

Подробные данные об окислительной способности различных тканей можно найти в работе Вернона<sup>337)</sup> об иодо-фенол-оксидазе. Наибольшей окислительной способностью обладают те ткани, которые, по Эрлиху, наиболее „насыщены кислородом“. Повидимому так называемый „интрамолекулярный кислород“ накапливается в тканях в виде органических перекисей, а не в качестве составной части „биогена“ или молекулы протоплазмы. Подобные перекиси служат запасом и переносчиком активного кислорода, которого в свободном виде в каждый данный момент в тканях содержится лишь очень небольшое количество.

### Редуказы.

До последнего времени оставался неразрешенным вопрос, участвуют ли энзимы в восстановительных процессах, разыгрывающихся в живом организме. Впервые предположение о существовании восстановительных энзимов было вызвано наблюдением Шардингера<sup>334)</sup>, который обнаружил, что свежее молоко после прибавления к нему муравьиного или уксусного альдегида приобретает способность восстанавливать некоторые краски в соответствующие лейкобазы. Предположение об энзиматическом характере этого процесса подтверждалось тем, что после кипячения молоко теряло свою восстановительную способность. С другой стороны, если в молоке развились бактерии, то оно может восстанавливать краски и без прибавления альдегида. Бахом<sup>34)</sup> было отмечено, что существует большое сходство между системой: энзим Шардингера + альдегид и окислительной системой: пероксидаза + перекись. Осаждая водные экстракты из печени алкоголем, Бах выделил энзим, обладавший всеми свойствами, Шардингеровского энзима,— в присутствии альдегида он переводит краски в лейкобазы, восстанавливает нитраты в нитриты и т. д.

Подобно тому как активный, насыщающий кислород является энергичным окислителем, так и водород *in statu nascendi* обладает сильнейшими восстановительными свойствами. Было высказано предположение, что подобно нестойким, содержащим избыток кислорода соединениям — перекисям, существуют нестойкие соединения водорода, — их

назвали иергидридами. Принимая четырехвалентность кислорода, мы по аналогии с перекисью водорода (гидропероксидом) имеем пергидрид кислорода (оксипергидрид):  $\text{OH}_4$ . Правда, пока еще не удалось изолировать соединения, отвечающие по своему составу оксипергидриду; все же представляется весьма вероятной и вполне отвечает экспериментальным данным гипотеза, что как пероксидаза выделяет активный кислород из перекисей, так Шардингеровский энзим — его можно назвать пергидридазой — выделяет из пергидридов активный водород.

На основании этой гипотезы Бах<sup>34)</sup> предложил различать три класса энзимов:

1. — Энзимы, действующие на гидрогенизированную воду (перекись водорода, оксипергидрид); они вызывают восстановительные процессы.

2. — Энзимы, действующие на обычную воду; они вызывают гидролитические процессы.

3. — Энзимы, действующие на окисленную воду (перекись водорода); они вызывают окислительные процессы.

„Редуказы“, или „гидрогеназы“, повидимому, представляют собою, подобно оксидазам, комплексную систему, состоящую из пергидридазы и нестойких органических пергидридов.

Вряд ли надо напоминать читателю, что при всех окислительных и восстановительных процессах, когда одно вещество окисляется, то одновременно другое должно восстанавливаться, и наоборот. В рассматриваемых нами случаях нас главным образом интересует вопрос, каким путем вызывается данная реакция — активированием кислорода или же активированием водорода. Тем, кто интересуется вопросом об окислительно-восстановительных процессах, мы советуем познакомиться с работой Бредига и Зоммера<sup>35)</sup>; авторы эти, между прочим, показали, что коллоидальная платина может служить катализатором и при восстановительных реакциях.

### Сопряженные реакции.

Изучая окислительно-восстановительные процессы, протекающие в организме, мы встречаемся с такими реакциями, которые были названы Оствальдом<sup>287)</sup> реакциями „сопряженными“. Вот пример такой реакции: если взбалтывать

раствор мышьяковистокислого натрия с воздухом, то никакого окисления не происходит; если же самое проделать с раствором сернистокислого натрия, то последний быстро окисляется. Если же взять смесь этих солей, то при взбалтывании окисляются обе соли. Очевидно, что при самопроизвольном окислении сернистокислого натрия часть кислорода каким-то образом активируется и оказывается способной окислить и более трудно окисляющийся мышьяковистокислый натрий. Когда речь идет о двух реакциях, из которых одна, протекающая между двумя веществами, идет медленно, но ускоряется одновременно развивающейся, более быстро идущей реакцией между одним из веществ, участвующих в первой реакции, и третьим веществом, то для удобства обозначения пользуются следующей терминологией: быстро протекающую реакцию называют *первичной*; другую, индуцируемую первой, самопроизвольно лишь медленно протекающую реакцию, называют *вторичной*; вещество, участвующее в обеих реакциях, называют *актором*, второе вещество в первичной реакции — *индуктором*, а соответствующее вещество во вторичной реакции — *акцептором*. В приведенном примере кислород является актором, сернистокислый натрий — индуктором, а мышьяковистокислая соль — акцептором. Некоторые каталитические реакции тоже относятся к числу сопряженных; так, например, при окислении иодистоводородной кислоты перекисью водорода в присутствии солей железа первичной реакцией является взаимодействие между перекисью и железной солью, вторичной — действие другой части перекиси на иодистоводородную кислоту; здесь перекись будет актором, соль железа — индуктором, а иодистоводородная кислота — акцептором. Дальнейшие подробности этого, далеко еще не окончательно выясненного вопроса, читатель найдет в книге Меллора „Статика и динамика химических реакций“.

#### Функция хлорофилла.

В связи с вопросом о роли каталазы известный интерес представляют работы Ушера и Пристлэя<sup>378 и 379</sup>) о функции хлорофилла в процессе ассимиляции. Система, обзывающая усвоение углерода, состоит из трех компонентов протоплазмы: хлоропласта, самого хлорофилла и каталазы.

При помощи пигмента, действующего одновременно и как химический и как физический фактор, энергия солнечного луча направляется на то, чтобы вызвать реакцию между двуокисью углерода и водой. При этом образуются два вещества — формальдегид и перекись водорода; оба они ядовиты для живой клетки, и если дать им возможность накапливаться, то реакция скоро остановилась бы. Но формальдегид по мере образования, благодаря действию протоплазмы хлоропласта, полимеризуется, а перекись водорода разлагается каталазой. Этим объясняется, почему вся реакция в целом не может происходить в мертвых тканях, а также в вытяжках из зеленых листьев. В определенных условиях, будучи подвергнут действию света в присутствии хлороформа, хлорофилл может образовать некоторое количество формальдегида, но так как последний разрушает хлорофилл, то реакция скоро останавливается. С другой стороны, в убитых кипяченем листьях происходит некоторое время образование формальдегида и перекиси водорода, но тут процесс останавливается еще скорее, так как перекись тоже губительно действует на хлорофилл. В последнее время Юарт<sup>235)</sup> выступил с возражениями против изложенной здесь теории, но затем Скрайвер<sup>236)</sup> подтвердил возможность образования формальдегида в растворах хлорофилла, а в позднейшей работе Ушер и Пристлэй<sup>237)</sup> приводят ряд новых доказательств в пользу своей гипотезы.

Отметим, что в этой реакции свет не играет роли катализатора, так как энергия его оказывается накопленной в образовавшихся продуктах.

Как неоднократно указывалось на предыдущих страницах, при катализитических процессах общее количество энергии реакционной системы остается неизменным; при фотохимических же реакциях количество энергии изменяется. Есть много оснований полагать, что действие света по существу не отличается от действия часто-переменных токов,— и в том и в другом случае происходит легкий электролиз. Такое предположение вполне согласуется с Максуэллевской электромагнитной теорией света. Вальтеру Лёбу<sup>238) в 239)</sup> удалось, вызывая тихий разряд в атмосфере влажного углекислого газа, получить формальдегид и перекись водорода.

Судя по опытам Мура и Уэбстера<sup>287</sup>), образование формальдегида обусловлено действием находящегося в хлоропласте железа, роль же хлорофилла сводится к поглощению световой энергии. Альдегид, получающийся из самого хлорофилла, несомненно является продуктом окисления одной из составных частей пигмента — именно спирта фитолы.

### Свертывание крови.

В процессе свертывания крови принимает участие целый ряд различных факторов. Согласно Моравитцу<sup>269</sup>), в циркулирующей крови находится особое вещество — тромбоген; под влиянием содержащегося в тканях и в форменных элементах крови энзима — тромбокиназы тромбоген превращается в протромбазу. Последняя переводится солями кальция в новый энзим — тромбазу. Тромбаза, наконец, действует на фибриноген и превращает его в фибрин. В противоположность Моравитцу, Нольф<sup>278</sup>) рассматривает процесс свертывания крови как результат взаимодействия трех коллоидальных протеинов, при участии ионов кальция. Этими протеинами являются тромбоген, тромбозим и фибриноген. Как фибрин, так и тромбаза состоят из всех трех этих протеинов, отличаясь лишь относительным содержанием каждого из них. Нерастворимость фибрина обусловлена большим содержанием фибриногена. Тромбозим представляет собою протеолитический энзим, и явление коагуляции крови является первой фазой его действия; во второй фазе происходит известное под названием „фибринолиз“ разжижение кровяного сгустка. Нам приходится здесь ограничиться лишь этим кратким изложением интересной работы Нольфа, отсылая читателя для более подробного ознакомления к оригинальному труду.

Следует также упомянуть об очень важной работе Реттгера<sup>217</sup>). Этот автор установил, что „фибрин-фермент“ не разрушается при нагревании и количественно входит в состав конечных продуктов реакции. Поэтому нельзя его причислить к истинным энзимам, а тем самым и рассмотрение вопроса о механизме свертывания крови, несмотря на весь его интерес, не может войти в задачи настоящей монографии.

### Спиртовое брожение.

Чтобы закончить эту главу, мы упомянем о тех довольно многочисленных случаях, когда известное вещество разлагается целым рядом энзимов, действующих последовательно. При этом продукты, образованные каждым предшествующим энзимом, служат субстратом для последующего. Одним из таких процессов является, как показали Бухнер и Мейзенхаймер<sup>92)</sup>, алкогольное брожение сахара. Первоначально авторы думали, что одним из промежуточных веществ при сбраживании сахара является молочная кислота, разлагаемая далее энзимом „лактацидазой“. В последнее время, однако, они пришли к заключению, что таким промежуточным веществом является не молочная кислота, а диокси-ацетон, так как молочная кислота не сбраживается дрожжами. В животном организме главным промежуточным веществом при разложении сахара, повидимому, является глицериновый альдегид, но дрожжами он сбраживается значительно труднее, чем диокси-ацетон. Вообще ход разложения сахара еще далеко не выяснен. Ряд ценных сведений по этому вопросу можно найти в монографии Хардена „Спиртовое брожение“.

В работе Бухнера и Мейзенхаймера приводится, между прочим, интересное с точки зрения общей теории катализа наблюдение. Оказалось, что в растворе глюкозы, хранившейся в течение пяти лет в запаянной трубке, нельзя было обнаружить никаких следов образования углекислого газа или алкоголя.

### Гидролиз генцианазы.

Интересный случай представляет собою изученный Буркело и Эриссэ<sup>72)</sup> энзиматический гидролиз генцианазы — полисахарида, состоящего из двух молекул глюкозы и одной молекулы фруктозы. Под влиянием инвертазы от генцианазы отщепляется фруктоза. Оставшаяся бигексоза может теперь быть расщеплена эмульсином (вернее той смесью энзимов, которая получается из горьких миндалей). Ясно, что при одновременном прибавлении инвертазы и эмульсина мы сразу получим полный гидролиз. Повидимому такая комбинация энзимов содержится в соке гриба *Aspergillus*; если бы

не знать механизма только что описанного постепенного гидролиза, то можно было бы предполагать, что в соке *Aspergillus* находится только один специфический энзим — генцианаза. Армстронг и Хортон<sup>24)</sup> недавно показали, что получаемый из горьких миндалей эмульсин содержит три отдельных энзима — во-первых, лактазу, во-вторых,  $\beta$ -глюказу, расщепляющую  $\beta$ -глюкозиды, например салицин, и, наконец, энзим, расщепляющий амигдалин на глюкозу и выделенный Э. Фишером амигдо-нитрил-глюкозид.

### Гидролиз раффинозы.

Раффиноза состоит из глюкозы, фруктозы и галактозы. Фишер и Линднер<sup>146)</sup> установили, что для полного гидролиза ее требуется последовательное действие нескольких энзимов. Согласно Армстронгу и Гловеру<sup>28)</sup>, если гидролизировать раффинозу кислотой или инвертазой, то она распадается на фруктозу и мелибиозу, тогда как под влиянием лактазы „эмульсина“ раффиноза расщепляется на тростниковый сахар и галактозу (ср. Нейберг<sup>27)</sup>).

### Гидролиз крахмала.

Превращение крахмала в глюкозу вызывается последовательным действием трех энзимов. Амилаза переводит крахмал в декстрины, эти в свою очередь превращаются декстриназой в мальтозу, которая, наконец, расщепляется мальтазой на две молекулы глюкозы.

Впрочем последние работы Макенна<sup>245)</sup> и Вооля и Глими<sup>402)</sup> заставляют думать, что предположение о существовании этих трех отдельных энзимов недостаточно обосновано.

### Протеокластические системы.

Аналогичные явления мы встречаем при расщеплении белков в пищеварительном канале: пепсин превращает белки в альбумозы и пептоны, эти расщепляются трипсином на еще более мелкие комплексы полипептидного характера, а эрепсин заканчивает процесс, разбивая полипептиды на отдельные составляющие их аминокислоты.

### Энзимы, расщепляющие аргинин.

Косеель и Дэкин<sup>221)</sup> выделили из печени энзим, обладающий способностью разлагать аргинин на мочевину и аминовалерьяновую кислоту. Аргинин часто встречается в прорастающих семенах растений, особенно тех, которые содержат большие количества запасного белка — например, в семенах лупина. Повидимому аргинин является здесь продуктом гидролиза протеинов. Отщепляющаяся от аргинина мочевина превращается другим энзимом — уреазой — в аммиак. Уреаза была найдена Такеуши<sup>239)</sup> в семенах сои — растения того же класса, что и лупин.

### Общие выводы.

Организм при помощи энзимов оказывается в состоянии при обычной температуре и невысоких концентрациях щелочи или кислоты проводить такие реакции, которые в отсутствии энзимов удается вызвать только при высокой температуре или при помощи энергичных химических реагентов.

Тщательное изучение энзиматических реакций приводит к заключению, что они подчиняются обычным законам катализа. Некоторые различия между действием энзимов и неорганических катализаторов зависят от коллоидальной природы энзимов; благодаря коллоидальному состоянию катализатора энзиматическая реакция протекает в гетерогенной системе; кроме того приходится принимать во внимание влияние поверхностного натяжения.

Энзимы очень чувствительны к повышению температуры; при нагревании все энзимы с большей или меньшей скоростью разрушаются; этим обусловлено существование так называемого „температурного оптимума“. Разрушение при нагревании вероятно зависит от коллоидальной природы энзимов.

Насколько мы знаем, все катализируемые энзимами реакции принадлежат к числу обратимых. Так как обычно при опытах реакция ведется в присутствии большого избытка воды, то положение равновесия, достигаемое под влиянием энзима, лежит очень близко от состояния полного гидролиза. На основании обратимости реакций можно заключить, что энзимы обладают и синтезирующей способностью.

Имеются указания на то, что соединение энзима с субстратом, принимаемое обычно за первую стадию действия энзима, происходит по типу адсорбционных соединений. Можно поэтому предполагать, что действие энзима проявляется на его поверхности; здесь реагирующие вещества накапливаются, приходят в более тесное соприкосновение между собою и, благодаря повышению их концентрации, согласно закону действия масс, скорость реакции значительно возрастает. Остается еще нерешенным вопрос, происходит ли на какой-нибудь стадии процесса химическое соединение между энзимом и субстратом.

Непосредственно экспериментальным путем доказано, что энзимы могут проявлять свое действие в такой среде, в которой они совершенно нерастворимы; в этих случаях реакция может разыгрываться только на поверхности частиц энзима.

Участием в энзиматических процессах таких факторов, как адсорбция, поверхностная энергия и т. д., обусловлен тот факт, что ряд законов, которым подчиняется течение энзиматических реакций, выражается в виде экспоненциальных (показательных) формул.

Большую роль в изменении активности энзима в течение вызываемой им реакции играет аутокаталитический — как положительный, так и отрицательный. Этим изменением активности главным образом и объясняется, почему, даже если вести реакцию в присутствии избытка воды, уравнение скорости этой реакции отличается от обычного уравнения мономолекулярных реакций.

Другой причиной, изменяющей активность энзима, является вытеснение субстрата с поверхности энзима другими сильно адсорбируемыми веществами или продуктами энзиматической реакции.

---

## ЛИТЕРАТУРНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ.

1. Abderhalden, E. und Gigon, A. Weiterer Beitrag zur Kenntnis des Verlaufs der fermentativen Polypeptidspaltung. *Zeitschr. physiol. Chemie*, **53**, 251 (1907).
2. Abderhalden, E. und G. Kapfberger. Serologische Studien mit Hilfe der optischen Methode. XI. Parenterale Zufuhr von Kohlenhydraten. *Zeit. physiol. Chemie*, **69**, 23 (1910).
3. Abderhalden, E. und H. Pringsheim. Beitrag zur Technik des Nachweises intracellulärer Fermente. *Zeit. physiol. Chem.* **65**, 180 (1910).
4. Abderhalden, E. u. P. Rona. Das Verhalten von Leucylphenylalanin u. s. w. gegen Presssaft der Leber vom Rinde. *Zeit. physiol. Chem.* **49**, 31 (1906).
5. Abderhalden, E. u. Schittenhelm, A. Ueber den Nachweis peptolytischer Fermente. *Zeit. physiol. Chem.* **61**, 421 (1909).
6. Abderhalden, E. u. E. Steinbeck. Beitrag zur Kenntnis der Wirkung des Pepsins und der Salzsäure. *Zeit. physiol. Chem.* **68**, 293 (1910).
7. Abderhalden, E. u. E. Steinbeck Weitere Untersuchungen über die Verwendbarkeit des Seidenpeptons zum Nachweis peptolytischer Fermente. *Zeit. physiol. Chem.* **68**, 312 (1910).
8. Abel, E. Zwischenreaktionskatalyse. *Zeit. f. Elektrochem.* **13**, 355 (1907).
9. Abel, E. Kinetik der Katalyse der Wasserstoffsuperoxyd-Thiosulfat-Reaktion. *Sitz.-Ber. K. K. Akad. Wien. Math. Wissensch.* **116**, 1145 (1907).
10. Abel, E. Ueber katalytische Reaktionsauslese. *Zeit. Elektrochem.* **18** 705 (1912).
11. Aggazzotti, A. Osservazioni ultramikroskopiche sui processi fermentativi. *Zeit. f. allgem. Physiol.* **7**, 62 (1907).
12. Alexander, J. r. Some colloid-chemical aspects of digestion, with ultramicroscopic observations. *Amer. Chem. J.* **32**, 680 (1910).
13. Armstrong, E. F. Studies in enzyme-action. The rate of the change conditioned by sucrolytic enzymes and its bearings on the law of mass-action. *Proc. Roy. Soc.* **73**, 500 (1904).
14. Armstrong, E. F. The influence of the products of change on the rate of change conditioned by sucrolytic enzymes. *Proc. Roy. Soc.* **73**, 516 (1904).
15. Armstrong, E. F. The sucrolytic action of acids as contrasted with that of enzymes. *Proc. Roy. Soc.* **73**, 526 (1904).

16. Armstrong, E. F. The synthetic action of acids contrasted with that of enzymes. Synthesis of maltose and isomaltose. Proc. Roy. Soc. **76**, B, 529 (1905).
17. Armstrong, E. F. The simple carbohydrates and the glucosides. 2-e изд. Longmans, London. 1912.
18. Armstrong, E. F. Enzymes. Chemical World. 1913.
19. Armstrongs, E. F. & H. E. The nature of enzymes and of their action as hydrolytic agents. Proc. Roy. Soc. **86**, B, 561 (1913).
20. H. E. Armstrong. Presidential address to Chemical Section. British Association Reporte. 1885.
21. Armstrong, E. F. Electrolytic conduction in relation to molecular composition, valency etc. Proc. Roy. Soc. **40**, 289 (1886).
22. Armstrong, H. E. The terminology of hydrolysis, especially as affected by enzymes. Tran. Chem. Soc. **57**, 528 (1890).
23. Armstrongs, H. E. & E. F. The nature of enzymes. Proc. Roy. Soc. **79**, B, 365 (1907).
24. Armstrongs, H. E. & E. F. and E. Horton. Studies on enzyme action. XII. Emulsin. Proc. Roy. Soc. **80**, B, 321 (1908).
25. Они же. The enzymes of emulsin. Prunase - the correlate of prunasin. Proc. Roy. Soc. **85**, B, 359 (1912).
26. Они же. Variations in *Lotus corniculatus* and *Trifolium repens* (cyanofloric plants) Proc. Roy. Soc. **86**, B, 269 (1913).
27. Armstrong, H. E. Benjamin, M. S. and E. Horton. Urease a selective enzyme. II. Observations on accelerating and inhibitive agents. Proc. Roy. Soc. **86**, B, 328 (1913).
28. Armstrong, H. E. and W. H. Glover. The hydrolysis of raffinose. Proc. Roy. Soc. **80**, B, 312 (1908).
29. Armstrong, H. E. and H. W. Gosney. Studies in enzyme action. XXII. Lipase. IV. The correlation of synthetic and hydrolytic activity. Proc. Roy. Soc. **88**, B, 176 (1914).
30. Armstrong, H. E. and E. Horton. Enzymes of the emulsin type. Proc. Roy. Soc. **82**, B, 349 (1910).
31. Arrhenius, S. Immunochemistry. New York. The Macmillan Company. 1907.
32. Arthus, M. Nature des enzymes. Thèse. Paris. 1896.
33. Ayrton, B. The activation of pankreatic juice. Quarterly J. of experim. physiol. **2**, 207 (1909).
34. Bach, A. Recherches sur les ferment réducteurs. Arch. Sc. phys. Génève. **32**, 27 (1911).
35. Bach et Chodat. Ber. d. deutsch. chem. Ges. **36**; Recherches sur les ferment oxydants Arch. d. sc. phys. et natur. Génève. **37**, 477 (1903).
36. Bankroft, W. D. Contact catalysis. J. Phys. Chem. **21**, 22 (1917—1918).
37. Bang, I. Untersuchungen über Diastasen. Bioch. Zeit. **32**, 417 (1911).
38. Barendrecht, H. P. Enzymwirkung. Zeit. physik. Chem. **49**, 456 (1904).

39. Bardger, G. and W. W. Starling. Blue adsorption compounds of iodine. Part I. Starch, saponin and cholalic acid. *Trans. Chem. Soc.* **101**, 1394 (1915).
40. Bayliss, W. M. The kinetiks of tryptic action. *Arch. des Sc. Biol.* **11**, 261 (1904).
41. Он же. On some aspects of adsorption phenomena etc. *Bioch. J.* **1**, 175 (1906).
42. Он же. Researches on the nature of enzyme action. I. On the causes of the rise in electrical conductivity under the action of trypsin. *J. Phys.* **36**, 221 (1907).
43. Он же. Ueber die Adsorption und ihre Beziehung zur Enzymwirkung. *Kolloid-Zeit.* **3**, 224 (1908).
44. Он же. The osmotic pressure of congo-red and of some other dyes. *Proc. Roy. Soc.* **81**, B, 269 (1909).
45. Он же. On adsorption as preliminary to chemica action. *Proc. Roy. Soc.* **64**, B, 81 (1911).
46. Он же. Synthetic properties of antiemul-in. *J. Phys.* **43**, 455 (1912).
47. Он же. The synthetic action of enzymes. *J. Phys.* **46**, 236 (1913).
48. Он же. The action of insoluble enzymes. *J. Phys.* **50**, 85 (1915).
49. Он же. Enzymes and surface action. *Arch. Neerl. de physiol.* **2**, 621 (1919).
50. Bayliss, W. M. and E. H. Starling. The mechanism of pancreatic secretion. *J. Physiol.* **28**, 325 (1902).
51. Они же. The proteolytic activities of the pancreatic juice. *J. Phys.* **30**, 61 (1903).
52. Они же. On the relation of enterokinase to trypsin. *J. Phys.* **32**, 129 (1905).
53. Bearn, A. R. and Kramer, W. On zymoids. *Bioch. J.* **2**, 174 (1907).
54. Bejerink, M. W. Личное сообщение автора.
55. Beitzke, H. und O. Neuberg. Zur Kenntniss der Antifermen. *Virch. Arch.* **183**, 169 (1906).
56. Они же. Zur Frage der synthetischen Wirkung der Antifermen. *Zeit. f. Imm.-Forsch.* **2**, 645 (1909).
57. Bemmelen, J. M. van. Die Absorption. *Ges. Abhandl. Dresden.* 1910.
58. Benson, R. and G. Wells. The study of autolysis by physico-chemical methods. *J. Biol. Chem.* **8**, 61 (1910).
59. Berczeller, L. Ueber die Löslichkeit der Pankrea-lipase. *Bioch. Zeit.* **34**, 170 (1911).
60. Berthelot, M. et Péan de Saint Gilles. Recherches sur les affinités. De la formation et de la décomposition des éthers. *Ann. de chimie et de phys.* **65**, 385 (1862).
61. Bertrand, G. Sur les rapports qui existent entre la constitution chimique des composés organiques et leur oxydabilité sous l'influence de la laccase. *Compt. rend.* **122**, 1132 (1896).
62. Он же. Sur l'intervention du manganèse dans les oxydations provoquées par la laccase. *Compt. rend.* **124**, 1032 (1897).

63. Он же. Le dosage des sucres réducteurs. *Bull. Soc. Chim. Paris.* **35**, 1285 (1906).
64. Он же. Les fermentes solubles ou diastases. *Revue scientifique.* **47** 609 (1909).
65. Berzelius, I. I. *Lehrb. der Chemie.* 3-e. 1837.
66. Bierry, H. Du rôle des électrolytes dans les actions diastatiques. *J. de phys. et path. gén.* **40**, 250 (1912).
67. Bierry, H., Gaja et V. Henry. Inactivité amyloytique du suc pancréatique dialysé. *Compt. rend. Soc. Biol.* **60**, 479 (1906).
68. Blackman, F. F. Optima and limiting factors. *Ann. of Botany.* **19**, 281 (1900).
69. Bodenstein, M. Gasreaktionen in der chemischen Kinetik. V. Allmähliche Vereinigung von Knallgas. *Zeit. physik. Chem.* **29**, 665 (1899).
70. Bourquelot, E. Sur l'hydrolyse par les fermentes solubles des hydrates du carbone à poids moléculaires élevés. *Compt. Rend. Soc. Biol.* **54**, 1140 (1902).
71. Bourquelot et M. Bridel. Synthèse des glucosides d'alcools à l'aide de l'emulsion et réversibilité des actions fermentaires. *Ann. de chim. et phys.* **28**, 145 (1913).
72. Bourquelot et H. Hérissey. Action des fermentes solubles et de la levure haute sur le gentioïose. *Compt. Rend.* **185**, 399 (1902).
73. Bradley, H. Some lipase reactions. *J. Biol. Chem.* **8**, 251 (1910).
74. Он же. The problem of enzyme synthesis. Lipase and fat of animal tissues. *J. Biol. Chem.* **13**, 407 (1913).
75. Он же. The problem of enzyme synthesis IV. Lactase of the mammary gland. *J. Biol. Chem.* **13**, 431 (1913).
76. Bradley, H. and E. Kellersberger. The problem of enzyme synthesis II. Diastase and glycogen of animal tissues. *J. Biol. Chem.* **13**, 419 (1913).
77. Они же. The problem of enzyme synthesis. III. Diastase and starch of plant tissues. *J. Biol. Chem.* **13**, 425 (1913).
78. Bredig, G. und K. Fajans. Zur Stereochemie der Katalyse. *Ber. Deutsch. chem. Oes.* **41**, 752 (1908).
79. Bredig, O. und P. Fiske. Durch Katalysatoren bewirkte assymetrische Synthese. *Bioch. Zeit.* **46**, 7 (1912).
80. Bredig, G. und R. Müller von Berneck. Ueber anorganische Fermente I. Ueber Platin-Katalyse und die chemische Dynamik des Wasserstoffsuperoxyds. *Zeit. physik. Chem.* **31**, 258 (1899).
81. Bredig, G. und F. Sommer. Anorganische Fermente. V. Die Schardingersche Reaktion und ähnliche enzymartige Katalysen. *Zeit. physik. Chem.* **70**, 304 (1910).
82. Brissemaire et R. Combès. L'action physiologique de quelques nitriles. *C. R. Soc. Biol.* **61**, 423 (1906).
83. Brode, J. Katalyse bei der Reaktion zwischen Wasserstoffperoxyd und Jodwasserstoff. *Zeit. physik. Chem.* **37**, 257 (1901).
84. Brown, A. Enzyme-action. *Trans. Chem. Soc.* **81**, 373 (1902).
85. Он же. Laboratory studies for brewing students. London, 1904.

86. Brown, H. and T. Glendinning. The velocity of starch hydrolysis by diastase with some remarks on enzyme-action. *Trans. Chem. Soc.* **81**, 388 (1902).
87. Brown, H. and J. Heron. Contributions to the history of starch and its transformations. *Trans. Chem. Soc.* **35**, 596 (1879).
88. Buchner und H. Haehn. Ueber das Spiel der Enzyme im Hefepresssaft. *Biochem. Zeit.* **19**, 191 (1909).
89. О и же. Ueber die Antiprotease im Hefepresssaft. *Bioch. Zeit.* **26**, 171 (1910).
90. Buchner, E. und M. Hahn. Die Zymasegärung. München u. Berlin 1903.
91. Buchner, E. und F. Klatte. Ueber das Ko-Enzym des Hefepresssaftes. *Bioch. Zeit.* **8**, 520 (1908).
92. Buchner, E. und J. Meisenheimer. Die chemischen Vorgänge bei der alkoholischen Gärung. IV. *Mitt. Ber. d. d. chem. Ges.* **33**, 1773 (1910).
93. Cathcart, E. On the antitryptic action of normal serum. *J. Physiol.* **31**, 497 (1904).
94. Cesana, G. Contributo allo studio ultramikroskopico dei processi catalitici. *Arch. di Fisiol.* **11**, 130 (1913).
95. Ильинников. Энтерокиназа. Диссерт. Петербург 1899.
96. Chik and C. Martin. On the „heat coagulation“ of proteins. *J. Physiol.* **40**, 404 (1910).
97. Clément et Désormes. Théorie de la fabrication de l'acide sulfurique. *Ann. de Chimie.* **59**, 329 (1806).
98. Coca, A. Synthesis by antiemulsin. *Zeit. f. Imm.-forsch.* **11**, 1 (1907).
99. Cole, S. The influence of electrolytes on the action of amilolytic ferment. *J. Physiol.* **30**, 202 (1904).
100. О и же. The influence of electrolytes on invertin. *J. Physiol.* **30**, 281 (1904).
101. Couvreur, E. L'action du lab, est-elle un dédoublement? *C. R. Soc. Biol.* **69**, 579 (1910).
102. Czyblarz, E. und O. von Fürth. Ueber tierische Peroxydase. *Beitr. chem. Physiol. u. Path.* **10**, 358 (1907).
103. Dakin, H. The hydrolysis of optically inactive esters by means of enzymes. Part I. The action of lipase upon esters of mandelic acid. The resolution of inactive mandelic acid. *J. Physiol.* **30**, 253 (1904).
104. Dakin, H. The catalytic action of amino-acids etc. in effecting certain syntheses. *J. Biol. Chem.* **7**, 49 (1909).
105. Dam van. Die Verdauung des Caseins durch Pepsin vom Kalb, Schwein und Rind. *Zeit. physiol. Chem.* **79**, 247 (1912).
106. Данилевский. Органохимическая способность организма. Харьков (1886).
107. Dastre, A. et A. Stassano. Nature de l'action exercée par l'antikinase sur la kinase. Effet d'inhibition. *C. rend. Soc. Biol.* **55**, 633 (1903).
108. Davis, O. The adsorption of iodine by carbon. *Trans. Chem. Soc.* **91**, 1666 (1907).

109. Delezenne, C. Activation du suc pancréatique par les sels de calcium. *C. rend. Soc. Biol.* **57**, 476 (1905).
110. Denham, H. Zur Kenntniss der Katalyse in heterogenen Systemen. *Zeit. physik. Chem.* **72**, 641 (1910).
111. Deville, H., S-t Claire et Debray, H. Sur une propriété nouvelle du rhodium métallique. *Compt. Rend.* **78**, 1782 (1874).
112. Dietz, W. Ueber eine umkehrbare Fermentreaktion im heterogenen System. Esterbildung und Esterverscifung. *Zeit. physiol. Chem.* **52**, 279 (1907).
113. Donnan, F. and J. Barker. Exper. investigation of Gibbs' thermodynamical theory of interfacial concentration in the case of an air-water interface. *Proc. Roy. Soc.* **85**, A, 557 (1911).
114. Dony-Henault, O. Contribution à l'étude méthodique des oxydases. 2-e mémoire. *Bull. de la classe des sciences, Acad. Roy. de Belgique.* **105** (1908).
115. Dex A. und R. Neidig. Spaltung von  $\alpha$ -und  $\beta$ -Methylglucosiden durch Aspergillus niger. *Biochem. Zeit.* **46**, 397 (1912).
116. Drury, A. The validity of microchemical test for the oxygen place in tissues. *Proc. Roy. Soc.* **88**, B, 166 (1914).
117. Dubrunfaut. Ueber Verwandlung des Stärkemehls in Zucker durch Malz. *J. für tech. u. oekon. Chem.* **9**, 156 (1830).
118. Duclaux, E. Chimie biologique. Paris, 1883.
119. Он же. Etudes sur l'action solaire. 1-e memoire. *Ann. Inst. Pasteur.* **10**, 168 (1896).
120. Он же. Sur l'action des diastases. *Ann. Inst. Pasteur.* **12**, 96 (1898).
121. Он же. Traité de microbiologie. Tome 2. Diastases, Toxines et Venins. Paris 1899.
122. Effront, J. Les enzymes et leurs applications. Paris 1899.
123. Ehrlich, P. Ueber die Beziehungen von chem. Konstitution, Vertheilung und pharmakologischer Wirkung. *Beitr. z. inner. Mediz.* **1**, 645 (1902).
124. Einmeyerling, O. Synthetische Wirkung der Hefemaltase. *Ber. d. d. chem. Ges.* **34**, 600, 2206, 3810 (1901).
125. Ernst, C. Ueber die Katalyse des Knallgases durch kolloidales Platin. *Zeit. physik. Chem.* **37**, 448 (1901).
126. Euler, H. Fermentative Spaltung von Dipeptiden. *Zeit. physiol. Chem.* **51**, 213 (1907).
127. Он же. Gleichgewicht und Endzustand bei Enzymreaktionen. *Zeit. physiol. Chem.* **52**, 146 (1907).
128. Он же. Allgemeine Chemie der Enzyme. *Erg. der Physiol.* **6**, 187 (1907).
129. Он же. Zur Nomenklatur der Enzyme. *Zeit. physiol. Chem.* **74**, 13. (1911).
130. Euler H. und Beth af Uggla. Unters. über die chem. Zusammensetzung und Bildung der Enzyme. I. Der Temperaturkoefficient der Invertase. *Zeit. physiol. Chem.* **65**, 124 (1910).
131. Euler, H. und I. Bolin. Zur Kenntniss biologisch wichtiger Oxydationen. *Zeit. physiol. Chem.* **57**, 80 (1908).

132. Euler, H. und S. Kullberg. Versuche zur Reindarstellung der Invertase. *Zeit. physiol. Chem.* **73**, 335 (1911).
133. Euler, H. u. K. Melander. Zur Kenntniss der Invertase. *Zeit. physiol. Chem.* **69**, 152 (1910).
134. Evans, C. On the catalytic decomposition of hydrogen peroxide by the catalase of blood. *Biochem. J.* **2**, 133 (1907).
135. Ewart, A. On the supposed extracellular photosynthesis by chlorophyll. *Proc. Roy. Soc.* **80**, B. 30 (1908).
136. Fajans, K. Ueber die stereochemische Spezifität der Katalysatoren. Aktivierung durch assymmetrische Katalyse. *Zeit. physik. Chem.* **73**, 25 u. **76**, 232 (1910).
137. Falk, K. Specificity of lipase action. *J. Amer. Chem. Soc.* **35**, 616 (1913).
138. О и же. A chemical study of enzyme action. *Science.* **47**, 423 (1917).
139. Falk, K. and J. Nelson. The hydrolytic action of some amino-acids and polypeptides on certain esters. *J. Amer. Chem. Soc.* **34**, 828 (1912).
140. Faraday, M. Experimental researches in electricity. VI. On the power of metals and other solids to induce the combination of gaseous bodies. *Phil. Trans.* **1834**, 77.
141. Fenton, H. Oxydation of tartaric acid in presence of iron. *Trans. Chem. Soc.* **65**, 899 (1894).
142. Fischer, E. Einfluss der Konfiguration auf die Wirkung der Enzyme. *Ber. d. d. Chem. Ges.* **27**, 2985, 3479 u. **28**, 1429 (1895).
143. О и же. Bedeutung der Stereochemie für die Physiologie. *Zeit. f. physiol. Chem.* **26**, 60 (1898—1899).
144. Fischer, E. u. E. Abderhalden. Ueber das Verhalten verschiedener Polypeptide gegen Pankreassaf und Magensaft. *Ztschr. f. physiol. Chem.* **46**, 52 (1905).
145. Fischer, E. u. E. Armstrong. Synthese einiger neuer Disaccharide. *Ber. d. d. Chem. Ges.* **35**, 3144 (1902).
146. Fischer, E. u. P. Lindner. Ueber die Enzyme von *Shizosaccharomyces octosporus* u. *S. Marxianus*. *Ber. d. d. Chem. Ges.* **28**, 984 (1895).
147. Fraenkel, S. u. M. Hamburg. Ueber Diastase. I. Versuche zur Herstellung von Reindiastase und deren Eigenschaften. *Beitr. chem. Physiol. u. Pathol.* **8**, 389 (1906).
148. Freundlich, H. Kapillarchemie. Leipzig. 1909.
149. Funk, C. u. A. Nieman. Ueber die Filtration von Lab und Pepsin. *Zeit. physiol. Chem.* **68**, 263 (1910).
150. Fürth, O. u. J. Schütz. Ueber den Einfluss der Galle auf die Fett- und Eiweißspaltenden Fermente der Pankreas. *Beitr. Chem. physiol. u. Pathol.* **9**, 28 (1907).
151. Gay, F. and B. Robertson. A comparison of paranuclein split from casein with a synthetic paranuclein, based on immunity reactions. *J. Biol. Chem.* **12**, 233 (1912).
152. Geffken, G. Beiträge zur Löslichkeitsbeeinflussung. *Zeit. physik. Chem.* **49**, 257 (1904).

153. Gibbs, W. Equilibrium of heterogeneous substances. *Trans. Conn. Acad. of Scienc.* 1878.
154. Glaessner, K. Ueber die Vorstufen der Magenfermente. *Beitr. Chem. Physiol. u. Pathol.* 1, 1 (1902).
155. Gramenitzky, M. Der Einfluss verschiedener Temperaturen auf die Fermente und die Regeneration fermentativer Eigenschaften. *Zeit. physiol. Chem.* **69**, 286 (1910).
156. Grützner, P. Ueber eine neue Methode Pepsinmengen kolorimetrisch zu bestimmen. *Pflügers Arch.* **8**, 452 (1874).
157. Haemäläinen, J. u. I. Sjöström. Ueber den Umfang der Glykuronsäurepaarung bei enzymimmunisierten Kaninchen. *Skand. Arch. Physiol.* **24**, 113 (1910).
158. Hamburger, W. Eine chemisch-biologische Untersuchung über die Beziehungen des Pepsins zum sogenannten Antipepsin. *J. Exper. Med.* **14**, 335 (1911).
159. Hamill, J. On the mechanism of protection of intestinal worms and its bearing on the relation of enterokinase to trypsin. *J. Physiol.* **33**, 476 (1905).
160. Hamsik, A. Ueber den Einfluss der Galle auf die durch die Pankreas und Darmlipase bewirkte Fettsynthese. *Zeit. physiol. Chem.* **65**, 232 (1910).
161. Он же. Zur synthetisierenden Wirkung der Endoipasen. *Zeit. physiol. Chem.* **90**, 489 (1914).
162. Hanriot, M. Sur la reversibilité des actions diastatiques. *Compt. rend. Soc. Biol.* **53**, 70 (1901).
163. Harden, A. Alcoholic fermentation. London. 1915.
164. Harden, A., J. Thompson and W. Young. Apparatus for collecting and measuring the gases evolved during fermentation. *Bioch. J.* **5**, 230 (1911).
165. Harden, A. and W. Young. The alcoholic ferment of yeast-juice. *Proc. Roy. Soc.* **77**, B. 405 (1906).
166. Он же. The co-ferment of yeast-juice. *Proc. Roy. Soc.* **78**, B. 369 (1906).
167. Он же. The function of phosphates in the fermentation of glucose by yeast-juice. *Proc. Roy. Soc.* **80**, B. 299 (1908).
168. Он же. The fermentation of glucose, mannose and fructose by yeast-juice. *Proc. Roy. Soc.* **81**, B. 336 (1909).
169. Он же. The function of phosphates in alcoholic fermentation. *Proc. Roy. Soc.* **82**, B. 321 (1910).
170. Hardy, W. On the coagulation of proteid by electricity. *J. Physiol.* **24**, 288 (1899).
171. Он же. A preliminary investigation of the conditions which determine the stability of irreversible hydrosols. *Proc. Roy. Soc.* **66**, 110 (1899).
172. Он же. Colloidal solutions. The globulins. *J. Physiol.* **33**, 251 (1905).
173. Он же. Croonian lecture: on globulins. *Proc. Roy. Soc.* **79**, B. 413 (1907).
174. Hata, S. Ueber die Sublimathemmung und die Reaktivierung der Fermentwirkungen. *Bioch. Zeit.* **17**, 156 (1909).

175. Hedin, S. Observations on the action of trypsin. *J. Physiol.* **32**, 468 (1905).
176. Он же. An antitryptic effect of charcoal and a comparison between the action of charcoal and that of the tryptic antibody in the serum. *Biochem. J.* **1**, 484 (1906).
177. Он же. A case of specific adsorption of enzymes. *Biochem. J.* **2**, 112 (1907).
178. Он же. Ueber spezifische Hemmung der Labwirkung und über verschiedene Labenzyme. *Zeit. physiol. Chem.* **74**, 242 (1911).
179. Он же. Die Immunisierung gegen Kalbslab. *Zeit. physiol. Chem.* **77**, 229 (1912).
180. Henry, V. Ueber das Gesetz der Wirkung des Invertins. *Zeit. physiol. Chem.* **39**, 194 (1901).
181. Он же. Lois générales de l'action des diastases. *Thèse*, Paris, 1903.
182. Он же. Recherches physico-chimiques sur les diastases. *Archivio di fisiologia* **1**, 299 (1904).
183. Он же. Theoretische und experimentelle Untersuchungen über die Wirkungen der Enzyme usw. *Zeit. physik. Chem.* **51**, 19 (1905).
184. Henri V. et Larguier des Baneels. Lois d'action de la trypsine sur la gelatine. *Compt. Rend. Soc. Biol.* **55**, 563 (1903).
185. Henriques, V. und J. Gjaldbaek. Untersuchung über die Plasteinbildung. *Zeit. physiol. Chem.* **71**, 485 (1911).
186. Henriques, V. und J. Gjaldbaek. Ueber hydrolytische Spaltungen von Proteinen durch Eiwirkung von Pepsin, Trypsin, Säuren und Alkalien. *Zeit. physiol. Chem.* **75**, 363 (1911).
187. Henriques, V. und C. Hansen. Ueber die Eiweissynthese im Tierkörper. *Zeit. physiol. Chem.* **43**, 417 (1904).
188. Henry, P. Ueber die wechselseitige Umwandlung der Laktone und der Oxysäuren. *Zeit. physik. Chem.* **10**, 96 (1892).
189. Henry, T. and J. Auld. On the probable existance of emulsin in yeast. *Proc. Roy. Soc.* **76**, B, 568 (1905).
190. Herzog, R. Physikalische Chemie der Fermente. (Oppenheimer—„Die Fermente und ihre Wirkungen“. Leipzig 1910).
191. Herzog, R. und H. Meier. Zur Kenntniss der Oxydasewirkung. *Zeit. physiol. Chem.* **73**, 258 (1911).
192. Hildebrand, H. Weiteres über hydrolytische Fermente, deren Schicksal und Wirkungen, sowie über Fermentfestigkeit und Hemmung der Fermentationen im Organismus. *Virch. Arch.* **131**, 5, u. **184**, 325 (1893).
193. Hill, A. Croft. Reversible Zymohydrolysis. *Trans. Chem. Soc.* **73**, 634 (1898).
194. Он же. Synthetic action on dextrose with pancreatic Ferment. *J. Physiol.* **28** (1902).
195. Он же. The reversibility of enzyme or ferment action. *Trans. Chem. Soc.* **83**, 578 (1903).
196. Hill, A. V. A new form of differential mikro-calorimeter for the estimation of heat production in physiological, bacteriological or ferment actions. *J. Physiol.* **43**, 261 (1911).

197. Hirayama, K. Einige Bemerkungen über proteolytische Fermente. *Zeit. physiol. Chem.* **65**, 290 (1910).
198. Hiadik, J. Ueber Vacuumverdampfung. *Biochem. Zeit.* **28**, 29 (1910).
199. Hudson, C. The inversion of sucrose by invertase. *Amer. Chem. J.* **30**, 1160 (1908).
200. Iscovesco, H. Etude sur les constituantes colloïdes du suc pancréatique. *Compt. Rend. Soc. Biol.* **60**, 539 (1906).
201. Он же. Studien über Kataphorese von Fermenten und Kolloiden. *Biochem. Zeit.* **24**, 53 (1910).
202. Jacoby, M. Ueber das Aldehyde oxydierende Ferment der Leber und Nebenniere. *Zeit. physiol. Chem.* **30**, 135 (1900).
203. Jaeger d.e. Erklärungsversuch über die Wirkungsart der ungeformten Fermente. *Virch. Arch.* **121**, 182 (1890).
204. Johnson-Blohm, G. Die Einwirkung einiger kolloiden Substanzen auf die Hemmung der Enzymwirkungen. *Zeit. physiol. Chem.* **82**, 178 (1912).
205. Jalander, Y. Zur Kenntniss der Ricinuslipase. *Biochem. Zeit.* **36**, 435 (1911).
206. Jonge, J. de. L'activation de la lipase pancréatique par les cholates. *Arch. Neerl. de Physiol.* **1**, 182 (1915).
207. Kanitz, A. Ueber Pankreassteapsin und über die Reactionsgeschwindigkeit der mittels Enzyme bewirkten Fettspaltung. *Zeit. physiol. Chem.* **46**, 482 (1905).
208. Kastle, J. The oxydases and other oxygen-catalysts concerned in biological oxydations. *Bull. 59, Hyg. Lab. U. S. Pub. Health and Mar-Hosp. Serv. Washington.*
209. Kastle, J. and A. Loevenhart. On lipase, the fat-splitting enzyme and the reversibility of its action. *Amer. Chem. J.* **24**, 491 (1900).
210. Kaufmann, R. Ueber den Einfluss der Protoplasmagiften auf die Trypsinverdauung. *Zeit. physiol. Chem.* **39**, 434 (1903).
211. Kirchhoff, C. Ueber die Reinigung der Getreidestärke. *Schweiger's J. f. Chemie und Physik.* **14**, 385 (1815).
212. Kjeldahl. Recherches sur le ferment producteur du sucre. *Compt. Rend. des travaux du laboratoire de Carlsberg.* 1879.
213. Klug, F. Untersuchungen über Pepsinverdauung. *Pflügers Arch.* **60**, 43 (1895).
214. Он же. Beiträge zur Pepsinverdauung. *Pflüg. Arch.* **65**, 330 (1897).
215. Он же. Pourquoi les ferments protéolytiques ne digèrent-ils pas l'estomac et l'intestin sur le vivant? *Arch. Intern. de Physiol.* **6**, 297 (1907).
216. Knoblauch, O. Ueber die Geschwindigkeit der Esterbildung und Esterzersetzung. *Zeit. physik. Chem.* **22**, 268 (1897).
217. Koelichen, K. Die chemische Dynamik der Acetonkondensation. *Zeit. physik. Chem.* **33**, 129 (1900).
218. Koelle, M. Weiteres über das Invertin. *Zeit. physiol. Chem.* **29**, 429 (1900).
219. Kondo, K. Ueber synthetische Aminosäurebildung in der Leber. III. Die Bildung körperfremder Aminosäuren. *Biochem. Zeit.* **38**, 407 (1911).

220. Korschun, S. Sind im Labmolekül mehrere functionierende Gruppen anzunehmen? *Zeit. physiol. Chem.* **37**, 366 (1902).
221. Kossei, A. und H. Dakin. Ueber die Arginase. *Zeit. physiol. Chem.* **41**, 321 (1904).
222. Krieble, V. Enzymes: the synthetic and hydrolytic oxynitrilase. *J. Amer. Chem. Soc.* **37**, 2205 (1915).
223. Kühne, W. Erfahrungen und Bemerkungen über Enzyme und Fermente. *Unters. a. d. physiol. Inst. d. Univ. Heidelberg.* **1**, 291 (1878).
224. Kullgren, C. Studien über die Inversion. *Zeit. physik. Chem.* **41**, 407 (1902).
225. Laer, H. van. Nouvelles recherches sur la vitesse de saccharification de l'amidon. *Bull. Acad. Roy. de Belgique.* 1911, 362.
226. Langley, G. On the destruction of ferments in the alimentary canal. *J. Physiol.* **3**, 246 (1886).
227. Langley, J. and J. Edkins. Pepsinogen and pepsin. *J. Physiol.* **7**, 371 (1886).
228. Langmuir, I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. *J. Amer. Chem. Soc.* **38**, 2221 u. **39**, 1848 (1916—17).
229. Он же. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *J. Amer. Chem. Soc.* **40**, 1361 (1918).
230. Leathes, J. Problems in animal metabolism. London 1906.
231. Lebedeff, A. Extraction de la zymase par simple macération. *Ann. Inst. Pasteur.* **26**, 8 (1912).
232. Lewis, W. Die Adsorption und ihre Beziehung zur Gibbschen Theorie. III. Die adsorbierende Quecksilberoberfläche. *Zeit. physik. Chem.* **79**, 129 (1910).
233. Он же. A system of physical chemistry. 3-е изд. 1918.
234. Loeb, J. Elektrolytische Dissoziation und physiologische Wirksamkeit von Pepsin und Trypsin. *Biochem. Zeit.* **19**, 534 (1909).
235. Loeb, W. Zur Kenntniss der Assimilation der Kohlensäure. *Zeit. f. Elektrochem.* **11**, 745 (1905).
236. Он же. Studien über chemische Wirkung der stillen elektrischen Entladung. *Zeit. f. Elektrochem.* **12**, 282 (1906).
237. Loewenhart, A. On the relation of lipase to fat metabolism; Lipogenesis. *Amer. J. Physiol.* **6**, 331 (1902).
238. Он же. Further observations on the action of lipase. *Amer. J. Physiol.* **15** (1905).
239. Loewenhart, A. and G. Pierce. The inhibitory effect of sodium fluoride on lipase. *J. Biol. Chem.* **2**, 409 (1907).
240. Loewenhartz, R. Ueber die Verseifungsgeschwindigkeit einiger Ester. *Zeit. physik. Chem.* **15**, 389 (1894).
241. Loewe, S. Zur physikalischen Chemie der Lipoide. *Biochem. Zeit.* **42**, 150 (1912).
242. Loewi, O. Ueber Eiweißsynthese im Tierkörper. *Arch. f. exper. Path. u. Pharmak.* **48**, 303 (1902).
243. Magnus, R. Zur Wirkungsweise des esterspaltenden Fermentes (Lipase) der Leber. *Zeit. physiol. Chem.* **42**, 149 (1904).

244. Он же. Die Wirkung synthetischer Gallensäuren auf die pankreatische Fettspaltung. Zeit. physiol. Chem. **48**, 376 (1906).
245. Maquenne, L. et E. Roux. Influence de la réaction du milieu sur l'activité de l'amylase et la composition des empois saccharifiées. Compt. Rend. **42**, 124, 1059, 1337 (1906).
246. Mathews, A. and T. Glenn. The composition of invertase. J. Biol. Chem. **9**, 29 (1911).
247. Mellanby, J. and V. Woolley. The ferments of the pancreas, I. The generation of trypsin from trypsinogen by enterokinase. J. Physiol. **45**, 370 (1919).
248. Он же. II. The action of calcium salts in the generation of trypsin. J. Physiol. **46**, 159.
249. Он же. V. The carbohydrate ferments of the pancreatic juice. J. Physiol. **49**, 246 (1915).
250. Mendel, L. and A. Blooij. Some peculiarities of the proteolytic activity of papain. J. Biol. Chem. **8**, 177 (2910).
251. Meyerhof, O. Über Hemmungen von Fermentreaktionen durch indifferente Narkotica. Pflüg. Arch. **157**, 251 (1914).
252. Michaelis, L. Die Adsorptionsaffinitäten des Hefe-Invertins. Biochem. Zeit. **7**, 488 (1909).
253. Он же. Elektrische Ueberführung von Fermenten. II. Trypsin und Pepsin. Biochem. Zeit. **16**, 486 (1909).
254. Он же. Uebersetzungsversuche mit Fermenten III. Die Malzdiastase und Pepsin. Biochem. Zeit. **17**, 231 (1909).
255. Он же. Die elektrische Ladung des Serumalbumins und der Fermente. Biochem. Zeit. **19**, 181 (1909).
256. Michaelis, L. und H. Davison. Die isoelektrische Konstante des Pepsins. Biochem. Zeit. **28**, 1 (1910).
257. Он же. Die Abhängigkeit der Trypsinwirkung von der Wasserstoffionenkonzentration. Biochem. Zeit. **36**, 280 (1910).
258. Он же. Trypsin und Pankreasnukleoprotein. Biochem. Zeit. **30**, 481 (1911).
259. Michaelis, L. und M. Ehrenreich. Die Adsorptionsanalyse der Fermente. Biochem. Zeit. **10**, 283 (1908).
260. Michaelis, L. und P. Ronai. Eine Methode zur Entfernung von Kolloiden aus ihren Lösungen, insbesonders zur Enteiweißung des Blutserums. Biochem. Zeit. **2**, 219 (1906).
261. Он же. Ueber die Löslichkeitsverhältnisse von Albumosen und Fermenten mit Hinblick auf ihre Beziehungen zu Lecitin und Mastix. Biochem. Zeit. **4**, 11 (1907).
262. Он же. Weitere Beiträge zur Methodik der Enteiweißung. Biochem. Zeit. **5**, 365 (1907).
263. Он же. Adsorption des Zuckers. Biochem. Zeit. **16**, 489 (1909).
264. Moore, B. Ueber die Geschwindigkeit der Krystallisation aus überkühlten Flüssigkeiten. Zeit. physik. Chem. **12**, 545 (1893).
265. Moore, B. Enzymes. „Recent advances in Physiology and Biochemistry“, L. Hill, London 1906.

266. Moore, B. and H. Roaf. Direct measurements of osmotic pressure of certain colloids. *Biochem. J.* **2**, 54 (1906).
267. Moore, B. and T. Webster. Synthesis of formaldehyde from carbon dioxide and water by inorganic colloids, acting as transformers of light energy. *Proc. Roy. Soc.* **87**, B, 163 (1913).
268. Morawitz, H. Ueber Adsorption und Kolloidfüllung. *Koll.-chem. Beih.* **1**, 317 (1910).
269. Morawitz, P. Zur Kenntniss der Vorstufen des Fibrinfermentes. *Beitr. Chem. Physiol. u. Pathol.* **4**, 381 (1903).
270. Он же. Die Chemie der Blutgerinnung. *Erg. der Physiol.* **4**, 307 (1905).
271. Munk, I. Ueber die Einwirkung des Wassers und ihre Beziehung zu den fermentativen Spaltungen. *Zeit. physiol. Chem.* **1**, 357 (1878).
272. Nelson, G. and W. Griffin. Adsorption of invertase. *J. Amer. Chem. Soc.* **38**, 1103 (1916).
273. Nelson, J. and W. Vosburg. Kinetics of invertase action. *J. Amer. Chem. Soc.* **39**, 790 (1917).
274. Nernst, W. Theoretische Chemie.
275. Neuberg, C. Zur Kenntniss der Raffinose. Abbau der Raffinose zu Rohrzucker und d-Galaktose. *Biochem. Zeit.* **3**, 519 (1907).
276. Он же. Verhalten von racemischer Glutaminsäure bei der Fäulniss. *Biochem. Zeit.* **18**, 431 (1909).
277. Nicloux, M. Saponification des corps gras. Paris 1906.
278. Nolf, P. Contribution à l'étude de la coagulation du sang. *Arch. Internat. de physiol.* **4**, 165; **6**, 1, 115, 306; **7**, 208, 379, 411 (1906—08).
279. Olfringa, J. Bemerkungen über die Bereitung von Organpresssäften mittels Infusorienerde. *Biochem. Zeit.* **28**, 112 (1910).
280. Ohta, K. Zur Frage der Hitzebeständigkeit von Trypsin und Pepsin. *Biochem. Zeit.* **44**, 472 (1912).
281. Он же. Ueber die Eigenschaft von Kaninchenserum nach der Behandlung mit Emulsin. *Biochem. Zeit.* **54**, 430 (1913).
282. Oker-Bloom, M. Die elektrische Leitfähigkeit und die Gefrierpunkterniedrigung als Indicatoren der Eiweisspaltung. *Skand. Arch. f. Physiol.* **13**, 359 (1902).
283. Onodera, P. On the effects of various substances (electrolytes, non-electrolytes, alkaloids etc.) upon the urease of soy-bean. *Biochem. J.* **9**, 541 (1915).
284. Oppenheimer, C. Die Fermente und ihre Wirkungen. Leipzig, 1909.
285. Osborne, W. Beiträge zur Kenntniss des Invertins. *Zeit. physiol. Chem.* **28**, 399 (1899).
286. Он же. Caseinogen and its salts. *J. Physiol.* **27**, 398 (1901).
287. Ostwald, W. Ueber Oxydationen mittels freien Sauerstoffs. *Zeit. f. physik. Chem.* **34**, 248 (1900).
288. Он же. Lehrbuch der allgemeinen Chemie. Leipzig 1903.
289. Он же. Отзыв о книге Фрейндлиха: „Kapillarchemie und Physiologie“. *Zeit. physik. Chem.* **62**, 512 (1908).
290. Ostwald, W. Grundriss der Kolloidchemie. Dresden 1909.

291. O'Sullivan, G. and F. Thompson. Invertase; a contribution to the history of an enzyme or unorganised ferment. Trans. Chem. Soc. **57**, 834 (1890).
292. Pauli, W. Untersuchungen über physikalische Zustandsänderungen der Kolloide. V. Ueber die elektrische Ladung von Eiweiss. Beitr. Chem. Physiol. u. Pathol. **7**, 531 (1906).
293. Pauli, W. und H. Handowsky. Untersuchungen über physikalische Zustandsänderungen der Kolloide. VIII. Studien am Säureeiweiss. Biochem. Zeit. **18**, 340 (1909).
294. Pavlov, J. und S. Paratschuk. Ueber die ein und demselben Eiweissferment zukommende proteolytische und milchkoagulierende Wirkung verschiedener Verdauungssäfte. Zeit. physiol. Chem. **42**, 415 (1904).
295. Pavy, F. and S. Bywaters. On the governing influence of environment on enzyme action. J. Physiol. **41**, 168 (1911).
296. Payen et Persoz. Mémoire sur la diastase, les principaux produit de ses réactions et leurs applications aux arts industriels. Ann. Chem. et Physique. **53**, 73 (1833).
297. Pekelharing, C. Mitteilungen über Pepsin. Zeit. physiol. Chem. **35**, 8 (1902).
298. Он же. Ein Paar Bemerkungen über Fibrinferment. Biochem. Zeit. **11**, 1 (1908).
299. Pekelharing, C. und W. Ringer. Zur elektrischen Ueberführung des Pepsins. Zeit. physiol. Chem. **75**, 289 (1911).
300. Perrin, J. Mécanisme de l'electrisation de contact et solutions colloides. J. de Chimie. Phys. **2**, 601; **3**, 50 (1904—05).
301. Он же. L'agitation moléculaire et le mouvement brownien. Compt. rend. **146**, 967 (1908).
302. Он же. La loi de Stokes et le mouvement brownien. Compt. rend. **147**, (1908).
303. Он же. L'origine du mouvement brownien. Compt. rend. **147**, 530 (1908).
304. Он же. Die Brownsche Bewegung und die wahre Existenz der Moleküle. Koll.-chem. Beihefte. **1**, 221 (1910).
305. Pfeffer, W. und B. Haansteen. Ueber die Ursachen der Entleerung der Reservestoffe aus Samen. Ber. Sachs. Ges. Wiss. **45**, 421 (1893).
306. Philoche, Ch. Recherches physico-chimique sur l'amylase et la maltase. J. de Chim. Physique. **6**, 212 (1908).
307. Plimmer, R. On the presence of lactase in the intestines of animals and on the adaptation of the intestine to lactose. J. Physiol. **35**, 20 (1906).
308. Porter, A. On the question of the identity of pepsin and rennet. J. Physiol. **42**, 389 (1911).
309. Posnyak, E. Ueber den Quellungsdruck. Koll. chem. Beih. **3**, 417 (1912).
310. Pottevin, II. Sur le mécanisme des actions lipolitiques. Compt. rend. **136**, 767 (1903).
311. Он же. Actions diastatiques réversibles. Formation et dédoublement des éthers-sels sous l'influence des diastases du pancréas. Bull. Soc. Chim. **35**, 693 (1906).

312. Pribram, E. Ueber Diastase. Herstellung von Reindiastase und deren Eigenschaften. Biochem. Zeit. **44**, 293 (1912).
313. Pringsheim, H. Studien über die Spaltung racemischer Aminosäuren durch Pilze. Zeit. physiol. Chem. **65**, 96 (1910).
314. Quincke, G. Die Oberflächenspannung an der Grenze wässriger Kolloidlösungen von verschiedener Konzentration. Drude's Ann. **9**, 1012 (1902).
315. Rakoczy, A. Ueber die milchkoagulierende und proteolytische Wirkung der Rinder- und Kalbsmageninfusionen und des natürlichen Kalbsmagensaftes. Zeit. physiol. Chem. **68**, 421 (1910).
316. Ramsden, W. Separation of solids in the surface-layers of solutions and suspensions. Proc. Roy. Soc. **72**, 156 (1904).
317. Rettger, L. The coagulation of blood. Amer. J. Physiol. **24**, 406 (1909).
318. Ring, M. Einfluss der Verdauung auf das Drehungsvermögen von Serumglobulinlösung. Verh. d. physik. med. Gesell. zu Würzburg. **35**, 13 (1902).
319. Roaf, H. The relations of proteins to crystalloids. I. The osmotic pressure of haemoglobin and the laking of red blood corpuscles. Quart. J. Exper. Physiol. **3**, 75 (1910).
320. Он же. The osmotic pressure of ionizing salts of serum proteins. Quart. J. Exper. Physiol. **3**, 171 (1910).
321. Robertson, R., J. Irvine and M. Dobson. A polarimetric study of the sucroclastic enzymes in Beta vulgaris. Biochem. J. **4**, 258 (1909).
322. Robertson, B. On some chemical properties of casein and their possible relation to the chemical behaviour of other protein bodies, with especial reference to hydrolysis of casein by trypsin. J. Biol. Chem. **2**, 317 (1907).
323. Он же. Note on the synthesis of a protein by the action of pepsin. J. Biol. Chem. **3**, 95 (1907).
324. Он же. On the synthesis of paranuclein through the agency of pepsin, etc. J. Biol. Chem. **5**, 393 (1908).
325. Robertson, B. and C. Schmidt. On the part played by the alkali in the hydrolysis of proteins by trypsin. J. Biol. Chem. **5**, 31 (1908).
326. Röhmann, F. und Schamaine, T. Ueber komplexe Verbindungen von Ferrosalzen, Wasserstoffsuperoxyd und Eiweißstoffen. Ein Beitrag zur Frage nach der Beteiligung des Eisens an biologischen Oxydationen. Biochem. Zeit. **42**, 235 (1912).
327. Rosenheim, O. and J. Shaw-Mackenzie. On pancreatic lipase. I. Accelerating action of haemolytic substances, etc. II. Action of serum. J. Physiol. **40** (1910).
328. Rosenthal, E. Ueber die antiproteolytische Wirkung des Blutserums. Fol. Serol. **6**, 285 (1910).
329. Rosenthaler, L. Durch Enzyme bewirkte assymetrische Synthesen. Biochem. Zeit. **14**, 238 (1908).
330. Rosenthaler, L. Durch Enzyme bewirkte assymetrische Synthesen. II. Biochem. Zeit. **17**, 279 (1909).

331. Rowland, S. A method of obtaining intracellular juices. *J. Physiol.* **27**, 53 (1901).
332. Sachs, J. Ueber die obere Temperaturgrenze der Vegetation. *Flora. Regensburg* 1861.
333. Salkowsky, E. Ueber das Invertin (Invertase) der Hefe. II. *Zeit. physiol. Chem.* **61**, 124 (1909).
334. Schärdinger, F. Ueber das Verhalten der Kuhmilch gegen Methylenblau und seine Verwendung zur Unterscheidung von gekochter und ungekochter Milch. *Zeit. Unters. Nahr. u. Genussmittel.* **5**, 1113 (1902).
335. Schmidt, E. Enzymologische Mitteilungen. *Zeit. physiol. Chem.* **67**, 314 (1915).
336. Schmidt, G. Ueber Adsorption von Lösungen. *Zeit. physik. Chem.* **74**, 689; **77**, 641 (1910).
337. Schmidt-Nielsen, S. und S. Zur Kenniniss der „Schüttelinaktivierung“ des Labs. *Zeit. physiol. Chem.* **60**, 426 (1909).
338. Он же. Zur Kenntniss der „Schüttelinaktivierung“ des Labs. II. *Zeit. physiol. Chem.* **68**, 317 (1910).
339. Schoenbein, G. Ueber einige durch Haarrörchenanziehung des Papiers hervorgebrachten Trennungswirkungen. *Pogg. Ann.* **114**, 275 (1861).
340. Он же. Ueber die katalytische Wirksamkeit organischer Materien und deren Verbreitung in der Pflanzen- und Tierwelt. *J. Pract. Chem.* **89**, 323 (1863).
341. Schryver, S. The photochemical formation of formaldehyde in green plants. *Proc. Roy. Soc.* **82**, B, 226 (1910).
342. Schütz, E. Eine Methode zur Bestimmung der relativen Pepsinmenge. *Zeit. physiol. Chem.* **9**, 577 (1885).
343. Schütz, J. Ueber den Einfluss der Pepsin- und Salzsäuremengen auf die Intensität der Verdauung, speziell bei Abwesenheit freier Salzsäure. *Biochem. Zeit.* **22**, 33 (1909).
344. Siedentopf, H. und R. Zsigmondy. Ueber Sichtbarmachung und Größenbestimmung ultramikroskopischer Teilchen. *Ann. d. Physik.* **10**, 1 (1903).
345. Он же. Ueber Teilchengrößen in Hydrosolen. *Zeit. f. Elektrochem.* **12**, 631 (1906).
346. Sjöqvist, J. Physiologisch-chemische Beobachtungen über Salzsäure. *Skand. Arch. Physiol.* **5**, 277 (1895).
347. Slator, A. The rate of fermentation by growing yeast-cells. *Biochem. J.* **7**, 197 (1913).
348. Slyke, D. and G. Cullen. The mode of action of urease and of enzymes in general. *J. Biol. Chem.* **19**, 141 (1914).
349. Sörensen, S. Etudes enzymatiques. Opt. rend. lab. de Carlsberg. **7**, 1 (1907).
350. Он же. Études enzymatiques. II. Sur la mesure et l'importance de la concentration des ions hydrogènes dans les réactions enzymatiques. *C. R. lab. d. Carlsb.* **8**, 1 (1909); *Biochem. Zeit.* **21**, 131 (1909).
351. Souza, D. de. Protection of trypsin from destruction by heat. *J. Physiol.* **43**, 374 (1911).
352. Spriggs, E. Eine neue Methode zur Bestimmung der Pepsinwirkung. *Zeit. physiol. Chem.* **35**, 456 (1902).

353. Starkenstein, E. Eigenschaften und Wirkungsweise des dia-statischen Fermentes der Warmblüter. Biochem. Zeit. **24**, 191 (1910).
354. Он же. Ueber Fermentwirkung und deren Beeinflussung durch Neutralsalze. Biochem. Zeit. **24**, 210 (1910).
355. Starling, E. On the adsorption of fluids from the connective tissue spaces. J. Physiol. **19**, 312 (1895).
356. Он же. The glomerular function of the kidney. J. Physiol. **24** 317 (1899).
357. Он же. Recent advances in the physiology of digestion. London 1906.
358. Tafel, J. Ueber die sogenannte indirekte Esterbildung. Zeit. physik. Chem. **19**, 592 (1896).
359. Takeuchi, T. Urease in higher plants. J. Coll. Agr. Tokyo. **1** (1909).
360. Tammann, G. Ueber die Wirkung der Fermente. Zeit. physik. Chem. **3**, 25 (1889).
361. Он же. Die Reaktionen ungeformter Fermente. Zeit. physiol. Chem. **16**, 271 (1892).
362. Он же. Zur Wirkung ungeformter Fermente. Zeit. physik. Chem. **18**, 426 (1895).
363. Tanaka, Y. The action of acids in the enzymic decomposition of oil by castor seeds. J. Coll. Engeneer. Tokyo. **5**, 25 (1910).
364. Он же. The preparation of lipase-powder acting in neutral medium. J. Coll. Engeneer. Tokyo. **5**, 125 (1912).
365. Taylor, A. On the synthesis of protein through the action of trypsin. J. Biol. Chem. **3**, 87 (1907).
366. Он же. On the conception and definition of the term „cataly-sator“. J. Biol. Chem. **8**, 503 (1910).
367. Terroine, E. Influence de la réaction du milieu sur la lipase pancréatique. C. rend. Soc. Biol. **68**, 439 (1910).
368. Он же. Action des sels biliaires sur la lipase pancréatique, I. C. rend. Soc. Biol. **68**, 439 (1910).
369. Он же. Action des sels biliaires sur la lipase pancréatique, II. C. rend. Soc. Biol. **68**, 518 (1910).
370. Он же. Action des sels biliaires sur la lipase pancréatique, IV. C. rend. Soc. Biol. **68**, 754 (1910).
371. Он же. Zur Kenntniss der Fettspaltung durch Pankreasssaft. Bioch. Zeit. **23**, 404 (1910).
372. Thaysen, A. Researches on the inhibition produced by certain sera on the coagulating power of rennet. Biochem. J. **9**, 110 (1915).
373. Thiele, F. On the lipolytic action of the tissues. Biochem. J. **7**, 287 (1913).
374. Thomson, J. J. Applications of dynamics to physics and chemistry. London 1888.
375. Trautz, M. und K. Volkmann. Der Temperaturkoeffizient chemischer Reaktionsgeschwindigkeiten. Zeit. f. physik. Chem. **64**, 53 (1908).
376. Travers, M. The law of distribution in the case in which one of the phases possesses mechanical rigidity: adsorption and occlusion. Proc Roy. Soc. **78**, A. 9 (1907).

377. Turhava, D. Aus dem Gebiete der Katalyse. Zeit. physik. Chem. **38**, 505 (1901).
378. Usher, F. and J. Priestley. A study of the mechanism of carbon assimilation in green plants. Proc. Roy. Soc. **77**, B, 369 (1906).
379. Он же. The mechanism of carbon assimilation in green plants: the photolytic decomposition of carbon dioxide in vitro. Proc. Roy. Soc. **78**, B, 318 (1906).
380. Он же. The mechanism of carbon assimilation, part III. Proc. Roy. Soc. **84**, B, 101 (1911).
381. Van't Hoff, J. Ueber die zunehmende Bedeutung der anorganischen Chemie. Zeit. anorg. Chem. **18**, 1 (1898).
382. Он же. Ueber synthetische Fermentwirkung. II. Sitz.-Ber. k. Preuss. Akad. **48**, 963 (1910).
383. Vernon, H. The conditions of action of trypsin on fibrin. J. Physiol. **26**, 405 (1900).
384. Vernon, H. The conditions of action of the pancreatic secretion. J. Physiol. **28**, 375 (1902).
385. Он же. The protective value of proteins and their decomposition products on trypsin. J. Physiol. **31**, 346 (1904).
386. Он же. Intracellular enzymes. London 1908.
387. Он же. The quantitative estimation of the indophenol oxydase in animal tissues. J. Physiol. **42**, 402 (1911).
388. Он же. The autocatalysis of trypsinogen. J. Physiol. **47**, 325 (1913).
389. Visser, A. Reaktionsgeschwindigkeit und chemisches Gleichgewicht in homogenen Systemen und deren Anwendung auf Enzymwirkungen. Zeit. f. physik. Chem. **52**, 257 (1905).
390. Vulquin, E. et M. Lisbonne. Inactivation de l'amylase du malt par la dialyse électrique. Réactivation. Cpt. rend. Soc. Biol. **72**, 936 (1911).
391. Walters, E. On the influence of the products of hydrolysis upon the rate of hydrolysis of casein by trypsin. J. Biol. Chem. **12**, 43 (1911).
392. Weinland, E. Ueber Antifermen I. Zeit. f. Biol. **44**, 1 (1903).
393. Он же. Ueber Antifermen II. Zur Frage, weshalb die Wand von Magen und Darm während des Lebens durch die proteolytischen Fermente nicht angegriffen wird. Zeit. f. Biol. **44**, 45 (1903).
394. Он же. Ueber die Zersetzung von Fett durch die Calliphoralarven. Zeit. f. Biol. **52**, 460 (1909).
395. Whetham, W. Ionic velocities. Phil. Trans. **184**, A, 337 (1893).
396. Он же. On the ionisation of dilute solutions at the freezing point. Phil. Trans. **194**, A, 321 (1900).
397. Wiechowski, W. Eine Methode zur chemischen und biologischen Untersuchung überlebender Organe. Beitr. chem. Physiol. u. Pathol. **9**, 232 (1907).
398. Wiechowski, W. und Wiener, H. Ueber Eigenschaften und Darstellung des harnsäurezerstörenden Fermentes der Rinderniere und Hundeleber. Beitr. chem. Physiol. u. Pathol. **9**, 247 (1907).
399. Williams, A. On adsorption from solutions. Meddel. K. Weteskapsakadem. Nobelinstitut. **27**, 23 1913.

400. Wirth, P. Unters. über Blausäure-benzaldehydlösungen in Verbindung mit Hirschchlorbeerwasser. Arch. der Pharm. **249**, 382 (1911).
401. Wittich, von. Das Pepsin und seine Wirkung auf Blutfibrin. Pflügers Arch. **5**, 435 (1872).
402. Wohl, A. und E. Glimm. Zur Kenntniss der Amylase (Diastase). Biochem. Zeit. **27**, 349 (1910).
403. Wöhler, L., W. Plüddemann und P. Wöhler. Beitrag zur Aufklärung des Schwefelsäure-Kontaktprozesses. Zeit. f. physik. Chem. **62**, 641 (1910).
404. Wöker, G. Die Katalyse. Stuttgart. 1910.
405. Wolff, I. Sur quelques sels minéraux qui jouent le rôle de peroxydases. Cpt. rend. **146**, 142, 781, 1217 (1908).
406. Оже. Contributions à la connaissance de divers phénomènes oxydasiqnes naturelles et artificiels. 1910.
407. Young, W. Studies on the antitryptic action of blood serum. Biochem. J. **12**, 499 (1918).
408. Zunz, E. Contribution à l'étude des protozoës. Arch. Internat. de physiol. **5**, 245 (1907).