

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СВОБОДНОЙ ЭНЕРГИИ ГИДРОЛИЗА АДЕНОЗИНТИФОСФОРНОЙ КИСЛОТЫ ПО КОНСТАНТЕ РАВНОВЕСИЯ ГЕКСОКИНАЗНОЙ РЕАКЦИИ

Г. Е. ВЛАДИМИРОВ, В. Г. ВЛАСОВА, А. И. КОЛОТИЛОВА
С. Н. ЛЫЗЛОВА и Н. С. ПАНТЕЛЕЕВА

*Кафедра биохимии Ленинградского государственного
университета им. А. А. Жданова*

Количественная характеристика величины богатой энергией фосфатной связи аденоэозинтрифосфорной кислоты (*ATФ*) в течение последних пятнадцати лет подвергалась неоднократному пересмотру.

Вначале свободную энергию гидролиза *ATФ* на основании приближенных расчетов оценивали величинами порядка —13—11 ккал на граммолекулу освобождающегося фосфата [1—4]. Однако уже в 1948 г. появились указания на завышенный характер этих величин. Один из авторов настоящей работы, пользуясь рядом надежных термодинамических данных, характеризующих суммарный эффект гликолиза, провел расчеты, по которым дефосфорилирование *ATФ* в стандартных условиях сопровождается освобождением 8—9 ккал на моль вещества [5—7]. Гиннодман [8], уточнив некоторые величины энергии гидролиза промежуточных продуктов гликолиза, пользуясь методом меченых атомов, пришел к выводу, что максимально при отщеплении концевого фосфорного остатка *ATФ* выход энергии может составлять 8—8,5 ккал.

Аналогичный порядок величин был получен и в ряде других исследований: —10,4 ккал [9], —9,4 ккал [10], —8,9 ккал [11], —7,9 ккал [12], —7 ккал [13].

Во всех цитируемых работах оценку величины свободной энергии гидролиза *ATФ* проводили на основании косвенных расчетов, в основу которых было положено рассмотрение энергетических соотношений отдельных этапов гликолиза и некоторых других реакций, где аденоэозинтрифосфорная кислота принимает непосредственное участие.

Недавно появились исследования, в которых калориметрическим путем проводили измерение теплоты, выделяющейся при гидролизе *ATФ*. Авторы работы делают вывод, что уровень энергии фосфорной связи *ATФ* значительно ниже, чем это предполагалось до сих пор, и что реакция гидролиза *ATФ* энергетически равновещена реакции гидролиза пирофосфорной и триметафосфорной кислот [14; 15].

В настоящей работе была предпринята попытка установить величину энергии гидролиза фосфатной связи аденоэозинтрифосфорной кислоты путем определения константы равновесия гексокиназной реакции:



В ходе гексокиназной реакции осуществляется фосфорилирование глюкозы за счет *ATФ* с образованием глюкозо-6-фосфата и аденоэозиндифосфорной кислоты (*ADФ*). Реакция протекает с большим перепадом свободной энергии и до последнего времени считалась практически необратимой. Известные сомнения в необратимости гексокиназной реакции вносили наблюдаемый некоторыми авторами [16; 17] факт торможения гексокиназы глюкозо-6-фосфатом и аденоэозиндифосфорной кислотой.

Первые указания об обратимости реакции фосфорилирования глюкозы за счет *ATФ* были получены в опытах Власовой [18].

Обратимый характер гексокиназной реакции был далее подтвержден в других работах, в которых применяли глюкозу или глюкозо-6-фосфат, меченные радиоактивным изотопом углерода [19; 20]. Авторы изучили скорость обратной реакции (образование глюкозы и *ATФ*) и ее отношение к изменяющимся концентрациям участников в реакции компонентов. Обратимый характер изучаемой реакции был подтвержден наблюдением торможения прямой реакции аденоэозиндифосфорной кислотой и торможения обратной реакции глюкозой.

В настоящей работе использовано экспериментальное определение константы равновесия гексокиназной реакции с применением метода меченых атомов для расчета свободной энергии гидролиза аденоцинтрифосфорной кислоты.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Препараты

1. Глюкозо-6-фосфат, меченный радиоактивным изотопом фосфора, получали в ходе фосфоглюкомутазной реакции в виде барневой соли превращением глюкозо-1-фосфата в глюкозо-6-фосфат [21].

Радиоактивный глюкозо-1-фосфат синтезировали в результате фосфоролиза крахмала растительной фосфорилазой [22]. Фосфоглюкомутазу извлекали из мышц кролика или крысы [21]. Активность фермента проверяли цистеиновым методом. Стабилизацию фосфоглюкомутазы при получении глюкозо-6-фосфата достигали добавлением сывороточного альбумина, активирование — добавлением сернокислых солей Mg и Na.

Используемые препараты глюкозо-6-фосфата были не менее 90—96% чистоты удельная активность их составляла в различных опытах от 150 до 450 имп/мин на 1 мкг Р.

2. Барневую соль аденоцинтрифосфорной кислоты получали химическим путем из аденоцинтрифосфорной кислоты [23]. Так как препараты не должны были содержать даже малейшей примеси АТФ, то проверку чистоты аденоцинтрифосфата производили тремя методами: по соотношению лабильного и общего фосфора, ферментативным путем при помощи гексокиназы и распределительной хроматографией на бумаге [24; 25] с последующим определением спектра поглощения на спектрофотометре СФ-4. Наиболее убедительным критерием чистоты АДФ являются два последовательных следов АТФ.

3. Гексокиназу выделяли из свежих пекарских дрожжей (маточная чистая культура, Ленинградский дрожжевой завод) по методу Мейергофа [26]. Полученный таким путем препарат фермента, по данным Коловика и Калькара [27], не содержит фосфоглюкомутазы. Проверку чистоты гексокиназы проводили при помощи миокиназы.

Миокиназу получали из мышц кролика [27]. Удаление примеси неорганического фосфора и фосфатаз проводили дialизом препарата гексокиназы в течение 5—6 час. на холоду против часто смением дистиллированной воды.

Используемые препараты фермента не содержали примеси миокиназы, фосфатаз и неорганического фосфора.

Пример одного из опытов по определению активности и чистоты препарата гексокиназы приведен в табл. 1.

Таблица 1
Результаты проверки чистоты и активности препарата гексокиназы

№ пробы	Состав пробы в мл				Фосфор в мкг на всю пробу					
	5%-ная глюко- за+бу- фер*	АДФ + Mg++	гексо- киназа	миоки- наза	вода	до инкуба- ции		через 30 мин. после инкуба- ции при 37° и pH 7,5		лабиль- ный фосфор
						до гид- ролиза	после гидро- лиза	до гид- ролиза	после гид- ролиза	
1	0,5	0,5	—	—	1,5	0,20	0,40	0,20	0,20	0,20
2	0,5	—	0,5	—	4,5	0,45	0,15	0	0,45	0
3	0,5	—	—	—	2,0	0,15	0,15	0	0,15	0
4	0,5	0,5	0,5	—	1,0	0,20	0,40	0,20	0,15	0
5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,20	0,40	0,20	0,20	0,20
									0,25	0,05

* Фосфатный буфер M/15.

Получаемые препараты содержали примесь фосфогексоизомеразы, однако, это, видимо, не могло исказить хода реакции, так как переход глюкозо-6-фосфата во фруктозо-6-фосфат совершается во много раз быстрее, чем гексокиназная реакция, и легко обратим в силу незначительного перепада энергии в этой системе. Наличие фруктокиназной активности в препаратах дрожжевой гексокиназы также не могло иметь большого значения, так как количество образующейся фруктозы в ходе обратной фруктокиназной реакции незначительно [20].

Данные табл. 1 свидетельствуют, что препарат гексокиназы активен, так как в пробе 5, содержащей миокиназу, почти весь лабильный фосфор АДФ, переведенный миокиназой в таковой АТФ, перешел на глюкозу с

образованием трудно гидролизуемого глюкозо-6-фосфата. Далее, препарат гексокиназы не содержит примеси миокиназы, так как в пробе 4 за время инкубации нет убыли лабильного фосфора. Фермент не содержит фосфатаз, так как в пробе 5 и в пробе 4 прирост неорганического фосфата за время инкубации отсутствует. Сходные данные по неорганическому фосфору проб 2 и 3 говорят об отсутствии в препарате гексокиназы примеси неорганического фосфора. Отсутствие убыли лабильного фосфора за время инкубации в пробе 4 свидетельствует об отсутствии примеси АТФ в препарате АДФ, используемом в опыте.

Постановка опытов

Для проведения опытов составляли реакционную смесь, состоящую из аденоциндинифосфорной кислоты, глюкозо-6-фосфата, меченого радиоактивным изотопом фосфора, ионов магния, дрожжевой гексокиназы и гликоколового буфера с рН 7,25. Смесь инкубировали в течение 3—6 час. на водяной бане при 37°. Через определенный интервал времени устанавливалось равновесие, и в силу обратимости реакции должно было образоваться некоторое количество глюкозы и аденоцинтрифосфорной кислоты, меченной Γ^{32} по третьему остатку фосфорной кислоты. АТФ синтезируется в ничтожно малом количестве, ее нельзя определить обычными аналитическими способами, и в данном случае АТФ определяли по радиоактивному фосфору. Для этого был использован метод добавления носителя.

По истечении срока инкубации фермент инактивировали трихлоруксусной кислотой (конечная концентрация 10%) и к смеси прибавляли точно известное количество нерадиоактивной аденоцинтрифосфорной кислоты. Тщательным перемешиванием достигали равномерного распределения синтезированной меченой АТФ среди нерадиоактивного носителя. Следующий этап заключался в выделении АТФ обычными препаративными приемами. Так как требовалось получить хотя бы небольшую долю АТФ, но совершенно свободную от примеси радиоактивного глюкозо-6-фосфата, проводили многократное промывание и переосаждение Ва-соли аденоцинтрифосфорной кислоты, которую затем переводили в ртутную соль. Последнюю разлагали сероводородом и АТФ вновь выделяли в виде чистой бариевой соли, не содержащей следов глюкозо-6-фосфата. Критерием чистоты выделенной АТФ служил контрольный опыт, в котором составляли совершенно аналогичную систему с тем отличием, что гексокиназу до начала инкубации инактивировали кипячением. АТФ, что выделенную из контрольной пробы, подвергали таким же приемам очистки, как и выделенную из опытной пробы. Если АТФ из контроля не обладала радиоактивностью, значит достигалось полное отделение последней от активного глюкозо-6-фосфата.

В некоторых опытах АТФ из контроля давала 3—6 имп/мин над фоном. Эту величину вычитали из данных определения радиоактивности АТФ, выделенной из опытной пробы.

Счет импульсов производили на установке «Б» со счетчиком АС-2. Растворы радиоактивных веществ наносили на специальные стекла. Количественное содержание неорганического фосфора определяли колориметрическим методом по Фиске и Суббароу, аденоцинтрифосфорной кислоты — по фосфору после 10-минутного гидролиза в $N\text{HCl}$ при 100°.

Зная количество АТФ, добавленной в качестве носителя, и определив удельную активность выделенной доли ее, легко рассчитать количество синтезированной радиоактивной АТФ.

Радиоактивную АТФ, выделенную из опыта, идентифицировали не только химическим путем, но и хроматографически. После разделения на бумаге пятно, соответствующее АТФ, давало заметное количество отсечетов, в то время как пятна, соответствующие АДФ и адениловой кислоте, не показывали радиоактивности.

Чтобы еще раз убедиться в том, что гексокиназа не содержала фосфатазы глюкозо-6-фосфата, проводили анализ на присутствие радиоактивного неорганического фосфора в осадках *ATФ*, выделяемых из опытной пробы. Для этого к раствору *ATФ* до гидролиза добавляли молибдат и эйконоген (по Фиске и Суббароу) и окрашенную часть раствора извлекали изобутиловым спиртом [28]. В 1 мл изобутилового экстракта производили подсчет импульсов. Оказалось, что во всех случаях примесь ненеорганического фосфора отсутствовала.

РЕЗУЛЬТАТЫ ОПЫТОВ

Ход рассуждений при расчете константы равновесия (*K*) и изменения свободной энергии (ΔF^0) можно разобрать на примере одного из опытов (табл. 2, опыт 3).

Радиоактивный глюкозо-6-фосфат в количестве 0,300 ммоля растворяли в 5 мл воды. 2,2 мл раствора, соответствующие 0,132 ммоля глюкозо-6-фосфата, отбирали в опытную колбочку и 2,2 мл — в контрольную.

Оставшийся раствор использовали для определения чистоты препарата по соотношению общего и гидролизуемого фосфора (6-часовой гидролиз), а также для определения удельной активности. Анализ показал, что чистота препарата составляла 93%. Стекла, на которые наносили пробы для подсчета импульсов, сохранялись до момента окончания опыта и подсчитывали их одновременно с пробами *ATФ*, выделяемыми из контрольной и опытной проб.

Бариевую соль аденоциндинфосфорной кислоты в количестве 0,289 ммолей растворяли в 3 мл 0,5 N HCl. Бариевую соль переводили в натриевую, раствор нейтрализовали до pH 7,5, добавляли 1 мл 0,05 M MgCl₂ и общий объем доводили до 6 мл. По 2,8 мл раствора отбирали в опытную и контрольную пробы. Оставшийся раствор использовали для анализа чистоты препарата *АДФ*. Анализ при помощи гексокиназы и хроматографией на бумаге показал отсутствие примеси *ATФ* в препарате *АДФ*. В контрольную пробу добавляли 5 мл прокипяченной гексокиназы, в опытную — 5 мл активной гексокиназы. К обеим смесям добавляли по 3 мл гликоколового буфера (pH 7,25).

Контрольную и опытную смеси выдерживали на водяной бане при 37°. Через 5½ час. к пробам было добавлено по 3,2 мл 50%-ной трихлоруксусной кислоты и по 3,7 мл раствора «*ATФ*-носителя», содержащего 12,75 мг (согласно проведенному анализу) фосфора *ATФ* в расчете на третий остаток фосфорной кислоты. Белки удаляли центрифугированием, пробы нейтрализовали до pH 7,0 и аденоциндинфосфорную кислоту осаждали 25%-ным уксуснокислым барием. Осадки тщескательно промывали 12,5%-ным уксуснокислым барием, растворяли в 0,5 N соляной кислоте и вновь дважды переосаждали уксуснокислым барием. Бариевую соль *ATФ* переводили в натриевую, сернокислый барий удаляли центрифугированием. Растворы доводили до pH 8 добавлением 2 N NaOH и к ним вновь приливали 25%-ный уксуснокислый барий.

Для более полной очистки *ATФ* бариевую соль ее переводили в ртутную. Баривевые осадки растворяли в 200 мл 10%-ной трихлоруксусной кислоты. Нерастворившуюся часть отбрасывали, а к растворам добавляли по 2—4 мл 20%-ной уксуснокислой ртути и 40%-ный едкий натр для подщелачивания до pH 3—4. Выпадающие осадки ртутной соли *ATФ* собирали центрифугированием, взмучивали в воде, разлагали сероводородом на холоду и *ATФ* вновь выделяли в виде бариевой соли. Осадки из контроля и опыта промывали спиртом, эфиром и высушивали в вакуум-эксканкаторе.

Навески Ba-*ATФ* из контроля и опыта (по 15 мг) растворяли в 3,2 мл 0,5 N HCl. Отсюда отбирали по 1 мл на стекла для подсчета импульсов. Оставшийся раствор использовали для анализа выделенного препарата *ATФ*. Одновременно определяли удельную активность использованного в опыте препарата глюкозо-6-фосфата.

Анализ показал, что удельная активность глюкозо-6-фосфата составляла 306 имп./мин на 1 мг Р³².

В чайвских *ATФ* из контроля и опыта, взятых для счета импульсов, обнаружено по 131,2 мг фосфора при расчете на третий остаток фосфорной кислоты *ATФ*. Контрольная проба не показала радиоактивности (отсутствие импульсов сверх фона). Опытная проба на 131,2 мг фосфора показала 868 имп./мин.

ATФ-носитель добавлен в количестве 12,71 мг (при расчете на третий остаток фосфорной кислоты). Отсюда можно рассчитать радиоактивность всей *ATФ*, добавленной в качестве носителя, она составляет 84 087 имп./мин. При делении этой величины на удельную активность глюкозо-6-фосфата можно определить количество фосфора, перешедшее с глюкозо-6-фосфата на *АДФ*, то есть количество синтезированной *ATФ*. Оно равняется 275 мг, или 0,0087 ммолей. Глюкозы образовалось равное количество (0,0087 ммолей).

Исходные вещества взяты в количествах: глюкозо-6-фосфат — 0,132 ммолей, *АДФ* — 0,135 ммолей.

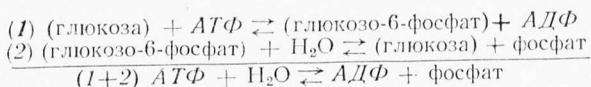
В состоянии равновесия количество *АДФ* будет $0,135 - 0,0087 = 0,1263$ ммолей и глюкозо-6-фосфата $0,132 - 0,0087 = 0,1233$ ммолей.

Полученные данные позволяют рассчитать константу равновесия гексокиназной реакции

$$K = \frac{[\text{глюкозо-6-фосфат}] [\text{АДФ}]}{[\text{глюкоза}] [\text{АТФ}]} = \frac{0,126 \times 0,123}{(0,0087)^2} = 204$$

Перепад энергии гексокиназной реакции (ΔF^0) для стандартных условий (при концентрации всех компонентов, равной 1 моль) будет составлять $\Delta F^0 = -RT\ln K = -0,00198 \times 310 \times 2,3 \lg 204 = -3,2$ ккал (R — газовая постоянная — 0,00198 ккал, T — абсолютная температура, $\ln K$ — натуральный логарифм константы равновесия = 2,3 $\lg K$).

Определение величины перепада свободной энергии гексокиназной реакции дает возможность рассчитать свободную энергию гидролиза АТФ. Гидролитическое расщепление аденоциантифосфорной кислоты можно представить как сумму гексокиназной реакции и реакции гидролиза глюкозо-6-фосфата.



Энергия гидролиза АТФ (ΔF_{1+2}^0) равна сумме свободных энергий реакции 1 (ΔF_1^0) и реакции 2 (ΔF_2^0) из данных разобранного опыта ΔF_1^0 составляет —3,2 ккал, ΔF_2^0 , по данным Гинодмана [6], равняется —2,45 ккал.

Таким образом $\Delta F_{1+2}^0 = -2,45 + (-3,2) = -5,65$ ккал.

В настоящей работе приведено семь аналогичных опытов по определению константы равновесия гексокиназной реакции и для каждого опыта рассчитаны величины свободной энергии гексокиназной реакции и свободной энергии гидролиза АТФ (табл. 2).

Таблица 2

Данные определения константы равновесия гексокиназной реакции и величины ΔF^0 для гексокиназной реакции и реакции гидролиза АТФ

№№ п/п	Количество исходных веществ		Удельная активность глюкозо-6-фосфата в имп/мин. на 1 г Р	Продолжительность опыта в час.	Количество АТФ-испинателя в мг	Количество синтезированной АТФ в молях	Константа равновесия (K) гексокиназной реакции	ΔF^0 -гексокиназной реакции в ккал/моль	ΔF^0 гидролиза АТФ в ккал/моль
	АДФ в молях	глюкозо-6-фосфат (Р ²) в молях							
1	0,126	0,185	238	5,5	16,45	0,0040	1380	-4,4	-6,85
2	0,124	0,193	147	3,0	16,63	0,0080	335	-3,5	-5,95
3	0,135	0,132	305	5,5	12,71	0,0087	204	-3,2	-5,65
4	0,124	0,193	147	5,0	16,63	0,0107	180	-3,2	-5,65
5	0,138	0,145	248	3,0	19,50	0,0120	116	-2,9	-5,35
6	0,118	0,193	461	2,5	11,80	0,0130	112	-2,9	-5,35
7	0,109	0,142	268	6,0	14,31	0,0135	73	-2,6	-5,05

Из табл. 2 видно, что различные количества компонентов реакции и различная продолжительность опытов не сказывается на количестве синтезированной АТФ и, следовательно, на величине константы равновесия. По всей видимости, равновесие устанавливается уже через 2,5—3 часа после начала инкубации.

Различия в полученных величинах константы равновесия объясняются отсутствием стандартных препаратов фермента гексокиназы, что связано с разнокачественностью дрожжей, из которых получали фермент.

Однако можно утверждать, что наиболее достоверными являются самые низкие величины константы равновесия гексокиназной реакции в силу того, что они получены при учете наиболее высоких концентраций синтезированной АТФ. Если опыт проведен с точным соблюдением всех

условий и при наличии достаточно активного и чистого фермента, то единственным источником обнаруживаемой $AT\Phi$ может быть только ее синтез в результате обратной гексокиназной реакции.

Чем больше $AT\Phi$ образуется, тем ниже будет константа равновесия (из уравнения равновесия), а следовательно, тем ниже будет величина свободной энергии гексокиназной реакции и реакции гидролиза $AT\Phi$.

Средняя величина перепада свободной энергии гексокиназной реакции, по данным табл. 2, составляет — 3,2 ккал для стандартных условий, а средняя величина свободной энергии гидролиза $AT\Phi$ — 5,6 ккал на моль.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Среди существующих способов определения свободной энергии химических веществ и реакций наиболее прямым и достоверным является установление константы равновесия опытным путем и последующий расчет свободной энергии, исходя из этой величины.

В настоящей работе с использованием радиоактивного глюкозо-6-фосфата определена константа равновесия гексокиназной реакции и вычислена величина свободной энергии гексокиназной реакции и гидролиза $AT\Phi$ для стандартных условий (концентрации компонентов реакции составляют 1 г-моль на 1 л, при температуре 37° и рН 7,25).

Перепад свободной энергии реакции фосфорилирования глюкозы при участии $AT\Phi$ составляет в среднем — 3,2 ккал. До сих пор эта величина, полученная путем косвенных расчетов, оценивалась в — 5,9 ккал.

Среди промежуточных реакций гликолиза практически необратимыми считались близкие в химическом отношении гексокиназная и фософруктокиназная реакции, а также реакция переноса фосфатного остатка с фосфоривиноградной кислоты на аденоцидифосфорную кислоту. В литературе имеются сведения об обратимости фосфорикуваттрансфосфорилазной реакции [29; 4].

Применение метода меченых атомов в данной работе позволило получить прямое доказательство обратимости реакции фосфорилирования глюкозы ($\Delta F^0 = -3,2$ ккал). Несомненно, что и для фософруктокиназной реакции величина перепада свободной энергии окажется более низкой. Следовательно, имеются все основания для пересмотра вопроса об обратимости процесса гликолиза в целом.

В физиологических условиях ΔF для гексокиназной реакции будет зависеть от концентрации отдельных компонентов реакции. Так, например, в условиях хорошего снабжения кислородом, когда содержание $AT\Phi$ во много раз больше, чем $AD\Phi$, перепад свободной энергии будет высоким.

Если принять для мышечной ткани концентрацию глюкозо-6-фосфата равной 0,003 М и концентрацию глюкозы равной 0,002 М, тогда при $[AD\Phi] = 0,1$ ΔF будет равно — 4,3 ккал.

$$(\Delta F = \Delta F^0 + RT \ln [\text{глюкозо-6-фосфат}] + RT \ln [AD\Phi] - RT \ln [\text{глюкоза}] - RT \ln [AT\Phi] = -3,2 + 1,42 \lg 0,003 + 1,42 \lg 0,1 - 1,42 \lg 0,002 = -4,3 \text{ ккал}).$$

В том случае, если разница в концентрациях $AT\Phi$ и $AD\Phi$ будет невелика, перепад энергии будет меньше.

Для реакции гидролиза $AT\Phi$, соответственно, также получена более низкая величина перепада свободной энергии, а именно — 5,6 ккал, вместо — 8 и — 9 ккал, как это принималось ранее [6—13].

Приведенный нами порядок величин находится в соответствии с новыми данными определения изменения теплосодержания реакции гидролиза аденоцидифосфорной кислоты. Китцингер и Бенцингер [30] определяя калориметрическим путем величину теплосодержания этой реакции, оценивают ее в — 4,8 ккал/моль, а Подольский и Моралес [15] — в —

4,7 ккал/моль, в отличие от принятой ранее величины в — 12 ккал [31; 32]. По заключению этих же авторов, реакция гидролиза АТФ энергетически равнозначна реакции гидролиза пирофосфата и триметаfosфата. Термосодержание для реакции гидролиза этих полифосфатов было определено в —5,8; —6,2 ккал на моль фосфорноангидридной связи [33; 34].

Несмотря на низкую величину свободной энергии гидролиза АТФ для стандартных условий, последняя отнюдь не утрачивает своего биологического значения как универсального поставщика химической энергии. В физиологических условиях энергия фосфатной связи АТФ будет значительно выше, она будет колебаться в зависимости от концентрации АТФ, АДФ и неорганических фосфатов. Так, если принять, что концентрация $\text{H}_3\text{PO}_4 = 0,01 M$ (что обычно имеет место в тканях) и концентрация АДФ равна концентрации АТФ, то

$$\Delta F = \Delta F^0 + RT \ln[\text{АДФ}] + RT \ln[\text{H}_3\text{PO}_4] - RT \ln[\text{ATF}] = -5,6 + \\ + 1,42 \lg 0,01 = -8,4 \text{ ккал.}$$

* * *

После направления в печать настоящей статьи появилась работа Робинса и Бойера [35], в которой при помощи радиоактивного изотопа углерода было найдено ΔF^0 для гексокиназной реакции равное — 4,5 ккал, то есть только на 1,3 ккал больше, чем в наших опытах. Далее авторы для реакции гидролиза глюкозо-6-фосфата принимали ΔF^0 равным 3,1 ккал, в то время как мы воспользовались более точными данными Гинодмана — 2,45 ккал. В результате всего определенная ими величина ΔF^0 для реакции гидролиза АТФ (—7,6 ккал/моль) на 2 ккал отличается от найденной нами.

ВЫВОДЫ

Гексокиназная реакция обратима и состояние равновесия может быть изучено при помощи радиоактивного изотопа фосфора.

Свободная энергия гексокиназной реакции составляет в среднем — 3,2 ккал для стандартных условий.

Свободная энергия гидролиза аденоzinтрифосфорной кислоты, определенная по константе равновесия гексокиназной реакции, составляет в среднем — 5,6 ккал для стандартных условий.

Поступила в редакцию
10. I 1957

ЛИТЕРАТУРА

1. Lipmann F., Adv. Enzymol. **1**, 99, 1941.
2. Lipmann F., Adv. Enzymol. **6**, 231, 1946.
3. Meuenghof O., Annal. New York Acad. sci. **45**, 377, 1944.
4. Meuenghof O., Oesper P., J. Biol. Chem. **179**, 1371, 1949.
5. Владимириров Г. Е., Тезисы докл. секции биолог. наук, Научная сессия ЛГУ, 1948, стр. 26.
6. Владимириров Г. Е. и Гинодман Л. М., Биохимия **18**, 1953.
7. Владимириров Г. Е., Ученые записки ЛГУ **32**, 328, 1954.
8. Гинодман Л. М., Энергетическая характеристика промежуточных реакций гликолиза, Дисс., Л., 1954.
9. Оеспер Р., В кн. Phosphorus metabolism, Johns Hopkins Press, Baltimore т. 1, 1951, стр. 521.
10. Burton K., Krebs H. A., Biochem. J. **54**, 94, 1953.
11. Burton K., Biochem. J. **59**, 44, 1955.
12. Levintow L., Meister A., J. Biol. Chem. **209**, 265, 1954.
13. Morales M. F., Botts J., Blum J., Hill T. L., Physiol. Rev. **35**, 475, 1955.
14. Podolsky R. J., Sturtevant J. M., J. Biol. Chem. **217**, 603, 1955.
15. Podolsky R. J., Morales M. F., J. Biol. Chem. **218**, 945, 1956.
16. Weil-Malherbe H., Bone A. D., Biochem. J. **49**, 339, 1951.
17. Sols A., Crane R. K., J. Biol. Chem. **206**, 925, 1954.
18. Власова В. Г., Размеры рассеяния энергии в ходе гликолиза, Дисс., Л., 1954.

19. Gamble J. L., Najjar V. A., Science **120**, 1023, 1954.
20. Gamble J. L., Najjar V. A., J. Biol. Chem. **217**, 595, 1956.
21. Нейфах С. А. и Гречишнина В. И., Биохимия **16**, 444, 1951.
22. Мешкова Н. П. и Северин С. Е., Практикум по биохимии животных, М., 1950.
23. Bielschowsky M., Biochem. J. **47**, 105, 1950.
24. Cohn W. S., Carter C. E., J. Am. Chem. Soc. **72**, 4273, 1950.
25. Kuschinsky G., Lange G., Turba F., Biochem. Z. **325**, 321, 1954.
26. Meyerhof O., Biochem. Z. **183**, 176, 1927.
27. Colowick S. P., Kalckar H. M., J. Biol. Chem. **148**, 117, 1943.
28. Berenblum J., Chain E., Biochem. J. **32**, 295, 1938.
29. Lardy H. A., Ziegler J. A., J. Biol. Chem. **159**, 343, 1945.
30. Kitzinger C., Benzingter T., Z. Naturforsch. **10**, 375, 1955.
31. Lohmann K., Biochem. Z. **253**, 431, 1932.
32. Ohlmeyer P., Z. Naturforsch. **1**, 30, 1946.
33. Meyerhof O., Shatas R., Kaplan A., Biochem. biophys. acta **12**, 121, 1953.
34. Ging N. S., Sturtevant J. M., J. Am. Chem. Soc. **76**, 2087, 1954.
35. Robbins E. A., Boyer K. D., J. Biol. Chem. **224**, 121, 1957.

THE DETERMINATION OF FREE ENERGY OF ATP HYDROLYSIS FROM THE EQUILIBRIUM CONSTANT OF THE HEXOKINASE REACTION

G. E. VLADIMIROV, V. G. VLASOVA, A. I. KOLOTILOVA, S. N. LYSLOVA,
and N. S. PANTELEEEVA

Chair of Biochemistry of the State University, Leningrad

Free energy of ATP hydrolysis was estimated from the experimentally determined equilibrium constant of the hexokinase reaction. The transfer of radioactive phosphorus from glucose-6-phosphate to ADP was followed up according to the reaction: glucose-6-phosphate + $ODP \rightleftharpoons$ glucose + ATP.

The amount of formed labelled $AT\Phi$ was assayed by the carrier method.

The free energy of the hexokinase reaction under standard conditions amounts to -3.2 kcal/mol . Hence, assuming the hydrolysis energy of glucose-6-phosphate to be -2.4 kcal the free energy of $AT\Phi$ hydrolysis is -5.6 kcal/mol .
