

三、中间代谢基本途径的阐明

在生物化学研究的初期。动物代谢的最终产物就被人们注意到了。然而，要解释碳水化合物、脂肪和蛋白质分子是经过怎样的途径降解成二氧化碳、水和尿素的，却是一件很困难的工作。目前仍有许多问题未得到解答。

人们可以提出中间过程的假想机理，但要鉴定中间物的存在却并非易事，因为许多中间物通常只有几分之一秒的寿命。这样一来，要想获得支持还是废弃某个假想机理的实验证据就很困难了。许多数据都是一点点积累起来的，既有这个实验室的某些数据，又有那个实验室的某些数据。

(一) 酶化学在理解中间代谢过程方面起着重要作用

酶研究所获成果特别丰富，一旦获得了一种酶，其活性就可进行研究，并且不会受到其它酶体系的影响。发酵过程的研究同样导致了許多重要线索，这些线索被推广到研究动物细胞组织中发生的那些过程。有人发现，某些药物能毒化特定的酶，这样就会使通常与酶作用的物质积聚起来了。

酶是专一的生物催化剂。影响酶反应速率的因素，主要在 1913 年由 L·米凯里斯和 M·L·门顿等人进行了研究。他们提出了一种理论，用来说明物质浓度对催化反应速率的影响，他研究出一种定量处理方法。尽管后来的研究工作者对该理论作了改进和扩展，但它仍然是酶反应速率研究的基础。

测压技术在酶研究中的应用，是 1902 年 J·巴克罗夫特(Barcroft, 1872—1947)所做的工作。他所用的方法通过 O·瓦尔伯的呼吸测压计而得到了改进，在这种测压计中，代谢系统所吸收的氧气量是通过观察其压力随反应进程的变化得到的。

(二) 碳水化合物代谢

许多实验室都曾解释过碳水化合物的分解作用，很早人们就清楚，己糖转变成二氧化碳的过程是一种在肌肉里发生的厌氧过程，该过程产生的 3—碳片段再经需氧过程转变成氧化物。1911 年，C·纽伯格利用亚硫酸氢钠使乙醛变成一种不起反应的加成产物，然后通过捕集技术对乙醛进行了鉴定。几年后，O·F·迈耶霍夫(1884—1951)证实，醇发酵过程中出现的辅酶也会在肌肉细胞里发现。

G·艾姆登、J·克鲁伊弗尔(kluyver, 1888—1956), K·洛曼、H·冯·欧拉、J·K·帕纳斯(Parnas, 1884—1949), O·瓦尔伯和其他研究者取得了进一步的进展。有关醇发酵的研究工作使得有可能设想这样一条己糖分解的途径，其中己糖是通过磷酸化的 3—碳片段分解成丙酮酸、乙醛和乙酸的，中间有 12 种不同的酶、辅酶和含有高能磷酸键的 ATP 参加。这条途径以两位研究者的名字命名为艾姆登—迈耶霍夫途径。这两位研究者弄清了其中许多步骤。这种完全厌氧途径为释放能量创造了条件。

糖酵解步骤的阐明，不仅仅是解决了糖经酵母的作用如何一步一步变为酒精这个古老的问题，而且促进了整个代谢的研究。在医学实践上对糖尿病因的探讨和有效治疗措施的制定，起了很重要的作用。同时在理论上阐明生物界在生化同一性问题上提供了有力的实验支持。

30 年代一些科学家在生物体内物质氧化的具体化学过程上又取得重要进展。1934—1937 年间匈牙利生物化学家圣捷尔吉(Albert Szent - Györgi, 1893—1986)研究了离体肌肉组织中氧的摄取,用瓦尔伯的方法研究切碎的鸽子胸肌对氧的吸收,发现这种鸽子胸肌的呼吸速度很快;并且观察到,当吸进氧气的速度随时间变慢时,通过加入琥珀酸、富马酸、苹果酸、草乙酸等的盐类可以使速度重新恢复正常。然而,与之密切相关的丙二酸却抑制这种作用。T·图恩伯格证实,肌肉里含有脱氢酶、富马酸酶和苹果酸脱氢酶等一些酶。H·A·克雷布斯(生于 1900 年)证实,通过加入柠檬酸。一氧代戊二酸、丙酮酸和 L—谷氨酸、L—天冬氨酸等氨基酸的盐,可加快呼吸速度。马丁斯和诺普研究了柠檬酸盐在肌肉细胞中发生的氧化作用,并报导了下述几种盐之间的转变:柠檬酸盐 \rightleftharpoons 顺乌头酸盐 \rightleftharpoons D—异柠檬酸盐 \rightleftharpoons 草丁二酸盐 \rightleftharpoons 一氧代戊二酸盐。

圣路易斯州华盛顿大学的卡尔·科里和格蒂·科里研制了一些技术,以通过中止必需酶的活化来防止某一过程的继续进行。他们用这种方法解释了糖原合成与降解过程中的某些中间步骤。他们成功地在试管中,在三磷酸腺苷(ATP)酶和己糖激酶、葡糖磷酸变位酶及磷酸化酶等酶的存在下,用葡萄糖合成出了糖原;在合成中葡萄糖被依次转变为 6—磷酸葡萄糖、1—磷酸葡萄糖及糖原。三磷酸腺苷(ATP)在第一步起着磷酸供体的作用,并在最后一步由二磷酸腺苷(ADP)重新生成。

圣捷尔吉试着添加一些想象中有可能是与氧吸收有关的化学变化道路上的物质,亦即从乳酸到二氧化碳的化学变化道路上的物质。1935 年他发现四种密切相关的四碳化合物—苹果酸、琥珀酸、延胡索酸和草酰乙酸——中的任何一种可用于恢复肌肉的呼吸活力,因为这四种化合物中的每一种都单独起恢复活力的作用。故而得出下述推断:机体可将它们相互转变,并且或许这四种化合物均位于化学变化的道路上。这个研究为汉斯·克雷布斯(Hans Krebs, 1900—1981)所发展,并导致了克雷布斯循环的阐明。

(三) 克雷布斯循环

1940 年在设菲尔德工作的克雷布斯,提出了一种相当复杂的循环途径,认为其中丙酮酸先经脱羧作用生成乙酸酯,然后乙酸酯再转变成草乙酸,同时生成琥珀酸,最后经脱氢和脱羧基作用重新生成草乙酸,并使乙酸残基完全氧化。他的循环利用了酶及辅酶 A 等的催化作用,这种催化作用发生在乙酰基的转移、二磷酸腺苷和三磷酸腺苷的磷酸传递及三磷酸吡啶核甙酸的氢传递等过程中。克雷布斯循环经历过多次改进,但其主要方面已证明是正确合理的。使用丙二酸或五砷酸钠等呼吸抑制剂,能中止循环中的某些中间步骤,并引起某些酸的积聚。此外,这种循环还能解释谷氨酸、天冬氨酸和丙氨酸进行的内肌肉氧化为什么那样迅速。这是因为这三种氨基酸可通过氨基转移作用互变成一酮酸,这种酸是克雷布斯循环的一部分。

克雷布斯循环,又称三羧酸(TCA)循环的目的是完成在糖酵解中开始的葡萄糖的氧化。在从柠檬酸到草酰乙酸的反应顺序中,丙酮酸被氧化成二氧化碳和水。在这个过程中,相当多的能量被释放出来——占葡萄糖氧化过程中释放的总能量的 93%。

克雷布斯因 1940 年发现克雷布斯循环(或三羧酸循环)而享盛名。这是

科里夫妇(Coris)已经证明的碳水化合物如糖原在体内分解为乳酸工作的继续。克雷布斯通过研究乳酸怎样被代谢为二氧化碳和水而完成了这个过程。后经李普曼证实和细节补充。克雷布斯和他共获1953年诺贝尔生理学或医学奖。克雷布斯充分意识到本循环的意义,指出它是所有食料化学分解的共同最终途径这一重要事实。

(四) 脂肪代谢

在所有处理合成和降解脂肪的尝试中,都必须考虑这样一个问题,即天然脂肪酸几乎都含偶数碳原子,并只以直链形式存在。大家知道,脂肪能由碳水化合物形成,并且一个己糖分子可以为甘油的合成提供两个3—碳分子。在解释脂肪酸等分子中存在的长链烃方面曾遇到过较大困难。

—氧化作用的实际设想是在1904年由F·诺普(Knoop, 1875—1946)的研究得出的。诺普给狗饲喂了许多有机酸,这些酸在其烃链的端基处都含有一个苯基。他了解到,苯甲酸在动物体内能被去掉毒性,并能以尿中的马尿酸形式排泄掉,苯醋酸以苯醋酸的形式排泄掉。诺普在给狗饲喂依次增加一个链长的 ω —苯基酸后报告说,当苯基在奇数链,(例如苯丙酸、苯戊酸)上的碳时就形成马尿酸,而当在偶数链(例如,苯丁酸)上的碳时就形成苯醋酸。这就提出,在脂肪酸氧化时,作用发生在—碳原子上,同时消去两个碳原子。当苯基不再对—位作用时,酸链的降解就会停止,否则还会继续进行。

对糖尿病人所进行的研究为—氧化作用提供了进一步的证据,因为糖尿病人的血液、呼吸和尿中都含有“丙酮体”———羟丁酸、乙酰乙酸和丙酮。艾姆登通过肝灌注法实验证实,这些化合物都来源于脂肪酸,而脂肪酸在糖尿病人体内发生的氧化作用不会超过4—碳酸阶段。

合成脂肪酸的设想同样涉及到2—碳单位的引进。M·奈恩基提议,先将乙醛分子缩合成醇醛,然后再还原羟基和氧化末端醛基。J·B·利斯(Leathes)和H·S·雷珀尔(Raper)提出过有些类似的一种看法,不过假定羟基位的降解会产生一个双键,这个双键可能后来被饱和了。I·斯梅德利普提出过一种合成机理,它是由丙酮酸和乙醛起始来增长2个碳单位。

尽管斯梅特利的设想被广泛采用了几十年,但它未能说明40年代所提出和假想的各种因素。里腾伯格和布洛克制备了含氘和含C—13的乙酸,并把它喂给动物吃,结果发现,这些动物的脂肪酸中含有了大量示踪同位素原子。

在1951年F·莱农(Lynen)发现辅酶A(CoA)以后,F·李普曼和S·奥霍亚各自独立地证实,乙酰辅酶A能合成脂肪酸。这一合成解释了脂肪代谢中发生的很大的能量变化,但后来却由于威斯康星州酶学研究所的S·J·瓦基尔的工作而提出了不同看法。

1935年,R·舍恩海默(Schoenheimer, 1898—1941)开始研究含示踪原子氘的脂肪,使脂肪的吸收和代谢有了新的解释。直到这时,人们还一直没想到,能量吸收和代谢达到均衡的动物能将刚吸收的脂肪氧化,以获取所需要的能量。脂肪沉积物被认为是当食物中营养不足时才予以利用的储备物。舍恩海默用氘使亚麻油发生加氢作用,并将这种含氘的脂肪喂给体重保持恒定的老鼠吃。四天之后,含氘的脂肪酸中有44%可在脂肪沉积物中检

测到。这些实验证实脂肪酸易于沉积，并且沉积物不断被吸收以用来进行代谢。在用含氘的软脂酸所进行的其它研究中，氘很快就能在硬脂酸、油酸、月桂酸和肉豆蔻酸中检测到。舍恩海默尔用含示踪原子的碳水化合物和氨基酸所进行的研究，进一步揭示出，所有的体内成分都处在高度运动的状态。

类脂研究的另一个多产领域是研究脂肪肝的那个领域。在对糖尿病人所做的早期研究中，人们了解到，给切除胰岛腺的狗注射胰岛素可使它们保持健康，同时也会使它们的肝中含有非常高的脂肪。G·贝斯特发现，这种高脂肪含量可通过饲喂卵磷脂或更好是饲喂胆碱来加以缓解。

卵磷脂和其它磷脂在代谢中的作用，在早期的研究中从未证实过。卵磷脂是 1846 年 N·T·高布利 (Gobley) 从鸡蛋黄中分离出来的，它除了含有脂肪酸和甘油外，还含有氮和磷。斯特雷克鉴别出含氮碱就是胆碱，胆碱是他先前从胆汁中分离出来的一种化合物，19 世纪 80 年代，J·L·W·图蒂库姆 (Thudicum) 广泛研究了脑的化学，从而揭示出，不仅存在卵磷脂，而且存在脑磷脂和神经鞘类脂物。后两种化合物的确切化学性质，直到 20 世纪 40 年代，当德国科隆的 E·克伦克 (Klenk) 和伊利诺伊州的 H·E·卡特 (Carter) 证实了神经鞘氨醇这种碱的性质及它在神经鞘磷脂和脑甾结构中的位置以后，才完全弄清楚。

贝斯特所作的预防脂肪肝的研究工作揭示出，脂肪可在肝中变为胆碱磷脂。在用磷-32 和氮-15 所进行的示踪物研究中，肝合成卵磷脂的能力与胆碱供量有联系。在胆碱不足时，可用砷胆碱 $(\text{CH}_3)_3\text{AsCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 来促进卵磷脂的合成。人们进一步观察到，高蛋白食物不会使脂肪肝发达，蛋氨酸就是这样的有效成分。受这些发现的启发，V·杜·维尼奥 (生于 1901 年) 正式提出了活化甲基的概念和甲基移转过程。

杜·维尼奥设想，蛋氨酸所以能预防脂肪肝是因为它易于为合成胆碱提供甲基。这一设想通过含氘甲基的饲喂实验而得到了证实。同时还证实，动物能由胆碱中的含氘甲基和甜菜碱合成蛋氨酸。然而，动物是否具有合成活化甲基的能力却一直是个问题。这个问题是由个别动物在某些实验中出现的反常行为而提出的。在给老鼠喝富氘水的实验中曾观察到有少量活化甲基合成，因为在胆碱的甲基中发现了氘。有人认为这一合成可能是肠内的细菌引起的，这种观点被圣玛利亚大学的 J·雷尼尔斯证明是不正确的。雷尼尔斯采用了一些技术，以饲养和研究无菌环境下的动物。当给这种环境中的两只老鼠饲喂富氘水时，发现它们的体内都含有富氘活化甲基。

(五) 氮代谢

含氮化合物的中间代谢受到人们很大注意。不过还有许多问题仍待解答。氧化氨基移转作用是 1933 年克雷布斯观察到的，曾一度被认为是一种普遍反应。后来的研究表明，L-氨基酸氧化酶不仅在蛇毒液和某些霉菌中普遍存在，而且在动物细胞组织中也存在的很普遍，显然是用来破坏可能遇到的非天然氨基酸。

氨基移转作用包括两个有机酸之间交换 - 氨基和 - 酮基，这种作用已证明是一种重要的代谢反应。1934 年，R·M·赫布斯特 (Herbest) 和恩格尔 (Engel) 在含有 - 氨基苯乙酸和丙酮酸的模型体系中观察到了这种反应；并检测到丙氨酸、苯甲醛和二氧化碳是该反应的产物。后两种产物大概

是由苯基— 一酮乙酸 $C_6H_5 \cdot CO \cdot COOH$ 脱羧基作用而来。1937 年有人观察到，鸽子胸肌中有氨基移转作用发生。各种氨基酸都能与 一氧代戊二酸反应生成谷氨酸，或与草乙酸反应生成天冬氨酸。舍恩海默尔用 ^{15}N 对含示踪原子的甘氨酸和亮氨酸进行了同位素示踪研究，从而确证，氮—15 很快就能在大多数这种氨基酸中发现。同时还观察到，必需氨基酸的 一酮基类似物是食物中的完美代用品。

1945 年，D·E·格林 (Green) 从猪的心肌中分离出了两种可催化氨基移转反应的酶。同年，E·E·斯内尔 (Snell) 观察到，在吡多醇 (B_6) 缺乏的情况下，氨基移转反应很难进行。十年后他证实，采用不含酶模型体系时，吡多醛磷酸脂和谷氨酸反应生成 一氧代戊二酸和吡多胺磷酸脂，并且反应是可逆的。分离出来的氨基移转酶含有辅酶吡多醛磷酸脂吡多胺磷酸脂。

鸟氨酸循环。尿素是 1773 年卢埃尔从尿中分离出来的。尿素的直接来源直到 1904 年才知道，那年，A·柯赛尔和达金在动物细胞组织中发现了精氨酸酶，并观察到这种酶能促使精氨酸水解成尿素和鸟氨酸。氨和二氧化碳经代谢作用，可生成含大量氮端基的精氨酸，这直到 1932 年才得到确证。当时克雷布斯报导说，鸟氨酸和瓜氨酸能促进尿素在肝中生成。克雷布斯设想了一个循环，其中鸟氨酸先与氨和二氧化碳反应生成瓜氨酸。然后瓜氨酸与氨反应生成精氨酸，精氨酸再经精氨酸的作用水解成尿素和鸟氨酸。

后来的研究表明，鸟氨酸循环基本上是正确的，但并不像所设想的那样简单。1954 年，S·拉斯纳证实，在瓜氨酸—鸟氨酸那一步反应中，氨可由酶促反应中的丝氨酸得来，这个反应包括由 ATP 到一磷酸脂的转变和同时生成精氨基琥珀酸。精氨基琥珀酸再经酶催化分解成富马酸和精氨酸。另外发现，鸟氨酸到瓜氨酸的转变也是酶促反应。威斯康星州的 P·P·科恩 (Cohen，生于 1903 年) 及其同事所作的研究，揭示了一个复杂机理，其中包括 ATP、镁离子、羧基谷氨酸和至少两个酶。不久之后，鸟氨酸循环与柠檬酸循环之间的联系也得到了证实；富马酸和丝氨酸都是桥键化合物。

含氮化合物的合成。许多实验室都为弄清楚含氧化合物合成中的相互联系作出过贡献。同位素示踪物的应用，有助于为合成氨基酸、维生素和卜啉确定前体和反应途径。例如，美国哥伦比亚的 D·谢明 (Shemin，生于 1911 年) 对卜啉的合成进行了示踪物研究，从而揭示出甘氨酸和琥珀酸是合成中的主要前体。甘氨酸还是合成嘌呤的前体，在这一合成中，二氧化碳、氨和甲醛不是直接而是通过丝氨酸和谷氨酸来提供碳片段的。

某些氨基酸中存在芳香环，这种环的来源一直是个谜，这个谜直到后来有关示踪物的研究揭示出葡萄糖是产生环的原始物质之后才解开。葡萄糖可转变为苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸。这几步转变反应是利用微生物的突变菌种进行的实验而得以证实的，这种菌种已丧失合成正常代谢所需的某些酶的能力。他们能推断一系列化学反应，这些反应会导致霉菌内形成必需的化合物。这一证实主要是斯坦福的比德尔 (Beadle) 和塔特姆 (Tatum) 实验室，以及纽约大学的 B·D·戴维斯 (Davis) 实验室所做工作的结果。前两人利用的是脉孢菌株，后者利用的是大肠杆菌株。