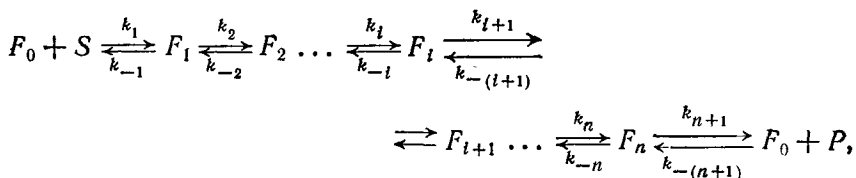


клеток. Сорбция реагентов (именуемых в данном случае *субстратами* фермента) и реакция происходят на некоторой поверхности белковой молекулы. В этом смысле ферментативный катализ сходен с гетерогенным, и действительно, надмолекулярные ферментные системы образуют фазу, отличную от окружающего их раствора. Однако активная поверхность белковой глобулы, молекулы фермента, интравертирована — как показывает рентгеноструктурный анализ, молекулы субстрата входят в некоторую полость в теле глобулы (см. стр. 377, 378). Имеется строгая стехиометрия взаимодействия — как правило, одна белковая глобула взаимодействует с одной молекулой субстрата или другого лиганда. При взаимодействии образуется промежуточное соединение — *фермент-субстратный комплекс (ФСК)*, строение и свойства которого могут быть изучены физическими методами. Таким образом, ферментативный катализ в растворе есть гомогенный катализ, осуществляемый большими глобулярными молекулами, имеющими специфические свойства.

Фермент можно трактовать как «черный ящик», преобразующий входной сигнал — молекулу субстрата, в выходной сигнал — молекулу продукта. Имеются два пути для исследования устройства и механизма работы «черного ящика»: изучение молекулярной структуры фермента и ФСК физическими и химическими методами и изучение кинетики ферментативных реакций.

§ 6.2. КИНЕТИКА ПРОСТЫХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

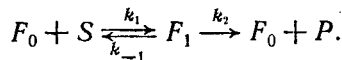
Рассмотрим простейшую ферментативную реакцию с участием одного субстрата и одного продукта реакции, т. е. превращение субстрата в продукт, причем постулируется образование одного или нескольких фермент-субстратных комплексов по схеме *)



где S — субстрат, P — продукт, F_0 — свободный фермент, F_i ($i = 1, 2, \dots, n$) — фермент-субстратный комплексы. Кинети-

*) Здесь и далее (когда это не приводит к недоразумениям) сами реагенты и их концентрации обозначаются одинаково.

соблюдается лишь одно условие, а именно избыток концентрации субстрата над концентрацией фермента ($S \gg E$). Покажем, что это действительно так. Рассмотрим простейший случай $n=1$ и без ограничения общности положим $k_{-2} = 0$; тогда



Соответствующие кинетические уравнения запишутся следующим образом:

$$\dot{S} = -k_1 F_0 S + k_{-1} F_1 \quad \dot{F}_1 = k_1 F_0 S - (k_{-1} + k_2) F_1. \quad (6,30)$$

Исключим F_0 с помощью условия (6,25), т. е. воспользуемся соотношением $F_0 = E - F_1$. Имеем

$$\dot{F}_1 = k_1 E S - (k_{-1} + k_2 + k_1 S) F_1, \quad \dot{S} = -\dot{F}_1 - k_2 F_1. \quad (6,31)$$

Проинтегрируем первое уравнение (6,31), считая S практически постоянным, т. е. рассматривая S как медленно изменяющийся параметр. В момент $t=0$ добавления фермента к субстрату $F_1(0) = 0$ (весь фермент находился в состоянии F_0). Получаем

$$F_1 = \frac{k_1 E S}{k_{-1} + k_2 + k_1 S} (1 - \exp(-t/\tau)), \quad (6,32)$$

где

$$\tau^{-1} = k_{-1} + k_2 + k_1 S.$$

F_1 релаксирует к стационарному значению, отвечающему $\dot{F}_1 = 0$, с временной постоянной τ тем быстрее, чем больше S :

$$\dot{F}_1 = k_1 E S \exp(-t/\tau) \rightarrow 0; \quad (6,33)$$

подставляя значения F_1 из (6,32) и \dot{F}_1 из (6,33) во второе уравнение (6,31), находим

$$\dot{S} = -k_1 E S \exp(-t/\tau) - \frac{k_1 k_2 E S}{k_{-1} + k_2 + k_1 S} (1 - \exp(-t/\tau)), \quad (6,34)$$

т. е. при $t \rightarrow \infty$ \dot{S} стремится к значению

$$\dot{S}_{\text{стан}} = -\frac{k_1 k_2 E S}{k_{-1} + k_2 + k_1 S}. \quad (6,35)$$

Покажем, что при $S \gg E$ относительная скорость изменения S действительно мала. \dot{S} монотонно зависит от времени, и максимальное его значение отвечает начальному моменту $t=0$, причем

$$\dot{S}(0) = -k_1 E S.$$

Максимальной мерой изменения S поэтому является

$$\Delta S = \dot{S}(0) \tau = - \frac{k_1 ES}{k_{-1} + k_2 + k_1 S}.$$

Легко видеть, что при $E \ll S$

$$|\Delta S| \ll S.$$

Вместе с тем

$$\Delta F_1 = \dot{F}_1(0) \tau = \frac{k_1 ES}{k_{-1} + k_2 + k_1 S}$$

и $\Delta F_1/E \gg |\Delta S/S|$.

Условие стационарности состоит лишь в $S \gg E$ и не зависит от соотношений между константами скоростей.

Можно показать, что при $S \gg E$ и любом числе промежуточных комплексов приближенная стационарность по-прежнему сохраняется. Все значения F_i , отвечающие решениям системы неоднородных линейных дифференциальных уравнений, экспоненциально стремятся к стационарным. Приближенная стационарность реализуется вследствие наличия двух шкал времени, отвечающих быстро (F_i) и медленно (S) меняющимся переменным. Малый параметр, характеризующий отношение этих двух шкал, есть ES^{-1} (ср. [12, 13]).

Согласно (6,35) стационарная скорость реакции для случая $n = 1$ равна

$$v \equiv \dot{P} = -\dot{S} = \frac{k_1 k_2 SE}{k_{-1} + k_2 + k_1 S}. \quad (6,36)$$

Такое же выражение получается непосредственно, если написать $v = k_2 F_1$ и найти F_1 из уравнения (6,31), приравняв \dot{F}_1 нулю. Если нельзя пренебречь обратной реакцией, то

$$v = \frac{k_1 k_2 SE - k_{-1} k_{-2} PE}{k_{-1} + k_2 + k_1 S + k_{-2} P}. \quad (6,37)$$

Для ряда реакций k_{-2} мало. В этом случае справедливо уравнение (6,36), которое можно переписать в виде

$$v = \frac{k_2 SE}{K_M + S}, \quad (6,38)$$

где

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}. \quad (6,39)$$

Уравнение (6,38) называется *уравнением Михаэлиса — Ментен*, а константа K_M — *константой Михаэлиса*. Зависимость $v(S)$, описываемая (6,38), подобна изотерме Лэнгмюра (рис. 6.3).

Кривая не имеет особенностей, и скорость реакции асимптотически стремится к наибольшему значению при $S \rightarrow \infty$

$$v_m = k_2 E. \quad (6,40)$$

Следовательно,

$$v = \frac{v_m S}{K_M + S}. \quad (6,41)$$

При $v = 0,5 v_m$ имеем $S = K_M$, т. е. константа Михаэлиса численно равна концентрации субстрата, при которой стационарная скорость реакции равна половине максимальной (дальнейшие подробности см. в [14—16]).

Уравнение (6,41) удобно преобразовать по Лайнуиверу и Бэрку [17]

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_m} \frac{1}{S} + \frac{1}{v_m}. \quad (6,42)$$

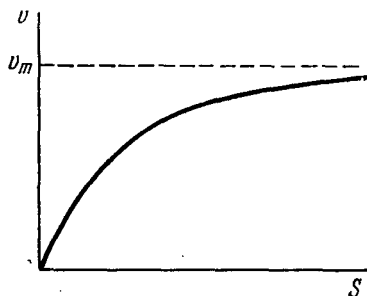


Рис. 6.3. Кривая Михаэлиса —
Ментен.

Строя график зависимости $1/v$ от $1/S$, находим по точке пересечения получающейся прямой

с осью ординат $1/v_m$ и по ее наклону K_M .

Константу Михаэлиса можно представить следующим образом:

$$K_M = k_2/k_1 + K_S,$$

где $K_S = k_{-1}/k_1$. По-видимому, в ряде случаев отличие K_S от K_M невелико, т. е. k_2/k_1 — малая величина. В табл. 6.1 приведены

Таблица 6.1

Значения K_M и K_S для реакций гидролиза

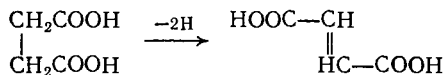
Фермент	Субстрат	K_M моль	K_S моль
Трипсин Химотрипсин	Бензил-2-аргинин	$1,0 \cdot 10^{-5}$	$0,6 \cdot 10^{-5}$
	Этиловый эфир ацетил-2-фенилаланина	$1,0 \cdot 10^{-4}$	$0,9 \cdot 10^{-4}$
Фицин	Этиловый эфир бензил-2-аргинина	$1,5 \cdot 10^{-2}$	$1,2 \cdot 10^{-2}$

значения K_M и K_S , рассчитанные Яковлевым [14] по данным Гутфрейнда.

Уравнение (6,41) можно переписать в виде

$$v_m/v - 1 = K_S/S + v_m/k_1 E S.$$

При данном значении S зависимость $v_m/v - 1$ от v_m изображается прямой линией, отсекающей на оси ординат отрезок K_S/S , ана оси абсцисс отрезок $-k_1EK_S$. Тангенс угла наклона прямой равен $1/k_1ES$. Так как $v_m = k_2E$, то из прямых, полученных при разных значениях S и E , можно найти все три константы скорости k_1, k_{-1}, k_2 . Так, при дегидрировании янтарной кислоты до фумаровой с помощью дегидразы



находим $k_1E = 1,15 \cdot 10^{-2}$ сек⁻¹, $k_{-1}E = 3,6 \cdot 10^{-7}$ моль·сек⁻¹, $k_2E = 5,15 \cdot 10^{-6}$ моль·сек⁻¹, $K_S = 3,13 \times 10^{-5}$ моль [18].

Рассмотрим теперь односубстратную реакцию при наличии модификатора — вещества, взаимодействующего с компонентами реакции и вызывающего заметное изменение скорости выделения продукта. Если модификатор уменьшает скорость, то он называется *ингибитором*. Обозначим его концентрацию I . Рассмотрим схемы двух простых процессов (рис. 6.4). В схеме *a*) свободный фермент наряду с реакционноспособным комплексом F_1 образует, присоединяя ингибитор, неактивный комплекс F_2 . *Ингибитор конкурирует* с субстратом за сорбирующий участок (активный центр) фермента. В схеме *б*) неактивный комплекс F_2 получается в результате взаимодействия уже образовавшегося фермент-субстратного комплекса с ингибитором. Это — *неконкурентное ингибирование*.

Уравнения стационарной кинетики в первом случае записываются следующим образом:

$$\left. \begin{aligned} \dot{F}_0 &= -(k_1S + k_3I)F_0 + (k_{-1} + k_2)F_1 + k_{-3}F_2 = 0, \\ \dot{F}_1 &= k_1SF_0 - (k_{-1} + k_2)F_1 = 0, \\ \dot{F}_2 &= k_3IF_0 - k_{-3}F_2 = 0, \\ E &= F_0 + F_1 + F_2, \\ v &= k_2F_1. \end{aligned} \right\} \quad (6,43)$$

Их решение имеет вид

$$F_1 = \frac{k_1S}{k_{-1} + k_2} F_0, \quad F_2 = \frac{k_3I}{k_{-3}} F_0, \quad E = \left(1 + \frac{k_1S}{k_{-1} + k_2} + \frac{k_3I}{k_{-3}}\right) F_0$$

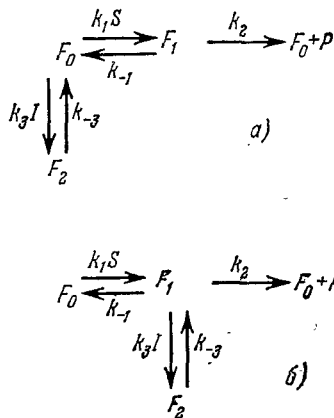


Рис. 6.4. Схемы процессов с конкурентным (а) и неконкурентным (б) ингибированием.

и, следовательно,

$$v = \frac{k_2 k_1 S}{k_{-1} + k_2} F_0 = \frac{k_2 k_1 S E}{(k_{-1} + k_2) (1 + k_1 S / (k_{-1} + k_2) + k_3 I / k_{-3})} = \frac{k_2 S E}{K_M + S + K_M K_I I} = \frac{v_m S}{K_M + S + K_M K_I I}, \quad (6,44)$$

где $K_I = k_3/k_{-3}$. Максимальная скорость при конкурентном ингибировании не меняется, но начальная скорость (при малых S) уменьшается. Во втором случае уравнения кинетики реакций имеют вид

$$\left. \begin{aligned} \dot{F}_0 &= -k_1 S F_0 + (k_{-1} + k_2) F_1 = 0, \\ \dot{F}_1 &= k_1 S F_0 - (k_1 + k_2 + k_3 I) F_1 + k_{-3} F_2 = 0, \\ \dot{F}_2 &= k_3 I F_1 - k_{-3} F_2 = 0, \\ E &= F_0 + F_1 + F_2, \\ v &= k_2 F_1, \end{aligned} \right\} \quad (6,45)$$

а их решение — вид

$$v = \frac{k_2 S E}{K_M + S + K_I S I}. \quad (6,46)$$

При неконкурентном ингибировании оказывается уменьшенной и максимальная скорость

$$v_m = \frac{k_2 E}{1 + K_I I}. \quad (6,47)$$

Мы рассмотрели лишь два крайних случая ингибирования. Зачастую приходится иметь дело с более сложными типами торможения (или, напротив, активации, когда модификатор ускоряет реакцию), например, со смешанным конкурентным и неконкурентным ингибированием и т. д. Эти процессы даже при стационарных условиях требуют решения более сложных уравнений. Математические методы стационарной кинетики сложных ферментативных реакций описаны в § 7.6.

В нестационарных условиях решение даже простых кинетических задач затруднительно. Оно осуществимо в численной, но не в аналитической форме с помощью ЭВМ. Однако расчеты, относящиеся к ранним стадиям ферментативных реакций, к предстационарному режиму, более просты [11]. В этих случаях можно считать, что практически весь субстрат и весь фермент находятся в свободном состоянии. Перепишем второе уравнение (6,30) в виде

$$F_0 = \frac{\dot{F}_1}{k_1 S} + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1 S} F_1;$$

вместе с тем

$$F_1 = \dot{P}/k_2.$$

Продифференцировав последнее соотношение по времени, находим $\dot{F}_1 = \dot{P}/k_2$. Исключая теперь F_0 с помощью $E = F_0 + F_1$, получаем

$$\ddot{P} + k_1(K_M + S)\dot{P} = k_1k_2ES. \quad (6,48)$$

В начальный момент $k_1k_2ES_0 = \dot{P}(0)$. В самом деле, $\dot{P}(0) = = k_2\dot{F}_1(0)$, $F_1(0) \approx 0$, $E \approx F_0(0)$. Следовательно,

$$\dot{F}_1(0) \approx k_1S_0F_0(0) \approx k_1S_0E \quad \text{и} \quad \ddot{P}(0) \approx k_1k_2ES_0.$$

Двойное интегрирование по времени при $S = S_0$ дает

$$P(t) = \frac{k_2ES_0}{K_M + S_0} \left[t + \frac{\exp[-k_1(K_M + S_0)t] - 1}{k_1(K_M + S_0)} \right]. \quad (6,49)$$

С ростом t функция $P(t)$ асимптотически приближается к прямой

$$P(t) = \frac{k_2ES_0}{K_M + S_0} \left[t - \frac{1}{k_1(K_M + S)} \right],$$

которая отсекает на оси t отрезок

$$\tau_1 = 1/k_1(K_M + S_0)$$

и имеет тангенс угла наклона $k_2ES_0/(K_M + S)$.

Изучая предстационарную кинетику, можно, очевидно, определить константы k_1 и k_2 , если из стационарных измерений известна постоянная K_M . Тем самым, находятся все три константы скорости [11, 19].

§ 6.3. ТЕРМОДИНАМИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Термодинамические характеристики ферментативных реакций находят с помощью формулы (6,22). Константы скорости, определенные из кинетических экспериментов, интерпретируют, предполагая, что рассматриваемый процесс адиабатичен. Свободную энергию, энтальпию и энтропию активации находят из температурной зависимости k . Согласно (6,22)

$$\frac{d \ln k}{dT} = \frac{1}{T} + \frac{H^*}{RT^2} = \frac{H^* + RT}{RT^2}, \quad (6,50)$$

что совпадает с уравнением Аррениуса, если $E^* = H^* + RT$. Вместе с тем

$$F^* = H^* - TS^* = -RT \ln k + RT \ln(kT/h).$$