

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

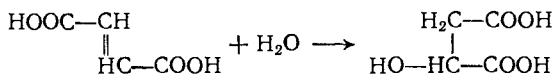
Термодинамические характеристики ферментативных реакций находят с помощью формулы (6,22). Константы скорости, определенные из кинетических экспериментов, интерпретируют, предполагая, что рассматриваемый процесс адиабатичен. Свободную энергию, энтальпию и энтропию активации находят из температурной зависимости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

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

Исследование зависимости  $\ln k$  от  $T$  позволяет определить  $F^*$ ,  $S^*$  и  $H^*$ . На рис. 6.5 и 6.6 показаны найденные таким образом кривые свободной энергии и энтальпии для реакции превращения фумарата в малат, катализируемой фумаразой [20]



Большое различие между двумя кривыми свидетельствует о важной роли энтропийного фактора. Он настолько существен

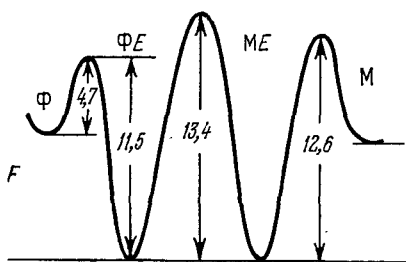


Рис. 6.5. Кривая свободной энергии для реакции фумарат  $\rightleftharpoons$  малат. Ф—фумарат, М—малат, ФЕ, МЕ—их комплексы с ферментом. Числа у кривых указывают энергии в ккал/моль.

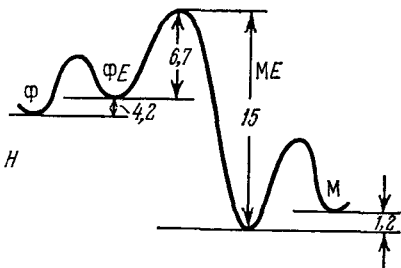


Рис. 6.6. Кривая энтальпии для реакции фумарат  $\rightleftharpoons$  малат.

в ферментативных реакциях, что путь реакции может пройти не через седловую точку с относительно наименьшей потенциальной энергией, а через точку, отвечающую большей энергии, но и большей энтропии [21].

В табл. 6.2 приведены значения активационных параметров нескольких ферментативных реакций, описываемых в стационарных условиях формулой типа (6,36), и величины разностей  $\Delta F$ ,  $\Delta H$ ,  $\Delta S$ , отвечающие «константе равновесия»  $k_2/k_1$  [21]. Свободные энергии и энтальпии даны в ккал/моль, энтропии — в кал/моль·град. Напомним, что при 300°K 33,3 энтропийных единицы дают вклад в свободную энергию, равный 10 ккал/моль. Как мы видим из табл. 6.2, энтропийные факторы действительно весьма существенны (см. также [22]).

Блюменфельд проанализировал вопрос о достоверности термодинамических данных, получаемых из кинетических измерений [23, 134].

Температурная зависимость констант скоростей для ферментативных реакций характеризуется рядом особенностей. Во многих случаях наблюдаются оптимальные значения констант при некоторых температурах, значительно меньших температуры

Таблица 6.2

Термодинамические параметры простых ферментативных реакций<sup>1)</sup>

Фермент	Субстрат	$F_1^*$	$H_1^*$	$S_1^*$	$F_2^*$	$H_2^*$	$S_2^*$	$\Delta F$	$\Delta H$	$\Delta S$
Химотрипсин	Метилгидроциннамат	17,8	10,9	-23,2	19,7	16,2	-11,8	1,9	-5,3	-11,4
	Метил-D- $\beta$ -фениллактат	16,6	2,5	-47,2	18,7	14,5	-14,2	-2,2	-12,0	-33,0
	Метил-L- $\beta$ -фениллактат	14,7	3,2	-38,5	17,5	10,5	-23,4	-2,8	-7,3	-15,1
	Бензоил-L-тирозин этиловый эфир	10,7	0,2	-38,5	15,0	8,6	-21,4	-3,3	-8,4	-17,1
	Бензонл-L-тирозинамид	16,9	3,1	-43,0	17,9	14,0	-13,0	9,9	-9,9	-30,0
Ацетилхолинэстераза	Ацетилхолин	2,5	(14-19)	(34-52)	8	(14-19)	(16-34)	-5,5	0	18,5
	Диметиламиноэтилацетат	5,5	(6,7-8)	(4-8)	9,9	(6,7-8)	-(16,5-10,5)	-4,4	0	14,6
Карбоксипептидаза	Аминоэтилацетат	9,7	9,5	-0,6	12,2	9,5	-9	-2,5	0	8,4
	Карбобензоксид-L-триптофан	16	21	17	19,3	16	-11	-3,4	5	-28
	Карбобензоксиглицил-L-фенилаланин	11,8	8,5	-11	14,4	8,8	-18	-2,5	-0,4	-7
	Карбобензоксиглицил-L-триптофан	11,9	9,9	-8,5	15,3	9,3	-20	-3,4	0	-11,5
Пепсин	Карбобензоксид-L-глутамил-L-тирозин этиловый эфир	18,3	22,5	14,1	22,1	20,1	-6,5	-4,7	1,4	20,6
	Карбобензоксид-L-глутамил-L-тирозин	18,8	19,6	2,6	23,1	16,6	-21,8	-4,3	3,0	24,4
Уреаза АТФаза	Мочевина	8,2	6,2	-6,8	11,3	9,1	-7,2	-3,2	-2,9	0,9
	АТФ	7,3	20,4	44,0	14,4	12,4	-8,0	-7,5	8	52

<sup>1)</sup> Нижние индексы 1 и 2 указывают первый и второй барьеры процесса.

денатурации. Природа этого максимума не ясна. Кинетические измерения можно вести лишь в узком температурном интервале. Активационные параметры сильно зависят от ионного состава раствора, они резко меняются при замене субстрата другим сходным с ним соединением и даже при замене фермента тем же ферментом, но полученным из другого источника. При этом сами константы  $k$  могут меняться мало, но меняются и энергия активации, и предэкспоненциальный множитель. Наконец, наблюдается линейная зависимость между значениями  $H^*$  и  $S^*$ :

$$H^* = \alpha' + T_{\kappa} S^*. \quad (6,51)$$

Этот эффект обсуждается далее.

Допустим, что истинный активационный барьер для данной стадии ферментативного процесса слабо зависит от температуры, поскольку организованная глобула фермента ведет себя как кооперативная система. Иными словами, сама структура глобулы зависит от температуры. Допустим также, что при этом истинное значение  $S^*$  не зависит от температуры. В узком интервале температур зависимость  $H^*(T)$  можно считать линейной, т. е.

$$H^* = H_0^* - bT, \quad b > 0.$$

Тогда уравнение Аррениуса (см. (6,1)) принимает вид

$$k = A \exp(b/R) \exp(-H_0^*/RT),$$

и опыт дает не истинное значение  $H^*$ , но  $H_0^*$ , и не истинное значение  $S^*$ , но  $S_0^* = S^* + b$ . Можно записать

$$H_0^* = H^* + T(S_0^* - S^*) = F^* + TS_0^*.$$

Величина  $H_0^*$  получается путем экстраполяции слабой температурной зависимости  $H^*$  к  $T \rightarrow 0^\circ\text{K}$ . Если, например, между  $20$  и  $30^\circ\text{C}$  истинное значение  $H^*$  возрастает мало, то измеряемая величина  $H_0^*$  может возрасти очень сильно. Мы видим, что если истинные активационные параметры испытывают малые изменения и измерения проводятся в узком температурном интервале, то кажущиеся значения  $H_0^*$  и  $S_0^*$  связаны друг с другом линейно, причем  $\alpha'$  в уравнении (6,51) есть свободная энергия активации, а  $T_{\kappa}$  — температура опыта.

Эти особенности в температурных зависимостях  $k$  свидетельствуют о структурных перестройках глобулы. Мы видим, что измеряемые активационные параметры имеют смысл лишь некоторых эффективных величин. Для установления истинных значений этих параметров необходимы детальные исследования конструкции фермента и механизма его действия. Кинетические измерения здесь недостаточны.

Рядом авторов был обнаружен и изучен так называемый *компенсационный эффект* [24—26]. Изменения энтальпии в процес-

сах, протекающих в водных растворах, зачастую пропорциональны изменениям энтропии. То же относится к энтальпии и энтропии активации. Соблюдается условие, подобное (6,51):

$$\Delta H = \alpha + T_K \Delta S. \quad (6,52)$$

Речь идет о процессах с участием малых молекул. К ним относятся ионизация слабых электролитов, сольватация ионов и неэлектролитов, реакции гидролиза и окислительно-восстановительные реакции, тушение флуоресценции индола и т. д. Во всех случаях  $T_K$ , называемая температурой компенсации, варьирует от 250 до 315 °К. Изменение свободной энергии равно

$$\Delta F = \Delta H - T \Delta S = \alpha + (T_K - T) \Delta S, \quad (6,53)$$

и свободная энергия активации

$$F^* = H^* - TS^* = \alpha' + (T'_K - T) S^*. \quad (6,54)$$

Величины  $\alpha$ ,  $\alpha'$ , а также  $T_K - T$  и  $T'_K - T$  сравнительно малы. Эффект компенсации заключается в том, что существенные изменения энтальпии и энтропии компенсируют друг друга и изменение свободной энергии относительно мало.

Изменения  $H$  и  $S$  при растворении неполярных веществ в воде можно представить соотношениями

$$\left. \begin{aligned} \Delta H(T, x_2) &\approx \Delta H(T_0, 0) + \int_0^{x_2} \frac{\partial \Delta H(T_0, x_2)}{(\partial x_2)_{T_0}} dx_2 + \int_{T_0}^T \Delta c_p(T, x_2) dT, \\ \Delta S(T, x_2) &= \Delta S(T_0, 0) + \int_0^{x_2} \frac{\partial \Delta S(T_0, x_2)}{(\partial x_2)_T} dx_2 + \int_{T_0}^T \frac{\Delta c_p(T, x_2)}{T} dT, \end{aligned} \right\} (6,55)$$

где  $T_0$  — температура сравнения,  $x_2$  — концентрация растворенного вещества. Если справедливо (6,52), то

$$\begin{aligned} \alpha = \Delta H(T_0, 0) - T_K \Delta S(T_0, 0) &+ \int_0^{x_2} \frac{\partial \Delta H}{(\partial x_2)_{T_0}} dx_2 - T_K \int_0^{x_2} \frac{\partial \Delta S}{(\partial x_2)_{T_2}} dx_2 + \\ &+ \int_{T_0}^T \Delta c_p(T, x_2) dT - T_K \int_{T_0}^T \frac{\Delta c_p(T, x_2)}{T} dT. \end{aligned} \quad (6,56)$$

Величина  $\alpha$  мала и приближенно постоянна, если  $\Delta c_p$  слабо зависит от температуры.

Ламри и Ражендер [26] предположили, что эффект компенсации определяется свойствами воды. Допустим, что реакция  $A \rightarrow B$  сопровождается изменением состояния  $n$  молекул воды



Тогда

$$\Delta H = \Delta H_{A \rightarrow B} + n \Delta H_{w_1 \rightarrow w_2},$$

$$\Delta S = \Delta S_{A \rightarrow B} + n \Delta S_{w_1 \rightarrow w_2}.$$

Если величины  $\Delta H_{A \rightarrow B}$  и  $\Delta S_{A \rightarrow B}$  малы, а переход  $w_1 \rightarrow w_2$  подобен фазовому, то

$$T_K = \frac{\Delta H_{w_1 \rightarrow w_2}}{\Delta S_{w_1 \rightarrow w_2}} \quad \text{и} \quad \Delta F_{w_1 \rightarrow w_2} (T = T_K) = 0.$$

Компенсационный эффект свойствен ферментативным процессам. Так, при гидролитическом расщеплении этилового эфира N-ацетил-L-триптофана химотрипсина  $\Delta F$  очень мало, а  $\Delta H$  и  $\Delta S$  велики. В сущности, почти все данные, приведенные в последних трех столбцах табл. 6.2, свидетельствуют о компенсации. Связывание ряда ингибиторов ацетилхолинэстеразой также сопровождается компенсацией —  $\Delta H$  варьирует в этих процессах от  $-7$  до  $+2$  ккал/моль, а  $\Delta S$  от  $-10$  до  $+20$  кал/моль·град [26]. Если здесь справедливо предположение об определяющей роли воды, то нужно установить, как влияет на поведение белковых молекул окружающая водная структура. Ламри и Ражендер считают, что связь белка с водой проявляется в изменении объема белковой молекулы в ходе реакции. Как будет показано в §§ 6.5 и 6.7, ферментативная активность зависит от конформационных превращений белка и, тем самым, глобулы могут изменять свой объем. Изменение энергии водно-белковой системы можно представить в виде

$$dE = T dS - p dV + W_w dV_w + W_p dV_p + \sigma dA, \quad (6.57)$$

где  $W_w$  — удельная работа изменения свободного объема воды на  $dV_w$ ,  $W_p$  — аналогичная величина для белка,  $\sigma$  — удельная работа изменения поверхности, разделяющей белковые молекулы и воду, на  $dA$ . Изменение свободной энергии равно

$$dF = dH - T dS - S dT = dE + p dV + V dp - T dS - S dT$$

и, согласно (6.57),

$$dF = -S dT + V dp + W_w dV_w + W_p dV_p + \sigma dA,$$

а при постоянных  $T$  и  $p$

$$dF = W_w dV_w + W_p dV_p + \sigma dA. \quad (6.58)$$

В ферментативных реакциях, изученных Васловым и Доэрти [27], максимальное измеренное изменение  $H$ , компенсируемое  $\Delta S$ , приблизительно равно  $-27$  ккал/моль и соответственно  $\Delta S \approx -100$  кал/моль·град. Полное максимальное изменение объема воды, оцененное по структурной релаксации, составляет

—83 мл/моль, что менее 0,5% от объема белка. Непосредственное наблюдение этого эффекта затруднительно. Тем не менее высказанные предположения физически осмысленны. Изменение конформации белка, вытеснение воды из внутренней полости глобулы молекулой субстрата могут вызвать перестройку окружающей водной структуры.

«Водный» компенсационный эффект может иметь важное физиологическое значение для теплокровных организмов и, тем самым, для эволюции в целом. Малость изменений свободной энергии вследствие компенсации означает малую чувствительность соответствующих ферментативных процессов к температурным изменениям в окружающей среде.

Существование компенсационного эффекта и его объяснение нельзя, однако, считать строго доказанным. Эффект может объясняться просто неправильным применением уравнения Аррениуса, как это показал Блюменфельд (см. стр. 370). Вопрос остается открытым, пока нет достоверных определений истинных термодинамических параметров. Тем не менее результаты рассмотрения компенсационного эффекта указывают на важные особенности ферментативных процессов.

Как уже отмечалось, понимание структуры и свойств белковых молекул невозможно без учета их водного окружения (см. гл. 4). Рассмотрение ферментов в водном растворе как целостной системы необходимо и для изучения термодинамики ферментативных процессов. Такой системный подход характерен для методологии современной физики. Вычленение белковых молекул из окружающей их водной среды незаконмерно в строгой теории. Это относится и к кинетике. Теория абсолютных скоростей реакций, переносящая на ферменты положения, справедливые для газовых реакций, пригодна лишь для грубых оценок. Теория ферментативных реакций требует учета физических свойств среды.

#### **6.4. ХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ**

Характерные особенности ферментативного катализа — большая активность и строгая специфичность по отношению к субстрату или группе субстратов.

Молекулярной активностью фермента называется число молекул субстрата, превращаемых в 1 мин одной молекулой фермента при оптимальной концентрации субстрата. Молекулярная активность может быть выражена и как *число оборотов* (Варбург) — число молей превращенного субстрата, приходящееся на моль фермента за 1 мин.