

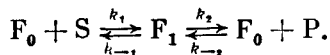
Обратимся к катализу. Как уже сказано, роль катализатора состоит в снижении свободной энергии активации, и, следовательно, в увеличении константы скорости реакции. Нужно различать *гетерогенный* и *гомогенный катализ*. В первом случае катализатор образует отдельную фазу, и реакция протекает на поверхности раздела фаз. Процесс начинается с *адсорбции* реагентов на этой поверхности, скажем, на поверхности твердого катализатора, ускоряющего реакцию в газе или в жидкости. Адсорбция сопровождается изменением электронной структуры реагентов и понижением свободной энергии активации. После прохождения реакции продукты десорбируются с поверхности. При гомогенном катализе катализатор и реагенты находятся в одной фазе, например в растворе. Катализатор образует промежуточное соединение с реагентами, далее распадающееся на катализатор и продукты реакции.

Ферменты функционируют либо в растворах, либо в надмолекулярных структурах. Сорбция реагентов, именуемых *субстратами*, и реакция протекают на некоторой поверхности большой молекулы белка. В этом смысле ферментативный катализ сходен с гетерогенным. Однако белок-фермент и малые молекулы субстратов находятся в одной фазе в растворе. Имеется строгая стехиометрия взаимодействия — как правило, одна белковая глобула взаимодействует с одной молекулой субстрата или другого лиганда. При взаимодействии образуется *фермент-субстратный комплекс* (ФСК), строение и свойства которого изучаются физическими и химическими методами. Ферментативный катализ в растворе — гомогенный катализ.

Можно рассматривать фермент как «черный ящик», преобразующий входной сигнал — молекулу субстрата в выходной сигнал — молекулу *продукта*. Имеются два способа для исследования устройства и механизма работы «черного ящика»: изучение молекулярной структуры фермента и ФСК и изучение кинетики ферментативных реакций.

§ 6.2. Кинетика простых ферментативных реакций

Рассмотрим простейшую ферментативную реакцию превращения субстрата в продукт в одностадийном процессе



Здесь F_0 — свободный фермент, S — субстрат, F_1 — ФСК, P — продукт. У стрелок указаны константы скорости реакций. Положим, для простоты, что можно пренебречь k_{-2} — обратной реакцией. Кинетические уравнения имеют вид (здесь F_0 , S , P — концентрации)

$$\begin{aligned} \dot{S} &= -k_1 F_0 S + k_{-1} F_1, \\ \dot{F}_1 &= k_1 F_0 S - (k_{-1} + k_2) F_1, \\ \dot{P} &= -\dot{S} = k_2 F_1. \end{aligned} \quad (6.19)$$

Общая концентрация фермента постоянна

$$F_0 + F_1 = E = \text{const.} \quad (6.20)$$

Исключая из второго уравнения (6.19) F_0 с помощью (6.20), получим

$$\dot{F}_1 = k_1 ES - (k_{-1} + k_2 + k_1 S) F_1. \quad (6.21)$$

Система находится в стационарном состоянии, если имеется большой избыток субстрата, $S \gg E$. Пока сохраняется стационарное состояние, $\dot{F}_1 = 0$ (и, конечно, $\dot{F}_0 = 0$). Поясним это наглядным примером. Нужно завязать ботинки. Это можно быстрее сделать, поставив ногу на стул, который тем самым играет роль катализатора. Субстрат — незавязанный ботинок, продукт — завязанный, свободный фермент — свободный стул, ФСК — нога; поставленная на стул. Если завязать ботинки нужно большому числу людей (скажем, матросам по тревоге), а число стульев невелико, то число стульев, на которые поставлены ноги, будет в течение некоторого времени постоянным.

Итак, в стационарном состоянии $\dot{F}_1 = 0$ и из (6.21) получаем

$$F_1 = \frac{k_1 ES}{k_{-1} + k_2 + k_1 S}. \quad (6.22)$$

Из (6.19) следует, что

$$v = \dot{P} = -\dot{S} = k_2 F_1 = \frac{k_1 k_2 SE}{k_{-1} + k_2 + k_1 S}, \quad (6.23)$$

v — скорость реакции. Поделив числитель и знаменатель на k_1 , получаем уравнение Михаэлиса — Ментен:

$$v = \frac{k_2 SE}{K_M + S}, \quad (6.24)$$

где константа Михаэлиса

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}. \quad (6.25)$$

Прежде чем рассмотреть это уравнение, докажем, что стационарное состояние действительно реализуется при $S \gg E$. Проинтегрируем уравнение (6.21), 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 свободен). Получаем

$$F_1 = \frac{k_1 ES}{k_{-1} + k_2 + k_1 S} (1 - e^{-t/\tau}), \quad (6.26)$$

где

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

ФСК F_2 релаксирует к стационарному значению, отвечающему $F_1 = 0$, с временной постоянной τ тем быстрее, чем больше концентрация субстрата S . Из (6.26) следует, что

$$F_1 = k_1 ES \exp(-t/\tau) \rightarrow 0. \quad (6.27)$$

Подставляя значения F_1 (6.26) и \dot{F}_1 (6.27) в первое уравнение (6.19),

находим

$$\dot{S} = -k_1 ES \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) - \frac{k_1 k_2 ES}{k_{-1} + k_2 + k_1 S} \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right)\right], \quad (6.28)$$

т. е. при $t \rightarrow \infty$ величина \dot{S} действительно стремится к стационарному значению (6.23). Это связано с исходным предположением о медленном изменении S . Относительная скорость изменения S действительно мала при $S \gg E$. Величина \dot{S} монотонно убывает во времени, ее максимальное значение отвечает начальному моменту $t = 0$:

$$S(0) = -k_1 ES.$$

Максимальной мерой изменения S поэтому является

$$\Delta S \approx \dot{S}(0) \tau = -\frac{k_1 ES}{k_{-1} + k_2 + k_1 S}. \quad (6.29)$$

Легко видеть, что при $E \ll S$

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

Вместе с тем $\Delta F_1 \approx \dot{F}_1(0) \tau \approx -\Delta S$ и $\Delta F_1/E \gg |\Delta S|/S$.

Вернемся к уравнению Михаэлиса — Ментен (6.24). Зависимость $v(S)$ подобна изотерме Ленгмюра (рис. 6.2). Кривая не имеет особенностей, скорость реакции асимптотически стремится к своему наибольшему значению при $S \rightarrow \infty$:

$$v_{\max} = k_2 E. \quad (6.30)$$

Следовательно,

$$v = \frac{v_{\max} S}{K_M + S}. \quad (6.31)$$

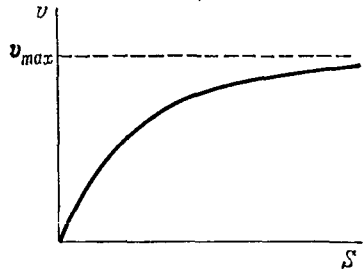


Рис. 6.2. Кривая Михаэлиса — Ментен

При $v = 0,5 v_{\max}$ имеем $S = K_M$,

т. е. константа Михаэлиса есть

концентрация субстрата, при которой скорость реакции равна половине максимальной.

Уравнение (6.31) удобно преобразовать по Лайнуиверу и Бэрку:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_{\max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{v_{\max}}. \quad (6.32)$$

Строя график зависимости $1/v$ от $1/S$, находим $1/v_{\max}$ по точке пересечения прямой с осью ординат и K_M по наклону прямой. Константу Михаэлиса можно представить в виде

$$K_M = k_2/k_1 + K_S, \quad \text{где } K_S = k_{-1}/k_1.$$

Все три константы скорости можно определить, представив (6.32) с помощью (6.30) в виде

$$\frac{v_{\max}}{v} - 1 = \frac{K_S}{S} + \frac{v_{\max}}{k_1 ES}. \quad (6.33)$$

При данном значении S зависимость $v_{\max}/v - 1$ от v_{\max} изображается прямой линией, отсекающей на оси ординат отрезок K_s/S , а на оси абсцисс отрезок $-1/k_1ES$. Из прямых, полученных при разных значениях S и E , можно найти k_1, k_{-1}, k_2 .

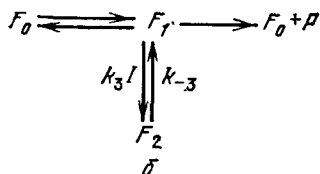
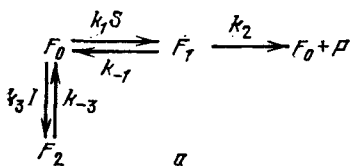


Рис. 6.3. Схемы процессов с конкурентным (а) и неконкурентным (б) ингибированием

Рассмотрим теперь такую же реакцию при наличии модификатора — вещества, вызывающего изменение скорости реакции. Если модификатор замедляет реакцию, то он называется *ингибитором*, в противном случае — *активатором*. Обозначим концентрацию ингибитора через I . На рис. 6.3 представлены графические схемы (графы) для двух простейших случаев ингибирования. При *конкурентном ингибировании* фермент, наряду с ФСК, образует неактивный комплекс с I , обозначаемый F_2 . Ингибитор конкурирует с субстратом, связываясь с активным центром фермента.

При *неконкурентном ингибировании* комплекс F_2 образуется при взаимодействии ФСК F_1 с I .

Уравнения стационарной кинетики при $S \gg E, I \gg E$ в первом случае имеют вид

$$\begin{aligned}
 \dot{F}_0 &= -(k_1 S + k_3 I) F_0 + (k_{-1} + k_2) F_1 + k_{-3} F_2 = 0, \\
 \dot{F}_1 &= k_1 S F_0 - (k_{-1} + k_2) F_1 = 0, \\
 \dot{F}_2 &= k_3 I F_0 - k_{-3} F_2 = 0, \\
 E &= F_0 + F_1 + F_2, \quad v = k_2 F_1.
 \end{aligned}
 \quad (6.34)$$

Их решение имеет вид

$$F_1 = \frac{k_1 S}{k_{-1} + k_2} F_0, \quad F_2 = \frac{k_3 I}{k_{-3}} F_0, \quad E = \left(1 + \frac{k_1 S}{k_{-1} + k_2} + \frac{k_3 I}{k_{-3}} \right) F_0.$$

и, следовательно,

$$v = \frac{k_2 k_1 S}{k_{-1} + k_2} F_0 = \frac{k_2 S E}{K_M + S + K_M K_I I},
 \quad (6.35)$$

где $K_I = k_3/k_{-3}$. Максимальная скорость $v_{\max} = k_2 E$ не меняется, но скорость при малых S убывает.

При *неконкурентном ингибировании*

$$\begin{aligned}
 \dot{F}_0 &= -k_1 S F_0 + (k_{-1} + k_2) F_1 = 0, \\
 \dot{F}_1 &= k_1 S F_0 - (k_{-1} + k_2 + k_3 I) F_1 + k_{-3} F_2 = 0, \\
 \dot{F}_2 &= k_3 I F_1 - k_{-3} F_2 = 0, \\
 E &= F_0 + F_1 + F_2, \quad v = k_2 F_1.
 \end{aligned}
 \quad (6.36)$$

Решение имеет вид

$$v = \frac{k_2 S E}{K_M + S + K_I S I} \quad (6.37)$$

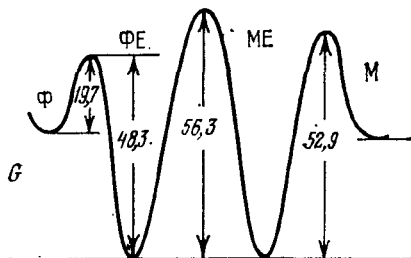
При этом уменьшается максимальная скорость

$$v_{\max} = \frac{k_2 E}{1 + k_I I} \quad (6.38)$$

На практике зачастую ситуация более сложна.

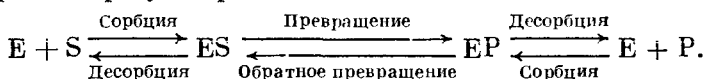
В нестационарных системах решение даже простых кинетических задач требует применения ЭВМ. Числовые решения дают

Рис. 6.4. Кривая свободной энергии для реакции $\Phi \rightleftharpoons M$ (фумарат \rightleftharpoons малат). ΦE , ME — комплексы с ферментами. Числа — энергия G в кДж/моль



более богатую информацию о константах скорости, необходимую в сложных случаях.

В действительности даже в простых случаях превращение субстрата в продукт протекает в несколько стадий:



Здесь E есть F_0 , $ES \rightleftharpoons EP$ мы ранее обозначили через F_1 . Исследование зависимости констант скорости от температуры позволяет определять эффективные значения свободной энергии, энтальпии и энтропии активации. Реакция имеет сложный профиль для этих величин (рис. 6.4). Они были определены для многих процессов, причем выяснилась большая роль энтропийного вклада.

Для G^+ ферментативных реакций характерны величины порядка 40—80 кДж/моль, для H^+ — того же порядка, для S^+ — 40—160 Дж/(моль · К). Напомним, что при 300 К 140 Дж/(моль · К) дают вклад в свободную энергию, равный 42 кДж/моль. Установлен так называемый *компенсационный эффект*. Изменения энтальпии ΔH в процессах, протекающих в водных растворах, зачастую пропорциональны изменениям энтропии ΔS . То же относится к активационным параметрам: H^+ пропорционально S^+ . Ламри предположил, что этот эффект определяется свойствами воды: изменение конформации белка, сопровождаемое вытеснением воды из активной полости глобулы, вызывает перестройку

окружающей водной структуры. Компенсационный эффект может быть важен для теплокровных организмов. Малость изменений ΔG и G^+ вследствие компенсации означает малую чувствительность ферментативных процессов к температурным изменениям в окружающей среде.

Однако значения G^+ , H^+ и S^+ для ферментативных реакций условны. Кинетические измерения можно вести лишь в узком температурном интервале. Активационные параметры сильно зависят от ионного состава среды, от рН и т. д. При этом уравнение Аррениуса может не выполняться, так как глобула испытывает структурные перестройки, зависящие от температуры. Указанная интерпретация компенсационного эффекта может оказаться иллюзорной. Эти вопросы остаются пока открытыми.

Существенная зависимость ферментативной активности от рН среды определяется полиэлектролитной природой фермента. Ферментативная активность, характеризуемая, в частности, константой k_2 , зависит от рН колоколообразно — k_2 имеет максимум при некотором значении рН и убывает при уменьшении или увеличении рН. Предложен ряд теоретических моделей, объясняющих в общих чертах такую зависимость. Подлинная теория требует, однако, более подробных сведений о ферментах, чем нам пока известны.

§ 6.3. Химические аспекты действия ферментов

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

Молекулярной активностью или *числом оборотов* фермента называется число молей субстрата, превращаемых в одну минуту одним молем фермента при значительном избытке субстрата, $S \gg E$. Свойства ферментов изучаются *in vitro*. Многие ферменты получены в кристаллической форме.

Субстраты — малые молекулы или малые группы больших молекул. Напротив, фермент макромолекулярен. Следовательно, субстрат непосредственно взаимодействует с определенным малым участком молекулы фермента — с ее *активным центром*. Природа активного центра, т. е. совокупность и расположение аминокислотных остатков, а также *кофакторов* (см. с. 48), входящих в его состав, установлена для ряда ферментов. Мы уже упоминали о фермент-субстратном узнавании (с. 58). Изменения активности, возникающие в результате химической модификации белка, позволяяют выявить функциональные группы активного центра. Сведения о его структуре дают оптические и спектральные методы, а также рентгеноструктурный анализ комплексов фермента с конкурентными ингибиторами, строение которых близко к строению субстратов.