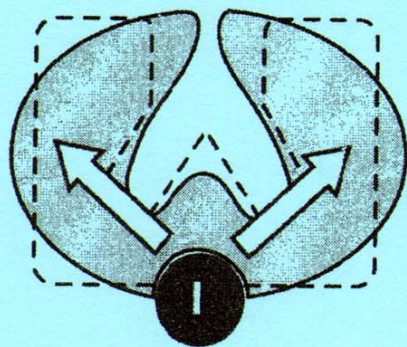


**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ УКРАИНЫ**  
**НАЦИОНАЛЬНЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ**  
**"Харьковский политехнический институт"**

**А.Н. Огурцов**

**КИНЕТИКА**  
**ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ**



**Харьков 2007**

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ УКРАИНЫ**  
**НАЦИОНАЛЬНЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ**  
**"Харьковский политехнический институт"**

**А. Н. Огурцов**

**КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ**  
**РЕАКЦИЙ**

**Учебное пособие**

**по курсу "ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ КАТАЛИЗ"**

для студентов специальности 092901  
"Промышленная биотехнология"

Утверждено  
редакционно-издательским  
советом университета,  
протокол № 3 от 08.12.2006 г.

Харьков НТУ "ХПИ" 2007

ББК 28.072

О 39

УДК 577.15

Рецензенты:

*А.И. Божков*, д-р биол. наук, профессор, Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина,

*В.В. Давыдов*, д-р мед. наук, профессор, ИОЗДП АМН Украины,

*Р.Д. Сытник*, д-р техн. наук, профессор, НТУ "ХПИ".

Навчальний посібник містить основні поняття та уявлення теорії регулювання ферментативних процесів, формальну кінетику ферментативного каталізу, приклади регулювання біокаталітичних процесів та методи дослідження ферментативних реакцій.

Призначений для студентів спеціальностей біотехнологічного профілю, а також усім, хто вивчає ензимологію або цікавиться її проблемами.

**Огурцов А. Н.**

О 39 Кинетика ферментативных реакций: Учеб. пособие по курсу "Ферментативный катализ" для студ. спец. 092901 "Промышленная биотехнология" / А. Н. Огурцов. – Харьков: НТУ "ХПИ", 2007. – 146 с.

ISBN 978966-384-051-2

Учебное пособие включает основные понятия и представления теории регулирования ферментативных процессов, формальную кинетику ферментативного катализа, примеры регулирования биокаталитических процессов и методы исследования ферментативных реакций.

Предназначено для студентов специальностей биотехнологического профиля, а также всем, кто изучает энзимологию или интересуется ее проблемами.

Ил. 49. Табл. 4. Библиогр. 36 назв.

**ББК 28.072**

ISBN 978966-384-051-2

© А.Н. Огурцов, 2007 г.

**ВСТУПЛЕНИЕ**

Раздел "Кинетика ферментативных реакций", завершающий в курсе "Ферментативный катализ", изучается после разделов "Теоретические основы биокатализа" и "Механизмы ферментативных процессов". Практические задания, выносимые на экзамен, основываются главным образом на материале раздела "Кинетика ферментативных реакций". Предметом раздела "Кинетика ферментативных реакций", как и всей учебной дисциплины "Ферментативный катализ", являются биофизические и биохимические механизмы ферментативных процессов в живой клетке и методы контроля и управления скоростью протекания и специфичностью биокаталитических процессов. Научную основу курса "Ферментативный катализ" составляют физика и биофизика, общая, органическая, аналитическая, физическая химия и биохимия, молекулярная биология и общая промышленная биотехнология.

Методическими основами курса являются лекции, в которых излагаются основные положения каждого раздела, практические занятия и самостоятельная работа студентов, которая является основным способом усвоения материала в свободное от аудиторных занятий время.

Для самостоятельной работы выделяется более половины общего объема времени, предназначенного для изучения данной дисциплины. Самостоятельная работа проводится по всем темам, которые входят в дисциплину. В процессе самостоятельной работы студент учится самостоятельно приобретать знания, которые затем используются в ходе выполнения индивидуальной самостоятельной работы, практических занятий, при подготовке к выполнению контрольных работ и к экзамену.

Настоящее пособие подготовлено на основе работ [1–17] таким образом, чтобы максимально облегчить усвоение раздела "Кинетика ферментативных реакций" и обеспечить учебно-методическую основу для выполнения практических заданий и подготовку к экзамену по курсу "Ферментативный катализ" студентам специальности 092901 "Промышленная биотехнология".

## 1. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ ЭНЗИМОЛОГИИ

**Ферменты** (от латинского *fermentum* – закваска), **энзимы** (от греческого *en* – "в" и *zyme* – "закваска") или **биокатализаторы**, – это вещества биологического происхождения, ускоряющие химические реакции.

Для того чтобы не смешивать слова различных языков, принято называть науку, изучающую ферменты и катализируемые ими реакции, **энзимологией** (от греческих слов *en*, *zyme*, *logos*).

Организованная последовательность процессов обмена веществ – **метаболизм** – возможна при условии, что каждая клетка обеспечена собственным генетически заданным набором ферментов.

В живой клетке множество разнообразных соединений, но реакции между ними не беспорядочны, а образуют строго определенные, характерные для данной клетки **метаболические пути** – согласованные последовательности реакций.

Индивидуальность клетки в большой степени определяется уникальным набором ферментов, который она генетически запрограммирована производить. Нехватка какого-либо фермента или какой-нибудь его дефект могут иметь очень серьезные отрицательные последствия для организма.

Регуляция метаболических процессов ферментами обеспечивает соответствие обмена веществ измененным условиям.

Почти все ферменты являются белками. Однако, известны также каталитически активные нуклеиновые кислоты – **рибозимы**.

Вещество, на которое действует фермент, называется **субстратом** (от латинского *substratum* – подстилка, основа).

Существуют сложные двух- и многокомпонентные ферменты, содержащие как белковые, так и небелковые компоненты.

**Апоферментом** (*apoenzyme*) называется белковый компонент такого сложного фермента.

**Кофактором** (*cofactor*) называется небелковый компонент сложного фермента.

Ферментативной активностью обладает только комплекс апофермент-кофактор, который называется **холоферментом** (*holoenzyme*).

*Апофермент + кофактор = холофермент*

*Апоenzyme + cofactor = holoenzyme*

Кофакторы можно разделить на **две группы**: (1) металлы (как правило – ионы металлов  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ ) и (2) сложные органические соединения.

Органические небелковые кофакторы называются **коферментами** (*coenzymes*). Источником коферментов часто служат витамины.

Тип связи между ферментом и коферментом может быть различным. Иногда они существуют отдельно и связываются друг с другом во время протекания реакции. Многие коферменты легко отделяются от холофермента и служат переносчиками отдельных атомов или групп атомов, отщепляемых ферментом от субстрата.

В других случаях кофактор и фермент **связаны постоянно** и иногда прочными ковалентными связями. В последнем случае небелковая часть фермента называется **протетической группой** (*prosthetic group*).

### ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Какие вещества называются ферментами?
2. Что изучает энзимология?
3. Какие вещества называются субстратами?
4. В чем сходство и различие между апоферментом и кофактором?
5. Какие ферменты называют холоферментами?
6. Какие кофакторы называются коферментами?
7. Что называется протетической группой фермента?

## 2. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ ХИМИЧЕСКОГО КАТАЛИЗА

**Катализом** называется явление изменения скорости химической реакции в присутствии катализаторов.

Катализ называется **положительным**, если скорость реакции увеличивается, и **отрицательным**, если скорость уменьшается.

Катализ называется **гомогенным**, если реагенты и катализатор находятся в одной фазе, и **гетерогенным**, если – в разных фазах.

**Катализатором** называется вещество, которое участвует в химической реакции и изменяет ее скорость, но не входит в состав конечных продуктов и остается неизменным после завершения химической реакции.

Катализатор, замедляющий реакцию, называется **ингибитором**.

Как уже говорилось выше, биологические катализаторы белковой природы называют **ферментами**.

Поскольку **катализатор не входит в состав** как исходных веществ, так и продуктов реакции, то он не может оказать влияние на изменение энергии Гиббса  $\Delta G$ . Следовательно, он **не может** вызвать протекание реакций, для которых в данных условиях  $\Delta G > 0$ , а может лишь ускорить скорость реакции в том случае, если  $\Delta G < 0$  (рисунок 1).

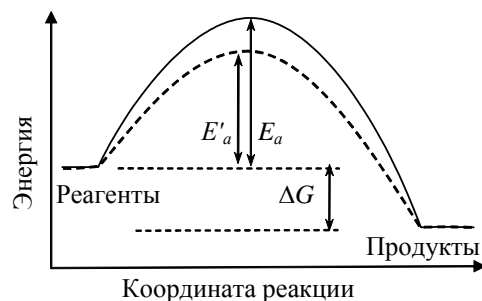


Рисунок 1 – Влияние катализатора на величину энергетического барьера

**В состоянии равновесия** ( $\Delta G = 0$ ) катализатор в равной степени ускоряет как прямую, так и обратную реакции.

**Механизм действия** катализаторов связан с тем, что они образуют промежуточные соединения с исходными веществами и тем самым **изменяют путь реакции**, причем новый путь характеризуется меньшей высотой энергетического барьера, т.е. меньшими энергиями активации  $E_a^1, E_a^2$  по сравнению с  $E_a$  в исходной (некатализируемой) реакции (рисунок 2).

Поэтому встречающееся зачастую утверждение о том, что катализатор снижает энергию активации, не корректно, так как реакция в присутствии катализатора не идентична исходной реакции. Просто это совершенно иная реакция, имеющая более низкий активационный барьер.

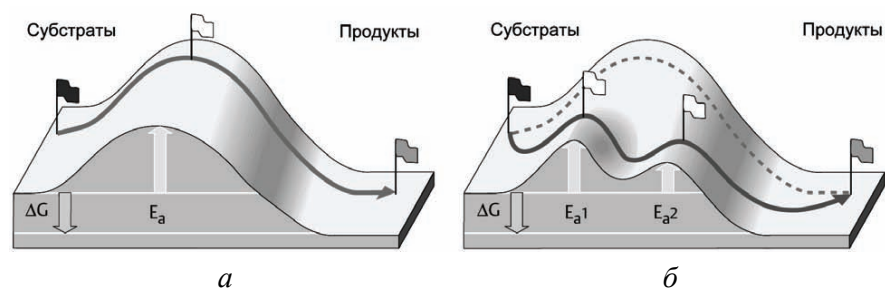


Рисунок 2 – Влияние катализатора на энергетический профиль реакции: *а* – энергетический профиль в отсутствие катализатора, *б* – энергетический профиль в присутствии катализатора

**Каталитическая активность**  $A$  характеризует изменение скорости данной реакции,  $w$ , при введении в реакцию катализатора

$$A = w_K - w_0.$$

Часто скорость реакции без катализатора,  $w_0$ , настолько мала, что **вторым слагаемым пренебрегают**:

$$A = w_K.$$

Если реакция протекает **вблизи состояния равновесия** и является двухсторонней, то за меру каталитической активности принимают скорость протекания реакции **в прямом направлении**.

**Удельной каталитической активностью** называется каталитическая активность, отнесенная к единице массы катализатора.

**Селективностью** (избирательностью) **катализатора** называется его способность ускорять один из возможных путей реакции, если она может протекать по разным направлениям с образованием различных продуктов.

Промежуточное химическое взаимодействие реагентов с катализатором может протекать **слитно** (рисунок 3(а)) или **раздельно** (рисунок 3(б)).

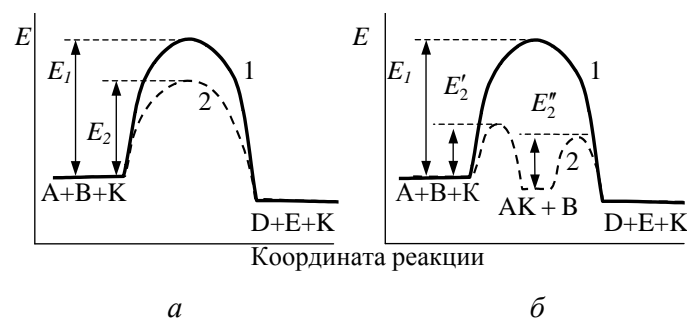
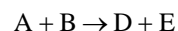


Рисунок 3 – Энергетический профиль реакции: а – при слитном каталитическом процессе, б – при раздельном каталитическом процессе

**При слитном каталитическом процессе** в состав активированного комплекса входят катализатор и все реагирующие вещества. Так элементарная реакция



без катализатора протекает через **активированный комплекс**  $AB^\ddagger$



а в присутствии катализатора – через активированный комплекс  $ABK^\ddagger$



Увеличение скорости при **слитном** механизме достигается в результате уменьшения энергии активации.

При **раздельном механизме** каталитический процесс осуществляется поэтапно, в виде нескольких стадий.

Энергетический профиль реакционного пути характеризуется при этом несколькими максимумами (активированные комплексы отдельных стадий) и минимумами (продукты промежуточного взаимодействия). Например, для случая, приведенного на рисунке 3(б)



В каждой последовательной стадии рвется только часть старых связей, поэтому энергии активации таких разрывов  $E_2'$  и  $E_2''$  заметно меньше энергии активации некатализируемой реакции  $E_1$ .

### ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Какое явление называется катализом?
2. Чем отличаются положительный и отрицательный катализ?
3. Какое вещество называется ингибитором?
4. Каков механизм ускорения химической реакции катализатором?
5. Что называется каталитической активностью катализатора?
6. Дайте определение селективности катализатора.
7. Чем различаются слитный и раздельный каталитические процессы?

### 3. МУЛЬТИСУБСТРАТНЫЕ РЕАКЦИИ

Большинство ферментативных реакций в биологических системах являются мультисубстратными. Рассмотрим особенности мультисубстратных реакций на примере бисубстратной реакции типа  $A + B \rightarrow C + D$ . Схематически такого типа реакции представлены на рисунке 4.

Большинство таких реакций заключается в переносе функциональных групп, таких как фосфорильная ( $PO_3^-$ ) или группа аммония,  $NH_4^+$ , от одного субстрата к другому. В окислительно-восстановительных реакциях между субстратами переносятся электроны.

Мультисубстратные реакции условно разделяют на **два класса**:

- 1) **реакции с образованием тройного комплекса** (реакции последовательного замещения (*sequential displacement*));
- 2) **"пинг-понг"-реакции** (реакции двойного замещения (*double displacement*)).

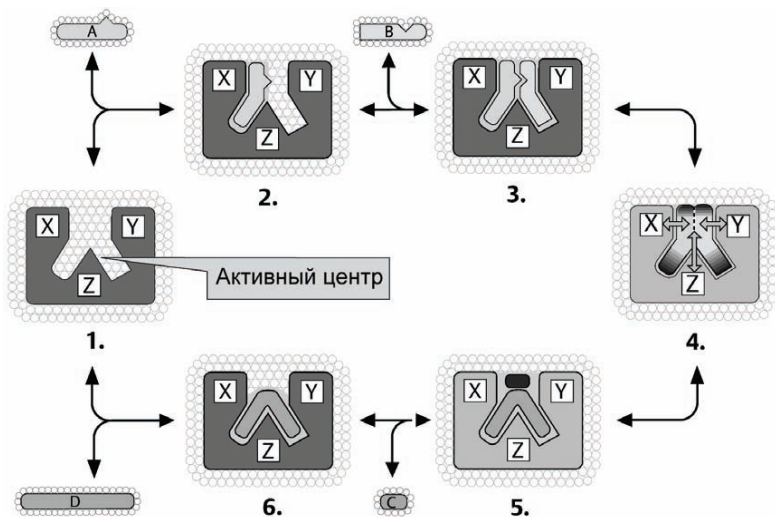


Рисунок 4 – Схема бисубстратной ферментативной реакции: 1 – свободный фермент  $E$ ; 2 – комплекс  $E·A$ ; 3 – Комплекс  $E·A·B$ ; 4 – Переходное состояние  $E^\ddagger$ ; 5 – Комплекс  $E·C·D$ ; 6 – комплекс  $E·D$

**В реакциях с образованием тройного комплекса** все субстраты должны быть сорбированы на ферменте, прежде чем, какой либо продукт реакции будет десорбирован. Так, в бисубстратной реакции образуется тройной комплекс: фермент и оба субстрата.

Реакции с образованием тройного комплекса бывают **двух типов**:

- 1) **упорядоченные**, в которых субстраты сорбируются на ферменте в строго определенном порядке,
- 2) **неупорядоченные** (статистические), в которых порядок присоединения субстратов к ферменту произволен.

Например, многие ферменты, использующие  $NAD^+$  или  $NADH$  в качестве субстратов, демонстрируют **упорядоченный** механизм. Рассмотренный в разделе "Механизмы ферментативных процессов" [1] пример каталитического цикла **лактатдегидрогеназы** представляет собой характерный пример такого рода реакции. **Лактатдегидрогеназа** восстанавливает пируват в лактат, окисляя при этом  $NADH$  в  $NAD^+$  (рисунок 5).

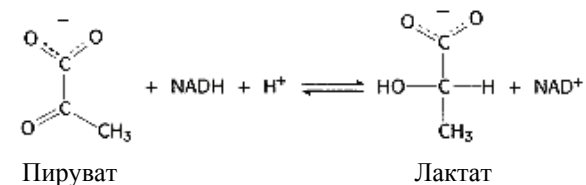


Рисунок 5 – Схема реакции восстановления пирувата в лактат

**В упорядоченных реакциях** последовательного замещения кофермент  $NADH$  **всегда присоединяется первым**, а лактат всегда десорбируется первым. Эта последовательность схематически изображена на рисунке 6 в виде, предложенном Келландом.

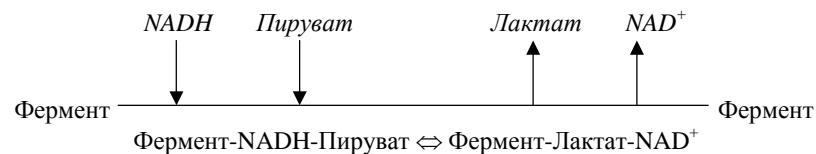


Рисунок 6 – Схема Келланда упорядоченной каталитической бисубстратной реакции восстановления пирувата в лактат на лактатдегидрогеназе

Фермент-субстратный комплекс представляет собой тройной комплекс: сначала он состоит из фермента и субстратов, а затем из фермента и продуктов.

**В статистических (неупорядоченных) реакциях** порядок, в котором субстраты присоединяются к ферменту произволен. Например, **креатинкиназа** образует фосфокреатин и АДФ из креатина и АТФ (рисунок 7).

Схема Келланда этой реакции изображена на рисунке 8.

**В "пинг-понг" реакциях** один или более продуктов реакции десорбируется еще **до того момента**, когда **все** субстраты присоединятся к ферменту. Определяющей особенностью этого механизма является **существование промежуточного состояния фермента**, в котором молекула фермента временно модифицирована.

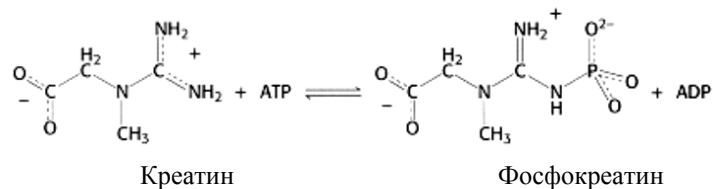


Рисунок 7 – Схема образования фосфокреатина из креатина с участием АТФ

Классическим примером такого механизма является реакция, в которой аминогруппа переносится между аминокислотой и  $\alpha$ -кетокислотой (рисунок 9).

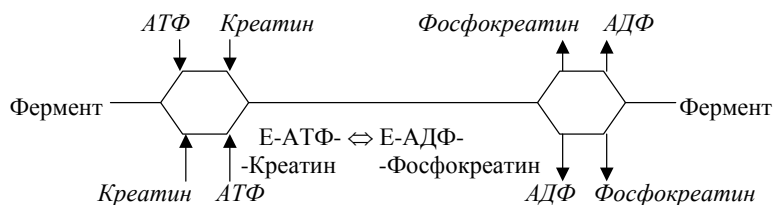


Рисунок 8 – Схема Келланда статистической каталитической бисубстратной реакции образования фосфокреатина

Фермент *аспартатамиотрансфераза* катализирует перенос аминогруппы от аспартата к  $\alpha$ -кетоглутарату.

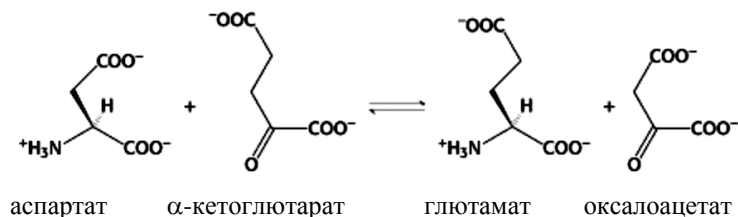


Рисунок 9 – Схема реакции переноса аминогруппы между аспартатом и  $\alpha$ -кетоглутаратом

Схема Келланда этой реакции представлена на рисунке 10.

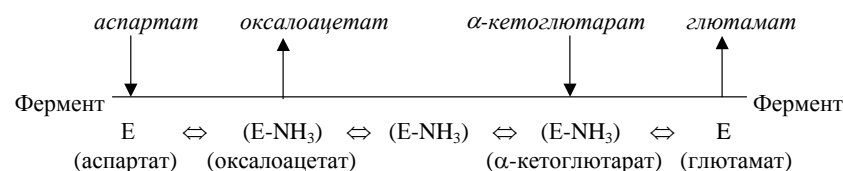


Рисунок 10 – Схема Келланда каталитической бисубстратной реакции типа "пинг-понг"

После сорбции аспартата фермент присоединяет к себе аминогруппу, образуя временную модифицированную форму. После этого первый продукт, оксалоацетат, десорбируется.

Второй субстрат,  $\alpha$ -кетоглутарат, сорбируется на *модифицированном* ферменте, присоединяет аминогруппу и продукт, глутамат, десорбируется с фермента.

Фермент работает как своего рода почтовый ящик, в котором первый субстрат (почтальон) оставил функциональную группу (почту), а второй субстрат (клиент) ее забрал. Пустой почтовый ящик – это фермент, а ящик с почтой – временная модифицированная форма этого фермента.

Субстраты сорбируются и десорбируются на ферменте как мячики настольного тенниса ударяются об игровой стол, поэтому такой механизм получил название "пинг-понг"-механизм.

### ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Какие ферментативные реакции называются мультисубстратными?
2. Какой "тройной комплекс" образуется в мультисубстратных реакциях с образованием тройного комплекса?
3. В чем отличие реакций типа "пинг-понг" от реакций с образованием тройного комплекса?
4. Какие схемы называются схемами Келланда?

#### 4. РЕГУЛЯЦИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ

*Способность к регуляции* отличает биокатализаторы от химических катализаторов.

Одним из удивительных свойств живых организмов является сохранение постоянного баланса между необходимыми для поддержания жизнедеятельности различными биодegradативными процессами и огромным количеством биосинтетических процессов.

*Клеточный гомеостаз* достигается благодаря функционированию эффективной и сложной системы регуляции, приводящей каждый отдельный метаболический процесс в строгое соответствие с нуждами организма в целом.

Поскольку практически все клеточные реакции катализируются ферментами, *координация метаболизма* в существенной мере *сводится к регуляции интенсивности протекания ферментативных реакций*, образующих метаболические пути.

*Эффективность* биологического катализа в клетке может регулироваться *двумя путями*:

- 1) путем изменения *количества катализатора*,
- 2) путем регулирования *активности фермента*.

Количество фермента в клетке определяется соотношением скоростей его синтеза и распада.

*Скорость синтеза* данного фермента может сильно меняться в зависимости от условий.

Существуют ферменты, которые всегда присутствуют в клетке в более или менее постоянных количествах: их называют *конститутивные ферменты*. В отличие от них так называемые *адаптивные* (или *индуцибельные*) ферменты синтезируются *только в ответ* на появление в среде соответствующего субстрата.

*Гены*, контролирующие синтез адаптивных ферментов, обычно находятся в состоянии *репрессии* и вводятся в действие только в присутствии *индуктора*.

Механизмы регуляции ферментативной активности *на уровне синтеза* ферментов являются достаточно *медленными*; для их реализации нужны по меньшей мере часы.

Существуют *относительно быстрые* регуляторные механизмы, которые направлены непосредственно на ферменты.

Многие соединения могут влиять на обмен веществ, модулируя активность соответствующих ферментов.

Особенно важные функции при этом выполняют *ингибиторы* ферментов. (Ингибиторами ферментов являются многие лекарственные вещества природного или синтетического происхождения.)

*Метаболиты* (промежуточные продукты метаболических путей) также могут быть ингибиторами ферментов в процессах регуляции.

#### ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Назовите два пути регуляции эффективности биокатализа.
2. Чем отличаются конститутивные и адаптивные ферменты?
3. В чем отличие генного и ингибиторного механизмов регуляции ферментативной активности?

#### 5. ТИПЫ ИНГИБИРОВАНИЯ ФЕРМЕНТОВ

Ингибиторы разделяют на обратимые и необратимые.

*Обратимые ингибиторы* не вносят в молекулу фермента каких-либо изменений после своей диссоциации.

*Необратимые ингибиторы* необратимо модифицируют целевой фермент.

Различают *конкурентное, неконкурентное и бесконкурентное* ингибирование.

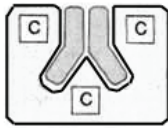
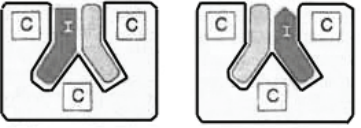
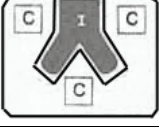

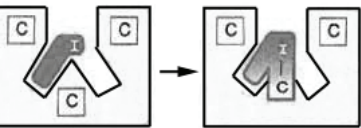

Схема фермент-субстратного комплекса в отсутствие ингибирования представлена в Таблице 1 (1).

*Конкурентным* называется ингибирование, при котором молекула ингибитора подобна молекуле субстрата (*аналог субстрата*) (Таблица 1 (2)). Она *блокирует* активный центр фермента и *полностью*



**предотвращает** связывание фермента с субстратом. Субстрат и фермент конкурируют за место связывания на ферменте.

Таблица 1 – Схемы ингибирования

	Тип регуляции	Схема фермент-субстратного комплекса
1	В отсутствии ингибирования	
2	Конкурентное ингибирование	
3	Аналог переходного состояния	
4	Неконкурентное ингибирование	
5	Суицидные субстраты	
6	Аллостерическое ингибирование	

**Аналоги переходного состояния** (Таблица 1 (3)) также действуют как конкурентные ингибиторы.

Например (рисунок 11), малоновая (1), щавелево-уксусная (2) и глутаровая (3) кислоты ингибируют фермент **сукцинатдегидрогеназу**,

субстратом которой является янтарная кислота (4) (сукцинат), так как они сходны по строению с субстратом.

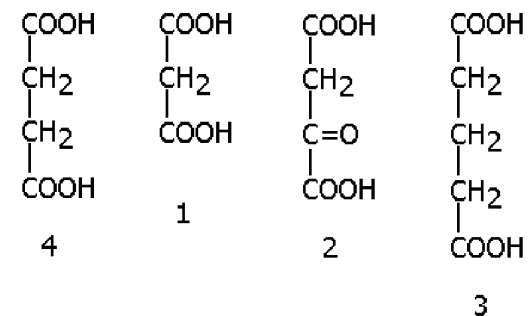


Рисунок 11 – Схемы строения: 1 – малоновой; 2 – щавелево-уксусной; 3 – глутаровой и 4 – янтарной (сукцинат) кислот

Другой пример, **сульфаниламидные** антибактериальные препараты (рисунок 12(1)) имеют сходное строение с **парааминобензойной** кислотой (рисунок 12(2)) и являются конкурентными ингибиторами в синтезе бактериями фолиевой кислоты (фактора роста бактерий).

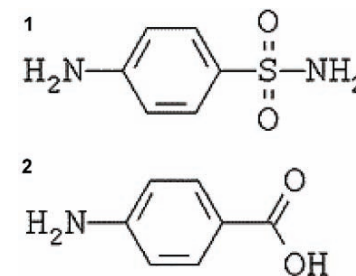


Рисунок 12 – Схемы строения: 1 – сульфаниламидных антибактериальных препаратов; 2 – парааминобензойной кислоты

У человека нет такого метаболического пути и в лечебных дозах они не влияют на жизнедеятельность человека, оказывая общий бактериостатический эффект (нарушая в некоторой степени деятельность кишечной микрофлоры).

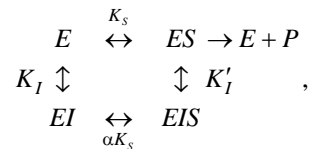
**Неконкурентным** называется ингибирование, при котором связывание фермента с ингибитором *не влияет на связывание* фермента с субстратом, но ингибитор *модифицирует функционально важную каталитическую группу* фермента "отключая" фермент. Структура активного центра изменяется и каталитическое превращение не происходит (Таблица 1 (4)).

Неконкурентные ингибиторы, поскольку они модифицируют функциональные группы целевого фермента, действуют как правило необратимо.

В случае так называемых "*суицидных субстратов*" речь идет о субстратных аналогах, содержащих дополнительно реакционную группу (Таблица 1 (5)). **Вначале** они связываются *обратно*, а **затем** образуют *ковалентное соединение* с активным центром фермента. Поэтому ингибирование такими соединениями проявляется как неконкурентное. Известным примером такого ингибитора является антибиотик пенициллин.

**Бесконкурентным** называется ингибирование, которое возникает, когда ингибитор может связываться с ферментом только в виде его комплекса с субстратом.

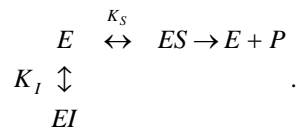
**Кинетическая схема ингибирования** выглядит следующим образом



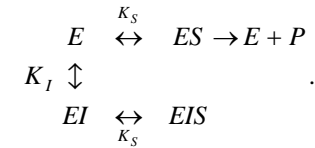
где  $K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}$  – константа диссоциации комплекса  $EI$ , ( $EI \leftrightarrow E + I$ ),

$K_S = \frac{[E][S]}{[ES]}$  – константа диссоциации комплекса  $ES$ , ( $ES \leftrightarrow E + S$ ).

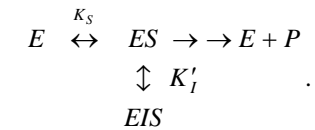
Для **конкурентного** ингибирования  $\alpha = \infty$ :



Для **неконкурентного** ингибирования  $\alpha = 1$ :



Для **бесконкурентного** ингибирования  $K_I = \infty$ :



И, наконец, существует **аллостерическое ингибирование**.

**Аллостерические ингибиторы** связываются с отдельными участками фермента *вне активного центра*. Такое связывание влечет за собой **конформационные изменения в молекуле фермента**, которые приводят к уменьшению его активности (Таблица 1 (6)).

Аллостерические эффекты встречаются практически только в случае олигомерных ферментов.

Аллостерические эффекты могут заключаться **как в ингибировании, так и в активации** фермента, поэтому аллостерическое ингибирование – это частный случай аллостерического механизма регуляции.

## ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. В чем отличие обратимого и необратимого ингибирования?
2. В чем отличие конкурентного и неконкурентного ингибирования?
3. Какие субстраты называются суицидными?
4. В чем специфика аллостерического ингибирования?
5. Запишите обобщенную кинетическую схему ингибирования.

## 6. АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЙ МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

**Аллостерическим механизмом регуляции активности ферментов** называют регуляторный механизм, в котором контроль активности

фермента реализуется путем **изменения конформации** белковой молекулы, индуцируемого связыванием метаболита-регулятора в особом (**аллостерическом**) центре, пространственно удаленном от активного центра.

Изменение конформации молекулы фермента влечет за собой **изменение каталитических характеристик активного центра**.

Метаболит-регулятор, модифицирующий активность фермента подобным образом, называют **аллостерическим эффектором**.

**Олигомерная** молекула фермента, состоящая из нескольких субъединиц, может содержать **несколько** активных центров и **несколько** аллостерических центров для определенного эффектора. В таком олигомере возможны взаимодействия не только между активным и аллостерическим центрами, но и между центрами одного сорта (между активными или между аллостерическими центрами).

В результате взаимодействия между субъединицами связывание субстрата становится **кооперативным**, когда связывание фермента с первым субстратом влияет на его способность к связыванию с последующими субстратами, и кривая зависимости скорости реакции  $w$  от концентрации субстрата  $[S]$  приобретает сигмоидную форму. Обычно эти ферменты ответственны за регуляцию и контроль метаболических процессов, и их активность регулируется **по принципу обратной связи**.

Для многих ферментов, катализирующих ключевые стадии метаболических путей, обнаружена чувствительность к метаболитам, отличающимся по химической структуре от субстратов соответствующих ферментативных реакций. Примером такого механизма служит **ингибирование** первого фермента биосинтетических путей **конечным продуктом** цепи.

Таким образом, если образующийся в итоге метаболической цепи продукт **не потребляется**, он накапливается и **ингибирует** первый фермент своего биосинтеза, предотвращая свое собственное накопление (а также накопление промежуточных продуктов, которое происходило бы в случае ингибирования не первого фермента в цепи). Это пример регуляции по механизму обратной связи.

Причем не только конечный продукт метаболического пути может быть регулятором и не обязательно регулируется именно первый фермент.

#### ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Какой механизм регуляции ферментативной активности называется аллостерическим?
2. Какой центр называется аллостерическим?
3. Что называется аллостерическим эффектором?
4. Какой вид связывания фермента с субстратом называется кооперативным?
5. В чем заключается механизм регуляции метаболических процессов по принципу обратной связи?

#### 7. АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ

Аллостерические ферменты являются **олигомерами**, состоящими из двух или более мономеров (рисунок 13). Аллостерические ферменты могут существовать в одном из двух обратимо связанных состояний – **активном и неактивном**.

Каждый лиганд (субстрат, эффектор), способный образовывать комплекс с белком, может связываться с каждой белковой субъединицей – субстрат в активном центре, эффектор в регуляторном.

Связывание эффектора с одной субъединицей (рисунок 13(б,в)) вызывает постепенное изменение конформации других субъединиц, приводящее в конечном счете к превращению аллостерического фермента в активное состояние.

Обратный переход фермента из активного состояния в неактивное сопровождается изменением субстрат-связывающей активности. В процессе превращения одной конформации в другую четвертичная структура белка остается неизменной.

Аллостерические ферменты принимают участие в контроле метаболизма в виде мультиферментных систем. Влияние на метаболизм достигается за счет **обратной**, положительной или отрицательной **связи**.



Рисунок 13 – Схема функционирования аллостерического фермента: *a* – состояния аллостерического фермента зависят от его пространственной организации; *б* – аллостерическая активация достигается связыванием активатора (положительного эффектора); *в* – аллостерическая инактивация происходит благодаря связыванию ингибитора (отрицательного эффектора)

### ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. В каких двух состояниях может существовать аллостерические ферменты?
2. Что такое положительный эффектор?
3. Является или нет ингибитор отрицательным эффектором?
4. Является или нет активатор положительным эффектором?

### 8. ДИССОЦИАТИВНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ

Многие ферменты клеточного метаболизма обладают олигомерной структурой, т. е. построены из отдельных субъединиц.

Связи между субъединицами имеют чаще всего нековалентный характер, и это определяет возможность диссоциации ферментного олигомера на отдельные субъединицы, которые, как правило, отличаются по своим каталитическим свойствам от ферментного олигомера (рисунок 14).

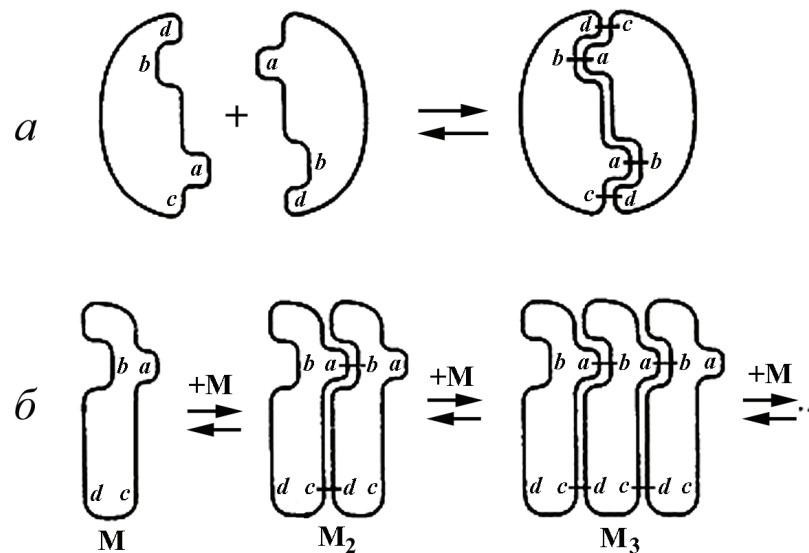


Рисунок 14 – Схемы ассоциации субъединиц олигомерного фермента: *a* – изологическая ассоциация, *б* – гетерологическая ассоциация

Положение равновесия между олигомерными формами фермента контролируется присутствием субстратов, коферментов и аллостерических эффекторов. Такое воздействие метаболитов на прочность связей между субъединицами в ферментном олигомере представляет собой диссоциативный механизм регуляции активности.

При этом, очевидно, диссоциативный механизм регуляции будет *различным образом проявляться* в случаях *изологической* и *гетерологической* ассоциации субъединиц-протомеров (рисунок 14).

*Изологическая ассоциация* (рисунок 14(а)) (т.е. ассоциация, элементарной стадией которой является взаимодействие 2-х идентичных центров ассоциации, расположенных на белковых субъединицах) дает только замкнутые структуры.

*Гетерологическая ассоциация* (рисунок 14(б)) (т.е. ассоциация, элементарной стадией которой является взаимодействие 2-х разнородных центров ассоциации) может привести к образованию ассоциатов неограниченной длины.

## 9. АДСОРБЦИОННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ

Клеточные метаболиты оказывают влияние на *способность фермента взаимодействовать с субклеточными структурами*.

Ферменты, адсорбированные структурными белками мышц и мембранами клеточных органелл, имеют *иное микроокружение*, нежели ферменты в растворе, и характеризуются измененными каталитическими характеристиками.

Контролируемая метаболитами адсорбция ферментов на субклеточных структурах (адсорбционный механизм регуляции) расширяет регуляторные возможности клетки.

*Аллостерический, диссоциативный и адсорбционный* механизмы регуляции ферментативной активности *являются родственными* в том отношении, что в каждом из них *влияние метаболита-регулятора* на каталитические свойства фермента осуществляется *не* путем *прямого* воздействия на активный центр фермента, *а косвенным путем* — *через изменение конформационного, олигомерного или адсорбционного состояния фермента*.

### ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Какое свойство ферментов обеспечивает диссоциативный механизм регуляции ферментативной активности?

2. Чем отличается реализация диссоциативного механизма регуляции ферментативных реакций в случаях изологической и гетерологической ассоциации субъединиц-протомеров?
3. В чем специфика адсорбционной регуляции ферментативных реакций?

## 10. СТАЦИОНАРНАЯ КИНЕТИКА МИХАЭЛИСА-МЕНТЕН

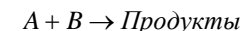
Основные трудности при исследовании ферментативных процессов сопряжены не с их экспериментальным изучением (что часто имеет место), а с *аналитическим выражением* получаемых результатов.

Иногда аналитическое выражение имеет настолько *сложный* вид, что это не позволяет объяснить исследуемый процесс.

*Упрощенные схемы* ферментативной кинетики служат одним из лучших примеров того, как с помощью обоснованных приближений можно свести сложную задачу к понятному и решаемому варианту.

Кинетика химических реакций с участием ферментов *принципиально* отличается от обычных химических реакций.

Скорость большинства химических реакций пропорциональна концентрации реагентов в системе. Например, для реакции



выражение для скорости реакции имеет вид

$$w = \frac{d[A]}{dt} = \frac{d[B]}{dt} = k[A][B].$$

В отличие от обычных химических реакций, скорости *ферментативных* реакций часто *не зависят* от концентрации субстрата.

Простое объяснение этого факта состоит в том, что для успешного протекания реакции требуется образование фермент-субстратного комплекса; и при достаточно высокой концентрации субстрата фермент будет "насыщен", так что практически весь фермент в любой данный момент времени связан с субстратом.

Следовательно, скорость суммарного химического процесса достигнет максимально возможного значения, пропорционального

концентрации фермента в системе, но независящего от концентрации (избыточной) субстрата.

Рассмотрим простейшую ферментативную реакцию



где  $A$  и  $B$  – два субстрата,  $P$  и  $Q$  – продукты,  $E$  – свободный фермент.

Общей моделью в этом случае будет схема, представленная на рисунке 15.

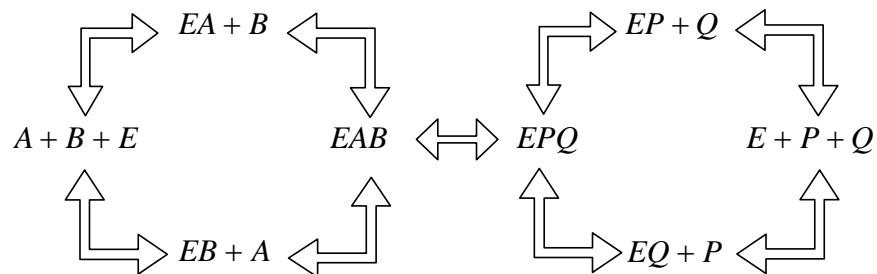


Рисунок 15 – Общая схема бисубстратной ферментативной реакции

Здесь  $EA$ ,  $EB$ ,  $EAB$ ,  $EPQ$ ,  $EP$  и  $EQ$  – разные возможные комплексы фермента с субстратом (субстратами) и продуктом (продуктами).

Математические выражения, описывающие эту модель не пригодны ни для каких практических целей.

Михаэлис и Ментен предложили оригинальный подход, который в рамках стационарной кинетики позволил существенным образом упростить описание кинетики ферментативных реакций.

#### ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. В чем состоит основная трудность при исследовании кинетики ферментативных реакций?
2. Для чего нужны упрощения кинетических схем ферментативных реакций?

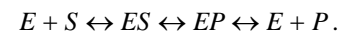
3. Чем отличается кинетика протекания ферментативных реакций от кинетики обычных химических реакций?
4. Почему скорости ферментативных реакций часто не зависят от концентрации субстрата?
5. Запишите общую схему бисубстратной ферментативной реакции.

#### 11. НЕОБХОДИМОСТЬ ГИПОТЕЗЫ О СТАЦИОНАРНОСТИ

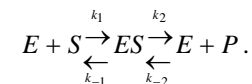
Покажем теперь, как Михаэлис и Ментен с помощью разумных упрощений получили кинетическую схему, пригодную для анализа огромного числа ферментативных реакций.

1. **Первое упрощение.** Считаем, что в реакции участвует *только один субстрат*  $S$ , с которым взаимодействует фермент  $E$ .

Тогда останется схема

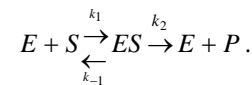


2. **Второе упрощение.** Считаем, что в реакции образуется *только одно промежуточное соединение*:



3. **Третье упрощение.** Ограничим период наблюдений *только начальным* этапом реакции до тех пор, пока не накопилось значительное количество продукта.

При этом можно не учитывать обратную реакцию между  $E$  и  $P$ , приводящую к образованию  $ES$ :



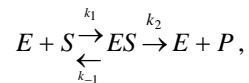
4. **Четвертое упрощение.** Считаем, что концентрация фермента мала по сравнению с (начальной) концентрацией субстрата (избыток субстрата) и по сравнению с *равновесной* концентрацией продукта

$$[E]_0 \ll [S]_0.$$

Это предположение необходимо, чтобы сохранять концентрацию фермент-субстратного комплекса постоянной, то есть для того, чтобы состояние системы можно было рассматривать как *стационарное*.

Именно это, последнее, **допущение о стационарном состоянии** является самым "**сильным**" и необходимым для описания ферментативной кинетики в сжатом виде.

Для того чтобы решить уравнение



в последующих параграфах рассмотрим последовательно усложняемую формальную кинетическую схему.

### ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Сформулируйте первое упрощение предложенное Михаэлисом и Ментеном.
2. Сколько промежуточных соединений образуется в ходе реакции, протекающей по схеме Михаэлиса-Ментен?
3. В каком случае можно не учитывать обратную реакцию на этапе  $ES \leftrightarrow E + P$ ?
4. В чем заключается предположение о наличии стационарного состояния в ходе протекания ферментативной реакции?

## 12. ОДНОСТАДИЙНАЯ ОДНОКОМПОНЕНТНАЯ ПРЯМАЯ РЕАКЦИЯ

Рассмотрим простейший случай – одностадийную однокомпонентную прямую реакцию



которая характеризуется **скоростью исчезновения реагента A**

$$\frac{d[A]}{dt} = -k_1[A].$$

Для того чтобы решить это дифференциальное уравнение, разделяем переменные

$$k_1 dt = -\frac{d[A]}{[A]}$$

и интегрируем части в пределах  $(0, t)$  и  $([A]_0, [A])$  соответственно

$$\int_0^t k_1 dt = -\int_{[A]_0}^{[A]} \frac{d[A]}{[A]},$$

$$k_1 t = -(\ln[A] - \ln[A]_0),$$

$$k_1 t = \ln \frac{[A]_0}{[A]}.$$

Откуда получаем выражения для расчета константы скорости химической реакции и концентрации реагирующего вещества в любой момент времени.

$$k_1 = \frac{1}{t} \ln \frac{[A]_0}{[A]},$$

$$[A] = [A]_0 \exp(-k_1 t),$$

где  $[A]_0$  – концентрация вещества A в начальный момент времени  $t = 0$ ,  $[A]$  – концентрация в момент времени  $t$ .

График зависимости концентрации реагентов от времени (кинетические кривые) представлены на рисунке 15.

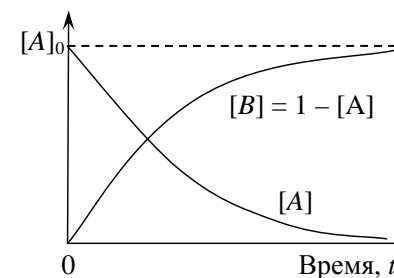


Рисунок 15 – Кинетические кривые одностадийной однокомпонентной прямой реакции

### ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Запишите кинетическое уравнение для случая одностадийной однокомпонентной прямой реакции.

2. Запишите выражение для зависимости от времени концентрации исходного вещества для случая одностадийной однокомпонентной прямой реакции.
3. Начертите кинетические кривые случая одностадийной однокомпонентной прямой реакции.

### 13. ПРЯМАЯ И ОБРАТНАЯ РЕАКЦИИ

*Двусторонней* (другое название – обратимая) элементарной реакцией первого порядка называется реакция, состоящая из прямой и обратной элементарных реакций первого порядка.



где  $k_1$  и  $k_{-1}$  – константы скорости соответственно прямой и обратной элементарных стадий. (Пример – реакция изомеризации).

Для реакции  $A \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} B$  *уменьшение* концентрации  $x = [A]_0 - [A]$  вещества

A равно *увеличению* концентрации  $x = [B] - [B]_0$  вещества B к моменту времени  $t$ . Отсюда

$$w = \frac{1}{(-1)} \frac{d[A]}{dt} = \frac{dx}{dt},$$

$$\frac{dx}{dt} = k_1([A]_0 - x) - k_{-1}([B]_0 + x).$$

При достаточно долгом  $t \rightarrow \infty$  протекании реакции  $A \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} B$  *наступает*

*состояние равновесия*, в котором  $x = x_\infty = \text{const}$ . При этом скорость прямой реакции равна скорости обратной реакции, соответственно скорость

двусторонней реакции равна нулю  $\left. \frac{dx}{dt} \right|_{x=x_\infty} = 0$ . Следовательно

$$k_1([A]_0 - x_\infty) - k_{-1}([B]_0 + x_\infty) = 0,$$

и состояние равновесие можно охарактеризовать *константой равновесия*

$$K = \frac{[B]_0 + x_\infty}{[A]_0 - x_\infty} = \frac{k_1}{k_{-1}}.$$

При этом

$$x_\infty = \frac{k_1[A]_0 - k_{-1}[B]_0}{k_1 + k_{-1}}.$$

Решим *кинетическое уравнение*  $\frac{dx}{dt} = k_1([A]_0 - x) - k_{-1}([B]_0 + x)$ :

$$\begin{aligned} \frac{dx}{dt} &= k_1([A]_0 - x) - k_{-1}([B]_0 + x) = \\ &= (k_1[A]_0 - k_{-1}[B]_0) - (k_1 + k_{-1})x = \\ &= (k_1 + k_{-1}) \left( \frac{k_1[A]_0 - k_{-1}[B]_0}{k_1 + k_{-1}} - x \right) = \\ &= (k_1 + k_{-1})(x_\infty - x). \end{aligned}$$

Разделяем переменные

$$\frac{dx}{x_\infty - x} = (k_1 + k_{-1}) dt$$

и интегрируем

$$\int_0^t (k_1 + k_{-1}) dt = \int_0^x \frac{dx}{x_\infty - x},$$

$$(k_1 + k_{-1})t = -\ln(x_\infty - x)|_0^x = -\ln(x_\infty - x) - (-\ln x_\infty) = \ln \frac{x_\infty}{x_\infty - x},$$

$$\frac{x_\infty - x}{x_\infty} = \exp[-(k_1 + k_{-1})t],$$

$$x = x_\infty(1 - \exp[-(k_1 + k_{-1})t]).$$

Соответственно

$$[A] = [A]_0 - x = [A]_0 - x_\infty(1 - \exp[-(k_1 + k_{-1})t]),$$

$$[B] = [B]_0 + x = [B]_0 + x_\infty(1 - \exp[-(k_1 + k_{-1})t]).$$

Для случая  $[B]_0 = 0$ , т.е. в том случае, когда в начале реакции продукта в системе нет, решения будут иметь вид

$$[A] = [A]_0 - \frac{k_1[A]_0}{k_1 + k_{-1}}(1 - \exp[-(k_1 + k_{-1})t]),$$

$$[B] = \frac{k_1[A]_0}{k_1 + k_{-1}}(1 - \exp[-(k_1 + k_{-1})t]).$$



Из-за обратной реакции  $[A]$  *не падает до нуля*; конечные предельные концентрации  $A$  и  $B$  достигаются быстрее, чем в случае одностадийной однокомпонентной прямой реакции, который был рассмотрен ранее.

Зависимость концентрации исходного вещества  $[A]$  и продукта реакции  $[B]$  от времени  $t$  для обратимой реакции первого порядка  $A \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} B$  для случаев  $K > 1$  и  $K < 1$  представлена на рисунке 16.

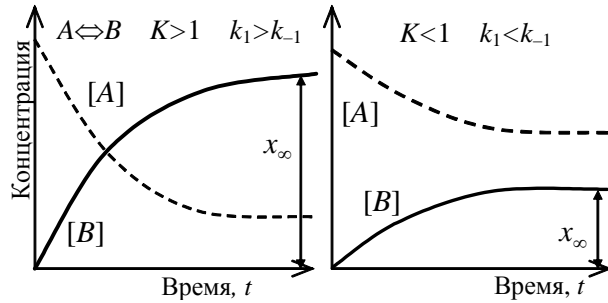


Рисунок 16 – Зависимость концентрации исходного вещества и продукта реакции от времени (кинетические кривые) для обратимой реакции первого порядка

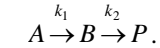
Заметим, что реакция  $A \xrightarrow{k_1} B$  и реакция  $A \xleftarrow[k_{-1}]{k_1} B$  практически заканчиваются прежде, чем концентрация какого-либо реагента станет постоянной.

#### ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Какая реакция называется двусторонней?
2. Запишите выражение для константы равновесия в случае простой обратимой реакции.
3. Запишите выражение для зависимости от времени концентрации продукта в случае простой обратимой реакции.
4. Нарисуйте кинетические кривые для обратимой реакции первого порядка.

#### 14. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ

Рассмотрим гомогенную реакцию в закрытой системе с двумя односторонними мономолекулярными элементарными стадиями



В этом случае, для описания этой модели потребуется решить систему кинетических уравнений

$$\begin{cases} \frac{d[A]}{dt} = -k_1[A], \\ \frac{d[B]}{dt} = k_1[A] - k_2[B], \\ \frac{d[P]}{dt} = k_2[B]. \end{cases}$$

Как было показано выше, решение первого уравнения системы имеет вид

$$[A] = [A]_0 \exp(-k_1 t).$$

Подставим это выражение во второе уравнение системы и получим

$$\frac{d[B]}{dt} = k_1[A]_0 \exp(-k_1 t) - k_2[B].$$

Решение этого уравнения имеет вид

$$[B] = \frac{k_1[A]_0}{k_2 - k_1} (\exp(-k_1 t) - \exp(-k_2 t)).$$

Действительно, подставим решение и сократим  $k_1[A]_0$

$$\begin{aligned} [A]_0 \frac{k_1}{k_2 - k_1} (-k_1 \exp(-k_1 t) + k_2 \exp(-k_2 t)) + \\ + k_2 [A]_0 \frac{k_1}{k_2 - k_1} (\exp(-k_1 t) - \exp(-k_2 t)) = k_1 [A]_0 \exp(-k_1 t), \end{aligned}$$

$$\frac{1}{k_2 - k_1} (-k_1 \exp(-k_1 t) + k_2 \exp(-k_2 t) + k_2 \exp(-k_1 t) - k_2 \exp(-k_2 t)) = \exp(-k_1 t),$$

$$\frac{1}{k_2 - k_1} (k_2 \exp(-k_1 t) - k_1 \exp(-k_1 t)) = \exp(-k_1 t) \quad \text{— тождество.}$$

Подставим это выражение в третье уравнение системы

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{k_2 k_1 [A]_0}{k_2 - k_1} (\exp(-k_1 t) - \exp(-k_2 t)).$$

Решение этого уравнения получим, используя соотношение материального баланса

$$[A]_0 - [A] = [B] + [P],$$

откуда

$$[P] = [A]_0 - [A] - [B].$$

Подставляем в  $[P] = [A]_0 - [A] - [B]$  выражения  $[A] = [A]_0 \exp(-k_1 t)$  и

$$[B] = [A]_0 \frac{k_1}{k_2 - k_1} (\exp(-k_1 t) - \exp(-k_2 t)).$$
 В результате получаем

$$[P] = [A]_0 - [A]_0 \exp(-k_1 t) - [A]_0 \frac{k_1}{k_2 - k_1} (\exp(-k_1 t) - \exp(-k_2 t)),$$

$$[P] = [A]_0 \left( 1 - \exp(-k_1 t) - \frac{k_1}{k_2 - k_1} \exp(-k_1 t) + \frac{k_1}{k_2 - k_1} \exp(-k_2 t) \right),$$

$$[P] = [A]_0 \left( 1 - \frac{k_2}{k_2 - k_1} \exp(-k_1 t) + \frac{k_1}{k_2 - k_1} \exp(-k_2 t) \right).$$

На рисунке 17 приведены кинетические кривые в безразмерных координатах  $([X]/[A]_0, k_1 t)$  для случая  $k_1 = 2k_2$ , где  $X = A, B, P$ .

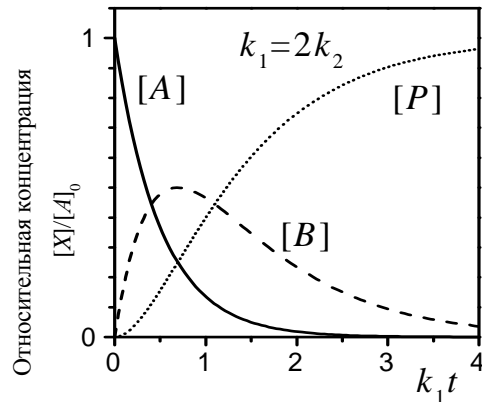


Рисунок 17 – Кинетические кривые последовательной реакции

Таким образом, в процессе существует момент времени, в который концентрация промежуточного соединения ***B*** **начинает уменьшаться**.

## ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Запишите систему кинетических уравнений для последовательной реакции  $A \xrightarrow{k_1} B \xrightarrow{k_2} P$ .
2. Запишите выражение для зависимости от времени концентрации промежуточного вещества  $[B]$ .
3. Запишите выражение для зависимости от времени концентрации продукта  $[P]$ .

## 15. НЕКАТАЛИЗИРУЕМАЯ РЕАКЦИЯ С ОДНИМ ПРОМЕЖУТОЧНЫМ СОЕДИНЕНИЕМ

Рассмотрим некатализируемую реакцию с одним промежуточным соединением

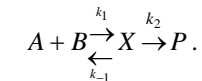
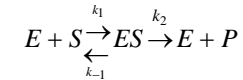


Схема этой реакции уже напоминает схему ферментативной реакции



с тем отличием, что при завершении реакции **реагент *B* не регенерируется**.

**Система кинетических уравнений** для этой реакции:

$$\begin{cases} \frac{d[A]}{dt} = -k_1[A][B] + k_{-1}[X] = \frac{d[B]}{dt} \\ \frac{d[X]}{dt} = k_1[A][B] - k_{-1}[X] - k_2[X] \\ \frac{d[P]}{dt} = k_2[X] \end{cases}$$

и **уравнение материального баланса**

$$[A]_0 - [A] = [B]_0 - [B].$$

Для системы четырех независимых уравнений с четырьмя неизвестными  $[A], [B], [X], [P]$  решение существует, но его невозможно

аналитически выразить для всех случаев. Типичный ход кинетических кривых для случая  $k_1 \approx k_{-1} \approx k_2$  и  $[A]_0 \approx [B]_0$  приведен на рисунке 18.

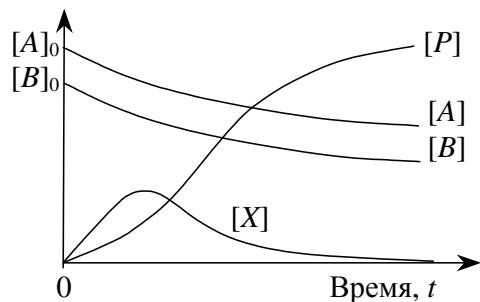
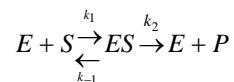


Рисунок 18 – Кинетические кривые для случая некатализуемой реакции с одним промежуточным соединением

#### ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Запишите схему некатализуемой реакции с одним промежуточным соединением.
2. Запишите систему кинетических уравнений для некатализуемой реакции с одним промежуточным соединением  $A + B \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} X \xrightarrow{k_2} P$ .
3. Возможно ли аналитически выразить решение системы кинетических уравнений для некатализуемой реакции с одним промежуточным соединением?

#### 16. КАТАЛИТИЧЕСКАЯ РЕАКЦИЯ С ОДНИМ ПРОМЕЖУТОЧНЫМ СОЕДИНЕНИЕМ



Это уравнение описывает кинетическую схему ферментативной реакции фермента  $E$  и субстрата  $S$  с образованием продукта реакции  $P$ .

Эта схема обычно служит *отправной точкой* в кинетике ферментативных реакций и *отличается* от предыдущего случая только тем, что *в конце реакции* фермент (катализатор) *регенерируется*.

#### Система кинетических уравнений

$$\begin{cases} \frac{d[S]}{dt} = -k_1[S][E] + k_{-1}[ES] \\ \frac{d[ES]}{dt} = k_1[S][E] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \\ \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \\ \frac{d[E]}{dt} = -k_1[S][E] + k_{-1}[ES] + k_2[ES] \end{cases}$$

и *уравнение материального баланса*

$$[E]_0 = [E] + [ES].$$

полностью описывают кинетическое поведение системы.

Хотя общего решения этой системы не существует, компьютерное моделирование позволяет строить кинетические кривые для частных случаев.

На рисунке 19(a) приведены кинетические кривые для случая  $k_1 \approx k_{-1} \approx k_2$  и  $[S]_0 \gg [E]_0$

Особенностью этого рисунка является то, что можно выделить *два характерных временных интервала*:

1) "*стационарный*" интервал, в котором концентрация "промежуточного" фермент-субстратного комплекса не меняется  $\frac{d[ES]}{dt} = 0$  и скорость образования продукта является постоянной (угол наклона зависимости  $[P]$  от времени приблизительно постоянен);

2) "*предстационарный*" или "*индукционный*" интервал (рисунок 19(б)), предшествующий стационарному, в котором не выполняется условие стационарности  $[ES] = const$ .

Чем больше начальный избыток субстрата над ферментом  $[S]_0 \gg [E]_0$ , тем короче индукционный участок.

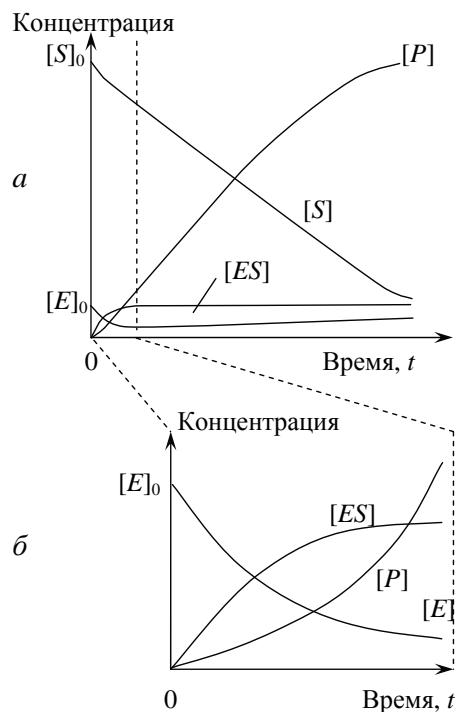


Рисунок 19 – Изменение концентрации реагентов каталитической реакции от времени: *a* – стационарное течение реакции, *б* – предстационарный интервал времени

Условие стационарности, т.е.  $[ES] = const$  и  $\frac{d[ES]}{dt} = 0$ , позволяет значительно упростить выражения кинетических уравнений.

Из выражения

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[S][E] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0$$

непосредственно следует

$$\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

Вид правой части уравнения соответствует выражению для константы равновесия для диссоциации комплекса  $[ES]$  на продукты  $[E]$  и  $[S]$ ,

которую в энзимологии называют **константой Михаэлиса**  $K_M$

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Величина  $\frac{1}{K_M}$  характеризует **прочность** фермент-субстратного комплекса: меньшее значение  $K_M$  соответствует более прочному связыванию субстрата с ферментом.

#### ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Запишите схему ферментативной реакции фермента  $E$  и субстрата  $S$  с образованием продукта реакции  $P$ .
2. Запишите систему кинетических уравнений для ферментативной реакции фермента  $E$  и субстрата  $S$  с образованием продукта реакции  $P$ .
3. Какие два характерных временных интервала можно выделить на кинетических кривых ферментативной реакции?
4. Запишите выражение для константы Михаэлиса.

#### 17. УРАВНЕНИЕ МИХАЭЛИСА

Перепишем выражение  $K_M = \frac{[E][S]}{[ES]}$  в виде  $[ES] = \frac{[E][S]}{K_M}$  и воспользуемся уравнением материального баланса  $[E]_0 = [E] + [ES]$  в виде  $[E] = [E]_0 - [ES]$ . Тогда  $[ES] = ([E]_0 - [ES]) \frac{[S]}{K_M}$  или  $[ES] = \frac{[E]_0[S]}{K_M + [S]}$

Выражение для скорости появления продукта (скорости реакции)

$$w = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] = \frac{k_2[E]_0[S]}{K_M + [S]}$$

называется **уравнением Михаэлиса**

$$w = \frac{k_2[E]_0[S]}{K_M + [S]}$$

Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата приведена на рисунке 20. Скорость не зависит от концентрации субстрата в

присутствии избытка  $S$  и пропорциональна ей при низких концентрациях  $S$ .

Таким образом, простая кинетическая модель, описываемая уравнением  $E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E + P$ , может объяснить загадочное отсутствие концентрационной зависимости, иногда наблюдаемое в ферментативных реакциях.

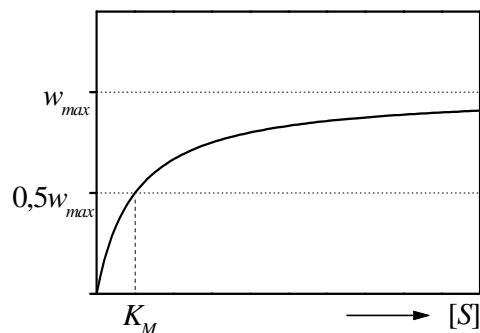


Рисунок 20 – Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата

При больших концентрациях субстрата скорость стремится к максимальному значению

$$w_{\max} = k_2[E]_0.$$

Из уравнения Михаэлиса следует, что при  $w = \frac{w_{\max}}{2}$  константа Михаэлиса  $K_M = [S]$  – **константа Михаэлиса равна концентрации субстрата, при которой скорость (стационарной) реакции достигает половины своего максимального значения.**

#### ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Запишите уравнение Михаэлиса.
2. От чего зависит максимальная скорость реакции в приближении Михаэлиса-Ментен?
3. Как выражается константа Михаэлиса через концентрацию субстрата?

#### 18. ПРИБЛИЖЕНИЕ ЛАЙНУИВЕРА-БЕРКА

Уравнение Михаэлиса  $w = \frac{w_{\max}[S]}{K_M + [S]}$  описывает гиперболу, и нахождение значений  $w_{\max}$  и  $K_M$  из зависимости  $w([S])$  требует набора данных во всем диапазоне концентраций.

Стандартным решением такой проблемы является приведение исследуемой зависимости к уравнению прямой путем преобразования координат. В энзимологии одним из наиболее популярных является подход, предложенный Лайнувером и Берком.

Преобразуем уравнение Михаэлиса в вид

$$\frac{1}{w} = \frac{K_M + [S]}{w_{\max}[S]},$$

а затем в **уравнение Лайнуивера-Берка (Lineweaver-Burk)**

$$\frac{1}{w} = \frac{K_M}{w_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{w_{\max}}.$$

График уравнения Лайнуивера-Берка представляющий собой прямую в координатах  $\left(\frac{1}{w}, \frac{1}{[S]}\right)$  приведен на рисунке 21.

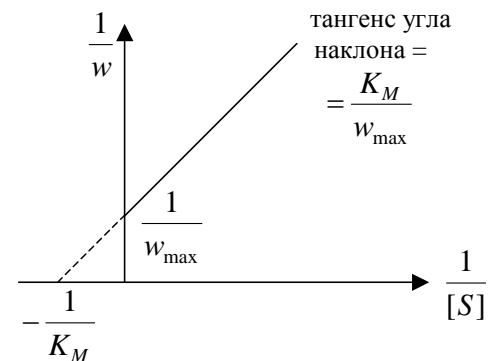


Рисунок 21 – График Лайнуивера-Берка

По графику уравнения Лайнуивера-Берка удобно определять  $w_{\max}$ ,  $K_M$  и  $k_2$ . Для этого продолжают прямую *до пересечения* ее с осью абсцисс и ординат.

1. **Значение максимальной скорости**  $w_{\max}$  равно обратной величине отрезка, отсекаемого прямой Лайнуивера-Берка на оси ординат.

2. **Значение константы Михаэлиса**  $K_M$  равно обратной величине отрезка, отсекаемого прямой Лайнуивера-Берка на оси абсцисс.

### ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Запишите уравнение Михаэлиса в координатах Лайнуивера-Берка.
2. Каким образом по графику Лайнуивера-Берка определить максимальную скорость ферментативной реакции?
3. Каким образом по графику Лайнуивера-Берка определить значение константы Михаэлиса?

## 19. СМЫСЛ ПАРАМЕТРОВ КИНЕТИКИ МИХАЭЛИСА-МЕНТЕН

### 1. Максимальная скорость ферментативной реакции $w_{\max}$ .

Поскольку  $w_{\max} = k_2[E]_0$ , то  $w_{\max}$  можно использовать в качестве **характеристики количества фермента**, присутствующего в неизвестном растворе (для "оценки" активности фермента). Обычно  $w_{\max}$  выражают в единицах ферментативной активности, например в международных единицах МЕ (1 микромоль/с) при условии, что фермент насыщен субстратом.

На практике измерение активности в крови фермента **аспартатаминотрансферазы** позволяет в три раза увеличить достоверность диагностирования инфаркта миокарда, при котором резко повышается активность этого фермента в сыворотке крови.

2. **Константа Михаэлиса**  $K_M$ . Параметр  $K_M$  в первую очередь используют для выявления **специфичности действия фермента**, поскольку  $K_M$  характеризует тенденцию фермент-субстратного комплекса к диссоциации на фермент и субстрат.

### Сравнивая значения $K_M$ для ряда различных субстратов,

можно определить, какой тип молекул наиболее прочно связывается с ферментом; как правило, к числу наиболее прочно связывающихся субстратов (т.е.  $K_M$  малы) относятся "природные" субстраты (субстраты, на которые фермент действует *in vivo*).

Проводя такие исследования, можно, например, классифицировать различные **протеолитические ферменты** (ферменты, которые гидролизуют белки) согласно тому, на какие участки полипептидной цепи они действуют. На рисунке 22 представлена схема действия некоторых протеолитических ферментов.

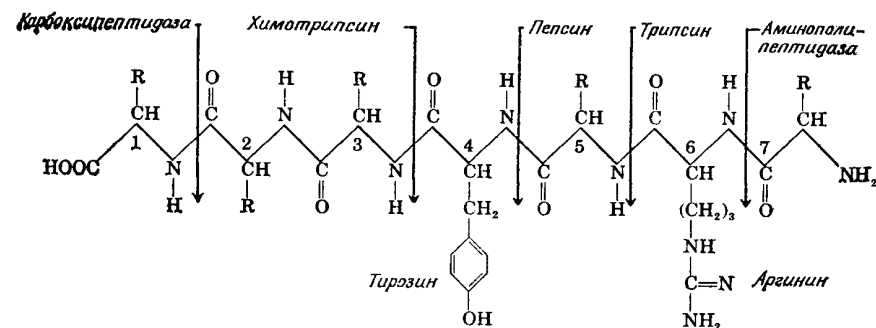


Рисунок 22 – Схема, иллюстрирующая специфичность действия разных протеолитических ферментов

Например, **химотрипсин** (EC 3.4.4.5) расщепляет цепь, атакуя карбоксильный конец связи между тирозином и соседним аминокислотным остатком.

Проявление подобной специфичности часто используется для расщепления белка по заданным участкам перед аминокислотным анализом. Проводя расщепление в нескольких различных (известных) участках и анализируя получающиеся при этом продукты, можно установить аминокислотную последовательность в белке.

На рисунке 23 представлена схема фермента **лизоцима**, аминокислотная последовательность которого была определена с помощью предварительного протеолиза протеолитическими ферментами.

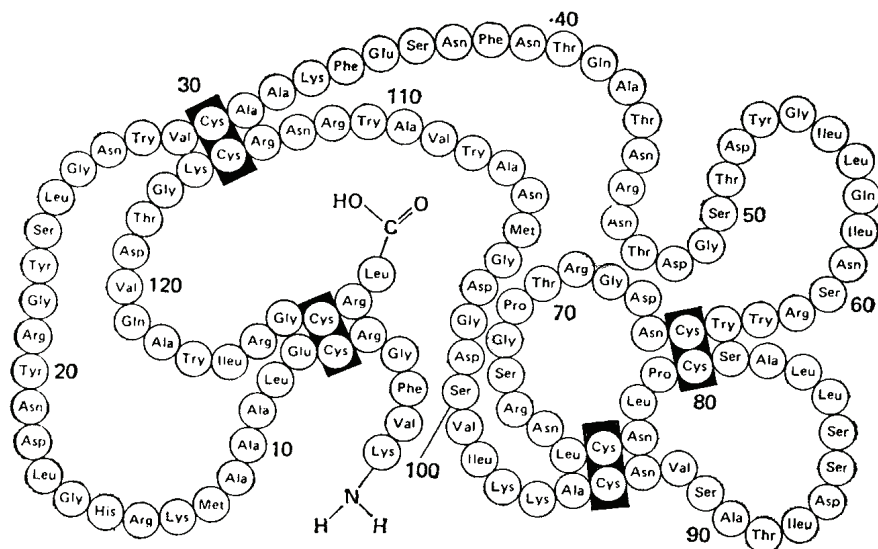


Рисунок 23 – Последовательность аминокислотных остатков в ферменте лизоцим

3. **Значение константы скорости**  $k_2$  второго этапа реакции. Если концентрация фермента известна (например при работе с очищенными ферментными препаратами), то из  $w_{\max}$  можно определить  $k_2 = \frac{w_{\max}}{[E]_0}$ .

Параметр  $k_2$  характеризует **эффективность ферментативного катализа** и используется для получения информации о его механизмах.

$k_2$  – **каталитическая константа**, часто обозначаемая как  $k_{cat}$  или  $k_c$  – может рассматриваться как число молей продукта, образующихся в единицу времени одним молем чистого фермента, насыщенного субстратом.

**Числом превращения** называется отношение  $k_2$  к числу активных центров в молекуле фермента. Таким образом, число превращения показывает количество молей продукта, образуемых в единицу времени (в 1 с) на **одном** активном центре фермента, насыщенном субстратом.

Как показано в таблице 2, типичные значения чисел превращения лежат в интервале 1–1 000 000.

Таблица 2 – Числа превращения для некоторых ферментов

Фермент	Число превращения
Химотрипсин	1 000
Рибонуклеаза	100
Карбоксипептидаза	100
Киназа	1 000
Каталаза	5 000 000
Пероксидаза	10
Карбоангидраза	36 000 000

Фермент **каталаза**, катализирующий реакцию  $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ , обеспечивает одну из наиболее высоких скоростей превращения, известных для хорошо изученных ферментов.

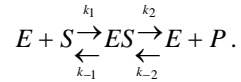
Каталазная ферментативная система задействована в **защитном механизме жука-бомбардира**. На кончике брюшка этого жука находится "реакторная железа", содержащая 25%  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Если потревожить жука, то каталазная реакция протекает так быстро, что за 1 с вода в "реакторной железе" нагревается от комнатной температуры до  $100^\circ\text{C}$  и под действием образующегося пара в нападающего выстреливается струя кипящей воды.

#### ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Какую информацию о ферментативной реакции дает максимальная скорость ферментативной реакции  $w_{\max}$ ?
2. Какую информацию о ферментативной реакции дает константа Михаэлиса?
3. Какую информацию о ферментативной реакции дает значение константы скорости  $k_2$ ?
4. Что называется числом превращения фермента?

## 20. СНЯТИЕ ОГРАНИЧЕНИЙ МИХАЭЛИСА-МЕНТЕН: 1. СУЩЕСТВОВАНИЕ ОБРАТНОЙ РЕАКЦИИ

Если обратная реакция между ферментом и продуктом возможна, то схема реакции будет иметь вид



**Скорость** изменения концентрации фермент-субстратного комплекса

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES] + k_{-2}[E][P].$$

При **стационарных** условиях

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0,$$

следовательно

$$k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES] + k_{-2}[E][P] = 0,$$

$$[ES] = \frac{k_1[S] + k_{-2}[P]}{k_{-1} + k_2}[E].$$

Подставим в это уравнение выражение для  $[E]$  из **уравнения материального баланса**  $[E]_0 = [E] + [ES]$

$$[E] = [E]_0 - [ES].$$

Получим

$$[ES] = \frac{k_1[S] + k_{-2}[P]}{k_{-1} + k_2}([E]_0 - [ES]),$$

$$[ES] + \frac{k_1[S] + k_{-2}[P]}{k_{-1} + k_2}[ES] = \frac{k_1[S] + k_{-2}[P]}{k_{-1} + k_2}[E]_0,$$

$$[ES] \left( 1 + \frac{k_1[S] + k_{-2}[P]}{k_{-1} + k_2} \right) = \frac{k_1[S] + k_{-2}[P]}{k_{-1} + k_2}[E]_0,$$

$$[ES] \left( \frac{k_{-1} + k_2 + k_1[S] + k_{-2}[P]}{k_{-1} + k_2} \right) = \frac{k_1[S] + k_{-2}[P]}{k_{-1} + k_2}[E]_0,$$

$$[ES] = \frac{k_1[S] + k_{-2}[P]}{k_{-1} + k_2 + k_1[S] + k_{-2}[P]}[E]_0.$$

**Скорость** изменения концентрации продукта

$$\begin{aligned} w &= \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] - k_{-2}[E][P] = k_2[ES] - k_{-2}([E]_0 - [ES])[P] = \\ &= [ES](k_2 + k_{-2}[P]) - k_{-2}[E]_0[P] = \\ &= \frac{(k_1[S] + k_{-2}[P])[E]_0(k_2 + k_{-2}[P])}{k_{-1} + k_2 + k_1[S] + k_{-2}[P]} - k_{-2}[E]_0[P] = \\ &= [E]_0 \left( \frac{(k_1[S] + k_{-2}[P])(k_2 + k_{-2}[P])}{k_{-1} + k_2 + k_1[S] + k_{-2}[P]} - k_{-2}[P] \right) = \\ &= \frac{(k_1k_2[S] - k_{-1}k_{-2}[P])[E]_0}{k_{-1} + k_2 + k_1[S] + k_{-2}[P]}. \end{aligned}$$

В начальный момент времени, когда продукт в системе отсутствует ( $[P] = 0$ )

$$w_{\text{прямая}} = \frac{k_1k_2[S][E]_0}{k_{-1} + k_2 + k_1[S]} = \frac{k_2[S][E]_0}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]} = \frac{w_{\text{max}}^S[S]}{K_M^S + [S]},$$

таким образом, уравнение принимает **вид уравнения Михаэлиса**.

Если концентрация субстрата падает до нуля  $[S] = 0$ , то

$$w_{\text{обратная}} = \frac{(-k_{-1}k_{-2}[P])[E]_0}{k_{-1} + k_2 + k_{-2}[P]} = \frac{-k_{-1}[P][E]_0}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_{-2}} + [P]} = \frac{w_{\text{max}}^P[P]}{K_M^P + [P]}$$

и уравнение принимает вид уравнения Михаэлиса по отношению к продукту **для обратной реакции**.

Эти **предельные** случаи очень важны.

**Во-первых**, если ферментативная реакция действительно обратима, то обратная реакция также является каталитической, и если в начале реакции в системе находится фермент и продукт, для обратной реакции  $w_{\text{max}}$  и  $K_M^P$  определяются так же просто, как если бы измерялась скорость прямой каталитической реакции.

**Во-вторых**, осложнения, обусловливаемые наличием обратной реакции, как правило, можно обойти, просто ограничивая измерения экспериментами, в которых  $[P] \approx 0$ .

**Скорость** образования продукта  $w$  обратимой ферментативной реакции **уменьшается по двум причинам**.



**Во-первых**, некоторое количество продукта в результате обратной реакции превращается **обратно в субстрат** – вычитаемое  $k_{-1}k_{-2}[P]$  в числителе выражения

$$w = \frac{(k_1k_2[S] - k_{-1}k_{-2}[P])[E]_0}{k_{-1} + k_2 + k_1[S] + k_{-2}[P]}$$

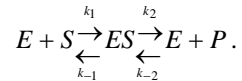
**Во-вторых**, увеличивается доля фермента, связанного в комплексе EP с продуктом, который не может взаимодействовать с субстратом – слагаемое  $k_{-2}[P]$  в знаменателе.

Таким образом, обратимая ферментативная реакция  $E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightleftharpoons[k_{-2}]{k_2} E + P$ , описываемая уравнением  $w = \frac{(k_1k_2[S] - k_{-1}k_{-2}[P])[E]_0}{k_{-1} + k_2 + k_1[S] + k_{-2}[P]}$ , служит примером простой **биологической регуляции** на молекулярном уровне:

- продукт образуется быстро, только если его мало,
- продукт образуется медленнее, если концентрация  $[P]$  велика.

#### ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Запишите выражение для скорости образования продукта реакции

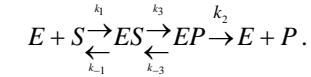


2. Проанализируйте предельные случаи  $[P]=0$  и  $[S]=0$  для обратимой ферментативной реакции.
3. Назовите две причины, по которым уменьшается скорость образования продукта обратимой ферментативной реакции.

### 21. СНЯТИЕ ОГРАНИЧЕНИЙ МИХАЭЛИСА-МЕНТЕН:

#### 2. РЕАКЦИИ С ЧИСЛОМ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ СОЕДИНЕНИЙ БОЛЬШЕ ОДНОГО

Будем считать теперь, что природа фермент субстратного комплекса изменяется в ходе протекания реакции



При стационарных условиях

$$[ES] = const, [EP] = const$$

**кинетические уравнения** будут иметь вид

$$\begin{cases} \frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] + k_{-3}[EP] - (k_{-1} + k_3)[ES] = 0 \\ \frac{d[EP]}{dt} = k_3[ES] - (k_{-3} + k_2)[EP] = 0 \\ w = \frac{d[P]}{dt} = k_2[EP]. \end{cases}$$

Уравнение материального баланса

$$[E]_0 = [E] + [ES] + [EP].$$

Отсюда  $[E] = [E]_0 - [ES] - [EP]$ .

Подставляем в первое уравнение системы

$$\begin{aligned} 0 &= k_1[E][S] + k_{-3}[EP] - (k_{-1} + k_3)[ES] = \\ &= k_1([E]_0 - [ES] - [EP])[S] + k_{-3}[EP] - (k_{-1} + k_3)[ES]. \end{aligned}$$

Далее

$$\begin{aligned} (k_{-1} + k_3)[ES] + k_1[ES][S] &= k_1[E]_0[S] - k_1[EP][S] + k_{-3}[EP], \\ [ES] &= \frac{k_1[E]_0[S] - k_1[EP][S] + k_{-3}[EP]}{k_{-1} + k_3 + k_1[S]}. \end{aligned}$$

Подставляем это выражение во второе уравнение системы

$$\begin{aligned} \frac{d[EP]}{dt} &= k_3[ES] - (k_{-3} + k_2)[EP] = 0, \\ k_3 \frac{k_1[E]_0[S] - k_1[EP][S] + k_{-3}[EP]}{k_{-1} + k_3 + k_1[S]} - (k_{-3} + k_2)[EP] &= 0 \end{aligned}$$

и решаем его относительно  $[EP]$ . Выражение

$$\frac{k_3(k_1[E]_0[S] - k_1[EP][S] + k_{-3}[EP]) - (k_{-1} + k_3 + k_1[S])(k_{-3} + k_2)[EP]}{k_{-1} + k_3 + k_1[S]} = 0$$

выполняется, если числитель равен нулю.

$$\begin{aligned} k_3k_1[E]_0[S] - k_3k_1[EP][S] + k_3k_{-3}[EP] - \\ - (k_{-1}k_{-3} + k_{-1}k_2 + k_3k_{-3} + k_3k_2 + k_1k_{-3}[S] + k_1k_2[S])[EP] &= 0 \end{aligned}$$

или

$$k_3k_1[E]_0[S] - k_3k_1[EP][S] + k_3k_{-3}[EP] - k_{-1}k_{-3}[EP] - k_{-1}k_2[EP] - k_3k_{-3}[EP] - k_3k_2[EP] - k_1k_{-3}[S][EP] - k_1k_2[S][EP] = 0,$$

откуда

$$k_3k_1[E]_0[S] = [EP](+k_3k_1[S] - k_3k_{-3} + k_{-1}k_{-3} + k_{-1}k_2 + k_3k_{-3} + k_3k_2 + k_1k_{-3}[S] + k_1k_2[S])$$

или

$$[EP] = \frac{k_3k_1[E]_0[S]}{k_{-1}k_{-3} + k_{-1}k_2 + k_3k_2 + [S]k_1(k_3 + k_{-3} + k_2)}.$$

Подставляем это выражение в скорость образования продукта

$$w = \frac{d[P]}{dt} = k_2[EP]$$

и получаем

$$w = \frac{k_3k_2k_1[E]_0[S]}{k_{-1}k_{-3} + k_{-1}k_2 + k_3k_2 + [S]k_1(k_3 + k_{-3} + k_2)}.$$

Это выражение *подобно* уравнению Михаэлиса

$$w = \frac{w_{\max}[S]}{K_M + [S]},$$

если разделить числитель и знаменатель на  $k_1(k_3 + k_{-3} + k_2)$ .

$$w = \frac{\frac{k_3k_2k_1[E]_0}{k_1(k_3 + k_{-3} + k_2)}[S]}{\frac{k_{-1}k_{-3} + k_{-1}k_2 + k_3k_2}{k_1(k_3 + k_{-3} + k_2)} + [S]},$$

здесь  $w_{\max} = \frac{k_3k_2k_1[E]_0}{k_1(k_3 + k_{-3} + k_2)}$ , а роль константы Михаэлиса выполняет

$$K_S = \frac{k_{-1}k_{-3} + k_{-1}k_2 + k_3k_2}{k_1(k_3 + k_{-3} + k_2)}.$$

Таким образом, **введение второго** промежуточного соединения в основную кинетическую схему Михаэлиса-Ментен приводит к результату, который в кинетике стационарных реакций **невозможно экспериментально отличить** от упрощенного случая с одним промежуточным соединением.

Хотя смысл кажущихся  $K_S$  и  $w_{\max}$  в терминах констант скоростей элементарных реакций **совершенно другой**, экспериментальная зависимость

в координатах Лайнуивера-Берка  $\left(\frac{1}{w}, \frac{1}{[S]}\right)$  по-прежнему описывается

**прямой** с углом наклона  $\frac{K_S}{w_{\max}}$ , пересекающей ось ординат при значении

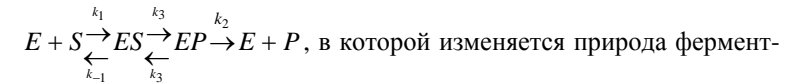
$$y = \frac{1}{w_{\max}}.$$

Таким образом, описанный вывод указывает на одну из самых серьезных слабостей **стационарной** кинетики ферментативных реакций, а именно, на **невозможность** по данным **стационарной** кинетики детектировать наличие нескольких промежуточных соединений в реакции.

Это пример **типичной проблемы**, которая возникает при постановке научных экспериментов, когда **усложненная и детализированная** теория **бесполезна**, если экспериментальные данные **не позволяют** ее проверить.

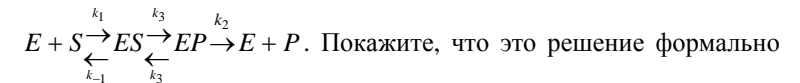
#### ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Запишите систему кинетических уравнений для реакции



субстратного комплекса.

2. Запишите выражение для скорости образования продукта реакции



подобно уравнению Михаэлиса.

3. Возможно ли в рамках стационарной кинетики ферментативных реакций экспериментально детектировать наличие нескольких промежуточных соединений в ферментативной реакции?

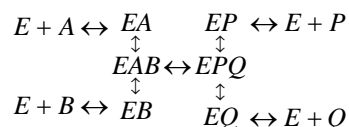
## 22. СНЯТИЕ ОГРАНИЧЕНИЙ МИХАЭЛИСА-МЕНТЕН:

### 3. МУЛЬТИСУБСТРАТНЫЕ РЕАКЦИИ

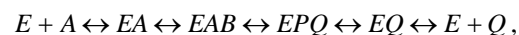
Приближение Лайнуивера-Берка позволяет различить упорядоченные, статистические и "пинг-понг" мультисубстратные реакции.

Схемы этих механизмов (для случая двух субстратов  $A$  и  $B$  и двух продуктов  $P$  и  $Q$ ) имеют вид:

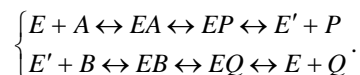
– *статистический* механизм



– *упорядоченный* механизм



– *"пинг-понг"* реакция



В реакции, происходящей по статистическому и упорядоченному механизмам, образуется *тройной комплекс* – *оба* субстрата должны связаться с ферментом *до того*, как реакция произойдет.

В *реакции типа "пинг-понг"* фермент сначала связывается и осуществляет превращение первого субстрата, а затем происходит взаимодействие со вторым субстратом.

Кинетика реакций с образованием *тройных комплексов* описывается уравнением

$$w = \frac{V[A][B]}{C_0 + C_1[A] + C_2[B] + [A][B]},$$

а кинетика *"пинг-понг"* реакций – уравнением

$$w = \frac{V[A][B]}{C_1[A] + C_2[B] + [A][B]},$$

где  $C_0$ ,  $C_1$  и  $C_2$  – комбинации разных констант скоростей в соответствующих механизмах.

*Характерные особенности* этих уравнений.

*Первое*, если один из субстратов присутствует в избытке, например  $[B]_0 \gg [A]_0$ , то оба уравнения упрощаются до одинакового вида:

$$w = \frac{V[A][B]}{C_0 + C_1[A] + C_2[B] + [A][B]} = \frac{V[A]}{\frac{C_0}{[B]} + \frac{C_1[A]}{[B]} + C_2 + [A]} \approx \frac{V[A]}{C_2 + [A]},$$

$$w = \frac{V[A][B]}{C_1[A] + C_2[B] + [A][B]} = \frac{V[A]}{\frac{C_1[A]}{[B]} + C_2 + [A]} \approx \frac{V[A]}{C_2 + [A]}.$$

Уравнение  $w = \frac{V[A]}{C_2 + [A]}$  внешне совпадает с уравнением Михаэлиса,

полученным при рассмотрении схемы Михаэлиса-Ментен для реакции с одним субстратом.

Эта ситуация *типична* для любой ферментативной реакции (например, гидролиз эфиров), при которой одним из реагентов является *вода*, например для многих ферментативных процессов в желудочно-кишечном тракте (с ферментами трипсин, химотрипсин, пепсин и т.д.).

*Кроме того*, важной особенностью этих уравнений скоростей двухсубстратных реакций является то, что при *постоянной* концентрации второго субстрата (пусть, например,  $[B] = const$ ) и изменении концентрации первого субстрата  $A$  зависимость  $\frac{1}{w}$  от  $\frac{1}{[A]}$  (зависимость Лайнуивера-Берка) *описывается прямой*.

Действительно, при  $[B] = const$  уравнения

$$w = \frac{V[A][B]}{C_0 + C_1[A] + C_2[B] + [A][B]}$$

и

$$w = \frac{V[A][B]}{C_1[A] + C_2[B] + [A][B]}$$

можно переписать в виде

$$\frac{1}{w} = \frac{C_0 + C_1[A] + C_2[B] + [A][B]}{V[A][B]} = \left( \frac{C_0}{V[B]} + \frac{C_2}{V} \right) \frac{1}{[A]} + \left( \frac{C_1}{V[B]} + \frac{1}{V} \right)$$

и

$$\frac{1}{w} = \frac{C_1[A] + C_2[B] + [A][B]}{V[A][B]} = \frac{C_2}{V} \frac{1}{[A]} + \left( \frac{C_1}{V[B]} + \frac{1}{V} \right).$$

Характер изменения зависимостей  $\frac{1}{w}$  от  $\frac{1}{[A]}$ , при проведении измерений с различными значениями постоянной концентрации  $[B_1] = const$ ,  $[B_2] = const$ ,  $[B_3] = const$ ,  $[B_4] = const$ ,  $[B_1] < [B_2] < [B_3] < [B_4]$ , будет **различен** в случаях реакций с образованием тройных комплексов и в "пинг-понг" реакциях.

Действительно, в реакциях с образованием тройного комплекса постоянная концентрация реагента  $B$  входит в коэффициент  $\left( \frac{C_0}{V[B]} + \frac{C_2}{V} \right)$

при  $\frac{1}{[A]}$  (тангенс угла наклона прямой) и в постоянный коэффициент  $\left( \frac{C_1}{V[B]} + \frac{1}{V} \right)$ .

Поэтому увеличение концентрации  $B$  в ряду  $[B_1] < [B_2] < [B_3] < [B_4]$  будет приводить одновременно и к смещению прямых вниз по оси  $\frac{1}{w}$ , и к уменьшению угла наклона (рисунок 24).

При этом прямые пересекаются в одной точке, координаты которой можно легко получить, решив систему уравнений относительно координат  $y = \frac{1}{w}$  и  $x = \frac{1}{[A]}$ ,

$$\begin{cases} y = \left( \frac{C_0}{V[B_1]} + \frac{C_2}{V} \right) \cdot x + \left( \frac{C_1}{V[B_1]} + \frac{1}{V} \right) \\ y = \left( \frac{C_0}{V[B_2]} + \frac{C_2}{V} \right) \cdot x + \left( \frac{C_1}{V[B_2]} + \frac{1}{V} \right) \end{cases}$$

В точке пересечения  $y_1 = y_2$

$$\left( \frac{C_0}{V[B_1]} + \frac{C_2}{V} \right) \cdot x + \left( \frac{C_1}{V[B_1]} + \frac{1}{V} \right) = \left( \frac{C_0}{V[B_2]} + \frac{C_2}{V} \right) \cdot x + \left( \frac{C_1}{V[B_2]} + \frac{1}{V} \right).$$

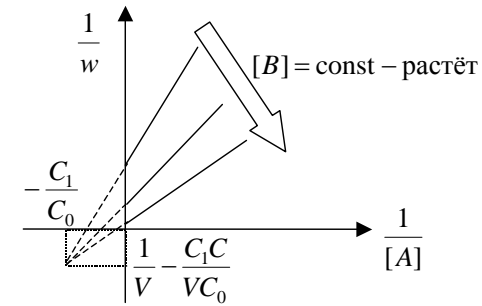


Рисунок 24 – Зависимости Лайнуивера-Берка для мультисубстратных реакций с образованием тройного комплекса

Откуда получаем

$$\left( \frac{C_0}{V[B_1]} - \frac{C_0}{V[B_2]} \right) \cdot x = \frac{C_1}{V[B_2]} - \frac{C_1}{V[B_1]}$$

или

$$\frac{C_0 [B_2] - [B_1]}{V [B_1][B_2]} x = -\frac{C_1 [B_2] - [B_1]}{V [B_1][B_2]}.$$

Следовательно

$$x = -\frac{C_1}{C_0},$$

при котором

$$y = \left( \frac{C_0}{V[B_1]} + \frac{C_2}{V} \right) \cdot \left( -\frac{C_1}{C_0} \right) + \frac{C_1}{V[B_1]} + \frac{1}{V} = \frac{1}{V} - \frac{C_1 C_2}{V C_0}.$$

Таким образом, **координаты точки пересечения прямых**

$$\begin{aligned} \frac{1}{[A]} &= -\frac{C_1}{C_0}, \\ \frac{1}{w} &= \frac{1}{V} - \frac{C_1 C_2}{V C_0} \end{aligned}$$

**не зависят** от величин  $[B_1]$  и  $[B_2]$ . Семейство прямых всегда пересекается в точке **слева** от оси ординат. А её положение относительно оси абсцисс

определяется *соотношением* между величинами  $C_0, C_1, C_2, V$  и знаком выражения  $\frac{1}{V} - \frac{C_1 C_2}{V C_0}$ .

В "пинг-понг" реакциях величина  $[B]$  входит только в постоянный коэффициент  $\left(\frac{C_1}{V[B]} + \frac{1}{V}\right)$ . Поэтому увеличение концентрации  $B$  в ряду  $[B_1] < [B_2] < [B_3] < [B_4]$  будет приводить *только к смещению* прямых вниз по оси  $\frac{1}{w}$  (рисунок 25). Мы получаем *семейство параллельных прямых*.

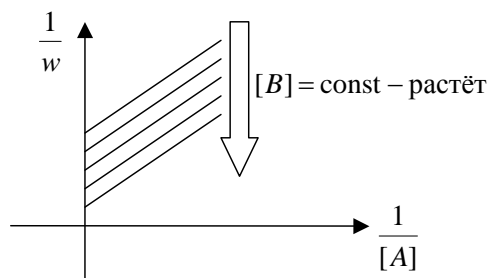
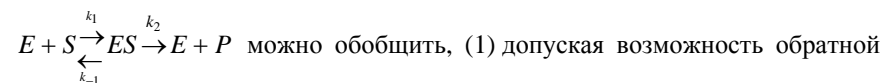


Рисунок 25 – Зависимости Лайнуивера-Берка для мультисубстратных реакций типа "пинг-понг"

Таким образом, использование представления Лайнуивера-Берка *позволяет различить механизмы мультисубстратных реакций* с образованием тройного комплекса и "пинг-понг" реакций.

Для установления различий между статистическим и упорядоченными механизмами требуются дальнейшие исследования (например, ингибирования или изотопного обмена).

Таким образом, основную кинетическую схему Михаэлиса-Ментен



реакции фермента с продуктом, (2) присутствие многих промежуточных соединений и (3) присутствие двух субстратов, способных реагировать раздельно ("пинг-понг") или одновременно (образование тройного комплекса) с ферментом.

Алгебраические сложности можно легко обойти, используя зависимость Лайнуивера-Берка  $\frac{1}{w}$  от  $\frac{1}{[A]}$  (которая соответствует прямой).

При этом:

1) *ингибирующее влияние продукта* сводится к минимуму *ограничением измерений начальных скоростей* реакций (так, чтобы эффективная концентрация продукта  $[P]$  была равна нулю),

2) поскольку вид уравнения скорости одинаков для ситуации и с одним, и с большим числом промежуточных соединений, *введение в схему дополнительных* промежуточных фермент-субстратных комплексов или комплексов фермента с продуктом *бессмысленно*,

3) *влияние второго субстрата подавляется* проведением эксперимента при условиях, при которых *концентрация* одного из двух субстратов *постоянна или избыточна*.

Простая схема Михаэлиса-Ментен определяет простейший механизм, которым можно объяснить зависимость скоростей ферментативных реакций от концентрации субстрата и фермента.

Однако при попытке обобщить эту схему и применить её к более реальным (и, следовательно, более сложным) ситуациям *даёт сравнительно мало новой информации*.

#### ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Запишите зависимость скорости образования продукта для мультисубстратной реакции с образованием тройных комплексов.
2. Запишите зависимость скорости образования продукта для мультисубстратной реакции типа "пинг-понг".
3. Изобразите графически зависимости Лайнуивера-Берка для мультисубстратных реакций с образованием тройного комплекса.
4. Изобразите графически зависимости Лайнуивера-Берка для мультисубстратных реакций типа "пинг-понг".
5. Каким образом анализ зависимостей Лайнуивера-Берка позволяет различить ферментативные мультисубстратные реакции с образованием тройного комплекса и реакции типа "пинг-понг"?

### 23. РЕГУЛЯЦИЯ СКОРОСТЕЙ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

В присутствии обратной реакции схема Михаэлиса-Ментен регулирует количество продукта, поскольку скорость его образования падает с ростом его концентрации. Такая "естественная" **"само"-регуляция** происходит во всех ферментативных реакциях, в которых катализируется превращение субстрата в продукт.

Однако, как известно, существуют **другие типы** регуляции ферментативной активности, основанные на присутствии в системе химических соединений, **эффекторов**, самих по себе **не являющихся** субстратами или продуктами, однако способных связываться с молекулой фермента на участках, которые, вообще говоря, могут быть удалены от каталитического активного центра фермента.

Действие таких внешних регуляторов (эффекторов) обеспечивает **эффективный контроль за скоростями ферментативных реакций** и служит средством биохимического отклика системы на изменение внешних условий путем изменения скоростей соответствующих ферментативных реакций.

Внешние регуляторы ферментативных реакций можно разделить на **две группы**.

В **первую** группу входят внешние регуляторы, которые **неспецифичны в структурном отношении** – их активность коррелирует с некоторыми феноменологическими физико-химическими свойствами, такими, как, например:

- поверхностное натяжение в их растворах,
- растворимость,
- степень ионизации

в большей степени, чем с присутствием в их структуре каких-либо специфических функциональных химических группировок.

Примеры таких веществ – лекарственные вещества-анестетики общего действия, такие, как хлороформ или диэтиловый эфир, физиологическая активность которых коррелирует с размером их молекул и с растворимостью в органических неполярных растворителях.

К другой аналогичной группе веществ относятся некоторые наркотические и возбуждающие агенты, такие, как пикротоксин или димфлин, действие которых основано на неспецифическом связывании с внешним слоем мембран и изменении ионной проницаемости синаптических мембран (нервных синапсов).

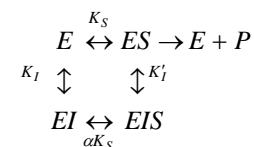
**Вторую** группу составляют эффекторы, действие которых основано на изменении ими каталитического действия ферментов в результате **специфического** взаимодействия эффектора с молекулой фермента.

Благодаря тому, что скорости обычных химических реакций намного ниже скоростей каталитических реакций, избирательность действия таких специфических эффекторов обеспечивает **эффект "химического усиления"**, благодаря которому всего несколько молекул эффектора существенным образом влияют на выход продукта в масштабах клетки.

**Эффекторы** ферментативных реакций принято разделять на **ингибиторы** и **активаторы**.

Общепринятая классификация ингибиторов основана на их влиянии на зависимость Лайнуивера-Берка (зависимость  $\frac{1}{w}$  от  $\frac{1}{[S]}$ ).

**Общую схему каталитической реакции** в присутствии ингибитора можно представить в виде

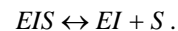


Здесь  $K_I$  – константа диссоциации комплекса  $EI$  в реакции  $(EI \leftrightarrow E + I)$ ,

$K_S$  – константа диссоциации комплекса  $ES$  в реакции  $(ES \leftrightarrow E + S)$ ,

$K'_I$  – константа диссоциации комплекса  $EIS$  в реакции  $EIS \leftrightarrow ES + I$ ,

$\alpha K_S$  – константа диссоциации комплекса  $EIS$  в реакции



Предельные случаи этой схемы, кинетический анализ которых достаточно однозначен и будет приведен ниже, представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Возможные случаи общего процесса ингибирования ферментов

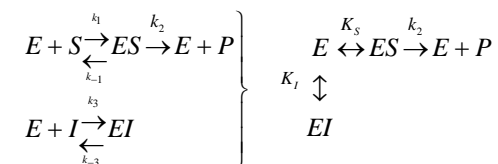
Предельное условие	Тип ингибирования	Механизм ингибирования
$\alpha \rightarrow \infty$	Конкурентное ингибирование	Связывание фермента с ингибитором предотвращает связывание с субстратом
$\alpha = 1$	Неконкурентное ингибирование	Связывание фермента с ингибитором не влияет на связывание с субстратом, но предотвращает образование продукта
$K_I = \infty$	Бесконкурентное ингибирование	Ингибитор связывается с ферментом только после образования фермент-субстратного комплекса и предотвращает образование продукта
$\alpha \neq 1, \alpha \neq \infty$ $K_I \neq \infty$	Смешанное ингибирование	Общий случай

#### ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Какие химические соединения называются эффикторами?
2. Назовите две группы внешних регуляторов ферментативных реакций.
3. Запишите общую схему каталитической реакции в присутствии ингибитора.
4. Запишите предельные условия для случаев конкурентного, неконкурентного и бесконкурентного ингибирования.

#### 24. КОНКУРЕНТНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ

Общая схема каталитической реакции для случая конкурентного ингибирования будет иметь следующий вид:



Образование комплекса  $EI$  является кинетическим "тупиком" – из него не образуются продукты. Ингибитор выводит из реакции некоторое количество свободного фермента, который теперь не может связываться с субстратом. Поэтому концентрация комплекса  $ES$  понижена и скорость реакции  $w = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES]$  (пропорциональная  $[ES]$ ) падает.

В **стационарном** случае субстрат и ингибитор присутствуют в системе в избытке

$$[E]_0 \ll [S]_0, [E]_0 \ll [I]_0.$$

Уравнения скоростей в стационарном состоянии будут иметь вид

$$\begin{aligned}
 \frac{d[ES]}{dt} &= -(k_{-1} + k_2)[ES] + k_1[E][S] = 0 \\
 \frac{d[EI]}{dt} &= -k_{-3}[EI] + k_3[E][I].
 \end{aligned}$$

Обозначим

$$\begin{aligned}
 \frac{[E][S]}{[ES]} &= \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_S - \text{константа Михаэлиса для субстрата } S, \\
 \frac{[E][I]}{[EI]} &= \frac{k_{-3}}{k_3} = K_I - \text{константа диссоциации комплекса } EI.
 \end{aligned}$$

Подставляем в эти выражения для констант значение  $[E] = [E]_0 - [ES] - [EI]$ , которое следует из уравнения материального баланса

$$[E]_0 = [E] + [ES] + [EI].$$

Получаем

$$K_S = \frac{[S]([E]_0 - [ES] - [EI])}{[ES]},$$

$$K_I = \frac{[I]([E]_0 - [ES] - [EI])}{[EI]}$$

Из последнего выражения следует

$$[EI] = \frac{[I]([E]_0 - [ES])}{K_I + [I]}$$

Подставляем  $[EI]$  в  $K_S = \frac{[S]([E]_0 - [ES] - [EI])}{[ES]}$  и решаем относительно  $[ES]$

$$K_S = \frac{[S] \cdot \left( [E]_0 - [ES] - \frac{[I]([E]_0 - [ES])}{K_I + [I]} \right)}{[ES]} = \frac{[S][E]_0 - [S][ES] - \frac{[S][I][E]_0 - [S][I][ES]}{K_I + [I]}}{[ES]}$$

Откуда получаем

$$K_I K_S [ES] + K_S [ES][I] = K_I [S][E]_0 + \frac{[S][E]_0 [I]}{K_I + [I]} - K_I [S][ES] - \frac{[S][ES][I] - [S][I][E]_0 + [S][I][ES]}{K_I + [I]}$$

или

$$K_I K_S [ES] + K_S [ES][I] = K_I [S][E]_0 - K_I [S][ES]$$

Таким образом

$$[ES] = \frac{K_I [S][E]_0}{K_S [I] + K_I [S] + K_I K_S}$$

Скорость получения продукта

$$w = \frac{d[P]}{dt} = k_2 [ES] = \frac{k_2 K_I [S][E]_0}{K_I [S] + K_S [I] + K_I K_S}$$

При достаточно больших концентрациях  $[S]$  скорость реакции приближается к предельной максимальной скорости  $w_{\max} = k_2 [E]_0$ , поэтому можем записать

$$w = \frac{w_{\max} K_I [S]}{K_I [S] + K_S [I] + K_I K_S}$$

Берем обратные величины от обеих частей уравнения

$$\frac{1}{w} = \frac{K_I [S] + K_S [I] + K_I K_S}{w_{\max} K_I [S]} = \frac{1}{w_{\max}} + \frac{K_S}{w_{\max}} \left( \frac{K_I + [I]}{K_I} \right) \cdot \frac{1}{[S]}$$

или

$$\frac{1}{w} = \frac{1}{w_{\max}} + \left( 1 + \frac{[I]}{K_I} \right) \cdot \frac{K_S}{w_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]}$$

Сравним это выражение (уравнение прямой в координатах  $\frac{1}{w}$  и  $\frac{1}{[S]}$ )

для конкурентного ингибирования с формулой Лайнуивера-Берка в отсутствие ингибирования

$$\frac{1}{w} = \frac{1}{w_{\max}} + \frac{K_S}{w_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]}$$

Очевидно, что для разных (но постоянных) значений концентрации конкурентного ингибитора  $[I] = const$  зависимость скорости реакции от концентрации **в координатах Лайнуивера-Берка** будет выглядеть как **семейство прямых**, отсекающих на оси ординат **одинаковый отрезок**, равный  $\frac{1}{w_{\max}}$ , причем угол наклона прямых будет тем больше, чем больше

$[I]$  (рисунок 26).

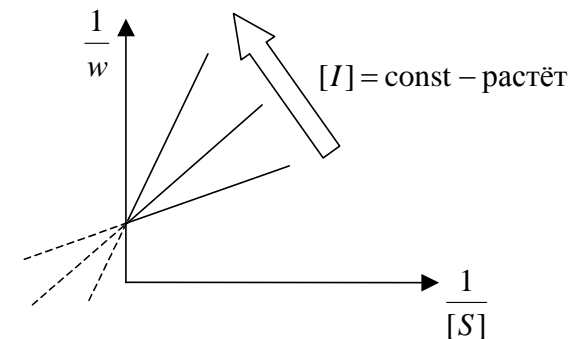


Рисунок 26 – Зависимости Лайнуивера-Берка в случае конкурентного ингибирования



Поскольку: (1) ингибитор и субстрат конкурируют друг с другом за один и тот же участок связывания на молекуле фермента и (2) в обоих случаях связывание является обратимым, то при достаточно большом избытке  $[S]$  относительно  $[I]$  практически весь фермент будет находиться в комплексе  $ES$  и скорость реакции будет равна той же максимальной предельной скорости ферментативной реакции  $w_{\max}$ .

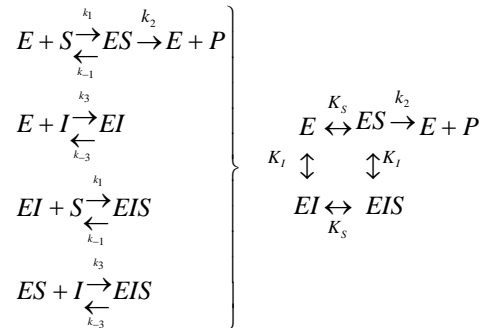
При пониженных концентрациях  $[S]$  ингибитор выводит некоторое количество фермента из сферы реакции в виде комплекса  $EI$ , так что концентрация  $ES$  (и, следовательно, скорость реакции  $w$ ) понижается.

### ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Получите выражение для скорости ферментативной реакции в случае конкурентного ингибирования.
2. В чем особенность зависимостей Лайнуивера-Берка при различных постоянных концентрациях ингибитора в случае конкурентного ингибирования?
3. Запишите координаты точки, в которой пересекаются прямые Лайнуивера-Берка в случае конкурентного ингибирования?

## 25. НЕКОНКУРЕНТНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ. СМЕШАННОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ

*Кинетическая схема* ферментативной реакции в случае *неконкурентного* ингибирования имеет вид:



При неконкурентном ингибировании ингибитор не влияет на связывание субстрата с ферментом, но препятствует превращению субстрата в продукты своим присутствием в составе фермент-субстратного комплекса.

В стационарных условиях *система кинетических уравнений* имеет вид

$$\begin{cases}
 \frac{d[ES]}{dt} = -(k_{-1} + k_2)[ES] + k_1[E][S] - k_3[ES][I] + k_{-3}[EIS] = 0 \\
 \frac{d[EI]}{dt} = k_3[E][I] + k_{-1}[EIS] - k_{-3}[EI] - k_1[EI][S] = 0 \\
 \frac{d[EIS]}{dt} = k_1[EI][S] + k_3[ES][I] - (k_{-1} + k_{-3})[EIS] = 0 \\
 \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES]
 \end{cases}$$

Запишем *уравнение материального баланса*

$$[E]_0 = [E] + [ES] + [EI] + [EIS]$$

в виде

$$[E] = [E]_0 - [ES] - [EI] - [EIS].$$

Определим *константы диссоциации*

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}, \quad K_I = \frac{[ES][I]}{[EIS]}, \\
 K_S = \frac{[E][S]}{[ES]}, \quad K_S = \frac{[EI][S]}{[EIS]}.$$

Очевидно  $\frac{[EI]}{[EIS]} = \frac{[E]}{[ES]}$ , откуда следует

$$\begin{cases}
 [EIS] = \frac{[ES][I]}{K_I} \\
 ([E]_0 - [ES] - [EI] - [EIS])[EIS] = [ES][EI] \\
 [EI] = \frac{K_S[EIS]}{[S]} = \frac{K_S[ES][I]}{K_I[S]}
 \end{cases}$$

Подставляем во второе уравнение этой системы выражения для  $[EI]$  и  $[EIS]$  из первого и третьего уравнений и решаем второе уравнение относительно  $[ES]$

$$\left( [E]_0 - [ES] - \frac{K_S [ES][I]}{K_I [S]} - \frac{[ES][I]}{K_I} \right) \frac{[ES][I]}{K_I} = [ES] \frac{K_S [ES][I]}{K_I [S]},$$

далее

$$[E]_0 - [ES] - \frac{K_S [ES][I]}{K_I [S]} - \frac{[ES][I]}{K_I} = [ES] \frac{K_S}{[S]},$$

откуда получаем

$$K_I [S][E]_0 - K_I [S][ES] - K_S [ES][I] - [ES][I][S] = K_S K_I [ES],$$

или

$$K_S K_I [ES] + K_I [S][ES] + K_S [ES][I] + [ES][I][S] = K_I [S][E]_0$$

и, наконец,

$$[ES](K_S K_I + K_I [S] + K_S [I] + [I][S]) = K_I [S][E]_0,$$

откуда следует

$$\begin{aligned} [ES] &= \frac{K_I [S][E]_0}{K_S K_I + K_I [S] + K_S [I] + [I][S]} = \\ &= \frac{[S][E]_0}{K_S + [S] + \frac{K_S [I]}{K_I} + \frac{[I][S]}{K_I}}. \end{aligned}$$

Таким образом, выражение для *скорости образования продукта* имеет вид

$$\begin{aligned} w &= k_2 [ES] = \\ &= \frac{k_2 [E]_0 [S]}{K_S + [S] + \frac{K_S [I]}{K_I} + \frac{[I][S]}{K_I}} = \\ &= \frac{w_{\max} [S]}{K_S + [S] + \frac{K_S [I]}{K_I} + \frac{[I][S]}{K_I}}, \end{aligned}$$

где

$$w_{\max} = k_2 [E]_0.$$

Выражение для обратной скорости  $\frac{1}{w}$  будет иметь вид

$$\frac{1}{w} = \frac{K_S + [S] + \frac{K_S [I]}{K_I} + \frac{[I][S]}{K_I}}{w_{\max} [S]} = \frac{K_S}{w_{\max} [S]} + \frac{1}{w_{\max}} + \frac{[I]}{K_I} \frac{K_S}{w_{\max} [S]} + \frac{[I]}{K_I} \frac{1}{w_{\max}}$$

или

$$\frac{1}{w} = \left( 1 + \frac{[I]}{K_I} \right) \cdot \left( \frac{1}{w_{\max}} + \frac{K_S}{w_{\max} [S]} \right).$$

Таким образом, это выражение представляет собой *уравнение прямой* в координатах Лайнуивера-Берка.

Концентрация неконкурентного ингибитора [I] определяет как наклон прямой (множитель  $\frac{K_I + [I]}{K_I} \frac{K_S}{w_{\max}}$ ), так и постоянный коэффициент

$\frac{K_I + [I]}{K_I} \frac{1}{w_{\max}}$  в уравнении прямой.

В присутствии постоянной концентрации неконкурентного ингибитора ( $[I] = const$ ) изменение зависимости Лайнуивера-Берка состоит в *увеличении угла наклона* прямых и *увеличении величины отрезка*, отсекаемого на оси ординат прямыми Лайнуивера-Берка.

При этом все прямые пересекаются в точке, лежащей на оси абсцисс (рисунок 27).

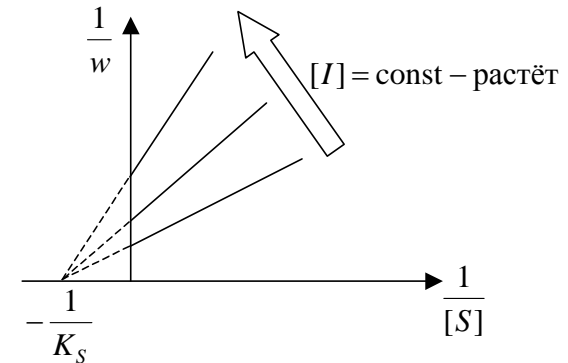


Рисунок 27 – Зависимости Лайнуивера-Берка в случае неконкурентного ингибирования

Координаты этой точки определяются равенством

$$\frac{1}{w_{\max}} + \frac{K_S}{w_{\max}} \frac{1}{[S]} = 0$$

или

$$\frac{1}{[S]} = -\frac{1}{K_S}.$$

Конкурентное и неконкурентное ингибирование представляют собой два крайних случая ингибирования. На практике, большинство ферментативных реакций принадлежат к *промежуточному* случаю.

При этом характерная точка пересечения прямых в координатах Лайнуивера-Берка находится в "промежуточном" положении (рисунок 25).

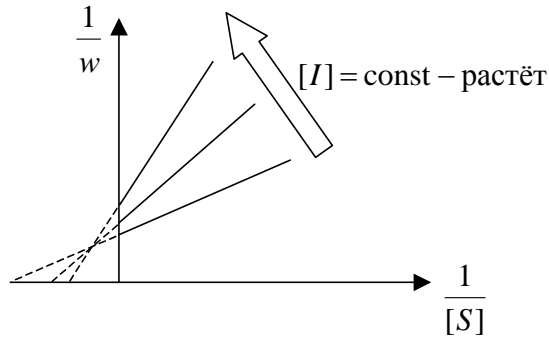


Рисунок 28 – Зависимости Лайнуивера-Берка в случае смешанного ингибирования

### ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Получите выражение для скорости ферментативной реакции в случае неконкурентного ингибирования.
2. В чем особенность зависимостей Лайнуивера-Берка при различных постоянных концентрациях ингибитора в случае неконкурентного ингибирования?
3. Запишите координаты точки, в которой пересекаются прямые Лайнуивера-Берка в случае неконкурентного ингибирования?

## 26. МЕТОД ДИКСОНА

*Метод Диксона* позволяет определять константу диссоциации  $K_I$  даже при отсутствии информации об абсолютном значении концентрации субстрата.

Для этого перепишем выражения Лайнуивера-Берка для конкурентного и неконкурентного ингибирования в виде:

$$\frac{1}{w} = \frac{1}{w_{\max}} \cdot \left(1 + \frac{K_S}{[S]}\right) + \frac{1}{w_{\max} K_I} \cdot \left(1 + \frac{K_S}{[S]}\right) \cdot [I] \text{ – неконкурентное и}$$

$$\frac{1}{w} = \frac{1}{w_{\max}} \cdot \left(1 + \frac{K_S}{[S]}\right) + \frac{K_S}{w_{\max} K_I [S]} \cdot [I] \text{ – конкурентное ингибирование.}$$

Эти уравнения служат основой для построения *зависимости Диксона* ( $\frac{1}{w}$  от концентрации ингибитора  $[I]$ ) при постоянной концентрации субстрата  $[S]$  (рисунок 29).

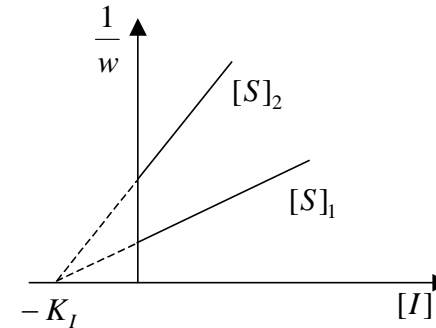


Рисунок 29 – Зависимости Диксона для случая неконкурентного ингибирования

В случае *неконкурентного ингибирования* прямые Диксона пересекаются в точке, определяемой равенством

$$\begin{aligned} \frac{1}{w_{\max}} \left(1 + \frac{K_S}{[S]_1}\right) + \frac{1}{w_{\max} K_I} \left(1 + \frac{K_S}{[S]_1}\right) \cdot [I] &= \\ &= \frac{1}{w_{\max}} \left(1 + \frac{K_S}{[S]_2}\right) + \frac{1}{w_{\max} K_I} \left(1 + \frac{K_S}{[S]_2}\right) \cdot [I], \end{aligned}$$

откуда следует

$$\begin{aligned} \frac{1}{[S]_1} + \frac{1}{[S]_1 K_I} [I] &= \frac{1}{[S]_2} + \frac{1}{[S]_2 K_I} [I], \\ \frac{1}{[S]_1 K_I} [I] - \frac{1}{[S]_2 K_I} [I] &= \frac{1}{[S]_2} - \frac{1}{[S]_1}, \\ \left( \frac{1}{[S]_2} - \frac{1}{[S]_1} \right) \cdot [I] &= -K_I \left( \frac{1}{[S]_2} - \frac{1}{[S]_1} \right), \end{aligned}$$

и, наконец,

$$[I] = -K_I.$$

При этом значении концентрации

$$\begin{aligned} \frac{1}{w} &= \frac{1}{w_{\max}} \left( 1 + \frac{K_S}{[S]} \right) + \frac{1}{w_{\max} K_I} \left( 1 + \frac{K_S}{[S]} \right) \cdot [I] = \\ &= \frac{1}{w_{\max}} \left( 1 + \frac{K_S}{[S]} \right) - \frac{1}{w_{\max} K_I} \left( 1 + \frac{K_S}{[S]} \right) \cdot K_I = \\ &= \frac{1}{w_{\max}} \left( 1 + \frac{K_S}{[S]} \right) - \frac{1}{w_{\max}} \left( 1 + \frac{K_S}{[S]} \right) = 0, \end{aligned}$$

следовательно, точка пересечения прямых Диксона лежит на оси абсцисс (рисунок 29).

В случае **конкурентного ингибирования** прямые Диксона (рисунок 30) пересекаются в точке, определяемой равенством

$$\frac{1}{w_{\max}} \left( 1 + \frac{K_S}{[S]_1} \right) + \frac{K_S}{w_{\max} K_I [S]_1} [I] = \frac{1}{w_{\max}} \left( 1 + \frac{K_S}{[S]_2} \right) + \frac{K_S}{w_{\max} K_I [S]_2} [I]$$

или

$$\frac{1}{[S]_1} + \frac{1}{K_I [S]_1} \cdot [I] = \frac{1}{[S]_2} + \frac{1}{K_I [S]_2} \cdot [I],$$

откуда следует

$$[I] = -K_I.$$

Следовательно, абсцисса пересечения прямых Диксона, так же как и в случае неконкурентного ингибирования, равна  $-K_I$  (рисунок 29). Но в

случае конкурентного ингибирования ордината этой точки равна  $\frac{1}{w_{\max}}$ , а не нулю, как в случае неконкурентного ингибирования (рисунок 29).

$$\frac{1}{w} = \frac{1}{w_{\max}} \left( 1 + \frac{K_S}{[S]_1} \right) - \frac{K_S}{w_{\max} K_I [S]_1} K_I = \frac{1}{w_{\max}}.$$

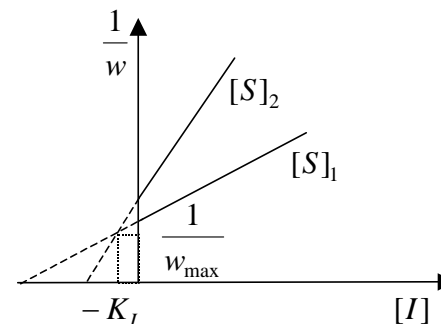


Рисунок 30 – Зависимости Диксона для случая конкурентного ингибирования

Таким образом, графическое построение зависимостей Диксона позволяют экспериментально определить  $K_I$ .

#### ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. В чем заключается преимущество метода Диксона?
2. В чем отличие зависимостей Диксона для случаев конкурентного и неконкурентного ингибирования?
3. Чему численно равна абсцисса точки пересечения прямых Диксона?

#### 27. pH-РЕГУЛЯЦИЯ СКОРОСТЕЙ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Типичная зависимость ферментативной активности от pH описывается **колоколообразной** кривой, как показано, например, на рисунке 31 для фермента *гистидазы*.

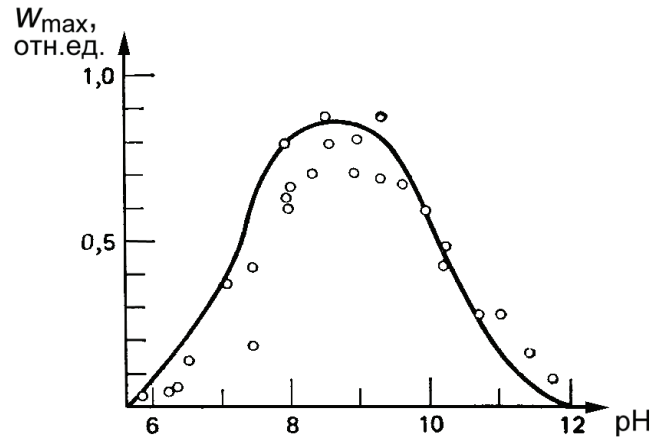


Рисунок 31 – Активность фермента гистидазы в зависимости от pH при действии на субстрат гистидин

Ферменты проявляют оптимальную активность при разных pH (рисунок 32), что позволяет осуществлять тонкую регулировку путей метаболизма либо самим организмом, либо в результате внешних воздействий на организм.

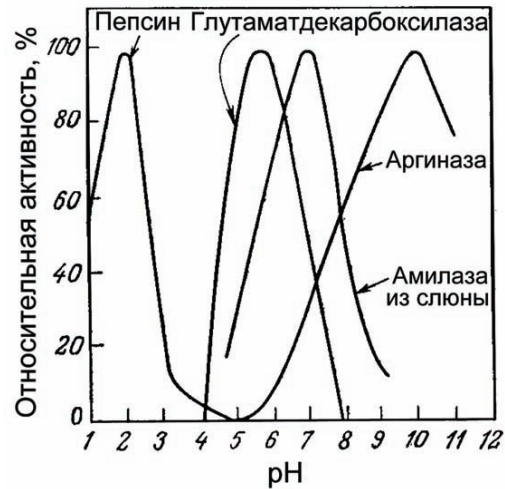
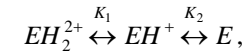


Рисунок 32 – Зависимость активности ферментов от pH

Простейший механизм влияния pH заключается в том, что фермент может существовать **в трех ионных формах**  $EH_2^{2+}$ ,  $EH^+$  и  $E$ , из которых только в одной форме фермент способен к связыванию субстрата и к каталитическому превращению.

Примем для определенности, что каталитически активной является форма  $EH^+$ . Модели зависимости ферментативной активности от pH рассмотрим на примере схемы



для которой константы диссоциации

$$K_1 = \frac{[EH^+][H^+]}{[EH_2^{2+}]},$$

$$K_2 = \frac{[E][H^+]}{[EH^+]}$$

и уравнение материального баланса

$$[E]_0 = [E] + [EH^+] + [EH_2^{2+}]$$

представляют собой систему трех уравнений с тремя неизвестными.

Выразим из уравнения материального баланса

$$[E] = [E]_0 - [EH^+] - [EH_2^{2+}]$$

и подставим в выражение для  $K_2$ :

$$K_2 = \frac{([E]_0 - [EH^+] - [EH_2^{2+}])[H^+]}{[EH^+]},$$

или

$$K_2[EH^+] + [EH^+][H^+] = [E]_0[H^+] - [EH_2^{2+}][H^+],$$

откуда

$$[EH^+] = \frac{[E]_0[H^+] - [EH_2^{2+}][H^+]}{K_2 + [H^+]}$$

Подставим  $[EH^+]$  в выражение для  $K_1$

$$K_1 = \frac{[H^+]}{[EH_2^{2+}]} \frac{[E]_0[H^+] - [EH_2^{2+}][H^+]}{K_2 + [H^+]},$$

откуда

$$K_1 K_2 [EH_2^{2+}] + K_1 [EH_2^{2+}] [H^+] = [H^+]^2 [E]_0 - [EH_2^{2+}] [H^+]^2,$$

и получим **зависимость** концентрации дважды протонированной формы фермента ( $[EH_2^{2+}]$ ) от кислотности системы:

$$[EH_2^{2+}] = \frac{[E]_0 [H^+]^2}{K_1 K_2 + K_1 [H^+] + [H^+]^2},$$

Далее, для  $[EH^+]$ :

$$\begin{aligned} [EH^+] &= \frac{[E]_0 [H^+] - \left( \frac{[H^+]^2 [E]_0}{K_1 K_2 + K_1 [H^+] + [H^+]^2} \right) \cdot [H^+]}{K_2 + [H^+]} = \\ &= \frac{[E]_0 [H^+] K_1 K_2 + K_1 [E]_0 [H^+]^2 + [E]_0 [H^+]^3 - [E]_0 [H^+]^3}{(K_2 + [H^+]) (K_1 K_2 + K_1 [H^+] + [H^+]^2)} = \\ &= \frac{[E]_0 [H^+] K_1 K_2 + K_1 [E]_0 [H^+]^2}{(K_2 + [H^+]) (K_1 K_2 + K_1 [H^+] + [H^+]^2)} = \\ &= \frac{(K_2 + [H^+]) [E]_0 [H^+] K_1}{(K_2 + [H^+]) (K_1 K_2 + K_1 [H^+] + [H^+]^2)}. \end{aligned}$$

Таким образом, **зависимость** концентрации однократно протонированной формы фермента ( $[EH^+]$ ) от концентрации протонов в системе:

$$[EH^+] = \frac{K_1 [E]_0 [H^+]}{K_1 K_2 + K_1 [H^+] + [H^+]^2}.$$

И, наконец,

$$\begin{aligned} [E] &= [E]_0 - [EH^+] - [EH_2^{2+}] \\ &= [E]_0 - \frac{K_1 [E]_0 [H^+]}{K_1 K_2 + K_1 [H^+] + [H^+]^2} - \frac{[E]_0 [H^+]^2}{K_1 K_2 + K_1 [H^+] + [H^+]^2} = \\ &= [E]_0 \frac{K_1 K_2 + K_1 [H^+] + [H^+]^2 - K_1 [H^+] - [H^+]^2}{K_1 K_2 + K_1 [H^+] + [H^+]^2}. \end{aligned}$$

Следовательно, для непротонированного фермента:

$$[E] = [E]_0 \frac{K_1 K_2}{K_1 K_2 + K_1 [H^+] + [H^+]^2}.$$

Относительная доля каждой из форм фермента

$$\begin{aligned} \frac{[EH_2^{2+}]}{[E]_0} &= \frac{[H^+]^2}{K_1 K_2 + K_1 [H^+] + [H^+]^2}, \\ \frac{[EH^+]}{[E]_0} &= \frac{K_1 [H^+]}{K_1 K_2 + K_1 [H^+] + [H^+]^2}, \\ \frac{[E]}{[E]_0} &= \frac{K_1 K_2}{K_1 K_2 + K_1 [H^+] + [H^+]^2}. \end{aligned}$$

Таким образом, если считать, что с субстратом может связываться и катализировать его превращение способна **только форма**  $EH^+$  фермента, и поскольку максимальная скорость реакции  $w_{\max}$  пропорциональна этой концентрации, то колоколообразная форма зависимости активности фермента от pH объясняется уравнением

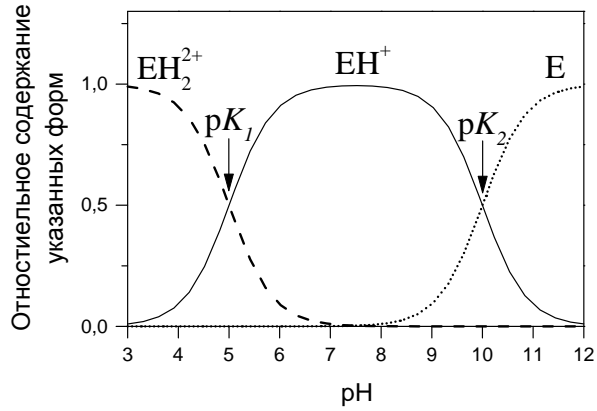
$$w_{\max} = \frac{w_{\max}^0 K_1 [H^+]}{K_1 K_2 + K_1 [H^+] + [H^+]^2},$$

где  $w_{\max}^0$  – максимальная скорость ферментативной реакции, которая бы наблюдалась, если бы весь фермент находился в активной форме  $EH^+$ , а оставшийся множитель  $\frac{K_1 [H^+]}{K_1 K_2 + K_1 [H^+] + [H^+]^2}$  характеризует долю общего количества фермента, находящуюся в форме  $EH^+$ .

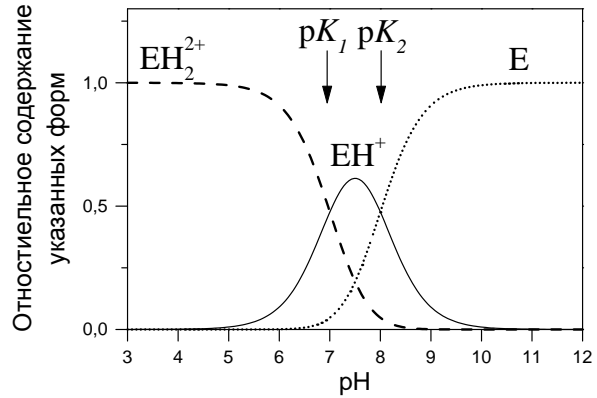
Относительное содержание  $EH_2^{2+}$ ,  $EH^+$  и  $E$  форм фермента при  $K_1 = 10^{-5}$  и  $K_2 = 10^{-10}$ , рассчитанное по формулам

$$\begin{aligned} \frac{[EH_2^{2+}]}{[E]_0} &= \frac{[H^+]^2}{K_1 K_2 + K_1 [H^+] + [H^+]^2}, \\ \frac{[EH^+]}{[E]_0} &= \frac{K_1 [H^+]}{K_1 K_2 + K_1 [H^+] + [H^+]^2}, \\ \frac{[E]}{[E]_0} &= \frac{K_1 K_2}{K_1 K_2 + K_1 [H^+] + [H^+]^2}, \end{aligned}$$

представлено на рисунке 33(а).



a



б

Рисунок 33 – Зависимость относительного содержания различных форм фермента от pH для двух случаев: а –  $K_1 = 10^{-5}$ ,  $K_2 = 10^{-10}$ ; б –  $K_1 = 10^{-7}$ ,  $K_2 = 10^{-8}$

Относительное содержание  $EH_2^{2+}$ ,  $EH^+$  и  $E$  форм фермента при  $K_1 = 10^{-7}$  и  $K_2 = 10^{-8}$  представлено на рисунке 33(б).

**Максимум** колоколообразной кривой найдем, приравняв нулю производную

$$\frac{d}{d[H^+]} \left( \frac{K_1[H^+]}{K_1K_2 + K_1[H^+] + [H^+]^2} \right) = 0.$$

Поскольку  $\left( \frac{a(x)}{b(x)} \right)' = \frac{a'(x) \cdot b(x) - b'(x) \cdot a(x)}{(b(x))^2}$ , то достаточно решить

уравнение

$$K_1(K_1K_2 + K_1[H^+] + [H^+]^2) - K_1[H^+](K_1 + 2[H^+]) = 0$$

или

$$K_1K_2 - [H^+]^2 = 0.$$

Таким образом, **положение максимума кривой**

$$[H^+]_{[EH^+]_{\max}} = \sqrt{K_1K_2} = [H^+]_{\text{оптималь}}.$$

Поскольку

$$pH_{\text{оптималь}} = -\lg[H^+]_{\text{оптималь}} = -\frac{1}{2}(\lg K_1 + \lg K_2) = \frac{1}{2}(pK_1 + pK_2),$$

то **максимум** колоколообразной кривой расположен при pH **на середине отрезка** между  $pK_1$  и  $pK_2$  (рисунок 33).

**Максимальное значение**

$$\left( \frac{[EH^+]}{[E]_0} \right)_{\max} = \frac{K_1[H^+]_{\text{оптималь}}}{K_1K_2 + K_1[H^+]_{\text{оптималь}} + [H^+]_{\text{оптималь}}^2}.$$

Область pH, при которых активность фермента составляет **более половины** максимального значения, определим из условия

$$\frac{1}{2} \frac{K_1[H^+]_{\text{оптималь}}}{K_1K_2 + K_1[H^+]_{\text{оптималь}} + [H^+]_{\text{оптималь}}^2} = \frac{K_1[H^+]}{K_1K_2 + K_1[H^+] + [H^+]^2},$$

или

$$[H^+]_{\text{оптималь}}(K_1K_2 + K_1[H^+] + [H^+]^2) = 2[H^+](K_1K_2 + K_1[H^+]_{\text{оптималь}} + [H^+]_{\text{оптималь}}^2),$$

откуда

$$K_1K_2[H^+]_{\text{оптималь}} + K_1[H^+][H^+]_{\text{оптималь}} + [H^+]^2[H^+]_{\text{оптималь}} = 2[H^+](K_1K_2 + 2[H^+]_{\text{оптималь}}K_1 + 2[H^+]_{\text{оптималь}}^2),$$

далее

$$K_1K_2[H^+]_{\text{оптималь}} - K_1[H^+][H^+]_{\text{оптималь}} + [H^+]^2[H^+]_{\text{оптималь}} - 2[H^+](K_1K_2 + 2[H^+]_{\text{оптималь}}K_1 + 2[H^+]_{\text{оптималь}}^2) = 0.$$

Учитывая  $K_1 K_2 = ([H^+]_{\text{оптим}})^2$ , получаем

$$[H^+]_{\text{оптим}}^3 - K_1 [H^+] [H^+]_{\text{оптим}} + [H^+]^2 [H^+]_{\text{оптим}} - 4 [H^+] [H^+]_{\text{оптим}}^2 = 0$$

и, сокращая  $[H^+]_{\text{оптим}}$ ,

$$[H^+]_{\text{оптим}}^2 - K_1 [H^+] + [H^+]^2 - 4 [H^+] [H^+]_{\text{оптим}} = 0,$$

получим

$$[H^+]^2 - (K_1 + 4 [H^+]_{\text{оптим}}) \cdot [H^+] + [H^+]_{\text{оптим}}^2 = 0.$$

Корни этого уравнения дают значения  $[H^+]$ , *между которыми* активность фермента превышает половину своего максимального значения.

#### ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Какой типичный вид зависимости активности ферментов от pH?
2. Сформулируйте простейший механизм, объясняющий колоколообразную форму зависимости ферментативной активности от pH.
3. Запишите выражения для относительного содержания трех ионных форм фермента при различных значениях pH.
4. Определите положение максимума кривой зависимости ферментативной активности от pH.

### 28. АЛЛОСТЕРИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ СКОРОСТЕЙ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Субъединичная четвертичная структура аллостерических ферментов способствует повышению чувствительности системы и усилению обратной связи в механизмах регулирования. Такая структура способствует увеличению чувствительности системы, так что малое изменение концентрации субстрата сильно влияет на скорость ферментативной реакции.

При этом характерный *гиперболический* ход зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата сменяется *сигмоидной* зависимостью. Так, например, на рисунке 34 схематически представлено изменение вида зависимости  $w$  от  $[S]$  в ферментативной реакции, происходящей под действием одиночной каталитической единицы

фермента *аспартаттранскарбамилазы* на субстрат аспаргат [2] (кривая 1), и под действием ассоциированного фермента, состоящего из двух каталитических и трех регуляторных полипептидных субъединиц (кривая 2).

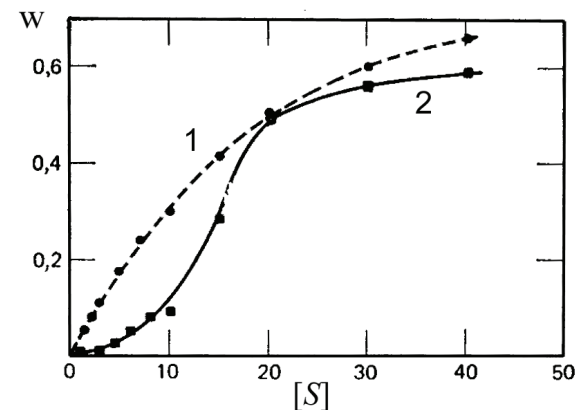


Рисунок 34 – Зависимость скорости появления продукта от концентрации субстрата (аспартата)

Предложено много механизмов, объясняющих кинетические особенности аллостерических ферментов.

### 29. СОГЛАСОВАННЫЙ МЕХАНИЗМ АЛЛОСТЕРИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

В 1965 г. Жак Моно, Джефри Уайман и Жан-Пьер Шанже предложили объяснение кооперативности аллостерических эффектов в реакции связывания кислорода с гемоглобином.

Используя их подход, рассмотрим аллостерический фермент, состоящий из двух идентичных субъединиц, каждая с одним активным центром. Субъединицы могут находиться в *двух конформациях* – *R*-состоянии (*relaxed*, "расслабленное") и *T*-состоянии (*tense*, "напряженное").

Конформация *R* обладает высоким сродством к субстрату, *T* – низким (рисунок 35). Формы *R* и *T* могут переходить одна в другую.



В данной модели делается важное допущение, что для сохранения симметрии димера обе субъединицы должны находиться в одном и том же конформационном состоянии. То есть, разрешены состояния  $RR$  и  $TT$ , а состояние  $RT$  запрещено.

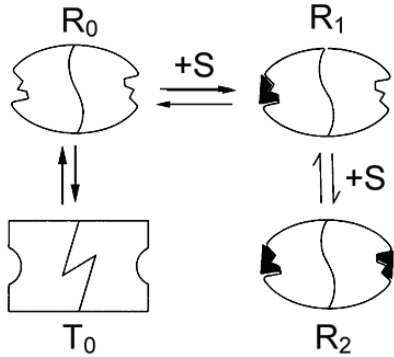


Рисунок 35 – Модель согласованного механизма аллостерических взаимодействий

Обозначим  $[R_0]$  и  $[T_0]$  – концентрации соответствующих форм, с которыми не связаны молекулы субстрата, и  $L$  – **константа аллостерического равновесия** реакции  $R \leftrightarrow T$  в отсутствии субстрата.

Тогда

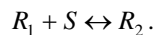
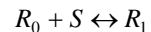
$$L = \frac{[T_0]}{[R_0]}$$

или

$$[T_0] = L[R_0].$$

Сделаем еще одно допущение: пусть субстрат может присоединяться только к  $R$ -форме фермента.  $R$ -форму, связанную с одной молекулой субстрата обозначим  $R_1$ , а связанную с двумя молекулами субстрата –  $R_2$ .

Присоединение каждой молекулы субстрата характеризуется **одной и той же** микроскопической константой диссоциации  $K_R$  в реакциях



80

Поскольку субстрат может связываться с любым **из двух** активных центров на  $R_0$  и, с другой стороны, отщепляться от любого **из двух** активных центров на  $R_2$ , то константа диссоциации будет иметь вид

$$K_R = \frac{2[R_0][S]}{[R_1]},$$

$$K_R = \frac{[R_1][S]}{2[R_2]}.$$

Определим **степень насыщения фермента**  $Y$ , то есть число активных центров с присоединенными молекулами субстрата, отнесенное к общему числу субстрат-связывающих центров:

$$Y = \frac{[R_1] + 2[R_2]}{2([T_0] + [R_0] + [R_1] + [R_2])}$$

Подставим в это выражение

$$[T_0] = L[R_0], \quad [R_1] = \frac{2[R_0][S]}{K_R},$$

$$[R_2] = \frac{[R_1][S]}{2K_R} = \frac{2[R_0][S]}{K_R} \cdot \frac{[S]}{2K_R} = [R_0] \left( \frac{[S]}{K_R} \right)^2.$$

Получим

$$Y = \frac{\frac{[R_0][S]}{K_R} + [R_0] \cdot \left( \frac{[S]}{K_R} \right)^2}{L[R_0] + [R_0] + \frac{2[R_0][S]}{K_R} + [R_0] \cdot \left( \frac{[S]}{K_R} \right)^2} = \frac{[S]}{K_R} \cdot \frac{1 + \frac{[S]}{K_R}}{L + \left( 1 + \frac{[S]}{K_R} \right)^2}$$

В общем случае, если  $n$  – число субъединиц в молекуле фермента, то доля  $Y$  активных центров занятых субстратом описывается уравнением (без вывода)

$$Y = \frac{L \cdot \alpha \cdot c \cdot (1 + c \cdot \alpha)^{n-1} + \alpha \cdot (1 + \alpha)^{n-1}}{L \cdot (1 + c \cdot \alpha)^n + (1 + \alpha)^n},$$

где  $\alpha = \frac{[S]}{K_R}$ ,  $c = \frac{K_R}{K_T}$  и (в общем случае)  $K_T = \frac{[T][S]}{[TS]}$  – константа диссоциации  $T$ -формы.

81

Зависимость  $Y$  от  $[S]$  выражается *сигмоидной*, а не гиперболической кривой (рисунок 36).

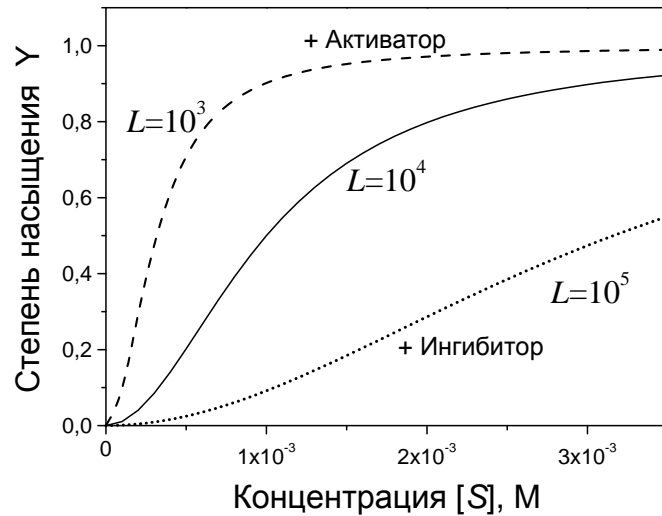


Рисунок 36 – Зависимость степени насыщения активных центров фермента от концентрации субстрата в модели согласованного механизма аллостерических взаимодействий при  $K_R = 10^{-5}$  М

Если число оборотов в расчете на один активный центр одинаково для фермент-субстратных комплексов с  $R_1$  и  $R_2$ , то график зависимости скорости реакции от концентрации субстрата *также* будет сигмоидным, поскольку

$$w = Y \cdot w_{\max}$$

Рассмотрим процесс связывания. В отсутствие субстрата почти все молекулы фермента находятся в  $T$ -форме. В примере, показанном на рисунке 36, на  $10^5$  молекул в  $T$ -форме приходится только одна молекула в  $R$ -форме ( $K_R = 10^{-5}$  М).

Добавление субстрата *сдвигает конформационное равновесие* в сторону образования  $R$ -формы, поскольку именно  $R$ -форма связывает субстрат. Когда субстрат присоединяется к одному активному центру,

второй активный центр должен быть также в  $R$ -форме, согласно основному постулату данной модели.

Другими словами, переход от  $T$  к  $R$  и обратно все субъединицы фермента осуществляют *согласованно*. Следовательно, по мере добавления субстрата доля молекул фермента в  $R$ -форме прогрессивно возрастает, и связывание субстрата происходит *кооперативно*.

Предложенная модель согласованного механизма объясняет влияние аллостерических ингибиторов и активаторов. Аллостерический ингибитор связывается преимущественно с  $T$ -формой, тогда как аллостерический активатор связывается преимущественно с  $R$ -формой. Аллостерический ингибитор сдвигает конформационное равновесие  $R \leftrightarrow T$  в сторону  $T$ , а аллостерический активатор – в сторону  $R$ . Эти эффекты можно выразить *количественно* через изменение *константы аллостерического равновесия*  $L$ . Аллостерический ингибитор повышает величину  $L$ , тогда как аллостерический активатор понижает ее. Эти эффекты показаны на рисунке 36. Степень насыщения  $Y$  при всех значениях  $[S]$  снижается в присутствии ингибитора и повышается в присутствии активатора.

Рассмотренное ранее неконкурентное ингибирование можно рассматривать как аллостерическое торможение.

Среди аллостерических взаимодействий различают *гомotropные* (взаимодействия между идентичными лигандами) и *гетеротропные* (взаимодействия между различными лигандами).

В рассмотренной модели кооперативное связывание субстрата ферментом представляет собой гомотропный эффект, а влияние активатора или ингибитора – гетеротропный. При согласованном механизме аллостерических взаимодействий *гомotropные* эффекты всегда положительны (кооперативны), а *гетерогенные* могут быть и положительными и отрицательными.

#### ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Как изменяется ход зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата в случае аллостерической регуляции ферментативной активности?

2. В чем специфика согласованного механизма аллостерических взаимодействий?
3. Как величина константы аллостерического равновесия влияет на ход зависимости степени насыщения активных центров фермента от концентрации субстрата в модели согласованного механизма аллостерических взаимодействий?
4. В чем отличие гомотропных и гетеротропных аллостерических взаимодействий?

### 30. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНЫЙ МЕХАНИЗМ АЛЛОСТЕРИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

Даниэль Кошланд разработал другую модель – последовательный механизм аллостерических взаимодействий (рисунок 37).

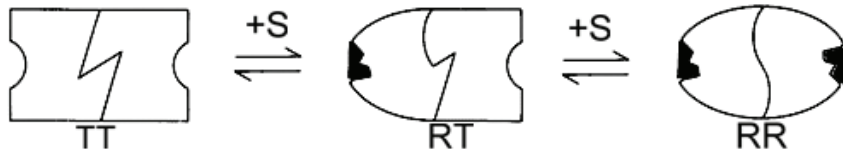


Рисунок 37 – Модель последовательного механизма кооперативного связывания субстрата аллостерическим ферментом

В основу модели Кошланда основу положены *три* постулата.

1. *Каждая* субъединица может существовать *в одном из двух* возможных конформационных состояний (*R* или *T*).
2. Связывание субстрата изменяет форму той субъединицы, к которой он присоединяется. Конформация *другой* субъединицы при этом существенно *не меняется*.
3. Конформационные изменения, вызванные связыванием субстрата на одной субъединице, *могут увеличивать или уменьшать* сродство к субстрату *другой* субъединицы той же молекулы фермента.

Связывание является кооперативным, если у *RT*-формы сродство к субстрату выше, чем у *TT*-формы.

Модель простого последовательного механизма взаимодействия *отличается* от модели согласованного механизма в нескольких отношениях.

*Во-первых*, в отсутствие субстрата весь фермент находится в *T*-форме. Переход от *T*-формы к *R*-форме индуцируется присоединением субстрата.

*Во-вторых*, конформационный переход от *T* к *R* в разных субъединицах фермента происходит не согласованно, а последовательно. В модели согласованного механизма, напротив, наличие гибридной формы *RT* исключается. Модель согласованного механизма исходит из важной *роли симметрии* во взаимодействии субъединиц в олигомерных белках и потому предполагает ее сохранение при аллостерических переходах.

*В-третьих*, в случае согласованного механизма *гомотропные* взаимодействия всегда должны быть положительными, тогда как в случае последовательного механизма они могут быть *либо* положительными, *либо* отрицательными. Это зависит от структурных переходов, вызванных присоединением первой молекулы субстрата.

Обе модели используются для описания различных аллостерических белков. Однако существуют аллостерические белки, для описания которых требуются более сложные модели.

### ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. В чем специфика последовательного механизма аллостерических взаимодействий?
2. Чем отличается модель простого последовательного механизма взаимодействия от модели согласованного механизма?

### 31. АВТОИНГИБИРОВАНИЕ СУБСТРАТОМ

Другим средством регуляции скорости ферментативной реакции является торможение реакции при высокой концентрации субстрата, как это имеет место в случае разложения мочевины *уреазой* (рисунок 38).

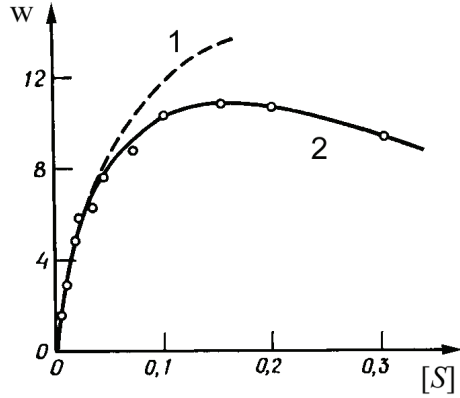
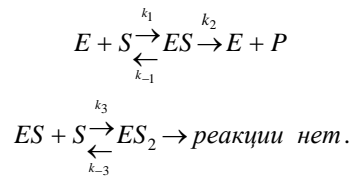


Рисунок 38 – Автоингибирование субстратом реакции разложения мочевины уреазой: 1 – ожидаемая гиперболическая кривая в отсутствие ингибирования; 2 – экспериментальные данные, свидетельствующие о усилении ингибирования при повышенных концентрациях субстрата

Механизм этого процесса заключается в том, что связывание данного фермента со второй молекулой субстрата эффективно препятствует осуществлению биокаталитической реакции:



Схематически такая модель автоингибирования реакции при высокой концентрации субстрата представлена на рисунке 39.

Очевидное подобие этого механизма рассмотренной выше схеме рН-регуляции  $EH_2^{2+} \xrightleftharpoons{K_1} EH^+ \xrightleftharpoons{K_2} E$  позволяет нам использовать полученное

выше выражение для скорости реакции  $ES_2 \leftrightarrow ES \leftrightarrow E$

$$w = \frac{w_{\max} K'_S [S]}{[S]^2 + K'_S [S] + K_S K'_S},$$

где вместо констант диссоциации для случая ионных форм фермента используем константы диссоциации моно- и бисубстратных фермент-

субстратных комплексов  $ES$  и  $ES_2$ : (вместо  $K_1 = \frac{[EH^+][H^+]}{[EH_2^{2+}]}$  используем  $K'_S = \frac{[ES][S]}{[ES_2]}$ , вместо  $K_2 = \frac{[E][H^+]}{[EH^+]}$  используем  $K_S = \frac{[E][S]}{[ES]}$ ).

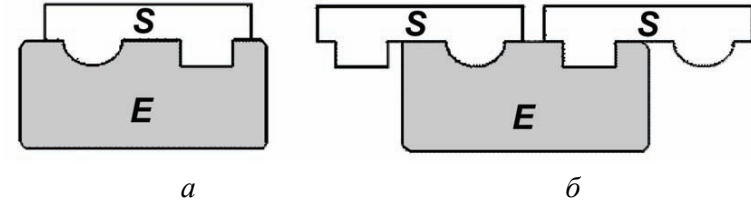


Рисунок 39 – Ингибирование избытком субстрата: а – нормальное связывание субстрата  $S$  с ферментом  $E$ , превращение возможно; б – аномальное связывание, ни один из субстратов не превращается в продукт.

При высоких концентрациях субстрата

$$w = \frac{w_{\max} K'_S [S]}{[S]^2 + K'_S [S] + K_S K'_S} = \frac{w_{\max}}{\frac{[S]^2}{K'_S [S]} + \frac{K'_S [S]}{K'_S [S]} + \frac{K_S K'_S}{K'_S [S]}} = \frac{w_{\max}}{1 + \frac{K_S}{[S]} + \frac{[S]}{K'_S}} \approx \frac{w_{\max} K'_S}{K'_S + [S]}$$

Величину  $K'_S$  определяем из графика в координатах  $\frac{1}{w}$ ,  $[S]$  (рисунок 40).

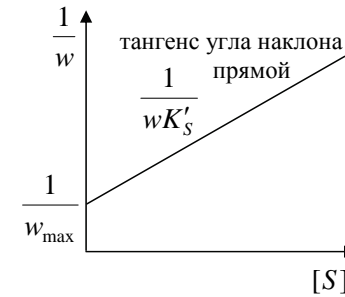


Рисунок 40 – Зависимости  $1/w$  от  $[S]$  для ферментативной реакции, ингибируемой высокой концентрацией субстрата

Величины  $K_S$  и  $w_{\max}$  определяют из обычной зависимости Лайнуивера-Берка в координатах  $\frac{1}{w}, \frac{1}{[S]}$  *при очень малых* концентрациях субстрата  $[S]$ .

График зависимости  $w = \frac{w_{\max} K'_S [S]}{[S]^2 + K'_S [S] + K_S K'_S}$ , так же как и в случае рН-регулирования, имеет колоколообразный вид. Максимум колоколообразной кривой находим, приравняв нулю производную

$$w_{\max} K'_S \frac{d}{d[S]} \left( \frac{[S]}{[S]^2 + K'_S [S] + K_S K'_S} \right) = 0$$

Поскольку  $\left( \frac{a(x)}{b(x)} \right)' = \frac{a'(x) \cdot b(x) - b'(x) \cdot a(x)}{(b(x))^2}$ , то достаточно решить уравнение

$$[S]^2 + K'_S [S] + K_S K'_S - [S](K'_S + 2[S]) = 0$$

или

$$K_S K'_S - [S]^2 = 0.$$

Откуда *положение максимума кривой*

$$[S]_{w_{\max}} = \sqrt{K_S K'_S}.$$

Таким образом, в рассматриваемом механизме автоингибирования (самоторможения) субстратом скорость реакции увеличивается при увеличении концентрации субстрата, но в присутствии избытка субстрата скорость падает, обеспечивая простое средство прямой регуляции скорости образования продукта.

#### ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. В чем заключается механизм автоингибирования субстратом?
2. Как определяют константу диссоциации  $K'_S$ ?
3. Как положение максимума кривой зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата выражается через величины констант диссоциации  $K'_S$  и  $K_S$ ?

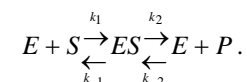
## 32. НЕСТАЦИОНАРНАЯ КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Кинетические исследования ферментативных реакций, протекающих в стационарных условиях, обычно позволяют определить только два параметра: (1) константу Михаэлиса и (2) максимальную скорость реакции.

Для того чтобы зарегистрировать промежуточные "короткоживущие" соединения и измерить константы скорости отдельных стадий необходимо измерить скорость приближения системы к стационарному состоянию. Индивидуальные константы скорости могут быть измерены за промежуток времени, в течение которого устанавливается это состояние.

Характерные времена установления равновесия  $1-10^{-7}$  с. Для работы в таком предстационарном интервале времен требуется (1) *аппаратура для быстрого смешивания* и последующего наблюдения за ферментом и субстратом. Кроме того, (2) поскольку наблюдаемые события происходят на самом ферменте, этот *фермент* должен присутствовать *в количествах, сравнимых* с количеством субстрата.

В качестве примера рассмотрим схему ферментативной реакции с участием одного промежуточного соединения:



Кинетика данной реакции описывается системой уравнений:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES] + k_{-2}[E][P],$$

$$w = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] - k_{-2}[E][P],$$

$$[E]_0 = [E] + [ES],$$

$$[S]_0 = [S] + [ES] + [P].$$

Решение этой нелинейной системы уравнений можно существенно упростить, если использовать некоторые условия экспериментального характера, позволяющие привести дифференциальные уравнения к линейному виду.

При большом избытке субстрата ( $[S]_0 \gg [E]_0$ )  $[S] \approx [S]_0$  и небольшой глубине реакции ( $[P] \approx 0$ ) систему можно записать в виде

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S]_0 - (k_{-1} + k_2)[ES],$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[ES],$$

$$[E]_0 = [E] + [ES].$$

Исключением переменной  $[E]$  первое дифференциальное уравнение может быть преобразовано к виду

$$\frac{d[ES]}{dt} + (k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2)[ES] = k_1[E]_0[S]_0.$$

Решение этого неоднородного уравнения имеет вид

$$[ES] = C \exp[-(k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2)t].$$

Чтобы найти предэкспоненциальный множитель  $C$ , продифференцируем выражение  $[ES] = C \exp[-(k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2)t]$  и подставим полученное значение в уравнение

$$\frac{d[ES]}{dt} + (k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2)[ES] = k_1[E]_0[S]_0.$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = -(k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2) \cdot C \exp[-(k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2)t],$$

$$-(k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2) \cdot C \exp[-(k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2)t] + (k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2)[ES] = k_1[E]_0[S]_0,$$

$$[ES] = \frac{k_1[E]_0[S]_0}{k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2} + C \exp[-(k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2)t]$$

С учетом начальных условий  $[ES]_0 = 0$  получим:

$$C = -\frac{k_1[E]_0[S]_0}{k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2},$$

откуда

$$[ES] = \frac{k_1[E]_0[S]_0}{k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2} - \frac{k_1[E]_0[S]_0}{k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2} \exp[-(k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2)t].$$

После несложных преобразований получим

$$[ES] = \frac{[E]_0[S]_0}{[S]_0 + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}} \left( 1 - \exp\left\{ -k_1 \left( [S]_0 + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \right) \cdot t \right\} \right) =$$

$$= \frac{[E]_0[S]_0}{K_M + [S]_0} (1 - \exp\{-k_1([S]_0 + K_M) \cdot t\})$$

Как видно из последнего уравнения (рисунок 41(а)), концентрация фермент-субстратного комплекса  $[ES]$  возрастает во времени и стремится к пределу:

$$[ES]_{\text{max}} = \frac{[E]_0[S]_0}{K_M + [S]_0}.$$

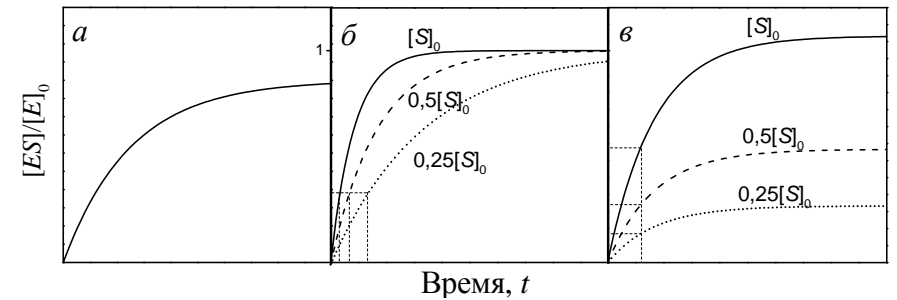


Рисунок 41 – Зависимость концентрации промежуточного соединения от времени в стационарном режиме

При  $[S]_0 \gg K_M$  (рисунок 41(б)) зависимость концентрации фермент-субстратного комплекса  $[ES] = \frac{[E]_0[S]_0}{K_M + [S]_0} (1 - \exp\{-k_1([S]_0 + K_M) \cdot t\})$  от времени имеет вид

$$[ES] = [E]_0 (1 - \exp\{-k_1[S]_0 \cdot t\}).$$

При  $[S]_0 \ll K_M$  (рисунок 41(в)) зависимость концентрации фермент-

субстратного комплекса  $[ES] = \frac{[E]_0[S]_0}{K_M + [S]_0} (1 - \exp\{-k_1([S]_0 + K_M) \cdot t\})$  от времени имеет вид

$$[ES] = \frac{[E]_0[S]_0}{K_M} (1 - \exp\{-k_1 K_M \cdot t\}).$$

### ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Получите выражение для временной зависимости концентрации фермент-субстратного комплекса в предстационарном режиме.
2. Запишите выражение для  $[ES]_{\text{стац}}$  – предела, к которому стремится концентрация фермент-субстратного комплекса в предстационарном режиме.
3. Запишите зависимость концентрации промежуточного соединения от времени в предстационарном режиме для случая  $[S]_0 \gg K_M$ .
4. Запишите зависимость концентрации промежуточного соединения от времени в предстационарном режиме для случая  $[S]_0 \ll K_M$ .

### 33. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНСТАНТ СКОРОСТЕЙ ИЗ НЕСТАЦИОНАРНОЙ КИНЕТИКИ

Из кинетики накопления фермент-субстратного комплекса  $[ES]$  может быть найдена константа скорости  $k_1$  и сумма констант скоростей  $(k_{-1} + k_2)$ . Для этого введем функцию  $\tau$

$$\frac{1}{\tau} = k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2$$

Тогда из уравнения  $[ES] = \frac{[E]_0[S]_0}{K_M + [S]_0} (1 - \exp\{-k_1([S]_0 + K_M) \cdot t\})$  получим

$$[ES] = [ES]_{\text{стац}} \left( 1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \right),$$

$$\ln([ES]_{\text{стац}} - [ES]) = \ln[ES]_{\text{стац}} - \frac{t}{\tau},$$

$$\ln\left(1 - \frac{[ES]}{[ES]_{\text{стац}}}\right) = -\frac{t}{\tau}.$$

Это уравнение **прямой** в координатах  $\ln\left(1 - \frac{[ES]}{[ES]_{\text{стац}}}\right)$  и  $t$ . По

тангенсу угла наклона прямой определяем  $\frac{1}{\tau}$ .

Поскольку мы определили  $\frac{1}{\tau} = k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2$ , то если провести эксперименты при различных начальных концентрациях субстрата, можно построить график зависимости  $\frac{1}{\tau}([S]_0)$  и найти  $k_1$  – тангенс угла наклона прямой

$$\frac{1}{\tau} = k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2$$

и  $(k_{-1} + k_2)$  – отрезок, отсекаемый прямой на оси ординат (рисунок 42).

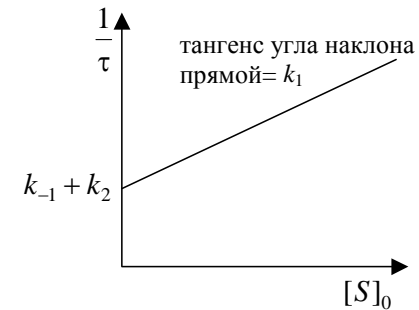


Рисунок 42 – Определение элементарных констант из данных по предстационарной кинетике реакции.

Константу  $k_2$  находят из стационарной скорости реакции, тогда  $k_{-1}$  можно определить из суммы  $(k_{-1} + k_2)$ .

## ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Как определяют константу  $k_1$  по предстационарной кинетике ферментативной реакции?
2. Как определяют сумму констант ( $k_{-1} + k_2$ ) по предстационарной кинетике ферментативной реакции?
3. Как определяют константу  $k_2$  по кинетике ферментативной реакции?
4. Как определяют константу  $k_{-1}$  по кинетике ферментативной реакции?

### 34. ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА СКОРОСТЬ РЕАКЦИЙ

При изучении любых проблем химической кинетики одним из основных теоретических положений является *уравнение Аррениуса*, выражающее зависимость константы скорости реакции от температуры

$$k = A \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right),$$

где  $E_a$  – энергия активации реакции,  $R$  – универсальная газовая постоянная,  $A$  – предэкспоненциальный множитель,  $T$  – абсолютная температура.

График зависимости Аррениуса в координатах  $(\ln k)$  от  $\left(\frac{1}{T}\right)$

представляет собой *прямую* с тангенсом угла наклона равным  $\left(-\frac{E_a}{R}\right)$ .

Многие реакции, катализируемые ферментами, подчиняются аррениусовской зависимости константы скорости реакции от температуры. Например, на рисунке 43 представлены экспериментальные данные и линейная аппроксимация температурной зависимости скорости ферментативной реакции гидролиза АТФ *миозином*.

Отметим, что температурный диапазон, в котором были получены данные, представленные на рисунке 43, является очень узким и охватывает только диапазон физиологически приемлемых температур.

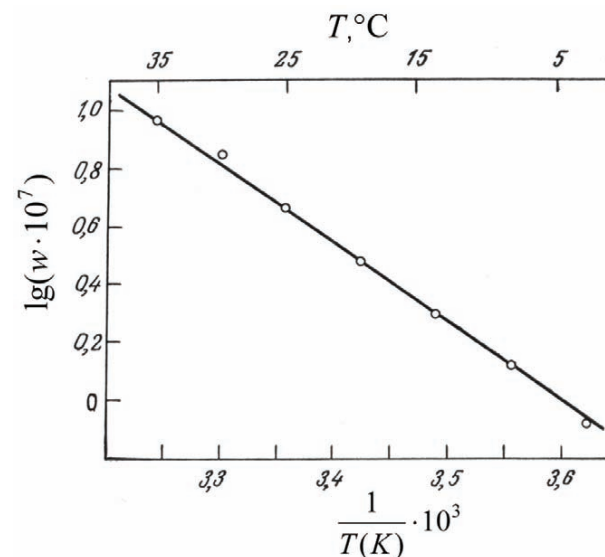


Рисунок 43 – Аррениусовская зависимость от температуры скорости ферментативной реакции гидролиза АТФ миозином

В этом эксперименте не рассматривались температуры, значительно превышающие обычные в биологических условиях пределы. Попытка поднять температуру значительно выше указанного диапазона приводит к *денатурации* белковых молекул.

Денатурация большинства белков начинается в диапазоне температур от 45–50°C и завершается очень быстро при 55°C (исключение составляют ферменты термофильных микроорганизмов, обитающих в горячих источниках, они сохраняют стабильность до 80–85°C).

Один из механизмов термической денатурации белков очевиден – по мере повышения температуры атомы в молекуле белка приобретают все более высокую энергию, в том числе кинетическую, и, в конце концов, становится возможным разрушение слабых связей, стабилизирующих глобулярную структуру белка, что и приводит к его инактивации.

Пример инактивации фермента *каталаза* при повышении температуры представлен на рисунке 44.



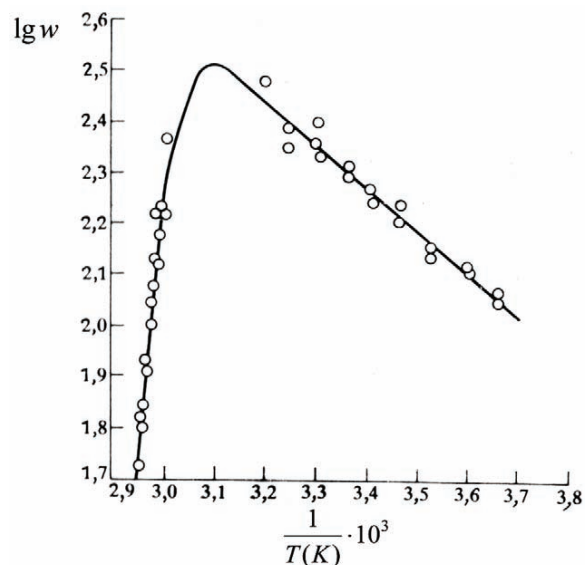
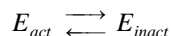


Рисунок 44 – Термическая инактивация фермента каталаза – температурная зависимость логарифма скорости разложения  $H_2O_2$

### 35. ТЕРМИЧЕСКАЯ ИНАКТИВАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ

Термическая инактивация ферментов может быть обратимой, необратимой или смешанной. Зависимость скорости реакции ферментативного катализа от температуры в достаточно широком диапазоне температур может быть описана с помощью простой модели **обратимой термической инактивации**. Согласно этой модели, мы принимаем, что неактивная (*inactive*)  $E_{inact}$  и активная (*active*)  $E_{act}$  формы фермента находятся в равновесии



Константу равновесия  $K_d$  этой реакции ( $d$  – денатурация (*denaturation*)) можно выразить следующим уравнением

$$\frac{[E]_{inact}}{[E]_{act}} = K_d = \exp\left(-\frac{\Delta G_d}{RT}\right) = \exp\left(-\frac{\Delta H_d}{RT}\right) \cdot \exp\left(\frac{\Delta S_d}{R}\right).$$

где  $\Delta G_d$ ,  $\Delta H_d$  и  $\Delta S_d$  – свободная энергия, энтальпия и энтропия инактивации соответственно.

Хотя изолированные водородные связи сравнительно слабы (их энергия обычно 3–7 ккал/моль), энтальпия инактивации ферментов  $\Delta H_d$  достаточно высока, составляя, например, для трипсина и лизоцима белка куриных яиц соответственно 68 и 73,5 ккал/моль. Инактивация этих ферментов сопровождается изменением энтропии, равным +213 ккал/(моль·К). Благодаря высокой энтальпии денатурации уже небольшие изменения температуры существенно изменяют относительное количество активной формы фермента. При таких высоких значениях  $\Delta H_d$  фермент инактивируется практически полностью в диапазоне тридцати градусов.

Поскольку весь фермент существует либо в активной, либо в неактивной форме

$$[E]_0 = [E]_{act} + [E]_{inact},$$

то из уравнения  $\frac{[E]_{inact}}{[E]_{act}} = K_d$  следует, что

$$[E]_{act} = \frac{[E]_0}{1 + K_d}.$$

Согласно теории переходного состояния, скорость реакций  $E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E + P$  при высоких концентрациях субстрата и с учетом

соотношения  $E_a = \Delta H^\ddagger + RT$  может быть выражена следующим образом

$$w_{max} = k(T)[E]_{act},$$

где

$$k(T) = \alpha \left(\frac{k_B T}{h}\right) \cdot \exp\left(\frac{\Delta S^\ddagger}{R}\right) \cdot \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right).$$

Здесь  $k_B$  – постоянная Больцмана,  $h$  – постоянная Планка,  $\alpha$  – не зависящий от температуры предэкспоненциальный множитель. Подробнее теория переходного состояния (теория абсолютных скоростей реакций Эйринга и Поляни изложена в §XI.2 учебника А.Г. Стромберг,

Д.П. Семченко, Физическая химия, М.: Высшая школа, 2001). Подставляя в уравнение  $w_{\max} = k(T)[E]_{act}$  выражения для  $k(T)$  и  $[E]_{act}$ , получим

$$w_{\max} = \frac{\beta \cdot T \cdot \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right)}{1 + \exp\left(-\frac{\Delta H_d}{RT}\right) \cdot \exp\left(\frac{\Delta S_d}{R}\right)}$$

Здесь коэффициент  $\beta$  включает  $\alpha$ ,  $k_B$ ,  $h_0$ ,  $[E]_0$  и  $\exp\left(\frac{\Delta S^\ddagger}{R}\right)$ .

Это уравнение и представляет собой схематично изображенное на рисунке 44 поведение системы фермент-субстрат. Сплошная кривая на этом рисунке, проходящая через экспериментальные точки, была вычислена при следующих значениях параметров:  $\Delta H_d = 55,5$  ккал/моль,  $E_a = 3,5$  ккал/моль,  $\Delta S_d = 168$  ккал/(моль·К),  $\beta = 258$  мм<sup>3</sup>/мин после их определения на основе тех же экспериментальных данных. При больших значениях  $\frac{1}{T}$  тангенс угла наклона кривой приближенно равен  $\left(-\frac{E_a}{R}\right)$ . Тангенс угла наклона другого прямого участка кривой при более высоких температурах приблизительно равен  $\left(\frac{\Delta H_d - E_a}{R}\right)$ .

Величину  $\Delta S_d$  можно определить, используя тот факт, что при температуре  $T_{\max}$ , когда  $\ln w_{\max}$  принимает наивысшее значение и  $\frac{d}{dT} \ln w_{\max} = 0$ , откуда константа равновесия

$$K_d(T_{\max}) = \frac{E_a + RT_{\max}}{\Delta H_d - E_a - RT_{\max}}$$

легко рассчитывается, поскольку  $T_{\max}$  известна из измерений, а величины  $E_a$  и  $\Delta H_d$  мы уже определили. Зная величину  $K_d(T_{\max})$ , мы из соотношения  $K_d = \exp\left(-\frac{\Delta H_d}{RT}\right) \cdot \exp\left(\frac{\Delta S_d}{R}\right)$  найдем  $\Delta S_d$ . Наконец подберем такое значение коэффициента  $\beta$ , чтобы  $w_{\max}(T_{\max})$  стало равным

измеренной величине. При необходимости более точные значения параметров можно получить методом последовательного приближения. В частности, очень большое влияние на результаты может оказывать значение  $T_{\max}$ . Конечно, от температуры зависят и **другие параметры** уравнений скорости реакции, например, константа Михаэлиса,  $K_M$ , или константы диссоциации  $K_S$  и  $K_I$ . Если эти параметры считать константами равновесия  $K$ , как это часто бывает в действительности, то мы должны прийти к температурной зависимости аналогичной зависимости  $w_{\max}(T)$ .

Тогда график зависимости  $\ln K$  (или  $\ln K$ ) от  $\frac{1}{T}$  будет представлять собой прямую линию, по наклону которой можно определить стандартную свободную энергию.

В некоторых случаях графическая зависимость в этих координатах **нелинейная**. Причиной подобных осложнений могут быть неоправданные упрощения в интерпретации  $K_S$  или  $K_I$ , или даже в последовательности катализируемых ферментом реакций. Напомним, например, что для случая простейшей последовательности реакций  $E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E + P$

константа Михаэлиса  $K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$  представляет собой не что иное, как отношение констант скоростей элементарных реакций. Если каждую из этих констант элементарных стадий в свою очередь выразить в форме уравнения Аррениуса  $k = A \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right)$ , или в форме уравнения теории

переходного состояния  $k(T) = \alpha \cdot \left(\frac{k_B T}{h}\right) \cdot \exp\left(\frac{\Delta S^\ddagger}{R}\right) \cdot \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right)$ , то

получится **весьма сложная** форма зависимости от температуры.

Другим возможным источником затруднений в определении зависимости некоторых параметров скорости реакции от температуры может служить существование нескольких промежуточных фермент-субстратных комплексов (или комплексов фермента с продуктом реакции).

Подобные соображения были положены в основу полезного и довольно широко применяемого способа проверки корректности кинетических моделей и соответствующих гипотетических последовательностей реакций. Если зависимость кинетических параметров в аррениусовских координатах выражается не прямой, то исходная модель или чрезмерно упрощена, или вообще неверна.

### 36. КЛАССИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ КИНЕТИКИ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Наиболее употребительные в кинетике ферментативных реакций экспериментальные методы классифицируют по способу проведения изучаемой реакции и в зависимости от того, каким образом следят за концентрацией реагирующих веществ. С этих точек зрения различают методы *классические, проточные, методы остановки потока и релаксационные*.

В *классических* методах исследования кинетики за смесью реагирующих веществ и изменением их концентраций наблюдают либо периодически (например, путем отбора проб и их анализа), либо непрерывно (измерением величин, пропорциональных концентрациям). Время, необходимое для полного перемешивания реагирующих веществ перед началом реакции, должно быть достаточно малым по сравнению с *полупериодом протекания реакции* – временем необходимым для преобразования половины молекул субстрата в продукт. Отсюда следует, что классические методы пригодны для исследования только реакций с полупериодом *более нескольких секунд*. Реакции с более коротким полупериодом этими методами можно изучать лишь при малых концентрациях или при пониженных температурах.

Из методов непрерывного измерения физических величин, зависящих от концентрации реагирующих веществ, необходимо в первую очередь упомянуть *прямой спектрофотометрический метод*. В ферментативных реакциях изменения поглощения, позволяющие различать исходные вещества и продукты реакции, вполне измеримы. При этом успешно пользуются регистрирующими спектрофотометрами, записывающими кинетическую кривую в виде зависимости поглощения при данной длине

волны от времени. Можно воспользоваться и тем, что спектры кофермента после реакции и перед реакцией различаются, как, например, в случае NADH и NAD<sup>+</sup>.

Очень близок к спектрофотометрическому методу *метод измерения флуоресценции*. Многие коферменты сильно флуоресцируют и притом в ничтожных концентрациях. Поэтому метод измерения флуоресценции особенно пригоден при работе с малыми концентрациями фермента и субстрата. Именно так поступают при измерении констант  $K_M$  и  $K_I$  в случае высокого сродства фермента к субстрату и ингибитору.

Если при ферментативной реакции происходит выделение или потребление ионов водорода (протонов), для ее исследования используют *потенциостат*. За протеканием реакции следят, измеряя количество кислоты или основания, требуемое для поддержания постоянного значения pH реакционной смеси. Схема такого устройства изображена на рисунке 45.

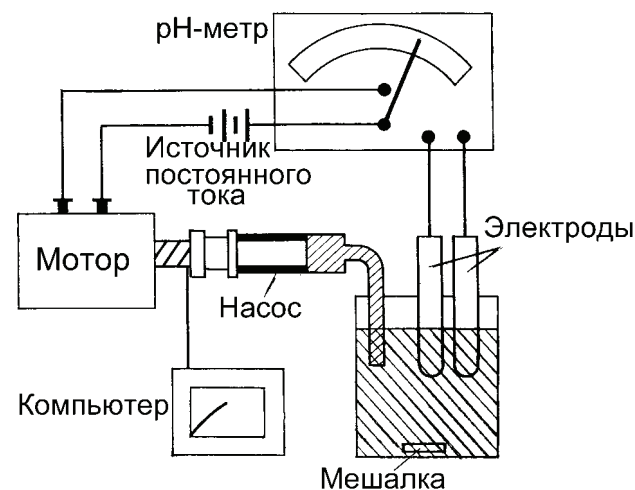


Рисунок 45 – Схема потенциостата для исследования кинетики ферментативных реакций

Если при ферментативной реакции исходные вещества или продукты быстро и обратимо реагируют с посторонними молекулами, обнаруживающими интенсивный спектр поглощения, можно воспользоваться

**индикаторным методом.** Для контроля кинетики реакции наблюдают изменения спектра посторонних молекул, обусловленные изменением концентрации субстрата или продукта. Необходимым условием индикаторного метода является значительное превышение скорости реакции индикатора с субстратом или продуктом над скоростью реакции Субстрат → Продукты (иначе, исследоваться будет не кинетика ферментативной реакции, а кинетика реакции индикатора с субстратом или продуктом). Необходимо также, чтобы индикатор не оказывал влияния на скорость ферментативной реакции (был нейтральным компонентом среды).

**Измерение оптического вращения** часто использовали в прошлом; метод сохраняет свое значение при исследовании кинетики ферментативных процессов и в настоящее время. Огромное большинство биологических соединений и продуктов, встречающихся в ферментативных реакциях, обладают оптической активностью. Большой чувствительности метода удается обычно добиться измерением в ультрафиолетовой части спектра.

При **периодическом контроле** кинетики реакций отбираемые пробы реакционной смеси можно анализировать некоторыми методами, позволяющими количественно определять реагирующие вещества или продукты. Однако после взятия пробы фермент необходимо быстро **инактивировать**, и притом так, чтобы не повлиять на концентрации субстрата и продукта.

### 37. МЕТОДЫ НЕПРЕРЫВНОГО ПОТОКА

Методы **непрерывного потока** (*continuous flow methods*) или методы **непрерывной струи**, позволяют расширить область классических методов изучения кинетики до области с полупериодом реакции в **несколько микросекунд**. Принцип метода изображен на рисунке 46. Растворы обоих реагирующих веществ вводят с постоянной скоростью в специальную смесительную камеру, в которой полное смешивание реагирующих веществ происходит в течение 1 мс. Полученный таким образом раствор реагирующих друг с другом веществ поступает далее в трубку с постоянным сечением. В этой трубке на любом расстоянии от смесительной камеры устанавливается стационарная концентрация, определяемая

скоростью потока, удалением от смесительной камеры и скоростью биохимической реакции.

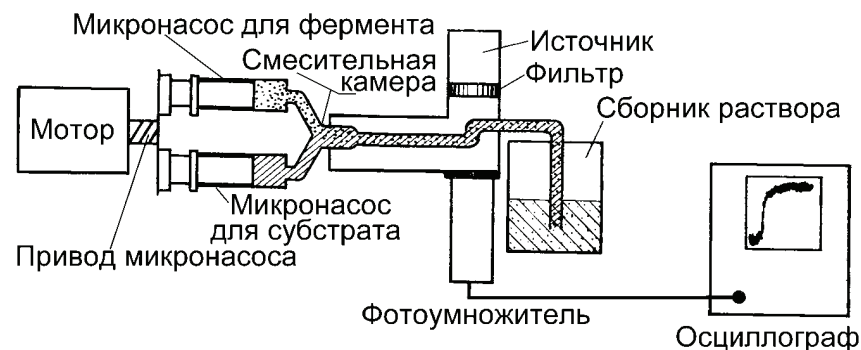


Рисунок 46 – Схема прибора для изучения кинетики ферментативных реакций методом непрерывного потока (непрерывной струи)

Стационарную концентрацию веществ в данном месте трубки можно измерять подходящим способом (например, спектрофотометрическим, термометрическим и т. п.). Если при методе непрерывного потока точно известна скорость смешанного раствора в трубке, то можно точно определить и время, в течение которого протекала реакция от смесительной камеры до места измерения в трубке.

Например, если скорость струи в трубке равна 10 м/с, то на расстоянии 1 см от смесителя "возраст" раствора будет равен 1 мс, на расстоянии 10 см – 10 мс и т. д. Это время также можно варьировать, меняя диаметр трубки. Неудобством этого метода оказывается потребление значительного объема раствора, чтобы добиться равномерного потока во всем приборе. Поскольку при одном измерении получают только одну точку зависимости концентрации от времени, то применение этого метода ограничено главным образом теми системами, для которых и субстрат, и фермент доступны в больших количествах.

### 38. МЕТОД ОСТАНОВЛЕННОЙ СТРУИ

В методе **остановленной струи** (другое название – метод прерывного потока) реагирующие вещества быстро смешивают в

специальной смесительной камере и измеряют их концентрации. После основательного перемешивания поток раствора через реакционный сосуд прекращают и при помощи быстрого регистрирующего устройства – например, оптического детектора с осциллографической записью – наблюдают в выбранной точке реакционной трубки снижение концентрации веществ со временем.

Для остановки струи используют простое устройство, которое позволяет остановить поток за 1–2 мс. Это устройство представляет собой поршень запорного насоса, помещенный в конце трубки. Реакционная смесь толкает этот поршень, и он резко останавливается, дойдя до внешних ограничителей и замкнув контакты, включающие регистрацию (рисунок 47).

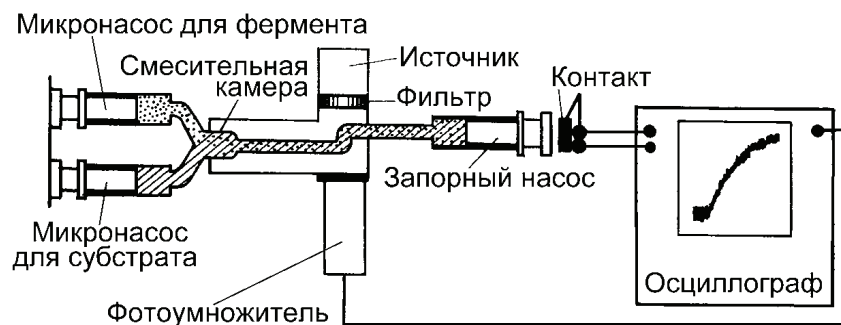


Рисунок 47 – Схема прибора для изучения кинетики ферментативных реакций методом остановленной струи (прерывного потока)

Для метода остановленной струи несущественно точное регулирование расхода жидкости, но важно, чтобы оба раствора были смешаны очень быстро и чтобы время, протекающее между смешиванием растворов и заполнением наблюдательной кюветы, было бы возможно меньше времени протекания исследуемой реакции. Наблюдение за реакцией начинается в момент, когда прекращается поток и включается регистрация. Преимущество описанного метода по сравнению с непрерывным заключается главным образом в меньшем расходе реагирующих веществ.

### 39. РЕЛАКСАЦИОННЫЕ МЕТОДЫ

К этой группе относятся весьма универсальные методы исследования кинетики быстрых химических реакций. Принцип релаксационных методов состоит в следующем. В системе, в которой установилось равновесие всех химических реакций, кинетику которых следует изучить, производят **быстрое** однократное или периодически повторяющееся **изменение** одной или нескольких интенсивных величин, определяющих равновесие (например, температуры или давления). В результате этого изменения произойдет сдвиг химического равновесия из исходного в новое равновесное состояние и, следовательно, изменение концентраций реагирующих веществ.

Изменение концентраций можно контролировать удобным, достаточно быстрым способом. При этом обычно наблюдают изменения некоторых физических величин, как правило, таких, которые являются линейными функциями концентрации (например, оптическое поглощение).

Из предположения, что скорость изменения интенсивной величины во много раз выше скорости исследуемой химической реакции, следует, что происходит запаздывание изменения концентраций – **релаксационный эффект**. В случае однократного изменения интенсивной величины получают релаксационный отсчет, содержащий временную характеристику исследуемой реакции – **время релаксации**. Это время является функцией констант скорости отдельных реакций и равновесных концентраций реагирующих веществ. Из зависимости времени релаксации от равновесных концентраций можно определить механизм реакции и значения констант отдельных реакций.

При анализе механизмов ферментативных реакций наибольшее применение нашел **метод температурного скачка**. Это объясняется тем, что разработана достаточно простая и надежная аппаратура, позволяющая осуществить изменение температуры за несколько микросекунд, а также тем, что данный метод позволяет работать с небольшим объемом исследуемого раствора (до 0,1 мл).

Раствор инкубируют в кювете спектрофотометра или флуориметра, а затем менее чем за 1 мкс повышают температуру на 5–10 градусов с

помощью разряда конденсатора (или за 10–100 нс с помощью инфракрасного лазера).

Схема устройства для измерений методом температурного скачка изображена на рисунке 48.

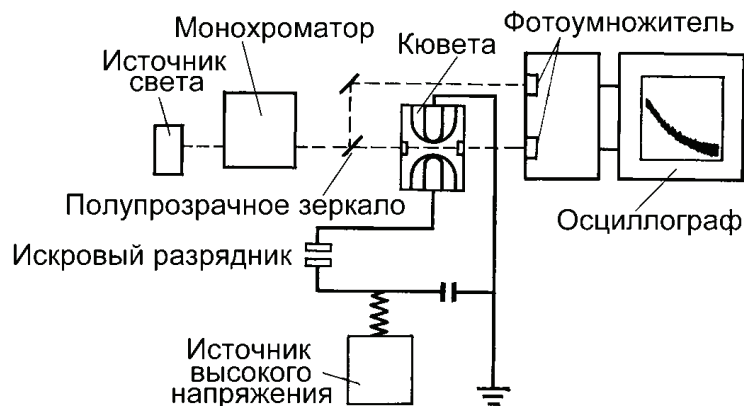


Рисунок 48 – Схема прибора для изучения кинетики ферментативных реакций методом температурного скачка

В этом устройстве конденсатор высокого напряжения заряжается от источника высокого напряжения. Затем конденсатор разряжают искровым разрядником через измерительную кювету с исследуемым раствором за время порядка 1 мкс. Для того, чтобы так быстро разрядить конденсатор, необходимо использовать электролит *достаточной* электропроводности. Это условие особенно хорошо выполняется в ферментативных реакциях, в которых для проявления оптимальной активности необходима повышенная концентрация электролита (~1 М).

Изменение концентрации в релаксирующей системе измеряют спектрофотометрически. От источника света через монохроматор в кювету пропускают пучок света выбранной длины волны. С помощью полупрозрачного зеркала часть пучка отводится для сравнения. Оба луча – луч сравнения и луч, прошедший через исследуемый раствор, – поступают на фотоумножители и получаемые сигналы подаются на *дифференциальный* усилитель и быстрый *осциллограф*. По сравнению с другими

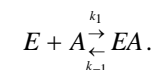
способами спектрофотометрический имеет то преимущество, что, подбирая соответствующую длину волны, можно наблюдать изменения концентрации любых веществ в релаксирующей смеси.

Если исследуемый биохимический процесс *не сопровождается* непосредственно изменением поглощения раствора, его можно объединить с какой-нибудь другой реакцией, вызывающей изменение поглощения и протекающей *быстрее*, чем та стадия, которая определяет общую скорость биохимической реакции.

#### 40. ХИМИЧЕСКАЯ РЕЛАКСАЦИЯ

Переход системы к новым равновесным концентрациям реагентов называется "химической релаксацией". Если отклонение от равновесия, вызванное внешним воздействием, невелико, кинетика релаксации будет описываться линейным дифференциальным уравнением.

Рассмотрим принципы релаксационной кинетики на примере простейшей реакции образования комплекса фермента  $E$  с каким-либо лигандом  $A$  (субстратом или эффектором)



В начальном состоянии система находится в равновесии, которое характеризуется равновесными концентрациями  $[E]$ ,  $[A]$ ,  $[EA]$  и константой равновесия

$$K = \frac{[EA]}{[E][A]}.$$

Предположим, что в системе резко изменяется температура ( $T \rightarrow T + \Delta T$ ). Это приводит к изменению константы равновесия ( $K \rightarrow K + \Delta K$ ), которое определяется термодинамическим соотношением

$$\frac{\Delta K}{K} \cong \Delta \ln K \cong \frac{\Delta H}{RT^2} \Delta T.$$

После быстрого изменения температуры исходные концентрации компонентов не соответствуют новому равновесию, характеризующемуся константой  $K + \Delta K$ , и, следовательно, система должна перейти в новое

равновесное состояние. При этом кинетика реакции описывается дифференциальным уравнением

$$\frac{d[EA]}{dt} = k_1[E][A] - k_{-1}[EA].$$

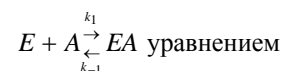
Это уравнение нелинейно, поскольку содержит произведение переменных  $[E] \cdot [A]$ . Анализ кинетики существенно упрощается, если отклонение от равновесия, вызываемое внешним фактором, невелико, т. е.,  $[E] \gg \Delta[E]$ ,  $[A] \gg \Delta[A]$ .

В этом случае, подставляя вместо  $[E]$ ,  $[A]$ ,  $[EA]$ , соответственно,  $[E] + \Delta[E]$ ,  $[A] + \Delta[A]$ ,  $[EA] + \Delta[EA]$  можно пренебречь произведением  $(\Delta[E] \cdot \Delta[A])$ .

С учетом равенства (из материального баланса)  $\Delta[A] = \Delta[E] = -\Delta[EA]$  дифференциальное уравнение становится линейным дифференциальным уравнением с постоянными коэффициентами и принимает вид

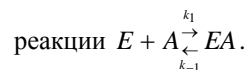
$$\frac{d(\Delta[EA])}{dt} + (k_1([E] + [A]) + k_{-1})\Delta[EA] = k_1[E][A] - k_{-1}[EA].$$

Решение этого дифференциального уравнения представляет собой экспоненциальную функцию  $\Delta[EA]$  от времени, в которой показатель экспоненты связан с элементарными константами скорости реакции



$$\frac{1}{\tau} = k_1([E] + [A]) + k_{-1}.$$

Величина  $\tau$  называется **временем релаксации**. При анализе зависимости времени релаксации от равновесных концентраций фермента  $[E]$  и лиганда  $[A]$  могут быть найдены элементарные константы скорости



Внешнее влияние, возмущающее систему, может иметь разную физическую природу. В общем случае константа равновесия является функцией не только температуры, но и давления, электрического поля. Поэтому помимо рассмотренного метода (температурного скачка) внешнее

воздействие на систему можно осуществить, изменяя давление (скачок давления, поглощение ультразвука) или электрическое поле (метод электрического импульса). Релаксационные методы имеют весьма высокую разрешающую способность (Таблица 4).

Таблица 4 – Разрешающая способность релаксационных методов

Метод	Разрешающая способность, с
Поглощение ультразвука	$10^{-6} - 10^{-10}$
Температурный скачок	$10^{-4} - 10^{-6}$
Метод электрического импульса	$10^{-4} - 10^{-6}$
Скачок давления	$10^{-2}$

Видно, что применение методов релаксационной кинетики позволяет исследовать процессы с временем релаксации до  $10^{-10}$  с. Именно поэтому релаксационная кинетика широко используется при исследовании механизмов быстрых ферментативных реакций.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ЗАДАЧИ

1. Для простой равновесной кинетической схемы  $A \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} B$  покажите,

что кинетическое уравнение для концентрации реагента  $A$  при условии: в нулевой момент времени  $[B]_0 = 0$ , имеет вид

$$[A] = [A]_0 - \frac{k_1[A]_0}{k_1 + k_{-1}} (1 - \exp[-(k_1 + k_{-1})t]).$$

2. Для простой равновесной кинетической схемы  $A \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} B$  покажите,

что кинетическое уравнение для концентрации реагента  $B$  при условии: в нулевой момент времени  $[B]_0 = 0$ , имеет вид

$$[B] = \frac{k_1[A]_0}{k_1 + k_{-1}} (1 - \exp[-(k_1 + k_{-1})t]).$$

3. Для случая двух последовательных реакций первого порядка  $A \xrightarrow{k_1} B \xrightarrow{k_2} P$  показать, что выражение для зависимости концентрации реагента  $A$  от времени при начальном условии  $[B]_0 = [P]_0 = 0$  имеет вид

$$[A] = [A]_0 \exp(-k_1 t).$$

4. Для случая двух последовательных реакций первого порядка  $A \xrightarrow{k_1} B \xrightarrow{k_2} P$  показать, что выражение для зависимости концентрации промежуточного вещества  $B$  от времени при начальном условии  $[B]_0 = [P]_0 = 0$  имеет вид

$$[B] = [P]_0 = 0 \text{ имеет вид } [B] = \frac{k_1[A]_0}{k_2 - k_1} (\exp(-k_1 t) - \exp(-k_2 t)).$$

5. Для случая двух последовательных реакций первого порядка  $A \xrightarrow{k_1} B \xrightarrow{k_2} P$  показать, что выражение для зависимости концентрации продукта  $P$  от времени при начальном условии  $[B]_0 = [P]_0 = 0$  имеет вид

$$[P] = [A]_0 \left( 1 - \frac{k_2}{k_2 - k_1} \exp(-k_1 t) + \frac{k_1}{k_2 - k_1} \exp(-k_2 t) \right).$$

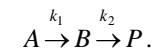
6. Для случая двух последовательных реакций первого порядка  $A \xrightarrow{k_1} B \xrightarrow{k_2} P$  показать, что выражение для зависимости концентрации промежуточного вещества  $B$  от времени имеет максимум при  $t = \frac{\ln(k_2/k_1)}{k_2 - k_1}$ .

7. Для случая двух последовательных реакций первого порядка  $A \xrightarrow{k_1} B \xrightarrow{k_2} P$  показать, что выражение для зависимости концентрации промежуточного вещества  $B$  от времени имеет максимум

$$[B]_{\max} = [A]_0 \left( \frac{k_2}{k_1} \right)^{\frac{k_2}{k_1 - k_2}}.$$

### РЕШЕНИЕ.

Рассмотрим последовательную реакцию, состоящую из двух односторонних мономолекулярных элементарных стадий,



Система кинетических уравнений для этого случая имеет вид

$$\begin{cases} \frac{d[A]}{dt} = -k_1[A], \\ \frac{d[B]}{dt} = k_1[A] - k_2[B], \\ \frac{d[P]}{dt} = k_2[B]. \end{cases}$$

Для того чтобы решить первое дифференциальное уравнение системы, разделяем переменные

$$k_1 dt = - \frac{d[A]}{[A]}$$

и интегрируем части в пределах  $(0, t)$  и  $([A]_0, [A])$  соответственно

$$\int_0^t k_1 dt = - \int_{[A]_0}^{[A]} \frac{d[A]}{[A]},$$

$$k_1 t = -(\ln[A] - \ln[A]_0),$$



$$k_1 t = \ln \frac{[A]_0}{[A]}.$$

Откуда получаем решение первого кинетического уравнения системы

$$k_1 = \frac{1}{t} \ln \frac{[A]_0}{[A]},$$

$$[A] = [A]_0 \exp(-k_1 t),$$

где  $[A]_0$  – концентрация вещества А в начальный момент времени  $t = 0$ ,

$[A]$  – концентрация в момент времени  $t$ .

Подставим выражение  $[A] = [A]_0 \exp(-k_1 t)$  во второе уравнение системы и получим

$$\frac{d[B]}{dt} = k_1 [A]_0 \exp(-k_1 t) - k_2 [B].$$

Решение этого уравнения имеет вид

$$[B] = \frac{k_1 [A]_0}{k_2 - k_1} (\exp(-k_1 t) - \exp(-k_2 t)).$$

Действительно, подставим решение и сократим  $k_1 [A]_0$

$$[A]_0 \frac{k_1}{k_2 - k_1} (-k_1 \exp(-k_1 t) + k_2 \exp(-k_2 t)) +$$

$$+ k_2 [A]_0 \frac{k_1}{k_2 - k_1} (\exp(-k_1 t) - \exp(-k_2 t)) = k_1 [A]_0 \exp(-k_1 t),$$

$$\frac{1}{k_2 - k_1} (-k_1 \exp(-k_1 t) + k_2 \exp(-k_2 t) + k_2 \exp(-k_1 t) - k_2 \exp(-k_2 t)) = \exp(-k_1 t),$$

$$\frac{1}{k_2 - k_1} (k_2 \exp(-k_1 t) - k_1 \exp(-k_1 t)) = \exp(-k_1 t) \quad \text{– тождество.}$$

Подставим это выражение в третье уравнение системы

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{k_2 k_1 [A]_0}{k_2 - k_1} (\exp(-k_1 t) - \exp(-k_2 t)).$$

Решение этого уравнения получим, используя соотношение материального баланса

$$[A]_0 - [A] = [B] + [P],$$

откуда

$$[P] = [A]_0 - [A] - [B].$$

Подставляем в  $[P] = [A]_0 - [A] - [B]$  выражения  $[A] = [A]_0 \exp(-k_1 t)$  и

$[B] = [A]_0 \frac{k_1}{k_2 - k_1} (\exp(-k_1 t) - \exp(-k_2 t))$ . В результате получаем

$$[P] = [A]_0 - [A]_0 \exp(-k_1 t) - [A]_0 \frac{k_1}{k_2 - k_1} (\exp(-k_1 t) - \exp(-k_2 t)),$$

$$[P] = [A]_0 \left( 1 - \exp(-k_1 t) - \frac{k_1}{k_2 - k_1} \exp(-k_1 t) + \frac{k_1}{k_2 - k_1} \exp(-k_2 t) \right),$$

$$[P] = [A]_0 \left( 1 - \frac{k_2}{k_2 - k_1} \exp(-k_1 t) + \frac{k_1}{k_2 - k_1} \exp(-k_2 t) \right).$$

На кинетической кривой для промежуточного вещества В имеется

максимум. Его координаты получаем из условия  $\frac{d[B]}{dt} = 0$

$$\frac{k_1 [A]_0}{k_2 - k_1} (\exp(-k_1 t) - \exp(-k_2 t)) = 0$$

Следовательно

$$\exp(-k_1 t) = \exp(-k_2 t),$$

откуда

$$(k_2 - k_1) t_{\max} = \ln \frac{k_2}{k_1}$$

или

$$t_{\max} = \frac{\ln(k_2/k_1)}{k_2 - k_1}.$$

Значение  $[B]_{\max}(t_{\max})$  получим, подставив  $t_{\max} = \frac{\ln(k_2/k_1)}{k_2 - k_1}$  в выражение

$$[B] = \frac{k_1 [A]_0}{k_2 - k_1} (\exp(-k_1 t) - \exp(-k_2 t)).$$

$$[B]_{\max}(t_{\max}) = \frac{k_1 [A]_0}{k_2 - k_1} \left( \exp\left(-k_1 \frac{\ln(k_2/k_1)}{k_2 - k_1}\right) - \exp\left(-k_2 \frac{\ln(k_2/k_1)}{k_2 - k_1}\right) \right) =$$

$$= \frac{k_1 [A]_0}{k_2 - k_1} \left\{ \exp\left(\ln\left[\left(\frac{k_2}{k_1}\right)^{\frac{k_1}{k_1 - k_2}}\right]\right) - \exp\left(\ln\left[\left(\frac{k_2}{k_1}\right)^{\frac{k_2}{k_1 - k_2}}\right]\right) \right\}.$$

Далее,

$$\begin{aligned}
 [B]_{\max}(t_{\max}) &= \frac{k_1[A]_0}{k_2 - k_1} \left( \left( \frac{k_2}{k_1} \right)^{\frac{k_1}{k_1 - k_2}} - \left( \frac{k_2}{k_1} \right)^{\frac{k_2}{k_1 - k_2}} \right) = \\
 &= \frac{k_1[A]_0}{k_2 - k_1} \left( \left( \frac{k_2}{k_1} \right)^{\frac{k_2}{k_1 - k_2} + 1} - \left( \frac{k_2}{k_1} \right)^{\frac{k_2}{k_1 - k_2}} \right) = \\
 &= \frac{k_1[A]_0}{k_2 - k_1} \left( \frac{k_2}{k_1} \right)^{\frac{k_2}{k_1 - k_2}} \left( \frac{k_2}{k_1} - 1 \right) = \frac{k_1[A]_0}{k_2 - k_1} \left( \frac{k_2}{k_1} \right)^{\frac{k_2}{k_1 - k_2}} \left( \frac{k_2 - k_1}{k_1} \right) = \\
 &= [A]_0 \left( \frac{k_2}{k_1} \right)^{\frac{k_2}{k_1 - k_2}}.
 \end{aligned}$$

ОТВЕТ.

Таким образом, для случая двух последовательных реакций первого порядка  $A \xrightarrow{k_1} B \xrightarrow{k_2} P$  выражение для зависимости концентрации промежуточного вещества  $B$  от времени имеет максимум

$$[B]_{\max}(t_{\max}) = [A]_0 \left( \frac{k_2}{k_1} \right)^{\frac{k_2}{k_1 - k_2}} \text{ при } t_{\max} = \frac{\ln(k_2/k_1)}{k_2 - k_1}.$$

8. Для случая каталитической реакции  $E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightleftharpoons[k_{-2}]{k_2} E + P$ , в которой учтена обратная реакция между ферментом и продуктом, показать, что при стационарных условиях выражение для скорости изменения концентрации продукта имеет вид  $w = \frac{(k_1 k_2 [S] - k_{-1} k_{-2} [P])[E]_0}{k_{-1} + k_2 + k_1 [S] + k_{-2} [P]}$ .

9. Для случая каталитической реакции  $E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E + P$ , в которой учтена обратная реакция между ферментом и продуктом, показать, что при стационарных условиях в начальный момент времени, когда

продукт реакции практически отсутствует в системе, выражение для скорости изменения концентрации продукта имеет вид  $w = \frac{k_1 k_2 [S][E]_0}{k_{-1} + k_2 + k_1 [S]}$ .

10. Из сравнения с моделью Михаэлиса-Ментен ( $E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E + P$ )

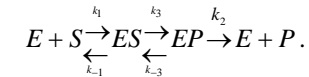
показать, каким образом в случае каталитической реакции  $E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightleftharpoons[k_{-2}]{k_2} E + P$  (в которой учтена обратная реакция между ферментом и продуктом) частичное превращение продукта реакции обратно в субстрат уменьшает скорость образования продукта  $w = \frac{d[P]}{dt}$ .

11. Для случая каталитической реакции  $E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightleftharpoons[k_{-3}]{k_3} EP \xrightarrow{k_2} E + P$ , в

которой природа фермент-субстратного комплекса изменяется в ходе протекания реакции, показать, что при стационарных условиях выражение для скорости изменения концентрации продукта имеет вид  $w = \frac{k_3 k_2 k_1 [E]_0 [S]}{k_{-1} k_{-3} + k_{-1} k_2 + k_3 k_2 + [S] k_1 (k_3 + k_{-3} + k_2)}$ .

РЕШЕНИЕ.

Пусть природа фермент-субстратного комплекса изменяется в ходе протекания реакции



При стационарных условиях

$$[ES] = const, [EP] = const$$

кинетические уравнения имеют вид

$$\begin{cases} \frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] + k_{-3}[EP] - (k_{-1} + k_3)[ES] = 0 \\ \frac{d[EP]}{dt} = k_3[ES] - (k_{-3} + k_2)[EP] = 0 \\ w = \frac{d[P]}{dt} = k_2[EP]. \end{cases}$$

Уравнение материального баланса

$$[E]_0 = [E] + [ES] + [EP].$$

Отсюда  $[E] = [E]_0 - [ES] - [EP]$ .

Подставляем  $[E]$  в первое уравнение системы

$$\begin{aligned} 0 &= k_1[E][S] + k_{-3}[EP] - (k_{-1} + k_3)[ES] = \\ &= k_1([E]_0 - [ES] - [EP])[S] + k_{-3}[EP] - (k_{-1} + k_3)[ES]. \end{aligned}$$

Следовательно

$$\begin{aligned} (k_{-1} + k_3)[ES] + k_1[ES][S] &= k_1[E]_0[S] - k_1[EP][S] + k_{-3}[EP], \\ [ES] &= \frac{k_1[E]_0[S] - k_1[EP][S] + k_{-3}[EP]}{k_{-1} + k_3 + k_1[S]}. \end{aligned}$$

Подставляем это выражение во второе уравнение системы

$$\begin{aligned} \frac{d[EP]}{dt} &= k_3[ES] - (k_{-3} + k_2)[EP] = 0, \\ k_3 \frac{k_1[E]_0[S] - k_1[EP][S] + k_{-3}[EP]}{k_{-1} + k_3 + k_1[S]} - (k_{-3} + k_2)[EP] &= 0 \end{aligned}$$

и решаем его относительно  $[EP]$ . Выражение

$$\frac{k_3(k_1[E]_0[S] - k_1[EP][S] + k_{-3}[EP]) - (k_{-1} + k_3 + k_1[S])(k_{-3} + k_2)[EP]}{k_{-1} + k_3 + k_1[S]} = 0$$

выполняется, если числитель равен нулю.

$$\begin{aligned} k_3k_1[E]_0[S] - k_3k_1[EP][S] + k_3k_{-3}[EP] - \\ - (k_{-1}k_{-3} + k_{-1}k_2 + k_3k_{-3} + k_3k_2 + k_1k_{-3}[S] + k_1k_2[S])[EP] = 0 \end{aligned}$$

или

$$\begin{aligned} k_3k_1[E]_0[S] - k_3k_1[EP][S] + k_3k_{-3}[EP] - k_{-1}k_{-3}[EP] - k_{-1}k_2[EP] - \\ - k_3k_{-3}[EP] - k_3k_2[EP] - k_1k_{-3}[S][EP] - k_1k_2[S][EP] = 0, \end{aligned}$$

откуда

$$k_3k_1[E]_0[S] = [EP](k_3k_1[S] - k_3k_{-3} + k_{-1}k_{-3} + k_{-1}k_2 + k_3k_{-3} + k_3k_2 + k_1k_{-3}[S] + k_1k_2[S])$$

или

$$[EP] = \frac{k_3k_1[E]_0[S]}{k_{-1}k_{-3} + k_{-1}k_2 + k_3k_2 + [S]k_1(k_3 + k_{-3} + k_2)}.$$

Подставляем это выражение в скорость образования продукта

$$w = \frac{d[P]}{dt} = k_2[EP]$$

и получаем

$$w = \frac{k_3k_2k_1[E]_0[S]}{k_{-1}k_{-3} + k_{-1}k_2 + k_3k_2 + [S]k_1(k_3 + k_{-3} + k_2)}.$$

ОТВЕТ.

Таким образом, для случая каталитической реакции  $E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightleftharpoons[k_{-3}]{k_3} EP \xrightarrow{k_2} E + P$ , в которой природа фермент-субстратного

комплекса изменяется в ходе протекания реакции, показать, что при стационарных условиях выражение для скорости изменения концентрации продукта имеет вид  $w = \frac{k_3k_2k_1[E]_0[S]}{k_{-1}k_{-3} + k_{-1}k_2 + k_3k_2 + [S]k_1(k_3 + k_{-3} + k_2)}$ .

**12.** Для случая мультисубстратных каталитических реакций с образованием тройных комплексов, выражение для скорости образования продукта которых имеет вид  $w = \frac{V[A][B]}{C_0 + C_1[A] + C_2[B] + [A][B]}$ , показать, что в

приближении Лайнуивера-Берка (зависимость  $\frac{1}{w}$  от  $\frac{1}{[A]}$  при постоянном значении  $[B]$ ) увеличение концентрации  $B$  в ряду  $[B_1] < [B_2] < [B_3] < [B_4]$  будет приводить одновременно и к смещению прямых вниз по оси  $\frac{1}{w}$  и к уменьшению угла наклона.

**13.** Для случая мультисубстратных каталитических реакций с образованием тройных комплексов, выражение для скорости образования

продукта которых имеет вид  $w = \frac{V[A][B]}{C_0 + C_1[A] + C_2[B] + [A][B]}$ , показать, что для набора различных постоянных концентраций  $[B] = const$ , прямые Лайнуивера-Берка пересекаются при значении  $\frac{1}{[A]} = -\frac{C_1}{C_0}$ .

14. Для случая мультисубстратных каталитических реакций с образованием тройных комплексов, выражение для скорости образования продукта которых имеет вид  $w = \frac{V[A][B]}{C_0 + C_1[A] + C_2[B] + [A][B]}$ , показать, что для набора различных постоянных концентраций  $[B] = const$ , прямые Лайнуивера-Берка пересекаются при значении  $\frac{1}{w} = \frac{1}{V} - \frac{C_1 C_2}{V C_0}$ .

15. Для случая мультисубстратных каталитических реакций типа "пинг-понг", выражение для скорости образования продукта которых имеет вид  $w = \frac{V[A][B]}{C_1[A] + C_2[B] + [A][B]}$ , показать, что для набора различных постоянных концентраций  $[B] = const$ , прямые Лайнуивера-Берка параллельны друг другу.

16. Для случая конкурентного ингибирования каталитической реакции  $E \xrightleftharpoons[k_{-3}]{k_3} E + S + I \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E + P$ , показать, что при стационарных условиях выражение для скорости изменения концентрации продукта имеет вид  $w = \frac{w_{\max} K_I [S]}{K_I [S] + K_S [I] + K_I K_S}$ , где  $K_S = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$  и  $K_I = \frac{k_{-3}}{k_3}$ .

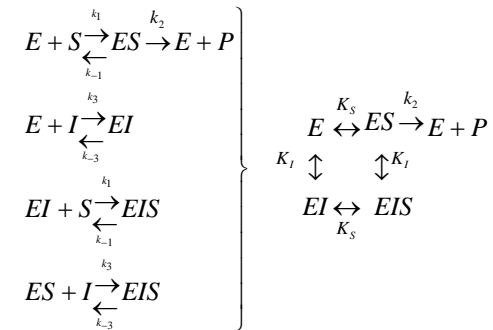
17. Для случая конкурентного ингибирования каталитической реакции  $E \xrightleftharpoons[k_{-3}]{k_3} E + S + I \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E + P$ , показать, что в присутствии постоянной концентрации ингибитора  $[I] = const$  изменение зависимости

Лайнуивера-Берка (зависимость  $\frac{1}{w}$  от  $\frac{1}{[S]}$ ) состоит в увеличении угла наклона прямых при неизменной величине отрезка, отсекаемого на оси ординат.

18. Для случая неконкурентного ингибирования каталитической реакции показать, что при стационарных условиях выражение для скорости изменения концентрации продукта имеет вид  $\frac{1}{w} = \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) \cdot \left(\frac{1}{w_{\max}} + \frac{K_S}{w_{\max}} \frac{1}{[S]}\right)$ , где  $K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}$  и  $K_S = \frac{[E][S]}{[ES]}$ ,  $[I]$  и  $[S]$  – концентрации ингибитора и субстрата, соответственно.

**РЕШЕНИЕ.**

Кинетическая схема ферментативной реакции в случае неконкурентного ингибирования имеет вид:



В стационарных условиях система кинетических уравнений имеет вид

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{d[ES]}{dt} = -(k_{-1} + k_2)[ES] + k_1[E][S] - k_3[ES][I] + k_{-3}[EIS] = 0 \\ \frac{d[EI]}{dt} = k_3[E][I] + k_{-1}[EIS] - k_{-3}[EI] - k_1[EI][S] = 0 \\ \frac{d[EIS]}{dt} = k_1[EI][S] + k_3[ES][I] - (k_{-1} + k_{-3})[EIS] = 0 \\ \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \end{array} \right.$$

Запишем уравнение материального баланса

$$[E]_0 = [E] + [ES] + [EI] + [EIS]$$

в виде

$$[E] = [E]_0 - [ES] - [EI] - [EIS].$$

Определим константы диссоциации

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}, \quad K_I = \frac{[ES][I]}{[EIS]}, \quad K_S = \frac{[E][S]}{[ES]}, \quad K_S = \frac{[EI][S]}{[EIS]}.$$

Очевидно  $\frac{[EI]}{[EIS]} = \frac{[E]}{[ES]}$ , откуда следует

$$\begin{cases} [EIS] = \frac{[ES][I]}{K_I} \\ ([E]_0 - [ES] - [EI] - [EIS])[EIS] = [ES][EI] \\ [EI] = \frac{K_S[EIS]}{[S]} = \frac{K_S[ES][I]}{K_I[S]} \end{cases}$$

Подставляем во второе уравнение этой системы выражения для  $[EI]$  и  $[EIS]$  из первого и третьего уравнений и решаем второе уравнение относительно  $[ES]$ .

$$\left( [E]_0 - [ES] - \frac{K_S[ES][I]}{K_I[S]} - \frac{[ES][I]}{K_I} \right) \frac{[ES][I]}{K_I} = [ES] \frac{K_S[ES][I]}{K_I[S]},$$

далее

$$[E]_0 - [ES] - \frac{K_S[ES][I]}{K_I[S]} - \frac{[ES][I]}{K_I} = [ES] \frac{K_S}{[S]},$$

откуда получаем

$$K_I[S][E]_0 - K_I[S][ES] - K_S[ES][I] - [ES][I][S] = K_S K_I [ES],$$

или

$$K_S K_I [ES] + K_I[S][ES] + K_S[ES][I] + [ES][I][S] = K_I[S][E]_0$$

и, наконец,

$$[ES](K_S K_I + K_I[S] + K_S[I] + [I][S]) = K_I[S][E]_0,$$

откуда следует

$$\begin{aligned} [ES] &= \frac{K_I[S][E]_0}{K_S K_I + K_I[S] + K_S[I] + [I][S]} = \\ &= \frac{[S][E]_0}{K_S + [S] + \frac{K_S[I]}{K_I} + \frac{[I][S]}{K_I}}. \end{aligned}$$

Таким образом, выражение для скорости образования продукта имеет вид

$$w = k_2[ES] = \frac{k_2[E]_0[S]}{K_S + [S] + \frac{K_S[I]}{K_I} + \frac{[I][S]}{K_I}} = \frac{w_{\max}[S]}{K_S + [S] + \frac{K_S[I]}{K_I} + \frac{[I][S]}{K_I}},$$

где

$$w_{\max} = k_2[E]_0.$$

Выражение для обратной скорости  $\frac{1}{w}$  будет иметь вид

$$\frac{1}{w} = \frac{K_S + [S] + \frac{K_S[I]}{K_I} + \frac{[I][S]}{K_I}}{w_{\max}[S]} = \frac{K_S}{w_{\max}[S]} + \frac{1}{w_{\max}} + \frac{[I]}{K_I} \frac{K_S}{w_{\max}[S]} + \frac{[I]}{K_I} \frac{1}{w_{\max}}$$

или

$$\frac{1}{w} = \left( 1 + \frac{[I]}{K_I} \right) \cdot \left( \frac{1}{w_{\max}} + \frac{K_S}{w_{\max}[S]} \right).$$

Это выражение представляет собой уравнение прямой в координатах Лайнуивера-Берка.

### ОТВЕТ.

Для случая неконкурентного ингибирования каталитической реакции при стационарных условиях выражение для скорости изменения концентрации продукта имеет вид  $\frac{1}{w} = \left( 1 + \frac{[I]}{K_I} \right) \cdot \left( \frac{1}{w_{\max}} + \frac{K_S}{w_{\max}[S]} \right)$ .

**19.** Для случая неконкурентного ингибирования каталитической реакции, выражение для скорости образования продукта которой имеет вид

$$\frac{1}{w} = \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) \cdot \left(\frac{1}{w_{\max}} + \frac{K_S}{w_{\max}} \frac{1}{[S]}\right) \quad (\text{где } K_S = \frac{[S][E]}{[ES]} \text{ и } K_I = \frac{[E][I]}{[EI]} - \text{константы}$$

диссоциации комплексов  $ES$  и  $EI$ , соответственно), показать, что в присутствии постоянной концентрации неконкурентного ингибитора  $[I] = const$  изменение зависимости Лайнуивера-Берка (зависимость  $\frac{1}{w}$  от

$\frac{1}{[S]}$ ) состоит в увеличении угла наклона прямых при неизменной величине

отрезка, отсекаемого на оси абсцисс.

**20.** Для случая неконкурентного ингибирования каталитической реакции показать как методом Диксона определить значение константы

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]} \text{ диссоциации комплекса } EI.$$

**21.** Для случая конкурентного ингибирования каталитической реакции показать как методом Диксона определить значение константы

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]} \text{ диссоциации комплекса } EI.$$

**22.** Для случая зависимости ферментативной активности от рН  $EH_2^{2+} \xrightleftharpoons{K_1} EH^+ \xrightleftharpoons{K_2} E$ , в которой только форма  $EH^+$  является каталитически активной, показать, что зависимость активности фермента от рН

$$\text{описывается уравнением } w_{\max} = \frac{w_{\max}^0 K_1 [H^+]}{K_1 K_2 + K_1 [H^+] + [H^+]^2}.$$

**23.** Для случая зависимости ферментативной активности от рН  $EH_2^{2+} \xrightleftharpoons{K_1} EH^+ \xrightleftharpoons{K_2} E$ , в которой только форма  $EH^+$  является каталитически активной, и зависимость активности фермента от рН описывается

$$\text{уравнением } w_{\max} = \frac{w_{\max}^0 K_1 [H^+]}{K_1 K_2 + K_1 [H^+] + [H^+]^2} \text{ показать, что максимум кривой}$$

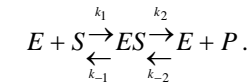
$$\text{расположен при } [H^+]_{\text{оптум}} = \sqrt{K_1 K_2}.$$

**24.** Для случая каталитической реакции  $E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E + P$  при

большом избытке субстрата ( $[S]_0 \gg [E]_0$ )  $[S] \approx [S]_0$  и небольшой глубине реакции ( $[P] \approx 0$ ) показать, что в предстационарном режиме зависимость концентрации фермент-субстратного комплекса от времени описывается выражением  $[ES] = \frac{[E]_0 [S]_0}{K_M + [S]_0} (1 - \exp\{-k_1([S]_0 + K_M) \cdot t\})$ .

РЕШЕНИЕ.

Нестационарная кинетика ферментативной реакции с участием одного промежуточного соединения:



описывается системой уравнений:

$$\begin{cases} \frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES] + k_{-2}[E][P], \\ w = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] - k_{-2}[E][P], \\ [E]_0 = [E] + [ES], \\ [S]_0 = [S] + [ES] + [P]. \end{cases}$$

При большом избытке субстрата ( $[S]_0 \gg [E]_0$ )  $[S] \approx [S]_0$  и небольшой глубине реакции ( $[P] \approx 0$ ) систему можно записать в виде

$$\begin{cases} \frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S]_0 - (k_{-1} + k_2)[ES] \\ \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES], \\ [E]_0 = [E] + [ES]. \end{cases}$$

Исключением переменной  $[E]$  первое дифференциальное уравнение может быть преобразовано к виду

$$\frac{d[ES]}{dt} + (k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2)[ES] = k_1[E]_0[S]_0.$$

Решение этого неоднородного уравнения имеет вид

$$[ES] = C \exp[-(k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2)t].$$

Чтобы найти предэкспоненциальный множитель  $C$ , продифференцируем выражение  $[ES] = C \exp[-(k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2)t]$  и подставим полученное

$$\text{значение в уравнение } \frac{d[ES]}{dt} + (k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2)[ES] = k_1[E]_0[S]_0.$$

$$\begin{aligned} \frac{d[ES]}{dt} &= -(k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2) \cdot C \exp[-(k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2)t], \\ &-(k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2) \cdot C \exp[-(k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2)t] + \\ &+ (k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2)[ES] = k_1[E]_0[S]_0, \end{aligned}$$

$$[ES] = \frac{k_1[E]_0[S]_0}{k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2} + C \exp[-(k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2)t]$$

С учетом начальных условий  $[ES]_0 = 0$  получим:

$$C = -\frac{k_1[E]_0[S]_0}{k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2},$$

откуда

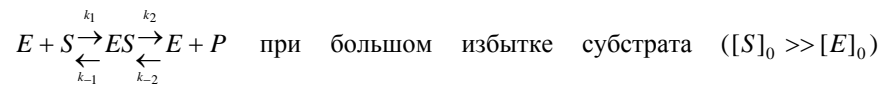
$$[ES] = \frac{k_1[E]_0[S]_0}{k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2} - \frac{k_1[E]_0[S]_0}{k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2} \exp[-(k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2)t].$$

После несложных преобразований получим

$$\begin{aligned} [ES] &= \frac{[E]_0[S]_0}{[S]_0 + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}} \left( 1 - \exp\left\{-k_1 \left( [S]_0 + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \right) \cdot t\right\} \right) = \\ &= \frac{[E]_0[S]_0}{K_M + [S]_0} (1 - \exp\{-k_1([S]_0 + K_M) \cdot t\}) \end{aligned}$$

**ОТВЕТ.**

Таким образом, для случая каталитической реакции



$[S] \approx [S]_0$  и небольшой глубине реакции ( $[P] \approx 0$ ) в предстационарном

режиме зависимость концентрации фермент-субстратного комплекса от времени имеет вид  $[ES] = \frac{[E]_0[S]_0}{K_M + [S]_0} (1 - \exp\{-k_1([S]_0 + K_M) \cdot t\})$ .

**25.** Для случая каталитической реакции  $E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightleftharpoons[k_{-2}]{k_2} E + P$  при

большом избытке субстрата ( $[S]_0 \gg [E]_0$ )  $[S] \approx [S]_0$  и небольшой глубине реакции ( $[P] \approx 0$ ) показать, что в предстационарном режиме при  $[S]_0 \gg K_M$  зависимость концентрации фермент-субстратного комплекса от времени описывается выражением  $[ES] = [E]_0 (1 - \exp\{-k_1[S]_0 \cdot t\})$ .

**26.** Для случая каталитической реакции  $E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightleftharpoons[k_{-2}]{k_2} E + P$  при

большом избытке субстрата ( $[S]_0 \gg [E]_0$ )  $[S] \approx [S]_0$  и небольшой глубине реакции ( $[P] \approx 0$ ) показать, что в предстационарном режиме при  $[S]_0 \ll K_M$  зависимость концентрации фермент-субстратного комплекса от времени описывается выражением  $[ES] = \frac{[E]_0[S]_0}{K_M} (1 - \exp\{-k_1 K_M \cdot t\})$ .

**27.** Для случая каталитической реакции  $E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightleftharpoons[k_{-2}]{k_2} E + P$  при

большом избытке субстрата ( $[S]_0 \gg [E]_0$ )  $[S] \approx [S]_0$  и небольшой глубине реакции ( $[P] \approx 0$ ) показать, как из кинетики накопления фермент-субстратного комплекса  $[ES]$  определить константу скорости  $k_1$  и сумму констант скоростей  $(k_{-1} + k_2)$ .

### ПРИМЕРЫ ТЕСТОВЫХ ЗАДАНИЙ

Для каждого вопроса выберите правильный ответ или правильное окончание формулировки или определения.

#### 1. Ферменты – это

- A) вещества небиологического происхождения, ускоряющие биохимические реакции.
- B) белковые компонент энзимов.
- C) небелковые компоненты энзимов.
- D) вещества биологического происхождения, ускоряющие химические реакции.
- E) каталитически активные нуклеиновые кислоты.
- F) органические небелковые кофакторы.
- G) витамины.

#### 2. Энзимология – это

- A) учение о строении белковых молекул.
- B) наука, изучающая устройство фермент-субстратных комплексов.
- C) учение о ферментативной кинетике.
- D) способ классификации ферментов.
- E) наука, изучающая ферменты и катализируемые ими реакции.
- F) описание приближения Михаэлиса-Ментен.
- G) систематика ферментативных процессов Лайнуивера-Берка.

#### 3. Субстратом называется

- A) вещество, которое действует на фермент.
- B) вещество, которое действует на кофермент.
- C) вещество, на которое действует фермент.
- D) небелковый компонент фермента.
- E) белковый компонент фермента.
- F) органический небелковый компонент фермента.
- G) активный центр фермента.

#### 4. Апоферментом называется

- A) небелковый компонент сложного фермента.
- B) белковый компонент сложного фермента.
- C) белковый компонент простого фермента.
- D) небелковый компонент простого фермента.
- E) комплекс холофермента и кофактора.
- F) комплекс холофермента с субстратом.
- G) простетическая группа кофактора.

#### 5. Кофактором называется

- A) небелковый компонент сложного фермента.
- B) белковый компонент сложного фермента.
- C) белковый компонент простого фермента.
- D) небелковый компонент простого фермента.
- E) комплекс холофермента с апоферментом.
- F) комплекс холофермента с субстратом.
- G) простетическая группа апофермента.

#### 6. Холоферментом называется

- A) небелковый компонент сложного фермента.
- B) белковый компонент сложного фермента.
- C) белковый компонент простого фермента.
- D) небелковый компонент простого фермента.
- E) комплекс апофермента и кофактора.
- F) комплекс кофактора с субстратом.
- G) простетическая группа кофактора.

#### 7. Коферментом называется

- A) небелковый компонент сложного фермента.
- B) белковый компонент сложного фермента.
- C) белковый компонент простого фермента.
- D) небелковый компонент простого фермента.
- E) комплекс апофермента и кофактора.
- F) комплекс кофактора с субстратом.
- G) органический небелковый кофактор.



**8.** Простетической группой называется

- A) апофермент, ковалентно связанный с ферментом.
- B) апофермент, нековалентно связанный с ферментом.
- C) кофактор, ковалентно связанный с ферментом.
- D) кофактор, нековалентно связанный с ферментом.
- E) холофермент, ковалентно связанный с ферментом.
- F) холофермент, нековалентно связанный с ферментом.
- G) кофермент, ковалентно связанный с ферментом.

**9.** Катализом называется

- A) явление изменения скорости химической реакции в отсутствие катализатора.
- B) явление изменения направления химической реакции в отсутствие катализатора.
- C) явление изменения скорости химической реакции в присутствии катализатора.
- D) явление изменения направления химической реакции в присутствии катализатора.
- E) явление изменения пути реакции в отсутствие субстрата.
- F) явление изменения пути реакции в присутствии субстрата.
- G) явление ускорения биохимической реакции в присутствии субстрата.

**10.** Каталитическая активность характеризует

- A) изменение глубины реакции при введении в систему катализатора.
- B) увеличение скорости реакции при введении в систему субстрата.
- C) увеличение скорости реакции при повышении температуры на 10 градусов.
- D) изменение скорости реакции при введении в систему катализатора.
- E) измерение направления реакции при введении в систему катализатора.
- F) изменение скорости реакции по одному из возможных путей реакции.
- G) изменение направления протекания реакции.

**11.** Селективностью катализатора называется

- A) его способность ускорять один из возможных путей реакции.
- B) его способность ускорять все возможные пути реакции.
- C) его способность разветвлять ход протекания реакции.
- D) его способность селективировать исходные вещества реакции.
- E) его способность селективировать промежуточные продукты реакции.
- F) его способность реагировать на изменение pH среды.
- G) его способность реагировать на изменение температуры среды.

**12.** В реакциях с образованием тройного комплекса

- A) три субстрата должны быть сорбированы на ферменте, прежде чем какой либо из продуктов будет десорбирован.
- B) два субстрата должны быть сорбированы на ферменте, прежде чем какой либо из продуктов будет десорбирован.
- C) образуется тройной комплекс субстрат-фермент-продукт.
- D) образуется тройной комплекс субстрат-кофермент-продукт.
- E) образуется тройной комплекс фермент-кофермент-продукт.
- F) два субстрата должны быть сорбированы на ферменте, до тех пор пока не образуются все продукты.
- G) три субстрата должны быть сорбированы на ферменте, до тех пор пока не образуются все продукты.

**13.** Конкурентным называется ингибирование

- A) при котором молекула ингибитора конкурирует с кофактором.
- B) при котором молекула ингибитора подобна молекуле субстрата.
- C) при котором молекула субстрата конкурирует с кофактором.
- D) при котором молекула субстрата конкурирует с коферментом.
- E) при котором молекула кофактора конкурирует с ингибитором.
- F) при котором молекула кофермента конкурирует с ингибитором.
- G) при котором молекула холофермента конкурирует с ферментом.

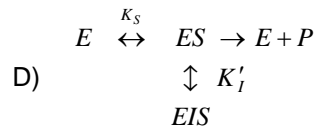
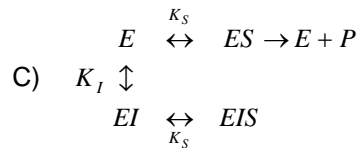
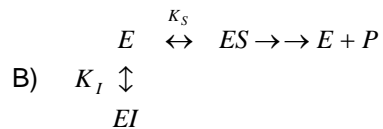
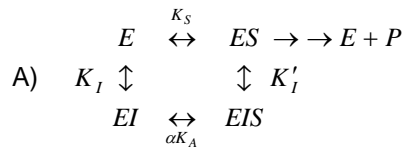
**14.** Неконкурентным называется ингибирование

- A) при котором связывание субстрата с ингибитором не влияет на связывание фермента с субстратом, но ингибитор модифицирует

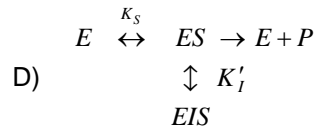
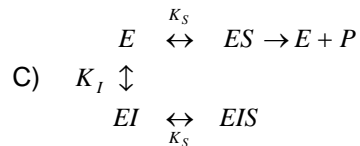
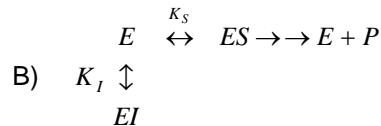
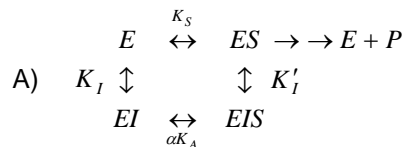
функционально важную каталитическую группу фермента, дезактивируя фермент.

- В) при котором связывание ингибитора с ферментом не влияет на связывание фермента с субстратом, но ингибитор модифицирует кофермент, дезактивируя фермент.
- С) при котором связывание фермента с ингибитором не влияет на связывание фермента с субстратом, но ингибитор модифицирует функционально важную каталитическую группу фермента, дезактивируя фермент.
- Д) при котором связывание фермента с ингибитором не влияет на связывание фермента с субстратом, но ингибитор модифицирует кофермент, дезактивируя фермент.
- Е) при котором связывание ингибитора с ферментом не влияет на связывание фермента с субстратом, но ингибитор модифицирует кофактор, дезактивируя фермент.
- Ф) при котором связывание фермента с ингибитором не влияет на связывание фермента с субстратом, но ингибитор модифицирует кофактор, дезактивируя фермент.
- Г) при котором связывание субстрата с ингибитором не влияет на связывание фермента с субстратом, но ингибитор модифицирует кофактор, дезактивируя фермент.

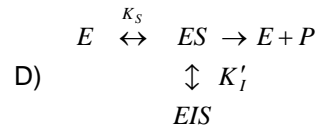
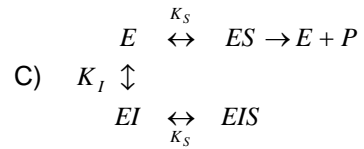
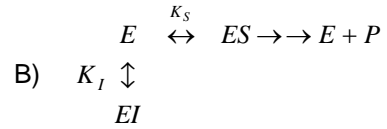
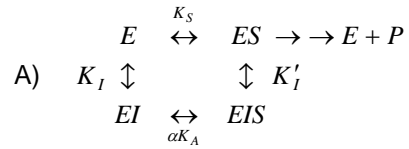
15. Кинетическая схема конкурентного ингибирования выглядит следующим образом



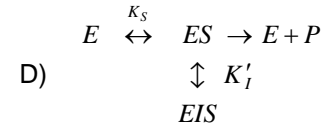
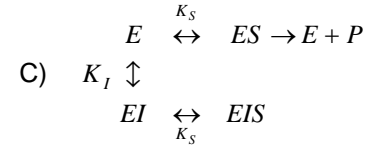
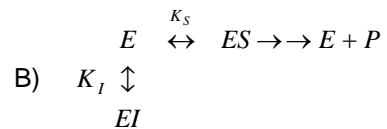
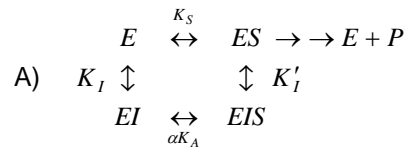
16. Общая кинетическая схема ингибирования выглядит следующим образом



17. Кинетическая схема бесконкурентного ингибирования выглядит следующим образом



18. Кинетическая схема неконкурентного ингибирования выглядит следующим образом



19. Кинетические уравнения, описывающие одностадийную однокомпонентную прямую реакцию, выглядят следующим образом

$$\text{A) } \frac{d[A]}{dt} = -k_1[A]$$

$$\text{B) } \frac{dx}{dt} = k_1([A]_0 - x) - k_{-1}([B]_0 + x)$$

$$\text{C) } \begin{cases} \frac{d[A]}{dt} = -k_1[A], \\ \frac{d[B]}{dt} = k_1[A] - k_2[B], \\ \frac{d[P]}{dt} = k_2[B] \end{cases}$$

$$\text{D) } \begin{cases} \frac{d[A]}{dt} = -k_1[A][B] + k_{-1}[X] = \frac{d[B]}{dt} \\ \frac{d[X]}{dt} = k_1[A][B] - k_{-1}[X] - k_2[X] \\ \frac{d[P]}{dt} = k_2[X] \end{cases}$$

$$E) \begin{cases} \frac{d[S]}{dt} = -k_1[S][E] + k_{-1}[ES] \\ \frac{d[ES]}{dt} = k_1[S][E] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \\ \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \\ \frac{d[E]}{dt} = -k_1[S][E] + k_{-1}[ES] + k_2[ES] \end{cases}$$

20. Кинетические уравнения, описывающие обратимую элементарную реакцию первого порядка, выглядят следующим образом

$$A) \frac{d[A]}{dt} = -k_1[A]$$

$$B) \frac{dx}{dt} = k_1([A]_0 - x) - k_{-1}([B]_0 + x)$$

$$C) \begin{cases} \frac{d[A]}{dt} = -k_1[A], \\ \frac{d[B]}{dt} = k_1[A] - k_2[B], \\ \frac{d[P]}{dt} = k_2[B] \end{cases}$$

$$D) \begin{cases} \frac{d[A]}{dt} = -k_1[A][B] + k_{-1}[X] = \frac{d[B]}{dt} \\ \frac{d[X]}{dt} = k_1[A][B] - k_{-1}[X] - k_2[X] \\ \frac{d[P]}{dt} = k_2[X] \end{cases}$$

$$E) \begin{cases} \frac{d[S]}{dt} = -k_1[S][E] + k_{-1}[ES] \\ \frac{d[ES]}{dt} = k_1[S][E] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \\ \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \\ \frac{d[E]}{dt} = -k_1[S][E] + k_{-1}[ES] + k_2[ES] \end{cases}$$

21. Кинетические уравнения, описывающие последовательную реакцию

$A \xrightarrow{k_1} B \xrightarrow{k_2} P$ , выглядят следующим образом

$$A) \frac{d[A]}{dt} = -k_1[A]$$

$$B) \frac{dx}{dt} = k_1([A]_0 - x) - k_{-1}([B]_0 + x)$$

$$C) \begin{cases} \frac{d[A]}{dt} = -k_1[A], \\ \frac{d[B]}{dt} = k_1[A] - k_2[B], \\ \frac{d[P]}{dt} = k_2[B] \end{cases}$$

$$D) \begin{cases} \frac{d[A]}{dt} = -k_1[A][B] + k_{-1}[X] = \frac{d[B]}{dt} \\ \frac{d[X]}{dt} = k_1[A][B] - k_{-1}[X] - k_2[X] \\ \frac{d[P]}{dt} = k_2[X] \end{cases}$$

$$E) \begin{cases} \frac{d[S]}{dt} = -k_1[S][E] + k_{-1}[ES] \\ \frac{d[ES]}{dt} = k_1[S][E] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \\ \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \\ \frac{d[E]}{dt} = -k_1[S][E] + k_{-1}[ES] + k_2[ES] \end{cases}$$

22. Кинетические уравнения, описывающие некатализируемую реакцию с одним промежуточным соединением, выглядят следующим образом

$$A) \frac{d[A]}{dt} = -k_1[A]$$

$$B) \frac{dx}{dt} = k_1([A]_0 - x) - k_{-1}([B]_0 + x)$$

$$C) \begin{cases} \frac{d[A]}{dt} = -k_1[A], \\ \frac{d[B]}{dt} = k_1[A] - k_2[B], \\ \frac{d[P]}{dt} = k_2[B] \end{cases}$$

$$D) \begin{cases} \frac{d[A]}{dt} = -k_1[A][B] + k_{-1}[X] = \frac{d[B]}{dt} \\ \frac{d[X]}{dt} = k_1[A][B] - k_{-1}[X] - k_2[X] \\ \frac{d[P]}{dt} = k_2[X] \end{cases}$$

$$E) \begin{cases} \frac{d[S]}{dt} = -k_1[S][E] + k_{-1}[ES] \\ \frac{d[ES]}{dt} = k_1[S][E] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \\ \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \\ \frac{d[E]}{dt} = -k_1[S][E] + k_{-1}[ES] + k_2[ES] \end{cases}$$

23. Кинетические уравнения, описывающие катализируемую реакцию с одним промежуточным соединением, выглядят следующим образом

$$A) \frac{d[A]}{dt} = -k_1[A]$$

$$B) \frac{dx}{dt} = k_1([A]_0 - x) - k_{-1}([B]_0 + x)$$

$$C) \begin{cases} \frac{d[A]}{dt} = -k_1[A], \\ \frac{d[B]}{dt} = k_1[A] - k_2[B], \\ \frac{d[P]}{dt} = k_2[B] \end{cases}$$

$$D) \begin{cases} \frac{d[A]}{dt} = -k_1[A][B] + k_{-1}[X] = \frac{d[B]}{dt} \\ \frac{d[X]}{dt} = k_1[A][B] - k_{-1}[X] - k_2[X] \\ \frac{d[P]}{dt} = k_2[X] \end{cases}$$

$$E) \begin{cases} \frac{d[S]}{dt} = -k_1[S][E] + k_{-1}[ES] \\ \frac{d[ES]}{dt} = k_1[S][E] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \\ \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \\ \frac{d[E]}{dt} = -k_1[S][E] + k_{-1}[ES] + k_2[ES] \end{cases}$$

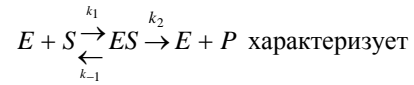
24. Максимальная скорость ферментативной реакции  $w_{\max}$  характеризует

- A) специфичность действия фермента.
- B) количество фермента в системе.
- C) эффективность ферментативного катализа.
- D) силу связывания фермента с ингибитором.
- E) стационарность протекания ферментативной реакции.
- F) время, за которое фермент преобразует половину молекул субстрата в системе.
- G) аллостеричность фермента.

25. Константа Михаэлиса характеризует

- A) специфичность действия фермента.
- B) количество фермента в системе.
- C) эффективность ферментативного катализа.
- D) силу связывания фермента с ингибитором.
- E) стационарность протекания ферментативной реакции.
- F) время, за которое фермент преобразует половину молекул субстрата в системе.
- G) аллостеричность фермента.

26. Значение константы скорости  $k_2$  второго этапа реакции



- A) специфичность действия фермента.
- B) количество фермента в системе.
- C) эффективность ферментативного катализа.
- D) силу связывания фермента с ингибитором.
- E) стационарность протекания ферментативной реакции.
- F) время, за которое фермент преобразует половину молекул субстрата в системе.
- G) аллостеричность фермента.

27. Уравнение Лайнуивера-Берка имеет вид

- A)  $\frac{1}{w} = \frac{K_M + [S]}{w_{\max} [S]}$
- B)  $\frac{1}{w} = \frac{K_M}{w_{\max} [S]} + \frac{1}{w_{\max}}$
- C)  $K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$
- D)  $[ES] = \frac{k_1[S] + k_{-2}[P]}{k_{-1} + k_2} [E]$
- E)  $w = \frac{V[A][B]}{C_1[A] + C_2[B] + [A][B]}$
- F)  $w = \frac{w_{\max} K_I [S]}{K_I [S] + K_S [I] + K_I K_S}$
- G)  $w_{\max} = \frac{w_{\max}^0 K_1 [H^+]}{K_1 K_2 + K_1 [H^+] + [H^+]^2}$

28. Уравнение Михаэлиса-Ментен имеет вид

- A)  $\frac{1}{w} = \frac{K_M + [S]}{w_{\max} [S]}$
- B)  $\frac{1}{w} = \frac{K_M}{w_{\max} [S]} + \frac{1}{w_{\max}}$
- C)  $K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$
- D)  $[ES] = \frac{k_1[S] + k_{-2}[P]}{k_{-1} + k_2} [E]$
- E)  $w = \frac{V[A][B]}{C_1[A] + C_2[B] + [A][B]}$
- F)  $w = \frac{w_{\max} K_I [S]}{K_I [S] + K_S [I] + K_I K_S}$
- G)  $w_{\max} = \frac{w_{\max}^0 K_1 [H^+]}{K_1 K_2 + K_1 [H^+] + [H^+]^2}$

29. Константа Михаэлиса описывается выражением

- A)  $\frac{1}{w} = \frac{K_M + [S]}{w_{\max} [S]}$
- B)  $\frac{1}{w} = \frac{K_M}{w_{\max} [S]} + \frac{1}{w_{\max}}$
- C)  $K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$
- D)  $[ES] = \frac{k_1[S] + k_{-2}[P]}{k_{-1} + k_2} [E]$
- E)  $w = \frac{V[A][B]}{C_1[A] + C_2[B] + [A][B]}$
- F)  $w = \frac{w_{\max} K_I [S]}{K_I [S] + K_S [I] + K_I K_S}$
- G)  $w_{\max} = \frac{w_{\max}^0 K_1 [H^+]}{K_1 K_2 + K_1 [H^+] + [H^+]^2}$

30. Предельное условие для случая бесконкурентного ингибирования имеет

вид

- A)  $\alpha \rightarrow \infty$
- B)  $\alpha = 1$
- C)  $K_I = \infty$
- D)  $\alpha \neq 1, \alpha \neq \infty, K_I \neq \infty$
- E)  $[E]_0 \ll [S]_0$
- F)  $[E]_0 \ll [I]_0$
- G)  $[S]_0 \gg K_M$
- H)  $[S]_0 \ll K_M$

31. Предельное условие для случая конкурентного ингибирования имеет

вид

- A)  $\alpha \rightarrow \infty$
- B)  $\alpha = 1$
- C)  $K_I = \infty$
- D)  $\alpha \neq 1, \alpha \neq \infty, K_I \neq \infty$
- E)  $[E]_0 \ll [S]_0$
- F)  $[E]_0 \ll [I]_0$
- G)  $[S]_0 \gg K_M$
- H)  $[S]_0 \ll K_M$

32. Предельное условие для случая неконкурентного ингибирования имеет

вид

- A)  $\alpha \rightarrow \infty$
- B)  $\alpha = 1$
- C)  $K_I = \infty$
- D)  $\alpha \neq 1, \alpha \neq \infty, K_I \neq \infty$
- E)  $[E]_0 \ll [S]_0$
- F)  $[E]_0 \ll [I]_0$
- G)  $[S]_0 \gg K_M$
- H)  $[S]_0 \ll K_M$

33. Предельное условие для случая смешанного ингибирования имеет вид

- A)  $\alpha \rightarrow \infty$
- B)  $\alpha = 1$
- C)  $K_I = \infty$
- D)  $\alpha \neq 1, \alpha \neq \infty, K_I \neq \infty$
- E)  $[E]_0 \ll [S]_0$
- F)  $[E]_0 \ll [I]_0$
- G)  $[S]_0 \gg K_M$
- H)  $[S]_0 \ll K_M$

34. На рисунке 49 представлены

- A) зависимости Лайнуивера-Берка для мультисубстратных реакций с образованием тройного комплекса.
- B) зависимости Лайнуивера-Берка для мультисубстратных реакций типа "пинг-понг".
- C) зависимости Лайнуивера-Берка для конкурентного ингибирования.
- D) зависимости Лайнуивера-Берка в случае неконкурентного ингибирования.
- E) зависимости Лайнуивера-Берка для смешанного ингибирования.
- F) зависимости Диксона для случая неконкурентного ингибирования.
- G) зависимости Диксона для случая конкурентного ингибирования.

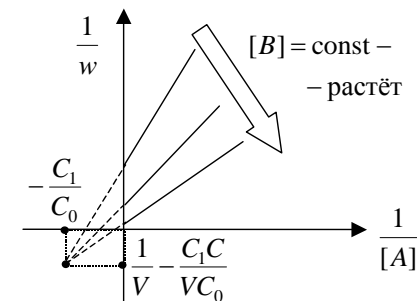


Рисунок 49 – Рисунок к тестовому заданию №34

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Огурцов А.Н. Механизмы ферментативных реакций. Конспект лекций по курсу "Ферментативный катализ" для студентов специальности 7.092901 "Промышленная биотехнология" – Харьков: НТУ "ХПИ", 2004. – 75 с.
2. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики. – М.: Мир, 1979. – 280с.
3. Березин И.В., Клесов А.А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. – М.: Изд. МГУ, 1976. – 320 с.
4. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. Биокинетика: Практический курс. – М.: ФАИР-Пресс, 1999. – 720 с.
5. Рубин А.Б., Пытьева Н.Ф., Ризниченко Г.Ю., Кинетика биологических процессов. – М.: Изд. МГУ, 1987. – 304 с.
6. Бейли Дж., Оллис Д. Основы биохимической инженерии. Пер. с англ. в 2-х частях. Ч.1. – М.: Мир, 1989. – 692 с.
7. Маршелл Э. Биофизическая химия. М.: Мир, 1981. – 806 с.
8. Калоус В., Павличек З. Биофизическая химия. – М.: Мир, 1985. – 446 с.
9. Огурцов А.Н. Молекулярная биология клетки. Основы клеточной организации: Конспект лекций по курсу "Клеточная и молекулярная биология" для студентов специальности 7.092901 "Промышленная биотехнология". – Харьков: НТУ "ХПИ", 2006. – 169 с.
10. Березин И.В., Мартинек К. Основы физической химии ферментативного катализа. – М.: Высшая школа, 1977. – 280 с.
11. Фершт Э. Структура и механизмы действия ферментов. – М.: Мир, 1980. – 432 с.
12. Коэн Ф. Регуляция ферментативной активности. – М.: Мир, 1986. – 144 с.
13. Молекулярные основы действия ферментов / Под ред. С.Е.Северина и Г.А.Кочетова. – М.: Изд-во МГУ, 1985. – 189 с.
14. Биология. Большой энциклопедический словарь / Гл. ред. М.С.Гиляров. – М.: Большая Российская энциклопедия, 2001. – 864 с.

15. Koolman J., Roehm K.-H.. Color Atlas of Biochemistry. – Thieme: Stuttgart, 2005. – 467 p.
16. Marangoni A.G. Enzyme Kinetics. – Wiley-Interscience: Hoboken, 2003. – 228 p.
17. Leskovac V. Comprehensive Enzyme Kinetics. – Kluwer Academic Publishers: New York, 2004. – 438 p.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

18. Плакунов В.К. Основы энзимологии. – М.: Логос, 2001. – 128 с.
19. Волькенштейн М.В. Физика ферментов. – М.: Наука, 1967. – 199 с.
20. Биотехнология: Учебное пособие для вузов. В 8 кн. / Под ред. Н.С. Егорова, В.Д. Самуилова. Кн. 7: Иммуобилизованные ферменты / И.В. Березин, Н.Л. Клячко, А.В. Левашов и др. – М.: Высш. шк., 1987. – 159 с.
21. Иммуобилизованные клетки и ферменты. Методы: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Вудворда. – М.: Мир, 1988. – 215 с.
22. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. – М.: Медицина, 1998. – 704 с.
23. Волькенштейн М.В. Биофизика. – М.: Наука, 1988. – 592 с.
24. Рубин А.Б. Биофизика. – М.: Высш. шк., 1999.– Т.1, 440 с.– Т.2, 464 с.
25. Дженкс В. Катализ в химии и энзимологии. – М.: Мир, 1972. – 467с.
26. Коферменты / Под ред. В.А. Яковлева. – М.: Медицина, 1973. – 375 с.
27. Шульц Г., Ширмер Р. Принципы структурной организации белков. – М.: Мир, 1982. – 354 с.
28. Огурцов А.Н. Механизмы мембранных процессов: Учебно-методическое пособие по курсу "Биологические мембраны" для студентов специальности 7.092901 "Промышленная биотехнология" заочного обучения. – Харьков: НТУ "ХПИ", 2006. – 139 с.
29. Биохимия мембран / Под ред. А.А. Болдырева. Кн. 5: З.П. Кометиани, М.Г. Векуа. Кинетика мембранных транспортных ферментов. – М.: Высш. шк., 1988. – 111 с.
30. Бендер М., Бергерон Р., Комями М. Биоорганическая химия ферментативного катализа. – М.: Мир, 1987. – 352 с.



31. Кольман Я., Рем К.Г. Наглядная биохимия. – М.: Мир, 2000. – 469 с.
32. Эткинс П. Физическая химия. М.: Мир, 1980. – 580 с.
33. Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L., Clarke N.D. Biochemistry. – Freeman and C°, 2002. – 572 p.
34. Chaplin M. Enzyme Technology. – Cambridge University Press: Cambridge, 1990. – 276 p.
35. Smith D.A., Van de Waterbeemd H., Walker D.K. Pharmacokinetics and Metabolism in Drug Design. – Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, 2001. – 141 p.
36. Copeland R.A. Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis. – Wiley-VCH, Inc., 2000. – 397 p.

## СОДЕРЖАНИЕ

Вступление	3
1. Основные понятия энзимологии	4
2. Основные понятия химического катализа	6
3. Мульти-субстратные реакции	9
4. Регуляция ферментативной активности	14
5. Типы ингибирования ферментов	15
6. Аллостерический механизм регуляции активности ферментов	19
7. Аллостерические ферменты	21
8. Диссоциативная регуляция ферментативной активности	23
9. Адсорбционная регуляция ферментативной активности	24
10. Стационарная кинетика Михаэлиса-Ментен	25
11. Необходимость гипотезы о стационарности	27
12. Одностадийная однокомпонентная прямая реакция	28
13. Прямая и обратная реакции	30
14. Последовательные реакции	33
15. Некатализируемая реакция с одним промежуточным соединением	35
16. Каталитическая реакция с одним промежуточным соединением	36
17. Уравнение Михаэлиса	39

18. Приближение Лайнуивера-Берка	41
19. Смысл параметров кинетики Михаэлиса-Ментен	42
20. Снятие ограничений Михаэлиса-Ментен: 1. Существование обратной реакции	46
21. Снятие ограничений Михаэлиса-Ментен: 2. Реакции с числом промежуточных соединений больше одного	48
22. Снятие ограничений Михаэлиса-Ментен: 3. Мульти-субстратные реакции	52
23. Регуляция скоростей ферментативных реакций	58
24. Конкуrentное ингибирование	60
25. Неконкуrentное ингибирование. Смешанное ингибирование	64
26. Метод Диксона	69
27. pH-Регуляция скоростей ферментативных реакций	71
28. Аллостерическая регуляция скоростей ферментативных реакций	78
29. Согласованный механизм аллостерических взаимодействий	79
30. Последовательный механизм аллостерических взаимодействий	84
31. Автоингибирование субстратом	85
32. Нестационарная кинетика ферментативных реакций	89
33. Определение констант скоростей из нестационарной кинетики	92
34. Влияние температуры на скорость реакций	94
35. Термическая инактивация ферментов	96
36. Классические методы исследования кинетики ферментативных реакций	100
37. Методы непрерывного потока	102
38. Метод остановленной струи	103
39. Релаксационные методы	105
40. Химическая релаксация	107
Контрольные задачи	110
Примеры тестовых заданий	126
Список литературы	142
Дополнительная литература	143

Навчальне видання

ОГУРЦОВ Олександр Миколайович

## **КІНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНИХ РЕАКЦІЙ**

Навчальний посібник  
по курсу "Ферментативний каталіз"

для студентів спеціальності 092901  
"Промислова біотехнологія"

Російською мовою

Відповідальний за випуск *М.Ф.Клецев*  
Роботу до видання рекомендувала *М.Г. Зінченко*  
В авторській редакції

План 2007 р., поз. 30/6-07.

Підп. до друку 22.01.07 р. Формат 60×84 1/16. Папір офісний. Riso-друк.  
Гарнітура Таймс. Ум. друк. арк. 8,4. Обл.-вид. арк. 10,1. Наклад 100 прим.  
Зам. № 46. Ціна договірна

---

Видавничий центр НТУ "ХП".  
Свідоцтво про державну реєстрацію ДК № 116 від 10.07.2000 р.  
61002, Харків, вул. Фрунзе, 21

---

Друкарня НТУ "ХП". 61002, Харків, вул. Фрунзе, 21

---