МОДУЛЬ 2.

КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Влияние концентрации субстрата на кинетику реакции.Влияние различных факторов на ферментативную активность. Влияние pH и температуры на прохождение ферментативных реакций

Одним из характерных проявлений жизни является удивительная способность живых организмов кинетически регулировать химические реакции, подавляя стремление к достижению термодинамического равновесия. Ферментативная кинетика занимается исследованием закономерностей влияния химической природы реагирующих веществ (ферментов, субстратов) и условий их взаимодействия (концентрация, pH среды, температуры, присутствие активаторов или ингибиторов) на скорость ферментативной реакции. Главной целью изучения кинетики ферментативных реакций является получение информации, которая может способствовать выяснению молекулярного механизма действия фермента.

Общие принципы кинетики химических реакций применимы и к ферментативным реакциям. Известно, что любая химическая реакция характеризуется константой термодинамического равновесия. Она выражает состояние химического равновесия, достигаемого системой, и обозначается K_p. Так, для реакции:

$$A + B \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftarrows}} C + D, \qquad K_p = \frac{[C]\cdot[D]}{[A]\cdot[B]}$$

константа равновесия равна произведению концентраций образующихся веществ, деленному на произведение концентрации исходных веществ. Значение константы равновесия обычно находят из соотношения констант скоростей прямой (k_{+1}) и обратной (k_{-1}) реакций, т.е. $K_p = k_{+1}/k_{-1}$. В состоянии равновесия скорость прямой реакции: $v_{+1} = k_{+1}[A]\cdot[B]$ равна скорости обратной реакции: $v_{-1} = k_{-1}[C]\cdot[D]$, т. е. $v_{+1} = v_{-1}$ соответственно $k_{+1}[A]\cdot[B] = k_{-1}[C]\cdot[D]$, или

$$\frac{k_{+1}}{k_{-1}} = \frac{[C]\cdot[D]}{[A]\cdot[B]}; \quad \text{отсюда} \quad \frac{k_{+1}}{k_{-1}} = K_p.$$

Теоретический график зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата при постоянной концентрации фермента.

а - реакция первого порядка (при [S] < K_m скорость реакции пропорциональна концентрации субстрата); б - реакция смешанного порядка; в - реакция нулевого порядка, когда v = V_{max}и скорость реакции не зависит от концентрации субстрата.

Таким образом, константа равновесия равна отношению констант скоростей прямой и обратной реакций. Величину, обратную константе равновесия, принято называть субстратной константой, или, в случае ферментативной реакции, константой диссоциации фермент–субстратного комплекса, и обозначать символом K_S. Так, в реакции

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftarrows}} ES, \quad K_s = \frac{[E]\cdot[S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_{+1}},$$

т.е. K_Sравна отношению произведения концентрации фермента и субстрата к концентрации фермент-субстратного комплекса или отношению констант скоростей обратной и прямой реакций. Следует отметить, что константа K_Sзависит от химической природы субстрата и фермента и определяет степень их сродства. Чем ниже значение K_S, тем выше сродство фермента к субстрату.

При изучении кинетики ферментативных реакций следует учитывать одну важную особенность этих реакций (не свойственную обычным химическим реакциям), связанную с явлением насыщения фермента субстратом. При низкой концентрации субстрата зависимость скорости реакции от концентрации субстрата (рисунок кривой) является почти линейной и подчиняется кинетике первого порядка. Это означает, что скорость реакции S —> P прямо пропорциональна концентрации субстрата S и в любой момент времени t определяется следующим кинетическим уравнением:

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = k'[S],$$

где [S] – молярная концентрация субстрата S; –d[S]/dt – скорость убыли субстрата; k' – константа скорости реакции, которая в данном случае имеет размерность, обратную единице времени (мин$^{-1}$ или с$^{-1}$).

При высокой концентрации субстрата скорость реакции максимальна, становится постоянной и не зависящей от концентрации субстрата [S] . В этом случае реакция подчиняется кинетике нулевого порядка v = k" (при полном насыщении фермента субстратом) и целиком определяется концентрацией фермента. Различают, кроме того, реакции второго порядка, скорость которых пропорциональна произведению концентраций двух реагирующих веществ. В определенных условиях при нарушении пропорциональности говорят иногда о реакциях смешанного порядка.

Изучая явление насыщения, Л. Михаэлис и М. Ментен разработали общую теорию ферментативной кинетики. Они исходили из предположения, что ферментативный процесс протекает в виде следующей химической реакции:

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftarrows}} ES \overset{k_{+2}}{\rightarrow} E + P,$$

т.е. фермент E вступает во взаимодействие с субстратом S с образованием промежуточного комплекса ES, который далее распадается на свободный фермент и продукт реакции P. Математическая обработка на основе закона действующих масс дала возможность вывести уравнение, названное в честь авторов уравнением Михаэлиса–Ментен, выражающее количественное соотношение между концентрацией субстрата и скоростью ферментативной реакции:

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_s + [S]},$$

где v – наблюдаемая скорость реакции при данной концентрации субстрата [S]; K_S– константа диссоциации фермент-субстратного комплекса, моль/л; V_{max}– максимальная скорость реакции при полном насыщении фермента субстратом.

Из уравнения Михаэлиса–Ментен следует, что при высокой концентрации субстрата и низком значении K_Sскорость реакции является максимальной, т.е. v = V_{max}(реакция нулевого порядка, см. рис. 4.12). При низкой концентрации субстрата, напротив, скорость реакции оказывается пропорциональной концентрации субстрата в каждый данный момент (реакция первого порядка).

Следует указать, что уравнение Михаэлиса–Ментен в его классическом виде не учитывает влияние на скорость ферментативного процесса продуктов реакции, например в реакции

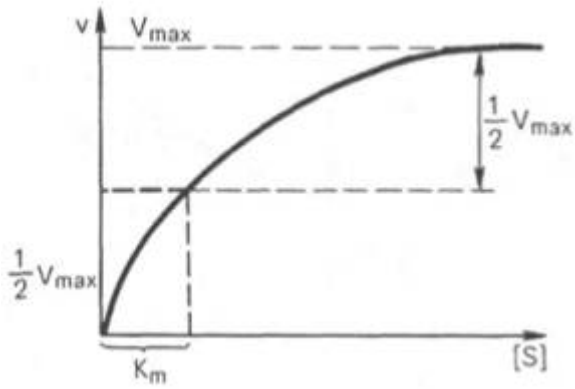
$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftarrows}} ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_{+2}}{\rightleftarrows}} E + P,$$

и носит несколько ограниченный характер. Поэтому были предприняты попытки усовершенствовать его. Так, было предложено уравнение Бриггса-Холдейна:

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]},$$

где K_m представляет собой константу Михаэлиса, являющуюся экспериментально определяемой величиной. Она может быть представлена следующим уравнением:

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}, \quad \text{или} \quad K_m = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} + \frac{k_{+2}}{k_{+1}}.$$



Кривая уравнения Михаэли-са-Ментен: гиперболическая зависимость начальных скоростей катализируемой ферментом реакции от концентрации субстрата.

В числителе представлены константы скоростей распада комплекса ES в двух направлениях (в сторону исходных E и S и в сторону конечных продуктов реакции E и P). Отношение k_{-1}/k_{+1}представляет собой константу диссоциации ферментсубстратного комплекса K_S, тогда:

$$K_m = K_s + \frac{k_{+2}}{k_{+1}}.$$

Отсюда вытекает важное следствие: константа Михаэлиса всегда больше константы диссоциации фермент-субстратного комплекса K_Sна величину

k_{+2}/k_{+1}.

Для определения численного значения K_m обычно находят ту концентрацию субстрата, при которой скорость ферментативной реакции v составляет половину от максимальной V_{max}, т.е. если $v = {}^1/_2\ V_{max}$. Подставляя значение v в уравнение Бриггса–Холдейна, получаем:

$$\frac{V_{max}}{2} = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]},$$

разделив обе части уравнения на V_{max}, получим

$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad \text{или} \quad K_m + [S] = 2[S], \quad \text{откуда} \quad K_m = [S].$$

Таким образом, константа Михаэлиса численно равна концентрации субстрата (моль/л), при которой скорость данной ферментативной реакции составляет половину от максимальной.

Определение величины K_m имеет важное значение при выяснении механизма действия эффекторов на активность ферментов и т.д. Константу Михаэлиса можно вычислить по графику. Отрезок на абсциссе, соответствующий скорости, равной половине максимальной, будет представлять собой K_m.

Пользоваться графиком, построенным в прямых координатах зависимости начальной скорости реакции v_0 от начальной концентрации субстрата $[S_0]$, неудобно, поскольку максимальная скорость V_{max}является в данном случае асимптотической величиной и определяется недостаточно точно.

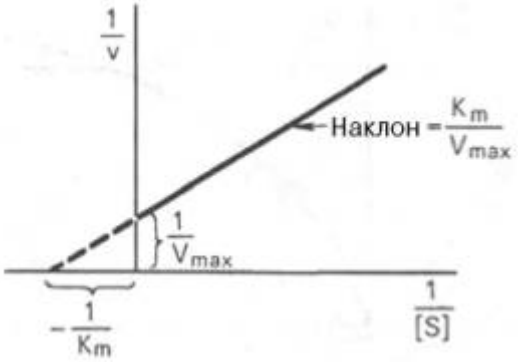


График Лайнуивера-Бэрка.

Для более удобного графического представления экспериментальных данных Г. Лайнуивер и Д. Бэрк преобразовали уравнение Бриггса–Хол-дейна по методу двойных обратных величин исходя из того принципа, что если существует равенство между двумя какими-либо величинами, то и обратные величины также будут равны. В частности, если

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}, \quad \text{то} \quad \frac{1}{v} = \frac{K_m + [S]}{V_{max} \cdot [S]}$$

или

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max} \cdot [S]} + \frac{[S]}{V_{max} \cdot [S]},$$

то после преобразования получаем уравнение:

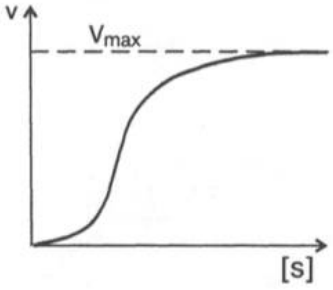
$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max} \cdot [S]} + \frac{1}{V_{max}},$$

которое получило название уравнения Лайнуивера–Бэрка. Это уравнение прямой линии: y = ax + b. Если теперь в соответствии с этим уравнением построить график в координатах 1/v (y) от l/[S] (x), то получим прямую линию, тангенс угла наклона который будет равен величине K_m/V_{max}; отрезок, отсекаемый прямой от оси ординат, представляет собой l/V_{max}(обратная величина максимальной скорости). Если продолжить прямую линию за ось ординат, тогда на абсциссе отсекается отрезок, соответствующий обратной величине константы Михаэлиса – $1/K_m$. Таким образом, величину K_m можно вычислить из данных

наклона прямой и длины отрезка, отсекаемого от оси ординат, или из длины отрезка, отсекаемого от оси абсцисс в области отрицательных значений.

Следует подчеркнуть, что значения V_{max}, как и величину K_m, более точно, чем по графику, построенному в прямых координатах, можно определить по графику, построенному по методу двойных обратных величин. Поэтому данный метод нашел широкое применение в современной энзимологии. Предложены также аналогичные графические способы определения K_m и V_{max}в координатах зависимости v от v/[S] и [S]/v от [S].

Следует отметить некоторые ограничения применения уравнения Михаэлиса–Ментен, обусловленные множественными формами ферментов и аллостерической природой фермента. В этом случае график зависимости начальной скорости реакции от концентрации субстрата (кинетическая



Сигмоидная кинетическая кривая насыщения субстратом.

кривая) имеет не гиперболическую форму, а сигмоидный характер наподобие кривой насыщения гемоглобина кислородом. Это означает, что связывание одной молекулы субстрата в одном каталитическом центре повышает связывание субстрата с другим центром, т.е. имеет место кооперативное взаимодействие, как и в случае присоединения кислорода к 4 субъединицам гемоглобина. Для оценки концентрации субстрата, при которой скорость реакции составляет половину максимальной, в условиях сигмоидного характера кинетической кривой обычно применяют преобразованное уравнение Хилла:

$$\log \frac{v}{V_{max} - v} = n \log [S] - \log K' ,$$

где K' – константа ассоциации; n – число субстратсвязывающих центров.

Различают стационарную, предстационарную и релаксационную кинетику ферментативных реакций.

Стационарная кинетика. В стационарном состоянии по промежуточным соед. ($dX_i/dt = 0$, i = 1, ..., n) и при избытке субстрата $[S]_0 \gg [E]_0$, где $[S]_0$ и $[E]_0$ - начальные концентрации соотв. субстрата и фермента, кинетика процесса характеризуется постоянным, неизменным во времени уровнем концентраций промежут. соед., а выражение для скорости процесса v_0, наз. начальной стационарной скоростью, имеет вид (ур-ние Михаэлиса- Ментен):

$$v_0 = \frac{k_{кат}[E]_0[S]_0}{K_M + [S]_0}, \quad (1)$$

где значения $k_{кат}$ и $K_м$ - ф-ции константы скорости элементарных стадий и заданы ур-нениями:

$$k_{кат} = 1/\sum_{i=2}^{n+1} \frac{1}{k_i}$$

$$K_M = \frac{K_S}{k_1}\left(1/\sum_{i=2}^{n+1} \frac{1}{k_i}\right)$$

Величину $k_{кат}$ наз. эффективной каталитич. константой скорости процесса, параметр $K_м$ - константой Михаэлиса. Значение $k_{кат}$ определяется величинами k_i наиб. медленных стадий каталитич. р-ций и иногда наз. числом оборотов фермента (ферментной системы); $k_{кат}$ характеризует число каталитич. циклов, совершаемых ферментной системой в единицу времени. Наиб. распространены ферменты, имеющие значение $k_{кат}$. для специфич. субстратов в диапазоне 10^2-10^3 $с^{-1}$. Типичные значения константы Михаэлиса лежат в интервале 10^{-3}- 10^{-4} М.

При больших концентрациях субстрата, когда $[S]_0 \gg K_M$, $v \cong k_{кат}[E]_0 = v_{макс}$, т. е. скорость р-ции не зависит от концентрации субстрата и достигает постоянной величины, наз. макс. скоростью. Графически ур-ние Михаэлиса - Ментен представляет собой гиперболу. Его можно линеаризовать, используя метод двойных обратных величин (метод Лайнуи-вера - Берка), т. е. строя зависимость 1/v от $1/[S]_0$, или др. методы. Линейная форма ур-ния (1) имеет вид:

$$1/v = \frac{K_M}{v_{макс}[S]_0} + \frac{1}{v_{макс}}. \quad (2)$$

Она позволяет определить графически значения $K_м$ и $v_{макс}$.

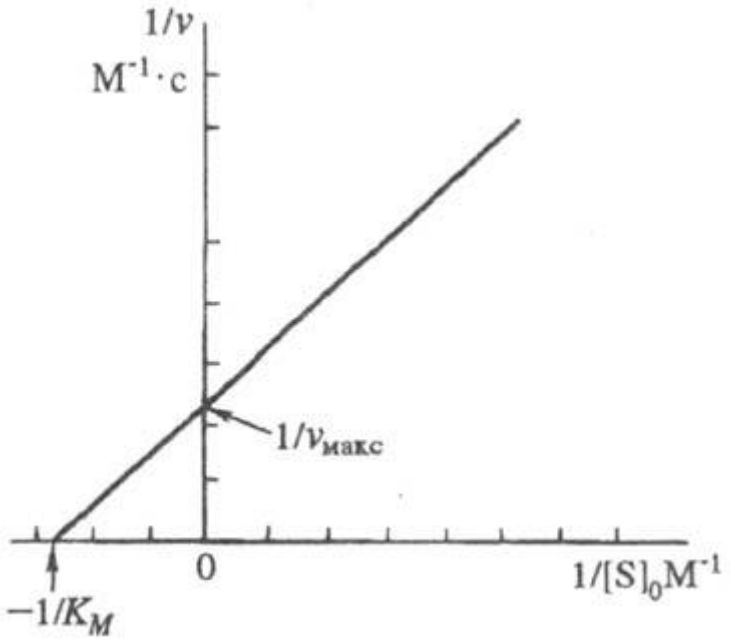


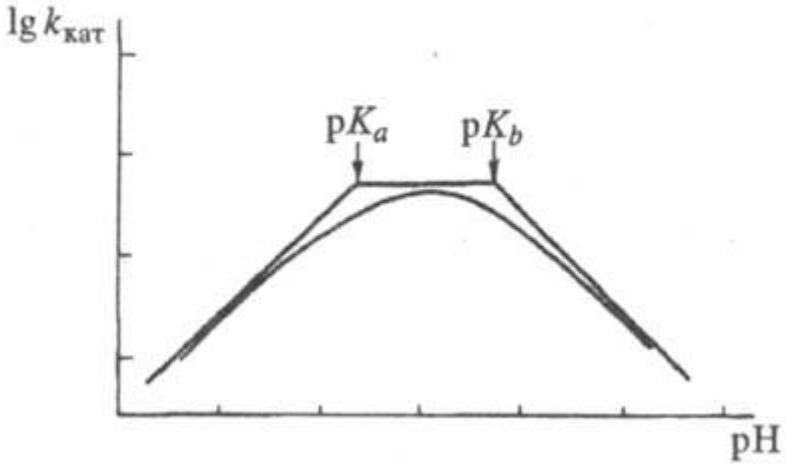
График линейной трансформации ур-ния Михаэлиса - Ментен в двойных обратных величинах (по Лайнуиверу - Берку).

Величина $K_м$ численно равна концентрации субстрата, при к-рой скорость р-ции равна $^1/_2\ v_{макс}$, поэтому $K_м$ часто служит мерой сродства субстрата и фермента, однако это справедливо лишь, если $K_M \simeq K_S$.

Величины $K_м$ и v_m изменяются в зависимости от значений pH. Это связано со способностью участвующих в катализе групп молекулы фермента изменять свое состояние ионизации и, тем самым, свою каталитич. эффективность. В простейшем случае изменение pH приводит к протонированию или депротонированию, по крайней мере, двух ионизирующихся групп фермента, участвующих в катализе. Если при этом только одна форма фермент-субстратного комплекса (напр., ESH) из трех возможных (ES, ESH и ESH_2) способна превращаться в продукт р-ции, то зависимость скорости от pH описывается ф-лой:

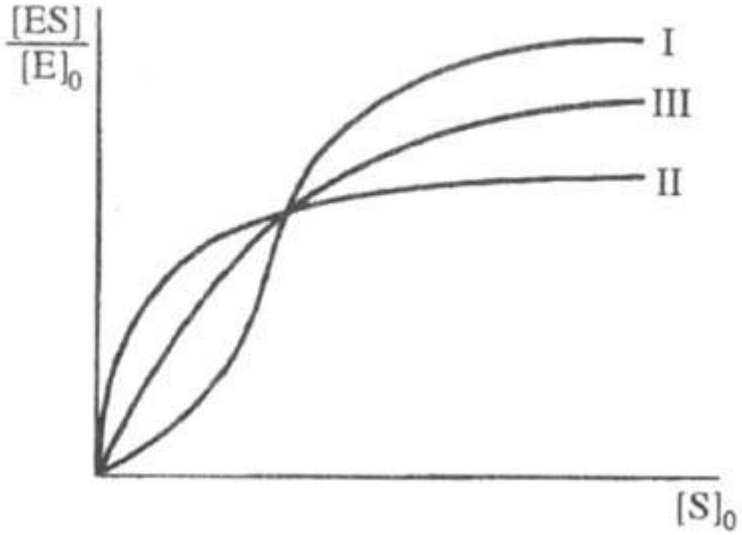
$$v = \frac{(k_{кат}/f')[E]_0[S]_0}{K'_M f/f' + [S]_0},$$

где $f = 1 + [H^+]/K_a + K_b/[H^+]$ и $f' = 1 + [H^+]/K'_a + K'_b/[H^+]$ -т. наз. pH-ф-ции Михаэлиса, а K_a, K_b и K'_a, K'_b- константы ионизации групп a и b соотв. своб. фермента и фермент-субстратного комплекса. В координатах lg $k_{кат}$ - pH эта зависимость представлена на рис. 2, причем тангенсы углов наклона касательных к восходящей, независимой от pH, и нисходящей ветвям кривой должны быть равны соответственно +1, 0 и -1. Из такого графика можно определить значения pK_a групп, участвующих в катализе.



Зависимость каталитич. константы от pH в логарифмич. координатах.

Скорость ферментативной р-ции не всегда подчиняется ур-нию (1). Один из часто встречающихся случаев - участие в р-ции аллостерич. ферментов (см. Регуляторы ферментов), для к-рых зависимость степени насыщения фермента от $[S]_0$ имеет негиперболич. характер (рис. 3). Это явление обусловлено кооперативностью связывания субстрата, т.е. когда связывание субстрата на одном из участков макромолекулы фермента увеличивает (положит. кооперативность) или уменьшает (отрицат. кооперативность) сродство к субстрату др. участка.



Зависимость степени насыщения фермента субстратом от концентрации субстрата при положительной (I) и отрицательной (II) кооперативности, а также в ее отсутствии (III).

Предстационарная кинетика. При быстром смешении р-ров фермента и субстрата в интервале времен 10^{-6}-10^{-1} с можно наблюдать переходные процессы, предшествующие образованию устойчивого стационарного состояния. В этом предстационарном режиме при использовании большого избытка субстрата $([S]_0 \gg [E]_0)$ система дифференц. ур-ний, описывающая кинетику процессов, линейна. Решение данного типа системы линейных дифференц. ур-ний дается суммой экспоненциальных членов. Так, для кинетич. схемы, представленной выше, кинетика накопления продукта имеет вид:

$$[P](t) = \sum_{i=1}^{n} k_{n+1}\frac{A_i}{\lambda_i}(e^{\lambda_i t} - 1) + \frac{k_{n+1}b}{a_n}\cdot t,$$

где A_i-, b, a_n - ф-ции элементарных константы скорости; λ_i-корни соответствующего характеристич. ур-ния.

Величина, обратная λ_i, наз. характеристич. временем процесса:

$$\tau_i = -1/\lambda_i$$

Для р-ции, протекающей с участием n промежут. соед., можно получить n характеристич. времен.

Исследование кинетики ферментативной р-ции в предстационарном режиме позволяет получить представление о детальном механизме каталитич. цикла и определить константы скорости элементарных стадий процесса.

Экспериментально кинетику ферментативной р-ции в предстационарном режиме исследуют с помощью метода остановленной струи (Струевые кинетические методы), позволяющего смешивать компоненты р-ции в течение 1 мс.

Релаксационная кинетика. При быстром возмущающем воздействии на систему (изменение т-ры, давления, электрич. поля) время, к-рое необходимо системе для достижения нового равновесия или стационарного состояния, зависит от скорости процессов, определяющих каталитич. ферментативный цикл.

Система ур-ний, описывающая кинетику процесса, линейна, если смещение от положения равновесия невелико. Решение системы приводит к зависимостям концентраций компонентов разл. стадий процесса в виде суммы экспоненциальных членов, показатели экспонент к-рых имеют характер времен релаксаций. Результатом исследования является спектр времен релаксации, соответствующий числу промежут. соед., участвующих в процессе. Величины времен релаксаций зависят от констант скорости элементарных стадий процессов.

Релаксационные методы кинетики позволяют определить константы скорости отдельных элементарных стадий трансформации интермедиатов. Методы изучения релаксационной кинетики имеют разл. разрешающую способность: поглощение ультразвука - 10^{-6}-10^{-10} с, температурный скачок - $1O^{-4}$-10^{-6} с, метод электрич. импульса - 10^{-4}-10^{-6} с, скачок давления - 10^{-2} с. При исследовании кинетики ферментативных р-ций наиб, применение нашел метод температурного скачка.

Макрокинетика ферментативных процессов. Развитие методов получения гетерогенных катализаторов путем иммобилизации ферментов на разл. носителях (см. Иммобилизованные ферменты)обусловило необходимость анализа кинетики процессов с учетом массопереноса субстрата. Теоретически и экспериментально исследованы закономерности кинетики р-ций с учетом эффектов диффузионного слоя и для систем с внутридиффузионными затруднениями при распределении фермента внутри носителя.

В условиях, когда на кинетику процесса влияет диффузионный перенос субстрата, каталитич. эффективность системы уменьшается. Фактор эффективности ηравен

отношению плотности потока продукта в условиях протекания ферментативной р-ции с диффузионно пониженной концентрацией субстрата к потоку, к-рый мог бы реализоваться в отсутствие диффузионных ограничений. В чисто диффузионной области, когда скорость процесса определяется массопереносом субстрата, фактор эффективности для систем с внешнедиффузи-онным торможением обратно пропорционален диффузионному модулю θ:

$$\eta = \frac{1}{\theta}; \quad \theta = \frac{k_{кат}[E]\, l_d}{K_M D},$$

где l_d - толщина диффузионного слоя, D - коэф. диффузии субстрата.

Для систем с внутридиффузионным торможением в р-циях первого порядка

$$\eta = \frac{\operatorname{th} \Phi_m}{\Phi_m}; \quad \Phi_m = l\sqrt{\frac{k_{кат}[E]}{DK_M}},$$

где $\Phi_т$ - безразмерный модуль (модуль Тиле).

При анализе кинетич. закономерностей в ферментативных реакторах широкое теоретич. и эксперим. развитие получили "идеальные" модели реакторов, проточный безградиентный реактор (проточный реактор идеального перемешивания), проточный реактор с идеальным вытеснением, мембранный реактор.

Кинетика полиферментных процессов. В организме (клетке) ферменты действуют не изолированно, а катализируют цепи трансформации молекул. Р-ции в полиферментных системах с кинетич. точки зрения можно рассматривать как последоват. процессы, специфич. особенностью к-рых является катализ ферментами каждой из стадий:

$$S_1 \xrightarrow[v_1, K_1]{E_1} S_2 \xrightarrow[v_2, K_2]{E_2} \ldots S_i \xrightarrow[v_i, K_i]{E_i} \ldots S_n \xrightarrow[v_n, K_n]{E_n} P,$$

где v_i, K_i - соотв. макс, скорость процесса и константа Михаэлиса i-й стадии р-ции соответственно.

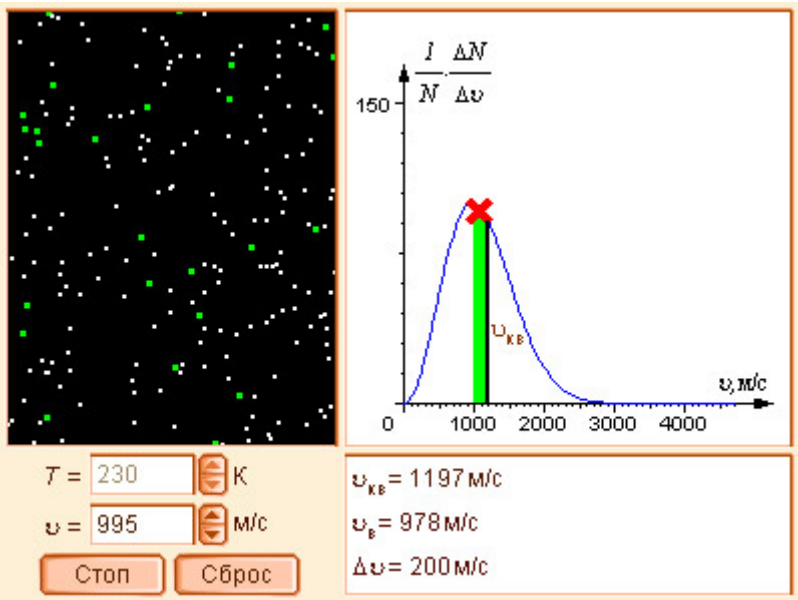
Важная особенность процесса - возможность образования устойчивого стационарного состояния. Условием-его возникновения может служить неравенство $v_i > v_0$, где v_0 - скорость лимитирующей стадии, характеризуемой наименьшей константой скорости и тем самым определяющей скорость всего последоват. процесса. В стационарном состоянии концентрации метаболитов после лимитирующей стадии меньше константы Михаэлиса соответствующего фермента.

Специфич. группу полиферментных систем составляют системы, осуществляющие окислит.-восстановит. р-ции с участием белковых переносчиков электронов. Переносчики образуют специфич. структуры, комплексы с детерминированной последовательностью переноса электрона. Кинетич. описание такого рода систем рассматривает в качестве независимой переменной состояния цепей с разл. степенью заселенности электронами.

Ферментативных реакций кинетику широко используют в исследовательской практике для изучения механизмов действия ферментов и ферментных систем. Практически значимая область науки о ферментах - инженерная энзимология, оперирует понятиями ферментативных реакций кинетики для оптимизации биотехнол. процессов.

Температура и скорость реакции

При фиксированной температуре реакция возможна, если взаимодействующие молекулы обладают определенным запасом энергии. Аррениус эту избыточную энергию назвал ***энергией активации***, а сами молекулы **активированными**.



Распределение Максвелла

По Аррениусу константа скорости k и энергия активации E_a связаны соотношением, получившим название уравнения Аррениуса:

$$k = Ae^{-\frac{E_a}{RT}} \qquad **$$

Здесь A – предэкспоненциальный множитель, R – универсальная газовая постоянная, T – абсолютная температура.

Таким образом, при постоянной температуре скорость реакции определяет E_a. Чем больше E_a, тем меньше число активных молекул и тем медленнее протекает реакция. При уменьшении E_a скорость возрастает, а при $E_a = 0$ реакция протекает мгновенно.

Величина E_a характеризует природу реагирующих веществ и определяется экспериментально из зависимости $k = f(T)$. Записав уравнение (**) в логарифмическом виде и решая его для констант при двух температурах, находим E_a:

$$\ln\frac{k_2}{k_1} = \frac{(T_2 - T_1)}{RT_2 \cdot T_1} E_a.$$

$$E_a = \frac{R T_1 T_2 \ln\left(\frac{k_{T_2}}{k_{T_1}}\right)}{T_2 - T_1}.$$

Если E_a = 50–100 кДж·моль$^{-1}$, то из уравнения Аррениуса следует, что при изменении температуры реакции на 10 градусов ее скорость изменится в 2–4 раза. Это правило было эмпирически установленно Вант-Гоффом:

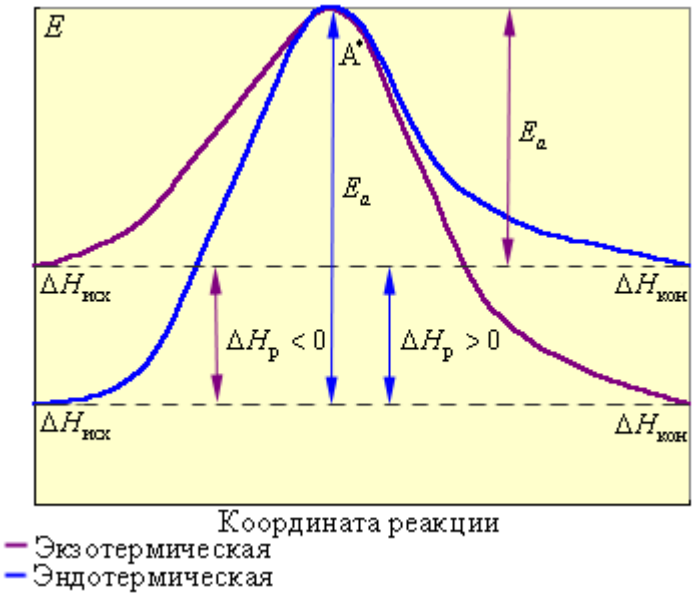
$$\gamma = \frac{k_t \pm 10}{k_t} = \pm(2\text{–}4)$$

$$\frac{k_{t_2}}{k_{t_1}} = \gamma^{(t_2 - t_1)/10}, \qquad \lg\frac{k_{t_2}}{k_{t_1}} = \frac{t_2 - t_1}{10}\lg\gamma.$$

γ – температурный коэффициент скорости химической реакции. Правило Вант-Гоффа имеет ограниченное применение, поскольку величина γ зависит от температуры, а вне области E_a = 50–100 кДж · моль$^{-1}$ это правило вообще не выполняется.

На рис. 5.4 видно, что затрачиваемая на перевод начальных продуктов в активное состояние (A* – активированный комплекс) энергия затем полностью или частично вновь выделяется при переходе к конечным продуктам. Разность энергий начальных и конечных продуктов определяет Δ*H* реакции, которая от энергии активации не зависит.

Таким образом, по пути из исходного состояния в конечное система должна преодолеть энергетический барьер. Только активные молекулы, обладающие в момент столкновения необходимым избытком энергии, равным E_a, могут преодолеть этот барьер и вступить в химическое взаимодействие. С ростом температуры увеличивается доля активных молекул в реакционнной среде.



Реакционный путь экзотермической и эндотермической реакции A + B → D; A* – переходное состояние,

активированный комплекс

Предэкспоненциальный множитель *A* характеризует общее число соударений. Для реакций с простыми молекулами *A* близок к теоретической величине столкновений *Z*, т. е. *A* = *Z*, рассчитываемой из кинетической теории газов. Для сложных молекул *A* ≠ *Z*, поэтому необходимо вводить стерический фактор *P*:

$$A = Z \cdot P.$$

Стерический фактор учитывает то обстоятельство, что для взаимодействия сложных активных молекул необходима определенная взаимная ориентация: течению процессов способствует столкновение молекул в положениях, когда в соприкосновение приходят их реакционноспособные связи или неподеленные пары электронов.

Таким образом, уравнение Аррениуса имеет вид

$$k = Z \cdot P \cdot e^{-E_a/RT}$$

Здесь *Z* – число всех соударений, *P* – доля соударений, благоприятных в пространственном отношении (принимает значения от 0 до 10^{-9}), $e^{-E_a/RT}$ – доля активных, т. е. благоприятных в энергетическом отношении соударений.

Размерность константы скорости получается из соотношения

$$[k] = \frac{[V]}{[c^n]},$$

и, как видно из уравнения Аррениуса, размерность предэкспоненты та же.

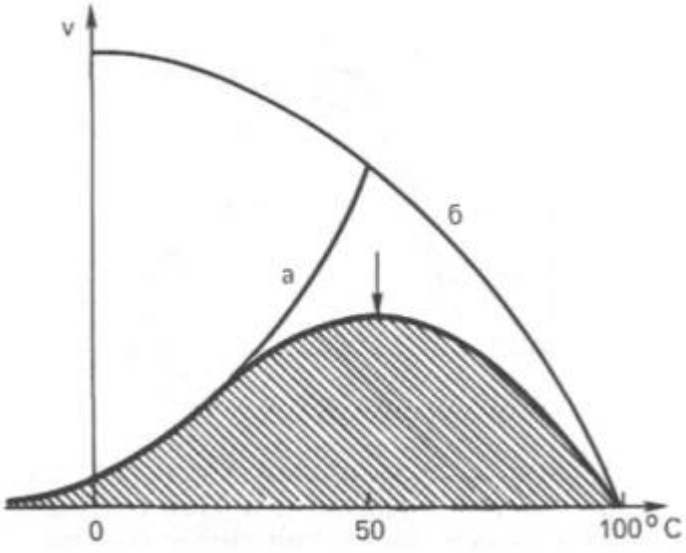
Для *T* = 300 *K* и концентраций, выраженных в моль·л$^{-1}$, *Z* имеет следующие приблизительные значения в реакциях различной молекулярности:

***n* = 1**	***n* = 2**	***n* = 3**
10^{13}–10^{14} с$^{-1}$	10^{11}–10^{12} л·моль$^{-1}$с$^{-1}$	10^{9}–10^{11} л·моль$^{-1}$с$^{-1}$

Анализируя выражение (**), приходим к выводу, что существуют две принципиальные возможности ускорения реакции:
а) увеличение температуры,
б) снижение энергии активации.

К ферментам применимы три основных критерия, характерных и для неорганических катализаторов. В частности, они остаются неизмененными после реакции, т.е. освобождаясь, могут вновь реагировать с новыми молекулами субстрата (хотя нельзя исключить побочных влияний условий среды на активность фермента). Ферменты способны оказывать действие в ничтожно малых концентрациях (например, одна молекула фермента реннина, содержащегося в слизистой оболочке желудка теленка, створаживает около 10^6 молекул казеиногена молока за 10 мин при температуре 37°С). Наличие либо отсутствие фермента или любого другого катализатора не оказывает влияния на величину константы равновесия и свободной энергии (ΔG). Катализаторы лишь повышают скорость, с которой система приближается к термодинамическому равновесию, не сдвигая точки равновесия. Химические реакции с высокой константой равновесия и отрицательной величиной ΔG принято называть экзергоническими. Реакции

с низкой константой равновесия и соответственно положительной величиной ΔG (они обычно не протекают спонтанно) называются эндергоническими. Для начала и завершения этих реакций необходим приток энергии извне. В живых системах экзергонические процессы обычно сопряжены с эндергоническими реакциями, обеспечивая последние необходимым количеством энергии.



Зависимость скорости катализируемой ферментом реакции от температуры.

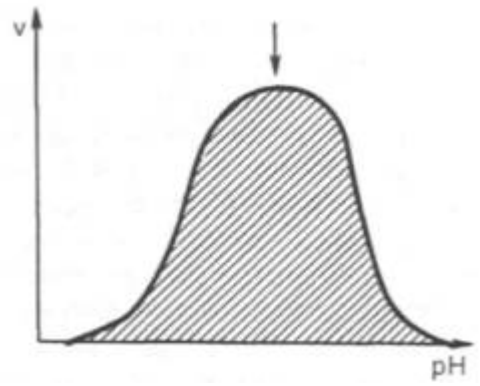
а - повышение скорости реакции как функция температуры; б - снижение скорости реакции как функция денатурации белка-фермента; стрелка указывает оптимум температуры.

Ферменты, являясь белками, обладают рядом характерных для этого класса органических соединений свойств, отличающихся от свойств неорганических катализаторов.

Термолабильность ферментов. Скорость химических реакций зависит от температуры, поэтому катализируемые ферментами реакции также чувствительны к изменениям температуры. Установлено, что скорость большинства биохимических реакций повышается в 2 раза при повышении температуры на 10°С и, наоборот, снижается в 2 раза при понижении температуры на 10°С. Этот показатель получил название температурного коэффициента. Однако вследствие белковой природы фермента тепловая денатурация при повышении температуры будет снижать эффективную концентрацию фермента с соответствующим снижением скорости реакции. Так, при температуре, не превышающей 45–50°С, скорость реакции увеличивается согласно теории химической кинетики. При температуре выше 50°С на скорость реакции большое влияние начинает оказывать тепловая денатурация белка-фермента, приводящая к полному прекращению ферментативного процесса.

Таким образом, термолабильность, или чувствительность к повышению температуры, является одним из характерных свойств ферментов, резко отличающих их от неорганических катализаторов. В присутствии последних скорость реакции возрастает экспоненциально при повышении температуры (см. кривую «а» на рис). При температуре 100°С почти все ферменты утрачивают свою активность (исключение составляет, очевидно, только один фермент мышечной ткани – миокиназа, которая выдерживает нагревание до 100°С). Оптимальной для действия большинства ферментов теплокровных животных является температура 40°С; в этих условиях скорость реакции оказывается

максимальной вследствие увеличения кинетической энергии реагирующих молекул. При низких температурах (0°С и ниже) ферменты, как правило, не разрушаются, хотя активность их падает почти до нуля. Во всех случаях имеет значение время воздействия соответствующей температуры. В настоящее время для пепсина, трипсина и ряда других ферментов доказано существование прямой зависимости



Зависимость скорости катализируемой ферментом реакции от pH (стрелка указывает оптимум pH).

между скоростью инактивации фермента и степенью денатурации белка. Следует отметить, что на термолабильность ферментов определенное влияние оказывает концентрация субстрата, pH среды и другие факторы. **Зависимость активности ферментов от pH среды.** Ферменты обычно наиболее активны в пределах узкой зоны концентрации водородных ионов, соответствующей для животных тканей в основном выработанным в процессе эволюции физиологическим значениям pH среды 6,0–8,0. При графическом изображении на кривой колоколообразной формы имеется определенная точка, в которой фермент проявляет максимальную активность; эту точку называют оптимумом pH среды для действия данного фермента. При определении зависимости активности фермента от концентрации водородных ионов реакцию проводят при разных значениях pH среды, обычно при оптимальной температуре и наличии достаточно высоких (насыщающих) концентраций субстрата. В табл. 4.3 приводятся оптимальные значения pH среды для ряда ферментов.

Таблица 4.3. **Оптимальные значения pH для некоторых ферментов**

Фермент	pH	Фермент	pH
Пепсин	1,5–2,5	Каталаза	6,8–7,0
Катепсин В	4,5–5,0	Уреаза	7,0–7,2
Амилаза из солода	4,9–5,2	Липаза панкреатическая	7,0–8,5
Сахараза кишечная	5,8–6,2	Трипсин	7,5–8,5
Амилаза слюны	6,8–7,0	Аргиназа	9,5–10,0

Из данных табл. 4.3 видно, что pH-оптимум действия ферментов лежит в пределах физиологических значений. Исключение составляют пепсин, pH-оптимум которого 2,0 (при pH 6,0 он не активен и не стабилен). Объясняется это, во-первых, структурной организацией молекулы фермента и, во-вторых, тем, что пепсин является компонентом желудочного сока, содержащего свободную соляную кислоту, которая создает оптимальную кислую среду для действия этого фермента. С другой стороны, pH-оптимум

аргиназы лежит в сильнощелочной зоне (около 10,0); такой среды нет в клетках печени, следовательно, in vivo аргиназа функционирует, по-видимому, не в своей оптимальной зоне pH среды.

Согласно современным представлениям, влияние изменений pH среды на молекулу фермента заключается в воздействии на состояние и степень ионизации кислотных и основных групп (в частности, COOH-группы дикар-боновых аминокислот, SH-группы цистеина, имидазольного азота гисти-дина, NH_2-группы лизина и др.). При резких сдвигах от оптимума pH среды ферменты могут подвергаться конформационным изменениям, приводящим к потере активности вследствие денатурации или изменения заряда молекулы фермента. При разных значениях pH среды активный центр может находиться в частично ионизированной или неионизированной форме, что сказывается на третичной структуре белка и соответственно на формировании активного фермент-субстратного комплекса. Имеет значение, кроме того, состояние ионизации субстратов и кофакторов.

Специфичность ферментов. Ферменты обладают высокой специфичностью действия. Это свойство часто существенно отличает их от неорганических катализаторов. Так, мелкоизмельченные платина и палладий могут катализировать восстановление (с участием молекулярного водорода) десятков тысяч химических соединений различной структуры. Высокая специфичность ферментов обусловлена, как было отмечено, конформационной и электростатической комплементарностью между молекулами субстрата и фермента и уникальной структурной организацией активного центра, обеспечивающими «узнавание», высокое сродство и избирательность протекания одной какой-либо реакции из тысячи других химических реакций, осуществляющихся одновременно в живых клетках.

В зависимости от механизма действия различают ферменты с относительной (или групповой) и абсолютной специфичностью. Так, для действия некоторых гидролитических ферментов наибольшее значение имеет тип химической связи в молекуле субстрата. Например, пепсин в одинаковой степени расщепляет белки животного и растительного происхождения, несмотря на то что эти белки существенно отличаются друг от друга как по химическому строению и аминокислотному составу, так и по физико-химическим свойствам. Однако пепсин не расщепляет ни углеводы, ни жиры. Объясняется это тем, что точкой приложения, местом действия пепсина является пептидная —CO—NH-связь. Для действия липазы, катализирующей гидролиз жиров на глицерин и жирные кислоты, подобным местом является сложноэфирная связь. Аналогичной групповой специфичностью обладают трипсин, химотрипсин, пептидазы, ферменты, гидроли-зующие α-гликозидные связи (но не β-гликозидные связи, имеющиеся в целлюлозе) в полисахаридах, и др. Обычно эти ферменты участвуют в процессе пищеварения, и их групповая специфичность, вероятнее всего, имеет определенный биологический смысл. Относительной специфичностью наделены также некоторые внутриклеточные ферменты, например гексокиназа, катализирующая в присутствии АТФ фосфорилирование почти всех гексоз, хотя одновременно в клетках имеются и специфические для каждой гексозы ферменты, выполняющие такое же фосфорилирование.

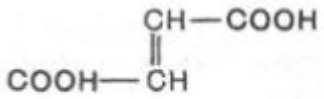
Абсолютной специфичностью действия называют способность фермента катализировать превращение только единственного субстрата. Любые изменения (модификации) в структуре субстрата делают его недоступным для действия фермента. Примерами таких ферментов могут служить аргиназа, расщепляющая в естественных условиях (в организме) аргинин, уреаза, катализирующая распад мочевины, и др.

Имеются экспериментальные доказательства существования так называемой стереохимической специфичности, обусловленной существованием оптически изомерных L- и D-форм или геометрических (цис-и транс-) изомеров химических веществ. Так, известны оксидазы L- и D-аминокислот, хотя в природных белках обнаружены только L-ами-нокислоты. Каждый из видов оксидаз действует только на свой специфический стереоизомер.

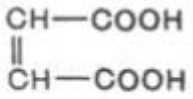
$$\text{L-аминокислота} \xrightarrow[\text{Оксидаза L-аминокислот}]{+{}^{1}/_{2}O_2} \alpha\text{-Кетокислота} + NH_3 + H_2O;$$

$$\text{D-аминокислота} \xrightarrow[\text{Оксидаза D-аминокислот}]{+{}^{1}/_{2}O_2} \alpha\text{-Кетокислота} + NH_3 + H_2O.$$

Наглядным примером стереохимической специфичности является бактериальная аспартатдекарбоксилаза, катализирующая отщепление CO_2 только от L-аспарагиновой кислоты с превращением ее в L-аланин. Сте-реоспецифичность проявляют ферменты, катализирующие и синтетические реакции. Так, из аммиака и α-кетоглутарата во всех живых организмах синтезируется L-изомер глутаминовой кислоты, входящей в состав природных белков. Если какое-либо соединение существует в форме цис-и транс-изомеров с различным расположением групп атомов вокруг двойной связи, то, как правило, только один из этих геометрических изомеров может служить в качестве субстрата для действия фермента. Например, фумараза катализирует превращение только фумаровой кислоты (трансизомер), но не действует на малеиновую кислоту (цис-изомер):



Фумаровая кислота



Малеиновая кислота

Таким образом, благодаря высокой специфичности действия ферменты обеспечивают протекание с большой скоростью лишь определенных химических реакций из огромного разнообразия возможных превращений в микропространстве клеток и целостном организме, регулируя тем самым интенсивность обмена веществ.