

ЭНЗИМОЛОГИЯ

Методическое руководство

СОДЕРЖАНИЕ

Раздел 1. Структура и функции белков и ферментов	3
Раздел 2. Химическая кинетика	14
Раздел 3. Термодинамика ферментативного катализа	33
Раздел 4. Кинетика ферментативного катализа	40
Раздел 5. Ингибиторы ферментов	78
Раздел 6. Особенности ферментативной кинетики мембранных белков	84

Раздел 1. Структура и функции белков и ферментов

Энзимология. Основная цель исследований - изучение химических основ биологических процессов живых систем, интеграция химии, биологии, химической кинетики, химической технологии, молекулярных аспектов ферментативного катализа, термодинамики биологических процессов. Ключевое место в развитии современной биомолекулярной химии и технологии занимают ферменты (энзимы) – белковые катализаторы различных процессов.

В курсе энзимологии – науки о ферментах – мы будем изучать молекулярные и кинетические аспекты ферментативного катализа и биотехнологические процессы на их основе. Развитие биотехнологии и генетической инженерии сделало возможным получение и производство ферментов с новыми свойствами в неограниченных количествах.

Аминокислоты. Пептиды.

Аминокислоты. Основой биополимерной цепи, формирующей белки и ферменты, являются α -аминокислоты. В природе известно более 500 аминокислот, однако белки формируются из 20 α -аминокислот. Белки, это биологические гетерополимеры, мономерами которых являются различные аминокислоты.

$\text{NH}_2 - \text{CH}(\text{R}) - \text{COOH}$

В зависимости от вида радикала R основные аминокислоты делят на три группы:

- 1) неполярные (аланин, метионин, валин, пролин, лейцин, изолейцин, триптофан, фенилаланин);
- 2) полярные незаряженные (аспарагин, глутамин, серин, глицин, тирозин, треонин, цистеин);
- 3) полярные заряженные (аргинин, гистидин, лизин — положительно; аспарагиновая и глутаминовая кислоты — отрицательно).

Боковые цепи аминокислот (радикал) могут быть гидрофобными или гидрофильными. У растений все необходимые аминокислоты синтезируются из первичных продуктов фотосинтеза. Человек и животные не способны синтезировать ряд протеиногенных аминокислот и должны получать их в готовом виде вместе с пищей. Такие аминокислоты называются незаменимыми (20 аминокислот). К ним относятся: лизин, валин, лейцин, изолейцин, треонин, фенилаланин, триптофан, метионин; аргинин и гистидин. Для человека абсолютно незаменимыми являются лизин, фенилаланин, триптофан. В растворе аминокислоты могут выступать в роли, как кислот, так и оснований, т. е. они являются амфотерными соединениями ($\text{NH}_2 - \text{CH}(\text{R}) - \text{COOH}$). Очень чувствительны к pH.

Все аминокислоты, за исключением глицина $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, имеют хиральный (оптически активный) атом в α -положении $\text{NH}_2 - \text{C}^*\text{H}(\text{R}) - \text{COOH}$. Все природные аминокислоты в белках представлены левовращающим L-стереоизомером.

Реакция синтеза белков является реакцией поликонденсации, при которой образуются амидные (пептидные) связи между карбоксильной группой и аминогруппой аминокислоты. Реакция образования пептидной связи обратима. Константа равновесия K может быть вычислена на основании свободной энергии ΔG реакции образования пептидной связи.

$$K = \exp[\Delta G^\circ / (RT)]$$

Если $\Delta G > 0$, то реакция не может протекать сама. В качестве примера стандартная свободная энергия для образования глицилглицина $\Delta G^\circ = 18 \text{ кДж/моль}$.

В соответствии с принципами химической термодинамики процесс протекает самопроизвольно, если свободная энергия реакции отрицательно. Поэтому реальный синтез белков в биосистемах идет с одновременным расходом АТФ.

$\text{АТФ} + \text{H}_2\text{O} = \text{АДФ} + \text{H}_3\text{PO}_4$, $\Delta G^\circ = -34 \text{ кДж/моль}$

Разнообразие белковых структур колоссально, $N=20^n$, где N – число возможных вариантов структур в белке, n – число аминокислот в белке.

Для белка, состоящего из 100 аминокислот, число возможных структур равно $20^{100} = 10^{130}$

Для сравнения: число нуклонов (протонов и нейтронов) во Вселенной составляет 10^{80} , что в 10^{50} меньше.

Химическая модификация аминокислот белков используется для идентификации функциональных групп активных центров, а также для «сшивания» с различными носителями, получения конъюгатов белков, получения биочипов и биосенсоров для проведения инструментальных исследований и т.п.

Первичная структура белка записана в молекулах ДНК в виде последовательности тринуклеотидных фрагментов – кодонов. При этом из 4 гетероциклических оснований может быть составлено 64 сочетания для 20 аминокислот, т.е. код является вырожденным (одной аминокислоте соответствует несколько кодонов). Первичная структура — последовательность аминокислот в полипептидной цепи. Важными особенностями первичной структуры являются консервативные домены – сочетания аминокислот, важных для функции белка. Консервативные мотивы сохраняются в процессе эволюции видов, по ним можно предсказать функцию неизвестного белка.

Лейцин, серин, аргинин имеют 6 кодонов, а триптофан и метионин – один кодон.

Наиболее распространенной в природе аминокислотой является :

1. лейцин - среднее содержание в биологическом мире 9,5%,
2. аланин – 7,6%,
3. серин - 7,1%.

Наиболее редкая аминокислота – триптофан 1.2 %

Пептиды.

Аминогруппа одной аминокислоты способна вступать в реакцию с карбоксильной группой другой аминокислоты, образуемая при этом молекула представляет собой дипептид, а связь $-\text{CO}-\text{NH}-$ называется пептидной связью: на одном конце молекулы дипептида находится свободная аминогруппа, а на другом — свободная карбоксильная группа. Благодаря этому дипептид может присоединять к себе другие аминокислоты, образуя олигопептиды. Если таким образом соединяется много аминокислот (более десяти), то получается полипептид.

Пептиды играют важную роль в организме. Многие олиго- и полипептиды являются гормонами, антибиотиками, токсинами. К олигопептидам относятся окситоцин, вазопрессин, тиреотропин, а также брадикинин (пептид боли) и некоторые опиаты («естественные наркотики» человека), выполняющие функцию обезболивания. К олигопептидам относятся и некоторые антибиотики (например, грамицидин S).

Многие гормоны (инсулин, адренкортикотропный гормон и др.), антибиотики (например, грамицидин А), токсины (например, дифтерийный токсин) являются полипептидами.

Белки. Структура белков.

Строение белков. Основой белка является полипептидная цепь (первичная структура), в которой аминокислоты связаны ковалентной амидной (пептидной) связью.

Белки представляют собой полипептиды, в молекулу которых входит от пятидесяти до нескольких тысяч аминокислот с относительной молекулярной массой свыше 10 000.

Вторичная структура – укладка полипептидных цепей в регулярные элементы типа α -спиралей и β -листов (β -складчатая структура), стабилизированных водородными связями. Помимо регулярных вторичных структур типа α -спиралей и β -листов белки содержат

нерегулярные элементы, такие как петли, связывающие α -спирали и β -листы. Полная классификация белков по вторичной структуре представлена в базах данных Dai/FSSP, CATH, SCOP).

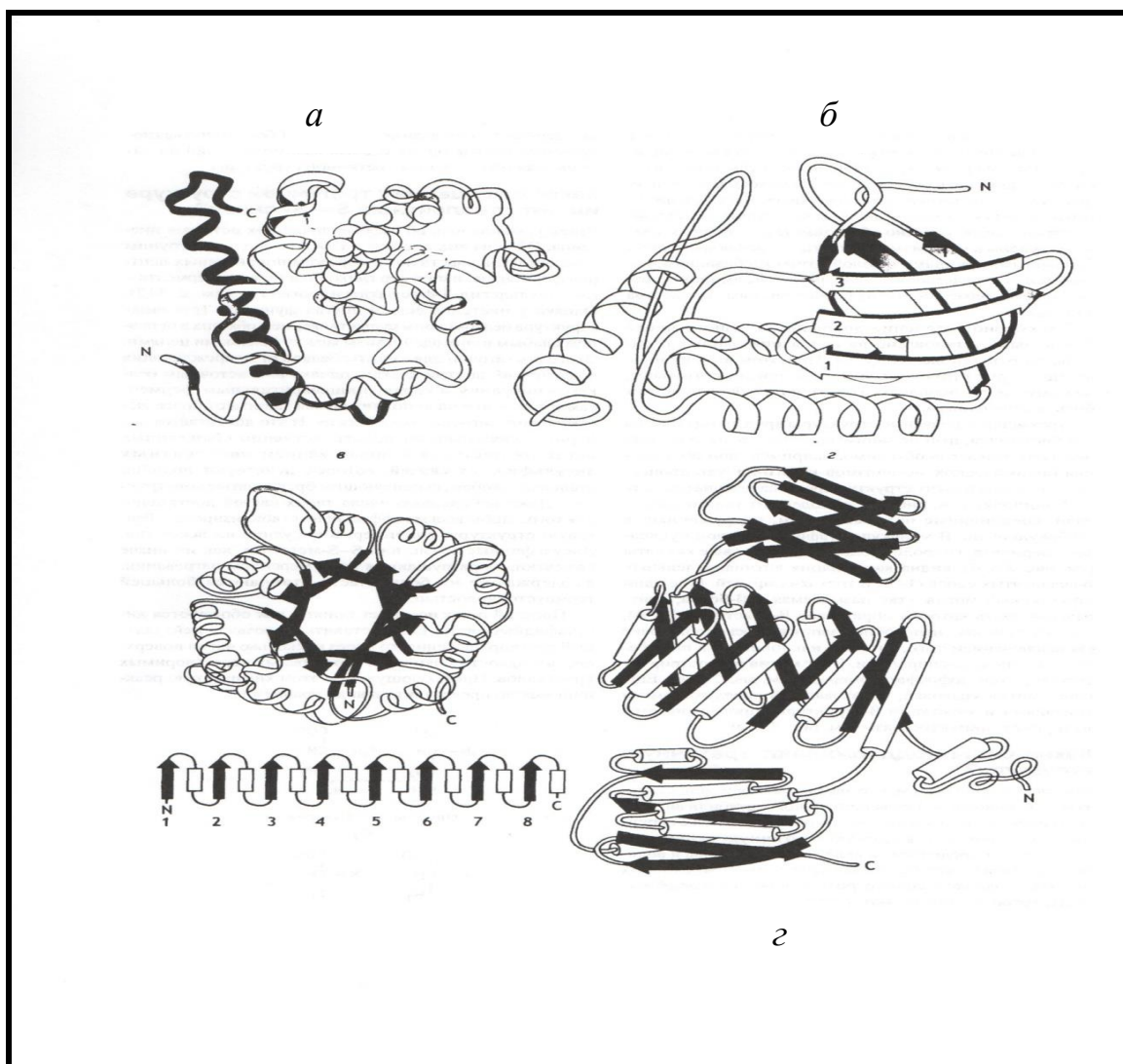


Рис.1. Строение различных белков. а – миоглобин, в центре которого расположен гем, б – триозофосфатизомераза, г – пируваткиназа.

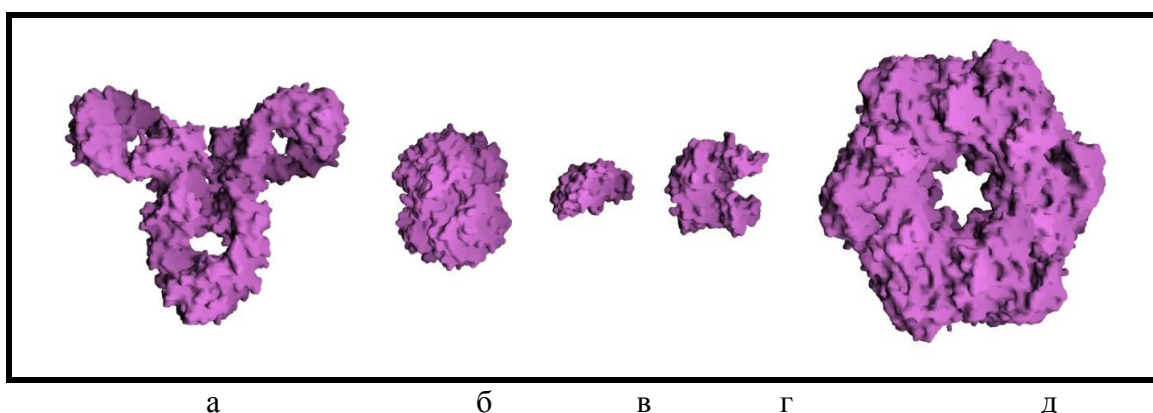


Рис.2. Сравнительный размер белков: а – антитело (IgG), б - гемоглобин, в – инсулин, г - аденилаткиназа (фермент), д - глютаминсинтетаза (фермент).

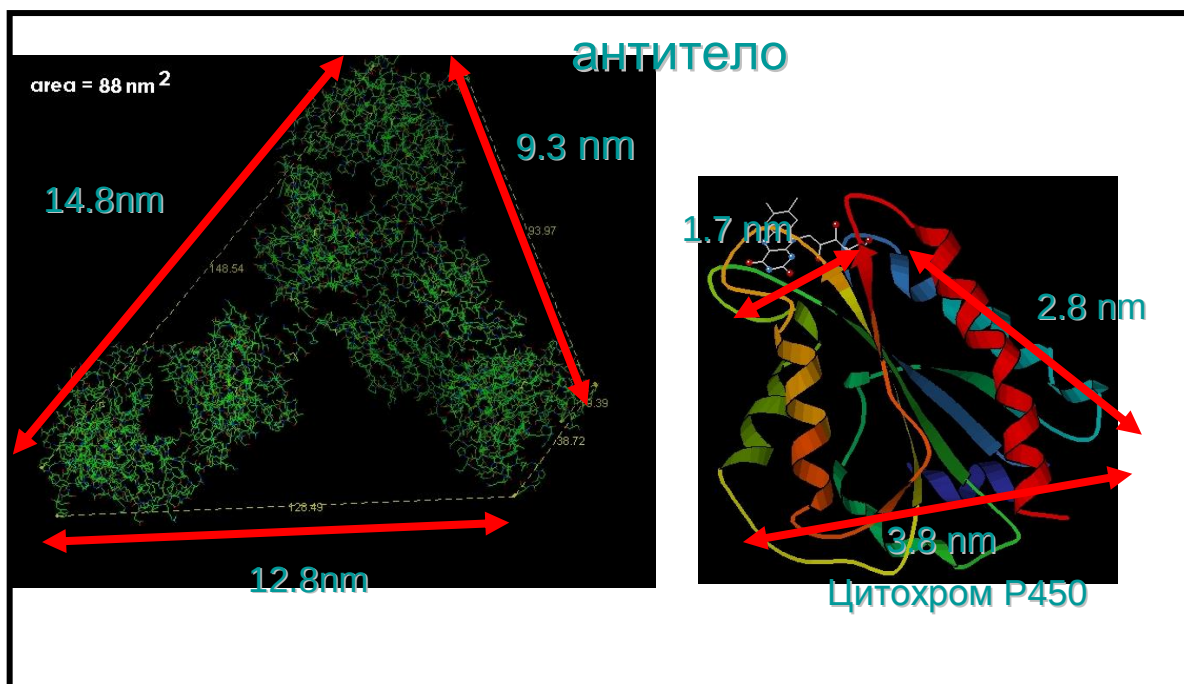


Рис.3 Сравнительные размеры белков.

Структурная химия белков.

Базисным положением структурной химии белка является представление о том, что последовательность аминокислот полипептидной цепи (первичная структура) определяет все последующие структуры в иерархии, включая структуру активного центра фермента, а также возможность образования компактной функционально значимой структуры и комплексов с другими белковыми молекулами или биологической мембраной.

Первичная структура стабилизирована ковалентными пептидными (амидными) связями.

В настоящее время в Интернете находятся несколько баз данных и программ.

1. Поиск гомологичных белков, обладающих близкой первичной структурой (программа BLAST).

2. База данных SWISS-PROT.

3. База данных HSSP (<http://www.san.der.embl-heidelberg.de/hsspl>)

Вторичная структура белков.

α - Спирали и β -структуры (складки или листы) стабилизированы водородными связями. Водородные связи образуются между атомом кислорода и одной и атомом азота другой аминокислоты, отстоящей от первой на четыре аминокислотных остатка

-NH-CH(R)-C(O)- NH-CH(R)-C(O)- NH-CH(R)-C(O)- NH-CH(R)-C(O)-NH

1

2

3

4

α - Спираль закручивается против часовой стрелки. Структура белковой молекулы может быть стабилизирована дисульфидными связями (-S-S-)

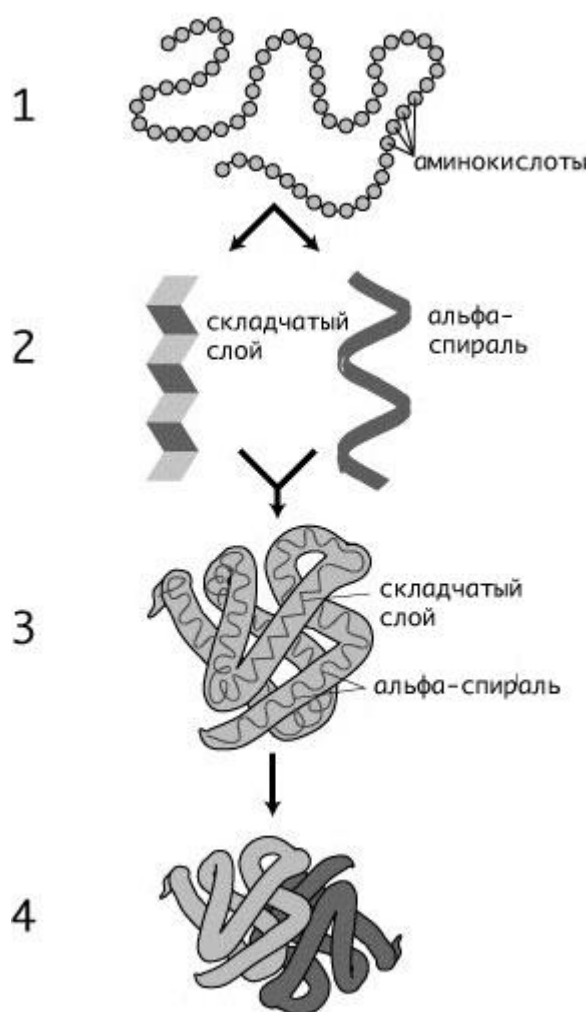
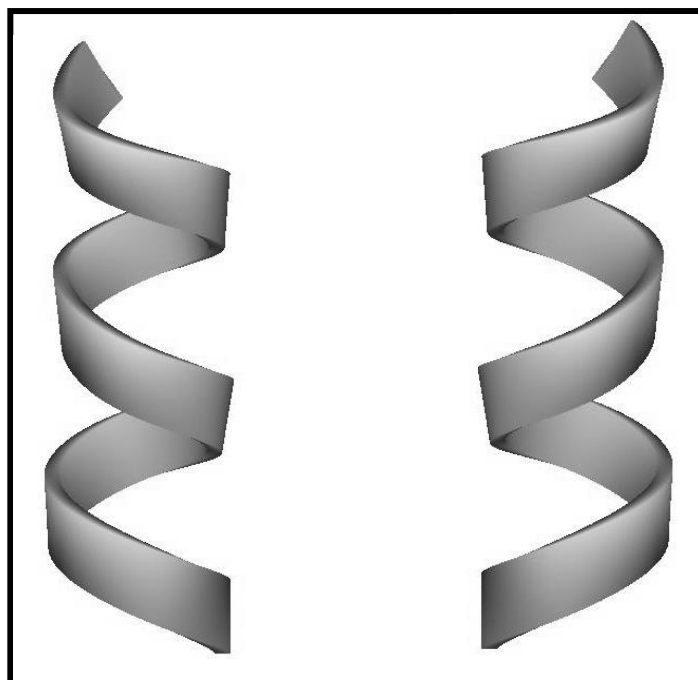


Рис.4 Сравнение структур белка. 1-первичная структура, 2- вторичная структура, 3- третичная структура, 4-четвертичная структура.

Вторичная структура — локальное упорядочивание фрагмента полипептидной цепи, стабилизированное водородными связями и гидрофобными взаимодействиями.

α -спирали — плотные витки вокруг длинной оси молекулы, один виток составляют 4 аминокислотных остатка, спираль стабилизирована водородными связями между Н и О пептидных групп, отстоящих друг от друга на 4 звена. Спираль построена исключительно из одного типа стереоизомеров аминокислот (L), хотя она может быть как левозакрученной, так и правозакрученной, в белках преобладает правозакрученная. Спираль нарушают электростатические взаимодействия глутаминовой кислоты, лизина, аргинина, близкорасположенные аспарагин, серин, треонин и лейцин могут стерически мешать образованию спирали, пролин вызывает изгиб цепи и также нарушает α -спирали.

Термин « α -спираль» был введен Л. Полингом, открывшим укладку пептидной цепи в виде правосторонней спирали в белке α -кератине. β -листы (складчатые слои) — несколько зигзагообразных полипептидных цепей, в которых водородные связи образуются между относительно удалёнными друг от друга в первичной структуре аминокислотами или разными цепями белка, а не близко расположенными, как имеет место в α -спирали. Эти цепи обычно направлены N-концами в противоположные стороны (антипараллельная ориентация). Для образования β -листов важны небольшие размеры R-групп аминокислот, преобладают обычно глицин и аланин.



Левосторонняя спираль

Правосторонняя спираль

Рис.5 схематическое изображение левосторонней и правосторонней спиралей в биохимии. Третичная и четвертичная структура белков.

Третичная структура белка - это расположение его полипептидной цепи в пространстве, способ компактизации белковой молекулы. Процесс укладки белковой молекулы называется фолдингом. В фолдинге могут принимать участие белки-шапероны. Шапероны – многокомпонентная система, обеспечивающая правильное сворачивание (фолдинг) полипептидной цепи в белке. Третичная структура стабилизирована ионными, водородными и гидрофобными связями, а также ковалентными дисульфидными связями. Многие белки образуют комплексы между субъединицами, образуя четвертичную структуру. В образовании комплексов большую роль играют электростатические (кулоновские) взаимодействия противоположно заряженных части (ионные взаимодействия), водородные связи, гидрофобные взаимодействия. Большинство белков свернуто в глобулы. Такие глобулы устойчивы в водных системах, т.к. их полярные группы находятся на поверхности в контакте с водой, а неполярные обращены вглубь молекулы таким образом, что их соприкосновение с водой сведено к минимуму.

Четвертичная структура белков. К числу олигомерных белков относится гемоглобин (2 идентичные α - и 2 идентичные β -субъединицы), аллостерически регулируемые ферменты, цитохромы P450 2B4 (гексамер).

Приставка «алло» означает другой. Низкомолекулярные соединения, связываемые белком (часто это не субстраты), называют лигандами. Лиганды, связывающиеся с аллостерическими участками, называются аллостерическими регуляторами или эффекторами. Связывание эффектора отражается на сродстве к субстрату.

Внутри- и межмолекулярные связи в белках (по силе взаимодействий):

1. Ковалентные пептидные связи (первичная структура).
2. Электростатические взаимодействия (вторичная, третичная и четвертичная структура).
3. Водородные связи (вторичная, третичная и четвертичная структура).
4. Гидрофобные взаимодействия (третичная и четвертичная структура).

При исследовании белок-белковых взаимодействий необходимо выяснить характер взаимодействий.

Для этого можно изменять условия: ионную силу, pH, полярность растворителя.

Структурная биохимия. По составу белки разделяют на два основных класса:

1. Простые белки дают при гидролизе только аминокислоты. Они содержат 50% C, 7% H, 23% O, 16% N, 0-3% S.
2. Сложные белки при гидролизе дают кроме аминокислот и другие продукты. Небелковую часть молекулы сложных белков называют простетической группой.

Белки в обмене веществ. Большинство микроорганизмов и растений могут синтезировать 20 стандартных аминокислот, а также дополнительные (нестандартные) аминокислоты, например, цитрулин. Но если аминокислоты есть в окружающей среде, даже микроорганизмы сохраняют энергию путём транспорта аминокислот внутрь клеток и выключения их биосинтетических путей.

Аминокислоты, которые не могут быть синтезированы животными, называются незаменимыми. Основные ферменты в биосинтетических путях, например, аспараткиназа, которая катализирует первый этап в образовании лизина, метионина и треонина из аспартата, отсутствуют у животных.

Животные, в основном, получают аминокислоты из белков, содержащихся в пище. Белки разрушаются в процессе пищеварения, который обычно начинается с денатурации белка путём помещения его в кислотную среду и гидролиза с помощью ферментов, называемых протеазами. Некоторые аминокислоты, полученные в результате пищеварения, используются для синтеза белков организма, а остальные превращаются в глюкозу в процессе глюконеогенеза или используются в цикле Кребса. Использование белка в качестве источника энергии особенно важно в условиях голодания, когда собственные белки организма, в особенности мускулов, служат источником энергии. Аминокислоты также являются важным источником азота и служат предшественниками ряда других азотистых соединений. Участвуют в синтезе гема, синтезе пуринов, синтезе креатина.

Многие белки содержат аминокислоты, модифицированные для выполнения определенной функции, например для связывания кальция.

Белок-белковые комплексы

Взаимодействия белковых молекул (белок-белковые взаимодействия) имеют основополагающее значение для ряда важнейших процессов, происходящих в клетках живых организмов. В соответствии с принятой в настоящий момент точкой зрения, для того, что белки смогли выполнить возложенные на них функции, им необходимо принять соответствующую трёхмерную структуру.

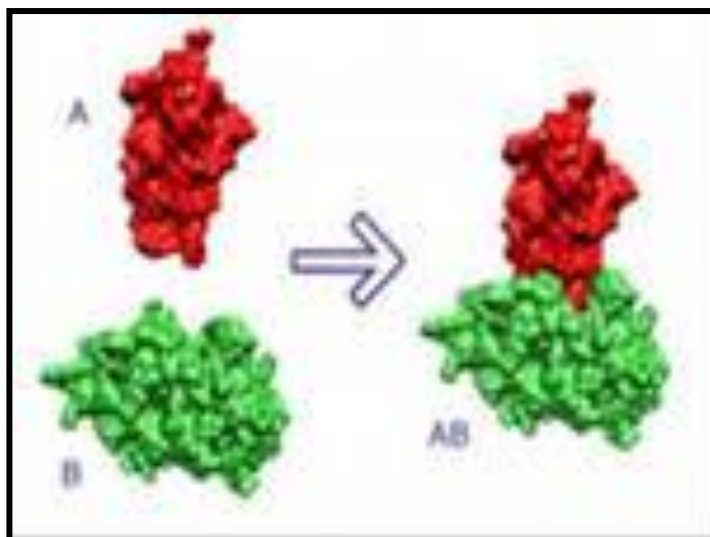


Рис.6 Белок-белковое взаимодействие.

Примером функционально-значимых белок-белковых взаимодействий является взаимодействие белков в системе:

- цитохром P450 (гемопроtein)
- НАДН-зависимая редуктаза (флавопротеин)
- цитохром b5 (гемопроtein).

Цитохромы P450 участвуют в метаболизме лекарственных препаратов, чужеродных соединений, попадающих в организм; в синтезе гормонов, простагландинов. Для функционирования этой системы необходимо образование продуктивного тройного комплекса этих белков.

Белок-белковые взаимодействия в комплексе ферментов фазы карбоксилирования, выделенном из листьев *Beta vulgaris*.

Образованна тремя ферментами фазы карбоксилирования цикла Кальвина - Бенсона:

- рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазой (РБФК/О),
- рибулофосфатизомеразой (РФИ) и
- фосфорибулокиназой (ФРК), в строме хлоропластов

Для исследования природы связей, стабилизирующих белковые комплексы, используют методы исследования структуры белков, а также химические и генетические модификации белков

- Рентгеноструктурный анализ
- Спектроскопия ядерного магнитного резонанса.
- Атомная силовая микроскопия
- Масс-спектрометрия
- Поверхностный плазмонный резонанс
- Спектроскопия, флуоресценция
- Биоинформационные методы
- Молекулярная динамика

Белок-белковые взаимодействия лежат в основе большинства биологических процессов, и роль их наиболее многообразна у многоклеточных организмов. Сложность этих взаимодействий часто графически представляют в виде карт, где каждая точка соответствует одному белку, а каждая линия — межбелковому взаимодействию.

Примеры белок-белковых взаимодействий. Прионы

Во второй половине 90-х годов, когда была определена аминокислотная последовательность PrP и выявлен ген Prnp, начались интенсивные поиски причин патогенности прионов. С помощью современных методов молекулярно-генетического анализа были получены новые данные о возможных вариантах состава и конформации (укладки) полипептидной цепи PrP. В частности, было установлено, что конверсия нормального прионного белка в его инфекционную изоформу - посттрансляционный

процесс . Анализ вторичной структуры PrPSc показал, что этот переход характеризуется большими структурными изменениями самого приона. Клеточный белок содержит 42% α -спиралей и почти не содержит β -тяжей (всего около 3%), в то время как в его инфекционной форме выявляется 30% α -спиралей и 43% β -тяжей. Превращение нормального белка в патогенный происходит путем белок-белковых взаимодействий

Методы изучения структуры белков.

- Рентгеноструктурный анализ
- Спектроскопия ядерного магнитного резонанса.
- Атомная силовая микроскопия
- Масс-спектрометрия

Модификация белков.

- 1. Модификация белков протонированием. Аминогруппы, карбоксильные группы, SH- группа цистеина, имидазольная группа гистидина, фенольная группа тирозина, гуанидиновая группа аргинина могут присоединять протон (ион водорода H^+) и менять знак заряда молекулы белка.
 - $-COO^- + H^+ = -COOH$
 - $-SH = -S^- + H^+$
- 2. Свободная аминогруппа N-концевой аминокислоты, ϵ -аминогруппа лизина).
- Реакции с альдегидами, с динитрофторбензолом, с ангидридами кислот.
- 3. Карбоксильные группы аспарагиновой и глутаминовой кислот, Карбоксильная группа C-концевой аминокислоты.
 - Реакция этерификации, амидирования
- 4. Фенольная группа тирозина.
 - Реакция электрофильного замещения в ароматическом кольце.
- 5. Имидазольная группа гистидина.
 - Алкилирование, фотоокисление
- 6. Гуанидиновая группа аргинина.
 - Реакция с дионами (бутадион)
- 7. Сульфгидрильные группы.
 - Алкилирование, реакция с реактивом Эллмана (5,5'-дитио-бис-(2-нитробензойная кислота)
- Бифункциональные сшивающие агенты. (Диальдегиды). Реагируют по аминогруппам.

Классификация белков по простетическим группам.

- | | |
|----------------------------|--|
| • Класс | Простетическая группа |
| • Нуклеопротеидные системы | |
| • Рибосомы | РНК |
| • Вирус табачной мозаики | РНК |
| • Липопротеиды | фосфолипиды, холестерин |
| • Гликопротеиды | |
| • γ -глобулин | гексозамин, галактоза, манноза, |
| • Фосфопротеиды | |
| • Казеин (белок молока) | фосфатная группа, связанная сложноэфирной связью с серином |
| • Гемопротеиды | |
| • Гемоглобин | железопроtopорфирин |
| • Цитохром с | |
| • Цитохром P450 | |
| • Флавопротеиды (FMN, FAD) | флавопуклеотиды |
| • Сукцинатдегидрогеназа | |
| • Оксидаза D-аминокислот | |
| • редуктазы | |
| • | |

Классификация белков в соответствии с выполняемыми функциями

- 1) каталитически активные белки (ферменты),
- 2) белки – ингибиторы ферментов,
- 3) белки-регуляторы активности генома,
- 4) защитные белки, белки иммунной и свертывающей системы,
- 5) токсические белки,
- 6) транспортные белки
- 7) мембранные белки,
- 8) сократительные белки,
- 9) рецепторные белки,
- 10) белки-гормоны,
- 11) белки – оболочки вирусов,

Понятие фермент. Классификация ферментов.

Термин «фермент» (fermentum) происходит от латинского *fervere* - вскипать, пениться, и отражает процесс пенообразования при спиртовом брожении.

Ферменты являются белковыми катализаторами биохимических реакций.

Катализаторы - это вещества, ускоряющие химические реакции; в ходе реакции они претерпевают физические изменения, но по ее завершении возвращаются в исходное состояние. Если образующиеся переходные комплексы распадаются с образованием продуктов и полной регенерацией катализатора, то реакция является каталитической.

Во многих случаях скорость реакции резко изменяется в присутствии специальных веществ - катализаторов. Катализаторы участвуют в реакции, но в результате ее не расходуются. Катализаторы биологических процессов, протекающих в живых организмах, представляют собой белковые молекулы, которые называют ферментами, или энзимами.

Если катализатор находится в одной фазе с реакционной смесью, то процесс называется гомогенным, в разных фазах – гетерогенным. Ферменты, растворенные в реакционной смеси, считаются гомогенными катализаторами. Однако, часто ферменты ведут себя как гетерогенные катализаторы, так как из-за большого размера их белковых молекул они образуют коллоидные, а не истинные растворы.

Классификация ферментов (по механизму действия)

- Класс 1. Оксидоредуктазы. Катализируют окислительно-восстановительные реакции.
Пример: алкогольдегидрогеназа, каталаза, пероксидаза.
- Класс 2. Трансферазы. Катализируют реакции переноса групп от одного соединения к другому.
Пример: аминотрансфераза,
- Класс 3. Гидролазы. Катализируют реакции гидролиза.
Пример: карбоксиэстераза, пепсин, трипсин, химотрипсин, ацетил-СоА-гидролаза
- Класс 4. Лиазы. Катализируют присоединение групп к двойным связям или отщепление групп с образованием двойной связи.
Пример: карбоангидраза, изоцитратлиаза.
- Класс 5. Изомеразы. Катализируют геометрические или другие изменения в пределах одной молекулы.
Пример: триозофосфатизомераза, аланинрацемаза.
- Класс 6. Лигаза (синтетаза). Катализируют реакции конденсации двух молекул, сопряженные с гидролизом пирофосфатной связи в молекуле АТФ.
Пример: тирозил-т-РНК-синтетаза, ацетат-СоА-лигаза.

Раздел 2. Химическая кинетика

Химическая кинетика – раздел химической науки, изучающий протекание физико-химических процессов во времени, скорости и механизмы химических реакций, их зависимость от различных условий (концентрации реагентов, температуры, наличия или отсутствия катализаторов, влияния электромагнитного излучения и др.)

Химическая кинетика - один из важнейших разделов химии, задача которого - объяснение качественных и количественных изменений химического или биохимического процесса, происходящего во времени. Эту задачу подразделяют на две.

1. Выявление механизма реакции - установление элементарных стадий и последовательности их протекания (качественные изменения).
2. Количественное описание химической реакции - установление строгих отношений, которые могли бы предсказывать изменения количеств исходных реагентов и продуктов по мере протекания реакции.

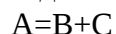
Большинство химических реакций – это сложные реакции, протекающие через несколько простых стадий – элементарных актов реакции.

При обсуждении механизмов реакции классифицируют по числу молекул, участвующих в каждом элементарном акте взаимодействия.

Молекулярность химических реакций

Молекулярность реакции обозначает число молекул, реагирующих друг с другом в конкретной реакции.

Мономолекулярными называют реакции, в которых элементарный акт представляет собой химическое превращение одной молекулы.



Бимолекулярные - реакции, элементарный акт в которых осуществляется при одновременном столкновении двух молекул.



В тримолекулярных реакциях элементарный акт осуществляется при одновременном столкновении трех молекул.



Столкновение более чем трех молекул одновременно практически невероятно, поэтому реакций большей молекулярности на практике не обнаружено.

Основные понятия химической кинетики.

Переходное состояние. Энергия активации. Энергетический профиль реакции.

Переходное состояние — состояние системы, при котором уравновешены разрушение и создание связи. В переходном состоянии система находится в течение небольшого (10–15 с) времени. Энергия, которую необходимо затратить, чтобы привести систему в переходное состояние, называется энергией активации. В многоступенчатых реакциях, которые включают в себя несколько переходных состояний, энергия активации соответствует наибольшему значению энергии. После преодоления переходного состояния молекулы вновь разлетаются с разрушением старых связей и образованием новых или с преобразованием исходных связей. Оба варианта возможны, так как происходят с высвобождением энергии (это хорошо видно на рисунке, поскольку оба положения лежат энергетически ниже энергии активации). Существуют вещества, способные уменьшить энергию активации для данной реакции. Такие вещества называют катализаторами. Биологи же такие вещества называют ферментами. Интересно, что катализаторы, таким образом, ускоряют ход реакции, самостоятельно в ней не участвуя.

Энергия активации в химии и биологии — минимальное количество энергии, которое требуется сообщить системе (в химии выражается в джоулях на моль), чтобы произошла реакция. Термин введен Сванте Августом Аррениусом в 1889. Типичное

обозначение энергии реакции E_a . Энергия активации затрачивается на преодоление «энергетического барьера» реакции (Рис.7). Чем выше значение энергии активации, тем с меньшей скоростью протекает реакция.

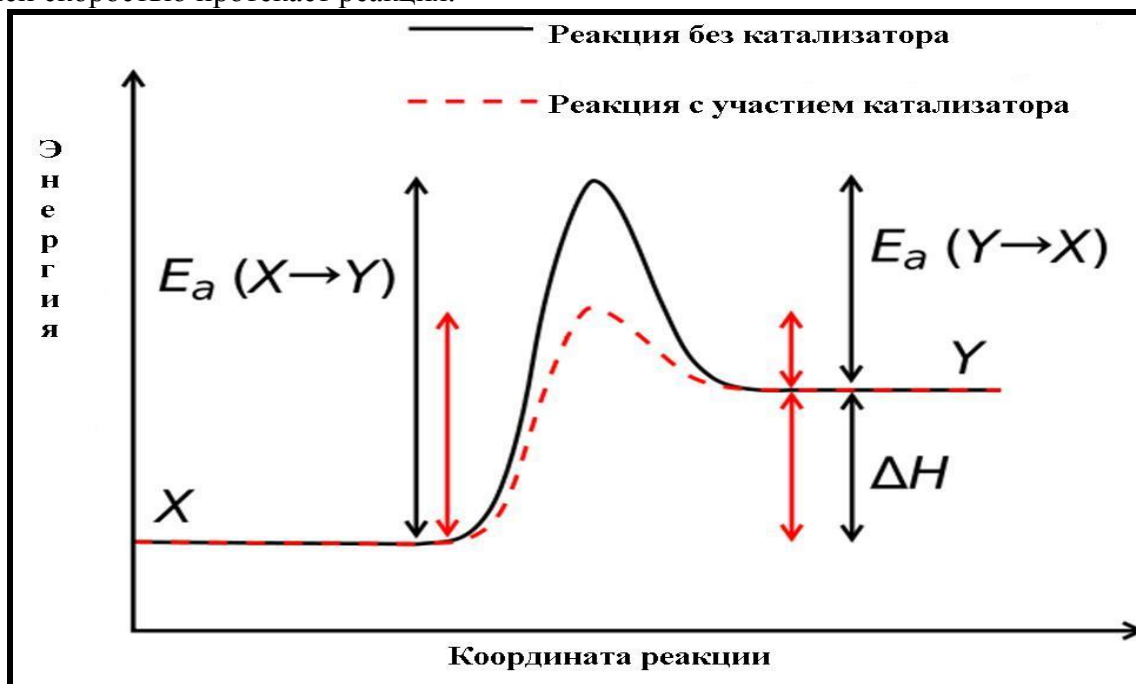


Рис.7 Графическое изображение понятия «Энергия активации».

В химической модели, известной как Теория активных соударений (ТАС), есть три условия, необходимых для того, чтобы произошла реакция:

- 1) Молекулы должны столкнуться. Это важное условие, однако его не достаточно, так как при столкновении не обязательно произойдёт реакция.
- 2) Молекулы должны обладать необходимой энергией (энергией активации). В процессе химической реакции взаимодействующие молекулы должны пройти через промежуточное состояние, которое может обладать большей энергией. То есть молекулы должны преодолеть энергетический барьер; если этого не произойдёт, реакция не начнётся.
- 3) Молекулы должны быть правильно ориентированы относительно друг друга.

При низкой (для определённой реакции) температуре большинство молекул обладают энергией меньшей, чем энергия активации, и неспособны преодолеть энергетический барьер. Однако, в веществе всегда найдутся отдельные молекулы, энергия которых значительно выше средней. Даже при низких температурах большинство реакций продолжают идти. Увеличение температуры позволяет увеличить долю молекул, обладающих достаточной энергией, чтобы преодолеть энергетический барьер. Таким образом, повышается скорость реакции.

Энергетический профиль реакции - график зависимости потенциальной энергии от координаты реакции.

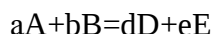
Закон действующих масс Гульдберга и Вааге.

В основе кинетики лежит закон действующих масс Гульдберга и Вааге.

Закон действующих масс был сформулирован в 1867 г. Гульдбергом и Вааге, и независимо от них в 1865 г. русским ученым Н.И. Бекетовым. (1861 г. Теория строения органических соединений А.М. Бутлерова, 1869 г. Периодический закон и Периодическая таблица химических элементов Д.И. Менделеева)

Закон действующих масс можно выразить в виде двух эквивалентных формулировок.

1) Скорость химической реакции при постоянной температуре прямо пропорциональна произведению концентраций реагирующих веществ в степени их стехиометрических коэффициентов.



скорость v_1 прямой реакции равна $v_1 = k [A]^a [B]^b$, скорость v_2 обратной реакции равна $v_2 = k [D]^d [E]^e$, где k_1, k_2 - коэффициенты пропорциональности (константы скорости прямой и обратной реакции соответственно); $[A], [B], [D], [E]$ - молярная концентрация вещества (М, моль/л); a, b, c, d - стехиометрические коэффициенты.

В такой форме закон действующих масс справедлив только для элементарных (простых) реакций, т.е. для таких, которые протекают в одну стадию непосредственно в акте столкновения реагирующих частиц. Для реакций, не являющихся элементарными, показатели степеней при концентрациях в выражениях для скоростей химических реакций часто не равны соответствующим стехиометрическим коэффициентам, т.е. в общем случае

$$v_1 = k [A]^{v(A)} [B]^{v(B)}, v_2 = k [D]^{v(D)} [E]^{v(E)}$$

где $v(A) \neq a, v(B) \neq b, v(D) \neq d, v(E) \neq e$.

Выражения для скорости реакции.

Тип реакции	Формула	Выражение для скорости реакции
мономолекулярной реакции	$A \rightarrow B + C$	$v = -dA/dt = k [A]$
бимолекулярная реакция	$A + B \rightarrow C$	$v = k [A][B]$
	$2A \rightarrow C$	$v = k [A]^2$
тримолекулярная реакция	$2A + B \rightarrow C$	$v = k [A]^2 [B]$
	$A + B + C \rightarrow D$	$v = k [A][B][C]$
В общем виде	$mA + nB \rightarrow C$	$v = k [A]^m [B]^n$
	$A \rightarrow P$	$v = k [A]$
	$mA + nB \rightarrow pC + qD$	$v = k [A]^m [B]^n$

k - коэффициент пропорциональности (константа скорости), $[A]$ - молярная концентрация вещества A .

Влияние концентраций реагирующих веществ может быть объяснено тем, что химические взаимодействия являются результатом столкновений частиц. Увеличение числа частиц в заданном объеме приводит к более частым столкновениям, т.е. к увеличению скорости реакции. Зависимость скорости химической реакции от концентрации реагирующих веществ справедлива для газов и реакций, протекающих в растворе. Для реакций с участием твердых веществ взаимодействие происходит не во всем объеме, а лишь на поверхности, от размера которой зависит скорость реакции. Поэтому реакции в гетерогенных системах значительно сложнее.

2) В состоянии равновесия отношение произведения активностей или фугитивностей (летучестей) продуктов реакции, взятых в степенях их стехиометрических коэффициентов. К аналогичному произведению для исходных веществ есть величина постоянная, зависящая от температуры и не зависящая от способа достижения равновесия. Эта постоянная величина называется константа равновесия.

Скорость и константа скорости химической реакции

Скорость реакции. Основным понятием в химической кинетике является скорость реакции. Скорость химической реакции определяется количеством вещества, прореагировавшего в единицу времени в единице объема. Размерность скорости химической реакции моль/л·с или моль/л·мин. Скорость химической реакции в начальный момент времени, когда существенные изменения концентраций реагирующих веществ не успели произойти, называется начальной скоростью и обозначается v_0 . Скорость химической реакции в любой другой момент времени называется текущей скоростью v .

Константа скорости

Константа скорости реакции (удельная скорость реакции) — коэффициент пропорциональности в кинетическом уравнении. Физический смысл константы скорости реакции k следует из уравнения закона действующих масс: k численно равна скорости реакции при концентрации каждого из реагирующих веществ равной 1 моль/л.

Константа скорости реакции зависит от температуры, от природы реагирующих веществ, но не зависит от их концентрации.

Константа скорости простой (элементарной) реакции называется истинной константой скорости. Константы скоростей сложных реакций принято называть эффективными константами скорости, поскольку они представляют более или менее сложные соотношения различных параметров, постоянных в данных условиях.

Константа скорости k характеризует

- 1) химическую природу реагирующих веществ,
- 2) их способность вступать в реакцию.

Пример: $\text{Na} + \text{H}_2\text{O} = 1/2\text{H}_2 + \text{NaOH}$ (реакция идет бурно, со взрывом)

$3\text{Fe} + 4\text{H}_2\text{O}(\text{пар}) = \text{Fe}_3\text{O}_4 + 4\text{H}_2$ (реакция идет при нагревании)

Физический смысл константы скорости - это скорость реакции при концентрации реагирующих веществ, равной единице, $[\text{A}] = 1 \text{ моль/л}$ (1М). $v = k$

Способы выражения концентрации

1. Молярная концентрация. Количество молей в 1 л раствора

Полное обозначение	Сокращенное обозначение	Численное обозначение
моль/л	М	10^1
ммоль/л	мМ	10^{-3}
мкмоль/л	мкМ	10^{-6}
нмоль/л	нМ	10^{-9}
рмоль/л	рМ	10^{-12}
фмоль/л	фМ	10^{-15}
аттомоль/л	аМ	10^{-18}
zeptomol/l	зМ	10^{-21}
Йоктомоль*	yocto	10^{-24}

* 1 йоктомоль равен 0,6 молекулам

2. Процентная концентрация. Масса (г) вещества в 100 г раствора.

Ех: Расчет количества вещества на биочипе, электроде, подложке микроскопа.

Например, на биочип нанесли 2 мкл 100 мМ раствора белка. Сколько молей белка на биочипе? $v = m/M$; $x = \text{объем} \times \text{молярность}$.

Порядок реакции

Порядок реакции - это число, равное сумме показателей степени концентрации реагирующих веществ в уравнении скорости. Порядок реакции совпадает со стехиометрическим коэффициентом только для простых реакций и элементарных процессов. В кинетике различают реакции первого, второго, третьего или даже дробного порядка. В более сложных случаях порядок всей реакции не может быть выражен ни целым, но дробным числом.

$A=B+C$; $v=k[A]$, это скорость реакции первого порядка.

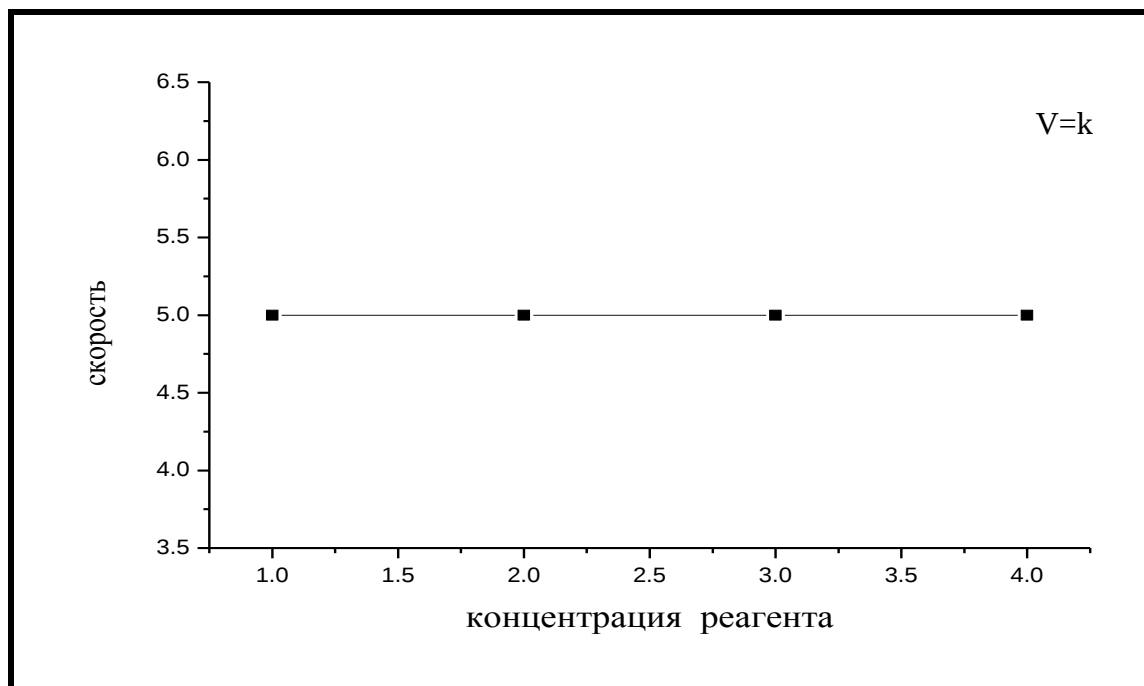
$A+B=C$, $v=k[A][B]$, сумма показателей 2, реакция суммарно второго порядка, но первого порядка по A, и первого по B или $2A=C$ $v=k[A]^2$, это скорость реакции второго порядка.

$v=k[A]^2[B][C]^3$, это реакция шестого порядка, но первого по B, второго по A, третьего по C.

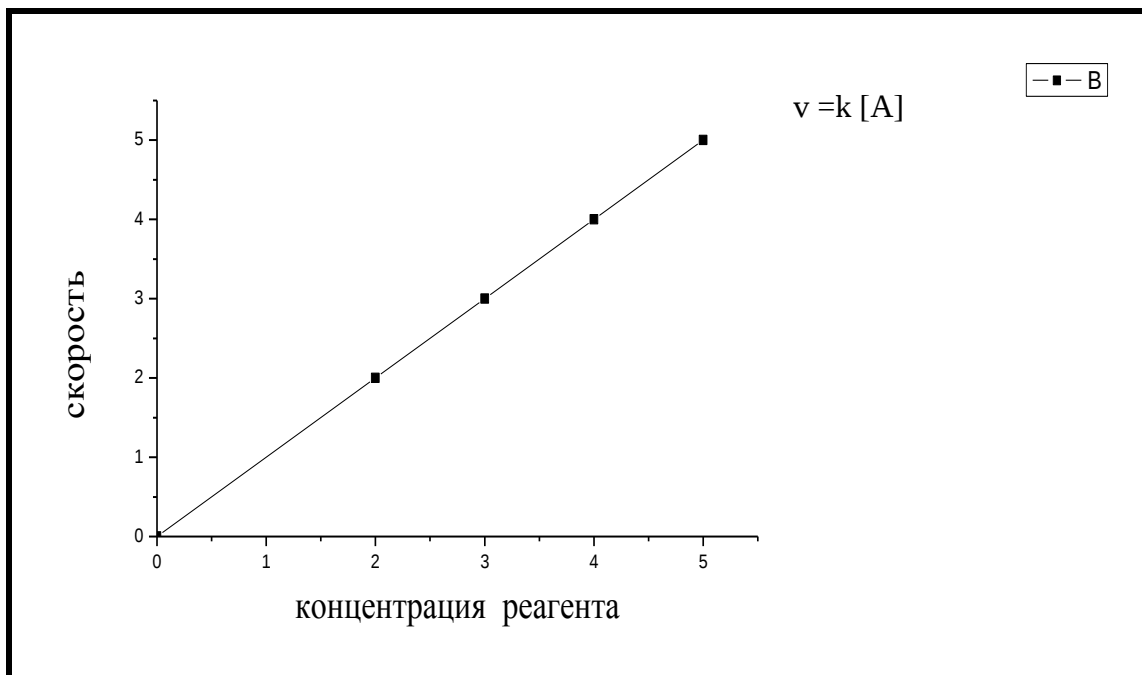
Если в уравнении скорости отсутствует концентрация, т.е. $v=k$, то оно относится к реакции нулевого порядка. Реакции нулевого порядка протекают с постоянной скоростью и не зависят от концентрации реагирующих веществ. Например, в каталитической реакции, в которой концентрация реагента (субстрата) настолько превышает концентрацию катализатора (фермента), что катализатор (фермент) все время полностью насыщен реагентом, реакция будет протекать с максимальной скоростью, и на нее не будет влиять увеличение концентрации реагента.

Графические изображения зависимости скоростей различного порядка от концентрации реагента

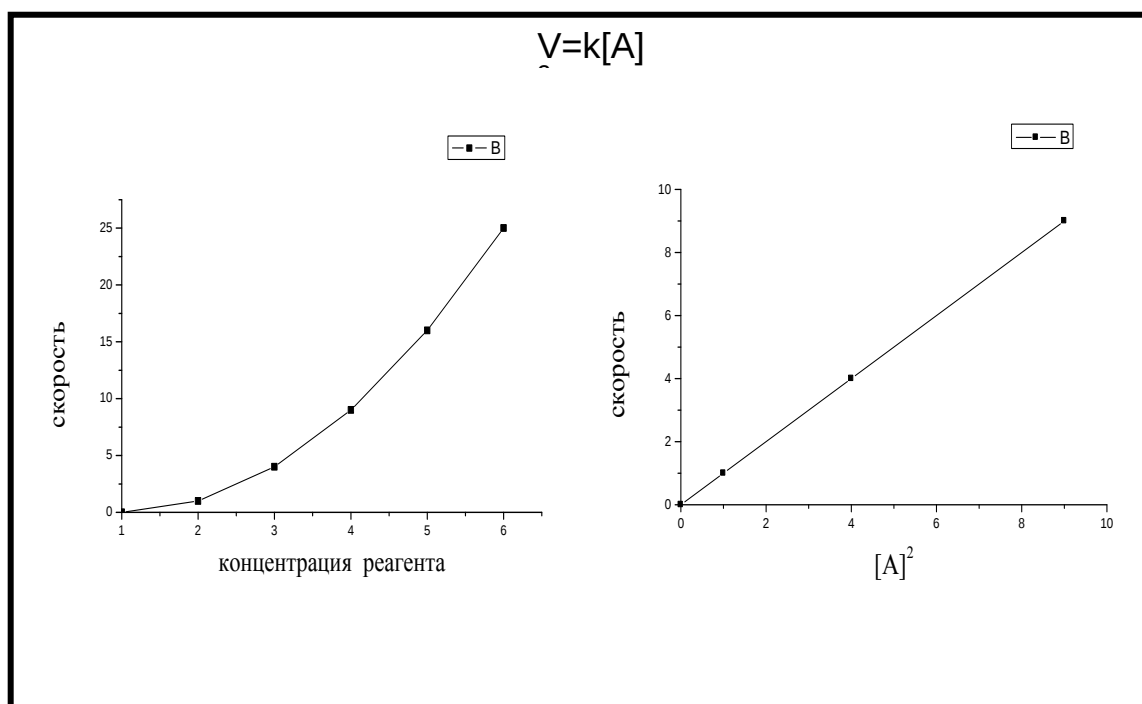
Зависимость скорости реакции нулевого порядка от концентрации



Зависимость скорости реакции первого порядка от концентрации



Зависимость скорости реакции второго порядка от концентрации



Начальная скорость ферментативной реакции

Начальная скорость – это скорость в первые моменты инкубации, пока еще сохраняется прямо пропорциональная зависимость между нарастанием продукта и временем инкубации, пока превращению подверглось не более 10-15 % субстрата.

Для неферментативных реакций скорость в присутствии катализатора практически не зависит от его концентрации. В отличие от этого, для ферментативных реакций скорость зависит существенно от количества добавленного фермента, т.е. скорость реакции будет являться мерой каталитической активности фермента. Эта мера называется «активностью

фермента» и выражается в стандартных единицах. Для того, чтобы связать количество фермента с его активностью, ввели понятие «удельная активность».

«Удельная активность»- активность единицы веса фермента в стандартных условиях; она выражается в мкмольх превращенного субстрата в мин. На мг белка.

Скорость ферментативной реакции выражают, как правило, в тех же единицах, что и удельная активность. Однако не стоит считать, что эти два понятия тождественны.

Определение начальной скорости реакции

При определении скорости ферментативной реакции, всегда следует определять начальную скорость ферментативной реакции. На рисунке 8 представлен ход экспериментальной кривой во времени нарастание продукта Р. С помощью графика представленного на рисунке 8А имея прямолинейный участок, мы можем рассчитать начальную скорость ферментативной реакции. Как отношение $v_0 = \Delta P / \Delta t$.

Часто бывает, что кривая не имеет прямолинейного участка. Одна из причин - нехватка субстрата. В этом случае проводится касательная из начала координат к кривой, и тангенс угла наклона этой касательной дает нам величину начальной скорости v_0 (Рис.8Б).

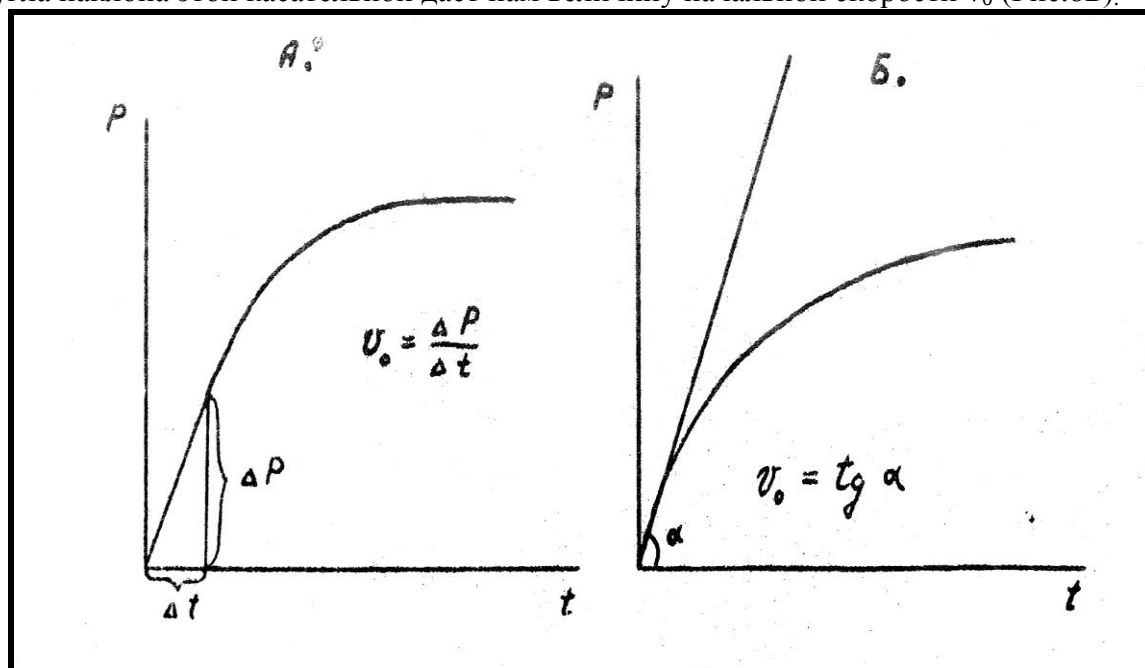


Рис.8 Ход ферментативной реакции во времени (нарастание Р). Определение начальной скорости реакции v_0 .

Единицы измерения скорости и константы скорости химических реакций различных порядков.

Различные формы уравнения скорости первого порядка

Дифференциальная форма	Интегральная форма	Размерность скорости	Размерность константы скорости
$V = -dA/dt = k[A]$	$2,303 \lg A_0/A = kt$	моль/л*с, моль/л*мин	$\text{с}^{-1}, \text{мин}^{-1}$

Интегрирование дифференциальной формы уравнения скорости первого порядка дает:

$$-\ln [A] = kt + C$$

Принимая граничные условия для величин концентрации А (A_0 и А) и времени (t и t_0), т.е.

$$-\ln[A]_{A_0} = kt_0 + C,$$

$$\ln A_0/A = kt,$$

где A_0 - начальная концентрация, А - концентрация в момент времени t. Переход от натуральных логарифмов к десятичным дает:

$$2,303 \lg A_0/A = kt \quad (2.1)$$

Выражение (2.1) является уравнением скорости первого порядка в интегральной форме. Если разделить обе части уравнения (2.1) на 2,303 получим:

$$\lg A_0/A = 0,434kt$$

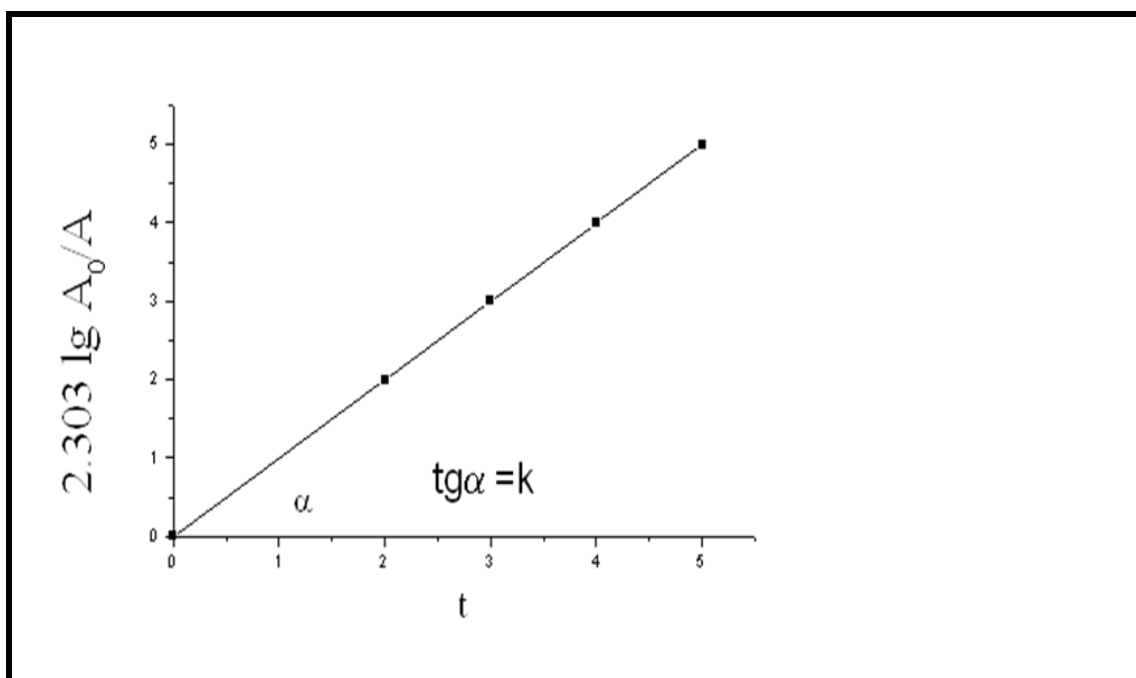


Рис.9 Зависимость $\lg$ концентрации A_0/A от времени для реакции первого порядка

Зависимость логарифма концентрации A_0/A от времени для реакции первого порядка

Экспериментальное определение параметров реакции

Часто кинетические измерения гораздо проще провести для образования продукта, чем для исчезновения реагента (субстрата).

Например, при термическом декарбоксилировании дикарбоновой кислоты происходит выделение CO_2 : $\text{HOOC-CH(NH}_2\text{)-CH(CH}_3\text{)-COOH} = \text{CO}_2 + \text{HOOC-CH(NH}_2\text{)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$

За реакцией можно следить, измеряя скорость выделения CO_2 . Если мы обозначим исходную концентрацию дикарбоновой кислоты через a , а количество CO_2 , выделяющееся за время t , через x , то количество дикарбоновой кислоты, оставшееся ко времени t , должно быть равно $(a-x)$.

$$k = 2,303/t \cdot \lg[A]_0/[A]_t \quad (2.2)$$

Ех: Хлористый фенилдиазоний при 50°C в воде подвергается термическому распаду по уравнению первого порядка с константой скорости $k = 0,071 \text{ мин}^{-1}$.

Сколько времени нужно нагревать раствор при 50°C для того, чтобы исходная концентрация, равная $0,01\text{M}$, уменьшилась до $0,001\text{M}$?

Решение.

$$2,303 \lg 0,01/0,001 = 0,071t$$

Ответ

$$t = 32,4 \text{ мин}$$

При использовании уравнения (2.2) концентрации не обязательно выражать в абсолютных единицах. Можно использовать, например, проценты.

Ех: За какое время реакция пройдет на 90%? $[A]_0 = 0,01 \text{ M}$.

Решение

$$2,303 \lg 0,01/0,001 = 0,071t$$

Ответ

$$t = 32,4 \text{ мин}$$



Рис.10 Кинетические графики для реакции первого порядка в полулогарифмических координатах

Реакции псевдопервого порядка

Реакции псевдопервого порядка – это реакции второго порядка, для которых концентрация одного из реагентов столь высока, что остается практически постоянной на протяжении всей реакции. В этом случае получаем зависимости, характерные для реакции первого порядка.

Уравнение скорости реакции второго порядка

Дифференциальная форма	Интегральная форма	Размерность скорости	Размерность константы скорости
$v = -d[A]/dt = k[A]^2$	$1/[A] = kt + C$	моль/л*с, моль/л*мин	$\text{с}^{-1} * \text{моль}^{-1} * \text{л}, \text{мин}^{-1} * \text{моль}^{-1} * \text{л}$

Интегрирование дифференциальной формы уравнения скорости второго порядка дает:

$$1/[A] = kt + C$$

исходная концентрация реагента a , прореагировало x , $(a-x)$ осталось, x продукта образовалось

$$1/(a-x) - 1/a = x/a(a-x) = kt$$

Уравнение скорости бимолекулярной реакции

Дифференциальная форма	Интегральная форма	Размерность скорости	Размерность константы скорости
$v = -d[A]/dt = k[A][B]$ если ($[A] = [B]$) или $V = dx/dt = k(a-x)(b-x)$ если ($[A] \neq [B]$)	$1/(a-x) - 1/a = x/a(a-x) = kt$ или $2.303/(a-b) \lg b(a-x)/a(b-x) = kt$	моль/л*с, моль/л*мин	$\text{с}^{-1} * \text{М}^{-1},$ $\text{мин}^{-1} * \text{М}^{-1}$

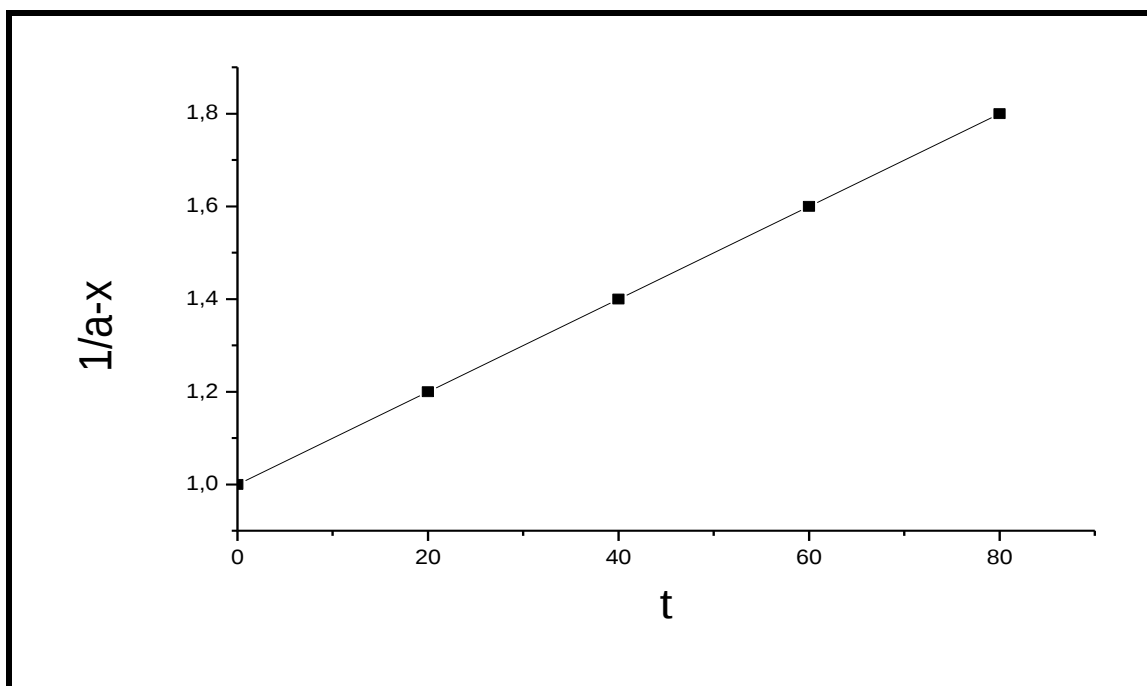


Рис.11 График для реакций второго порядка $1/(a-x) = kt + 1/a$ в координатах $1/(a-x)$, t

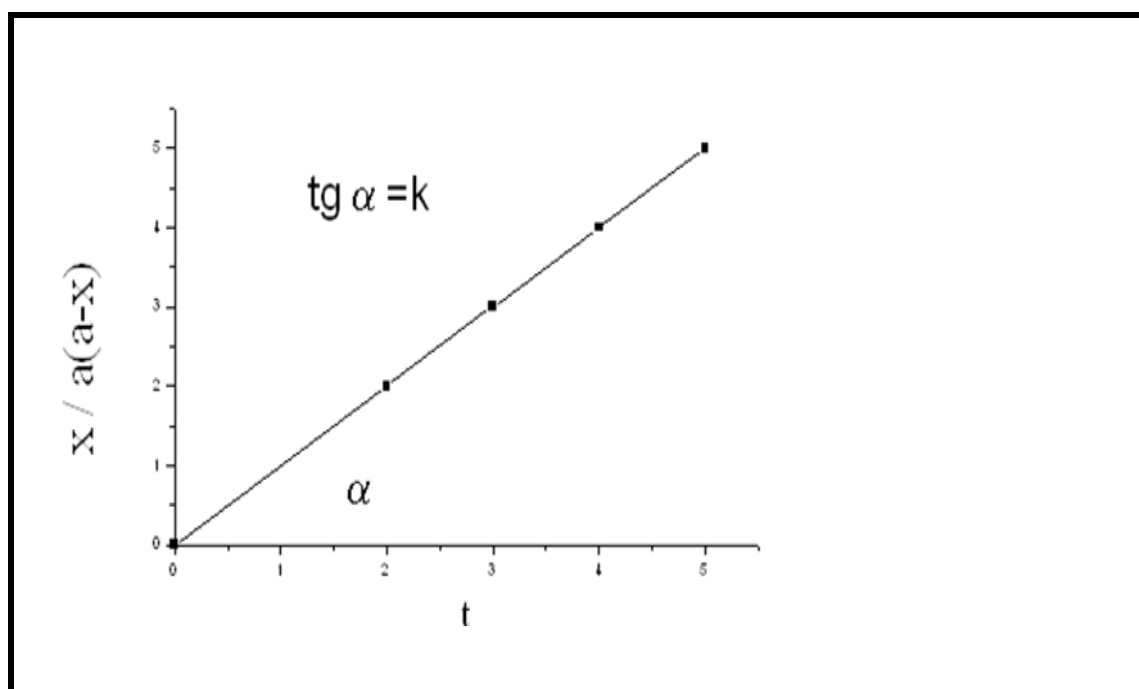


Рис.12 График для реакций второго порядка $x/a(a-x) = kt$ в координатах $x/a(a-x)$, t для реакции $2A = C$

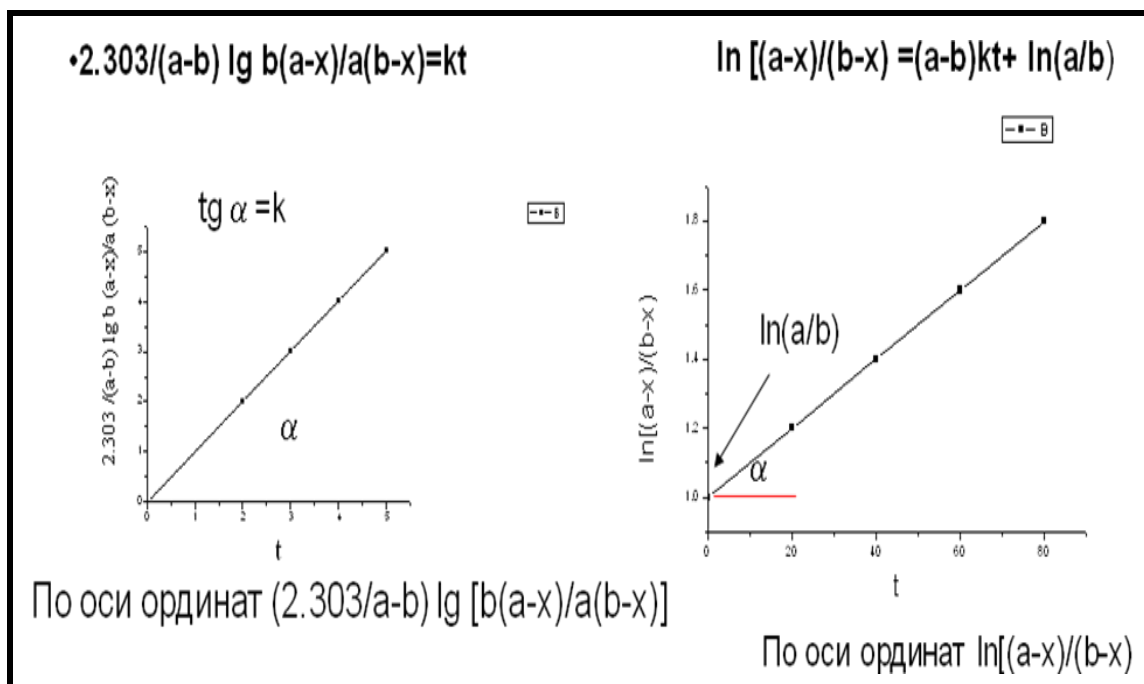


Рис.13 Графики для бимолекулярной реакции второго порядка с разными концентрациями А и В

Для вычисления константы скорости бимолекулярной реакции необходимо знать начальные концентрации реагирующих веществ, убыль одного из них к моменту времени t и время t . Для реакций, когда $[B] \gg [A]$ можно считать, что концентрация вещества В в ходе реакции остается постоянной и тогда $v=k*[A]$, где $k*=k[B]$. Мы имеем псевдомомолекулярную реакцию. Константа скорости псевдомомолекулярной реакции определяется как и константа скорости истинной мономолекулярной реакции первого порядка, но она представляет собой не истинную, а кажущуюся константу скорости реакции.

Для нахождения истинной константы надо полученную экспериментальную величину k^* разделить на концентрацию вещества В

- $k= k^* /[B]$

Реакции n порядка

Дифференциальная форма	Интегральная форма	Размерность скорости	Размерность константы скорости
$v=-dx/dt= k(a-x)^n$	$1/(n-1)(a-x)^{n-1}=kt$	моль/л*с, моль/л*мин	Моль ¹⁻ⁿ *л ⁿ⁻¹ *с ⁻¹

- $nA=P$
- $v=k[A]^n$
- $V_0 = -dA/dt=kC_0^n$
- C_0 - концентрация вещества А в начальный момент (начальная концентрация)

Скорость расходования вещества в реакции n -го порядка в начальный момент времени можно записать следующим образом:

$$v_0=- d C_0/dt=k C_0^n \quad (2.3)$$

Логорифмируя уравнение (2.3), получим

$$\log v_0 = \log k+ n \log C_0 \quad (2.4)$$

Из выражения (2.4) очевидно, что порядок реакции можно определить при анализе начальных скоростей реакции (v_0), соответствующих различным начальным концентрациям реагента (C_0). В этом случае зависимость в координатах ($\log v_0, \log C_0$)

должна иметь вид прямой линии с тангенсом угла наклона, численно равным порядку реакции n .

Порядок реакции можно приблизительно определить по значениям начальных скоростей реакции (v_0^1 и v_0^2), которые соответствуют двум начальным концентрациям субстрата (c_0^1 и c_0^2), используя соотношение (2.4):

$$\log v_0^1 = \log k + n \log c_0^1 \quad (2.5)$$

$$\log v_0^2 = \log k + n \log c_0^2 \quad (2.6)$$

Вычитая (2.6) из (2.5), получим

$$\log v_0^1 - \log v_0^2 = n (\log c_0^1 - \log c_0^2)$$

или

$$n = \log(v_0^1 / v_0^2) / \log(c_0^1 / c_0^2)$$

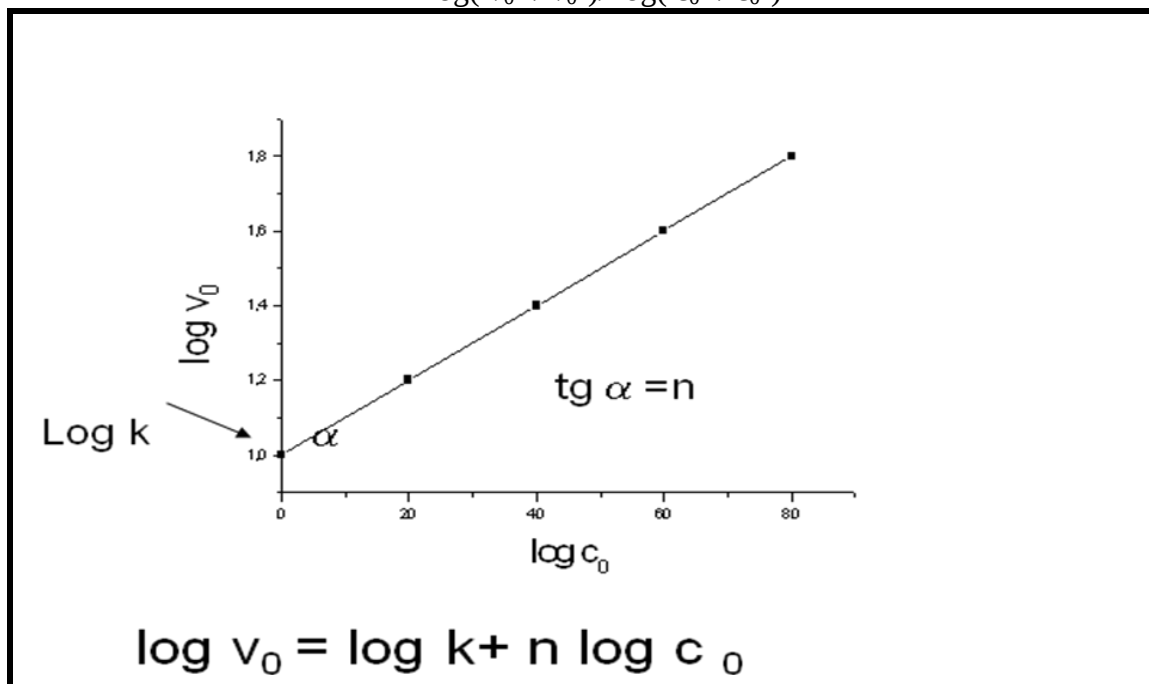


Рис.14 Зависимость в координатах $\log v_0$, $\log c_0$

Реакции дробного порядка

Дробный порядок реакции свидетельствует о том, что данная реакция является сложной и протекает в несколько стадий.

при $t=0$, $[A]=a$, а в момент времени t $[A]=a-x$, x – прореагировало

Дифференциальная форма	Интегральная форма	Размерность скорости	Размерность константы скорости
$v = -dx/dt = k(a-x)^{1/2}$ с порядком $1/2$	$2(a-x)^{1/2} = C - kt$	моль/л*с, моль/л*мин	моль/л*с, моль/л*мин
$v = -dx/dt = k(a-x)^{3/2}$ с порядком $3/2$	$2/(a-x)^{3/2} = kt + C$	моль/л*с, моль/л*мин	$с^{-1} * моль^{-1} * л$

Реакции нулевого порядка $V=k$

Дифференциальная форма	Интегральная форма	Размерность скорости	Размерность константы скорости
$v = -d[A]/dt = k$	$[A] = kt$	моль/л*с, моль/л*мин	моль/л*с, моль/л*мин

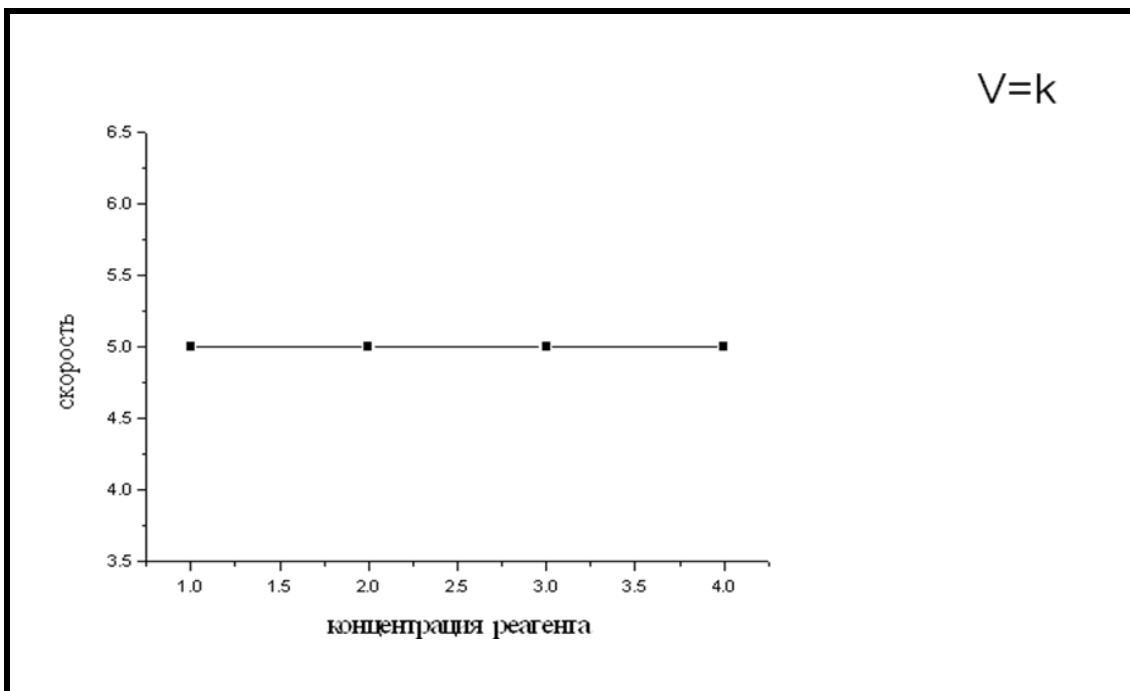


Рис.17 Зависимость скорости реакции нулевого порядка от концентрации

Время полупревращения субстрата

Для реакций первого порядка

$$2,303 \lg A_0/A = kt$$

Пусть $t_{1/2}$ выражает время, необходимое для завершения реакции наполовину, по истечении которого $[A]=1/2 [A_0]$

$$2,303 \lg A_0/1/2[A_0]=kt_{1/2}, 2,303 \lg 2=0.693$$

$$t_{1/2}=0.693/k$$

Время полупревращения субстрата в случае реакции первого порядка зависит только от константы скорости реакции и не зависит от начальной концентрации реагента (субстрата).

Ех: Рассчитать время полупревращения хлористого фенилдиазония при 50°C в воде по уравнению первого порядка с константой скорости $k = 0.071 \text{ мин}^{-1}$.

Решение

$$t_{1/2}=0.693/k=0.693/0.071 \text{ мин}^{-1}$$

Ответ

$$t_{1/2}=9.76 \text{ мин}$$

Время полупревращения реагента (субстрата) $t_{1/2}$ для реакций второго порядка

При $t_{1/2}$, $x=1/2 a$, $1/(a-x) - 1/a = x / a(a-x)=kt$

Получим: $t_{1/2} = 1/ka$

Реакции нулевого порядка $V=k$

Время полупревращения реагента (субстрата) $t_{1/2}$ для реакций нулевого порядка

$$\frac{dx}{dt} = k$$

$$dx = kdt$$

Проинтегрировав, получаем $x=kt$ (x – концентрация образовавшегося продукта) $t_{1/2} = a/2k$

Задачи

1. Начальные скорости реакции 2-фенил-4,4 диметил-2-оксазолин-5-она (А) с этиловым эфиром аланина (В). Условия реакции: четыреххлористый углерод; 20°C

$V_0 \cdot 10^7$, моль/л*сек	$[A]_0 \cdot 10^3$, моль/л	$[B]_0 \cdot 10^3$, моль/л
4,06	2,15	15,1
4,20	10,0	3,36
12,10	6,38	15,1
36,80	10,0	29,4

Решение

Используя формулу для определения порядка реакции по двум начальным скоростям, соответствующим двум различным начальным концентрациям реагента, получаем

$$n(A) = \frac{\log 12,1 / 4,06}{\log 6,38 / 2,15} = 1$$

$$n(B) = \frac{\log 36,8 / 4,2}{\log 29,4 / 3,36} = 1$$

Таким образом, реакция имеет первый порядок по обоим реагентам

2. Определить порядок реакции и значение константы скорости (A_0 – начальная концентрация, А-концентрация в момент времени t

Кинетика реакции диэтилового эфира с изобутил-литием. Условия опыта: 30°C; начальные концентрации диэтилового эфира и изобутил-лития равны 4,5 моль/л и 0,15 моль/л соответственно

Время реакции, часы	[Изобутил-литий], моль/л
0	0,150 A_0
1	0,132 А
2	0,120
3	0,108
4	0,097
5	0,090
6	0,075

Уравнение скорости первого порядка в интегральной форме $2,303 \lg A_0/A = kt$ или $\lg A_0/A = 0,434 kt$ (если разделить обе части уравнения на 2,303)

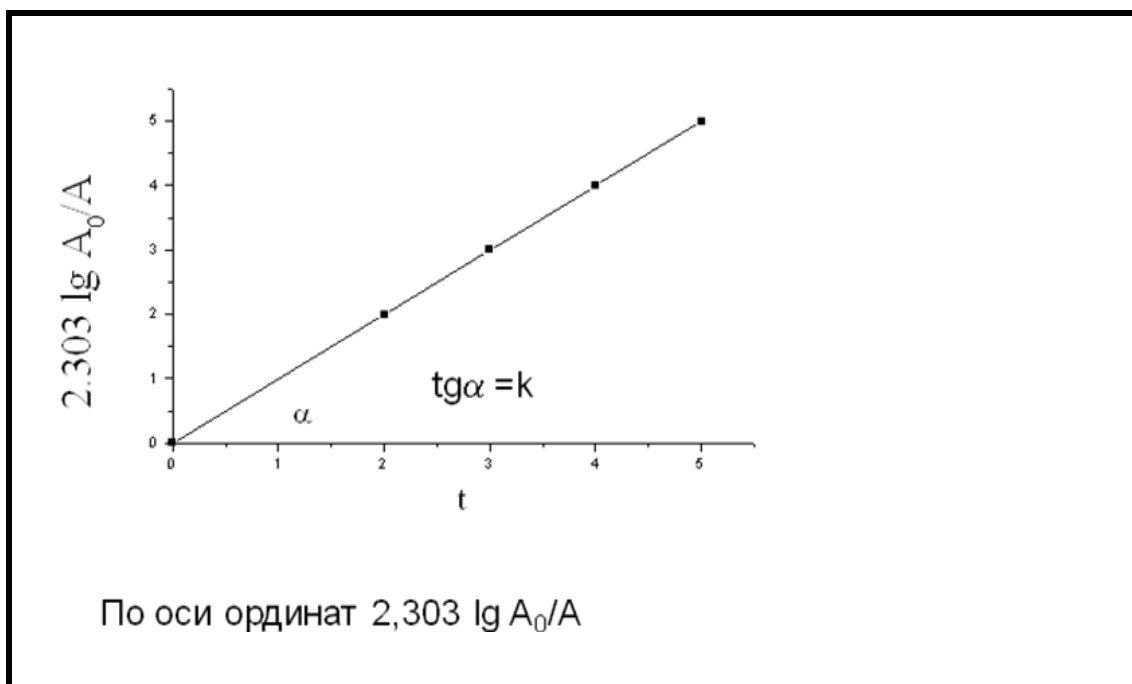


Рис.15 Зависимость lg концентрации A₀/A от времени для реакции первого порядка
Решение

Если построить график в координатах $\ln c_0/c, t, (2,303 \lg A_0/A = kt)$, то можно определить порядок реакции по изобутил литию $n=1$. $k=3.06 \cdot 10^{-5} \text{ сек}^{-1}$

Характеристические функции кинетики необратимых химических реакций

Порядок	Дифференциальное уравнение	Интегральное уравнение	к, найденная из интегральных уравнений	t _{1/2}
0	$-d(a-x)/dt=k$	$x=kt$	x/t	$a/2k$
1	$-d(a-x)/dt=k(a-x)$	$2,303 \lg A_0/A = kt$ Или $2,303 \lg a/(a-x) = kt$	$(1/t)\ln[a/(a-x)]$	$t_{1/2}=0.693/k$ Или $\ln 2/k$
2 (A+A)	$-d(a-x)/dt=k(a-x)^2$	$1/(a-x)-1/a = x/a(a-x)=kt$	$(1/t)[1/(a-x)-1/a]$	$1/ak$
2 (A+B)	$-d(a-x)/dt=k(a-x)(b-x)$	$\ln[(a-x)/(b-x)]=(a-b)kt+\ln(a/b)$	$\ln[(a-x)/a][b(b-x)]/t(a-b)$	$\ln(2-a/b)/k(b-a)$ Период полупревращения по А

	Порядок 0 (реакции нулевого порядка)	Порядок 1 (реакции первого порядка)	Порядок 2 (реакции второго порядка) (A+A)	Порядок 2 (реакции второго порядка) (A+B)	Порядок n (реакции n-го порядка)
Дифференциальное	$-d(a-x)/dt$	$-d(a-x)/dt =$	$-d(a-x)/dt =$	$-d(a-$	$-d(a-$

уравнение		$k(a-x)$	$k(a-x)^2$	$x)/dt=k(a-x)(b-x)$	$x)/dt=k(a-x)^n$
Константа скорости k , найденная из интегральных уравнений	x / t	$(1 / t) \ln [a/(a-x)]$	$(1/t [1 / (a-x) - 1/a])$	$\ln[(a-x)/a][(b-x)/t(a-b)]$	$[1/(n-1)t][1/(a-x)^{n-1} - 1/a^{n-1}]$
Период полупревращения	$t_{1/2} = a / 2k$	$t_{1/2} = 0.693/k$ или $\ln 2/k$	$t_{1/2} = 1/ak$	$t_{1/2} = \ln (2-a/b) / k(b-a)$	$(2^{1/n-1} - 1)/ka^{n-1}(n-1)$

Каталитические реакции

Типы катализа

- 1. Катализ сближением. Внутримолекулярные реакции.
- 2. Ковалентный катализ.
- 2.1. Нуклеофильный катализ.
- 2.2. Электрофильный катализ.
- 3. Общий кислотно-основной катализ
- 3.1. Кислотный катализ. Катализируется ионами водорода, кислотами.
- 3.2. Основной катализ. Катализируется основаниями.

Типы катализа (по механизму реакции).

1. Катализ сближением.

Примеры: внутримолекулярные реакции и ферментативные реакции.

Лучше всего изучены такие модельные системы, в которых реагирующим компонентом являются составные части одной молекулы. Это внутримолекулярные реакции или реакции, в которых функциональная группа, расположенная рядом с реакционным центром, оказывает анхимерное содействие протеканию процесса. Можно предположить, что аналогичное сближение реагирующих групп происходит и на ферменте за счет сил взаимодействия между ферментом и субстратом. В обоих случаях сближение реагентов по сравнению с их состоянием в разбавленном растворе приводит к понижению свободной энергии активации реакции, и, по-видимому, такого рода концентрационный эффект приведет к изменению энтропии активации.

Время полупревращения реакции гидролиза эфира 0-карбоксифеилфосфорной кислоты (I) в 30%-ном диметилсульфоксиде при 36°C составляет 15 минут, в то время как при тех же условиях в случаях пара-замещенного соединения (II) реакцию гидролиза так и не удалось обнаружить в течении 77 690 ч.

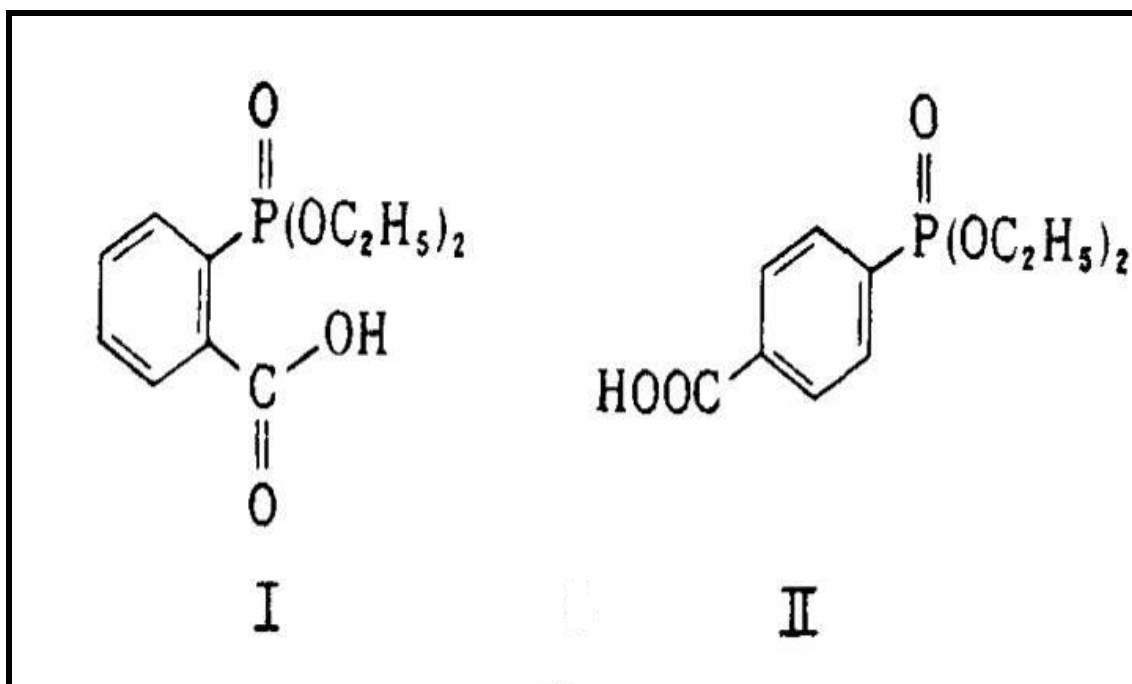


Рис.6 0-карбоксифеилфосфорная кислота (I) и пара-замещенное соединение (II).

Увеличение скорости реакции, обусловлено наличием карбоксильной группы в орто-положении, превосходит величину в $7 \cdot 10^7$ раз. Если проэтерифицировать орто-карбоксильную группу, то аномальная реакционная способность соединения (I) исчезает. Для ферментов катализ сближением приводит к локальному увеличению локальной концентрации реагирующих молекул на активном центре фермента. На активном центре фермента происходит сближение реагирующих молекул за счет слабых сил связывания.

2. Ковалентный катализ.

Некоторые ферменты химически реагируют с субстратами с образованием ковалентных фермент-субстратных промежуточных соединений (ацилфермент в случае сериновых протеиназ).

Таблица 1. Ковалентные фермент-субстратные промежуточные соединения

Класс ферментов	Реагирующая группа	Ковалентное промежуточное соединение
Химотрипсин, трипсин, эстеразы, субтилизин, тромбин, эластаза	ОН(серин)	Ацилсерин
Папаин, фицин, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	SH(цистеин)	Ацилцистеин
Щелочная фосфатаза, фосфоглюкомутаза	ОН(серин)	Фосфосерин
Сукцинилтиокиназа, фосфоенолпировиноградной кислоты-гексоза трансфосфорилаза	Имидазол(гистидин)	Фосфорилимидазол
Альдолаза, декарбоксилаза и пиридоксальные ферменты	$>C=O$ и $>C=N-$ (лизин и аминокислота субстрата)	Основание Шиффа

2.1. Нуклеофильный катализ

1. К нуклеофильным группам ферментов, которые участвуют в катализе относятся:

-ОН (серин, тирозин)

-SH (цистеин)

-COOH (аспарагиновая кислота), NH₂- (лизин), Имидазол (гистидин)

Все нуклеофильные группы, как правило, имеют свободную пару электронов.

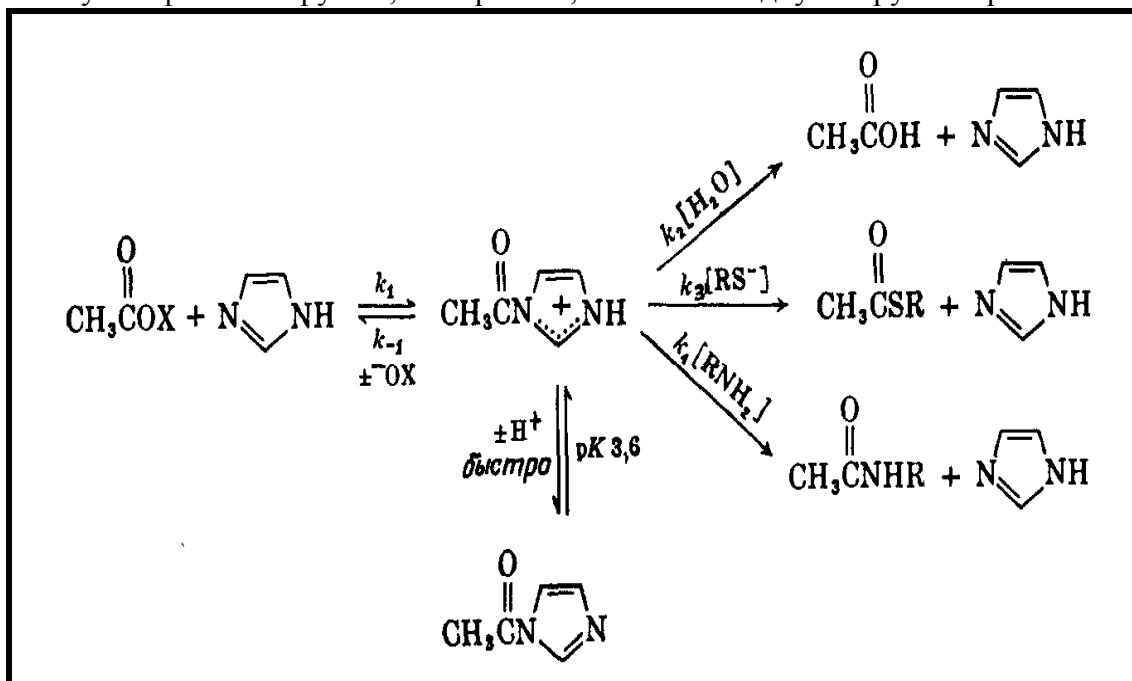


Рис7. Нуклеофильный катализ

2.2. Электрофильный катализ

(основная роль – стабилизация образующихся отрицательных зарядов)

Примеры электрофильных катализаторов:

1. ионы металлов.
2. пиридоксальфосфат (пиридиновое кольцо оттягивает на себя электроны, эффективно стабилизируя отрицательный заряд.
3. тиаминпирофосфат

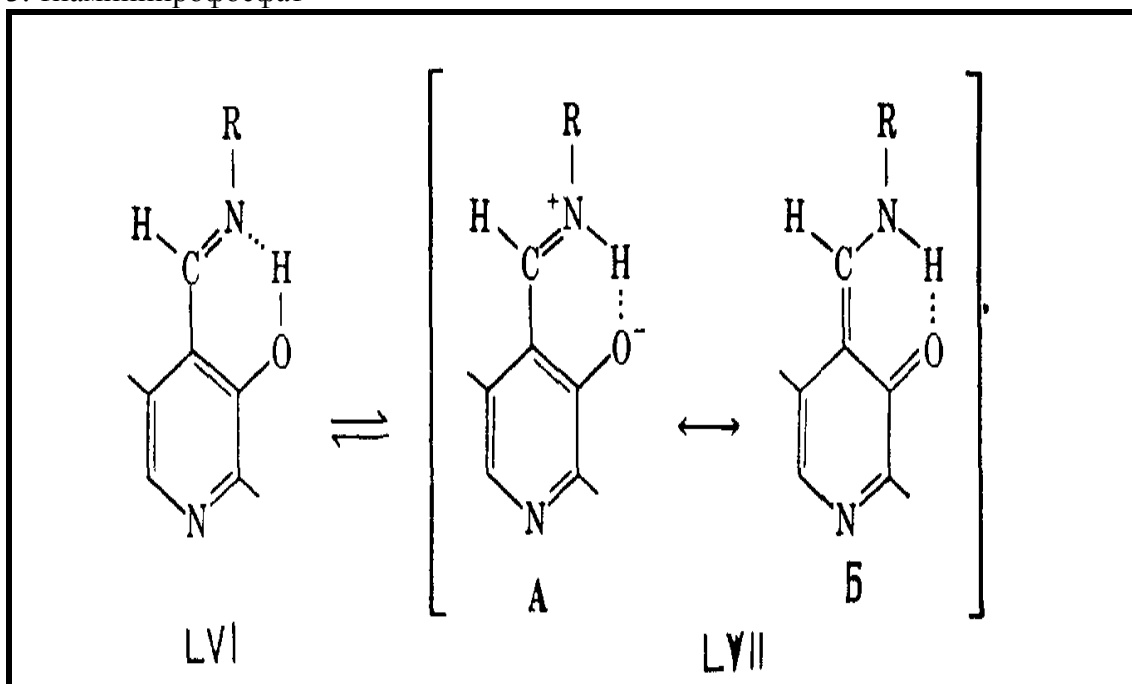


Рис.8 Пиридоксаль фосфат конденсируется с аминокислотами, образуя основание Шиффа. Пиридиновое кольцо оттягивает на себя электроны, эффективно стабилизируя отрицательный заряд.

3. Общий кислотно-основной катализ

- 3.1. Кислотный катализ. Катализируется ионами водорода, кислотами.
- 3.2. Основной катализ. Катализируется основаниями

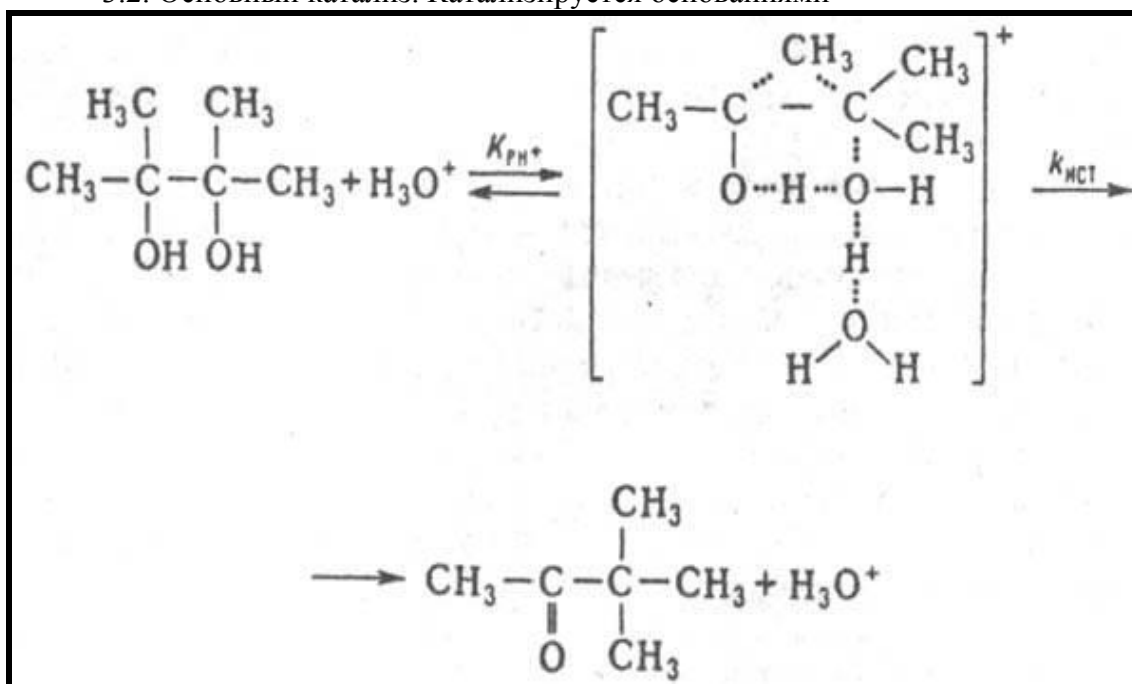


Рис.9

Классификация реакций (по стадиям)

Последовательные многостадийные цепи реакций (гликолиз).

$A \rightarrow B \rightarrow V \rightarrow G \dots P$

В такой цепи скорость образования конечного продукта определяется скоростью самой медленной стадии (узкое место)

-Разветвленные реакции с образованием различных конечных продуктов. Пример: превращение ацетил –КоА:

ацетил –КоА идет в цикл Кребса, на синтез жирных кислот, на другие синтетические процессы.

-Замкнутые циклы (цикл Кребса или орнитиновый цикл)

Классификация реакций

-Ферментативная реакция: $E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$

-Обратимые (двухсторонние для ферментативных реакций) (переаминирование)

-Необратимые (односторонние для ферментативных реакций) (АТФ-азная реакция)

Ферментативные реакции можно классифицировать по числу участников.

- 1. односубстратные (ацетилхолинэстераза)
- 2. двухсубстратные. (креатинкиназа, миокиназа, переаминирование, цитохром P450)

Иногда в ходе реакции участвует один субстрат и один кофермент. Такие реакции описываются как двухсубстратные (лактатдегидрогеназа)

Раздел 3. Термодинамика ферментативного катализа

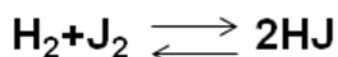
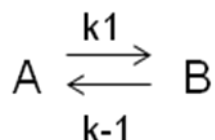
Химическая термодинамика использует законы термодинамики применительно к химическим и физико-химическим явлениям. Она рассматривает тепловой и энергетический баланс процессов, а также химические и фазовые равновесия.

Вопросы теплообразования и энергетики играют важную роль в ферментативной кинетике. Термодинамические параметры системы описывают только данное состояние, не учитывая предшествующих. Следовательно, изменение параметров при переходе системы из одного состояния в другое не зависит от пути реакции, а определяется только термодинамическими параметрами начального и конечного состояний.

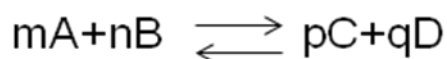
Любое изменение термодинамической системы. Приводящее к изменению хотя бы одного термодинамического параметра, называется термодинамическим процессом. Термодинамические параметры однозначны только для обратимых процессов, когда система находится в равновесии в любой момент времени и в каждой ее части. Если вывести систему из устойчивого равновесия, то возникает термодинамический процесс, препятствующий внешнему воздействию (принцип Ле Шателье - Брауна).

Обратимые реакции

Химические реакции, которые при одних и тех же условиях могут идти в противоположных направлениях, называются обратимыми.



Состояние, в котором скорость обратной реакции равна скорости прямой реакции, называется химическим равновесием.



$$v_1 = k_1 [A]^m [B]^n$$

$$v_{-1} = k_{-1} [C]^p [D]^q$$

Иногда константу скорости обратной реакции обозначают k_2

$$k_1 [A]^m [B]^n = k_2 [C]^p [D]^q$$

$K = k_1 / k_2 = [C]^p [D]^q / [A]^m [B]^n$ - математическое выражение закона действующих масс при химическом равновесии.

K - константа равновесия, представляющая собой отношение констант скоростей прямой и обратной реакции (отношение равновесных концентраций продуктов к исходным веществам).

Константы скорости прямой и обратной реакций k_1 и k_2 характеризуют

1. химическую природу реагирующих веществ
2. их способность вступать в химические реакции

$$K = k_1 / k_2 = [C]^p [D]^q / [A]^m [B]^n$$

K - константа равновесия, представляющая собой отношение констант скоростей прямой и обратной реакции (отношение равновесных концентраций продуктов к исходным веществам).

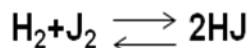
Чем больше скорость прямой реакции, тем больше константа равновесия, и наоборот

СМЕЩЕНИЕ ХИМИЧЕСКОГО РАВНОВЕСИЯ.

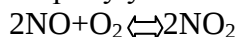
Принцип Ле Шателье.

Внешнее воздействие на систему, находящуюся в состоянии равновесия приводит к смещению этого равновесия, при котором эффект проведенного воздействия ослабляется
Факторы, влияющие на смещение равновесия

Концентрация. При увеличении концентрации одного из реагирующих веществ равновесие смещается в сторону расхода этого вещества, при уменьшении концентрации равновесие смещается в сторону образования этого вещества.



Давление (для газовых систем). При увеличении давления равновесие смещается в сторону уменьшения молекул газообразных веществ, т.е. в сторону понижения давления.



3 об. 2 об.

при повышении давления равновесие сместится в сторону прямой реакции, в сторону образования NO_2

Температура. При повышении температуры равновесие смещается в сторону эндотермической реакции (идущей с поглощением тепла). При понижении температуры - в сторону экзотермической реакции.



Прямая реакция экзотермическая,

Обратная – эндотермическая

При повышении температуры равновесие смещается в сторону обратной реакции

Интегральное определение порядка реакции и констант скоростей обратимых реакций

Мономолекулярные реакции первого порядка



k_1 – константа скорости прямой реакции

k_2 – константа скорости обратной реакции

$t = 0$, $[\text{A}] = a$, $[\text{B}] = 0$, а в момент времени t

$[\text{A}] = a - x$, $[\text{B}] = x$, x – образовалось

При достижении равновесия

$$v_1 = v_{-1}$$

$$x = x_{\text{равн}}$$

$$k_1 (a - x_{\text{равн}}) = k_{-1} x_{\text{равн}}$$

$$a - x_{\text{равн}} = (k_{-1} / k_1) x_{\text{равн}}$$

$$dx/dt = (k_1 a / x_{\text{равн}}) (x_{\text{равн}} - x)$$

После интегрирования получим

$$(x_{\text{равн}} / a) \ln(x_{\text{равн}} / [x_{\text{равн}} - x]) = k_1 t$$

a – начальная концентрация

x – концентрация в момент времени t

$x_{\text{равн}}$ – равновесная концентрация

$$(x_{\text{равн}}/a) \ln(x_{\text{равн}}/[x_{\text{равн}} - x])$$

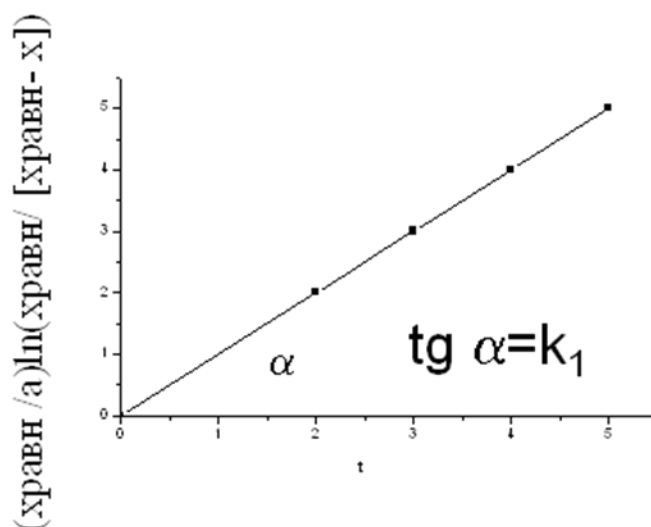


Рис.18 График обратимой реакции первого порядка $(x_{\text{равн}}/a) \ln(x_{\text{равн}}/[x_{\text{равн}} - x]) = k_1 t$,
а - концентрация вещества А

Константа скорости обратной реакции k_{-1} может быть вычислена из константы равновесия K по известной k_1

$$K = k_1/k_{-1} = x_{\text{равн}}/(a - x_{\text{равн}})$$

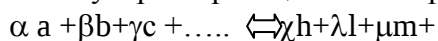
$$k_{-1} = K/k_1 = x_{\text{равн}}/(a - x_{\text{равн}}) k_1$$

Обратимые реакции разных порядков. Константы скорости обратимых химических реакций.

Тип реакции	k_1
$A \rightleftharpoons B$ $A \rightleftharpoons B + C$	$((x_{\text{равн}}/a) \ln(x_{\text{равн}}/[x_{\text{равн}} - x]))/t$ $[x_{\text{равн}}/t (2a - x_{\text{равн}})] \ln\{[ax_{\text{равн}} + x(a - x_{\text{равн}})]/a(x_{\text{равн}} - x)\}$
$A + B \rightleftharpoons C$ Если $[A] = [B]$	$[x_{\text{равн}}/t(a^2 - x_{\text{равн}}^2)] \ln\{[x_{\text{равн}}(a^2 - xx_{\text{равн}})]/a^2(x_{\text{равн}} - x)\}$
$A + B \rightleftharpoons C$ Если $[A]$ не равно $[B]$	$[x_{\text{равн}}/t(ab - x_{\text{равн}}^2)] \ln\{[x_{\text{равн}}(ab - xx_{\text{равн}})]/ab(x_{\text{равн}} - x)\}$

Реакция n-го порядка

Для состояния равновесия различных обратимых реакций в общем случае для n-молекулярной реакции n-го порядка можно записать



$$V_{\text{пр}} = V_{\text{обр}}$$

$$K = k_1(\text{пр})/k_2(\text{обр})$$

Влияние температуры на скорость реакции

Скорость любой химической реакции при повышении температуры увеличивается, если при этом не происходит вторичных изменений реагентов или катализатора.

Изменение константы скорости в зависимости от температуры

Влияние температуры на скорость реакции. Правило Вант-Гоффа.

При повышении температуры на каждые десять градусов скорость реакции возрастает в 2-4 раза.*

$$V(T_2)/V(T_1) = \gamma^{(T_2 - T_1)/10}, \gamma - \text{температурный коэффициент скорости реакции.}$$

Константу скорости реакции при температуре, превышающей исходную на ΔT можно рассчитать

$$k(T + \Delta T) = k_T \gamma^{\Delta T/10}$$

*Исключением из этого правила является уменьшение скорости ферментативной реакции при температурах, вызывающих денатурацию фермента

Наиболее существенным фактором, определяющим характер влияния температуры на скорость реакции, является кинетическая энергия реагентов, так как из кинетической теории следует, что она зависит только от абсолютной температуры.

Уравнение Вант-Гоффа выражает скорость изменения величины $\ln K$ в зависимости от температуры (уравнение изобары Вант-Гоффа).

$$\text{Дифференциальная форма } d(\ln K)/dT = \Delta H^0 / R \cdot 1/T^2$$

$$\text{Интегральная форма } \ln K_2/K_1 = \Delta H^0 (T_2 - T_1) / R(T_2 T_1)$$

K_2, K_1 – константы равновесия обратимых реакций при температурах T_2 и T_1 соответственно.

ΔH^0 – энтальпия реакции, равная разности энергий активации прямой и обратной реакций

$$\Delta H^0 = E_1 - E_{-1} = E \text{ (Дж/моль)}$$

Казалось бы, такая зависимость связана с увеличением молекулярных столкновений, но при повышении температуры на десять градусов общее число столкновений возрастает на несколько процентов, тогда как число прореагировавших молекул возрастает на 200-400%. Чтобы объяснить наблюдаемые расхождения Сванте Аррениус показал, что влияние температуры сводится к увеличению числа активных молекул, т.е. таких молекул, которые в момент столкновения обладают энергией, не меньше определенной для данной химической реакции величины, называемой энергией активации химической реакции. Энергия активации – это некоторое избыточное количество энергии (по сравнению со средой), необходимое для вступления молекул в реакцию. Поскольку константа равновесия представляет собой отношение констант скоростей прямой и обратной реакции, С. Аррениус предположил, что аналогичная математическая форма описывает влияние температуры на константу скорости реакции.

Согласно Аррениусу, константа скорости химической реакции зависит от температуры экспоненциально $k = A e^{-E/(RT)}$. E – энергия активации (Дж/моль) или величина потенциального барьера, который нужно преодолеть, чтобы началась реакция, R – универсальная газовая постоянная, 1,987 кал/моль град или 8.314 Дж/моль град, T – температура в К, A – константа (множитель Аррениуса, предэкспоненциальный множитель, вероятностный фактор), e – основание натуральных логарифмов 2, 71828.

Различные формы уравнения Аррениуса

$$\ln k = -E_a/RT + \ln A$$

$$\ln k_{T2}/k_{T1} = E_a (T_2 - T_1) / R(T_2 T_1)$$

$$d(\ln K)/dT = E_a / R \cdot 1/T^2 \text{ (дифференциальная форма уравнения Аррениуса)}$$

E_a – энергия активации

Или в случае ферментативной реакции $V = k[Enz]_0$

$$\ln V = -E_a/RT + \text{const}$$

$\ln k = -E_a/RT + \ln A$ (A – константа). Эта форма уравнения Аррениуса очень удобна для графического выражения данных в координатах $\ln k$ и $1/T$

$$E_a = -4,576 \text{ tg } \alpha$$

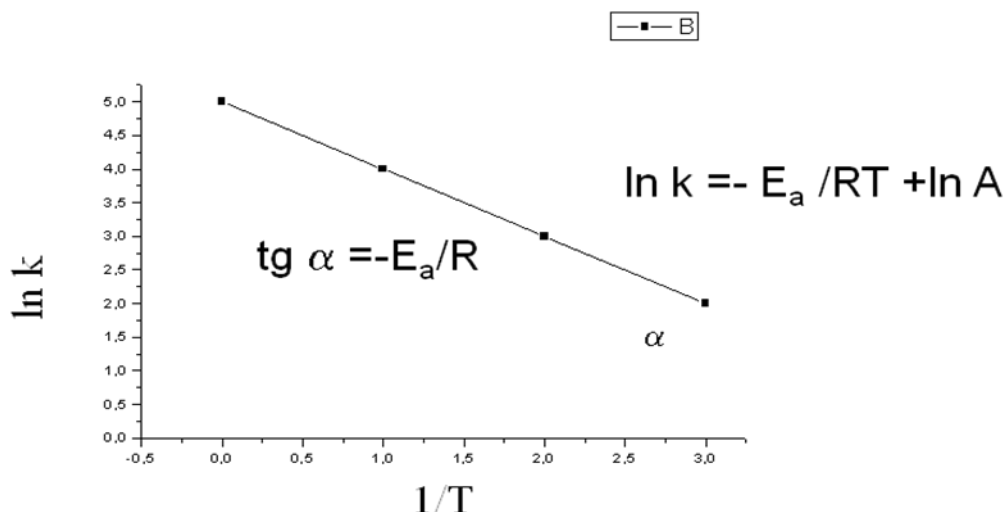


Рис.19 Зависимость логарифма константы скорости от обратной температуры. (На оси ординат часто вместо константы скорости откладывают логарифм скорости $\ln V$).

Если начальные концентрации всех компонентов реакционной смеси поддерживаются постоянными и изменяют только температуру, то скорости реакций будут подчиняться уравнению Аррениуса. Энергия активации в отличие от ΔH (изменение энтальпии) всегда имеет положительный знак и равна молярному увеличению энергии, которое необходимо сообщить реагирующим молекулам для образования продуктов. Энергия активации E_a представляет собой критическую (минимальную) энергию активации. Выражение $e^{-E/(RT)}$ отражает долю молекул, обладающих такой энергией. Аррениус полагал, что скорость реакции определяется не только экспоненциальным членом, но и частотой молекулярных столкновений и вероятностью того, что сталкивающиеся молекулы будут иметь благоприятную ориентацию. В уравнении $k = A e^{-E/(RT)}$ обе эти величины объединены в один член A – предэкспоненциальный или вероятностный фактор A часто принимают равным 1. По теории Аррениуса отношение числа активных молекул $N_{ак}$ к общему числу молекул N , т.е. доля активных молекул $\alpha = N_{ак} / N = e^{-E/(RT)}$.

Задача

Во сколько раз увеличится доля активных молекул, если температура возрастет от 0° до 100° С при средних значениях энергии активации $E = 20$ ккал, $R = 1,985$ кал./град, $e = -2,71828$.

Решение

По теории Аррениуса отношение числа активных молекул $N_{ак}$ к общему числу молекул N , т.е. доля активных молекул $\alpha = N_{ак} / N = e^{-E/(RT)}$

$$\alpha_{100} / \alpha_0 = e^{20000 \cdot 100 / 1,985 \cdot 273 \cdot 373} = 20\,000$$

$$k = A e^{-E/(RT)}$$

Энергия активации E_a равна активационной энтальпии $\Delta H^\#$ с обратным знаком

$$E_a = -\Delta H^\#$$

$$k = A e^{\Delta H^\# / (RT)}$$

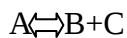
Энергия активации E_a всегда имеет положительный знак

Активационная энтальпия $\Delta H^\#$ может иметь разные знаки (Дж/моль)

Определение констант скорости релаксационным методом

Константы скорости быстрых реакций нельзя измерять обычными способами. Для определения таких констант используют релаксационный метод Эйгена с измерением времени релаксации. Систему выводят из равновесного состояния. Возмущение может

быть вызвано резким изменением температуры (Т-скачок, метод температурного скачка), давления, pH и/или других параметров реакционной смеси. Время возмущения 10^{-6} – 10^{-9} с. Обычно с помощью мощного электрического разряда достигается мгновенное повышение температуры в реакционной ячейке. Измеряют время установления нового равновесия в системе. Временем релаксации τ называют время, необходимое для уменьшения отклонения от этого нового времени в e раз (e - основание натурального логарифма).



k_1 – константа скорости прямой реакции, k_{-1} – константа скорости обратной реакции, $[A]=a$, $[B]=[C]=x$, в состоянии равновесия $x=x_{\text{равн}}$

$$dx/dt = k_1(a-x) - k_{-1}x^2$$

$$\text{В состоянии равновесия } k_1(a-x) = k_{-1}x^2$$

Отклонение от равновесного значения после возмущения $\Delta x = x - x_{\text{равн}}$

$(\Delta x)_0$ - смещение концентрации реагента от ее равновесного значения без возмущения.

Временем релаксации τ называют время, необходимое для уменьшения отклонения от этого нового времени в e раз (e - основание натурального логарифма).

По определению, время релаксации τ - это время, за которое $(\Delta x)_0 / \Delta x = e$

Временем релаксации τ называют время, необходимое для уменьшения отклонения от этого нового времени в e раз (e - основание натурального логарифма). $\tau = 1/(k_1 + 2k_{-1}x_{\text{равн}})$, основное уравнение релаксации: $(\Delta x) / (\Delta x)_0 = \exp(-t/\tau)$

Отклонение от равновесного значения после возмущения $\Delta x = x - x_{\text{равн}}$

Уравнение, задающее наклон кривой, можно получить, продифференцировав основное уравнение релаксации.

$$(\Delta x) / (\Delta x)_0 = \exp(-t/\tau)$$

$(\Delta x)_{\text{tg}} = (\Delta x)_0(1-t/\tau)$ (уравнение задающее наклон кривой при $t=0$), касательная пересекает ось абсцисс в точке $t = \tau$.

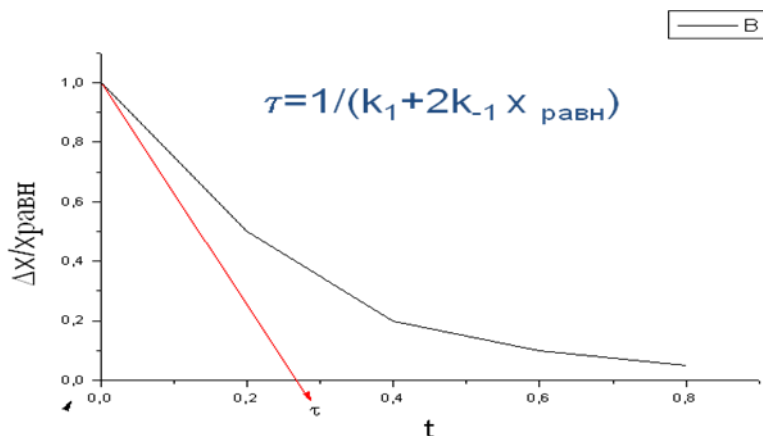
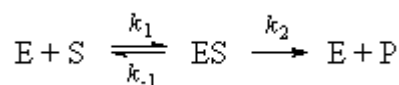
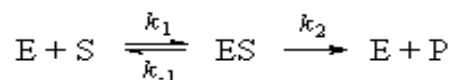


Рис.20 Процесс релаксации $(\Delta x)_{\text{tg}} = (\Delta x)_0(1-t/\tau)$ касательная пересекает ось абсцисс в точке $t = \tau$. $\tau = 0,27\text{с}$

$\tau = 1/(k_1 + 2k_{-1}x_{\text{равн}})$. Измерив время релаксации и зная $x_{\text{равн}}$ (равновесные концентрации) получим соотношение между константами прямой и обратной реакции k_1 и k_{-1} . $K = k_1 / k_{-1}$



Применение релаксационных методов для ферментативных реакций. Для ферментативных реакций $K_{\text{равн}} = k_1 / k_{-1} = [ES] / [E][S]$, $\tau = 1/(k_1 + 2k_{-1}x_{\text{равн}})$. По времени релаксации можно определить соотношение констант прямой и обратной реакции.



$V=k [A]$, Размерность константы скорости первого порядка c^{-1} .

$$\frac{d \Delta [X]}{dt} = - \frac{\Delta [X]}{\tau}$$

где $\Delta[X]$ -отклонение концентрации реагента или продукта(по изменению концентрации которого производится регистрация кинетики) от равновесной; τ -константа,характеризующая скорость достижения нового положения равновесия и называемая временем релаксации. Время релаксации - величина, обратная константе скорости псевдопервого порядка. Ее связь с кинетическими и изучаемыми параметрами равновесной системы, а также равновесными концентрациями реагентов определяется характером конкретной системы. Реакциями псевдопервого порядка называются реакции второго порядка, в которых концентрация одного из реагентов столь высока, что остается практически постоянной на протяжении всей реакции.

Влияние температуры на скорость химических и ферментативных реакций.

$\ln k = -E_a / RT + \ln A$; $\ln k_{T2}/k_{T1} = E_a (T2-T1) / R(T2T1)$ -(различные формы уравнения Аррениуса, 1889 г.), E_a – энергия активации

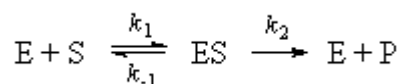
Или в случае ферментативной реакции $V=k[Enz]_0$

$$\ln V_{max} = -E_a / RT + \text{const}$$

Согласно Аррениусу, константа скорости химической реакции зависит от температуры экспоненциально $k=A e^{-E/(RT)}$, E - энергия активации (Дж/моль) или величина потенциального барьера, который нужно преодолеть, чтобы началась реакция, R - универсальная газовая постоянная, 1,987 кал/моль град или 8.314 Дж/моль град, T -температура в К, A – константа (множитель Аррениуса, предэкспоненциальный множитель, вероятностный фактор), фактор частоты, размерность как у константы скорости первого порядка, c^{-1} , e –основание натуральных логарифмов 2, 71828.

Раздел 4. Кинетика ферментативного катализа

Ферментативный катализ



В обычных химических реакциях концентрация реагентов намного выше, чем в ферментативных реакциях. Однако, ферментативные реакции протекают в 10^{11-13} раз быстрее некаталитических. Несмотря на низкие концентрации, т.е. малое число столкновений, число эффективных столкновений возрастает за счет эффекта сближения и эффекта ориентации. Эффект сближения отражает свойство фермента (и других катализаторов) селективно увеличивать локальную концентрацию реагентов. Связывание субстратов на поверхности фермента осуществляется таким образом, что они принимают ориентацию, оптимальную для облегчения взаимодействия – эффект ориентации. Эффект напряжения отражает возможность прикрепления субстрата к ферменту в двух или нескольких местах. В результате такого связывания разрушаемая связь ослабляется благодаря поляризации электронных оболочек и изменению углов связей, и энергия активации, требующаяся для разрушения этой связи, понижается.

Активные центры ферментов

В основе катализа лежит представление о том, что каталитический цикл осуществляется совокупностью атомов, которые составляют активный центр. Для ферментов под активным центром понимают совокупность фрагментов аминокислот, осуществляющих связывание (сорбцию) субстрата, его химическую активацию и превращение. Активный центр фермента имеет сложную конфигурацию, он включает как полярные (гидрофильные), так и неполярные (гидрофобные) группы. Представление об активном центре сформировалось в результате анализа данных по ингибированию реакций и химической модификации белковой молекулы. Активный центр фермента осуществляет две функции:

1. сорбцию субстрата (комплексобразование субстрата с ферментом)
2. химическое превращение субстрата

Условно в активном центре можно выделить сорбционный и каталитический участки.

Сайт-специфический мутагенез

Новые возможности идентификации групп, входящих в активные центры ферментов, появились с развитием техники сайт-специфического мутагенеза (генетическая инженерия ферментов). Для ферментов, экспрессию генов которых можно проводить с помощью генно-инженерных конструкций типа плазмид, возможна замена отдельных аминокислот на уровне ДНК (на уровне кодонов) с последующей экспрессией и изучением каталитических свойств получаемых белков.

Сорбционный и каталитический участки.

Сорбционный подцентр, ответственный за связывание, фиксацию и ориентацию субстратов, определяет специфичность действия ферментов. При связывании органических молекул (или ионов) в поверхностном слое белковой глобулы действуют те же силы, которые обычно возникают при межмолекулярных взаимодействиях. Среди механизмов, которые играют главную роль при образовании комплекса фермент-субстрат в воде, отметим следующие: 1) образование ковалентной связи; 2) гидрофобное взаимодействие между аполярными (углеводородными) фрагментами субстратной молекулы и дегидратированными областями поверхностного слоя глобулы; 3) электростатическое взаимодействие между заряженной группой субстрата и ионизованными аминокислотными остатками полипептидной цепи; 4) образование водородной связи.

Общим для большинства ферментативных систем является то, что субстрат связывается с активным центром двумя или большим числом точек.

Каталитический подцентр, осуществляющий химическое превращение молекул субстрата и использующий для этих целей различные механизмы катализа.

Природа ферментативного катализа.

Удивительная особенность ферментативного катализа состоит в том, что фермент специфическим образом связывает субстрат и все реакции протекают внутри фермент-субстратного комплекса.

Растворы низкомолекулярных субстратов – это истинные растворы с размерами частиц менее 1 нм. Растворы ферментов являются коллоидными растворами с размером частиц 1-100 нм. В обычных химических реакциях концентрация реагентов выше, чем в ферментативных реакциях. Однако, ферментативные реакции протекают в 10^{11-13} раз быстрее некаталитических. Это связано:

- 1) с эффектом сближения (он наблюдается и в неферментативных реакциях), который приводит к селективному увеличению локальной концентрации реагентов,
- 2) с эффектом ориентации, так как связывание субстратов на поверхности фермента осуществляется таким образом, что они принимают ориентацию, оптимальную для облегчения взаимодействия,
- 3) с эффектом напряжения, он отражает возможность прикрепления субстрата к ферменту в двух или нескольких местах. В результате такого связывания разрушаемая связь ослабляется благодаря поляризации электронных оболочек и изменению углов связей, энергия активации, требующаяся для разрушения этой связи, понижается.

Раствор фермента в концентрации 10^{-11} М эквивалентен по реакционной способности 10 М раствору кислоты.

Значения константы скорости второго порядка реакции гидролиза мочевины

Реагент	катализатор	температура, С	k (моль/л с)
мочевина	H_3O^+	62	$7.4 \cdot 10^{-7}$
мочевина	уреаза	21	$5.0 \cdot 10^6$

Механизм действия ферментов.

Основными моментами в механизме действия ферментов является избирательность действия в отношении структуры субстрата, в ряде случаев ферменты обладают абсолютной специфичностью, катализируя превращение только одного вещества и не реагируя с его производными или гомологами, и проявление специфичности в зависимости от условий реакции (так например одна и та же реакция- гидролиз амидной связи в пептидах - ускоряется химотрипсином при значениях pH, близких к нейтральным, тогда как другая протеаза - пепсин-функционирует только в кислой среде).

Ферментативная реакция – это, как правило, многостадийный процесс, в котором на первой стадии образуется комплекс между ферментом и субстратом. Чаще всего эта стадия представляет собой сорбцию субстрата на ферменте, обусловленную, например, их гидрофобным, полярным и (или) ионным взаимодействием.

Влияние температуры на ферментативные реакции

1. Некоторые стадии ферментативных реакций являются обратимыми и реагируют на изменение температуры.
2. Температурная зависимость ряда кинетических параметров позволяет определять термодинамические параметры ферментативного катализа.
3. Применимость уравнений Вант-Гоффа, уравнения Аррениуса для ферментативного катализа позволяет определять кинетические, термодинамические и активационные параметры.

Уравнение Вант-Гоффа

$$\ln K_2/K_1 = \Delta H (T_2 - T_1) / R(T_2 T_1)$$

K_2 , K_1 – константы равновесия обратимых реакций при температурах T_2 и T_1 соответственно, ΔH –энтальпия реакции.

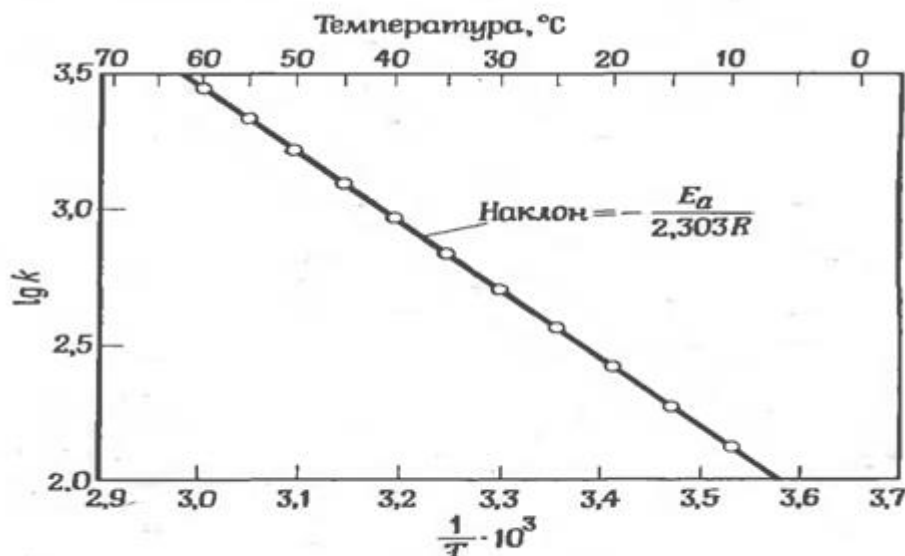


Рис.21 Влияние температуры на скорость ферментативной реакции. Определение энергии активации $\ln k = -E_a/RT + \ln A$ (уравнение Аррениуса).

Классификация ферментативных реакций

Альберти

Клеланду

Фермент-субстратный комплекс

Скорость ферментативной реакции

Прежде чем перейти к рассмотрению кинетики ферментативных реакций, нужно установить, что мы принимаем за скорость ферментативной реакции, как ее охарактеризовать и как ее определить экспериментально.

Для ферментативной реакции скорость зависит существенно от количества добавленного фермента, т.е. скорость реакции будет являться мерой каталитической активности фермента. Эта мера часто называется «активностью фермента» и выражается в стандартных единицах.

«единица количества фермента»-Е-это его количество, которое превращает один моль субстрата (S) в 1 минуту в стандартных условиях. (насыщающие концентрации субстрата, оптимум pH, температура 25°C, избыток кофактора)

«удельная активность»- активность единицы веса фермента в стандартных условиях; она выражается в мкмольх превращенного субстрата в мин. на мг белка.

«молекулярная активность»- число молекул субстрата, претерпевающих превращение в стандартных условиях под действием одной молекулы фермента за 1 минуту.

«активность каталитического центра»- число молекул субстрата, претерпевающих превращение в стандартных условиях в одном каталитическом центре за 1 минуту.

Удельная активность и скорость ферментативной реакции выражаются в мкмольх, однако это не одно и то же, т.к. удельная активность-это величина, полученная в определенных стандартных условиях.

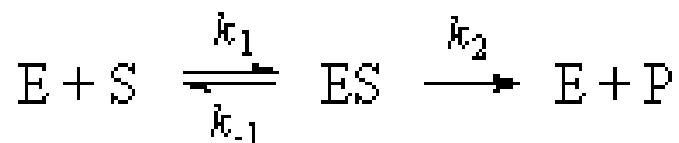
О скорости ферментативной реакции можно судить как по убыли субстрата, так и по приросту продукта.

Практическое определение скорости ферментативной реакции осуществляется на основании определения начальной скорости ферментативной реакции. Начальная скорость- это скорость в первые моменты инкубации, пока еще сохраняется пропорциональная зависимость между нарастанием продукта и временем инкубации, пока превращению подверглось не более 10-15% субстрата.

Итак, основное правило работы с ферментами – определять начальную скорость ферментативной реакции, иначе любое кинетическое исследование или ингибиторный анализ теряют всякий смысл.

Стационарная кинетика ферментативных реакций.
Кинетические схемы и механизмы

Фундаментальное представление о механизме ферментативной реакции является представление о фермент-субстратном комплексе, образующемся при превращении субстрата в продукт под действием фермента.



Субстрат образует комплекс с активным центром фермента, в комплексе происходят фермент-субстратные изменения, образуются продукты реакции, которые уходят из активного центра, освобождая его для взаимодействия с новой молекулой субстрата. Доказательством существования ФСК являются результаты изучения кинетики реакций, катализируемых ферментами.

Стационарное состояние – это состояние системы, с постоянной во времени концентрацией промежуточных соединений при избытке субстрата.

В стационарной кинетике концентрация ФСК – величина постоянная, при таком динамическом равновесии сумма скоростей всех реакций, приводящих к образованию ФСК, равна сумме скоростей всех реакций, приводящих к его распаду. Например, в стационарном состоянии скорость увеличения численности населения данной страны равна скорости его убыли. Концентрация метаболита в клетке стационарна, если скорость его образования равна скорости распада. При смешивании фермента с большим избытком субстрата наблюдается предстационарный период, во время которого концентрация промежуточных соединений выходит на стационарный уровень. Затем скорость реакции меняется сравнительно медленно, и можно считать, что концентрации промежуточных соединений являются стационарными. Скорость ферментативных реакций измеряют на стационарном участке.

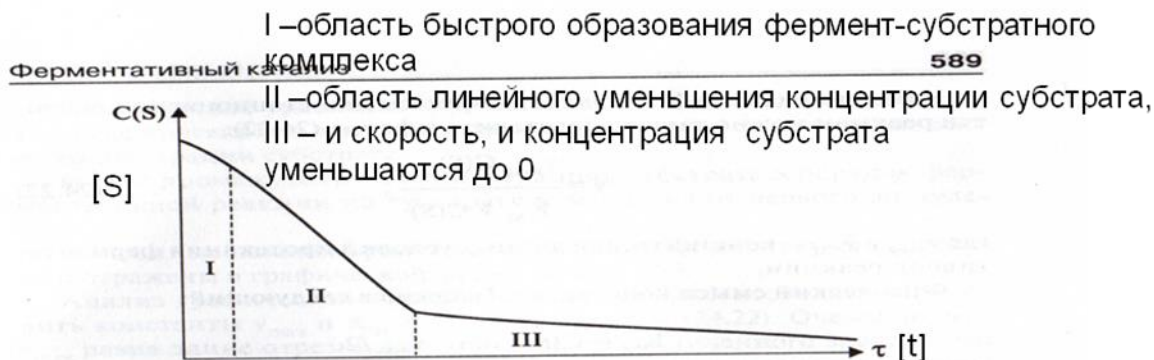


Рис. 24.1. Кинетическая кривая субстрата S; $C(S)$ – концентрация субстрата S; τ – время

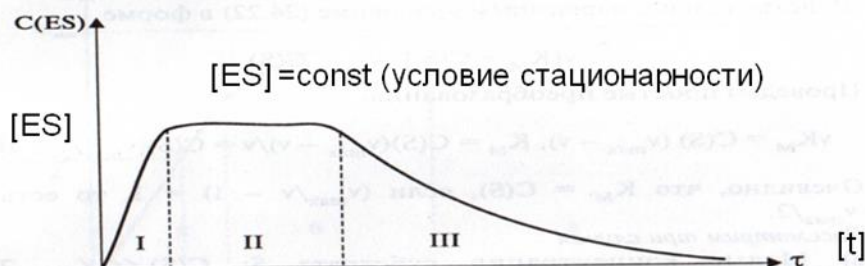


Рис. 24.2. Кинетическая кривая субстрат-ферментного комплекса ES; $C(ES)$ – концентрация ES; τ – время

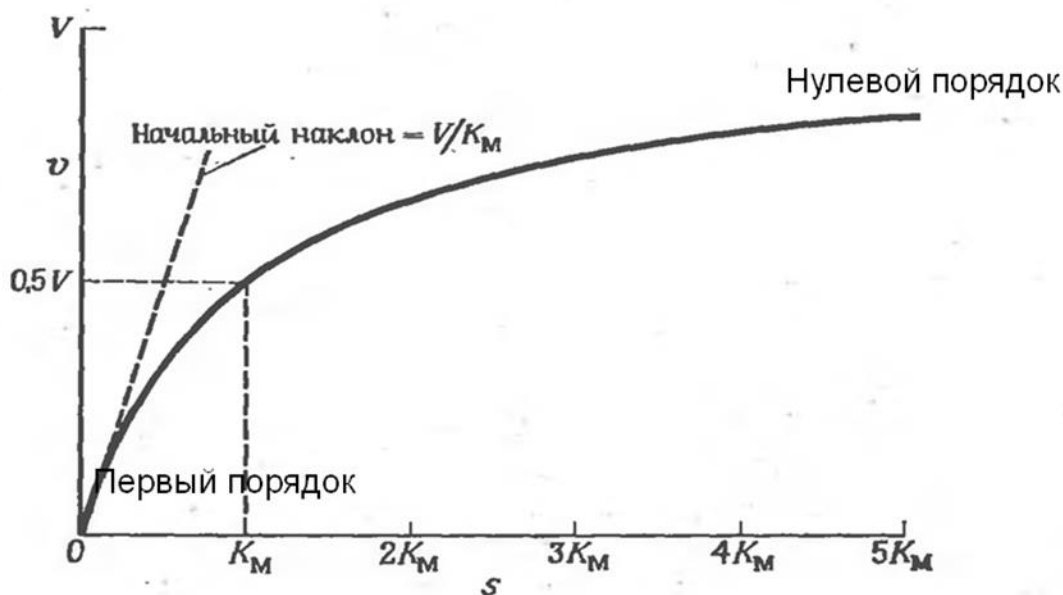


Рис. 2.1. График зависимости начальной скорости v от концентрации субстрата s для реакции, подчиняющейся уравнению Михаэлиса — Ментен. (Михаэлис и Ментен этот график не использовали и предложений применять его не давали.)

Рис.22. Типичная зависимость начальной скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата

Зависимость начальной скорости реакции v_0 от начальной концентрации субстрата S_0 описывается гиперболической функцией

$$V_0 = V_m S_0 / (K_m + S_0)$$

$y = ax / (b + x)$ - уравнение гиперболы

V_m - максимальная скорость

K_m - константа Михаэлиса

При низких концентрациях субстрата реакция протекает в соответствии с уравнением первого порядка. При высоких концентрациях скорость перестает зависеть от концентрации и реакция протекает в соответствии с уравнением нулевого порядка. Самая ранняя попытка математически описать ферментативные реакции была предпринята Дюкло в 1898 г.

Браун и независимо от него Анри, впервые выдвинули гипотезу об образовании фермент-субстратного комплекса в ходе реакции.

В 1913 г. Михаэлис и Ментен опубликовали свою теорию общего механизма ферментативных реакций:



Михаэлис и Ментен предположили, что скорость реакции определяется распадом комплекса ES, т.е. константой k_2

Начальную скорость реакции можно выразить как $V_0 = k_2[ES]$ (скорость пропорциональна произведению концентраций реагирующих веществ)

Константа диссоциации фермент-субстратного комплекса (субстратная константа)

$$K_s = [E][S] / [ES] = k_{-1}/k_1$$

Концентрация свободного фермента

$$[E] = K_s [ES] / [S]$$

Общая концентрация фермента

$$[E]_{\text{общ}} = [E] + [ES] = K_s [ES] / [S] + [ES]$$

Отношение начальной скорости к теоретически возможной максимальной скорости равно отношению $[ES]$ к $[E]_{\text{общ}}$

$$V_0 / V_m = [ES] / [E]_{\text{общ}}$$

$$V_0 = V_{\max} [S] / K_s + [S]$$

Классическое уравнение Михаэлиса-Ментен (1913 г.)

$$V_0 = \frac{k_{\text{cat}} [E]_0 [S]}{K_s + [S]}$$

V_0 начальная скорость реакции

В 1925 г. Бриггс и Холдейн доказали, что уравнение Михаэлиса-Ментен справедливо, если $k_2 \ll k_{-1}$ т.е. когда равновесие элементарной стадии устанавливается очень быстро по сравнению со скоростью следующей стадии.

$$K_s = K_M$$

$$K_s = [E][S] / [ES] = k_{-1}/k_1$$

Если k_2 сравнима с k_{-1} , то

$$K_M = (k_{-1} + k_2) / k_1$$

КОНСТАНТА Михаэлиса имеет размерность КОНЦЕНТРАЦИИ (моль/л)

$$V_0 = V_{\max} [S] / K_M + [S]$$

Если $k_{-1} \ll k_2$

$$K_k = k_2 / k_1$$

K_k - Кинетическая константа (по определению Ван Слайка)

K_m численно равна концентрации субстрата, при которой скорость ферментативной реакции равна половине максимальной $v = 1/2 V_{\max}$.

При отсутствии субстратного торможения насыщающими будут такие концентрации субстрата, которые превосходят величину K_m по крайней мере в 10 раз.



Рис. 2.1. График зависимости начальной скорости v от концентрации субстрата s для реакции, подчиняющейся уравнению Михаэлиса — Ментен. (Михаэлис и Ментен этот график не использовали и предложенный применять его не давали.)

Рис. 23. Типичная зависимость начальной скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата

Зависимость начальной скорости реакции v_0 от начальной концентрации субстрата S_0 описывается гиперболической функцией

$$V_0 = V_m S_0 / (K_m + S_0)$$

$y = ax / b + x$ - уравнение гиперболы

V_m - максимальная скорость

K_m - константа Михаэлиса

$$V_0 = V_{\max} [S] / K_M + [S]$$

Уравнение Михаэлиса-Ментен справедливо если:

- 1) образуется кинетически устойчивый фермент-субстратный комплекс,
- 2) определяемая константа K_s является константой диссоциации ФСК, $k_2 \ll k_{-1}$
- 3) концентрация субстрата не меняется в ходе реакции, т.е. концентрация свободного субстрата равна его начальной концентрации,
- 4) продукт реакции быстро отщепляется от фермента,
- 5) вторая стадия реакции необратима,
- 6) с каждым активным центром фермента связывается только одна молекула субстрата,
- 7) для всех реагирующих веществ можно использовать вместо активностей их концентрации

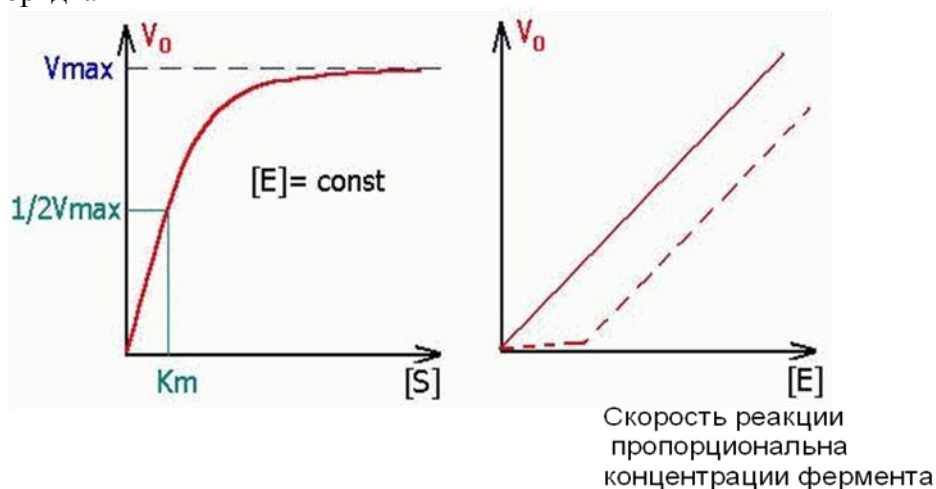
Стационарная кинетика ферментативных реакций.

Кинетические схемы и механизмы

Фундаментальное представление о механизме ферментативной реакции является представление о фермент-субстратном комплексе, образующемся при превращении субстрата в продукт под действием фермента. Субстрат образует комплекс с активным центром фермента, в комплексе происходят фермент-субстратные изменения, образуются продукты реакции, которые уходят из активного центра, освобождая его для взаимодействия с новой молекулой субстрата. Доказательством существования ФСК являются результаты изучения кинетики реакций, катализируемых ферментами.

Стационарное состояние — это состояние системы, с постоянной во времени концентрацией промежуточных соединений при избытке субстрата.

В стационарной кинетике концентрация ФСК – величина постоянная, при таком динамическом равновесии сумма скоростей всех реакций, приводящих к образованию ФСК, равна сумме скоростей всех реакций, приводящих к его распаду. Например, в стационарном состоянии скорость увеличения численности населения данной страны равна скорости его убыли. Концентрация метаболита в клетке стационарна, если скорость его образования равна скорости распада. При смешивании фермента с большим избытком субстрата наблюдается предстационарный период, во время которого концентрация промежуточных соединений выходит на стационарный уровень. Затем скорость реакции меняется сравнительно медленно, и можно считать, что концентрации промежуточных соединений являются стационарными. Скорость ферментативных реакций измеряют на стационарном участке. При низких концентрациях субстрата реакция протекает в соответствии с уравнением первого порядка. При высоких концентрациях скорость перестает зависеть от концентрации и реакция протекает в соответствии с уравнением нулевого порядка



Самая ранняя попытка математически описать ферментативные реакции была предпринята Дюкло в 1898 г. Браун и независимо от него Анри, впервые выдвинули гипотезу об образовании фермент-субстратного комплекса в ходе реакции.

В 1913 г. Михаэлис и Ментен опубликовали свою теорию общего механизма ферментативных реакций:



Михаэлис и Ментен предположили, что скорость реакции определяется распадом комплекса ES, т.е. константой k_2

Начальную скорость реакции можно выразить как $V_0 = k_2[ES]$ (скорость пропорциональна произведению концентраций реагирующих веществ)

Константа диссоциации фермент-субстратного комплекса (субстратная константа)

$$K_s = [E][S] / [ES] = k_{-1}/k_1$$

Концентрация свободного фермента

$$[E] = K_s [ES] / [S]$$

Общая концентрация фермента

$$[E]_{\text{общ}} = [E] + [ES] = K_s [ES] / [S] + [ES]$$

Отношение начальной скорости к теоретически возможной максимальной скорости равно отношению $[ES]$ к $[E]_{\text{общ}}$

$$V / V_m = [ES] / [E]_{\text{общ}}$$

$$V = V_{\text{max}}[S] / K_s + [S]$$

Классическое уравнение Михаэлиса-Ментен (1913 г.)

$$V = \frac{k_{\text{cat}} [E]_0 [S]}{K_s + [S]}$$

V начальная скорость реакции

Формально классическое уравнение Михаэлиса-Ментен соответствует изотерме Ленгмюра, показывая, что фермент действует как гетерогенный катализатор

$$\Gamma = \Gamma_{\infty} C / (C + b)$$

Γ - относительное количество адсорбированного вещества,

Γ_{∞} - максимальное количество адсорбированного вещества при насыщающем давлении, b - постоянная величина, характерная для данного адсорбированного вещества, некоторая постоянная для данной пары адсорбент-адсорбат величина (отношение констант скоростей десорбции и адсорбции), численно равная концентрации адсорбата, при которой занята половина активных центров

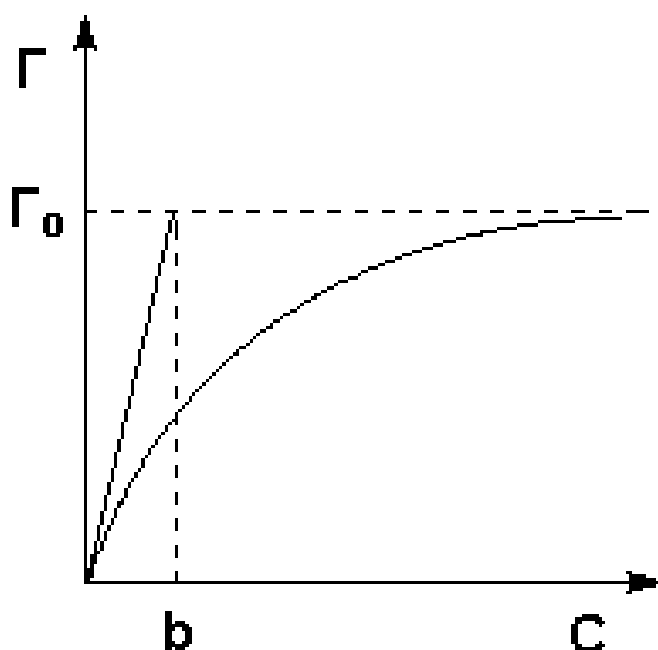


Рис.24. Изотерма Ленгмюра $\Gamma = \Gamma_{\infty} C / (C + b)$

В 1925 г. Бриггс и Холдейн доказали, что уравнение Михаэлиса-Ментен справедливо, если $k_2 \ll k_{-1}$ т.е. когда равновесие элементарной стадии устанавливается очень быстро по сравнению со скоростью следующей стадии.

$$K_s = K_M$$

$$K_s = [E][S] / [ES] = k_{-1}/k_1$$

Если k_2 сравнима с k_{-1} , то

$$K_M = (k_{-1} + k_2) / k_1$$

КОНСТАНТА Михаэлиса имеет размерность КОНЦЕНТРАЦИИ (моль/л)

$$V = V_{\text{max}} [S] / K_M + [S]$$

Если $k_{-1} \ll k_2$

$$K_k = k_2 / k_1$$

K_k - Кинетическая константа (по определению Ван Слайка).

K_M численно равна концентрации субстрата, при которой скорость ферментативной реакции равна половине максимальной $v = 1/2 V_{\text{max}}$.

При отсутствии субстратного торможения насыщающими будут такие концентрации субстрата, которые превосходят величину K_M по крайней мере в 10 раз.

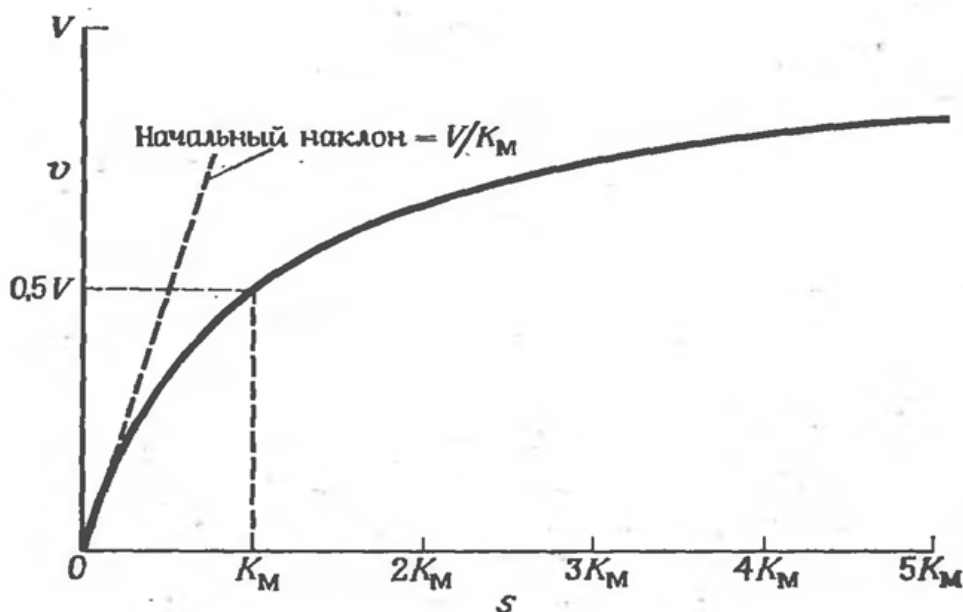


Рис.25. Типичная зависимость начальной скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата

Зависимость начальной скорости реакции v от начальной концентрации субстрата S_0 описывается гиперболической функцией

$$V = V_m S_0 / (K_m + S_0)$$

$y = ax / b + x$ - уравнение гиперболы

V_m - максимальная скорость

K_m - константа Михаэлиса

$$V = V_{\max} [S] / K_M + [S]$$

$$V = k_2 [E]_0 [S] / K_M + [S]$$

Уравнение Михаэлиса-Ментен справедливо если:

- 1) образуется кинетически устойчивый фермент-субстратный комплекс,
- 2) определяемая константа K_s является константой диссоциации ФСК, $k_2 \ll k_{-1}$
- 3) концентрация субстрата не меняется в ходе реакции, т.е. концентрация свободного субстрата равна его начальной концентрации,
- 4) продукт реакции быстро отщепляется от фермента,
- 5) вторая стадия реакции необратима,
- 6) с каждым активным центром фермента связывается только одна молекула субстрата,
- 7) для всех реагирующих веществ можно использовать вместо активностей их концентрации

Кинетика Бриггса-Холдейна (1925 г., George E. Briggs, John B.S. Haldane)

Когда k_2 сравнима с k_{-1} , то

$$K_M = (k_{-1} + k_2) / k_1$$

$$\text{т.к. } K_S = [E][S] / [ES] = k_{-1} / k_1$$

$$K_M = K_S + k_2 / k_1$$

КОНСТАНТА Михаэлиса имеет размерность КОНЦЕНТРАЦИИ (моль/л)

$$V = V_{\max} [S] / K_M + [S]$$

Физический смысл параметров уравнения Михаэлиса-Ментен

1. Смысл константы k_{cat}

$$V = k_{\text{cat}} [ES]$$

Для механизма Бриггса-Холдейна (k_2 сравнима с k_{-1}), когда комплекс EP диссоциирует очень быстро, $k_{\text{cat}} = k_2$

$$V = k_2 [ES]$$

При смешивании фермента с большим избытком субстрата наблюдается предстационарный период, во время которого концентрация промежуточных соединений выходит на стационарный уровень. Затем скорость реакции меняется сравнительно медленно, и можно считать, что концентрации промежуточных соединений являются стационарными. Скорость ферментативных реакций измеряют на стационарном участке. Зависимость начальной скорости реакции v_0 от начальной концентрации субстрата S_0 описывается гиперболической функцией

$$V_0 = V_m S_0 / (K_m + S_0)$$

$y = ax / b + x$ - уравнение гиперболы

V_m - максимальная скорость

K_m - константа Михаэлиса

Если диссоциация комплекса ЕР протекает медленно, то константа скорости этого процесса вносит вклад в параметр k_{cat}

Параметр k_{cat} называют числом оборотов фермента, поскольку он определяет максимальное число молекул субстрата, превращающихся в продукт одним активным центром в единицу времени.

Несмотря на то, что $K_M = K_S$ - истинной константе диссоциации фермент-субстратного комплекса - только для простого механизма Михаэлиса –Ментен $k_2 \ll k_{-1}$,

K_M можно рассматривать как кажущуюся константу диссоциации

K_M является мерой количества фермента, связанного в той или иной форме с субстратом.

Смысл параметра

$$k_{cat} / K_M$$

$V = (k_{cat} / K_M) [E_0] [S]$ при низких концентрациях субстрата, т.е. отношение k_{cat} / K_M представляет собой кажущуюся константу скорости второго порядка.

Параметр k_{cat} / K_M определяет специфичность действия фермента при наличии конкурирующих субстратов (каталитическая эффективность или константа специфичности, catalytic efficiency or specificity constant, размерность $M^{-1} s^{-1}$).

$$k_{cat} / K_M = k_{cat} k_1 / k_{-1} + k_2$$

Методы определения V_{max} и K_M

Эти параметры могут быть определены из экспериментальных данных.

Из данных по стационарной кинетике параметры V_{max} и K_M определяют с помощью линеаризации уравнения Михаэлиса-Ментен.

Метод Лайнуивера – Бэрка

$$1/v = K_M/V \cdot 1/[S] + 1/V$$

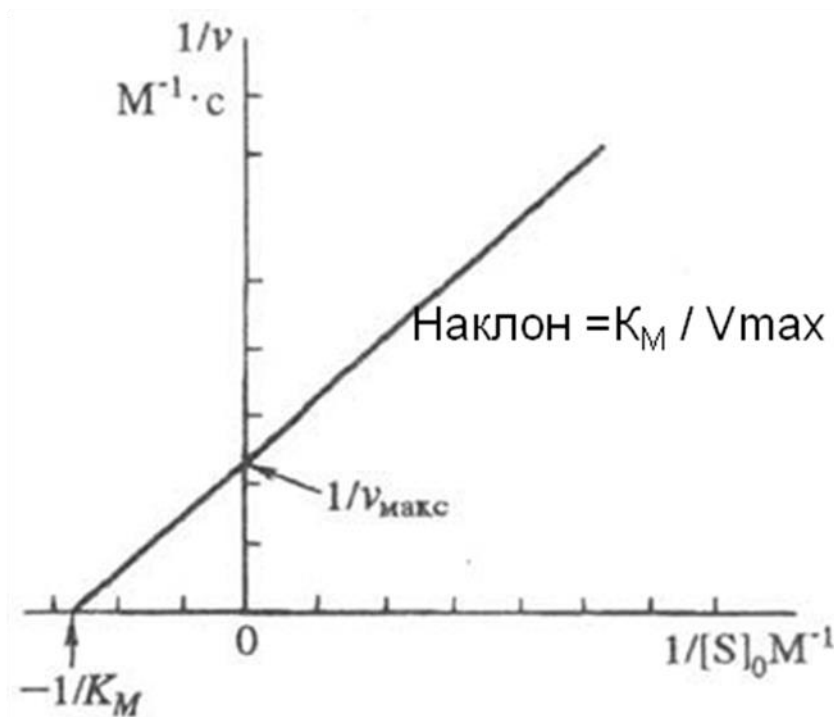


Рис. 26. Метод двойных обратных координат (метод Лайнуивера - Бэрка)

График, построенный в координатах

$1/V$; $1/S$ представляет собой прямую, с тангенсом угла наклона $K_M / V_{\max}$

Отрезок, отсекаемый на оси ординат при $1/S = 0$, равен $1/V_{\max}$, а на оси абсцисс $-1/K_M$

Метод Эди (Иди)-Хофсти (метод Скэтчарда)

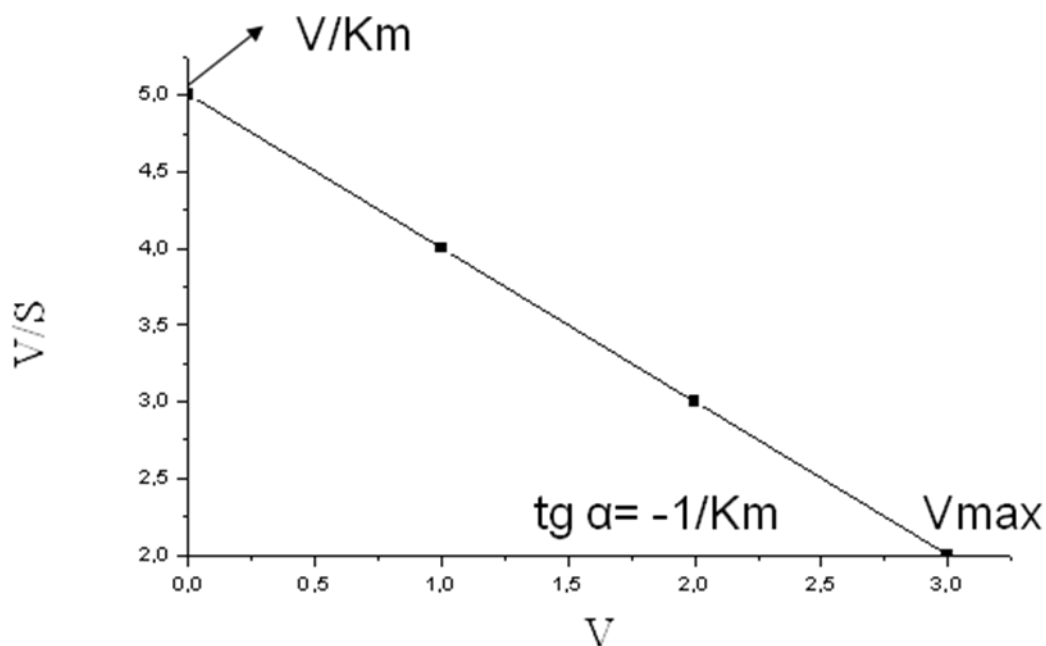


Рис.27. Метод Эди-Хофсти (метод Скэтчарда)

Отрезок, отсекаемый на оси абсцисс $V_{\max}$, на оси ординат V/K_M

Для графика Эди (Иди)-Хофсти иногда дают координаты

$$Y \text{ --- } v$$

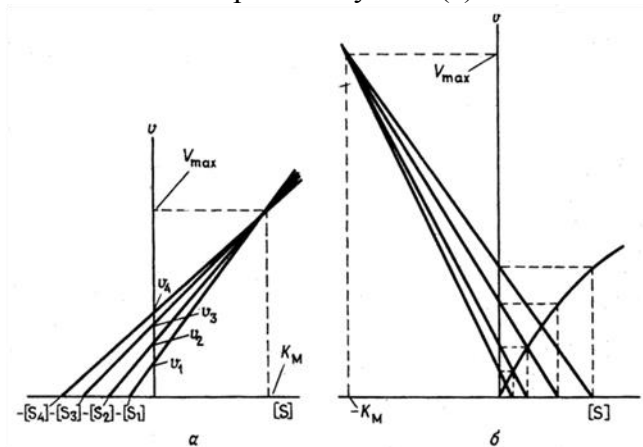
$$X \text{ --- } v/[S]$$

$$V = V_{\max} - K_M v/[S]$$

Дополнительные методы линейаризации уравнения Михаэлиса-Ментен.

1. Метод двойных обратных координат (метод Лайнуивера-Берка) $1/v$, $1/[S]$.

2. Метод Иди-Хофсти ($v/[S]$, v)
 3. Метод Эйзенталя и Корниш-Бодена («прямой график» Эйзенталя и Корниш-Бодена) (v , $[S]$).
 4. Метод де Мигуэл Марино и Тамари (δ) (v , $[S]$).
- Метод Эйзенталя и Корниш-Бодена (а) и метод де Мигуэл Марино и Тамари (б)



а- метод Эйзенталя и Корниш-Бодена б -метод де Мигуэл Марино и Тамари

Рис.28.

Каждой концентрации субстрата $[S]_i$ на кинетической кривой соответствует значение начальной скорости v_i

$i=1, \dots, n$

Значения $[S]_i$ с обратным знаком откладываются на оси абсцисс, на оси ординат – значения v_i

Через полученные пары точек проводят прямые, пересекающие оси координат в точках $(-[S]_i, 0)$ и $(0, v_i)$

Проекция общей точки пересечения прямых на горизонтальную ось x равна K_M , на ось y равна V_{max}

Метод де Мигуэл Марино и Тамари

Метод де Мигуэл Марино и Тамари в основном аналогичен методу Эйзенталя и Корниш-Бодена.

Прямые линии проводят через точки с координатами $([S]_i, 0)$, и $(0, v_i)$, соответствующей каждой паре значений $[S]_i, v_i$ кинетической кривой. Прямые пересекаются во втором квадранте, точка их пересечения дает значения $(-K_M), V_{max}$.

Определение концентрации активных центров

Максимальная скорость реакции V_{max} равна $V_{max} = k_{cat} \cdot E_0$

k_{cat} –эффективная каталитическая константа скорости лимитирующей стадии, характеризующая число каталитических циклов, совершаемых активным центром в единицу времени E_0 – концентрация активных центров фермента.

Методы определения концентрации активных центров ферментов

1. Определение по содержанию белка.

Если известно, что фермент содержит один активный центр на молекулу белка и в растворе присутствует только один белок, молекулярная масса которого известна, концентрацию активных центров можно определить исходя из содержания белка в растворе $E_0 = p/M$, p – концентрация белка (масса белка), M –молекулярная масса белка

2. Определение по простетической группе.

Для некоторых ферментов меткой активного центра является простетическая группа. Например, для ферментов, образующих прочный комплекс с гемом (гемопротейны) определение концентрации активных центров сводится к определению в растворе гема или его производных.

3. Определение методом необратимого ингибирования.

Если для фермента известен ингибитор, необратимо блокирующий активный центр, то можно использовать метод, основанный на измерении остаточной активности фермента после инкубации его с ингибитором при варьировании концентрации ингибитора I_0

$$V_0 = k(E_0 - I_0)$$

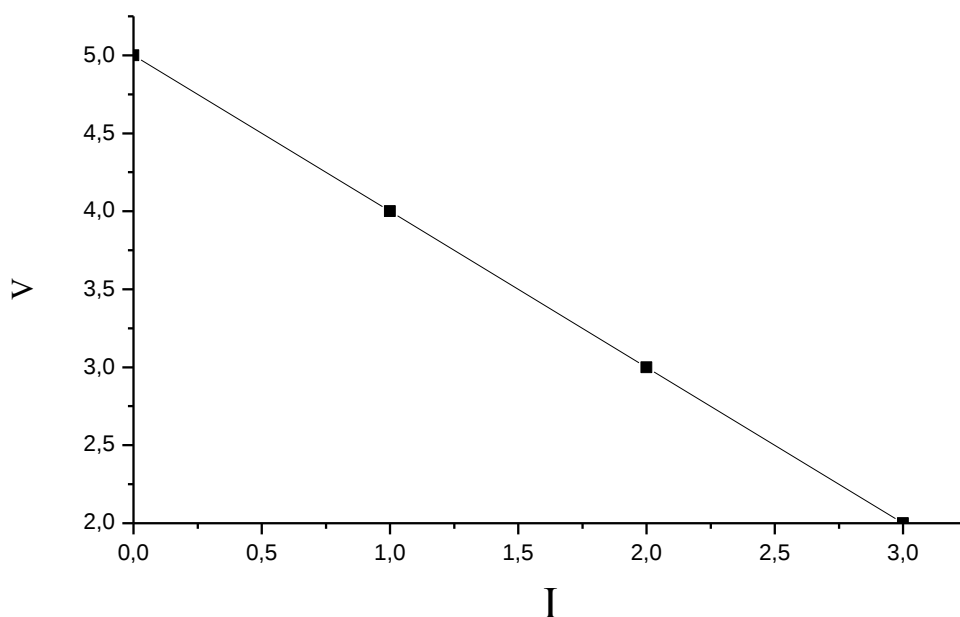


Рис. 29. E_0 — концентрация активных центров фермента
 $V_0 = k(E_0 - I_0)$

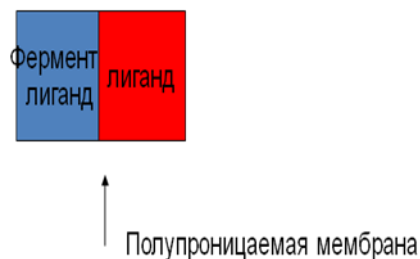
Определение констант диссоциации фермент-субстратных комплексов

Несмотря на то, что $K_M = K_S$ - истинной константе диссоциации фермент-субстратного комплекса - только для простого механизма Михаэлиса –Ментен $k_2 \ll k_{-1}$, K_M можно рассматривать как кажущуюся константу диссоциации. Более ценную информацию может дать предстационарная кинетика, т.к. в этом случае стадии химического превращения субстрата и стадии связывания можно разграничить. Начальная или предстационарная фаза, занимающая доли секунды, характеризуется быстрым увеличением образования продукта и быстрым увеличением концентрации ФСК. Это увеличение продолжается до тех пор, пока не установится динамическое равновесие (стационарная фаза), затем, по мере исчерпания субстрата, система снова выходит из стационарного состояния (нестационарная фаза)

Экспериментальные методы определения констант диссоциации фермент-субстратных комплексов

1. Равновесный диализ.

Этот метод позволяет прямо измерить концентрацию свободного и связанного с ферментом лиганда.



После установления равновесия, отобрав пробу из ячейки, содержащей белок, определяют сумму концентраций свободного и связанного лиганда, в другой ячейке — только свободный лиганд (субстрат).

Равновесная гель-фильтрация

Гели для гель-фильтрации (сефадекс, биогель) имеют поры такого размера, что в них помещаются небольшие молекулы лигандов (субстратов), для белковых молекул эти поры малы. Белок «проскакивает» через сефадекс, в случае колонки, уравновешенной лигандом, белок связывает лиганд, и перемещает его с такой скоростью, как движется сам. На выходе можно определить концентрацию связанного лиганда.

Ультрацентрифугирование

При ультрацентрифугировании измеряют УФ (или Vis) –поглощение непосредственно в ходе седиментации.

Например, связывание тРНК с аминокислот-тРНК-синтетазой регистрируется по изменению УФ-поглощения

Спектральные методы.

- ЯМР
- Флуоресценция
- Поляризация флуоресценции
- Спектроскопия в УФ или видимом диапазоне
- Оптическая дисперсия (дисперсия оптического вращения)
- Рассеяние света

Графическое представление данных по связыванию молекул лигандов белкам.

Кинетический метод

1. Уравнение Клотца

Преобразуя уравнение Лайнуивера-Берка

$$1/v = K_m/V \cdot 1/[S] + 1/V$$

получаем уравнение Клотца

$$[E]_t / [S]_b = K_s / n [S]_f + 1/n.$$

$[S]_b$ –концентрация связанного лиганда (субстрата), которая равна количеству занятых центров связывания

n –число идентичных мест связывания на молекуле фермента

Чтобы избежать превращения субстрата, можно подобрать его аналог, не подвергающийся превращения, но обладающий хорошим сродством к ферменту. Скорость v пропорциональна $[S]_b$ и V_{max} пропорциональна $n[E]_t$

$$1/[S]_b = (K_s/n[E]_t)1/[S]_f + 1/n[E]_t$$

$[S]_f$ - концентрация свободного лиганда (free)

$[E]_t$ – общая концентрация фермента (total)

Уравнение можно привести к виду

$$[E]_t / [S]_b = K_s / n [S]_f + 1/n$$

Уравнение Клотца

$$[E]_t / [S]_b = K_s / n [S]_f + 1/n \quad (\text{Уравнение Клотца})$$

Согласно соотношению Стокелла, полученному при дальнейшем преобразовании уравнения Клотца, $d/p = K([E] - p) + n$ (соотношение Стокелла), n –число молекул субстрата (лиганда), связанных с ферментом, $[E]$ - молярная концентрация свободного фермента, K –константа диссоциации (величина, обратная константе связывания, ($K=1/K_s$)).

$p = \Delta\epsilon / \Delta\epsilon_{max}$ - отношение изменения поглощения при образовании комплекса фермент - лиганд к максимальному изменению поглощения, d – молярная концентрация S (субстрата, лиганда)

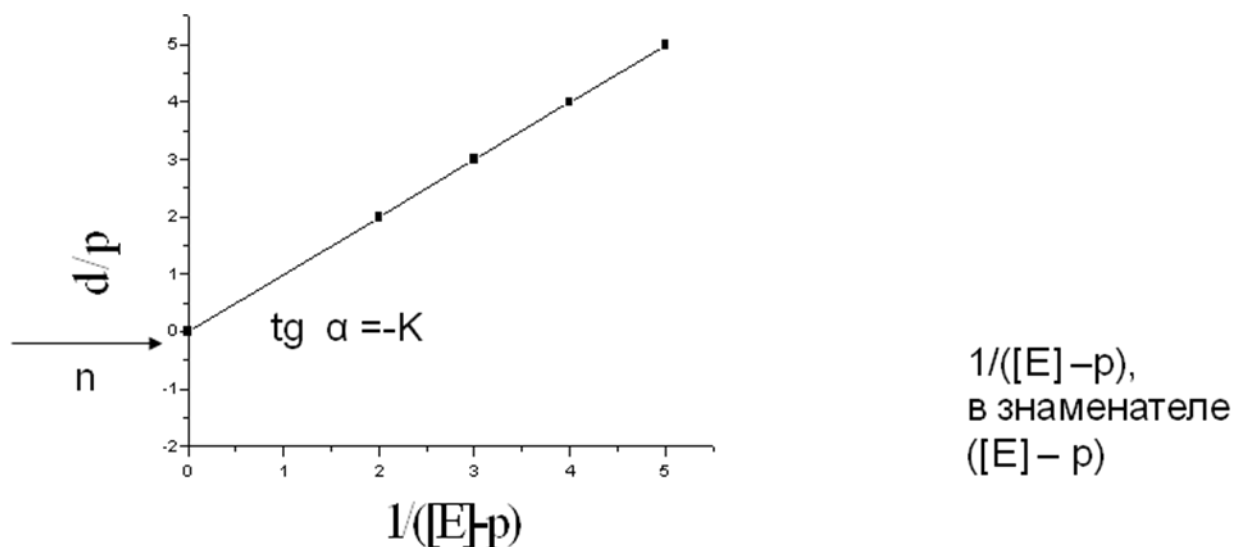


Рис.30. Уравнение Клотца и соотношение Стокелла $d/p = K([E] - p) + n$, n – число молекул субстрата (лиганда), связанных с ферментом

Метод Скэтчарда

Уравнение Эди (Иди)-Хофсти можно преобразовать в уравнение Скэтчарда, описывающее связывание лиганда. Обработка данных проводится по графику зависимости

$$v / [S]_{\text{free}} \text{ от } v,$$

v - количество молей лиганда, связанного с белком или количество занятых участков.

$[S]_{\text{free}}$ - концентрация свободного субстрата (лиганда) при равновесии

$$E]_b / n [E]_f = [S]_t / K_s - [E]_b / K_s$$

$$K = v / [S]_{\text{free}} (n - v)$$

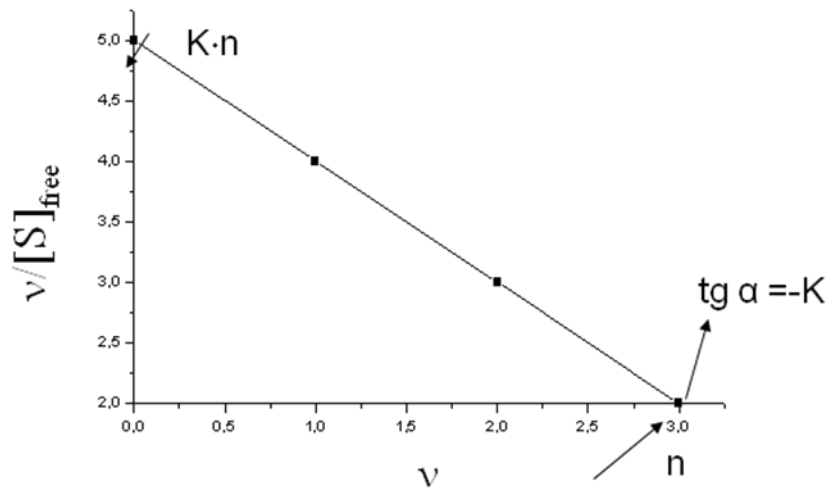
v - количество молей лиганда, связанных с белком, $[S]_{\text{free}}$ – концентрация свободного лиганда (субстрата) при равновесии, n - количество участков на ферменте, способных связывать лиганд, K – кажущаяся константа сродства (обратная константе диссоциации)

$$v / [S]_{\text{free}} = Kn - Kv$$

Уравнение прямой для построения графика в координатах Скэтчарда

ν – количество молей лиганда, связанных с белком

$[S]_{\text{free}}$ – концентрация свободного лиганда (субстрата) при равновесии



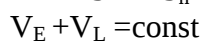
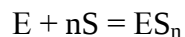
n – число идентичных мест связывания на молекуле фермента

K – кажущаяся константа сродства, константа ассоциации, величина, обратная константе диссоциации из графика Стокелла

Рис.31. График Скэтчарда $v/[S]_{\text{free}} = Kn - Kv$

Метод непрерывной вариации Джоба

Если можно измерить количество связанного или свободного лиганда и количество образовавшегося комплекса, можно использовать уравнение Скэтчарда. В некоторых случаях мы не можем измерить эти величины, а можем определить только концентрацию образовавшегося комплекса. Тогда применяют метод непрерывной вариации Джоба. Если все лиганды связываются с рецептором (ферментом) по одностадийному механизму или взаимодействие между центрами связывания так велико, что после связывания первой молекулы лиганда мгновенно связываются все остальные, т.е.



Объемы раствора фермента и лиганда данной концентрации соответственно

n – количество связанных молекул лиганда

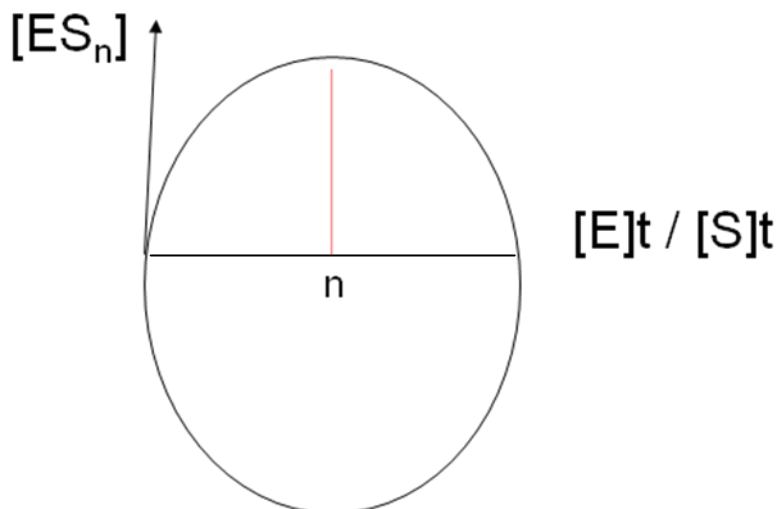


Рис.32

Построив график зависимости концентрации комплекса ES_n от изменяемой величины $[E]_t / [S]_t$ при постоянной величине $[E]_t + [S]_t$, получаем колоколообразную кривую с максимумом в точке p .

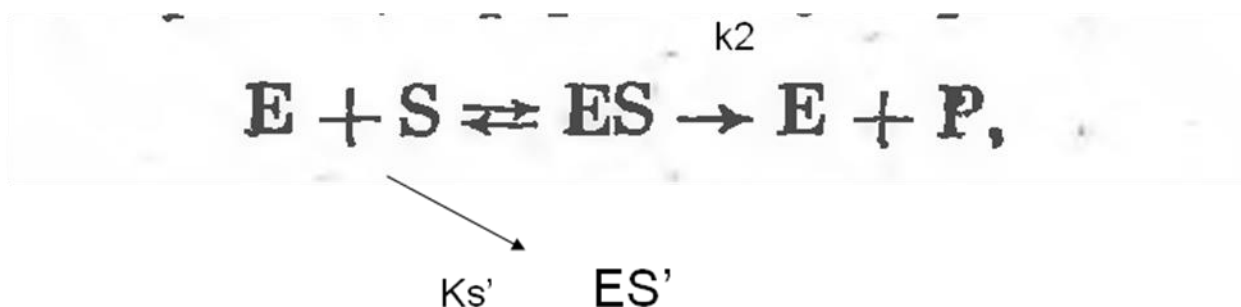
p — число идентичных мест связывания на молекуле фермента

Если молекулы лиганда связываются с ферментом последовательно одна за другой, а центры связывания независимы, можно использовать метод Джоба.

Если при последовательном связывании лиганда (субстрата) центры связывания взаимозависимы, для определения p метод Джоба применять нельзя.

Непродуктивное связывание

Известны случаи, когда наряду с продуктивным связыванием субстрата с активным центром фермента происходит связывание таким образом, что образуется неактивный комплекс. Такие случаи называются непродуктивным связыванием



ES' непродуктивный комплекс

Влияние непродуктивного связывания на механизм Михаэлиса – Ментен

проявляется в уменьшении обоих параметров k_{cat} и K_M . Параметр k_{cat} уменьшается из-за того, что при насыщении продуктивно связывается только часть субстрата. K_M становится меньше K_s , поскольку наличие дополнительных вариантов связывания должно приводить к более прочному связыванию.

На соотношение k_{cat} / K_M не влияет наличие дополнительного способа связывания, поскольку k_{cat} и K_M изменяются пропорционально.

$$k_{cat} / K_M = k_2 / K_s$$

Если непродуктивно связывающий центр связывает субстрат в 1000 раз прочнее, чем продуктивно связывающий, то K_M будет в 1000 раз меньше K_s .

Однако, поскольку из 1000 молекул продуктивно связывается только одна,

k_{cat} будет в 1000 раз меньше, чем k_2

Нестационарная (предстационарная) кинетика ферментативных реакций

Кинетика в предстационарной фазе позволяет изучать самые начальные этапы реакции, когда равновесие в системе не установилось. В предстационарной фазе происходит ускорение реакции по мере образования ФСК.

Начальная или предстационарная фаза, занимающая доли секунды (несколько миллисекунд), характеризуется быстрым увеличением образования продукта и быстрым увеличением концентрации ФСК. Это увеличение продолжается до тех пор, пока не установится динамическое равновесие (стационарная фаза), затем, по мере исчерпания субстрата, система снова выходит из стационарного состояния (нестационарная фаза)

Превращения субстрата проходят через ряд короткоживущих промежуточных соединений, изучение реакционной способности которых помогает выяснить механизм ферментативного катализа. Наиболее надежную информацию о кинетике промежуточных стадий дает изучение нестационарного режима их протекания. Для этого используют методы изучения быстрых реакций в растворах.

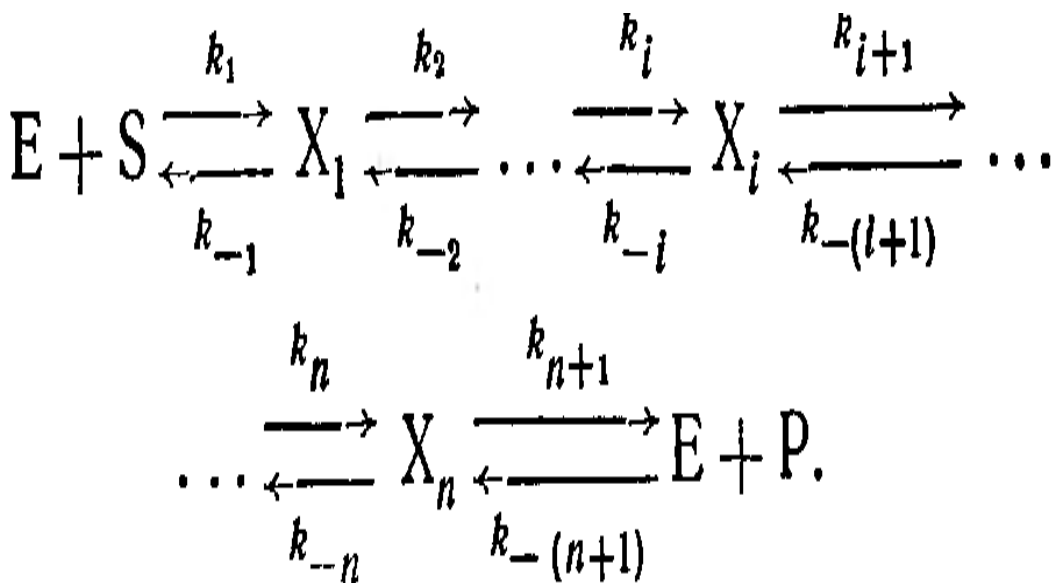


Рис.33. Общая схема ферментативной реакции, включающей образование промежуточных соединений

Для каждого из n промежуточных соединений, а также для фермента, продукта и субстрата можно на основе законов химической кинетики записать дифференциальные уравнения, описывающие изменения концентрации веществ во времени.

$$\begin{aligned} \frac{d[X_1]}{dt} &= k_1[E][S] + k_{-2}[X_2] - (k_{-1} + k_2)[X_1], \\ \dots\dots\dots \\ \frac{d[X_i]}{dt} &= k_i[X_{i-1}] + k_{-(i+1)}[X_{i+1}] - (k_{-i} + k_{i+1})[X_i], \\ \dots\dots\dots \\ \frac{d[X_n]}{dt} &= k_n[X_{n-1}] + k_{-(n+1)}[E][P] - (k_{-n} + k_{n+1})[X_n], \\ \frac{d[P]}{dt} &= k_{n+1}[X_n] - k_{-(n+1)}[E][P], \\ [E]_0 &= [E] + [X_1] + \dots + [X_n], \\ [S]_0 &= [S] + [X_1] + \dots + [X_n] + [P]. \end{aligned}$$

Рис.34. Система уравнений для n промежуточных стадий

Для анализа кинетики ферментативных реакций, протекающих в нестационарном режиме, используют два метода.

1. Релаксационная кинетика
2. Предстационарная кинетика

Релаксационная кинетика

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. Релаксационные методы кинетики позволяют определить константы скорости отдельных элементарных стадий трансформации интермедиатов. Методы изучения релаксационной кинетики имеют различную разрешающую способность:

поглощение ультразвука - 10^{-6} - 10^{-10} с,

температурный скачок - 10^{-4} - 10^{-6} с,

метод электрического импульса - 10^{-4} - 10^{-6} с,

скачок давления - 10^{-2} с.

При исследовании кинетики ферментативных реакций наибольшее применение имеет метод температурного скачка.

2. Предстационарная кинетика.

Методы предстационарной кинетики

Для упрощения системы уравнений применяют использование большого избытка одного из реагентов

1. Например, создание условий $[S]_0 \gg [E]_0$

Или $[E]_0 \gg [S]_0$

2. изучение кинетики реакции в начальный (предстационарный) период времени на небольшой глубине реакции.

При изучении кинетики реакции в начальный (предстационарный) период времени на небольшой глубине реакции.

В этом случае накоплением концентрации продукта во времени можно пренебречь

$[P] \sim 0$

Новая система уравнений является линейной и имеет аналитическое решение. Кинетика ферментативных реакций в предстационарном режиме их протекания изучается методами «остановленной струи» или «постоянного потока». Принципиальная особенность этих методов состоит в быстром смешивании растворов реагирующих веществ с смесительной камере специальной конструкции, после чего смесь поступает в измерительную кювету. Чаще всего в установках типа «остановленной струи» (stop-flow) используется спектрофотометрический метод измерения с регистрацией сигнала. В этом методе можно зарегистрировать образование промежуточных комплексов (ФСК). Для исследования реакций в пикосекундном (10^{-12}) и наносекундном (10^{-9}) временном диапазоне используют методы флеш-фотолиза, пульс-радиолиза.

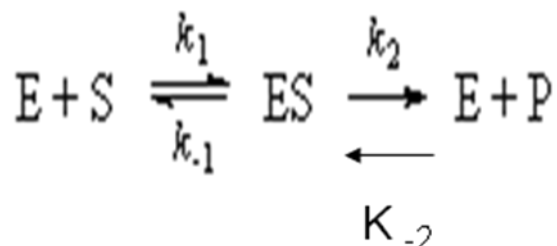
Предстационарная кинетика обладает рядом преимуществ с практической точки зрения. В предстационарной фазе можно определить стехиометрию процесса, в ходе которого происходит «всплеск» концентрации продукта, находят константы скорости переноса связанных с ферментом промежуточных соединений на второй субстрат, исследуют индуцируемые лигандами конформационные изменения в белках. Данные предстационарной кинетики основаны на прямых измерениях, а прямые измерения всегда предпочтительнее косвенных. Предстационарная кинетика позволяет доказать существование промежуточных соединений, определить скорость их образования и исчезновения и исследовать механизм ферментативной реакции. Фермент берется в количествах, сравнимых с количеством субстрата, и исследуются события, происходящие на самом ферменте.

Возможности предстационарной и стационарной кинетики

Стационарная кинетика: измеряют только скорости появления продуктов или исчезновения субстратов (реагентов).

Предстационарная кинетика: регистрация промежуточных соединений, скорости их образования и исчезновения. Фермент берется в количествах, сравнимых с количеством субстрата, и исследуются события, происходящие на самом ферменте.

Односубстратные двусторонние реакции с одним продуктом



В качестве такой реакции можно привести любую изомеразную реакцию, например, превращение фосфодиоксиацетона в фосфоглицериновый альдегид, или взаимопревращение яблочной и фумаровой кислот.

Скорость реакции образования продукта P определяется константой скорости k_{+2} и концентрацией ФСК

$$v_s = k_{+2} [ES]$$

v_s – скорость прямой реакции

Скорость обратной реакции

$$v_p = k_{-1} [ES]$$

Неизвестная величина – концентрация ФСК - $[ES]$

В условиях стационарности скорость образования ФСК равна скорости его распада

$$v_{+1} + v_{-2} = v_{-1} + v_{+2}$$

После преобразований получим выражение для скорости прямой реакции v_s , которое имеет довольно сложный вид и в которое входят все константы k_{+1} , k_{-1} , k_{+2} , k_{-2}

Использовать такое уравнение трудно.

Если измерить скорость прямой реакции за тот промежуток времени, когда продукта образовалось еще очень мало, т.е. $[P] \rightarrow 0$, $t \rightarrow 0$, то уравнение для скорости упрощается и приобретает вид уравнения Михаэлиса-Ментен

$$v_s = V_{\max} [S]_0 / (K_m^S + [S]_0)$$

v_s – скорость прямой реакции

Для определения скорости обратной реакции надо взять в качестве субстрата продукт реакции и измерить начальную скорость процесса при

$$t \rightarrow 0, [S] \rightarrow 0,$$

$$[P] \rightarrow [P]_0$$

$$v_p = V_p [P]_0 / (K_m^P + [P]_0)$$

v_p – скорость обратной реакции

Особенностью двусторонней реакции является то, что все константы скоростей рассчитываются из экспериментальных данных (линеаризация уравнения Михаэлиса – Ментен, определение K_m , $V_{\max}$, $V_{\max} = k_{\text{cat}} [E]_0$).

$$k_{-1} = V_p / [E]_0$$

$$k_{+2} = V_s / [E]_0$$

$$k_{+1} = k_{-1} + k_{+2} / K_m^S$$

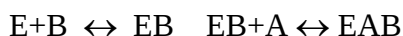
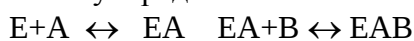
$$k_{-2} = V_s + V_p / (K_m^P [E]_0)$$

Зная все константы, можно найти величины субстратных констант для прямой и обратной реакции и охарактеризовать степень сродства фермента к субстрату и продукту.

Бисубстратные реакции. Классификация

1. Неупорядоченный механизм предполагает, что не существует определенной последовательности в присоединении субстратов.

1а. Неупорядоченное независимое присоединение



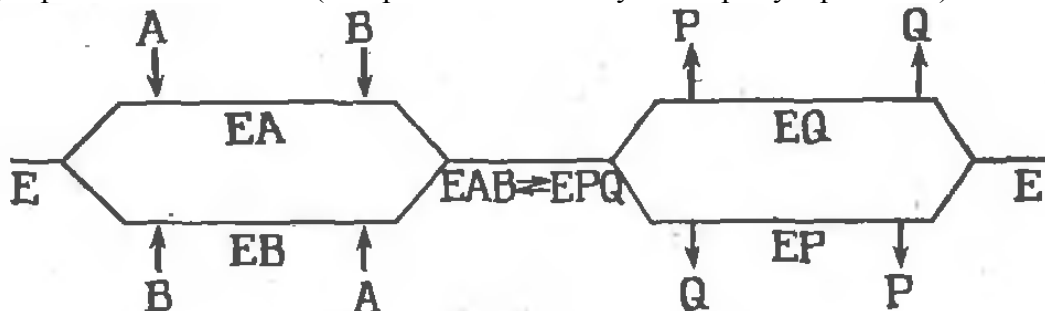
Сродство фермента к каждому из двух субстратов не изменяется при присоединении другого субстрата. Каждая из стадий характеризуется соответствующей константой диссоциации и константой скорости

1b. Неупорядоченное взаимозависимое связывание. Комплекс фермента с субстратом А обладает иным сродством в субстрату В, чем свободный фермент. То же самое справедливо и для субстрата В.



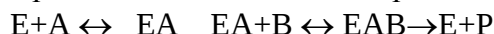
Каждая из стадий характеризуется соответствующей константой диссоциации и константой скорости

Неупорядоченные стадии (по прямой линии получаем прямую реакцию)

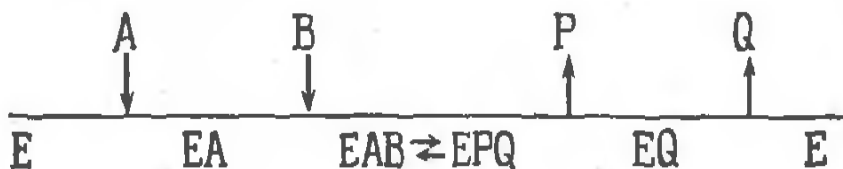


2. Упорядоченное связывание субстратов (принудительное связывание).

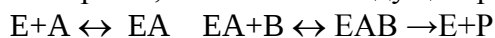
В этом случае наблюдается определенная последовательность в присоединении субстратов, т.е. один из субстратов обладает большим сродством, чем другой.



Механизм с образованием тройного комплекса и упорядоченным присоединением субстратов и упорядоченным отщеплением продуктов



Субстрат, присоединяющийся первым, называется «ведущим реагентом»,



3. Механизм «пинг-понг»

Один из продуктов образуется до реакции фермента со вторым субстратом. По такому механизму протекают реакции переаминирования, когда первый этап реакции - образование основания Шиффа (комплекс EA), затем происходит отщепление одного из продуктов – кетокислоты, и уже после этого происходит присоединение второго субстрата реакции переаминирования к фосфопиридоксамину, прочно связанному с ферментом.



Упорядоченный (1а и 1в) и неупорядоченный (2) механизмы кинетически неразличимы. Уравнение скорости двухсубстратной (бисубстратной) реакции, идущей по упорядоченному или неупорядоченному механизму, имеет довольно сложный вид.

СМЫСЛ КИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ДВУХ ОСНОВНЫХ МЕХАНИЗМОВ С УПОРЯДОЧЕННЫМ ПРИСОЕДИНЕНИЕМ СУБСТРАТОВ

Параметр	Механизм с образованием тройного комплекса	Механизм с замещением комплекса
	$ \begin{array}{c} E \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_{+1}a} EA \\ \begin{array}{c} \uparrow k_{+4} \\ \downarrow k_{-4}q \end{array} \\ EQ \xrightleftharpoons[k_{+3}]{k_{-3}p} EAB \\ \begin{array}{c} \uparrow k_{+2}b \\ \downarrow k_{-2} \end{array} \\ EPQ \end{array} $	$ \begin{array}{c} E \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_{+1}a} EA \\ \begin{array}{c} \uparrow k_{+4} \\ \downarrow k_{-4}q \end{array} \\ EQ \xrightleftharpoons[k_{+3}b]{k_{-3}} E'B \\ \begin{array}{c} \uparrow k_{+2} \\ \downarrow k_{-2} \end{array} \\ E'P \end{array} $
V_f	$\frac{k_{+3} k_{+4} e_0}{k_{+3} + k_{+4}}$	$\frac{k_{+3} k_{+4} e_0}{k_{+3} + k_{+4}}$
V_r	$\frac{k_{-1} k_{-2} e_0}{k_{-1} + k_{-2}}$	$\frac{k_{-1} k_{-3} e_0}{k_{-1} + k_{-3}}$
K_M^A	$\frac{k_{+3} k_{+4}}{k_{+1} (k_{+3} + k_{+4})}$	$\frac{(k_{-1} + k_{+2}) k_{+1}}{k_{+1} (k_{+2} + k_{+4})}$
K_M^B	$\frac{(k_{-2} + k_{+3}) k_{+4}}{k_{+2} (k_{+3} + k_{+4})}$	$\frac{k_{+2} (k_{-3} + k_{+4})}{(k_{+2} + k_{+4}) k_{+3}}$
K_M^P	$\frac{k_{-1} (k_{-2} + k_{+2})}{(k_{-1} + k_{-2}) k_{-3}}$	$\frac{(k_{-1} + k_{+2}) k_{-3}}{(k_{-1} + k_{-3}) k_{-2}}$
K_M^Q	$\frac{k_{-1} k_{-3}}{(k_{-1} + k_{-2}) k_{-4}}$	$\frac{k_{-1} (k_{-3} + k_{+4})}{(k_{-1} + k_{-3}) k_{-4}}$
K_i^A	k_{-1} / k_{+1}	k_{-1} / k_{+1}
K_i^B	$(k_{-1} + k_{-2}) / k_{+2}$	k_{-3} / k_{+3}^{-1}
K_i^P	$(k_{+3} + k_{+4}) / k_{-3}$	k_{+2} / k_{-2}
K_i^Q	k_{+4} / k_{-4}	k_{+4} / k_{-4}

Для упрощения кинетических уравнений концентрацию одного из субстратов оставляют постоянной (этот субстрат называют «фиксированным»), а концентрацию второго изменяют («вариабельный» субстрат).

При $[B] = \text{const}$,

$$1/v = K_1 / V \cdot 1/[A] + 1/V_{\text{каж}}$$

$$1/v = K_1 / V \cdot 1/[A] + K_2$$

$V_{\text{каж}}$ – кажущаяся максимальная скорость

$(1/V_{\text{каж}} = K_2)$ (отрезок, отсекаемый на оси ординат)

$$K_2 = 1/V (1 + K_m^B / [B])$$

$$K_1 = K_m^A (1 + K_s^A K_m^B / K_m^A [B])$$

Эти уравнения совпадают формально с уравнением Михаэлиса-Ментен

При $[B] = \text{const}$,

$$1/v = K_1 / V \cdot 1/[A] + K_2$$

$$y = K_1 / V \cdot x + 1/V_{\text{каж}}$$

$$y = K_1 / V \cdot x + 1/V_{\text{каж}} \quad (y = ax + b)$$

V – предельная максимальная скорость

K_1 – кажущаяся константа Михаэлиса

K_2 $-1/V_{\text{каж}}$

$K_M(A)$ – константа Михаэлиса для вещества А

$K_M(B)$ – константа Михаэлиса для вещества В

$K_s(A)$ – субстратная константа для вещества А

$K_s(B)$ – субстратная константа для вещества В

$$1/v = K_1 / V \cdot 1/[A] + 1/V_{\text{каж}}$$

График в координатах $1/v$, $1/[A]$ дает прямую линию для фиксированного значения В. При разных значениях В получаем серию прямых («веер»). По этим графикам определяем кажущиеся значения V , K_M

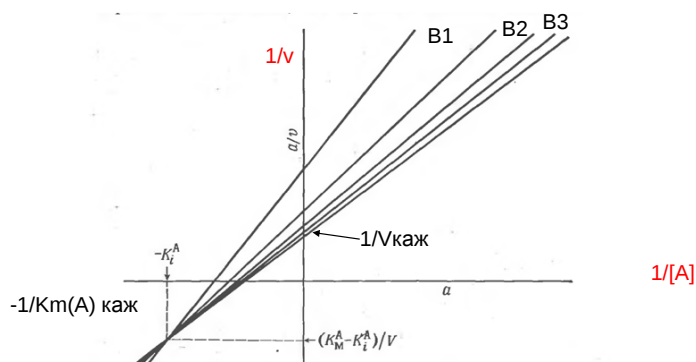


Рис.35. График двойных обратных величин для бисубстратной реакции, идущей по неупорядоченному или упорядоченному механизму.

Для нахождения истинных V , $K_M(A)$ и $K_M(B)$ надо построить на основе графика при фиксированных значениях В

новый график в координатах $1/V_{\text{каж}}$, $1/[B]$.

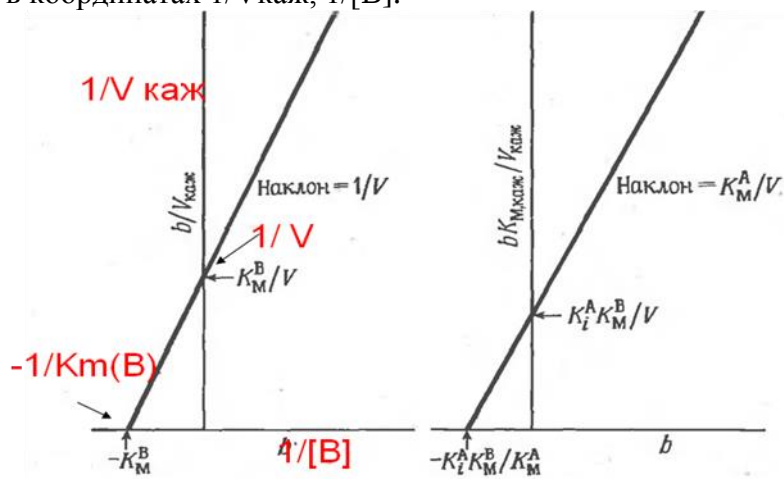


Рис.36. Определение истинных величин констант Михаэлиса и максимальной скорости реакции двусубстратной (бисубстратной) реакции

Механизм бисубстратных реакций «пинг-понг»

При постоянной концентрации В и вариабельной концентрации А наклон полученной прямой равен $K_M(A) / V$, т.е. является величиной постоянной.

Получаем серию параллельных прямых. Точки пересечения с осью ординат дают кажущиеся величины $1/V$

Для получения истинных значений V и K_m как и в случае неупорядоченного или упорядоченного механизма строят вторичные графики в координатах $1/[B]$, $1/V_{\text{каж}}$. $1/V_{\text{каж}}$ - величины отрезков на оси ординат первичных графиков.

Для механизма «ПИНГ-ПОНГ» при изображении экспериментальных данных методом двойных обратных величин в координатах $1/[A]$, $1/V$

получаем ряд параллельных прямых

При разных концентрациях фиксированного субстрата.

Точки пересечения дадут с осью ординат дадут кажущиеся величины $1/V_{\text{каж}}$.

Для нахождения истинных значений строят вторичные графики (как в случае упорядоченного или неупорядоченного механизмов)

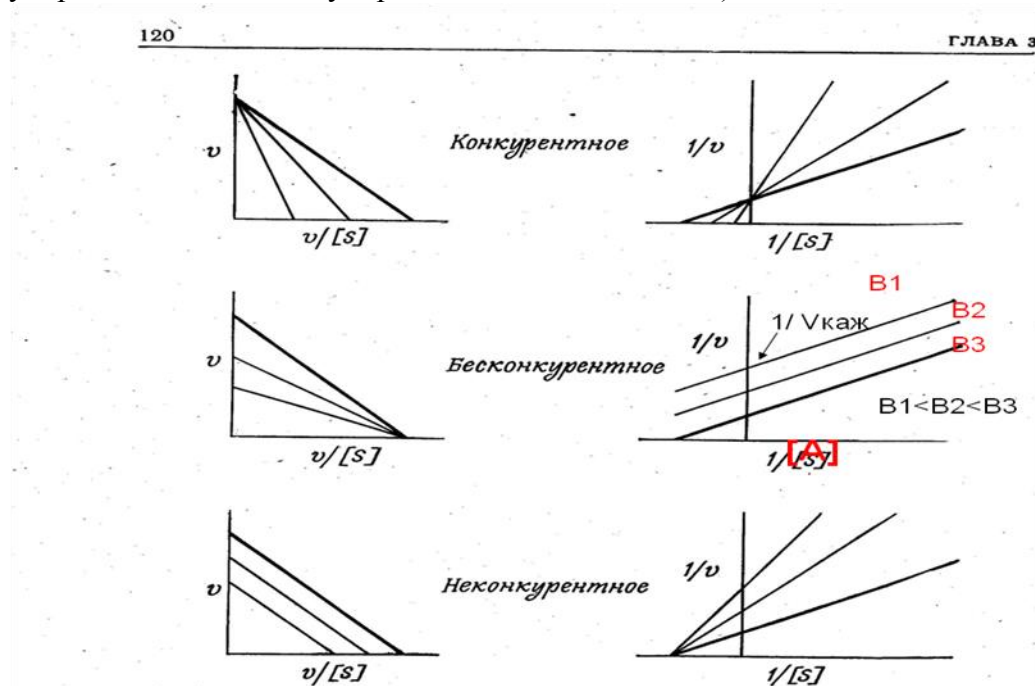


Рис.37.

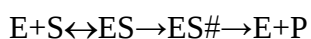
Выводы

По характеру графиков двойных обратных величин можно различить механизм «пинг-понг» от механизмов упорядоченного или неупорядоченного связывания двух субстратов. Выводы по разделу кинетики с двумя субстратами

1. При построении экспериментальных данных методом двойных обратных величин на осях получаем отрезки, соответствующие обратным значениям кажущихся $K_m(\text{каж})$ и $V(\text{каж})$.
2. Для расчета истинных K_m и V необходимо строить вторичные графики, используя кажущиеся величины $K_m(\text{каж})$ и $V(\text{каж})$.
3. Для построения первичных графиков необходимо иметь величины начальных скоростей реакций при нескольких фиксированных концентрациях одного из субстратов и переменных концентрациях другого субстрата.

Многостадийные реакции

Односубстратная односторонняя реакция, идущая через две стадии фермент-субстратного комплекса



$ES\#$ - одна из форм фермент-субстратного комплекса, образующаяся после преобразования первичного ФСК (ES).

После образования ФСК может происходить конформационная перестройка фермента, которая представляет часто медленный процесс. Промежуточных стадий перестройки может быть несколько. Разработаны подходы для нахождения уравнения скорости реакции для таких случаев. Формально это уравнение Михаэлиса - Ментен.

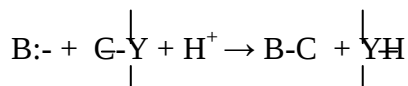
Если механизм реакции неизвестен, то все определяемые константы можно считать кажущимися.

Механизмы ферментативного катализа

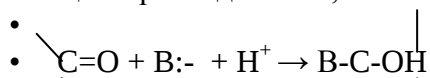
Классификация ферментативных реакций.

1. Реакции замещения, в которых одно основание или нуклеофил, замещается другим.

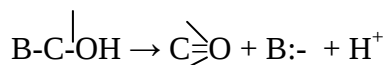
Нуклеофильное замещение



2. Реакции присоединения, в которых реагент присоединяется к двойной связи.



3. Реакции элиминирования, при которых происходит отщепление определенных групп от субстрата с образованием двойных связей. (реакции, обратные реакциям присоединения)



1. Нуклеофильное замещение.

2. Реакции замещения, в которых одно основание или нуклеофил, замещается другим.

3. Нуклеофильное замещение

4. $\text{B:}^- + \text{C}-\underset{\text{|}}{\text{Y}} + \text{H}^+ \rightarrow \text{B}-\underset{\text{|}}{\text{C}} + \underset{\text{|}}{\text{Y}}\text{H}$

5. Реакции замещения при атоме углерода. Примеры: химотрипсин, трипсин.

6. Химотрипсин гидролизует пептиды в том случае, когда C=O группа расщепляемой пептидной связи принадлежит ароматической аминокислоте

7. В активный центр химотрипсина входят

8. Asp-102,

9. Ser-195

10. His-57

11. $\text{R}'-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{R} \rightarrow \text{R}'-\text{NH}_2 + \text{Ацилфермент}$

12. (вместо NH- получаем ацилированный фермент $\text{R}-\text{C}(\text{O})-\text{X}$ (фермент))

13. Доказательством серина в активном центре химотрипсина послужили эксперименты с диизопропилфторфосфатом, который инактивирует химотрипсин с образованием О-фосфосерина

14. $-\text{P}(\text{O})\text{O}(\text{OH})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{COO}^-)\text{NH}_3^+$

Если на фермент действовали диизопропилфторфосфатом, меченым P^{32} , то радиоактивный фосфор оказывался связанным с ферментом ковалентно

Ацилфермент

$\text{R}-\text{C}(\text{O})-\text{X}$ (фермент)

Трипсин

Трипсин расщепляет только те пептидные связи, к которым примыкают остатки аргинина или лизина (т.е. аминокислот, имеющих в нейтральной среде положительный заряд).

Кислые протеиназы

Пепсин желудка

Реннин (сычужный фермент) вызывает быстрое свертывание молока и используется в сыроварении

Эти ферменты наиболее активны в интервале pH от 1 до 5. Поэтому серин и гистидин не входят в активный центр этих ферментов (при кислых pH они были бы протонированы).

У «кислых» протеинах в механизме двойного замещения роль нуклеофила играет карбоксилат-ион (карбоксильная группа), а донором протона по отношению к уходящей группе служит вторая карбоксильная группа.

Механизм действия пепсина и лизоцима похожи.

Папаин

В папаине нуклеофилом является $-\text{SH}$ группа.

Неактивная форма папина активируется под действием тиолов.

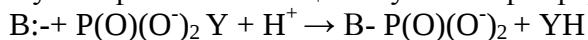
Карбоксипептидаза А

Карбоксипептидазы атакуют только С-концевые группы, отщепляя по одной аминокислоте, что делает ее ценным инструментом при определении аминокислотной последовательности в пептидах.

Главной особенностью карбоксипептидазы А является наличие в молекуле прочно связанного иона цинка Zn^{+2} . Ион цинка образует хелатные связи с двумя имидазольными группами и боковой цепью глутаминовой кислоты.

Замещение у атома фосфора

Нуклеофильное замещение у атома фосфора

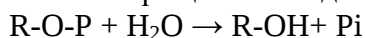


Фосфатазы

Фосфатазы катализируют гидролиз фосфорных эфиров с образованием неорганического фосфата:



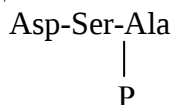
или в сокращенном виде



Две группы ферментов, кислые и щелочные фосфатазы, представляют собой неспецифические ферменты, которые способны расщеплять различные эфиры фосфорной кислоты.

Щелочная фосфатаза E.coli представляет собой димер с молекулярной массой 89 000, требует ионы цинка для проявления каталитической активности, аллостерически активируется ионами магния и имеет рН оптимум выше 8.

В опытах с меченым фосфатом было показано, что фосфат присоединяется к реакционноспособному остатку серина щелочной фосфатазы в последовательности



Кислые фосфатазы имеют оптимум при рН ~ 5 и ингибируются фторид-ионом F^-

При взаимодействии с меченым фосфатом был выделен N-фосфогистидин.

Рибонуклеаза

В активный центр рибонуклеазы входят Lys- 41,

His -12,

His-119

Каталитическое расщепление фосфодиэфирных связей в молекуле РНК под действием рибонуклеазы протекает в две стадии. В качестве промежуточного соединения образуется циклический 2'3' –дифосфат, который затем гидролизуются молекулой воды с образованием свободного 3'-нуклеотида

Киназы

Киназы катализируют перенос фосфатных групп от одного атома к другому.

Примером киназ может служить гексокиназа, участвующая в синтезе глюкозо-6-фосфата из свободной глюкозы.

Истинным субстратом гексокиназы является комплекс АТФ с Mg^{+2}

Протеинкиназы

Протеинкиназы катализируют перенос фосфатных групп от АТФ к гидроксильным группам остатков серина или треонина белков.

Особенностью протеинкиназ является присутствие остатка лизина или аргинина в положении, отделенном от серина или треонина только одним аминокислотным остатком.

Реакции присоединения и элиминирования

Присоединение к поляризованным двойным связям.

Пример – присоединение воды к альдегидам и образование циклических структур сахаров.

Карбоангидраза

Одна из простейших реакций присоединения – это гидратация CO_2 с образованием бикарбонат-иона.

Карбоангидраза проявляет активность в тканях, участвующих в процессах дыхания, например, в эритроцитах.

В 1 л крови млекопитающих содержится 1-2 г этого фермента.

Карбоангидраза содержит прочно связанный ион цинка Zn^{+2}

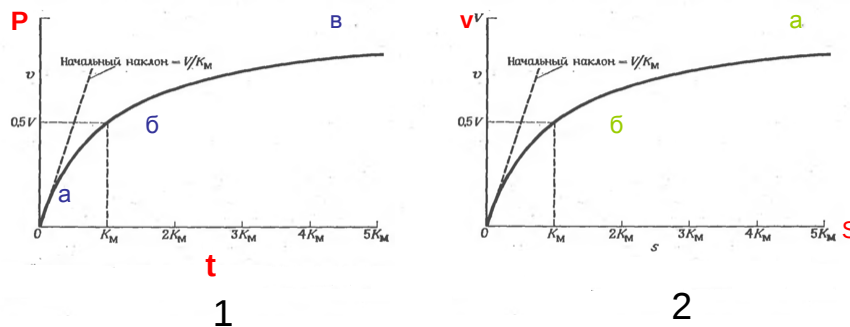
Карбоангидраза – один из наиболее активных среди известных ферментов.

Реакция гидратации CO_2 при 25°C характеризуется числом оборотов $\sim 10^6 \text{ c}^{-1}$

Интегральная форма уравнения Михаэлиса

$$v = V[S] / (K_m + [S])$$

В предыдущих лекциях мы разбирали подходы, когда экспериментальные данные представляли собой величины начальных скоростей реакции при различных исходных концентрациях субстрата. Однако, для некоторых ферментов сродство субстрата к ферменту может быть таким высоким, что даже очень низкие концентрации субстрата окажутся насыщающими. Как получить зависимость v от S , если дальнейшее снижение концентрации субстрата невозможно, например, вследствие приближения к пределу чувствительности метода определения нарастания продукта или убыли субстрата.



1. Нарастание продукта в ходе ферментативной реакции
2. Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата

Участок «а» на рис.1 соответствует насыщающим концентрациям субстрата: реакция идет с постоянной скоростью. Это соответствует тем концентрациям субстрата, которые принадлежат области «а» на рис.2. Затем, по мере уменьшения концентрации субстрата в ходе реакции, не все молекулы фермента будут в виде ФСК, и скорость реакции уменьшается (участок «б» на рис.1 и рис.2)

$$v = dP/dt,$$

Участок «а» на рис.1 соответствует насыщающим концентрациям субстрата: реакция идет с постоянной скоростью. Это соответствует тем концентрациям субстрата, которые принадлежат области «а» на рис.2. Затем, по мере уменьшения концентрации субстрата в ходе реакции, не все молекулы фермента будут в виде ФСК (ES), и скорость реакции уменьшается (участок «б» на кривой 1 соответствует падению скорости в результате уменьшения концентрации субстрата, что можно видеть при сопоставлении с областью «б» на кривой 2. Участок «в» на кривой 1 соответствует прекращению реакции в

результате исчерпания субстрата. При этом образовавшееся количество продукта будет равно исходному количеству субстрата $[S]_0$. В ходе ферментативной реакции скорость в каждый момент времени будет определяться тем количеством субстрата, которое в этот момент осталось. Для расчетов констант из экспериментальных данных, представляющих зависимость P от t используется интегральная форма уравнения Михаэлиса

Если $[S]_0$ – исходная концентрация субстрата,

P – прирост продукта к моменту времени t ,

то $([S]_0 - P)$ – концентрация субстрата, оставшаяся к моменту времени t

$$V = dP/dt = \frac{V([S]_0 - P)}{K_m + ([S]_0 - P)}$$

После интегрирования и преобразований получаем

$$2,303 / t \cdot \{ \lg [S]_0 / ([S]_0 - P) \} =$$

$$V / K_m - 1 / K_m \cdot (P / t)$$

Следовательно, достаточно иметь зависимость нарастания продукта в ходе реакции, и рассчитать концентрацию оставшегося субстрата к моменту времени t .

График зависимости в координатах

$$2,303 / t \cdot (\lg [S]_0 / [S]_0 - P)$$

от P/t даст прямую линию, наклон которой равен $-1/K_m$

На оси абсцисс отсекается отрезок V

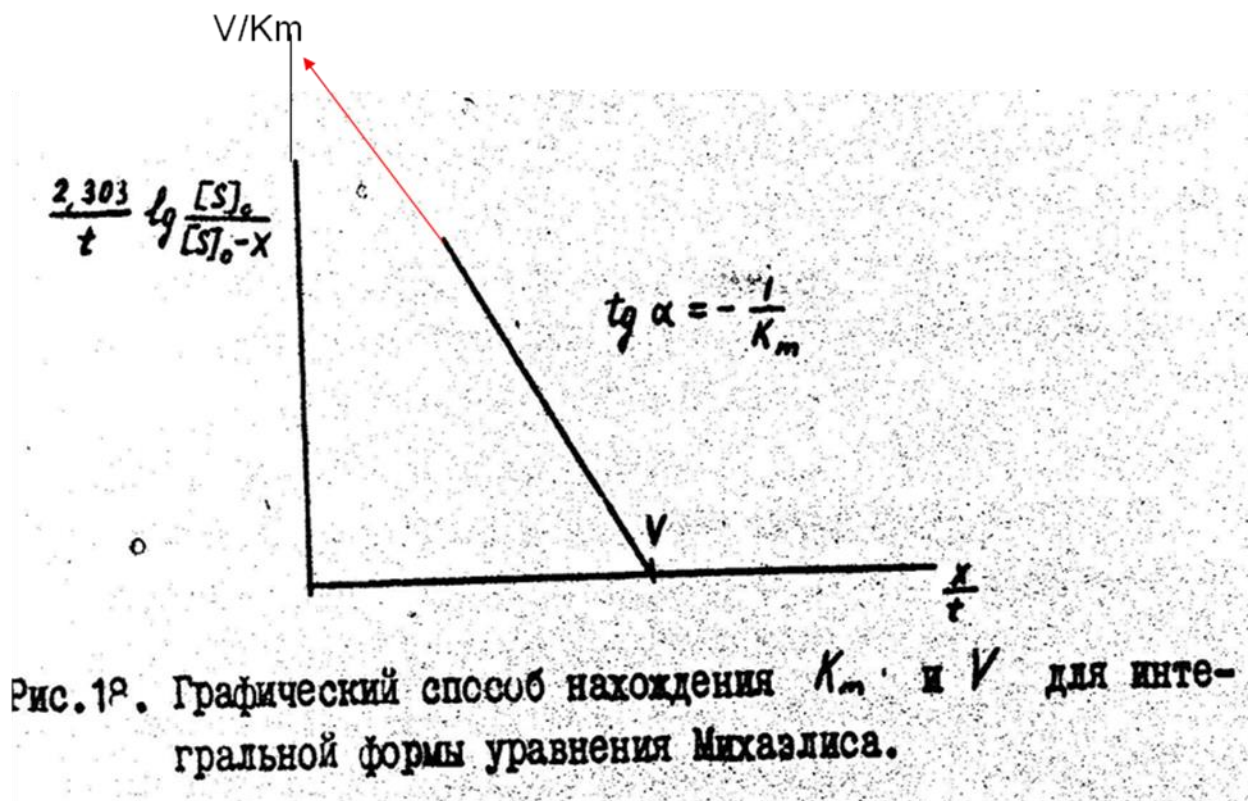


Рис.38 Графический способ нахождения K_m и V для интегральной формы уравнения Михаэлиса (в координатах Фостера-Нимана)

Для построения графика в координатах интегрального уравнения Михаэлиса надо иметь как можно больше экспериментальных точек или вести непрерывную запись хода ферментативной реакции (кинетическую кривую)

Природа регуляции ферментов

1. Аллостерическая регуляция.
2. Ковалентная модификация белка (фосфорилирование или дефосфорилирование)

Кинетика аллостерической регуляции ферментативной реакции

«Алло» означает другой

На ферменте, кроме участка связывания субстрата есть участок или участки связывания другого соединения.

Низкомолекулярные соединения, связываемые белком, называют лигандами.

В роли аллостерических эффекторов могут быть гормоны, ионы металлов, кофакторы, иногда – субстраты. Лиганды, связывающиеся с аллостерическими участками, называются аллостерическими эффекторами или аллостерическими регуляторами.

Действие эффекторов как правило, наблюдается при определенной концентрации субстрата.

Положительные эффекторы увеличивают активность фермента (активаторы), отрицательные (ингибиторы) – понижают.

Самой характерной, отличительной особенностью аллостерических ферментов является сигмоидная форма (S-образная форма) зависимости v от S . Дополнительным доказательством наличия аллостерического влияния служит снятие его без изменения максимальной скорости реакции.

Это значит, что при определенном воздействии сигмоидная форма (S-образная форма) зависимости v от S переходит в обычную гиперболическую кривую Михаэлиса-Ментен. Это также подтверждает неидентичность аллостерического участка и активного центра.

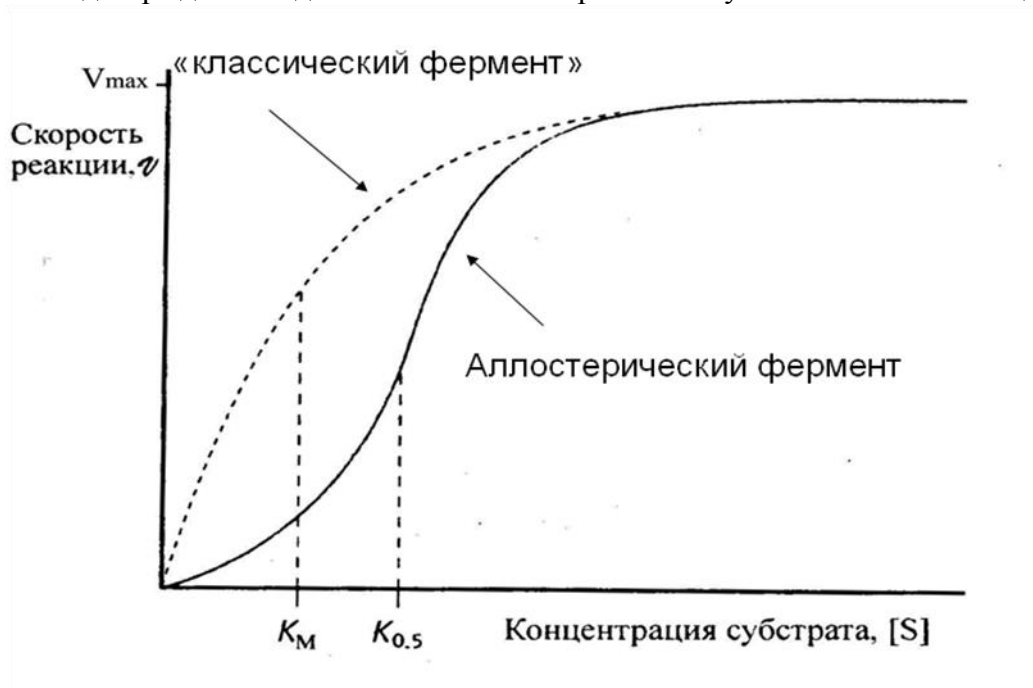


Рис.39. Влияние концентрации субстрата на скорость реакции, катализируемой типичным аллостерическим ферментом

Способы снятия аллостерического влияния могут быть разными. Они направлены на то, чтобы сделать фермент нечувствительным к аллостерическому эффектору без потери ферментативной активности.

Методы снятия аллостерического влияния:

Мягкие денатурирующие воздействия,

Изменение pH, Диализ, Изменение температуры (нагревание, охлаждение)

Замораживание и оттаивание, Обработка мочевиной и протеолитическими ферментами.

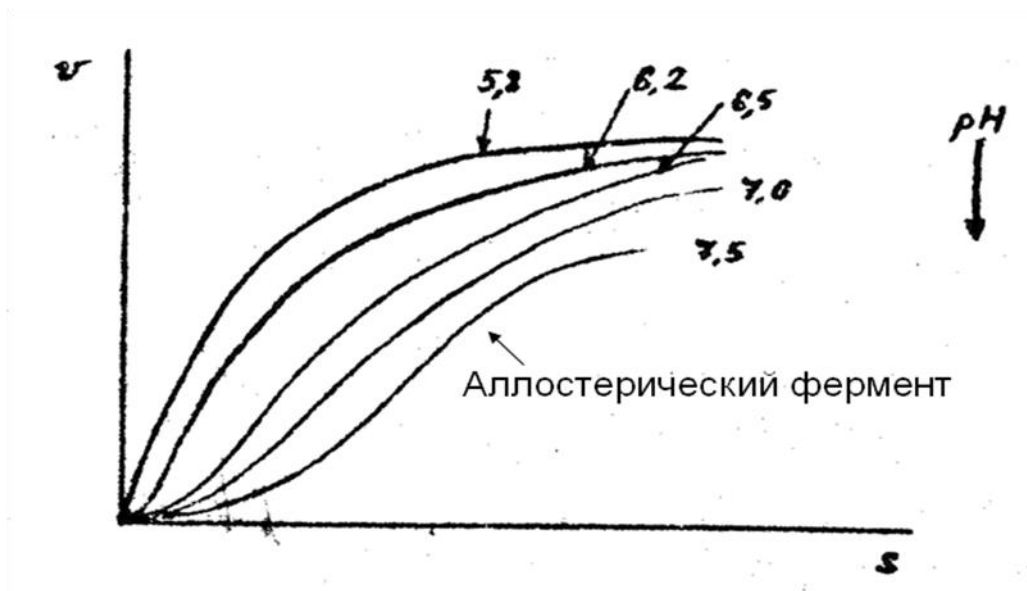


Рис.40. Снятие аллостерического эффекта при изменении pH

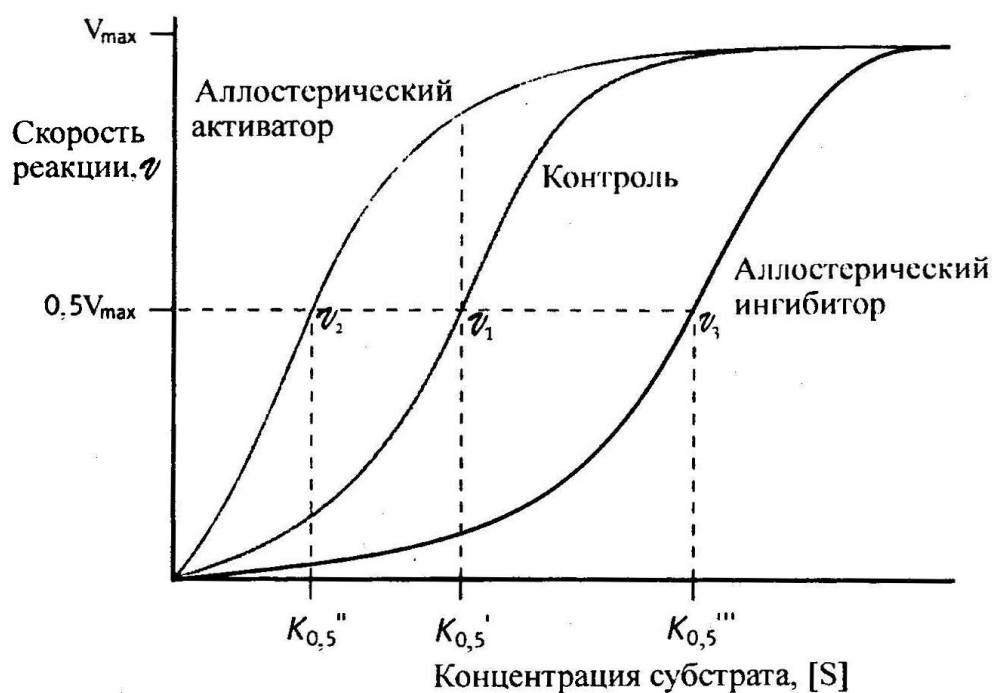


Рис.41. Влияние концентрации субстрата на скорость реакции, катализируемой типичным аллостерическим ферментом

Аллостерическое влияние может осуществляться на уровне четвертичной, третичной, или вторичной структуры.

Связывание эффектора отражается на сродстве фермента к субстрату. Такие аллостерические ферменты состоят из нескольких каталитических белков, которые нековалентно объединены в единый ферментный комплекс. Компоненты такого комплекса называют белковыми субъединицами, протомерами или мономерами. Хотя каждая из субъединиц обладает каталитической активностью, общая активность фермента зависит от их взаимодействия друг с другом. Когда аллостерический регулятор связывается с ферментом, сигмоидная кривая сдвигается влево, тогда как аллостерический ингибитор сдвигает ее вправо.

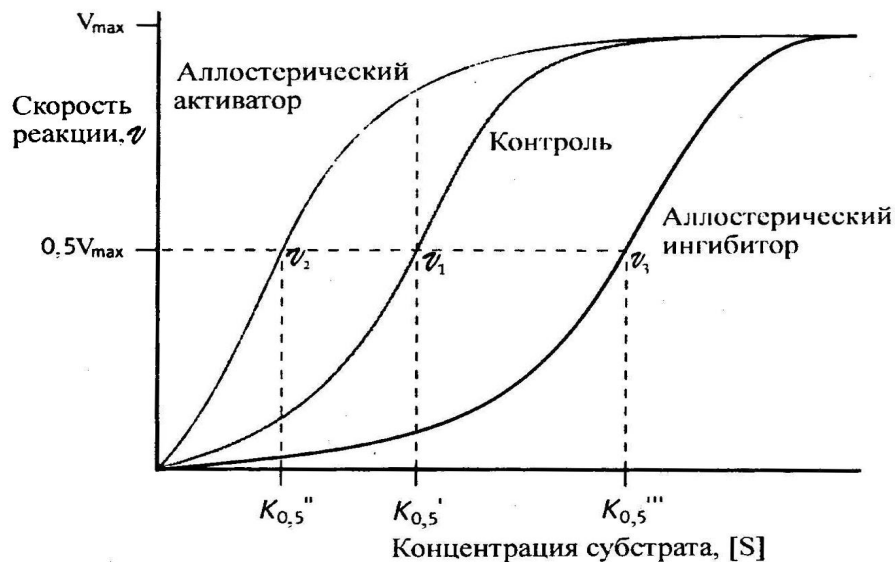


Рис.42. Влияние концентрации субстрата на скорость реакции, катализируемой типичным аллостерическим ферментом

Сдвиг кривой влево свидетельствует об увеличении сродства фермента к субстрату, а сдвиг вправо – о его уменьшении. Сигмоидная форма кривой зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата указывает на то, что скорость реакции более чувствительна к изменению концентрации субстрата (чем при гиперболической зависимости), особенно в области скоростей, близких к $0,5 V_{\max}$. Взаимодействие одной из субъединиц аллостерического фермента с субстратом способствует лучшему связыванию молекул субстрата другими субъединицами. Такой эффект называется гомотропным кооперативным связыванием субстрата.

Термин «гомотропный» отражает то обстоятельство, что все субъединицы связывают один и тот же лиганд - субстрат. Кооперативность часто относят к аллостерическим эффектам несмотря на то, что участки связывания лиганда и субстрата идентичны. Кооперативное взаимодействие можно считать аллостерическим, т.к. связывание субстрата каждой из субъединиц зависит от присутствия лиганда на соседней субъединице.

Аллостерическую регуляцию условно можно разделить на два основных типа: прямую (изменение четвертичной, третичной, или вторичной структуры, косвенную (влияние эффектора на уровне четвертичной структуры, не связанное с диссоциацией).

Прямая и косвенная аллостерическая регуляция кинетически неразличимы

Теоретические модели аллостерической регуляции можно назвать состоянием с высоким и низким сродством к субстрату. Предполагается, что связывание субстрата увеличивает долю субъединиц с высоким сродством к субстрату.

Механизмы аллостерических взаимодействий и кооперативности

Существуют различные типы молекулярных механизмов аллостерической регуляции.

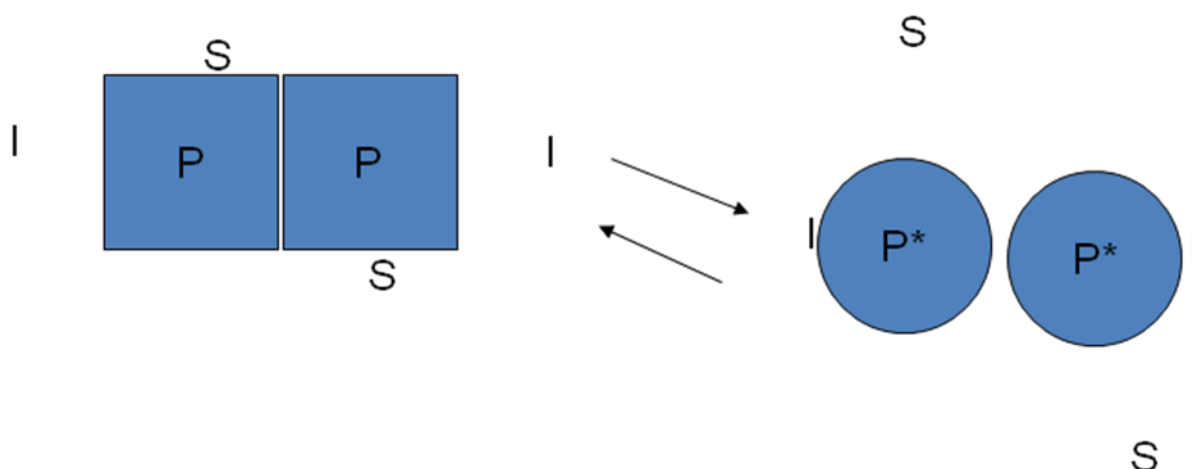
«Согласованная» (равновесная) модель

1. Схема Моно, Уимена (Уаймена) и Шанже (1965 г., Jacques Monod, Jeffries Wyman, Jean-Pierre Changeux)

В растворе фермент может существовать в двух конформационных равновесных формах: $T \leftrightarrow R$ не связанной с лигандами форме (T- tense состояние, напряженное состояние), и форме, связанной с лигандами (R-relaxed, расслабленное состояние). Эти состояния различаются энергетически и по числу связей между субъединицами. В отсутствие лиганда переход от одной формы к другой происходит спонтанно. Наличие лиганда (субстрата или эффектора, или ингибитора) будет сдвигать это равновесие.

Пример: молекула гемоглобина всегда сохраняет свою симметрию. Гемоглобин находится либо в окси-, либо в дезокси-состояниях. Смешанные состояния невозможны. Например, одна форма фермента способна связывать только субстрат (PP), а вторая (P'P') только ингибитор

Модель Моно, Уимена (Уаймена) и Шанже.



S – субстрат, I – ингибитор

Ингибитор сдвигает равновесие в сторону образования формы P'P'

С ростом концентрации субстрата все большее число молекул фермента переходит в состояние с высоким сродством к субстрату PP.

Эта модель относится к косвенной кооперативности, или косвенной аллостерической регуляции.

2. Интеракционная (interaction – взаимодействие) модель Кошланда (Последовательная модель Кошланда, Немети и Филмера, The Sequential Model, D.E. Koshland, G Nemethy, D. Filmer, 1966 г.)

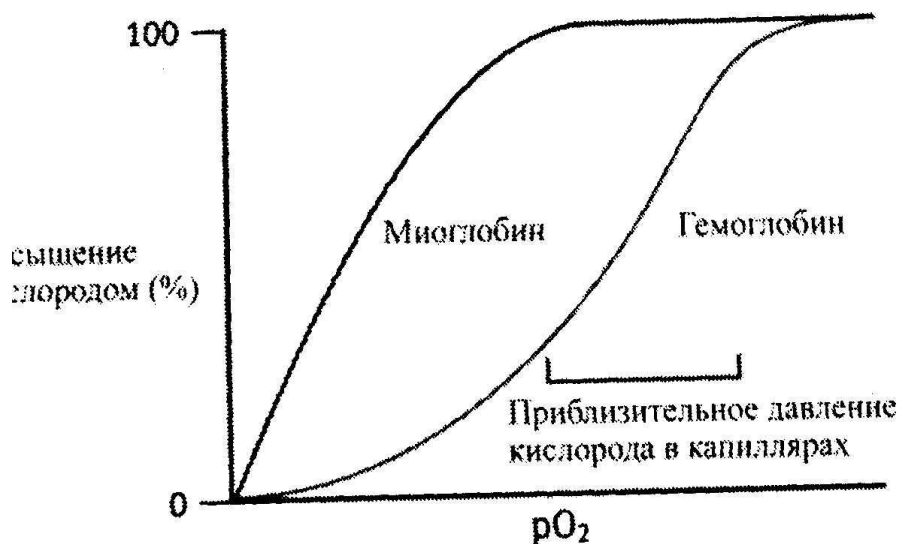
Авторы этой модели предполагают, что переход от T-состояния к связанному с лигандом R-состоянием представляет собой последовательный процесс. Конформация субъединиц в олигомере при связывании лиганда изменяется поочередно, последовательно без резкого переключения всей молекулы из одного состояния в другое. Равновесия между состояниями нет.

Интеракционная модель для объяснения механизма действия аллостерических ферментов подразумевает наличие в ферменте нескольких равноценных участков (нескольких активных центров) для связывания субстрата. Эти участки остаются равноценными только до тех пор, пока они свободны, связывание субстрата в одном из них приводит к изменению связывания субстрата в другом. Теория индуцированного соответствия.

Последовательная модель Кошланда, Немети и Филмера связана с идеей Кошланда об индуцированном соответствии, согласно которой связывание субстрата с ферментом вызывает в ферменте конформационные изменения, в результате чего каталитические группы фермента принимают необходимую конформацию.

3. Обобщенная модель Эйгена

Эйген предположил, что модели Моно и др. и Кошланда и др. представляют собой предельные случаи более общей схемы, которая является промежуточной для схем 1 и 2.



с. 27,11. Кривая насыщения гемоглобина кислородом. Более высоко-
Рис.43. Кривая насыщения кислородом миоглобина и гемоглобина

Связывание кислорода с миоглобином и гемоглобином

Молекула миоглобина захватывает кислород из крови и переносит его внутрь клетки, где кислород используется митохондриями для выработки энергии.

Насыщение миоглобина кислородом характеризуется гиперболической кривой.

Гемоглобин

Молекула гемоглобина связывает 4 молекулы кислорода, по одной на каждую субъединицу. Насыщение гемоглобина кислородом описывается сигмоидной кривой, сдвинутой вправо относительно гиперболической кривой для миоглобина. Для 50 % насыщения гемоглобина кислородом необходима более высокая концентрация кислорода, чем в случае миоглобина. Гемоглобину необходимо забрать как можно больше кислорода из легких и отдать его капиллярам в тканях.

Сигмоидный характер кривой объясняется гомотропным (так как связывается только один лиганд — кислород) положительным кооперативным эффектом.

Первоначальное сродство дезоксигемоглобина к кислороду в 200 раз ниже, чем сродство на заключительном этапе связывания. Присоединение одной молекулы кислорода к молекуле гемоглобина облегчает связывание кислорода остальными субъединицами гемоглобина

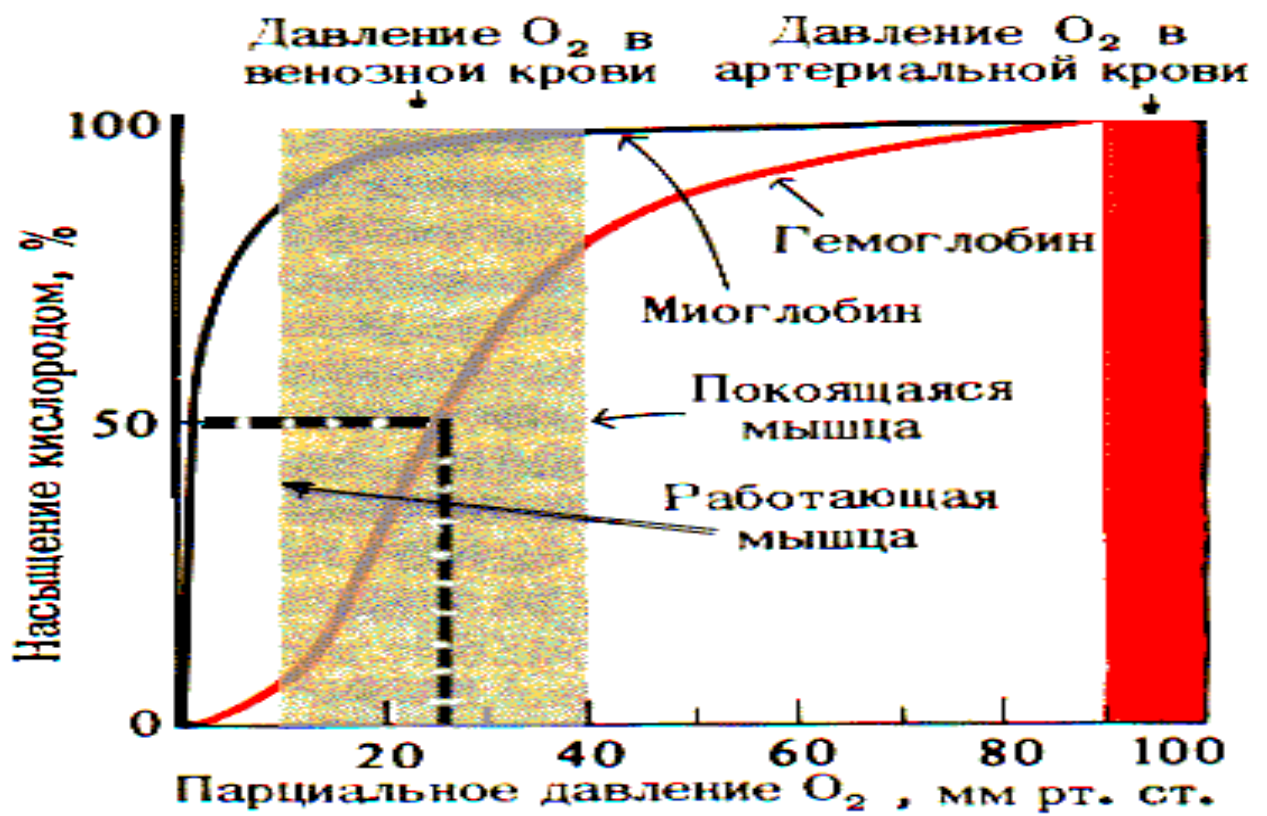
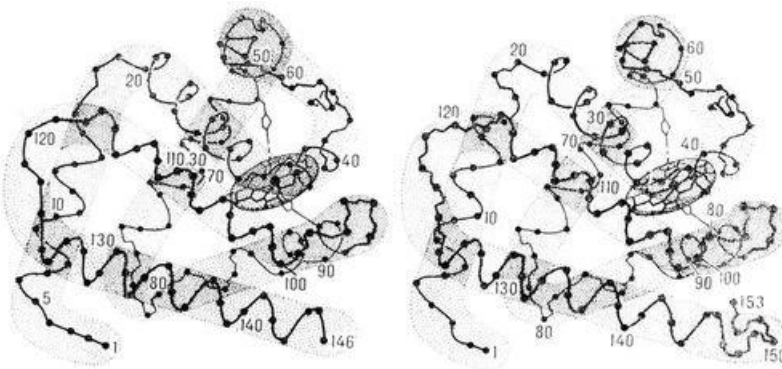


Рис. 44. Кривая насыщения кислородом миоглобина и гемоглобина
Миоглобин



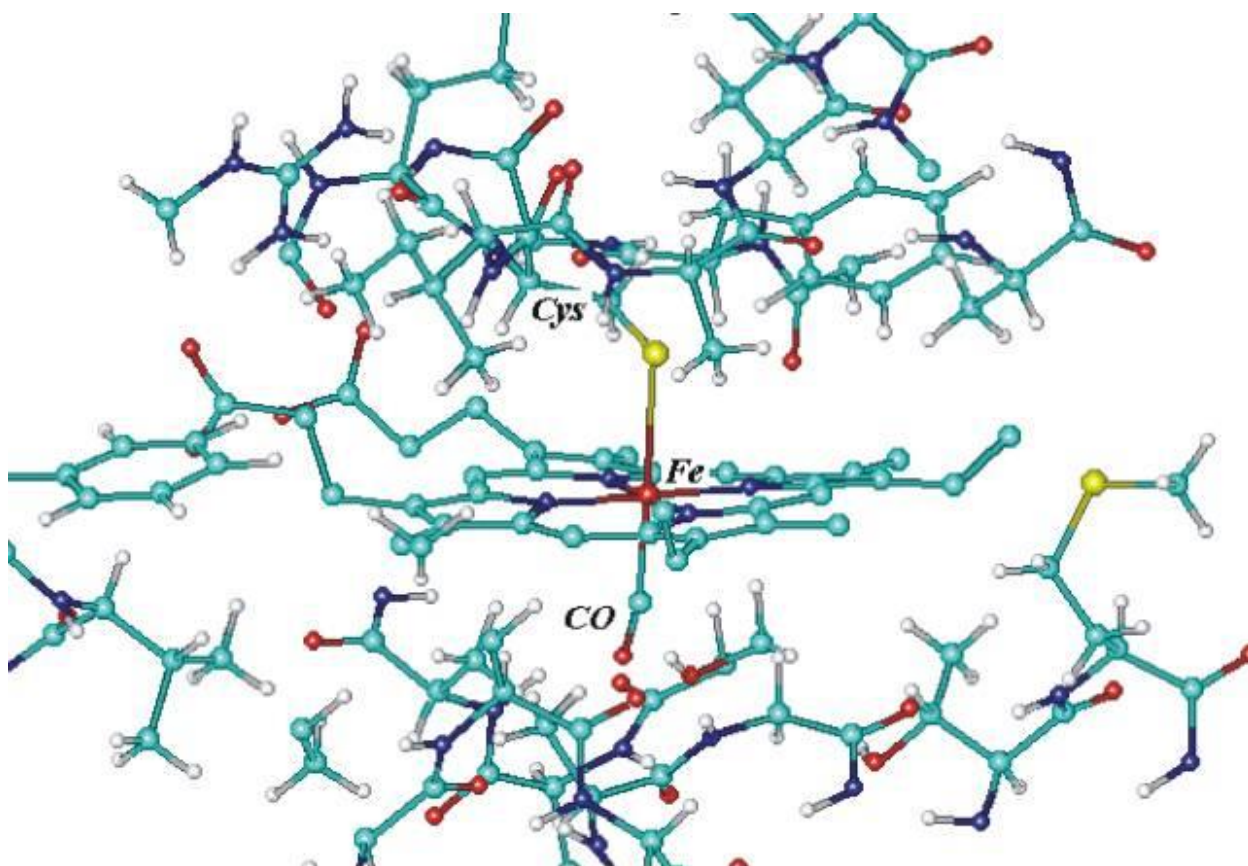


Рис. 4. Гем цитохрома P450. В 5-ом координационном положении находится Cys, в 6-ом с железом связана молекула CO.

Рис.45.

Одна из самых важных характеристик аллостерического фермента является число взаимодействующих центров в молекуле фермента.

Уравнение Хилла позволяет найти это число n , если обнаруживается сигмоидная форма зависимости v от S



Находя число n , определяют порядок реакции фермента относительно субстрата, т.е. минимальное число молекул субстрата, которое должно прореагировать с ферментом, чтобы объяснить его кинетическое поведение

K – кажущаяся константа диссоциации для комплекса ES_n представляет собой суммарную константу диссоциации n – числа обычных субстратных констант.

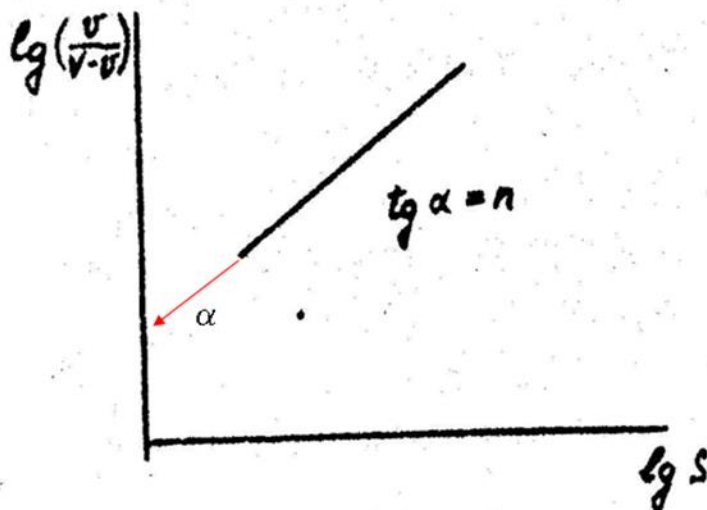
Уравнение Хилла

$$\log v / (V_{\max} - v) = n \log [S] - \log K$$

K – суммарная константа диссоциации n числа обычных субстратных констант.

Коэффициент Хилла n выражает число взаимодействующих участков или активных центров.

эс величины p_2 .



ис.70. Определение числа взаимодействующих участков (коэффициент Хилла).

Рис.46. Определение числа взаимодействующих участков (коэффициент Хилла) в координатах $\lg v / (V_{\max} - v)$, $\lg [S]$

Примеры аллостерических ферментов

1. Гемоглобин (4 субъединицы).

2. Аспартат транскарбамоилаза

Этот фермент состоит из 6 каталитических субъединиц (С, $M = 33000$), объединенных в два тримера, и 6 регуляторных субъединиц (R, $M = 17000$), образующих три димера.

С3R2 структура. Эти центры находятся на расстоянии 6 нм. Аллостерическим активатором является АТФ, а ингибитором – ЦТФ.

3. Аспартокиназа.

4. Фосфофруктокиназа.

Природа регуляции ферментов

1. Аллостерическая регуляция.

2. Ковалентная модификация белка (фосфорилирование или дефосфорилирование)

Роль фосфорилирования в регуляции ферментативной активности

Ферменты протеинкиназы переносят фосфатный остаток АТФ на соответствующий белок.

При этом изменяется конформация фосфорилированного участка и, как следствие, его каталитические свойства. Мишенью для фосфорилирования может быть не только фермент, но и регуляторный белок – ингибитор или активатор фермента.

Фосфорилированию подвергаются гидроксильные группы отдельных остатков серина и треонина фермента. Фосфатные остатки могут отщепляться протеинфосфатазами.

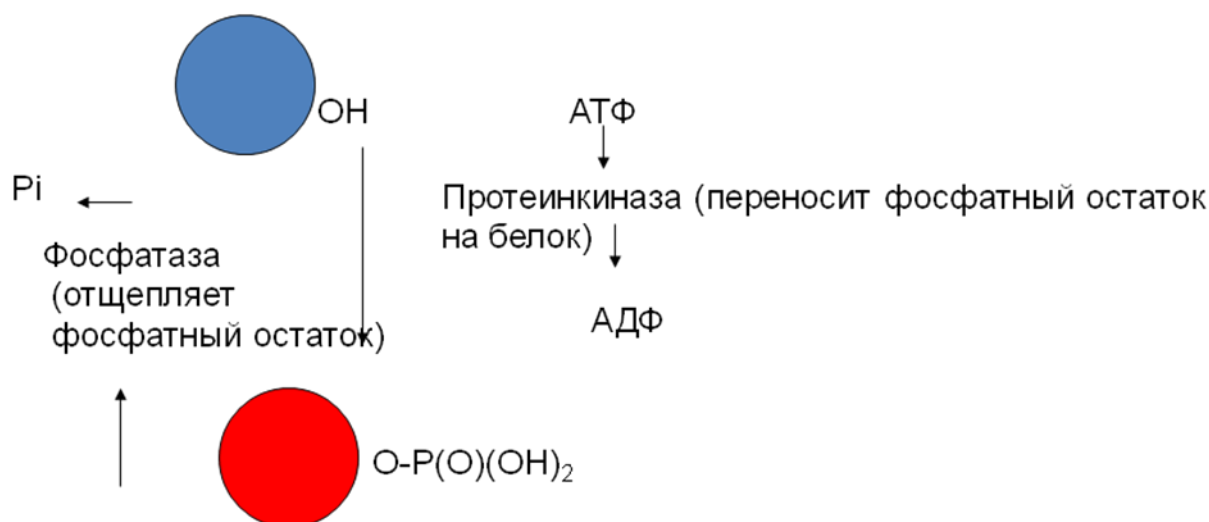


Рис.47. Схема регуляции фермента при фосфорилировании

Нахождение констант скоростей отдельных стадий ферментативной реакции

1. Субстратная константа K_s является константой диссоциации фермент-субстратного комплекса ES. Обратная величина представляет собой константу равновесия $1/K_s = K_p$.

$$K_s = k_{-1}/k_{+1} = [E][S] / [ES]$$

$$K_p = k_{+1}/k_{-1}$$

K_s дает гораздо больше информации, чем K_m

$$K_m = K_s + k_{+2} / k_{+1}$$

если k_{+2} соизмерима с k_{-1}

Увеличение субстратной константы при замене субстрата на его аналог будет говорить об уменьшении сродства. Изменение K_s при действии ингибитора позволит предположить избирательность действия этого ингибитора на активный центр и поможет идентифицировать группы, участвующие в связывании субстрата. Определение k_{+1} методом изучения кинетики предстационарного состояния (по Гатфрейнду или Гутфройнду и Рафтоу)

Предстационарная стадия начинается в первые моменты после смешивания реагентов и продолжается несколько миллисекунд. Затем наступает стационарная стадия. В предстационарной фазе происходит ускорение реакции по мере образования фермент-субстратного комплекса.

Определение константы k_{+1} методом изучения кинетики предстационарного состояния

На графике зависимости P (продукт) от времени t в предстационарном состоянии на оси абсцисс отсекается прямая, равная $1/(k_{+1}/[S_0])$ (при насыщающей концентрации субстрата).

Определение константы k_{+1} методом изучения кинетики предстационарного состояния

$$K_s = k_{-1}/k_{+1}$$

Зная исходную концентрацию субстрата S_0 , рассчитывают k_{+1}

Далее рассчитывают k_{+2}

$$V = k_{+2} [E]_0$$

K_m рассчитывают методом стационарной кинетики (линеаризация уравнения Михаэлиса)

$$K_m = (k_{-1} + k_{+2}) / k_{+1}$$

Из этих данных рассчитывают k_{-1}

Метод Гатфрейнда (Гутфройнда) применим в том случае, когда существует один промежуточный фермент-субстратный комплекс.

Раздел 5. Ингибиторы ферментов

Классификация ингибиторов

1. Необратимые ингибиторы.

Необратимые ингибиторы блокируют каталитическую активность фермента, осуществляя химическую модификацию одной из групп, участвующих в каталитическом превращении субстрата. Диизопропилфторфосфат (ингибитор протеиназ и эстераз)- эти ингибиторы действуют необратимо,

2. Обратимые ингибиторы.

Обратимые ингибиторы.

1. Конкурентные.

Ингибиторы, которые реагируют с ферментом, занимая место субстрата и препятствуя образованию фермент-субстратного комплекса. Тройной комплекс не образуется.

КОНКУРЕНТНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ: когда за активный центр фермента вместе с субстратом конкурирует ИНГИБИТОР:

$E + I \rightleftharpoons EI$

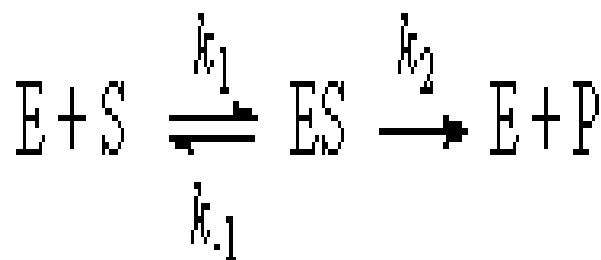
$K_i = [E][I] / [EI]$, т.е. K_i представляет собой константу диссоциации фермент-субстратного комплекса.

Чем меньше K_i , тем сильнее ингибитор

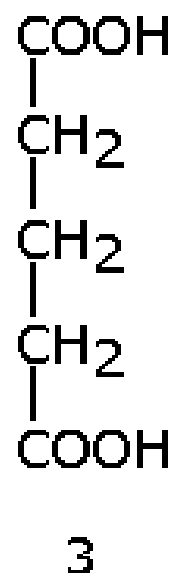
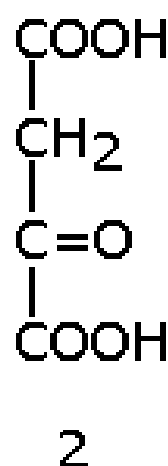
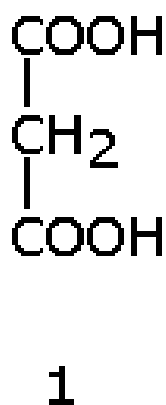
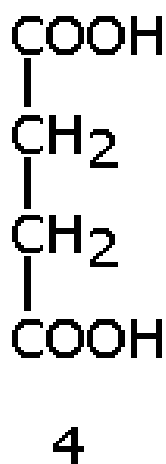
Чем больше концентрация конкурентного ингибитора, тем больше кажущаяся величина константы Михаэлиса.

Конкурентные ингибиторы.

Схема реакции



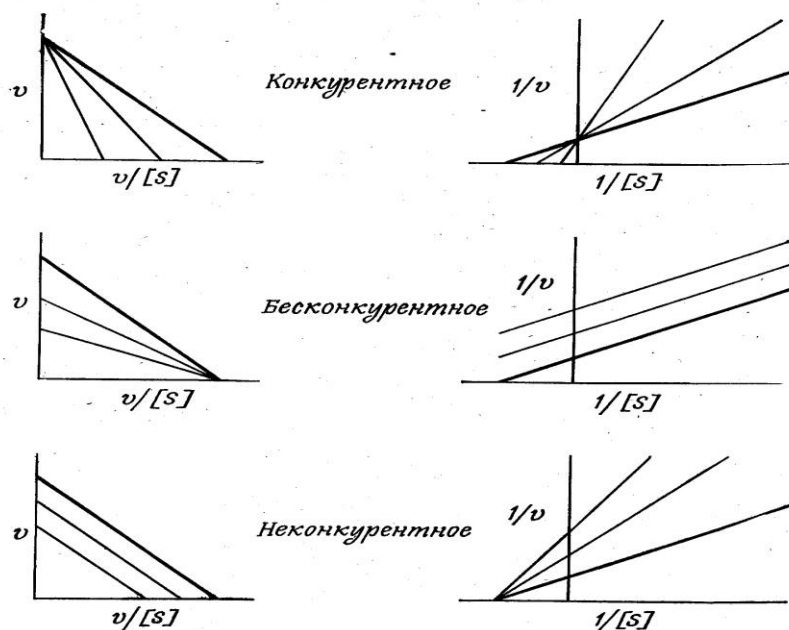
Так, малоновая (1), щавелевоуксусная (2) и глутаровая (3) кислоты ингибируют фермент СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗУ, субстратом которой является янтарная кислота (4) (СУКЦИНАТ), так как они сходны по строению с субстратом. Кроме карбоновых кислот ингибитором является пирофосфат



Графики Эди-Хофсти (слева) и Лайнуивера-Бэрка (справа) для различных типов ингибирования.

120

ГЛАВА 3



При конкурентном ингибировании получим набор прямых, отличающихся тангенсом угла наклона и пересекающихся ось ординат в одной точке ($1/V_{\max}$).

При любой концентрации ингибитора можно использовать настолько высокую концентрацию субстрата, что активность фермента будет максимальной.

В присутствии конкурентного ингибитора кажущаяся величина K_m' будет больше истинного значения на величину, равную разнице в длине отрезков, отсекаемых на оси абсцисс. В случае отсутствия ингибирования $\tan$ угла наклона прямой равен $K_m/V_{\max}$.

В присутствии конкурентного ингибитора $\tan$ увеличивается в $(1 + [I]/K_i)$ раз. Из этого соотношения можно рассчитать K_i .

Без ингибитора

$$\text{Наклон} = K_m/V_{\max}$$

В присутствии конкурентного ингибитора

$$\text{Наклон} = (1 + [I]/K_i) \cdot K_m/V_{\max}$$

КОНКУРЕНТНЫЙ ИНГИБИТОР увеличивает K_m и не изменяет $V_{\max}$

K_i – константа ингибирования,
 константа диссоциации фермент-ингибиторного комплекса.

$$K_i = [E][I] / [EI]$$

I_{50} – концентрация ингибитора, вызывающая снижение активности фермента на 50%.

Для конкурентного торможения

$$I_{50} = 1 + (K_i / K_m) \cdot [S]$$

$$\text{или } I_{50} = (K_m + [S]) / K_m \cdot K_i$$

I_{50} зависит от K_m , от концентрации субстрата, и от концентрации ингибитора.

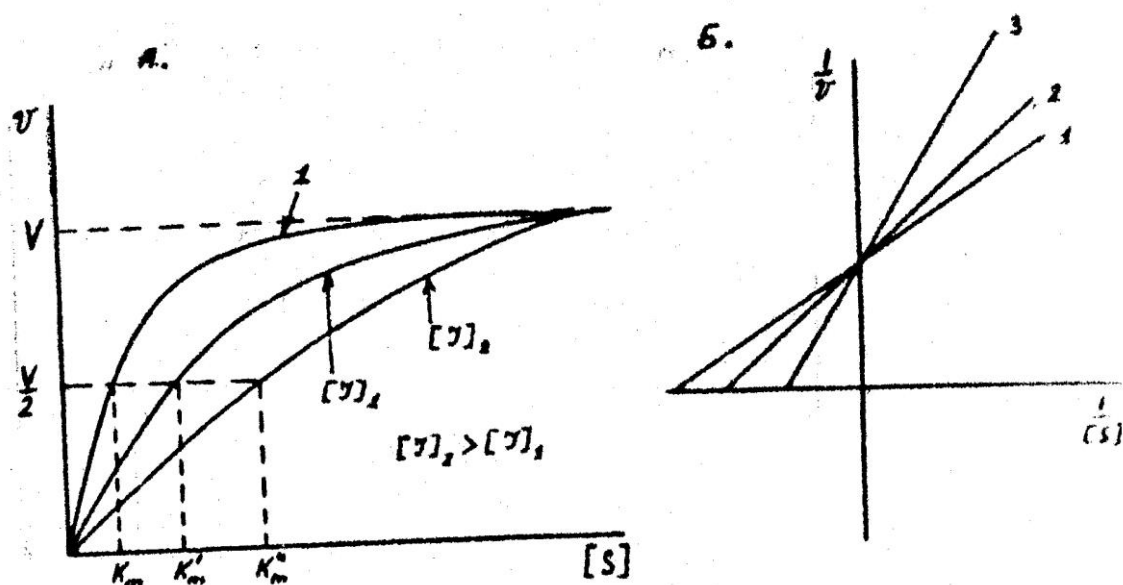
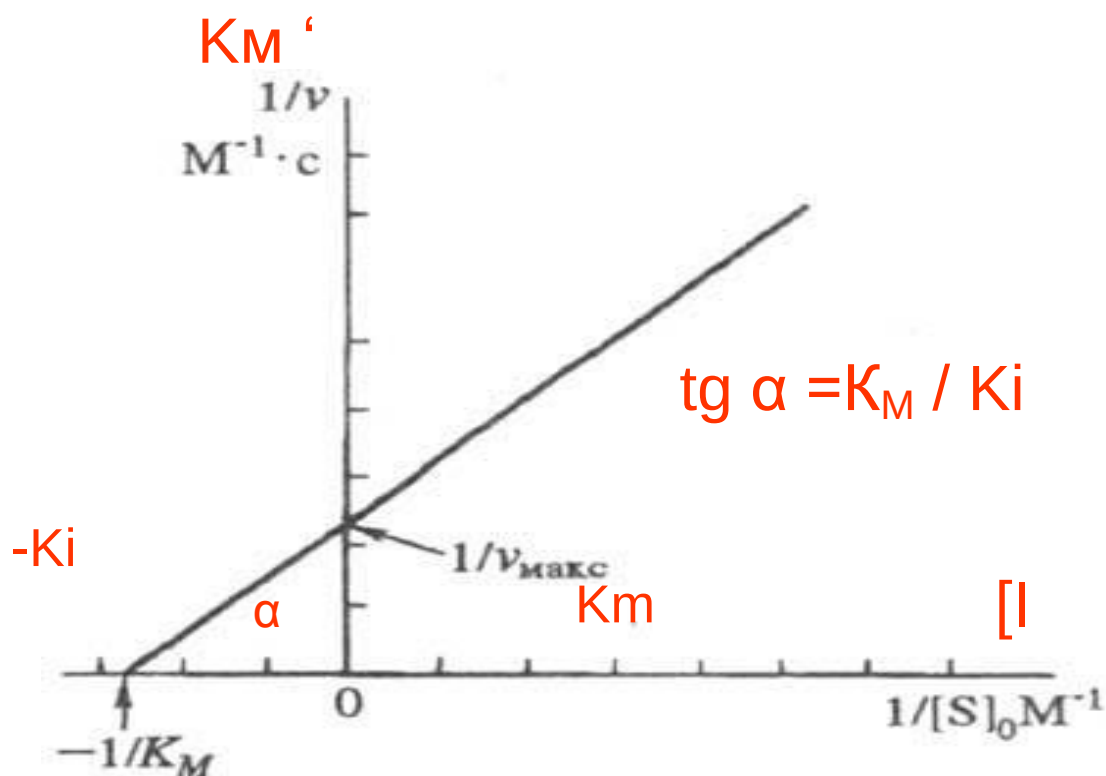


Рис. 48. 1.-без ингибитора, 2 и 3 –в присутствии конкурентного ингибитора
 Определение константы ингибирования для конкурентного ингибирования

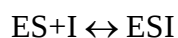
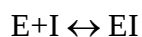


2. Неконкурентные ингибиторы.

Когда S и I присоединяются к ферменту одновременно, а не конкурируют за один и тот же центр связывания.

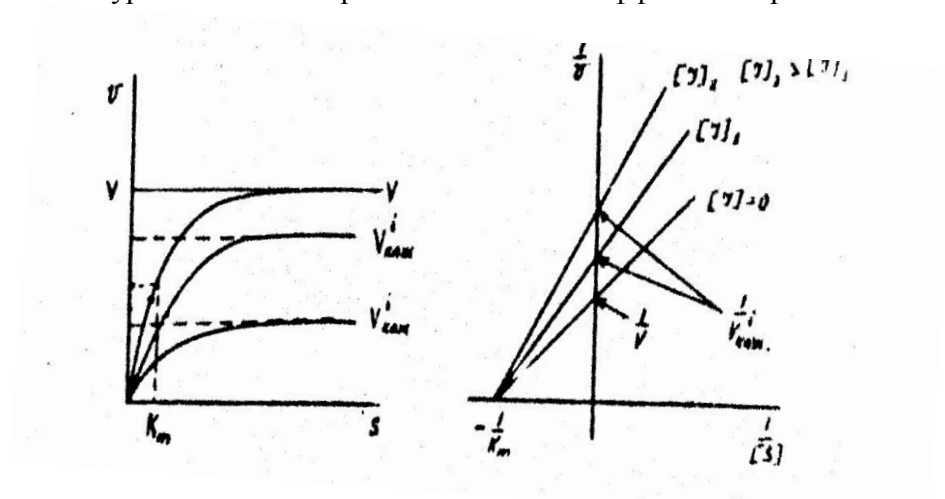
Неконкурентные ингибиторы КАК ПРАВИЛО - НЕПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ - NaF (ингибитор фосфатаз), п-хлормеркурибензоат (связывает группировки -SH).

Неконкурентный ингибитор связывается с ферментом на участке, отличающемся от центра связывания субстрата. Ингибитор связывается либо со свободным ферментом, либо с фермент-субстратным комплексом ES.



Обе формы EI и ESI неактивны

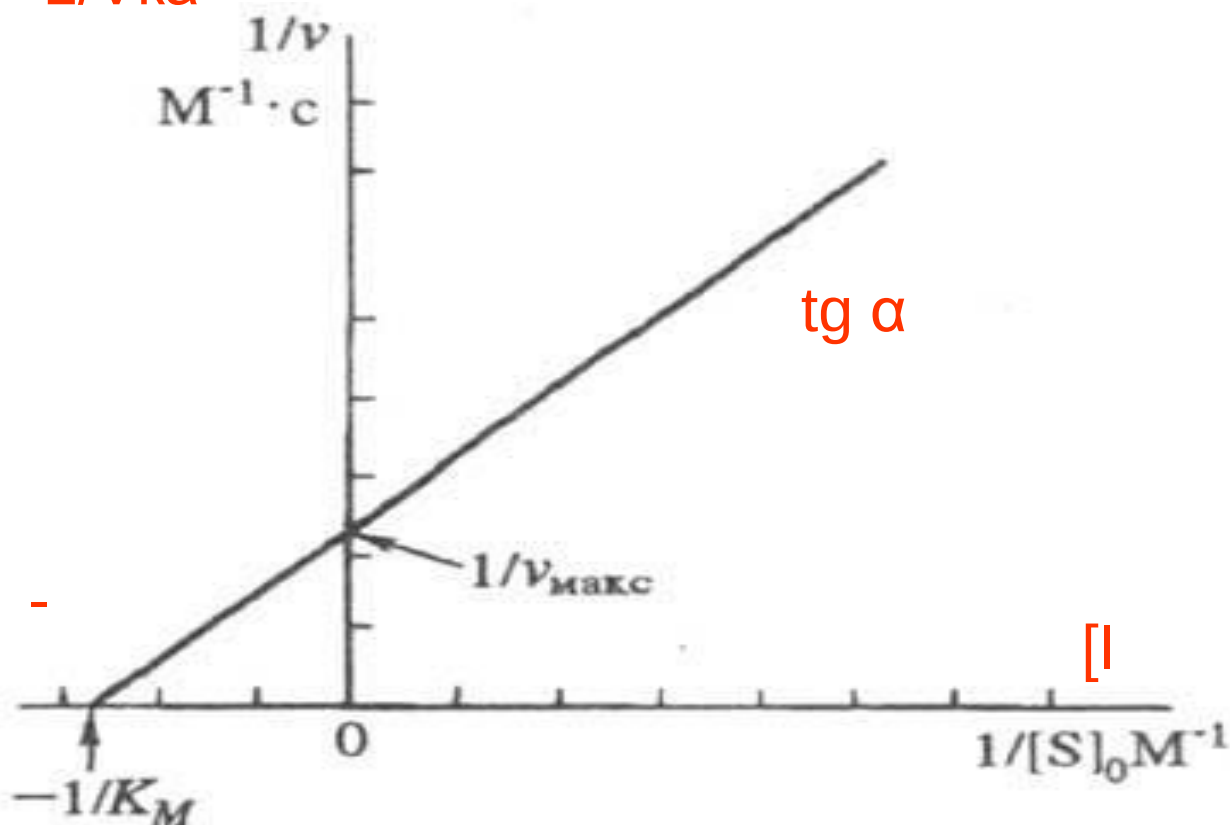
Неконкурентное ингибирование с полным эффектом торможения



При неконкурентном ингибировании графики различаются по наклону, не имеют общей точки пересечения на оси ординат. Отрезок, отсекаемый на оси ординат, для ингибированного фермента больше, чем для неингибированного, что указывает на снижение V_{max} в присутствии неконкурентного ингибитора.

Определение константы ингибирования для неконкурентного торможения

1/V_{ка}



В случае неконкурентного торможения для оценки эффективности действия ингибитора можно пользоваться величиной I₅₀ – концентрацией ингибитора, вызывающей снижение активности фермента на 50%.

Для неконкурентного торможения

I₅₀ = K_i (размерность концентрации, М, мМ, мкМ и т.д.)

I₅₀ – концентрация ингибитора, вызывающая снижение активности фермента на 50%.

Тип ингибирования	[I] ₅₀
Конкурентное	$(K_m + [S])K_i / K_m$
Неконкурентное	K_i
Бесконкурентное	$(K_m + [S])K_i / [S]$
Смешанное	$(K_m + [S])K_i K_i' / (K_m K_i' + K_i [S])$

НЕКОНКУРЕНТНЫЙ ингибитор

Устранить уменьшение V_{max} не удастся как бы ни была высока концентрация субстрата.

НЕКОНКУРЕНТНЫЙ ингибитор не изменяет K_m и снижает V_{max}.

Примером неконкурентного ингибирования является действие реагентов, обратимо связывающихся с –SH группами остатков цистеина.

Ионы тяжелых металлов (Cu⁺², Hg⁺², Ag⁺) и их производные ингибируют такие ферменты с образованием меркаптидов.

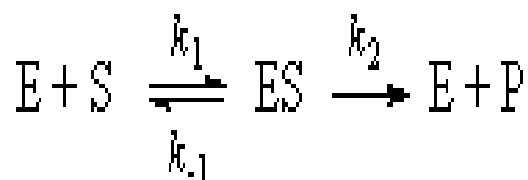
3. Бесконкурентные ингибиторы.

Ингибирование, при котором I связывается с ES, но не связывается с E, т.е. бесконкурентный ингибитор в отсутствии субстрата не присоединяется к ферменту.

БЕСКОНКУРЕНТНЫЙ ингибитор в одинаковой степени снижает K_m и V_{max}.

4. Смешанные ингибиторы.

Л.Уэбб, Ингибиторы ферментов и метаболизма.
Москва, Мир, 1966



Использование ингибиторного анализа в в медицинской биохимии

Важной «мишенью» для действия лекарств являются ферменты.

Механизм действия нестероидных противовоспалительных средств обусловлен ингибированием циклооксигеназы и снижением биосинтеза простагландинов.

Примеры лекарств-ингибиторов

Сульфаниламидные антибактериальные препараты имеют сходное строение с парааминобензойной кислотой и являются конкурентными ингибиторами в синтезе бактериями фолиевой кислоты (фактора роста бактерий). 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):

Ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента

В качестве гипотензивных средств используются ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента:

Каптоприл (капотен),

Эналаприл,

Лизиноприл,

фозиноприл

(Д.А. Харкевич, Фармакология, 2004 г.)

Багоприл - антигипертензивный препарат, механизм его действия связан с уменьшением образования из ангиотензина I ангиотензина II, снижение содержания которого ведет к прямому уменьшению выделения альдостерона. При этом понижается общее периферическое сосудистое сопротивление, систолическое и диастолическое артериальное давление, пост- и преднагрузка на миокард. Расширяет артерии в большей степени, чем вены, при этом рефлекторного повышения частоты сердечных сокращений не отмечается. Уменьшает деградацию брадикинина, увеличивает синтез простагландина. Гипотензивный эффект более выражен при высоком уровне ренина плазмы крови, чем при нормальном или сниженном его уровне.

Ингибиторы ацетилхолинэстеразы (антихолинэстеразные средства) блокируют фермент и стабилизируют ацетилхолин:

Прозерин,

Армин,

Эдрофоний,

Галантамина гидробромид,

Физиостигмина салицилат

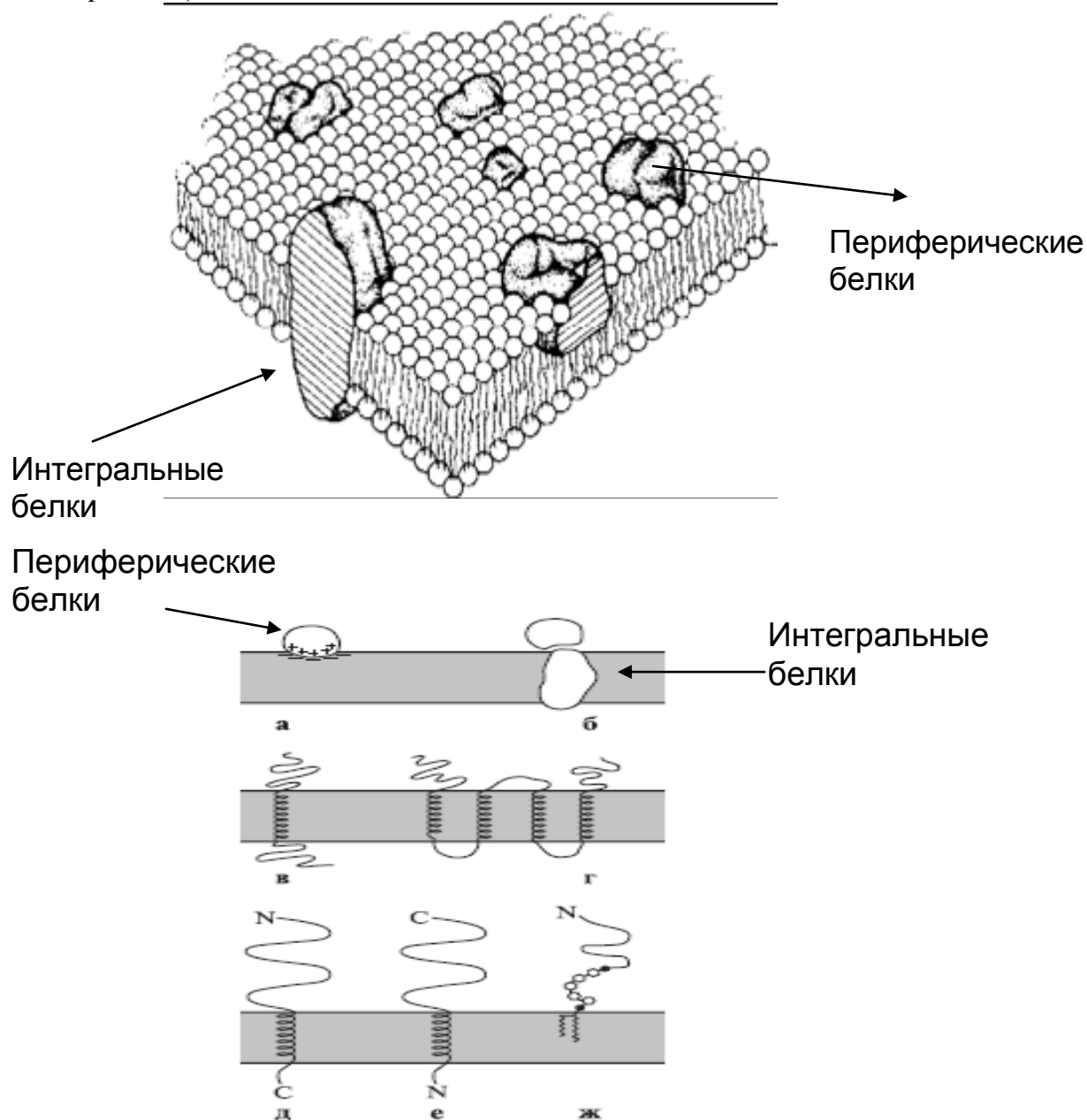
Раздел 6. Особенности ферментативной кинетики мембранных белков.

Кинетика действия иммобилизованных ферментов

Ферменты могут быть включены:

1. В мембраны
2. В искусственные мембраны
3. Связаны с носителем (иммобилизованы на биочипе, биосенсоре, полимерном материале)

Строение мембраны с интегральными (встроенными) и периферическими (находящимися на поверхности) белками



Классификация мембранных белков по типу связывания с мембраной.

Периферические белки:

- (а) электростатическое связывание с бислоем,
- (б) связывание с другими «якорными» белками.

Интегральные трансмембранные белки:

- (в) единственное и
- (г) множественные пересечения

мембраны.

Интегральные мембранные белки, имеющие гидрофобный якорь:

(д) I тип — белок обладает С-концевым пептидным якорем,

(е) II тип — белок содержит N-концевой якорь,

(ж) в качестве гидрофобного якоря выступает фосфатидилинозитольный гликолипид (GPI).

Каталитические свойства интегральных ферментов, обладающих пептидным или фосфатидилинозитольным якорем, также могут изменяться при переводе их в растворимую форму. На такую возможность прямо указывают данные по изучению каталитических свойств

мембраносвязанного ангиотензинпревращающего фермента АПФ (двудоменный фермент с двумя активными центрами)

Было показано, что соотношение каталитических констант

гидролиза природного субстрата ангиотензина I на N- ($k_{cat} = 48 \text{ с}^{-1}$) и С-доменах ($k_{cat} = 14 \text{ с}^{-1}$) мембраносвязанного фермента отличается от такового для солюбилизованного АПФ в водных условиях: 11 с^{-1} и 34 с^{-1} , соответственно.

Структурно-функциональные особенности мембранных белков. Кинетика мембранных транспортных ферментов.

Иммобилизованные ферменты

Принципиальной особенностью систем, в которых работают иммобилизованные ферменты, является их гетерогенный характер. В таких системах на кинетику процесса оказывает влияние массоперенос за счет диффузии субстратов и продуктов реакции. Если скорости ферментативных реакций высокие, а диффузия затруднена, скорость реакции в целом будет зависеть от скорости диффузии реагентов. Иммобилизованные ферменты находят все большее применение в промышленности, медицине, аналитической химии. Для ферментов, связанных с носителем, или включенных в мембраны, можно рассмотреть последовательность процессов:

1. субстрат из раствора диффундирует к поверхности носителя (мембраны),
2. субстрат пересекает границу раздела и диффундирует внутри носителя,
3. субстрат превращается в продукт под действием фермента,
4. продукт диффундирует к поверхности носителя,
5. продукт диффундирует в объем раствора от поверхности носителя.

Влияние носителя на фермент и на ферментативную реакцию

1. Конформационный эффект, т.е. структура иммобилизованного фермента отличается от его структуры в растворе.
2. Эффект диффузии (распределения), т.е. как субстрат проникает к иммобилизованному ферменту; среда, через которую субстрат проникает в активный центр фермента, отличается от среды раствора.
3. Эффект распределения, т.е. концентрация субстрата внутри носителя отличается от концентрации в растворе.
4. Диффузионный эффект, т.е. на кинетику влияет скорость диффузии.
5. Стерические затруднения, проявляющиеся в том, что мембрана (носитель) может экранировать активный центр или часть его.

Массообмен играет важную роль в гетерогенно-каталитических реакциях, в электрохимических процессах.

При иммобилизации фермента на твердых носителях возникает гетерогенная система, свойства которой определяются массопереносом субстрата из жидкости к поверхности носителя (система с внешней диффузией реагентов).

Уравнения, описывающие систему, не могут быть решены в общем случае вследствие их сложности. Решение возможно только при введении ряда ограничений.

Приближенная оценка границы кинетической и диффузионной областей в неподвижной жидкости

Обычно реакции, катализируемые иммобилизованными ферментами, проводят при низких скоростях растворов субстратов.

Например, при исследовании реакций с иммобилизованными ферментами (фицин) процесс изучали при скорости введения раствора субстрата 200 мл/час. В гидродинамическом смысле эти условия скорости подачи раствора субстрата близки к практически неподвижной жидкости. При низких скоростях раствора субстрата массоперенос субстрата можно рассматривать как диффузионный перенос к неподвижной жидкости.

В том случае, когда экспериментально наблюдаемая скорость реакции, пересчитанная на единицу потока, близка к предельному теоретическому значению диффузионного потока, можно утверждать, что реакция контролируется диффузией. Если экспериментальное значение потока существенно ниже теоретического предельного значения диффузионного потока, реакция протекает в кинетической области.

Поток субстрата к гранулам носителя

Поток субстрата $j_{\max}$ к поверхности сферической частицы носителя равен

$$j_{\max} = 4\pi R D S_0$$

R – радиус сферической гранулы носителя

D – коэффициент диффузии

S_0 – начальная концентрация субстрата

Число N сферических частиц в 1 л раствора равно

$$N = 3D / 4\pi R^3 \rho$$

ρ – плотность носителя

Общая максимальная диффузионная скорость процесса в единице объема

$$v_{\text{дифмакс}} = j_{\max} \cdot N = 3nD S_0 / (1000\rho R^2)$$

n – концентрация носителя, г/л

Экспериментально измеряемая скорость v (эксп) равна

$$v_{\text{эксп}} = V_m' S_0 / (K_m' + S_0)$$

V_m' , K_m' – параметры фермента в иммобилизованном состоянии

Введем безразмерное соотношение χ

$$\chi = v_{\text{эксп}} / v_{\text{дифмакс}}$$

$$\chi = 1000 \rho R^2 V_m' / (K_m' + S_0) 3nD$$

v – скорость процесса

Это соотношение является критерием, который позволяет определить, в какой области – кинетической или диффузионной – работает система.

Если $\chi \ll 1$, система работает в кинетическом режиме.

Если $\chi \sim 1$, система работает в диффузионном режиме.

Чем выше V_m' (максимальная скорость фермента в иммобилизованном состоянии), тем выше вероятность того, что реакция контролируется диффузией субстрата.

При изменении концентрации субстрата система может существовать в одной из трех областей:

- 1) в кинетической области, которая реализуется при высоких концентрациях субстрата,
- 2) в переходной области,
- 3) в диффузионной области, где скорость процесса контролируется массопереносом субстрата к поверхности носителя с ферментом

Оценка

параметров

$$k_{\text{cat}}' / K_m'$$

Этот параметр связывает скорость реакции с концентрацией свободного фермента (а не с его общей концентрацией)

Отношение k_{cat}' / K_m' может изменяться в широких пределах.

$$v = (k_{\text{cat}} / K_m) [E]_0 [S]$$

т.е. соотношение k_{cat}' / K_m' представляет собой кажущуюся константу скорости второго порядка (при низких концентрациях субстрата)

При низких концентрациях субстрата $[E] = [E]_0$

Условно все (иммобилизованные) ферменты можно разделить на три основные группы.

1. Малоактивные

($k_{cat}'/K_m' < 10^4$ л/моль·с)

2. Активные

($k_{cat}'/K_m' = 10^4 - 10^7$ л/моль·с)

3. Высокоактивные

($k_{cat}'/K_m' > 10^7$ л/моль·с)

Методы иммобилизации белков-ферментов или клеток

В качестве носителей используют синтетические полимерные материалы.

1. Сорбция с образованием ионных, водородных, гидрофобных связей.

2. Образование ковалентных связей фермент – носитель.

3. Включение в водопроницаемые гели(гидрогели)

4. Включение в микрокапсулы.

МЕМБРАННЫЕ БЕЛКИ

Предельное количество гидрофобных аминокислотных радикалов для глобулярного белка не должно превышать 40%. Даже при этом ограничении такие молекулы могут быть стабилизированы лишь в виде громоздких октамеров - ансамблей, содержащих восемь субъединиц. Однако ряд белков имеют гораздо больше гидрофобных аминокислот в своем составе. Стабильно функционировать эти белки могут лишь будучи погруженными в гидрофобные мембранные структуры клетки - такие белки называют мембранными (или мембраносвязанными).

Мембранные белки в подавляющем большинстве также образуют надмолекулярные ансамбли, хотя внутри мембранного бислоя в их образовании нет структурной необходимости - гидрофобные белки целиком погружены внутрь мембранного бислоя и легко перемещаются в латеральном направлении. Поэтому специалистов, изучающих такие белковые системы, всегда занимал вопрос о биологическом значении олигомерных ансамблей, образуемых мембранными белками. Олигомерные ансамбли, или ассоциаты, могут состоять из нескольких одинаковых молекул (то есть являться гомоолигомерами) или включать в состав различные по структуре и функции белки (в последнем случае ассоциаты называют гетероолигомерами)

Критическая концентрация мицеллообразования (ККМ) ~ концентрация ПАВ в растворе, при которой в системе образуются в заметных количествах устойчивые мицеллы. При низких концентрациях ПАВ (10^{-4} - 10^{-2} М) образуются истинные растворы, причем ионогенные ПАВ ведут себя как сильные электролиты. При достижении ККМ мицеллы находятся в термодинамическом равновесии с неассоциированными молекулами ПАВ; при разбавлении р-ра мицеллы распадаются, а при увеличении концентрации вновь возникают. Выше ККМ весь избыток ПАВ находится в виде мицелл. При очень большом содержании ПАВ в системе образуются жидкие кристаллы или гели.

Ферментативные реакции на межфазной границе мембраны

Надо различать реакции фермента в мембране, получающего субстрат из водной фазы, и реакции фермента в межфазном пространстве (мембранном), получающего субстрат из межфазного пространства. Если применить для мембранных белков уравнения Михаэлиса-Ментен, но заменить

$v/[E]_0$ на j (поток субстрата)

$$j = v/[E]_0 = k_{cat}[S] / K_m + [S]$$

$K_s^* = k_d / k_a$ константа диссоциации для субстрата S от границы раздела (interface)

k_d константа скорости диссоциации от границы раздела

k_a - константа скорости ассоциации к границе раздела.

Для $[S]_0 > K_s^*$, $[S] = K_s^*$, и будет равно критической концентрации мицеллообразования (ккм) в предположении, что мембраны образуют мицеллы определенного размера.

$$j = k_{cat} K_s^* / K_m + K_s^* = j_{max}$$

При увеличении $[S]$ 0 поток возрастает до максимального значения

$$[S] \geq K_s^*$$

K_m и k_{cat} могут быть определены из уравнения Михаэлиса – Ментен при изменении концентрации субстрата ниже K_m