
ОСНОВЫ КИНЕТИКИ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Скорость ферментативной реакции

Скорость ферментативной реакции определяется изменением количества молекул субстрата или продукта за единицу времени. Скорость ферментативной реакции - мера каталитической активности фермента, её обозначают как активность фермента.

Математически скорость ферментативной реакции выражается в изменении концентрации субстрата (уменьшение) или продукта (увеличение) за единицу времени:

$$V = dC_s/dt \text{ или } dC_p/dt$$

C_s – концентрация субстрата, C_p – концентрация продукта.

Скорость ферментативной реакции

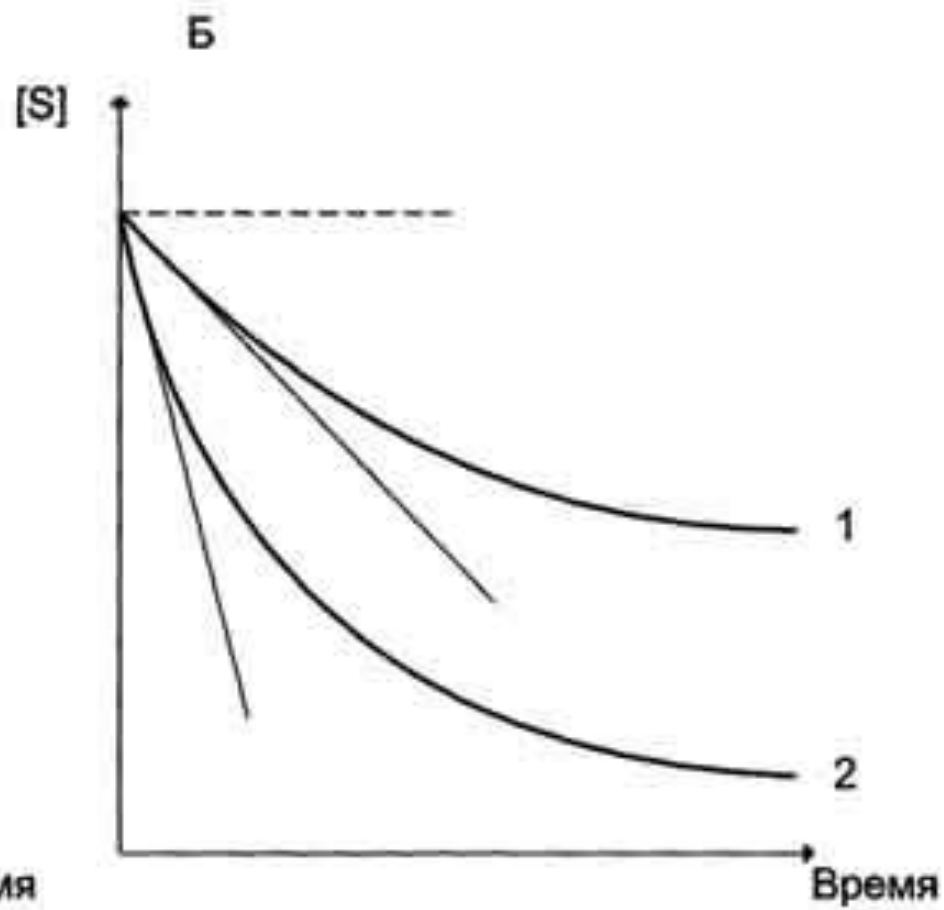
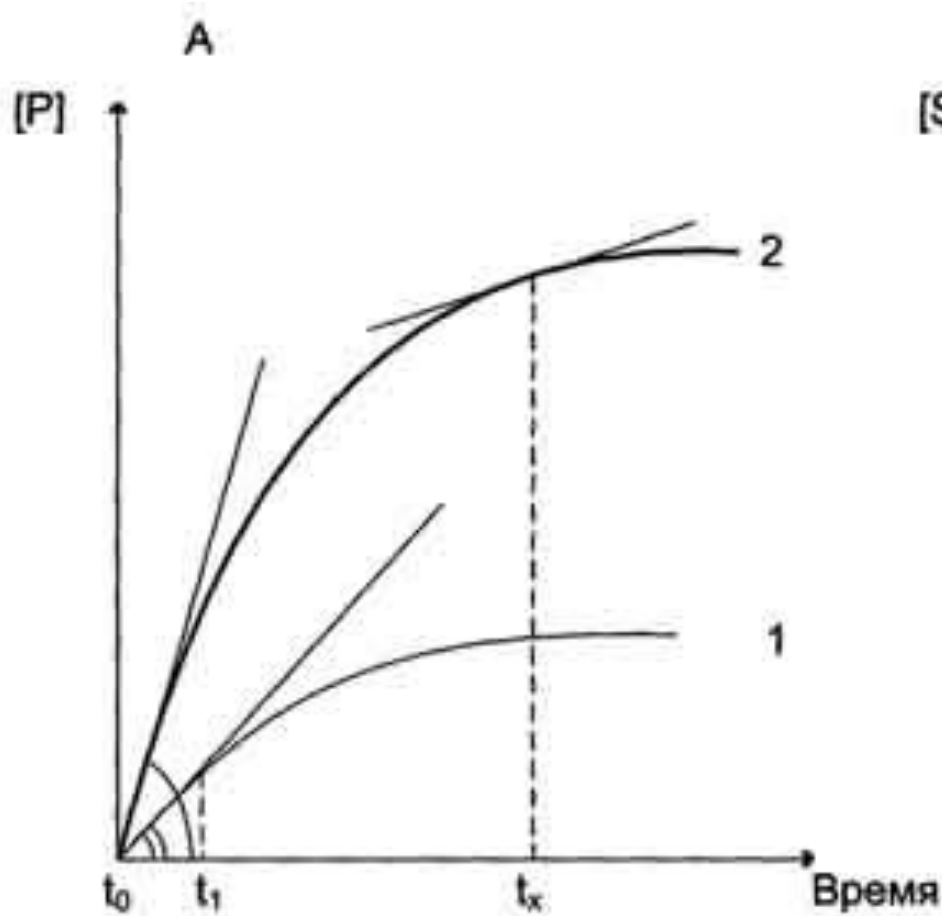
На начальном этапе $[0 - t_0]$ скорость реакции прямо пропорциональна времени и имеет линейную зависимость.

С течением времени изменение скорости ферментативной реакции в экспериментальных условиях уменьшается, об этом свидетельствует уменьшение угла наклона касательной в момент времени t .

Снижение скорости ферментативной реакции может происходить за счёт ряда факторов: уменьшения концентрации субстрата, увеличения концентрации продукта, который может оказывать ингибирующее действие, могут происходить изменения pH раствора, инактивация фермента и т.д.

На этапе $[t_1 - t_x]$ скорость реакции изменяется нелинейно в зависимости от времени. Поэтому для определения скорости ферментативной реакции чаще всего исследуют изменение скорости на начальном этапе $[t_0 - t_1]$, где наблюдают линейное изменение концентрации продукта (или субстрата).

Зависимость скорости ферментативной реакции от времени



Скорость ферментативной реакции

Скорость ферментативной реакции зависит от ряда факторов, таких как:

- количество и активность ферментов,
- концентрация субстрата,
- температура среды,
- рН раствора,
- присутствие регуляторных молекул (активаторов и ингибиторов).

Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации фермента

При проведении ферментативной реакции в условиях избытка субстрата скорость реакции будет зависеть от концентрации фермента. Графическая зависимость такой реакции имеет вид прямой линии.



Очевидно, что в кинетическое уравнение концентрация фермента (C_f) входит линейным множителем: $V = k \cdot C_s^x \cdot C_f$

Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации фермента

Однако количество фермента часто невозможно определить в абсолютных величинах, поэтому на практике пользуются условными величинами, характеризующими активность фермента: *одна международная единица активности (МЕ) соответствует такому количеству фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата за 1 мин при оптимальных условиях проведения ферментативной реакции.*

Оптимальные условия индивидуальны для каждого фермента и зависят от температуры среды, рН раствора, при отсутствии активаторов и ингибиторов.

$$n \text{ ME} = \frac{\text{Количество превращённого субстрата (мкмоль)}}{\text{Время (мин)}}$$

Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации фермента

В 1973 г. была принята новая единица активности ферментов: 1 катал (кат), соответствующий такому количеству катализатора, которое превращает 1 моль субстрата за 1 с. Количество каталов определяют по формуле:

$$n \text{ катал} = \frac{\text{Количество превращённого субстрата (моль)}}{\text{Время (с)}}$$

Международная единица ферментативной активности МЕ связана с каталом следующими равенствами:

$$1 \text{ кат} = 1 \text{ моль/с} = 60 \text{ моль/мин} = 60 \times 10^6 \text{ мкмоль/мин} = 6 \times 10^7 \text{ МЕ},$$

$$1 \text{ МЕ} = 1 \text{ мкмоль/мин} = 1/60 \text{ мкмоль/с} = 1/60 \text{ мкат} = 16,67 \text{ нкат}.$$

Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры

Повышение температуры до определённых пределов увеличивает скорость ферментативной:

С повышением температуры увеличивается средний уровень энергии частиц, и энергетический барьер (энергия активации) может быть преодолен большим количеством частиц.

Однако скорость химической реакции, катализируемая ферментами, имеет свой температурный оптимум, превышение которого сопровождается понижением ферментативной активности, возникающим из-за термической денатурации белковой молекулы.

Для большинства ферментов человека температурный оптимум 37-38⁰С. Но существуют термостабильные ферменты. Например, Taq-полимераза микроорганизмов из горячих источников, не инактивируется при повышении температуры до 95⁰С.

Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры



Зависимость скорости ферментативной реакции от pH

Для каждого фермента существует значение pH, при котором наблюдается его максимальная активность. Отклонение от оптимального значения pH приводит к понижению ферментативной активности.

Влияние pH на активность ферментов связано с ионизацией функциональных групп аминокислотных остатков данного белка, обеспечивающих оптимальную конформацию активного центра фермента. При изменении pH от оптимальных значений происходит изменение ионизации функциональных групп молекулы белка.

Зависимость скорости ферментативной реакции от pH

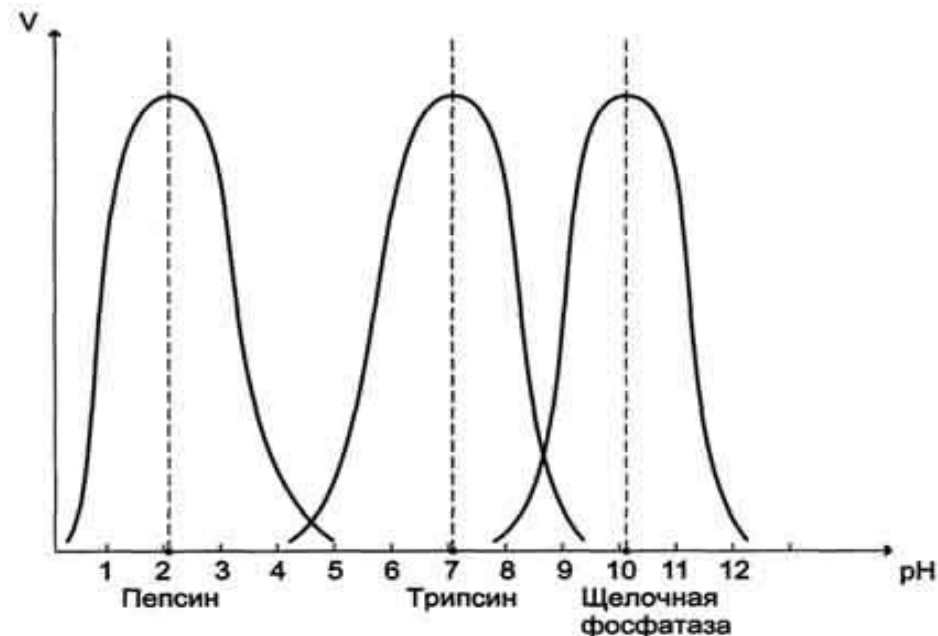
При закислении среды происходит протонирование свободных аминогрупп (NH_3^+), а при защелачивании происходит отщепление протона от карбоксильных групп (COO^-).

Это приводит к изменению конформации молекулы фермента и конформации активного центра; следовательно, нарушается присоединение субстрата, кофакторов и коферментов к активному центру. При значительном отклонении от оптимального значения pH может происходить денатурация белковой молекулы с полной потерей ферментативной активности.

Кроме того, pH среды может влиять на степень ионизации или пространственную организацию субстрата, что также влияет на сродство субстрата к активному центру.

Зависимость скорости ферментативной реакции от pH

Оптимальное значение pH у разных ферментов различно. Ферменты, работающие в кислых условиях среды (например, пепсин в желудке или лизосомальные ферменты), эволюционно приобретают конформацию, обеспечивающую работу фермента при кислых значениях pH. Однако большая часть ферментов организма человека имеет оптимальное pH, близкое к нейтральному (6-7), совпадающее с физиологическим значением pH

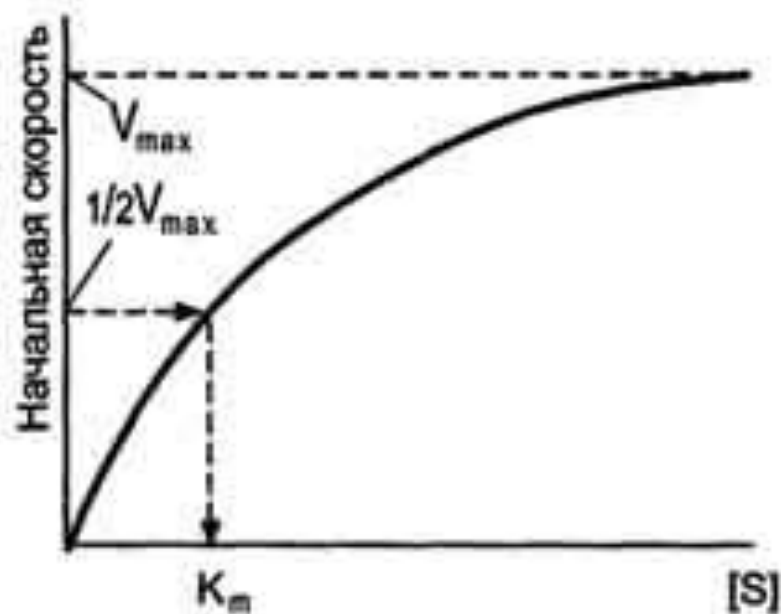


Зависимость скорости ферментативной реакции от количества субстрата

Если концентрацию ферментов оставить постоянной, изменяя только количество субстрата, то график скорости ферментативной реакции выходит на максимум.

При увеличении количества субстрата начальная скорость возрастает. Когда фермент становится полностью насыщенным субстратом, т.е. происходит максимально возможное при данной концентрации фермента формирование фермент-субстратного комплекса. Дальнейшее повышение концентрации субстрата не приводит к увеличению образования продукта, т.е. скорость реакции не возрастает. Данное состояние соответствует максимальной скорости реакции V_{\max} .

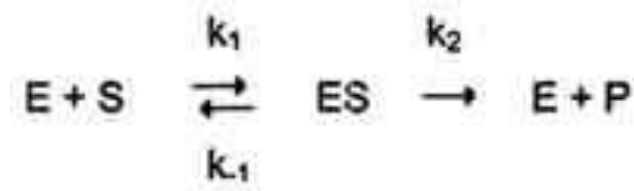
Зависимость скорости ферментативной реакции от количества субстрата



V_{\max} - максимальная скорость реакции при данной концентрации фермента в оптимальных условиях проведения реакции. K_m - константа Михаэлиса.

Уравнение Михаэлиса-Ментен

Ферментативный процесс можно выразить следующим уравнением:



где k_1 - константа скорости образования фермент-субстратного комплекса; k_{-1} - константа скорости обратной реакции, распада фермент-субстратного комплекса; k_2 - константа скорости образования продукта реакции.

Соотношение констант скоростей $(k_{-1} + k_2)/k_1$ называют константой Михаэлиса и обозначают K_m .

Уравнение Михаэлиса-Ментен

Наибольшая скорость реакции (U_{\max}) наблюдается в том случае, когда все молекулы фермента находятся в комплексе с субстратом, т.е. в фермент-субстратном комплексе ES, т.е. $[E] = [ES]$.

Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата выражается следующим уравнением:

$$V = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

Это уравнение получило название уравнения Михаэлиса-Ментен.

В случае, когда скорость реакции равна половине максимальной, $K_m = [S]$. Таким образом, *константа Михаэлиса численно равна концентрации субстрата, при которой достигается половина максимальной скорости.*

Порядок ферментативной реакции по субстрату

$$V = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

Если концентрация субстрата значительно больше K_m ($S \gg K_m$), то сумму ($K_m + S$) можно считать равной $[S]$. Следовательно, скорость реакции становится равной максимальной скорости:

$$V = V_{\max}$$

В этих условиях реакция имеет нулевой порядок, т.е. не зависит от концентрации субстрата. Можно сделать вывод, что V_{\max} - величина постоянная для данной концентрации фермента, не зависящая от концентрации субстрата.

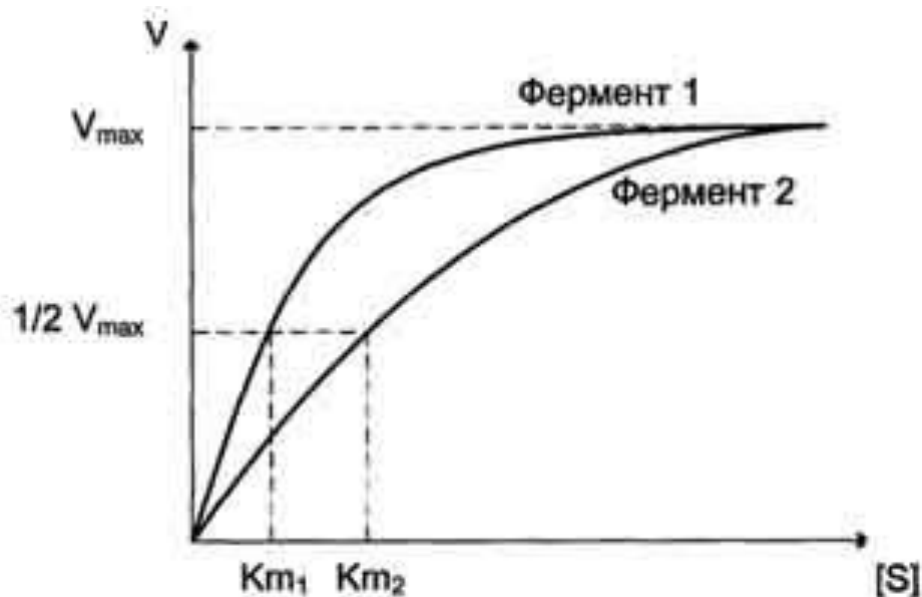
Если концентрация субстрата значительно меньше K_m ($S \ll K_m$), то сумма ($K_m + S$) примерно равна K_m , следовательно, $V = V_{\max}[S]/K_m$, т.е. в данном случае скорость реакции прямо пропорциональна концентрации субстрата (реакция имеет первый порядок)

K_m и U_{max}

- V_{max} дает характеристику каталитической активности фермента и имеет размерность скорости ферментативной реакции моль/л, т.е. определяет максимальную возможность образования продукта при данной концентрации фермента и в условиях избытка субстрата.
- K_m характеризует сродство данного фермента к данному субстрату и является величиной постоянной, не зависящей от концентрации фермента. Чем меньше K_m , тем больше сродство фермента к данному субстрату, тем выше начальная скорость реакции и наоборот, чем больше K_m , тем меньше начальная скорость реакции, тем меньше сродство фермента к субстрату.

K_m

Зависимость скорости двух ферментативных реакций (1 и 2) от концентрации субстрата. Константа Михаэлиса первого фермента меньше константы Михаэлиса второго фермента ($K_{m1} < K_{m2}$). Следовательно, сродство первого фермента к субстрату выше, чем у второго фермента, и начальная скорость реакции, катализируемой первым ферментом, выше в сравнении со вторым ферментом.



Анализ кинетики ферментов методом Лайнуивера-Берка

Г. Лайнуивер и Д. Берк преобразовали уравнение Михаэлиса-Ментен, выразив обе части уравнения в виде обратных величин:

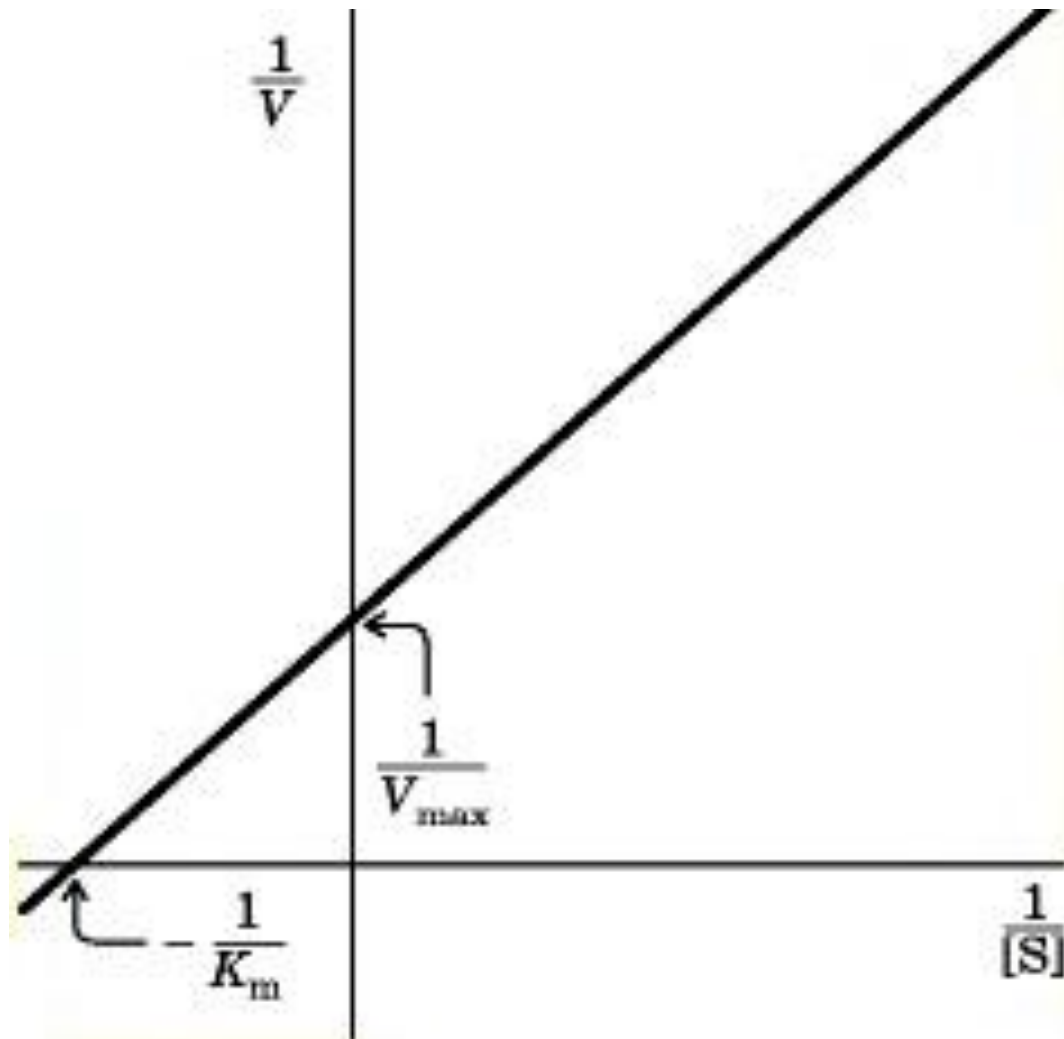
$$1/V = K_m/(V_{max} \cdot [S]) + [S]/(V_{max} \cdot [S])$$

или:

Уравнение Лайнуивера-Берка

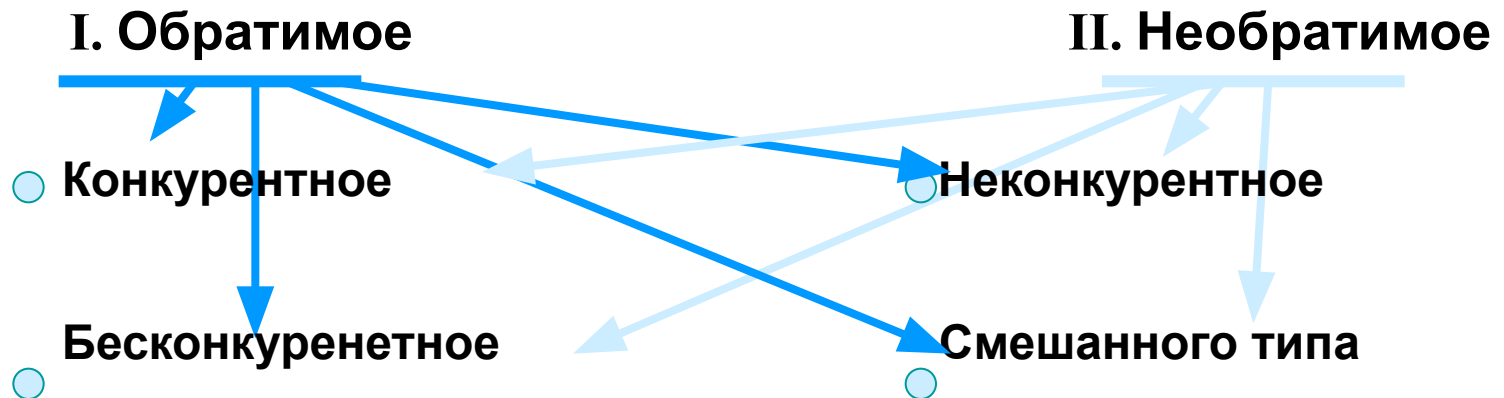
$$1/V = K_m/V_{max} \cdot 1/[S] + 1/V_{max}$$

Графическое выражение уравнения Лайнуивера-Берка



Реакции ингибирования ферментативных процессов

ТИПЫ ИНГИБИРОВАНИЯ ФЕРМЕНТОВ

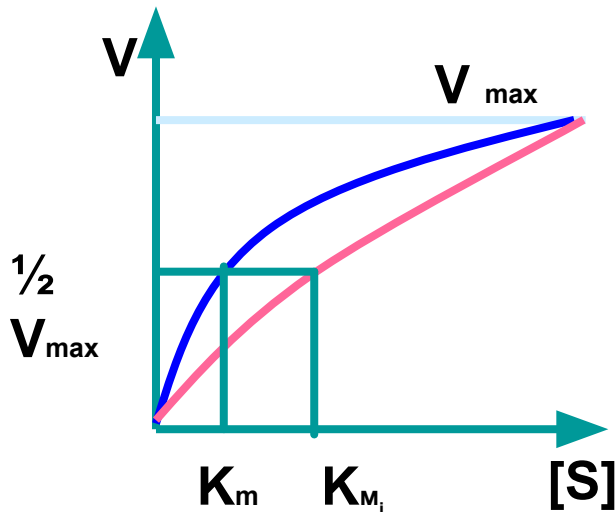


Конкурентное ингибирование

Осуществляется веществом, близким по химическому строению к субстрату. В этом случае ингибитор связывается в активном центре фермента и конкурирует за него с субстратом. Таким образом, конкурентный ингибитор не связывается с фермент-субстратным комплексом.

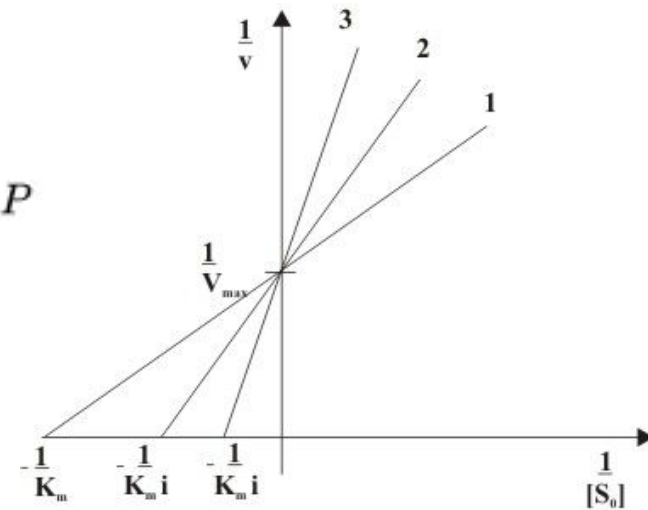
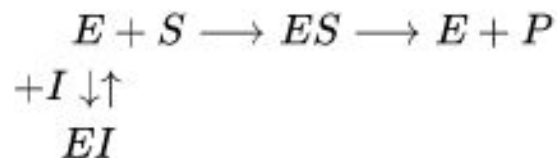
График зависимости скорости реакции от концентрации субстрата

по Михаэлису-Ментен



по Лайнуиверу-Берку

Схема конкурентного ингибирования:



Неконкурентное ингибирование

Ингибитор реагирует с ферментом иным образом, чем субстрат, поэтому повышение концентрации субстрата не может вытеснить ингибитор и восстановить активность фермента. Неконкурентный ингибитор не мешает связыванию субстрата с ферментом. Он способен присоединяться как к свободному ферменту, так и к фермент-субстратному комплексу с одинаковой эффективностью. Ингибитор вызывает такие конформационные изменения, которые не позволяют ферменту превращать субстрат в продукт, но не влияют на сродство фермента к субстрату.

График зависимости скорости реакции от концентрации субстрата

по Михаэлису-Ментен

по Лайнуиверу-Берку

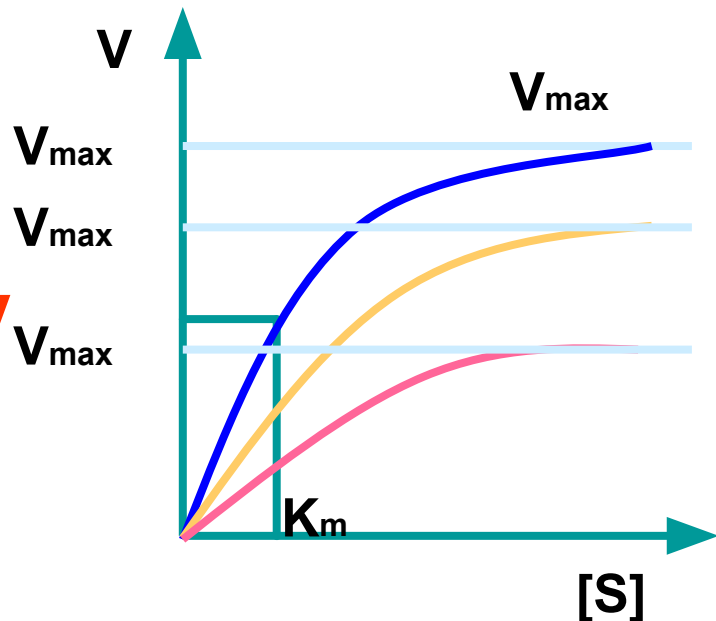
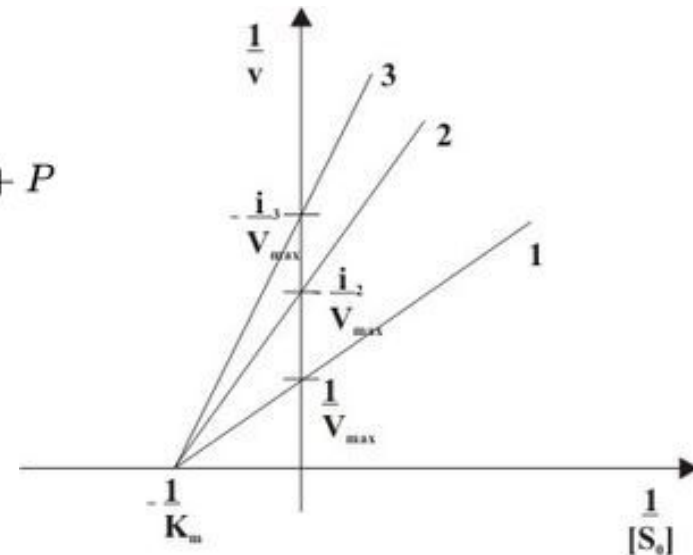
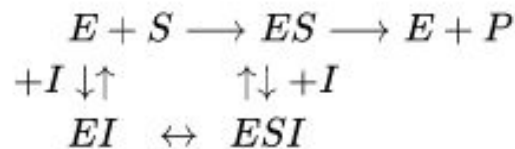


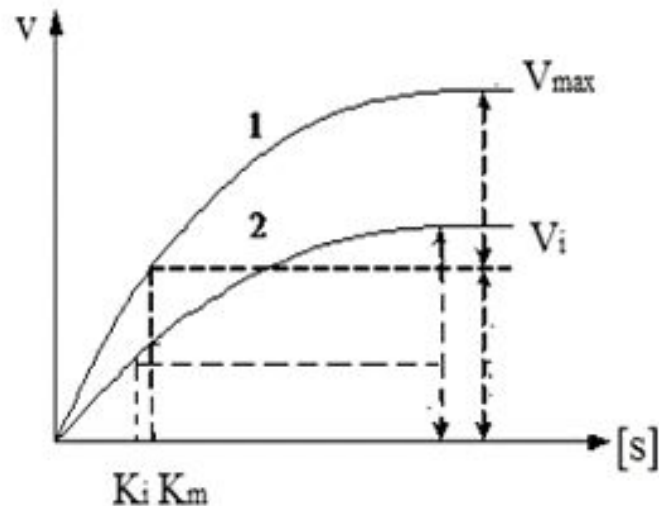
Схема конкурентного ингибирования:



Бесконкурентное ингибирование

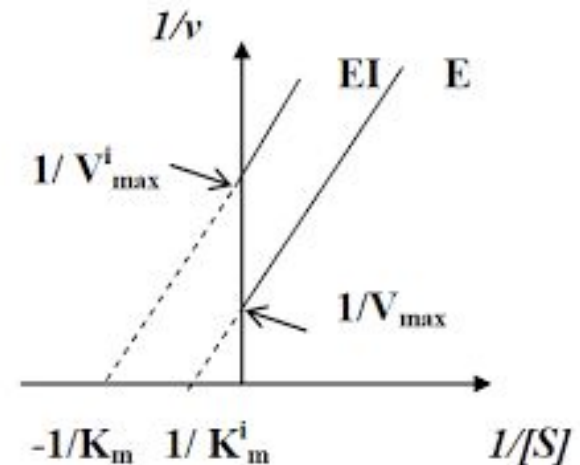
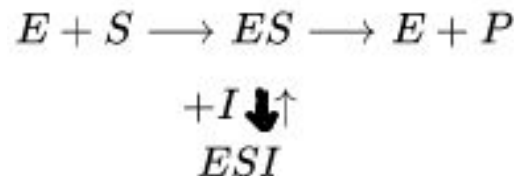
При бесконкурентном ингибировании ингибитор связывается только с фермент-субстратным комплексом, но не со свободным ферментом. Субстрат, связываясь с ферментом, изменяет его конформацию, что делает возможным связывание с ингибитором. Ингибитор, в свою очередь, так меняет конформацию фермента, что катализ становится невозможным.

График зависимости скорости реакции от концентрации субстрата по Михаэлису-Ментен по Лайнуиверу-Берку



a

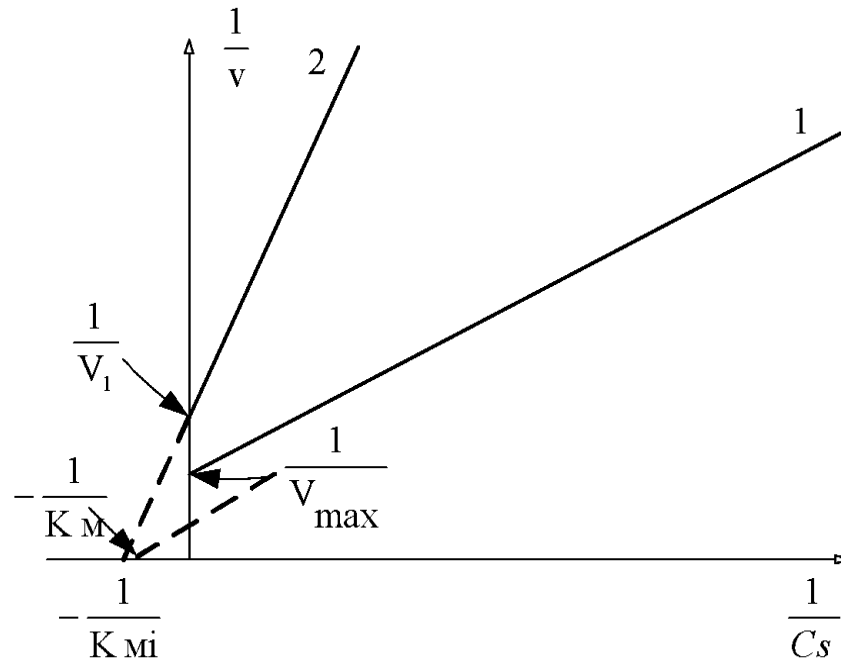
Схема конкурентного ингибирования:



Смешанное ингибирование

Ингибитор связывается как в активном центре, так и вне его, а комплекс EI сохраняет частичную активность по сравнению с нативным ферментом. Такие ингибиторы увеличивают константу Михаэлиса и уменьшают максимальную скорость ферментативной реакции.

График зависимости скорости реакции от концентрации субстрата
по Лайнуиверу-Берку



Сравнение типов ингибирования ферментов

Тип ингибитора:	Механизм действия:
КОНКУРЕНТНОЕ	I связывается в активном центре и конкурирует с субстратом. $V_{i \max} = V_{\max} ; K_{M i} > K_M$
НЕКОНКУРЕНТНОЕ	I связывается вне активного центра. $V_{i \max} < V_{\max} ; K_{M i} = K_M$
БЕСКОНКУРЕНТНОЕ	I связывается не с E, а с комплексом ES. $V_{i \max} \neq V_{\max} , K_M \neq K_{M i}$
СМЕШАННОЕ	I связывается в активном центре и вне его. V_{\max} и K_M уменьшаются независимо друг от друга.

Классификация ферментов.

Тривиальная классификация ферментов

Название ферментов строится по принципу:

Субстрат + реакция катализируемая ферментом + аза

Например: лактатдегидрогеназа

Исключение: пепсин

В основе классификации ферментов лежит
тип катализируемой реакции

Международная классификация ферментов

Современные классификация и номенклатура ферментов были разработаны Комиссией по ферментам Международного биохимического союза, учрежденной в 1956 г., и утверждены на V Международном биохимическом конгрессе в 1961 г. в Москве. Был разработан шифр и каждому ферменту присвоен индивидуальный номер.

Шифр ферментов: 1.1.1.27 - ЛДГ

В каждом шифре 4 цифры:

- **1 - класс ферментов**
- **2 - подкласс** (указывает какая группировка является донором)
- **3 - подподкласс** (указывает какая группировка является акцептором)
- **4 - порядковый номер фермента** в подподклассе

Классификация ферментов

1. *Оксидоредуктазы* - катализируют окислительно-восстановительные реакции
2. *Трансферазы* - катализируют реакции межмолекулярного переноса
3. *Гидролазы* - осуществляет гидролитический разрыв связей с присоединением воды в месте разрыва. Гидролазы - простые белки
4. *Лиазы* - негидролитический разрыв связей (C-C; C-H; C-S)
5. *Изомеразы* - катализирует реакции оптической и геометрической изомеризации
6. *Лигазы (синтетазы)* - осуществляют синтез сложных органических веществ за счет образования новых связей с использованием АТФ

Оксидоредуктазы

- *Дегидрогеназы*
 - аэробные (малатдегидрогеназа, сукцинатдегидрогеназа)
 - анаэробные
- *Оксигеназы*
 - монооксигеназы
 - диоксигеназы
- *Редуктазы*

Коферменты:

НАД, НАДФ, ФАД, ФМН, коэнзим Q, липоевая кислота, глутатион, гем.

Кофактор: витамин С

Трансферазы

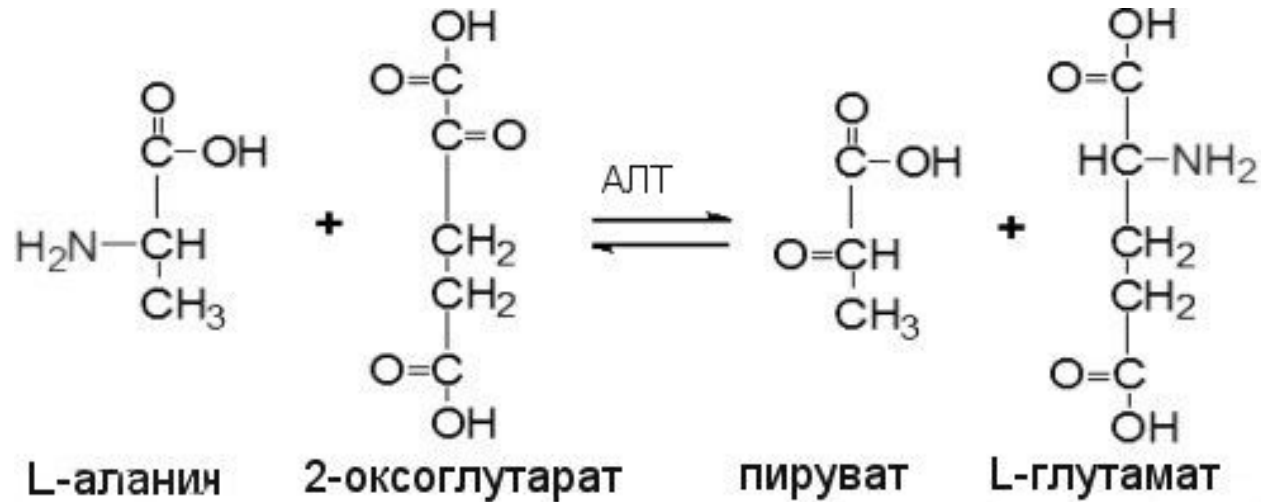
Ферменты:

- *Аминотрансферазы*
- *Фосфотрансферазы*
- *Гликозилтрансферазы*

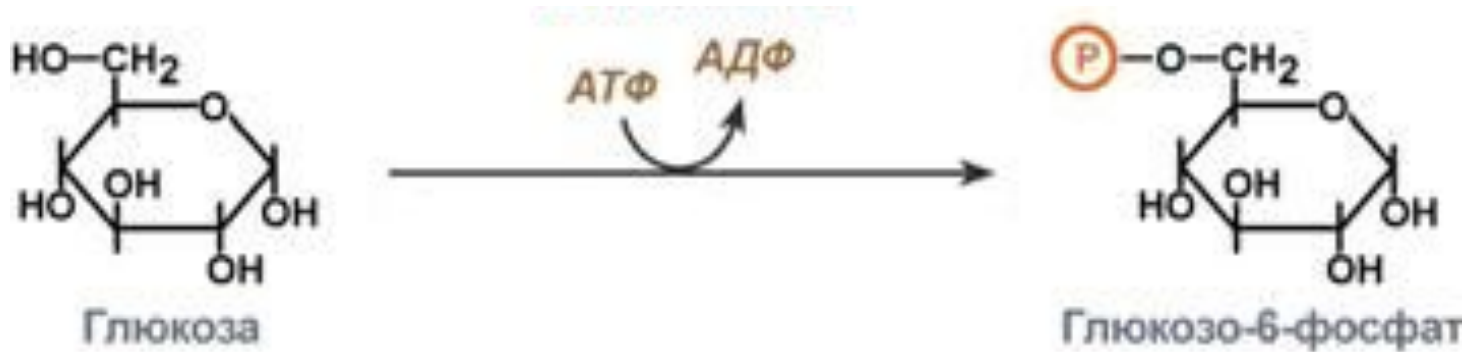
Коферменты: АТФ, ГТФ, УДФ, ЦДФ, тетрагидрофолиевая кислота, фосфопиридоксаль, SH-Коэнзим А, ФАФС.

Трансферазы: Примеры.

Аланинаминотрансфераза (АлАт)



Гексокиназа (ГК)



Гидролазы

Ферменты:

- *Пептидгидролазы:*

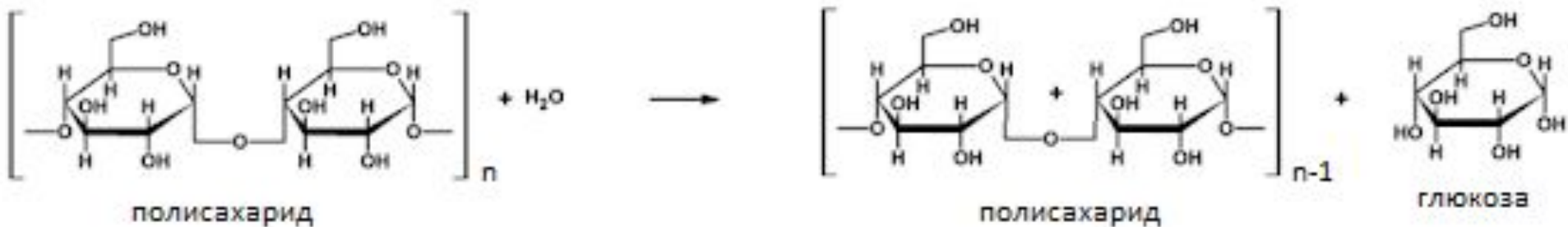
- аминопептидазы
- карбоксипептидаза
- дипептидазы
- пепсин
- трипсин
- химотрипсин

- *Гликозидазы*

Коферментов НЕТ.

Гидролазы: Примеры.

Амилаза



Лиазы

Коферменты:

- Фосфопиридоксаль
- Тиаминпирофосфат

Варианты разрывов связи:

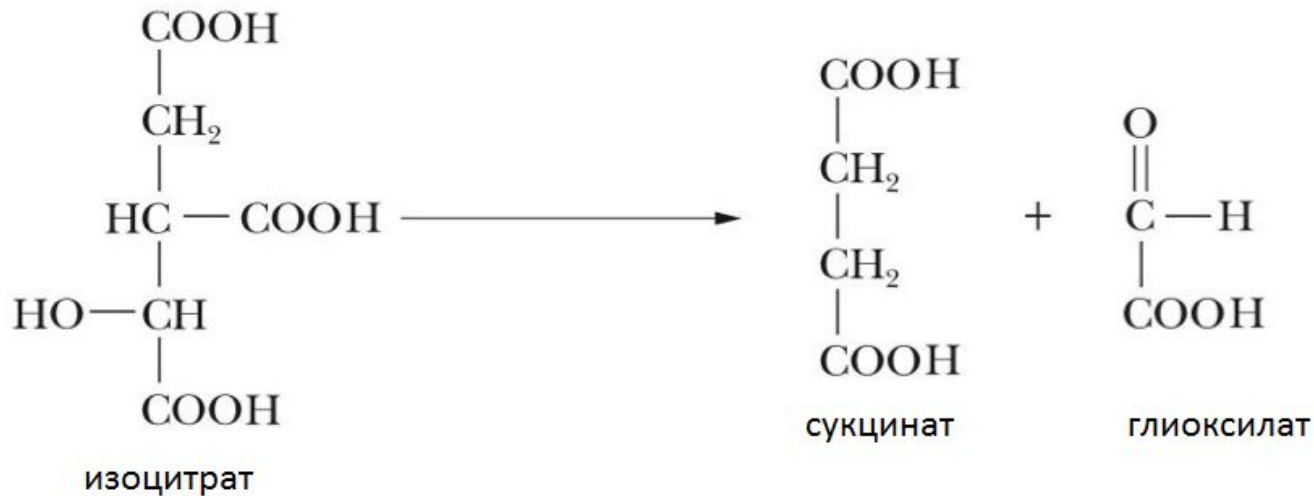
- C-C
- C-O
- C-N
- C-S

Лиазы: Примеры.

Фумаратгидратаза (ФГ)



Изоцитратлиаза (ИЦЛ)



Изомеразы

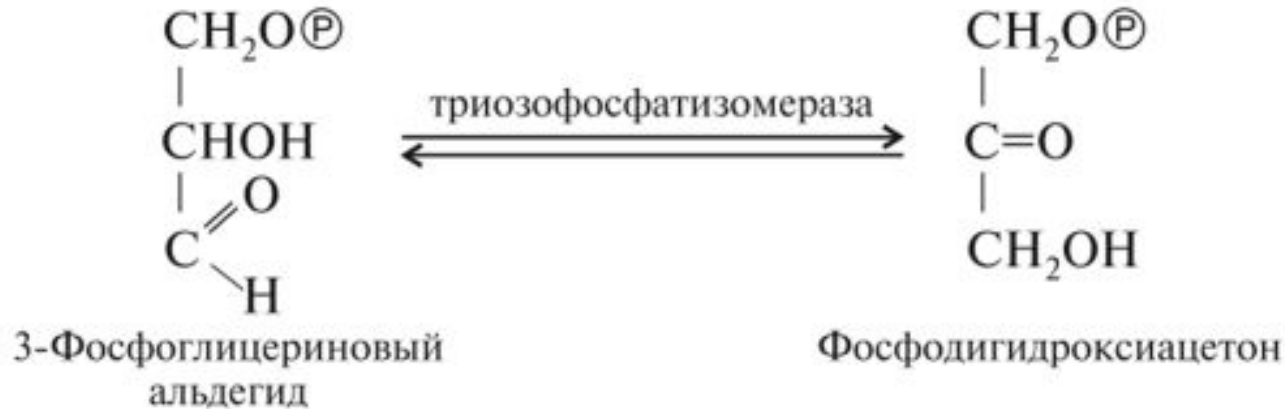
Коферменты: кобамидные коферменты (витамин В₁₂)

Цис-трансизомеразы

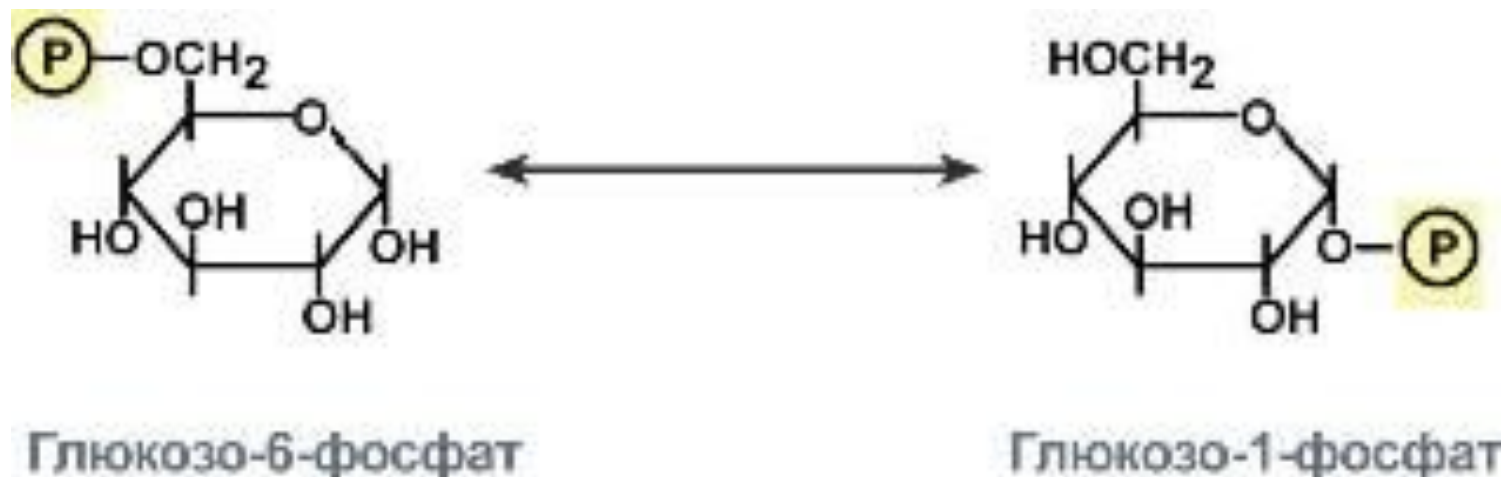
Внутримолекулярные

Изомеразы: Примеры.

Триозофосфатизомераза



Фосфоглюкомутаза



Лигазы

Ферменты:

- Глутаминсинтетаза
- Пируваткарбоксилаза

Коферменты:

- биотин
- HS-КоА

Обязательный участник АТФ

Лигазы: Примеры.

Пируваткарбоксилаза

