

ОСНОВЫ КИНЕТИКИ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Кинетика ферментативных реакций - раздел энзимологии, изучающий зависимость скорости химических реакций, катализируемых ферментами, от химической природы реагирующих веществ, а также от факторов окружающей среды.

Для измерения каталитической активности ферментов используют

скорость реакции или активность фермента.

Скорость ферментативной реакции - изменение количества молекул субстрата или продукта за единицу времени.

Скорость ферментативной реакции - мера каталитической активности фермента, её обозначают как активность фермента.

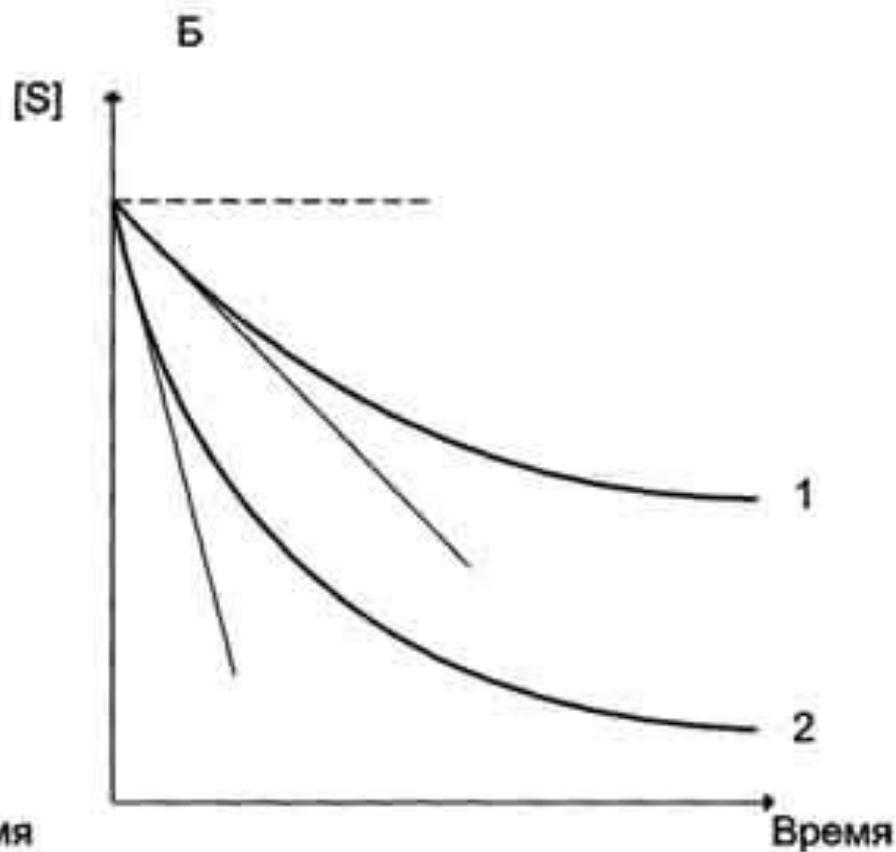
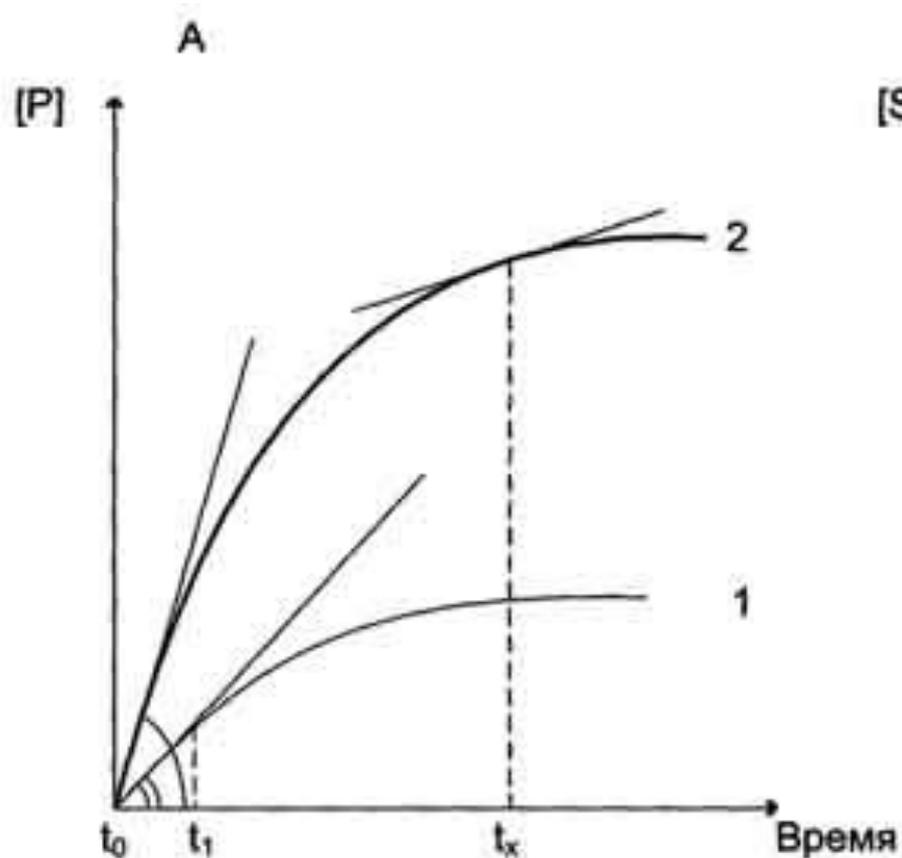
Математически скорость ферментативной реакции выражается в изменении концентрации субстрата (уменьшение) или продукта (увеличение) за единицу времени:

$$V = D[S]/t = D[P]/t.$$

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.

Графически изменение скорости ферментативной реакции определяется тангенсом угла наклона касательной к кривой профиля реакции. Чем больше угол наклона, тем больше изменение скорости 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 количества ферментов

При проведении ферментативной реакции в условиях избытка субстрата скорость реакции будет зависеть от концентрации фермента.



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, pH раствора, при отсутствии активаторов и ингибиторов.

Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры среды

Повышение температуры до определённых пределов оказывает влияние на скорость ферментативной реакции, подобно влиянию температуры на любую химическую реакцию.

1. С повышением температуры ускоряется движение молекул, что приводит к повышению вероятности взаимодействия реагирующих веществ.

2. Температура может повышать энергию реагирующих молекул, что также приводит к ускорению реакции.

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

Правило Вант-Гоффа

$$V_2 = V_1 \cdot \gamma^{\frac{T_2 - T_1}{10}}$$

где V_1 – скорость реакции при температуре T_1 ; V_2 – скорость реакции при температуре T_2 ; γ – коэффициент Вант-Гоффа;

Уравнение Аррениуса:

$$k = A e^{-E_a/RT},$$

где k – константа скорости реакции; E_a – энергия активации реакции; R – газовая постоянная; T – абсолютная температура; A – коэффициент пропорциональности (характеризует частоту столкновений реагирующих молекул)



Для большинства ферментов человека оптимальна температура 37-38 °С.

Однако в природе существуют и термостабильные ферменты.

Например, Taq-полимераза, выделенная из микроорганизмов, живущих в горячих источниках, не инактивируется при повышении температуры до 95 °С. Этот фермент используют в научно-практической медицине для молекулярной диагностики заболеваний с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Фермент мышечной ткани— миокиназа, которая выдерживает нагревание до 100°С.

Зависимость скорости ферментативной реакции от рН среды

Активность ферментов зависит от рН раствора, в котором протекает ферментативная реакция.

Для каждого фермента существует значение рН, при котором наблюдается его максимальная активность.

Отклонение от оптимального значения рН 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.

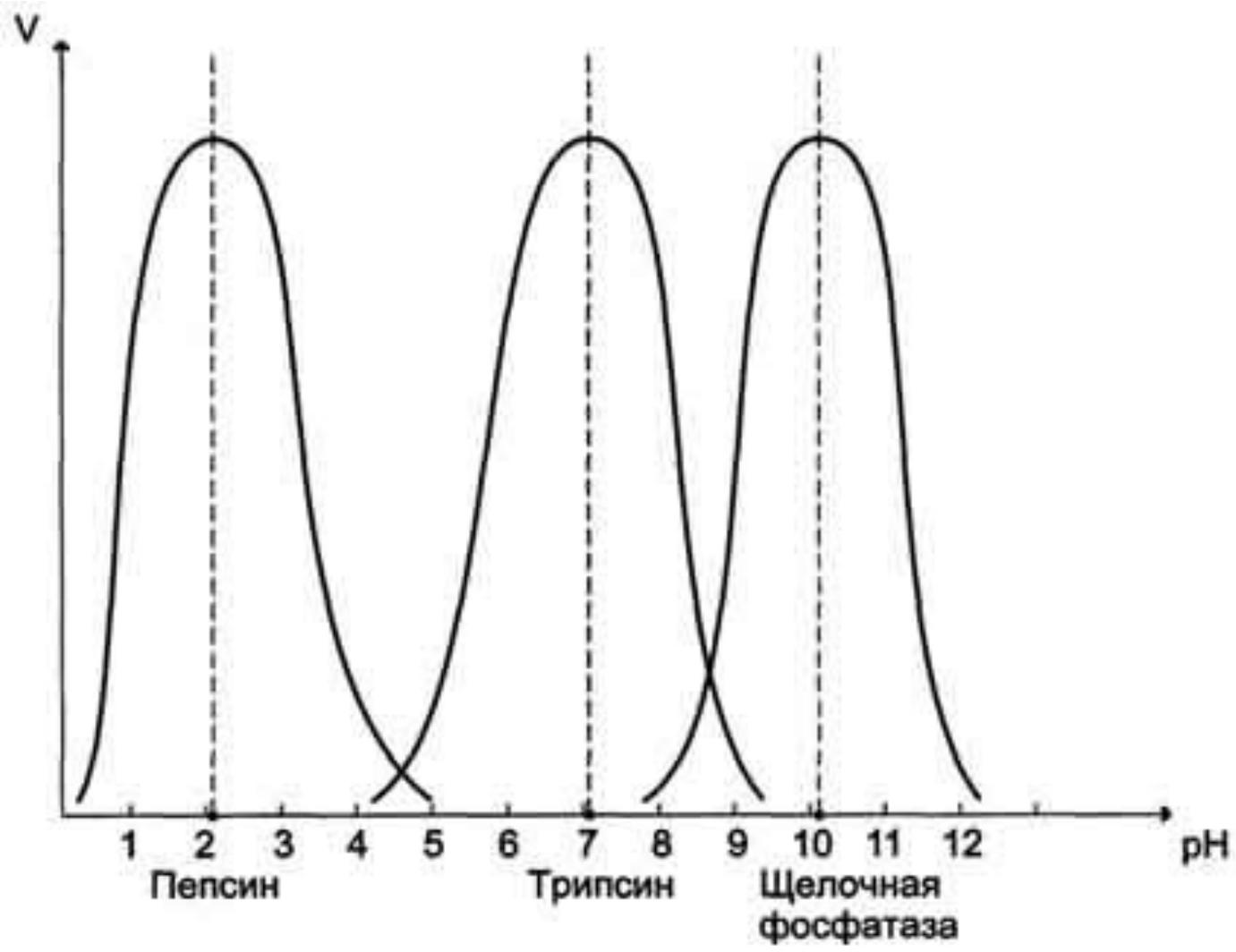
Например, при закислении среды происходит протонирование свободных аминогрупп (NH^3+), а при защелачивании происходит отщепление протона от карбоксильных групп (COO^-).

Это приводит к изменению конформации молекулы фермента и конформации активного центра; следовательно, нарушается присоединение субстрата, кофакторов и коферментов к активному центру.

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

При значительном отклонении от оптимального значения рН может происходить денатурация белковой молекулы с полной потерей ферментативной активности.

Оптimum значения рН у разных ферментов различный. Ферменты, работающие в кислых условиях среды (например, пепсин в желудке или лизосомальные ферменты), эволюционно приобретают конформацию, обеспечивающую работу фермента при кислых значениях рН. Однако большая часть ферментов организма человека имеет optimum рН, близкий к нейтральному, совпадающий с физиологическим значением рН.



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

Зависимость скорости ферментативной реакции от количества субстрата

Одним из наиболее существенных факторов, определяющих скорость ферментативной реакции, является концентрация субстрата (или субстратов) и продукта(продуктов).

В случае постоянной концентрации фермента скорость реакции постепенно увеличивается, достигая определенного максимума, при котором дальнейшее увеличение количества субстрата практически не оказывает влияния на скорость ферментативной реакции.

В таких случаях принято считать, что субстрат находится в избытке, а фермент полностью насыщен, т. е. все молекулы фермента связаны с субстратом.

Фактором, ограничивающим скорость реакции, при этом становится концентрация фермента.

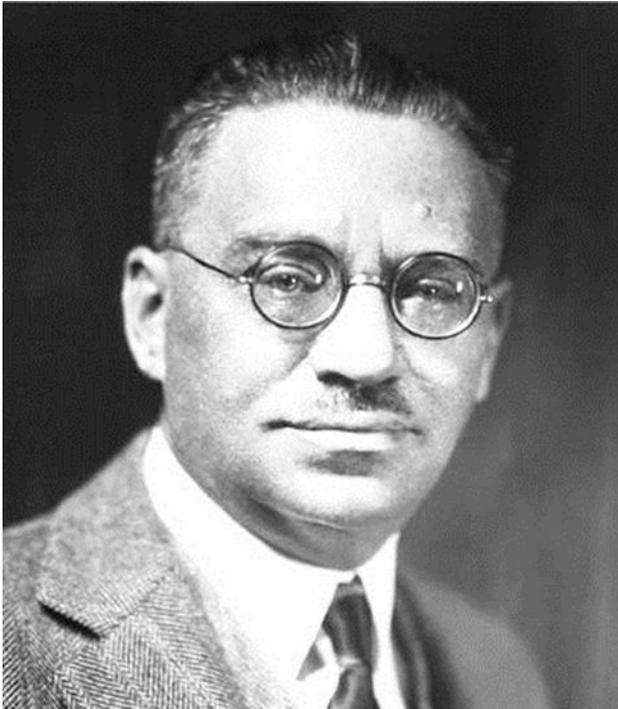




Леонор Михаэлис

1875—1949

Берлин, Германия - Нью-Йорк, США
биохимик и химик-органик



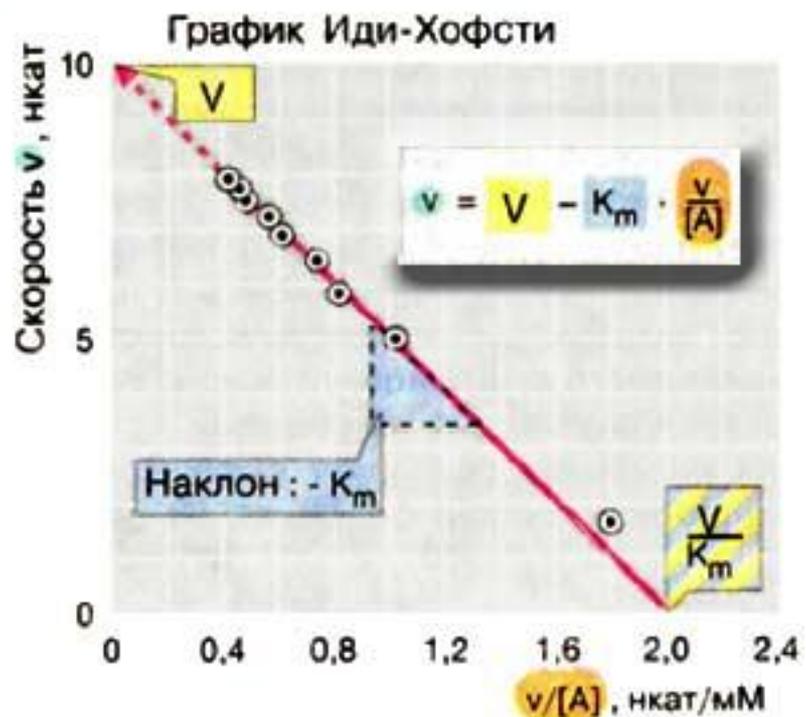
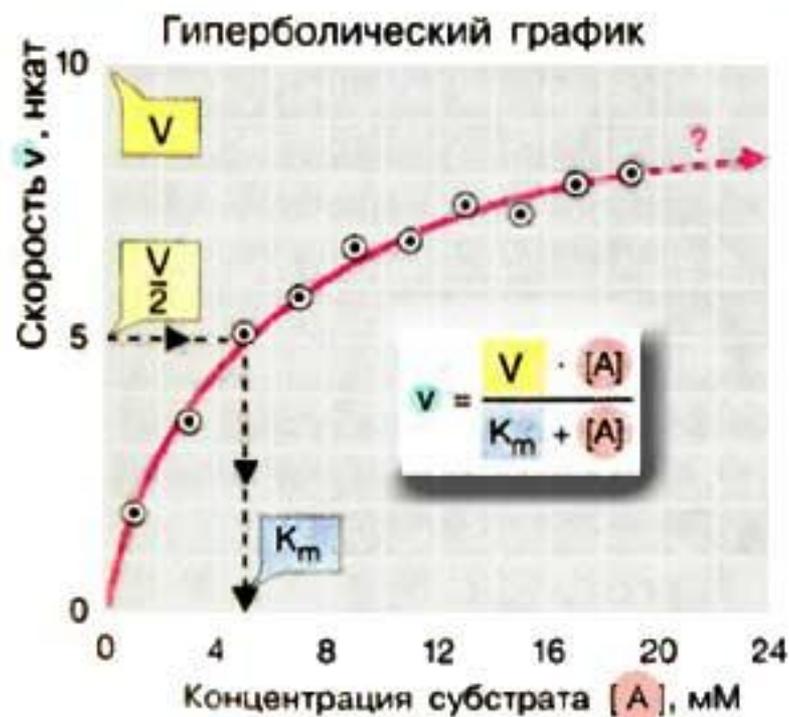
Мауд Леонора Ментен

1879 – 1960, Канада

биохимик и физиолог

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

А. Модель Михаэлиса-Ментен



Б. Определение V и K_m

График Лайнуивера-Берка

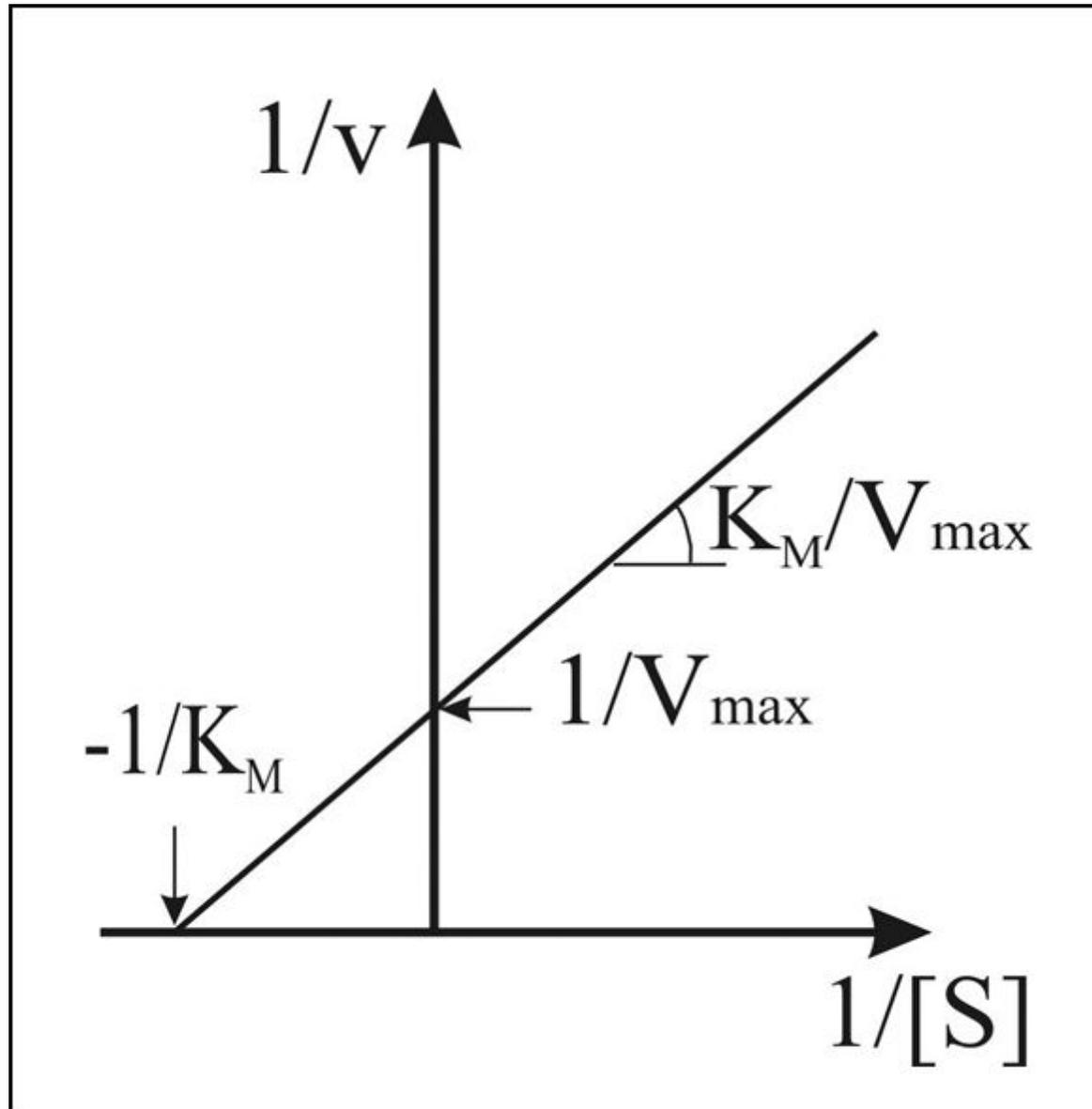


График в координатах Скэтчарда

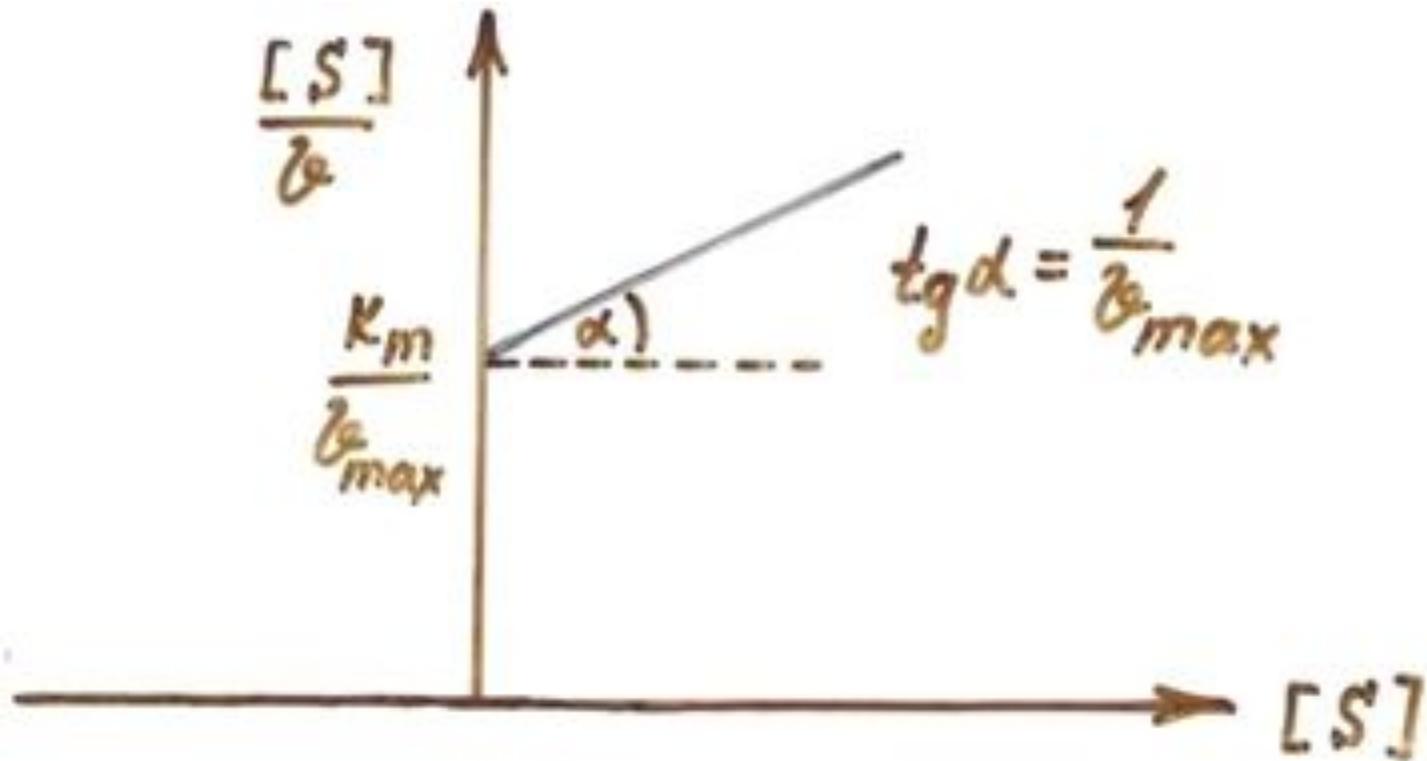


График Эдди-Хофсти

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

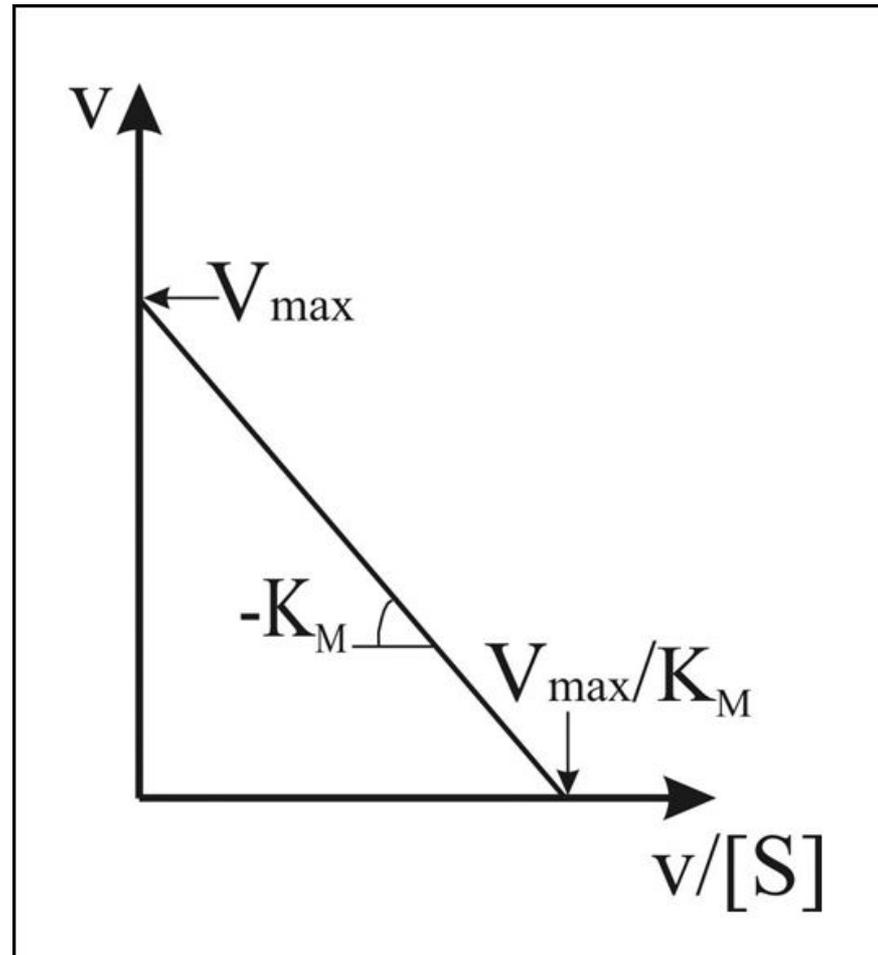


Таблица 9-4. Значения констант Михаэлиса –
Ментен (K_M) для некоторых ферментов

Фермент	Субстрат	K_M , мМ
Каталаза	H_2O_2	25
Гексокиназа (мозг)	АТФ	0,4
	D-глюкоза	0,05
	D-фруктоза	1,5
Карбоан- гидраза	HCO_3^-	9
Химотрипсин	Глицил-тирози- нил-глицин	108
	N-бензоил- тирозинамид	2,5
β -Галактозида- за	D-лактоза	4,0
Треониндегид- ратаза	L-треонин	5,0