

И. В. БЕРЕЗИН, К. МАРТИНЕК

ОСНОВЫ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА

Допущено Министерством высшего
и среднего специального образования СССР
в качестве учебного пособия
для студентов химических и биохимических специальностей
высших учебных заведений



МОСКВА · «ВЫСШАЯ ШКОЛА» · 1977

541

Б48

УДК 541.1 + 577.17(075)

Рецензенты:

проф. В. К. Антонов (ин-т биорганической химии АН СССР) и кафедра физической химии Новосибирского университета (зав. кафедрой В. С. Музыкантов).

- Б48 Березин И. В. и Мартинек К. Основы физической химии ферментативного катализа. Учеб. пособие для студентов хим. и биолог. фак. ун-тов. М., «Высш. школа», 1977. 280 с. с ил.

В первой части книги кратко рассмотрено строение белков и активных центров ферментов, а также их свойства, важные для катализа. Более подробно изложены физико-химические механизмы катализа и ускоренный, наблюдаемых как в ферментативных, так и в модельных процессах.

Вторая часть книги посвящена кинетическим закономерностям ферментативных реакций. В теоретическом и методическом плане рассматривается ряд подходов как нестационарной, так и стационарной кинетики, наиболее полезных для выяснения механизма действия ферментов и топографии их активных центров.

Б $\frac{20503 - 321}{001(01) - 77}$ 48-77

541

Предисловие

Физико-химические исследования в области органической химии, и прежде всего гомогенного катализа, привели к столь фундаментальным обобщениям, что давно уже выделились (под названием «физико-органическая химия») в самостоятельный раздел науки. На наших глазах на стыке физической химии и молекулярной биологии происходит становление новой научной дисциплины — физикохимии биокатализа (химической энзимологии). Тесная связь этой относительно молодой области науки с физико-органической химией обусловлена, главным образом, тем, что путь к познанию каталитических функций ферментов проходил прежде всего через известные механизмы гомогенно-каталитического типа.

Основная задача физической химии биокатализа состоит в выявлении некоторой общности причин, обуславливающих уникальные свойства биологических катализаторов. Может показаться, что постановка такой задачи слишком контрастирует с тем положением, которое господствовало в энзимологии еще несколько лет тому назад, когда, несмотря на обширные качественные сведения о специфичности действия многих сотен ферментов, «мы не имели, — как отмечает Уильям Дженкс (1969), — ни в одном конкретном случае сколь либо детального или количественного представления о движущих силах катализа» [1]. Однако с тех пор благодаря усилиям ряда научных школ произошли существенные сдвиги. Хотя и трудно отдать предпочтение тем или иным методическим подходам, однако вряд ли можно оспаривать важность вклада, который в решение поставленной проблемы внесли кинетико-термодинамические исследования. Они приобрели особое значение, когда в результате рентгеновских исследований структуры кристаллических ферментов появилась возможность трактовать их результаты на молекулярном уровне.

В итоге уже сейчас накопилось достаточно данных, из которых следует, что ферментативные реакции при всей сложности протекают в полном соответствии с общими закономерностями химических превращений [1—6], и, следовательно, некоторые общие принципы действия ферментов могут найти объяснение на основе теории абсолютных скоростей реакций [5].

На стыке молекулярной биологии с физической и физико-органической химией возникла еще одна не менее важная задача — создать сравнительно простые каталитические системы, в которых использовались бы принципы действия активных центров, работающих в ферментах. Подобного рода исследования обогащают физико-органическую химию познанием нетрадиционных путей (механизмов), позволяющих ускорять или в общем случае регулировать скорости химических реакций. Изучение механизмов молекулярной биологии, в частности движущих сил ферментативного катализа, поможет найти пути создания избирательных химических катализаторов с управляемыми свойствами [7, 8]. В то же время анализ как общих закономерностей, так и различий, наблюдаемых в ферментативных и модельных системах, можно рассматривать как качественно новую ступень углубленного изучения самих ферментов. Иными словами, подобного рода исследования в области «молекулярной химической бионики» должны способствовать формированию новых взглядов на природу ферментативного катализа.

В данном пособии рассматриваются с единых позиций обе эти проблемы. Для этой цели в первой части проводится кинетико-термодинамический анализ физико-химических механизмов ряда ферментативных (гл. II) и модельных (гл. III)

реакций. В основу обсуждения положена кинетическая теория двухцентрового (в общем случае многоцентрового) химического взаимодействия. В качестве иллюстрации основных положений, которые сложились в теории биологического катализа, весьма детально изложен механизм действия α -химотрипсина (гл. IV). Выбор этого фермента нельзя считать случайным. Протеолитические ферменты всегда находились на переднем крае развития энзимологии. Некоторые из них в числе первых были выделены в кристаллическом состоянии. Обычно эти ферменты служат модельным объектом для установления взаимосвязи между структурой и каталитической функцией белков. В этом направлении наибольшие успехи были достигнуты при раскрытии механизма действия именно α -химотрипсина. Согласно мнению Г. Нейрата [9], познание движущих сил α -химотрипсина катализа проливает свет на механизм каталитической активности и других ферментов.

Наука о ферментативном катализе (как и наука о любых химических реакциях) имеет две стороны — это представления о механизме и формальное описание его кинетических (или термодинамических) закономерностей. В первой части книги рассмотрен именно первый (механистический) аспект проблемы; вторая часть посвящена формальной (практической) кинетике ферментативных реакций. При этом раздельно проведен кинетический анализ реакций, протекающих в нестационарных условиях (гл. V) и в стационарном режиме (гл. VI).

В целях наглядности теорию иллюстрируют экспериментальные данные, полученные для более, чем 50 ферментов. Однако, читатель должен учитывать, что именно эти частные положения, касающиеся отдельных ферментов (и прежде всего карбоксипептидазы А), еще подлежат проверке и безусловно будут уточнены в результате бурного развития энзимологических исследований.

Авторы полагают, что книга доступна лицам, знакомым с химической термодинамикой и химической кинетикой в пределах обычных курсов этих дисциплин на химических факультетах [10, 11].

В основу книги положен курс, который один из авторов читает на химическом факультете МГУ. В создании курса, при написании отдельных разделов, оказали нам помощь сотрудники кафедры химической энзимологии А. К. Яцимирский (гл. III), С. Д. Варфоломеев (гл. V), А. А. Клёсов (гл. VI), а также А. М. Клибанов и А. В. Левашов.

ЛИТЕРАТУРА К ПРЕДИСЛОВИЮ

1. Дженкс В. Катализ в химии и энзимологии. М., «Мир», 1972.
2. Брюст Т., Бенкович С. Механизмы биоорганических реакций. М., «Мир», 1970.
3. Bender M. L. Mechanisms of Homogeneous Catalysis from Protons to Proteins. New York-Toronto, Wiley Interscience, 1971.
4. Браунштейн А. Е., Карпейский М. Я. Ж. Всес. хим. общ-ва им. Д. И. Менделеева, **16**, 362 (1971).
5. Березин И. В., Мартинек К. Ж. Всес. хим. общ-ва им. Д. И. Менделеева, **16**, 411 (1971).
6. Полторак О. М., Чухрай Е. С. Физико-химические основы ферментативного катализа. М., «Высшая школа», 1971.
7. Кабанов В. А. Ж. Всес. хим. общ-ва им. Д. И. Менделеева, **16**, 446 (1971).
8. Шолов А. Е. Ж. Всес. хим. общ-ва им. Д. И. Менделеева, **16**, 450 (1971).
9. Нейрат Г. В сб.: «Молекулы и клетки», М., «Мир», 1966.
10. Курс физической химии. Под ред. Я. И. Герасимова. М., «Химия», 1969.
11. Эмануэль Н. М., Кнорре Д. Г. Курс химической кинетики. М., «Высшая школа», 1974.



ЧАСТЬ ПЕРВАЯ

МЕХАНИЗМ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА

ГЛАВА I

СТРОЕНИЕ И ВАЖНЕЙШИЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ И ИХ АКТИВНЫХ ЦЕНТРОВ

§ 1. Введение

Живые организмы могут существовать лишь благодаря их замечательной способности — кинетически контролировать химические реакции и тем самым подавлять стремление к достижению термодинамических равновесий. Немаловажную роль здесь играют биологические катализаторы — ферменты, число которых, пожалуй, совпадает с числом известных биохимических реакций. Ферменты катализируют такие разнообразные реакции, как гидролиз и дегидрирование, конденсация и изомеризация и многие другие. Согласно классификации, утвержденной Комиссией по ферментам Международного биохимического союза [1], ферменты подразделяются на 6 классов*:

1. Оксидоредуктазы — ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции.

2. Трансферазы — ферменты, катализирующие реакции переноса групп.

3. Гидролазы — ферменты, катализирующие реакции гидролиза.

4. Лиазы — ферменты, катализирующие присоединение групп к двойным связям или, наоборот, отщепление группы с образованием двойной связи.

5. Изомеразы — ферменты, катализирующие реакции изомеризации.

6. Лигазы (синтетазы) — ферменты, катализирующие реакции конденсации двух молекул, сопряженные с расщеплением пирофосфатной связи в молекуле аденозинтрифосфата (или аналогичного трифосфата).

Ферменты как биокатализаторы обладают рядом уникальных свойств, которые выделяют их на фоне обычных органических катализаторов гомогенного типа. Прежде всего следует указать на их необычайно высокую каталитическую эффективность. Так, например, добавка незначительной концентрации фермента (10^{-7} — 10^{-9} М) приводит к ускорению катализируемой им реакции между двумя субстратами иногда более чем в 10^{10} раз (табл. 1). Органические катализаторы

* Более подробно о классификации ферментов см. в [2—4].

Таблица 1

Сравнение относительных скоростей ферментативной v_E и неферментативной v_0 реакций [5]

Фермент	Субстраты	v_E/v_0
Гексокиназа ($10^{-7}M$)	{ Глюкоза ($3 \cdot 10^{-3}M$) АТФ ($2 \cdot 10^{-3}M$)	$>10^{10}$
Фосфорилаза ($10^{-7}M$)	{ Глюкозо-1-фосфат ($2 \cdot 10^{-2}M$) Гликоген ($10^{-5}M$)	$>10^{11}$
Алкогольдегидрогеназа ($5 \cdot 10^{-7}M$)	{ НАД ($4 \cdot 10^{-4}M$) Этанол ($4 \cdot 10^{-2}M$)	$>5 \cdot 10^8$
Креатинкиназа ($3 \cdot 10^{-9}M$)	{ Креатин ($2 \cdot 10^{-2}M$) АТФ ($4 \cdot 10^{-3}M$)	$>10^4$

Таблица 2

Сравнение констант скоростей второго порядка для катализируемых реакций [6]

Реакция и субстрат	Катализатор	Константа скорости, $M^{-1} \cdot c^{-1}$	Температура, $^{\circ}C$
Гидролиз пептидов:			
глицилглицин	H_3O^+	$1,1 \cdot 10^{-6}$	54
карбобензокси- <i>L</i> -глутамил- <i>L</i> -тирозин	Пепсин	0,8	32
карбобензоксиглицил- <i>L</i> -фенилаланин	Карбоксипептидаза	$3 \cdot 10^4$	25
Гидролиз амидов:			
бензамид	H_3O^+	$2,4 \cdot 10^{-6}$	52
»	OH^-	$8,5 \cdot 10^{-6}$	53
амид <i>N</i> -бензоил- <i>L</i> -тирозина	Химотрипсин	14,9	25
Гидролиз сложных эфиров:			
этилбензоат	H_3O^+	$9,0 \cdot 10^{-5}$	100
»	OH^-	$5,5 \cdot 10^{-4}$	25
этиловый эфир <i>N</i> -бензоил- <i>L</i> -тирозина	Химотрипсин	$1,9 \cdot 10^4$	25
Гидролиз мочевины:			
мочевина	H_3O^+	$7,4 \cdot 10^{-7}$	62
»	Уреаза	$5,0 \cdot 10^6$	21
Гидролиз аденозинтрифосфата:			
АТФ	H_3O^+	$4,7 \cdot 10^{-6}$	40
»	Миозин	$8,2 \cdot 10^6$	25

гомогенного типа не достигают, как правило, столь больших ускорений (табл. 2).

Другое не менее важное свойство ферментов — избирательность действия (специфичность) в отношении структуры субстрата. В ряде случаев ферменты обладают абсолютной специфичностью, катализируя превращение только одного вещества и не реагируя с его производ-

ными или гомологами. Так, фермент уреазы катализирует гидролиз мочевины и не оказывает влияния на реакции гидролиза других амидов [7], хотя мочевина по реакционной способности мало отличается от других соединений с амидной связью, в том числе пептидов (см. табл. 2). Бутандиолдегидрогеназа катализирует превращение 2,3-бутандиола в ацетон, но совершенно не окисляет этиленгликоль, глицерин, этанол, бутанол или глюкозу [7]. Специфичность ферментов проявляется также и в отношении условий реакции. Так, например, одна и та же реакция — гидролиз амидной связи в пептидах — ускоряется хитотрипсином при значениях рН, близких к нейтральным, тогда как другая протеаза — пепсин — функционирует только в кислой среде.

Эти свойства ферментов обусловлены весьма сложным механизмом их действия, многие стороны которого еще до конца не раскрыты. Представления о механизмах ферментативного катализа получили наиболее существенное развитие лишь в последние 10—20 лет. Еще в начале XX в. считали, что биокатализаторы не принадлежат ни к одному из известных классов органических соединений. Более того, многие ученые полагали, что существует определенная связь между высокой эффективностью биокатализа и открытым в то время явлением радиоактивного излучения [8]. Лишь в 1926 г. Самнер установил, что ферменты представляют собой белки.

Перспективы развития науки о ферментах весьма образно сформулировал Ламри в 1959 г. [9]: «...Итак, эта область еще не вышла из поры младенчества, но дитя шагает быстро и наговорило целые тома; можно предвидеть раннее его возмужание. Когда решающее свойство или свойства белка будут раскрыты — в терминах структуры и каталитической функции, — тогда, возможно, твердо установленные теории органической и физической химии послужат основой для глубокого проникновения в одну из тайн, наиболее ревниво оберегаемых Природой»*.

Действительно, успехи современной теории биологического катализа и теоретической химии показали, что ферментативные реакции при всей их сложности протекают в полном соответствии с общими закономерностями обычных химических превращений. Объяснение огромных преимуществ, которыми ферментативный катализ отличается от биологического гетеро- и гомогенного катализа, заложено фактически лишь в исключительно сложной структуре макромолекул белка.

§ 2. Строение белков (ферментов)

Белки** — это высокомолекулярные соединения, состоящие из α -L-аминокислот, связанных друг с другом пептидными (амидными) связями. Нижней границей молекулярной массы белков условно счи-

* Перевод А. Е. Браунштейна и М. Я. Карпейского.

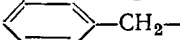
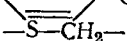
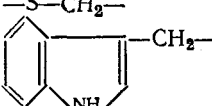
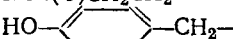
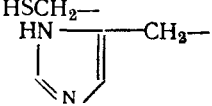
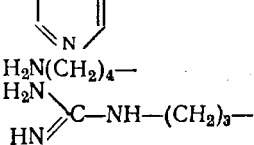
** Более подробные сведения о строении белковых молекул можно найти в специальных руководствах или курсах биологической химии, например [2, 10], см. также [4].

тают величину 5000; с другой стороны, молекулярная масса многих широко распространенных белков достигает нескольких сот тысяч или даже нескольких миллионов.

Аминокислоты — структурные элементы белков. В молекулах природных белков встречается около 20 аминокислот. Как видно из табл. 3, некоторые из белковых цепей аминокислот несут отрицательный заряд, тогда как другие заряжены положительно; одни боковые группы гидрофобны, другие, наоборот, полярны и, следовательно, сильно сольватируются водой.

Таблица 3

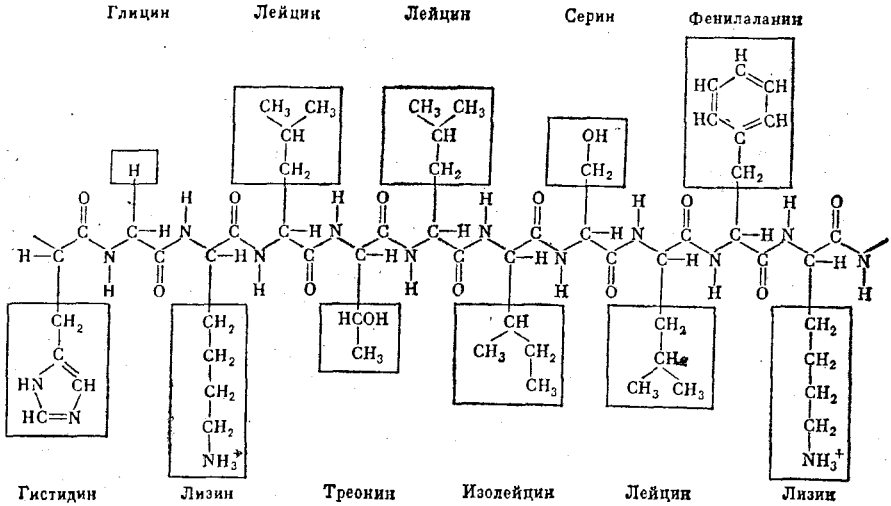
Основные аминокислоты белковых молекул]

$\begin{array}{c} \text{R}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Название	Символ	Боковая группа R
Аминокислоты с неполярными боковыми группами	Глицин	Gly	H—
	Аланин	Ala	CH ₃ —
	Валин	Val	(CH ₃) ₂ CH—
	Лейцин	Leu	(CH ₃) ₂ CHCH ₂ —
	Изолейцин	Ile	CH ₃ CH ₂ CH(CH ₃)—
	Метионин	Met	CH ₃ SCH ₂ CH ₂ —
	Фенилаланин	Phe	
	¹ / ₂ -Цистин	Cys	
	Триптофан	Trp	
	Аминокислоты с полярными, но неионизованными боковыми группами (при «физиологических» значениях pH)	Серин	Ser
Треонин		Thr	CH ₃ CH(OH)—
Аспарагин		Asp	H ₂ NC(O)CH ₂ —
Глутамин		Gln	H ₂ NC(O)CH ₂ CH ₂ —
Аминокислоты с ионизованными боковыми группами		Аспарагиновая	Asp
	Глутаминовая	Glu	HOC(O)CH ₂ CH ₂ —
	Тирозин	Tyr	
	Цистеин	Cys	HSCH ₂ —
	Гистидин	His	
	Лизин	Lys	H ₂ N(CH ₂) ₄ —
	Аргинин	Arg	

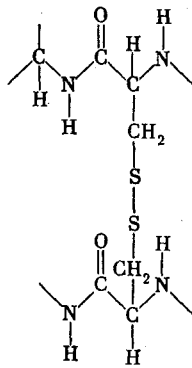
Именно это разнообразие аминокислот открывает практически безграничные возможности для варьирования последовательности аминокислот в полипептидных цепях. Так, например, число структурно неэквивалентных белков, которые содержали бы всего лишь 100 номерных единиц, составляет 20¹⁰⁰. С другой стороны, структурное

разнообразие белков обусловлено не только простой последовательностью аминокислот, но также и более высокими формами (уровнями) их структурной организации.

Первичная структура. Это такая структура белковой молекулы, которая обусловлена ковалентными связями. В данном случае следует иметь в виду не только пептидные связи, соединяющие каждую аминокислоту с соседними



но также и дисульфидные (если они имеются), соединяющие атомы серы двух остатков цистеина:



Полипептидная цепь, например, молекулы лизоцима (состоящей из 129 аминокислотных остатков) в четырех местах связана дисульфидными мостиками (рис. 1).

Вторичная структура определяется специфической укладкой локальных участков полимерной цепи в пространстве. Полипептидные цепи способны образовать по крайней мере два типа упорядоченных

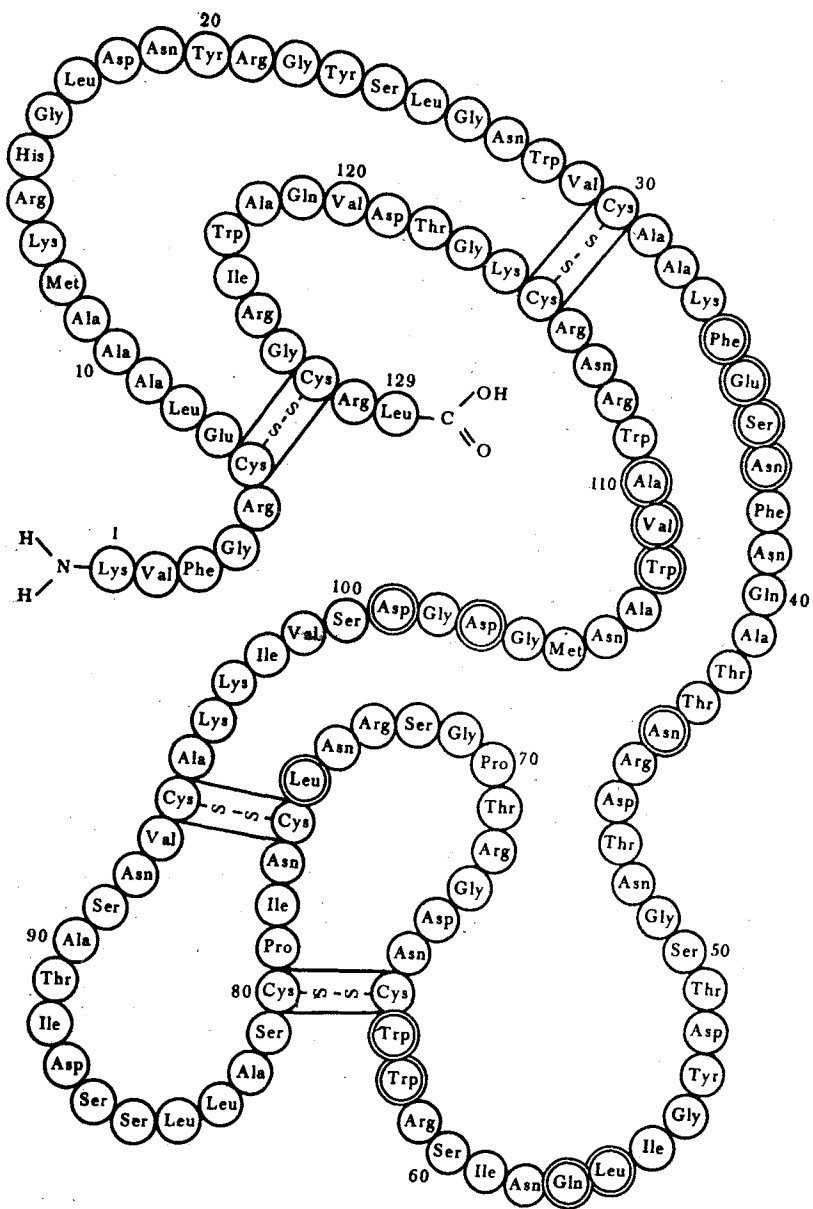
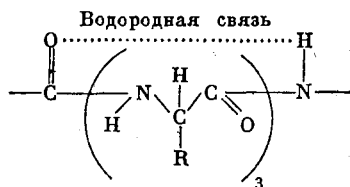


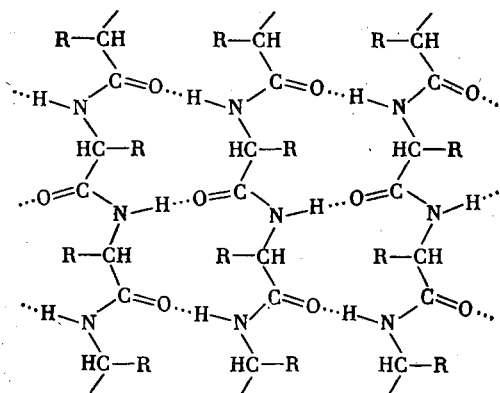
Рис. 1. Двумерная модель по Филлипсу [11] молекулы лизоцима: двойные кружки — аминокислотные остатки, выступающие сорбционный участок глобулы

конформаций. Первая и чаще всего встречающаяся в природе конформация — это спираль. Наиболее характерна для белков α -спираль (рис. 2). Главное в спиральной структуре — это образование сильной водородной связи:



Некоторые аминокислоты не укладываются в конформацию α -спирали из-за стерических затруднений, которые создает боковая группа R. Это приводит к резким разрывам в спиральных участках полимерной цепи. α -Спирали в некоторых белковых молекулах составляют значительный процент, в других их мало или вообще нет.

Вторая упорядоченная конформация, в которую могут укладываться полипептидные цепи, известна под названием β -структуры. Такого рода «складчатые слои» образуются из нескольких участков растянутых (неспиральных) цепей, лежащих антипараллельно друг другу, и удерживаются водородными связями:



Третичная структура белковой молекулы образуется при свертывании полипептидной цепи в компактную трехмерную систему (в случае ферментов это, как правило, сферическая глобула). При рассмотрении сил, определяющих свертывание полипептидной цепи (цепей), прежде всего укажем на следующее фундаментальное свойство белков: полипептидные цепи стремятся свернуться так, чтобы во внут-

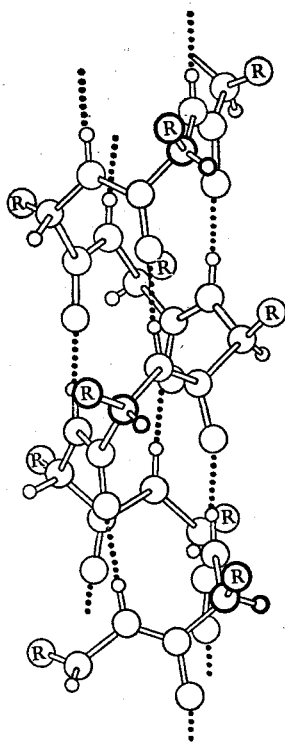
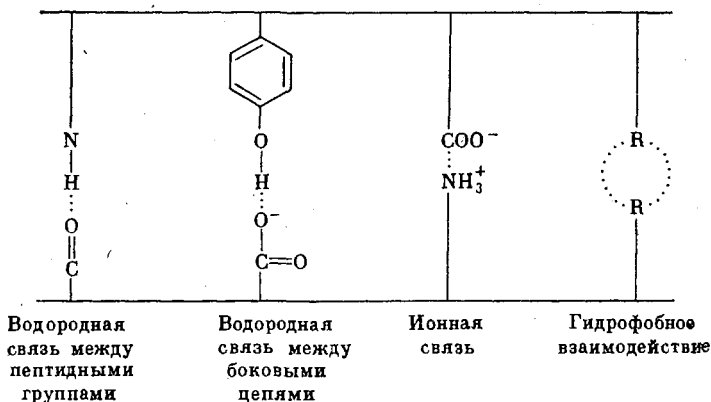


Рис. 2. α -Спираль: пунктирные линии соответствуют водородным связям

ренной части молекулы спрятать как можно больше гидрофобных боковых цепей аминокислотных остатков и увести их тем самым от термодинамически невыгодного контакта с водной средой. На поверхности же расположены главным образом гидрофильные (и, прежде всего, заряженные) аминокислотные остатки. В целом пространственная структура образовавшейся глобулы стабилизируется также и за счет других связей между боковыми группами аминокислот. При этом можно выделить четыре типа взаимодействий:



Наряду с этими взаимодействиями в стабилизации трехмерной структуры участвуют также и дисульфидные мостики.

На рис. 3 показано пространственное строение молекулы протеолитического фермента α -химотрипсина. Линейные размеры глобулы соответствуют примерно 45, 38 и 35 Å [13].

Для более глубокого понимания законов образования третичной структуры следует подчеркнуть, что полипептидная цепь не свертывается произвольно с образованием хаотичного (статистического) клубка. Анфинсен с сотр. [14] показал, что пространственная структура белков задана их первичной структурой. Иными словами, последовательность аминокислотных остатков в полимерной цепи «кодирует» строго определенный тип вторичной, третичной и высших структур белка.

На языке термодинамики это означает, что для молекулы белка существует лишь одно состояние (или ограниченное число состояний), когда свободная энергия как функция пространственного строения (и, следовательно, как функция нековалентных взаимодействий между аминокислотными остатками полипептидной цепи) обнаруживает минимум.

Четвертичная структура белков. В больших белковых молекулах (молекулярная масса которых, как правило, существенно превышает 30 000) имеется не одна, а несколько полипептидных цепей, не связанных ковалентно друг с другом. Эти субъединичные глобулы могут,

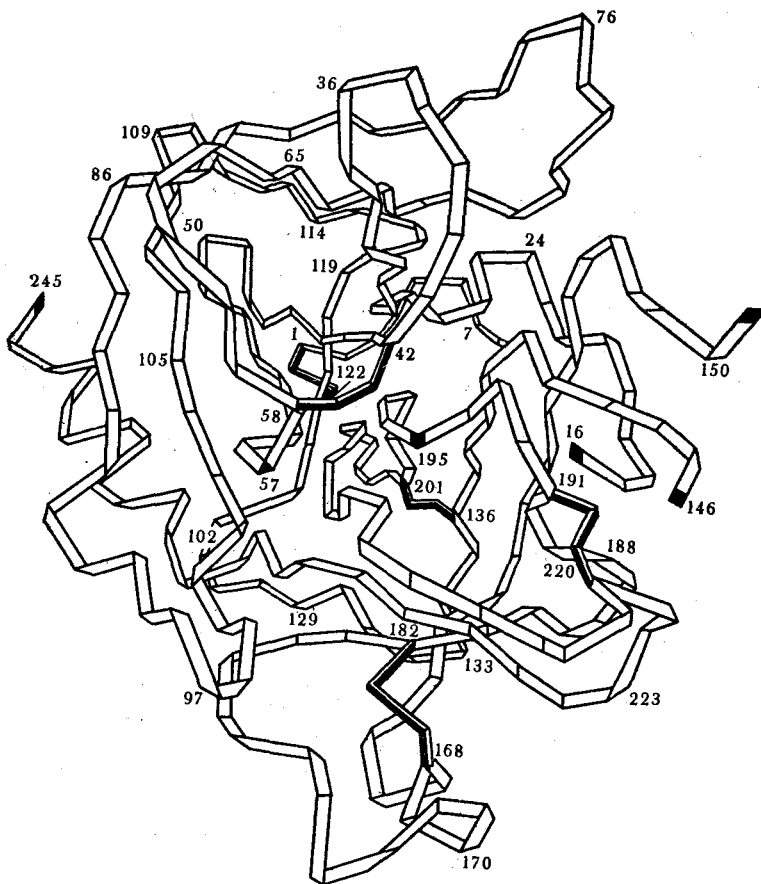


Рис. 3. Трехмерная модель молекулы α -химотрипсина, представленная Блоу с сотр. [12]:
зачерненные линии — дисульфидные мостики

в принципе, существовать и в свободном состоянии, однако в результате взаимодействия целого ряда более слабых сил (водородная связь, гидрофобное или ион-ионное взаимодействие) происходит их упорядоченная упаковка в четвертичную структуру белка.

Кофакторы*. Для осуществления каталитической функции многие ферменты содержат в молекуле небелковый фрагмент — кофактор. В качестве кофактора выступают большей частью либо органические вещества весьма сложного строения (и выполняющие в катализе роль

* Более подробные сведения о химической природе кофакторов и их функциях в катализе можно найти в [2—4, 8, 10].

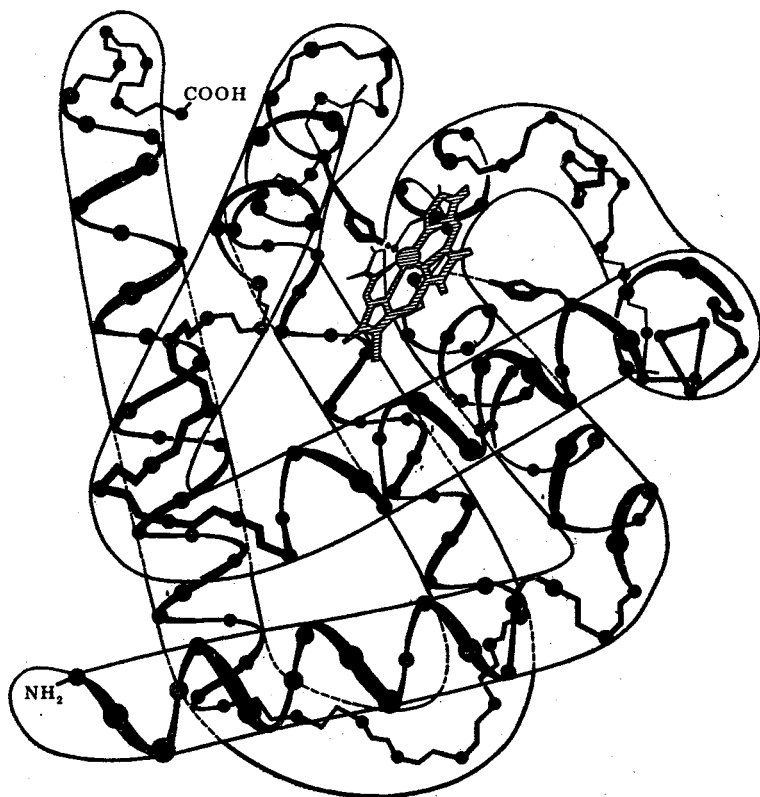


Рис. 4. Углеродный скелет полипептидной цепи миоглобина по Кендрью [2]:
заштрихованная фигура — гем

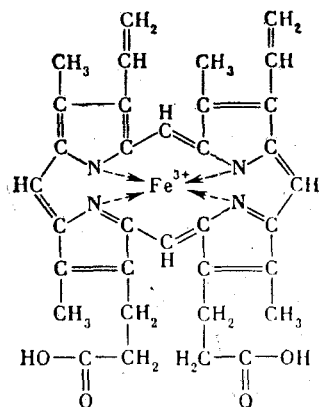
или простетической группы, или кофермента), либо несложные неорганические ионы.

Простетическая группа присоединена к белковой части (апоферменту) либо ковалентно, либо при участии целого ряда более слабых сил (водородная связь, гидрофобное или ион-ионное взаимодействие и др.), которые ориентируют эту каталитически активную группу по отношению к полипептидной цепи.

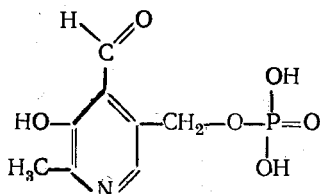
Образовавшийся комплекс (или ковалентное соединение) называется холоферментом.

На рис. 4 представлена молекула миоглобина, в которой роль простетической группы играет гем. Остов молекулы состоит из 8 относительно прямолинейных участков, разделенных между собой местами сгибов. Каждый отрезок закручен в виде α -спирали. Схематически показано включение гема (заштрихованная фигура).

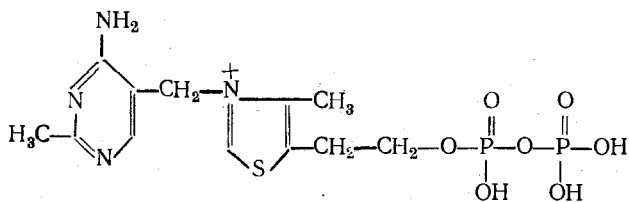
Химическая структура гема (протогематин IX) имеет следующий вид:



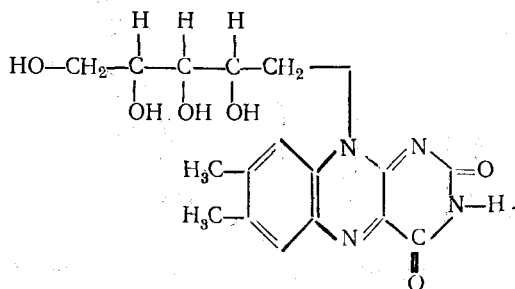
Функции кофакторов в катализе и их химическая природа чрезвычайно разнообразны. Простетическую группу образуют, например, производные витамина B_6 , в частности пиридоксальфосфат:



производные витамина B_1 , например тиаминпирофосфат:

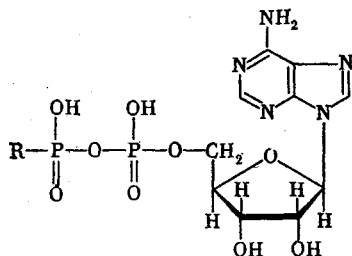


производные витамина B_2 (флавины), например рибофлавин:



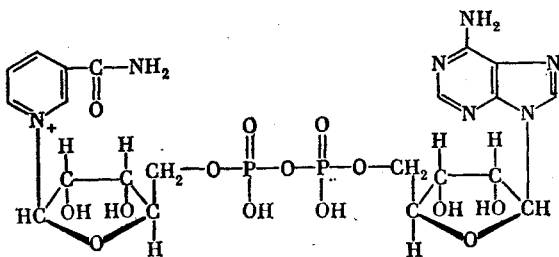
Кофактор, выполняя каталитическую функцию, должен оставаться химически неизменным в результате катализируемой реакции. Если же в роли кофактора выступает истинно простетическая группа, то она осуществляет весь каталитический цикл, будучи присоединенной к одной и той же молекуле фермента. В ряде случаев, однако, кофакторы вступают в более сложные взаимодействия, будучи связующим звеном между двумя ферментами и обеспечивая тем самым образование единой ферментной системы. Такие кофакторы принято называть *коферментами*.

В природе распространены системы, в которых небелковый кофермент обеспечивает протекание реакции переноса группы (ацильной, оксиметильной, формильной, метильной и др.): один из ферментов переносит группу от первого субстрата к коферменту, а другой — от кофермента ко второму субстрату. Наибольшее биологическое значение имеют, по-видимому, реакции трансфосфорилирования, которые обеспечивают передачу энергии от одного процесса к другому. Переносчиками фосфатной группы служат различные нуклеотиды и нуклеозиды, например аденозиндифосфат (АДФ):

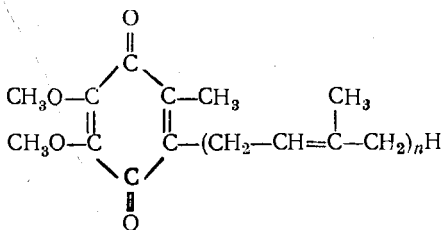


который может присоединять третью фосфатную группу и превращаться таким образом в аденозинтрифосфат (АТФ).

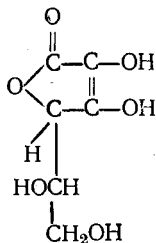
Не менее важную роль в живых системах играют реакции переноса водорода, которые служат источником энергии. В качестве переносчиков водорода наиболее известны никотинамидадениндинуклеотид (НАД) и никотинамидадениндинуклеотид-фосфат (НАДФ). Окисленная форма первого кофермента имеет следующий вид:



К коферментам относятся также убихиноны (коферменты Q) типа



L-аскорбиновая кислота (витамин С):



и многие другие соединения.

Наряду с органическими кофакторами большое значение в каталитической активности многих ферментов (металлопротеидов) имеют различные ионы металлов: Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Sr^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} и Al^{3+} , а также NH_4^+ . Прочность связи металла с белком зависит от функциональных групп, с которыми он связан. Так, например, атом цинка, содержащийся в активном центре карбоксипептидазы А, входит в полилигандный центр, образованный карбоксильной группой остатка Glu-72 и двумя имидазольными группами остатков His-69 и His-196 (рис. 5).

§ 3. Строение активных центров ферментов

Активный центр формируется из фрагментов полипептидной цепи, в том числе из отдельных аминокислотных остатков, содержащих разнообразные функциональные группы. Некоторые из них принимают участие в сорбции субстрата на ферменте, другие катализируют его химическое превращение. Встраивание молекулы субстрата в активный центр, находящийся в поверхностном слое белковой глобулы, показано на рис. 6.

Согласно представлениям, которые сложились в гомогенном катализе, к каталитически активным радикалам белка относятся нуклеофильные группы (такие как имидазол гистидина, оксигруппы серина или тирозина, тиоловые группы цистеина, ϵ -аминогруппы лизина, ионизованные карбоксилы аспарагиновой и глутаминовой кислот и др.) и электрофилы (ион имидазолия, неионизованные карбоксильные группы, ионы металлов и т. п.). В первичной структуре молекулы фермента группы активного центра обычно удалены друг от друга (см. рис. 1). Однако в третичной структуре аминокислотные остатки, принимающие участие в катализе, некоторым образом фиксированы

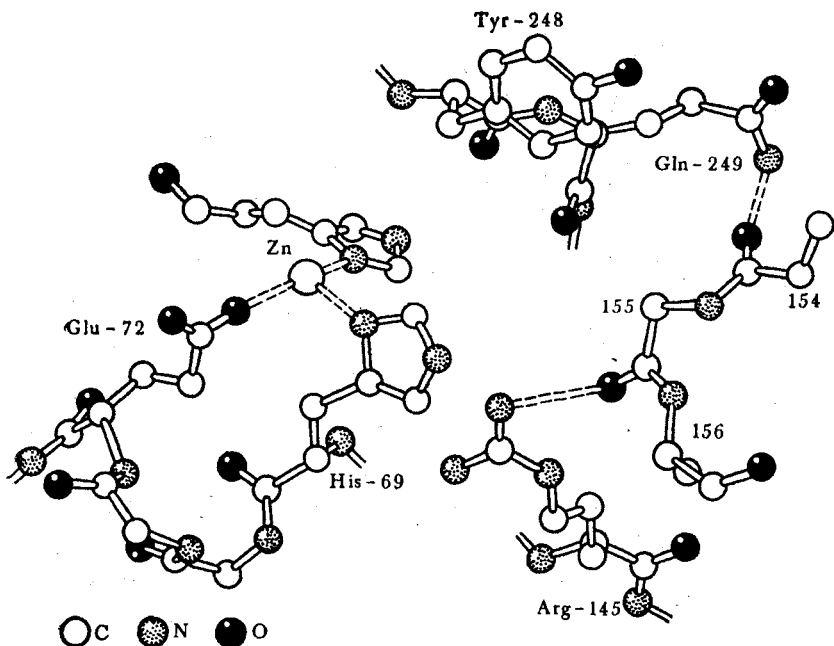


Рис. 5. Расположение аминокислотных остатков в активном центре карбокси-пептидазы А со встроенным атомом цинка [15]

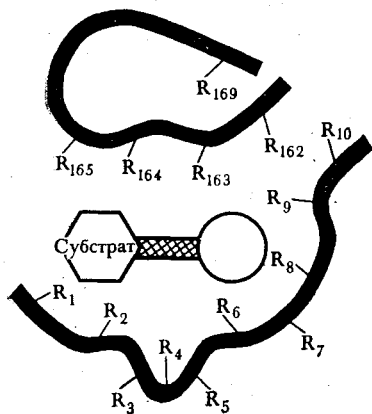
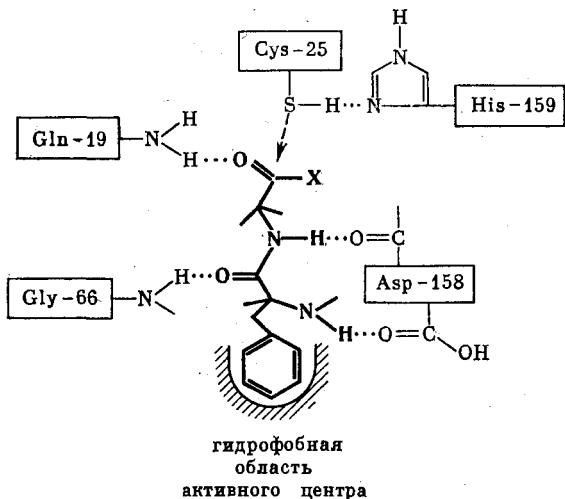


Рис. 6. Схематическое изображение активного центра фермента:

заштрихованная полоса — связь, которая разрывается в процессе действия фермента; буквами обозначены некоторые из боковых цепей аминокислотных остатков; две черные полосы — полипептидные цепи двух сегментов белковой цепи

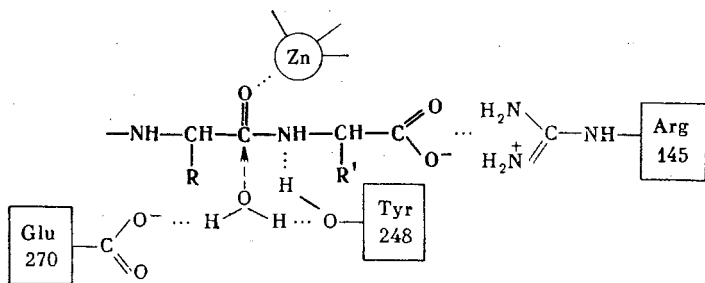
(ориентированы) в сближенном состоянии, удобном для «одновременного» их взаимодействия с сорбированной молекулой субстрата. Так, сорбция молекулы синтетического субстрата на активном центре папаина происходит [16] в результате гидрофобного взаимодействия при одновременном образовании трех водородных связей (пунктир) с остатками Gly-66 и Asp-158:



В химической реакции сорбированного субстрата с ферментом участвуют Gln-19, His-159 и Cys-25 (стрелкой показана нуклеофильная атака карбонильной группы субстрата) [17].

В формировании активного центра принимают участие также молекулы воды, входящие в гидратационные слои, а в ряде случаев ионы металлов, связанные с белком, и органические кофакторы. Определенную жесткость такой конструкции придают α -спирали, β -структуры и дисульфидные мостики.

Наиболее полную информацию о строении активных центров принесли рентгеновские исследования структуры кристаллических ферментов и их комплексов с субстратоподобными ингибиторами [18—20]. В результате для многих ферментов были получены трехмерные модели их молекулярной структуры при высоких разрешениях (порядка 2Å). На рис. 7 показано встраивание молекулы квазисубстрата в активный центр карбоксипептидазы А. Для более глубокого понимания этой молекулярной структуры полезно сопоставить ее со схемой



где пунктиром отражена сорбция субстрата на активном центре (за счет электростатического взаимодействия концевой карбоксильной группы с Arg-145), а также химическое взаимодействие сорбирован-

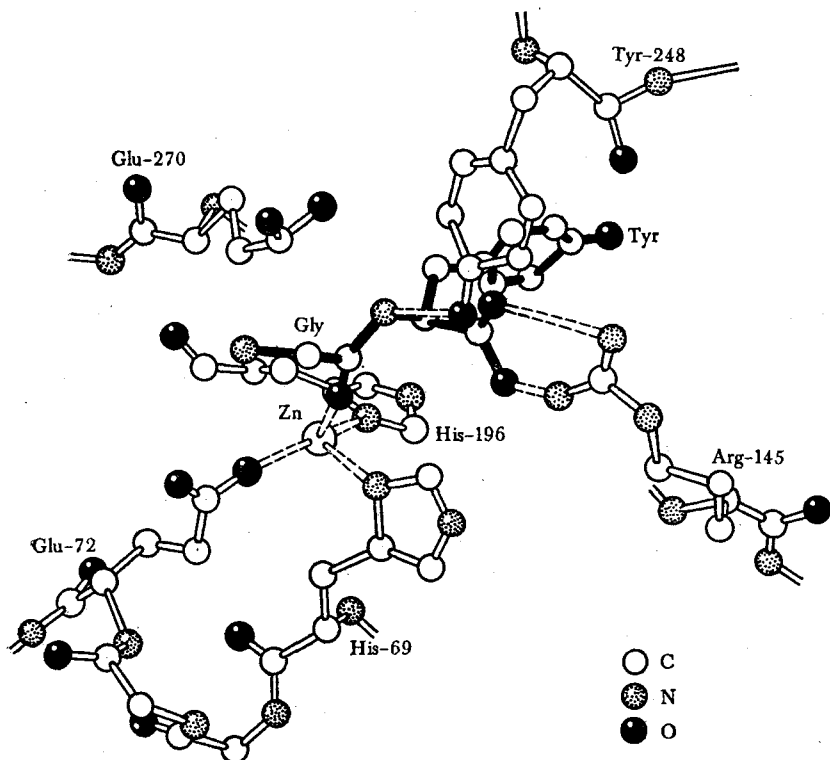


Рис. 7. Связывание глицил-*L*-тирозина (строение его молекулы показано жирно) в активном центре карбоксипептидазы А (сравни с рис. 5) [15]

ного субстрата с атомом Zn, молекулой воды и аминокислотными остатками белка (Glu-270 и Tyr-248) (стрелкой показано направление нуклеофильной атаки карбонильной группы субстрата) [21].

Следовательно, структурные особенности поверхностного слоя белковых глобул позволяют сосредоточить в активном центре большое число различных по химической природе функциональных групп, способных не только сорбировать субстрат на ферменте, но взаимодействовать с ним также и химически.

§ 4. Микросреда активного центра

Среда активного центра отличается, как правило, сильно развитой микрогетерогенностью. Это связано с тем, что в образовании поверхностного слоя белков принимают участие не только заряженные и полярные аминокислотные остатки (которым, поскольку они сильно сольватированы, термодинамически выгодно контактировать с водой), но также частично и аполярные (углеводородные) боковые группы. Так, например, для α -химотрипсина методом рентгеноструктурного анализа

было найдено, что в поверхностный слой входит 10 остатков Leu (из 19), 10 остатков Val (из 23), 10 остатков Ile (из 15); более того, все остатки Phe (всего 6) расположены непосредственно на поверхности глобулы [22]. В поверхностный слой прочно встроены также и молекулы воды. На рис. 8 показан фрагмент поверхностного слоя глобулы α -химотрипсина вблизи активного центра (аминокислотные остатки Ser-214, Asp-102 и His-57 принимают участие в механизме катализа). В центре показано включение двух молекул воды, образующих водородные связи (пунктир) с боковыми функциональными группами и амидными фрагментами белка.

В целом микросреда поверхностного слоя обладает, как правило, более низкой диэлектрической проницаемостью (присущей органическим растворителям) по сравнению с водой [23]. Так, значение диэлектрической проницаемости в сорбционном участке активного центра химотрипсина меньше 10 (для воды $\epsilon = 80$; в бутаноле $\epsilon = 8$; в октане $\epsilon = 2$).

Микросреда поверхностного слоя обнаруживает также сильно пониженную полярность по сравнению с водой. На это указывают, в частности, результаты сравнения УФ- и видимых спектров поглощения или спектров флуоресценции ароматических соединений в воде, в органическом растворителе и при солюбилизации их в поверхностном слое белковой глобулы [23, 24]. Полярность среды, окружающей молекулу N-арилсульфоната в комплексе с белком, близка к значению, характеризующему этанол ($Z = 80$; для воды $Z = 95$) (табл. 4). В тех участках ферментной глобулы, где непосредственно происходит гидрофобное взаимодействие аполярных аминокислотных остатков полипептидной цепи, полярность микросреды должна быть еще более низкой. С другой стороны, в рядом расположенных областях поверхностного слоя следует ожидать высокую локальную концентрацию диполей пептидных связей. Это (даже в отсутствие полярных и заряженных боковых групп) может привести к образованию участков высокополярной и поляризующей микросреды (где напряженность поля достигает значений 10—100 мВ/см) [23]. Если судить по аналогии со строением и свойствами ионных мицелл (см. гл. III), в локальных заряженных участках (особенно в случае нескольких одноименно заряженных боковых групп) электростатический потенциал может достигать нескольких десятков милливольт (по отношению к воде); падение его должно приводить к напряженности поля порядка тысяч или сотен тысяч вольт на см.

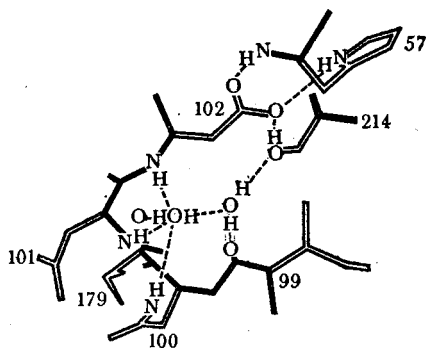


Рис. 8. Фрагмент поверхностного слоя глобулы химотрипсина вблизи активного центра [22]:

зачерненные линии — цепи пептидных связей; светлые линии — боковые группы аминокислотных остатков; пунктир — водородные связи

Полярность (значение Z по Косоверу) среды, окружающей молекулу 1-аминонафталин-7-сульфоната, при солюбилизации ее белками [24]

Название	Z
Различные дегидрогеназы	84—88
Химотрипсиноген	84
Химотрипсин	91
Трипсин	84
Рибонуклеаза	73—80
Альдолаза	83
Лизоцим	88
Бычий сыворочный альбумин	83

Поверхностный слой белковых глобул характеризуется повышенной **микровязкостью** [20, 25]. Эффекты повышенной микровязкости особенно сильно развиты в области активных центров. Весьма наглядное представление о их масштабе было получено при исследовании методом ЯМР подвижности органических молекул, связанных на активном центре только за счет гидрофобных взаимодействий. Как известно, гидрофобные взаимодействия при слипании углеводородных молекул (или же их фрагментов) в водном растворе не ограничивают свободу их вращательного движения [26]. Иное наблюдается при включении органической молекулы в высокоорганизованную структуру

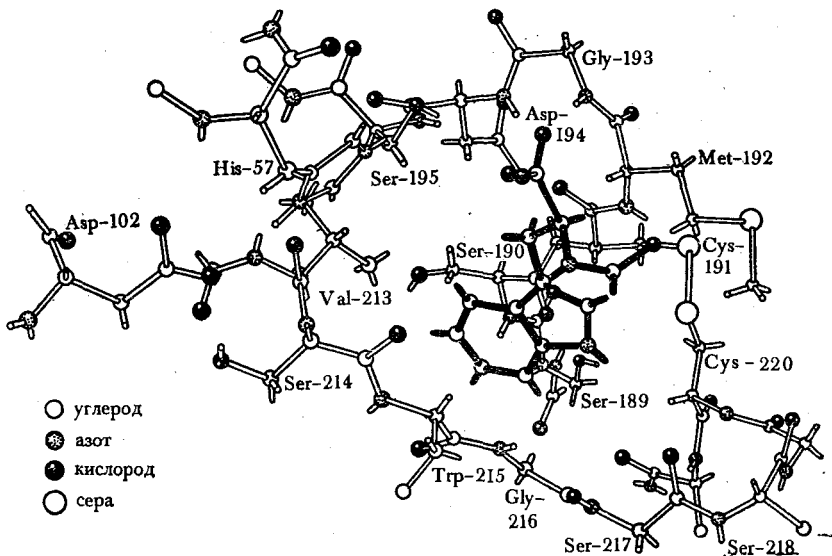


Рис. 9. Строение активного центра α -химотрипсина по Блоу с сотр. [29]. [Боковая группа субстрата — *N*-формил-*L*-триптофан (выделен жирно) расположена в гидрофобной полости активного центра]

активного центра фермента. Здесь полипептидные цепи белка расположены настолько жестко, что затрудняют не только поступательную диффузию в глобуле, но также и вращательное движение связанной молекулы. Так, Гериг на примере *транс*-циннаматного иона [27] и молекулы триптофана [28], связанных на активном центре химотрипсина, показал, что они не имеют степеней свободы движения, которое было бы независимым от движения ферментной глобулы в целом (та или другая частица жестко фиксирована в поверхностном слое). Это нашло подтверждение в результатах рентгеноструктурного анализа. Так, молекула *N*-формил-*L*-триптофана при связывании с химотрипсином включается в узкую щель, которая позволяет лишь одно пространственное расположение ароматического кольца (рис. 9).

§ 5. Механизм сорбции органических молекул и ионов на активном центре

При связывании органических молекул (или ионов) в поверхностном слое белковой глобулы действуют те же силы, которые обычно возникают при межмолекулярных взаимодействиях. Их классификация весьма детально изложена Уэббом [30]. 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 (хотя бы частично) 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. В качестве примера можно указать на сорбцию молекулы синтетического субстрата на активном центре папаина (стр. 19). Углеводородный фрагмент сорбируемой молекулы связывается с белком за счет гидрофобных взаимодействий. Дополнительную ориентацию ей придают 3 водородные связи (пунктир) с аминокислотными остатками белка: Gly-66 и Asp-158.

Образованию весьма прочных «многоточечных» (хелатных) комплексов способствует то, что полипептидные цепи белка и особенно боковые группы аминокислотных остатков, находящихся в поверхностном слое, не зафиксированы слишком жестко и обладают определенной подвижностью (гибкостью). В результате обеспечивается возможность пространственной настройки отдельных сорбционных участков глобулы на соответствующие (связываемые ими) фрагменты сорбируемой молекулы. Иными словами, сорбционный участок глобулы в принципе способен принять конфигурацию, несколько отличную от равновесной

* В специальных руководствах рассмотрен ряд конкретных систем и показано, какой тип взаимодействий «органический лиганд — активный центр» наиболее характерен для данного фермента; см., например, [3, 4, 30].

(т. е. термодинамически устойчивой в отсутствие лиганда), чтобы обеспечить наибольший контакт фермента с лигандом. Конформационные изменения в молекуле фермента при комплексообразовании были зарегистрированы как с помощью химических, так и физических методов (ЯМР, ЭПР, дифракция рентгеновских лучей и др.) [20].

Рассмотрим характер конформационных изменений, возникающих при комплексообразовании карбоксипептидазы А с субстратоподобным ингибитором [15]. В активном центре свободного фермента (см. рис. 5) имеется система водородных связей (пунктир), которая простирается от Arg-145 через амидные связи полипептидной цепи (Glu-155, Ala-154, Gln-249) и молекулу воды (она не указана на рис. 5) до фенольного гидроксила Tyr-248. При контакте этого же фермента с квазисубстратом глицил-*L*-тирозином (см. рис. 7) электростатическое взаимодействие свободной карбоксильной группы квазисубстрата с гуанидиновой группой Arg-145 (пунктир) вызывает смещение последней на 2 Å (по сравнению с ее положением в свободном ферменте). Более того, это смещение одного остатка влечет за собой нарушение всей системы водородных связей, что приводит к повороту боковой цепи Tyr-248 с перемещением ее фенольного гидроксила на 12 Å. В результате между ней и амидным атомом азота в молекуле квазисубстрата образуется водородная связь (пунктир на рис. 7).

Не менее важную роль в комплексообразовании играет также и повышенная микровязкость в поверхностном слое (см. раздел «Микро-среда активного центра» этой главы). Повышенная микровязкость обусловлена тем, что подвижность полипептидных цепей в известной степени заторможена. Если бы это было не так, то энтропийные потери при образовании сложного комплекса фермент — органический лиганд могли бы стать столь большими, что образование его было бы неэффективным (см. раздел «Оценка свободной энергии сорбции» этой главы).

Многоочечный характер комплексообразования в сочетании с эффектом повышенной микровязкости приводит практически к полной потере диффузионной подвижности органического лиганда. Так, методом ЯМР было показано, что молекула никотинамидадениндинуклеотида (НАД) в активном центре алкогольдегидрогеназы (где она выступает в роли кофермента) обнаруживает сильно заторможенное вращение по сравнению с ее подвижностью в комплексе с сывороточным альбумином [31]. Фермент аспартаттранскарбамоилаза связывает молекулу субстрата (сукцинат) на активном центре настолько жестко, что она полностью теряет свободное вращение [32].

§ 6. Прочность комплексов фермент — лиганд (оценка свободной энергии сорбции)

Сорбцию лиганда L на ферменте E (константа равновесия $K_{ассоц}$)



с термодинамической точки зрения удобнее рассматривать как после-

довательный, состоящий из двух этапов процесс. Будем считать, что на первом этапе происходит сближение частиц, которое включает остановку лиганда L против центра сорбции фермента E с одновременным «замораживанием» вращения и некоторых колебательных степеней свободы. При этом система E + L принимает состояние, близкое к переходному состоянию образования связи E·L. На сближение частиц необходимо затратить свободную энергию, равную $\Delta G_{\text{сближ}}$. Лишь затем* (уже в «собственном» акте сорбции, который в рамках данной модели условно можно рассматривать как «внутримолекулярный» процесс образования связи) может реализоваться выигрыш свободной энергии гидрофобного, электростатического или другого взаимодействия фермент — лиганд $\Delta G_{\text{внутр}}^{E \cdot L}$. В итоге суммарное изменение свободной энергии процесса (1.1) $\Delta G_{\text{ассоц}} = -RT \ln K_{\text{ассоц}}$ можно представить следующим образом:

$$\Delta G_{\text{ассоц}} = \Delta G_{\text{сближ}} + \Delta G_{\text{внутр}}^{E \cdot L} \quad (1.2)$$

Для того чтобы оценить значение $\Delta G_{\text{ассоц}}$, рассмотрим по отдельности каждый из членов правой части уравнения (1.2). Для оценки $\Delta G_{\text{сближ}}$ примем, что эта величина определяется в первом приближении потерями энтропии связываемой молекулы**. В этом случае энтропию сближения ($\Delta S_{\text{сближ}}$) просто оценить для комплексообразования с белком жесткой сферической молекулы [33]. При некоторых допущениях о стерическом факторе (ограничивающем площадь соприкосновения частиц и их вращательное движение) можно прийти к значениям $-T\Delta S_{\text{сближ}} \approx 3-5$ ккал/моль (12,6—21 кДж/моль) [33] (здесь и далее в этом параграфе примем значение T, близкое к комнатной температуре). Если же связывание сопровождается существенными потерями также и внутренних вращательных степеней свободы, ассоциация может стать по энтропии еще менее выгодной. Так, оценка энтропии ассоциации с белком линейного дианиона



с большим числом степеней свободы вращательного движения приво-

* Разумеется, описанная термодинамическая картина комплексообразования схематична; вовсе не следует понимать, что эти два этапа должны быть полностью разделены во времени, хотя в целом ряде реальных систем методами быстрой кинетики были прослежены две стадии процесса (1.1) — бимолекулярная (диффузионное сближение частиц) и псевдомономолекулярная (механизм которой обусловлен более тонкой организацией структуры комплекса и более глубокой реализацией термодинамически выгодных взаимодействий (см. § 7 этой главы, а также гл. VII).

** В общем случае [30, 33] суммарное изменение энтропии реакции (1.1) ($\Delta S_{\text{ассоц}}$) состоит по крайней мере из трех частей: 1) из жесткости структуры, возникающей при образовании комплекса E·L (т. е. из потери поступательного движения одной из частиц и ограничений вращательных и колебательных движений) и обуславливающей отрицательное изменение энтропии; 2) из изменения структуры фермента или лиганда, которое наступает в результате связывания (индуцированное «напряжение»); при этом изменение энтропии может быть как отрицательным, так и положительным; 3) из освобождения ранее связанных молекул воды, что приводит к положительному изменению энтропии.

дит к значению — $T\Delta S_{\text{сближ}} \approx 30$ ккал/моль (126 кДж/моль) [33]*. Потеря энтропии, сопровождающая включение в комплекс молекулы воды, была оценена в — $T\Delta S_{\text{сближ}} \approx 4-6$ ккал/моль (16,8—25,2 кДж/моль) [35]. Экспериментальные значения согласуются в первом приближении с этими величинами.

К сожалению, на опыте могут быть найдены лишь суммарные значения, характеризующие изменение энтропии процесса в целом. Так, потеря энтропии при замораживании воды приводит к величине — $T\Delta S \approx 1,5$ ккал/моль (6,3 кДж/моль) [34]. Энтропия димеризации мочевины, N-метилацетамида или муравьиной кислоты составляет — $T\Delta S_{\text{ассоц}} \approx 2,5-4$ ккал/моль (10,5—16,8 кДж/моль) [36]. Можно, однако, думать, что в этих процессах $\Delta S_{\text{сближ}}$ вносит основной (если не единственный) вклад в измеряемую величину. Брюс и Бенкович [37] на основании анализа кинетики внутри- и межмолекулярных реакций привели близкую оценку энтропийных затрат, необходимых для сближения реагентов, — $T\Delta S_{\text{сближ}} \approx 4-7$ ккал/моль (16,8—29,4 кДж/моль). На основании этих и подобного рода данных в литературе обычно принимают, что комплексообразование аминокислотного субстрата с ферментом характеризуется величиной $\Delta G_{\text{сближ}}$, равной по крайней мере 2—4 ккал/моль (8,4—16,8 кДж/моль) [38].

Перейдем к оценке второго члена в правой части уравнения (1.2), полагая, что в простейшем случае реализуется лишь один тип взаимодействий между ферментом и сорбируемой молекулой (или ионом).

Вклад гидрофобного взаимодействия в свободную энергию сорбции органической молекулы на ферменте можно оценить теоретически [26]. Однако более плодотворными для оценки «прочности гидрофобной связи»** оказались некоторые эмпирические критерии. В их основу положено представление, что образование комплекса белок — органический лиганд, возникающего в результате гидрофобных взаимодействий, можно рассматривать фактически как термодинамически выгодный перенос аполярной молекулы (или ее фрагмента) из воды в органическую фазу белка. Величина поверхности связываемой молекулы [40, 41] — это весьма частный критерий, поскольку на его основании нельзя сравнивать комплексообразующие свойства соединений, содержащих в молекуле различного рода полярные заместители. Недостаточным критерием гидрофобности ингибиторов или субстратов следует считать также и растворимость их в воде. Использование этой величи-

* Рассмотрение реальной картины этого процесса представляется весьма интересным. На опыте было найдено значение — $T\Delta S_{\text{ассоц}} \approx -6,6$ ккал/моль (27,8 кДж/моль) [34]. При сопоставлении этой величины с приведенной уже теоретической оценкой — $T\Delta S_{\text{сближ}} \approx 30$ ккал/моль (126 кДж/моль) авторы [34] пришли к выводу, что комплексообразование сопряжено с существенным вытеснением воды и в результате оно становится термодинамически выгодным даже по энтропии.

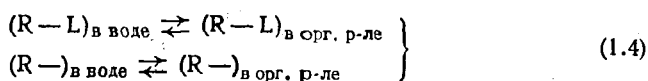
** Термин «гидрофобная связь» следует считать не совсем удачным, как справедливо отметил Гильдебранд [39], поскольку при ассоциации гидрофобных молекул в воде речь идет не об образовании каких-то определенных связей, а о неспецифических взаимодействиях, определяемых изменениями структуры воды, как растворителя.

ны для сравнительного анализа констант ассоциации этих соединений с белками [40, 42] осложнено тем, что свободная энергия процесса растворения зависит от агрегатного состояния растворяемого соединения. Кроме того, отсутствие стандартной исходной среды при переходе лиганда из фазы чистого соединения в находящийся с ним в равновесии водный раствор затрудняет сопоставление комплексующих свойств соединений, резко различающихся по своим химическим или физическим свойствам.

Перечисленных недостатков лишена *экстракционная модель*, с помощью которой сравнивают свободную энергию комплексообразования ($\Delta G_{\text{ассоц}}$):



со свободной энергией модельного процесса переноса (экстракции) молекулы лиганда (или ее фрагмента R) из воды в органический растворитель ($\Delta G_{\text{экстр}}$ или, соответственно, $\Delta G_{\text{экстр}}^R$):



Фундаментальное свойство экстракционной модели, обусловленное самой природой гидрофобных взаимодействий, заключается в том, что инкремент свободной энергии переноса углеводородного фрагмента в молекуле лиганда из воды в органический растворитель практически не зависит от природы последнего [43—47]. Это связано с тем, что главный вклад в эту величину вносит свободная энергия сольватации углеводородного фрагмента в воде. Так, например, независимо от природы органического растворителя инкремент свободной энергии переноса СН_2 -группы из воды в органическую фазу составляет примерно 700 кал/моль (3000 Дж/моль) [45]. Приблизительно та же величина свободной энергии характеризует адсорбцию алифатических соединений на поверхности раздела фаз вода — масло или вода — воздух, адсорбцию их из водного раствора на поверхность ртутной капли или же процесс солюбилизации органических молекул мицеллами детергентов [45]. Значение этого факта трудно переоценить, поскольку именно поэтому (пользуясь сопоставлением термодинамики гидрофобного взаимодействия белок — органический лиганд с аналогичными данными для модельных процессов) можно выявить, в принципе, специфические свойства структуры или «микросреды» гидрофобных полостей в белках*.

На рис. 10 представлены данные по сорбционной способности активного центра липоксигеназы [52]. Из этих данных следует, что между

* При этом следует соблюдать известную осторожность, как, впрочем, всегда при использовании метода корреляций. Недавно попытки сопоставить данные по макроскопическим поверхностным энергиям с процессом ассоциации неполярных молекул в водном растворе [48, 49] встретили закономерную критику [50, 51].

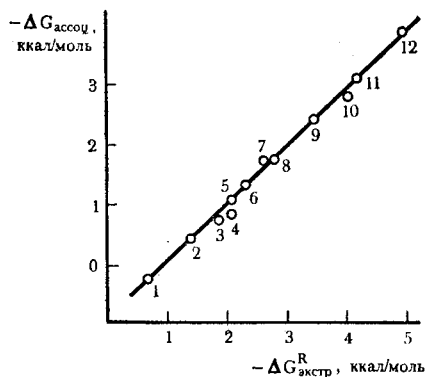


Рис. 10. Линейная зависимость свободной энергии комплексообразования алифатических спиртов (ROH) с активным центром липоксигеназы от свободной энергии переноса группы R из воды в октанол [52]:

1 — метанол; 2 — этанол; 3 — изопропанол; 4 — трет-бутанол; 5 — н-пропанол; 6 — втор-бутанол; 7 — изобутанол; 8 — н-бутанол; 9 — пентанол; 10 — изогексанол; 11 — гексанол; 12 — гептанол

Поскольку в ряду комплексующихся с ферментом соединений R—L, близких по структуре и молекулярной массе, величина $\Delta G_{\text{сблвж}}$ должна быть практически постоянной, то, исходя из уравнений (1.2) и (1.5), получим

$$\Delta G_{\text{внутр}}^{E \cdot RL} \approx \chi \Delta G_{\text{экстр}}^R \quad (1.6)$$

Используя уравнение (1.6), можно оценить искомую величину $\Delta G_{\text{внутр}}^{E \cdot RL}$, поскольку показатели гидрофобности лигандов $\Delta G_{\text{экстр}}^R$ были измерены для огромного числа органических соединений [43], а значения χ также известны для многих ферментов. В случае липоксигеназы (см. рис. 10) и ряда других ферментов (или белков) $\chi \approx 1$ [53]*. Оценка, проведенная на основании этих данных для гидрофобного взаимодействия с белком, например боковой группы фенилаланина ($C_6H_5CH_2-$), приводит к величине $\Delta G_{\text{внутр}}^{E \cdot RL}$, равной почти — 4 ккал/моль (—16 кДж/моль).

Величину электростатического взаимодействия между зарядами в поверхностном слое белка и ионными формами лиганда можно оце-

свободными энергиями процессов комплексообразования (1.3) и экстракции фрагмента R (1.4) существует линейная зависимость

$$\Delta G_{\text{ассоц}} = \chi \Delta G_{\text{экстр}}^R + \text{const}, \quad (1.5)$$

где χ — коэффициент прямой пропорциональности. Физический смысл уравнения (1.5) состоит в том, что вклад, который вносит гидрофобная группа R в свободную энергию комплексообразования, пропорционален свободной энергии переноса этой группы из воды в органический растворитель. Иными словами, на основании уравнения (1.5) можно заключить, что механизм гидрофобного взаимодействия фермент—лиганд — это фактически экстракция гидрофобного фрагмента R в молекуле лиганда из воды в среду белка.

* Иногда $\chi < 1$ [53]. Это указывает на то, что в результате комплексообразования гидрофобная группа R погружается в среду белка далеко не полностью (и частично сохраняет термодинамически невыгодный контакт с водой) или же сорбцию сопровождают неблагоприятные с точки зрения термодинамики конформационные изменения в структуре глобулы (возможно также и в молекуле лиганда).

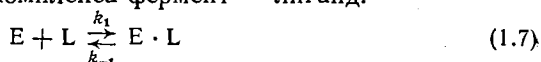
нить, учитывая закон Кулона. Ограничимся приближением, при котором рассматривается притяжение двух единичных разноименных точечных зарядов, расположенных на расстоянии 10\AA друг от друга [54]. Потенциальная энергия такого взаимодействия сильно зависит от диэлектрической проницаемости среды ϵ . Если в гидратированном поверхностном слое (при $\epsilon = 80$, как в воде) $\Delta G_{\text{внутр}}^{\text{E}\cdot\text{L}}$ составляет всего $-0,5$ ккал/моль, то в условиях с низкой диэлектрической проницаемостью ($\epsilon < 10$, что наблюдается в гидрофобных участках глобулы) величина $\Delta G_{\text{внутр}}^{\text{E}\cdot\text{L}}$ должна принимать значения $-(5-10)$ ккал/моль, т. е. $-(21-42)$ кДж/моль [54].

Не менее существенный вклад в комплексообразование E·L может внести и образование водородной связи между ферментом и лигандом. В аполярной (неводной) среде энтальпия образования водородной связи принимает весьма высокие значения: $-(4-8)$ ккал/моль, т. е. $-(16,8-33,6)$ кДж/моль [55, 56].

Из всего изложенного следует, что даже столь грубая оценка величины $\Delta G_{\text{внутр}}^{\text{E}\cdot\text{L}}$ позволяет прийти к выводу, что силы взаимодействия между поверхностным слоем ферментной глобулы и органическими молекулами или ионами вполне могут перекрыть (особенно при многоточечном взаимодействии фермент—лиганд) энтропийные потери, обусловленные необходимым сближением комплексующих агентов ($\Delta G_{\text{сближ}}$). Эксперимент подтверждает это представление, поскольку комплексообразование низкомолекулярных лигандов с белками характеризуется весьма высокими значениями констант ассоциации порядка 10^2-10^5 л/моль [30] (см. гл. VII), что соответствует величине $\Delta G_{\text{ассоц}}$, равной примерно $-(3-7)$ ккал/моль или $-(12,6-29,4)$ кДж/моль.

§ 7. Скорость образования комплекса фермент — лиганд

Включение молекулы или иона в поверхностный слой белковой глобулы при образовании комплекса фермент — лиганд:



(k_1 и k_{-1} — константы скорости прямой и обратной реакций) происходит со скоростями, которые в ряде случаев приближаются к пределу, предсказанному теорией реакций, контролируемых диффузией реагентов (см. гл. VII; $k_1 = 10^8-10^{10}$ $\text{M}^{-1}\cdot\text{c}^{-1}$). Это справедливо не только для многих каталитически активных лигандов (таких, как НАДН в лактатдегидрогеназах, где $k_1 \approx 10^9$ $\text{M}^{-1}\cdot\text{c}^{-1}$ [57]), но также и субстратов (например, при комплексообразовании глутаминовой или аспарагиновой кислот с аспаратаминомтрансферазой, где $k_1 \approx 10^7-10^8$ $\text{M}^{-1}\cdot\text{c}^{-1}$ [58]).

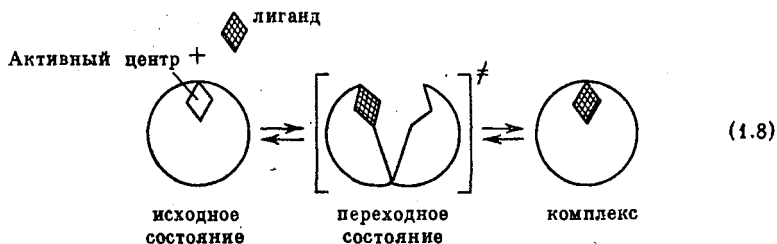
Однако чаще всего константы скорости образования комплексов субстратов или различных эффекторов с активными центрами ферментов несколько ниже диффузионного предела ($k_1 \approx 10^6-10^7$ $\text{M}^{-1}\cdot\text{c}^{-1}$); см. гл. VII. Это может быть связано с тем, что лиганд при комплексообразовании с активным центром встречает стерические затруднения со стороны рядом расположенных полипептидных цепей белка. С таким

представлением согласуется то, что константа скорости комплексообразования обнаруживает, как правило, весьма высокую чувствительность к структуре органического лиганда. Так, введение α -метильной группы в молекулу аспарагиновой кислоты приводит к уменьшению константы комплексообразования этого субстрата с аспартаминотрансферазой почти в 10^4 раз [59]. Роль стерических затруднений в скорости сорбции удалось вскрыть методом ЯМР также и на примере аспартаттранскарбамилазы, катализирующей конденсацию *L*-аспартата и карбамоилфосфата (с образованием карбамоил-*L*-аспартата) [32]. Так, сукцинат (структурный аналог молекулы аспартата) включается не слишком быстро в активный центр, находящийся в комплексе со вторым субстратом — карбамоилфосфатом ($k_1 = 2,3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$). Однако достаточно заменить в активном центре специфический субстрат (карбамоилфосфат) на менее объемный неорганический фосфат, как скорость обмена для сукцината возрастает настолько, что методом ЯМР ее измерить уже нельзя.

В общем случае для объяснения малой скорости комплексообразования следует учитывать два принципиально различающихся механизма.

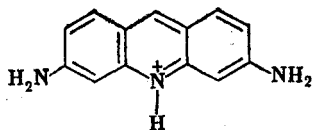
Первый механизм предполагает наличие относительно жесткой конформации связывающего центра. В этом случае малое значение константы скорости комплексообразования, наблюдаемое на опыте, объясняется стерическими затруднениями, которые при комплексообразовании встречает молекула лиганда со стороны сложной организованной структуры активного центра. Фактически, здесь энтропийные потери, обусловленные высокой степенью ориентации лиганда при образовании комплекса, приводят к малому значению предэкспоненциального множителя в выражении для константы скорости процесса. Что касается энергии активации для данного механизма, то следует допустить, что ее значение мало, как и для всех процессов, контролируемых диффузией.

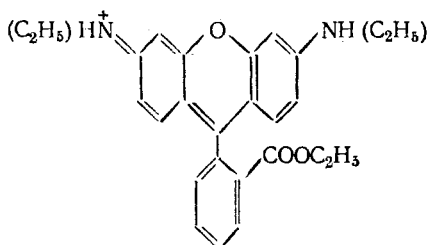
Альтернативный механизм комплексообразования предполагает иную модель активного центра, в которой лиганд в принципе не может достичь связывающего центра без существенных конформационных изменений в молекуле белка (происходящих, возможно, лишь в переходном состоянии процесса комплексообразования):



Известно, что конформационные изменения в белках характеризуются, как правило, значительными изменениями энтальпии [60]. Поэтому значения энергии активации при таком механизме могут оказаться весьма высокими.

В качестве примера сравним характеристики комплексообразования с активным центром α -химотрипсина двух красителей [61], а именно профлавина:





Константы равновесия в том и другом случае отличаются незначительно (в 2—4 раза). В то же время при переходе от профлавина к родамину 6G процесс комплексообразования красителя с активным центром замедляется почти в 10^6 раз! Структуры молекул этих лигандов различаются в основном лишь тем, что молекула родамина 6G содержит дополнительное бензольное кольцо. Как показало изучение температурной зависимости кинетики комплексообразования, энергия активации этого процесса порядка 17 ккал/моль (71,4 кДж/моль). С другой стороны, известно, что энергия активации процессов, контролируемых диффузией, не превышает, как правило, 5 ккал/моль (21 кДж/моль) [62, 63]. Поэтому следует заключить, что образование комплекса химотрипсина с более объемной молекулой родамина 6G возможно лишь в результате конформационных изменений в молекуле фермента. Такой механизм (1.8) комплексообразования органических молекул с белками, по-видимому, весьма распространен.

Несмотря на указанные ограничения (которые на скорость диффузии лиганда к сорбционному центру накладывают стерические затруднения со стороны отдельных фрагментов поверхностного слоя белковой глобулы), константы скорости k_1 для истинных субстратов все же остаются, как правило, большими, если сравнивать их со скоростями обычных (неферментативных) химических процессов второго порядка (см., например, табл. 2). С другой стороны, в силу высокой эффективности ферментативного катализа (и, следовательно, в силу огромных скоростей химических превращений, идущих на активных центрах ферментов) сорбция субстрата на ферменте в ряде случаев может лимитировать валовую скорость катализируемой реакции [64] (см. гл. VII).

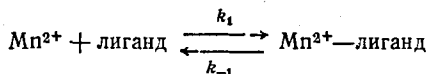
Значение константы скорости обратной реакции (десорбции) $k_{-1} = k_1/K_{\text{ассоц}}$ зависит как от факторов, определяющих скорость прямой стадии (k_1), так и от природы сил, связывающих лиганд на ферменте ($K_{\text{ассоц}}$). Поэтому теоретическая оценка величины k_{-1} должна опираться на те положения, которые уже были изложены в этом параграфе. Если исходить из наиболее распространенных значений $k_1 \approx 10^2 - 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ и $K_{\text{ассоц}} \approx 10^2 - 10^5 \text{ M}$, то для k_{-1} следует ожидать величины порядка $10^5 - 10^2 \text{ с}^{-1}$. Эти значения действительно наблюдаются на опыте (см. гл. VII).

При сравнении с неферментативными комплексами значения k_{-1} оказываются, как правило, меньше аналогичных констант скоростей. Причину этого следует искать как в рассмотренных стерических затруднениях, ограничивающих скорость диффузии в поверхностном слое белковой глобулы (k_1), так и в высокой прочности многоточечных (хелатных) комплексов с участием ферментов ($K_{\text{ассоц}}$; см. раздел «Прочность комплексов фермент — лиганд» этой главы). Так, из табл. 5 видно, что даже молекула воды обменивается между раствором и координационной сферой Mn^{2+} быстрее в случае свободного иона, чем встроенного в активный центр пируваткиназы [65].

С помощью значений k_1 и k_{-1} можно вычислить время (τ) установления равновесия (1.7). При избытке концентрации лиганда по сравнению с концентрацией фермента (именно в этих условиях обычно и протекают ферментативные реакции; см. гл. V и VI) из кинетической теории (см. гл. V) следует $\tau \approx 1/(k_1[L] + k_{-1})$. Даже при не слишком больших значениях констант скоростей ($k_1 \approx 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ и $k_{-1} \approx 10^3 \text{ c}^{-1}$) и при умеренной концентрации лиганда ($[L] \approx 10^{-3} \text{ M}$) значение τ не превышает одну миллисекунду. При более высоких значениях констант скоростей и концентрации лиганда сорбционное равновесие (1.7) будет устанавливаться еще быстрее.

Таблица 5

Скорости обмена пирувата и молекулы H_2O между водой и комплексом с Mn^{2+} , либо свободным, либо встроеным в активный центр пируваткиназы (ПК) [65]:



Константы скорости	ПК·Mn-пируват	ПК·Mn-H ₂ O	Mn-H ₂ O
$k_1(\text{M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1})$	$4 \cdot 10^6$	—	—
$k_{-1}(\text{c}^{-1})$	$2 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^2$

ЛИТЕРАТУРА К ГЛ. I

1. Enzyme Nomenclature. Recommendation (1972) of the International Union of Pure and Applied Chemistry and the International Union of Biochemistry. Amsterdam, Elsevier, 1973.
2. Л е н и н д ж е р А. Биохимия. М., «Мир», 1974.
3. Д и к с о н М., У э б б Э. Ферменты. М., «Мир», 1966.
4. П о л т о р а к О. М., Ч у х р а й Е. С. Физико-химические основы ферментативного катализа. М., «Высшая школа», 1971.
5. K o s h l a n d D., J r., J. Cell. Comp. Physiol., 47, Suppl. 1, 217 (1956).
6. L a i d l e r K. J. The Chemical Kinetics of Enzyme Action. London, Oxford University Press, 1958.
7. В а г м а н Т. Е. Enzyme Handbook. Berlin — Heidelberg — New York, Springer Verlag, 1969.
8. Д ж е н к с В. Катализ в химии и энзимологии. М., «Мир», 1972.
9. L u m g u R. In «The Enzymes» (P. Boyer, H. Lardy, K. Myrback, eds.), v. 1, New York, Acad. Press, 1959).
10. М а л е р Г., К о р д е с Ю. Основы биологической химии. М., «Мир», 1970.
11. Ф и л л и п с Д. В сб.: «Молекулы и клетки». Вып. 3. М., «Мир», 1968.
12. B i r k t o f t J. J., et al. Phil. Trans. Roy. Soc. (London), B 257, 67 (1970).
13. M a t t h e w s B. W., et al. Nature, 214, 652 (1967).
14. A n f i n s e n C. B. Science, 181, 223 (1973).
15. B l o w D. M., S t e i t z T. A. Ann. Rev. Biochem., 39, 63 (1970).
16. A k h t a r M., W i l t o n D. C. Ann. Repts. Progr. Chem., B 68, 167 (1972).
17. D r e n t h J., S w e n H. M., H o o g e n s t r a t e n W., S l u y t e r m a n L. A. Proc. Kon. Ned. Akad. v. Wetensch., C 78, 104 (1975).
18. П е р у т ц М. В сб.: «Молекулы и клетки», М., «Мир», 1966.
19. P e r u t z M. F. Europ. J. Biochem., 8, 455 (1969).
20. Ж. Всес. хим. общ-ва им. Д. И. Менделеева, 16, № 4 (1971).

21. Mildvan A. S., Cohn M. *Adv. Enzymol.*, **33**, 1 (1970).
22. Birktoft J. J., Blow D. M. *J. Mol. Biol.*, **68**, 187 (1972).
23. Johannin G., Kellershohn N. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 321 (1972).
24. Cordes E. H., Gitler C. In «Progress in Bioorganic Chemistry» (Kaiser E. T. and Kezdy F. J., eds.) v. 2, Toronto-New York, J. Wiley a. S., 1973.
25. Wallach D. *J. Chem. Phys.*, **47**, 5258 (1967).
26. Nemethy G., Scheraga H. A. *J. Chem. Phys.*, **36**, 3382 (1962); **36**, 3401 (1962); *J. Phys. Chem.*, **66**, 1770 (1962).
27. Gerig J. T., Reinheimer J. D. *J. Amer. Chem. Soc.*, **92**, 3146 (1970).
28. Gerig J. T. *J. Amer. Chem. Soc.*, **90**, 2681 (1968).
29. Steitz T. A., Henderson R., Blow D. M. *J. Mol. Biol.*, **46**, 337 (1969).
30. Уэбб Л. Ингибиторы ферментов и метаболизма. М., «Мир», 1966.
31. Hollis D. P. *Biochemistry*, **6**, 2080 (1967).
32. Sykes B. D., Schmidt P. G., Stark G. R. *J. Biol. Chem.*, **245**, 1180 (1970).
33. Steinberg I., Scheraga H. A. *J. Biol. Chem.*, **238**, 172 (1963).
34. Epstein S. I., Doty P., Boyd W. C. *J. Amer. Chem. Soc.*, **78**, 3306 (1956).
35. Schaleger L. L., Long F. A. In «Adv. Phys. Org. Chem.» (Gold V., ed.) New York, Acad. Press, 1963, p. 26.
36. Schrier E. E., Ingwall R. T., Scheraga H. A. *J. Phys. Chem.*, **69**, 298 (1965).
37. Bruice T. C., Benkovic S. *J. Amer. Chem. Soc.*, **86**, 418 (1964).
38. Bender M. L., Kezdy F. J., Gunter C. R. *J. Amer. Chem. Soc.*, **86**, 3714 (1964).
39. Hildebrand J. H. *J. Phys. Chem.*, **71**, 3320 (1967).
40. Hymes A. J., Robinson D. A., Canady W. J. *J. Biol. Chem.*, **240**, 134 (1965).
41. Royer G., Canady W. J. *Arch. Biochem. Biophys.*, **124**, 530 (1968).
42. Wildauer R., Canady W. J. *Biochemistry*, **5**, 2885 (1966).
43. Leo A., Hansch C., Elkins D. *Chem. Rev.*, **71**, 525 (1971); Hansch C. *J. Org. Chem.*, **37**, 92 (1972).
44. Tanford C. *J. Amer. Chem. Soc.*, **84**, 4240 (1962).
45. Мартинек К., Левашов А. В., Березин И. В. *Мол. биол.*, **4**, 517 (1970).
46. Collander R. *Acta Chem. Scand.*, **3**, 717 (1949); **4**, 1085 (1950); **5**, 774 (1951).
47. Leo A., Hansch C. *J. Org. Chem.*, **36**, 1539 (1971).
48. Kauzmann W. *Adv. Protein Chem.*, **14**, 1 (1959).
49. Sinanoglu O., Abdulnur S. *Feder. Proc.*, **24**, 5 (1965); *Photochem. Photobiol.*, **3**, 333 (1964).
50. Aveyard R., Mitchell P. W. *Trans. Faraday Soc.*, **64**, 1757 (1968).
51. Crothers D. M., Ratner D. I. *Biochemistry*, **7**, 1823 (1968).
52. Mitsuda H., Yasumoto K., Yamamoto A. *Arch. Biochem. Biophys.*, **118**, 664 (1968).
53. Helmer F., Kiehs K., Hansch C. *Biochemistry*, **7**, 2858 (1968).
54. Reuben J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **68**, 563 (1971).
55. Laskowski M., Scheraga H. A. *J. Amer. Chem. Soc.*, **76**, 6305 (1954).
56. Ingles D. W., Knowles J. R. *Biochem. J.*, **108**, 561 (1968).
57. Czerninski G. H., Schreck G. *J. Biol. Chem.*, **239**, 913 (1964).
58. Fasella P., Hammes G. G. *Biochemistry*, **6**, 1798 (1967).
59. Hammes G. G., Haslam J. L. *Biochemistry*, **7**, 1319 (1968).
60. Сб.: «Структура и стабильность биологических макромолекул». М., «Мир», 1973.
61. Варфоломеев С. Д., Мартинек К., Березин И. В. *Мол. биол.*, **7**, 115, (1973).

62. Глесстон С., Лейдлер К., Эйринг Г. Теория абсолютных скоростей реакций. М., ИЛ, 1948.
63. Березин И. В., Клибанов А. М., Мартишек К. Усп. хим., 44, 80 (1975).
64. Phillip M., Bender M. L. Nature — New Biology, 241, 44 (1973).
65. Mildvan A. S., Scrutton M. C. Biochemistry, 6, 2978 (1967).

ГЛАВА II

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА

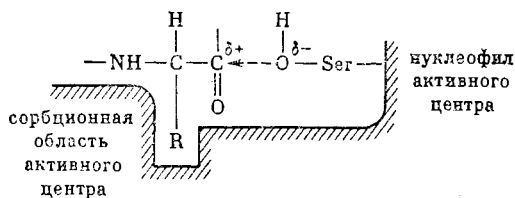
Уникальные каталитические свойства ферментов (см. гл. I) обусловлены весьма сложным механизмом их действия, многие стороны которого еще до конца не раскрыты. Всеобщее признание, однако, получило представление, согласно которому ферментативный катализ обусловлен по крайней мере тремя основными причинами: во-первых, тем, что сорбция субстрата на ферменте протекает так, чтобы облегчить последующую химическую реакцию; во-вторых, полифункциональным характером химического взаимодействия между ферментом и сорбированным субстратом (или субстратами) и, наконец, в-третьих, эффектами микросреды, характеристики которой (диэлектрическая проницаемость, полярность и др.) в области активного центра могут существенно отличаться от соответствующих показателей водного раствора. В настоящей главе будут рассмотрены именно эти три физико-химических механизма ускорений в реакциях, катализируемых ферментами. Наиболее подробно остановимся на первом из них (§ 1—4), поскольку именно здесь удалось глубоко и количественно проникнуть в природу движущих сил катализа.

§ 1. Свободная энергия сорбции субстрата на ферменте как источник ускорения реакции

Ферментативная реакция — это, как правило, многостадийный процесс, в котором на первой стадии образуется комплекс между ферментом и субстратом (комплекс Михаэлиса). Чаще всего эта стадия представляет собой сорбцию субстрата на ферменте, обусловленную, например, их гидрофобным, полярным и (или) ионным взаимодействием (см. гл. I). На образование комплекса Михаэлиса, предшествующее химическому взаимодействию, указывают многочисленные экспериментальные данные, в том числе и кинетические (см. гл. V и VI); некоторые фермент-субстратные комплексы были выделены в чистом виде [1]. Возникает вопрос, в какой мере способствует (и способствует ли) образование фермент-субстратного комплекса ускорению катализируемой реакции.

В связи с этим необходимо указать, что сорбция субстрата на ферменте происходит, как правило, при участии функциональных групп белка, отличных от тех, которые принимают участие в последующей химической реакции. Именно так происходит взаимодействие субстра-

та, например, с активным центром сериновых протеаз, катализирующих гидролиз пептидной связи в белках [2]. Химический механизм действия этих ферментов содержит общее для них звено — это нуклеофильная атака сорбированной молекулы субстрата гидроксильной группой остатка серина:



С другой стороны, эти ферменты сильно различаются по специфичности их действия. Так, сериновые протеазы α -химотрипсин и эластаза осуществляют гидролиз пептидной связи, образованной аминокислотой, содержащей в S_{α} положении гидрофобную боковую группу R; при этом специфичность α -химотрипсина определяется объемным гидрофобным радикалом в молекуле субстрата (типа боковой группы фенилаланина, триптофана), а для эластазы — метильной группой аланина. Механизм наблюдаемой специфичности обусловлен весьма незначительными различиями в строении активных центров этих двух ферментов. По данным рентгеноструктурного анализа, в активном центре α -химотрипсина имеется довольно вместительный «гидрофобный карман», где связывается ароматическая боковая группа гидролизуемого пептида (рис. 11, а; ср. с рис. 9). В активном центре эластазы размеры сорбционной области, где происходит связывание метильной группы субстрата (рис. 11, б), намного меньше, чем в случае α -химотрипсина. Это вызвано тем, что вместо Gly-216 и Ser-217 (см. рис. 9) в соответствующих положениях эластазной пептидной цепи расположены более объемные остатки треонина и валина [3].

Не менее поучительно сопоставление сорбционных функций α -химотрипсина и другой сериновой протеазы — трипсина. Размеры и форма субстратсвязывающего (сорбционного) участка в активных центрах обоих ферментов примерно одинаковы [3]. Единственное различие в первичной структуре полипептидных фрагментов, образующих «гидрофобный карман», состоит в том, что в α -химотрипсине остаток 189 — это серин (см. рис. 9), а в трипсине в соответствующем положении находится отрицательно заряженная аспарагиновая кислота. Это приводит к тому, что в отличие от α -химотрипсина трипсин обнаруживает специфичность к гидролизу пептидных связей, образованных положительно заряженной аминокислотой (Lys, Arg). Сорбция положительно заряженного субстрата на ферменте (вблизи каталитически активного нуклеофила активного центра) происходит в данном случае за счет электростатических взаимодействий (рис. 11, в).

Итак, в активном центре сериновых протеаз функциональные участки (осуществляющие сорбцию и нуклеофильный катализ) пространственно разделены. Эту структурную особенность можно в большей

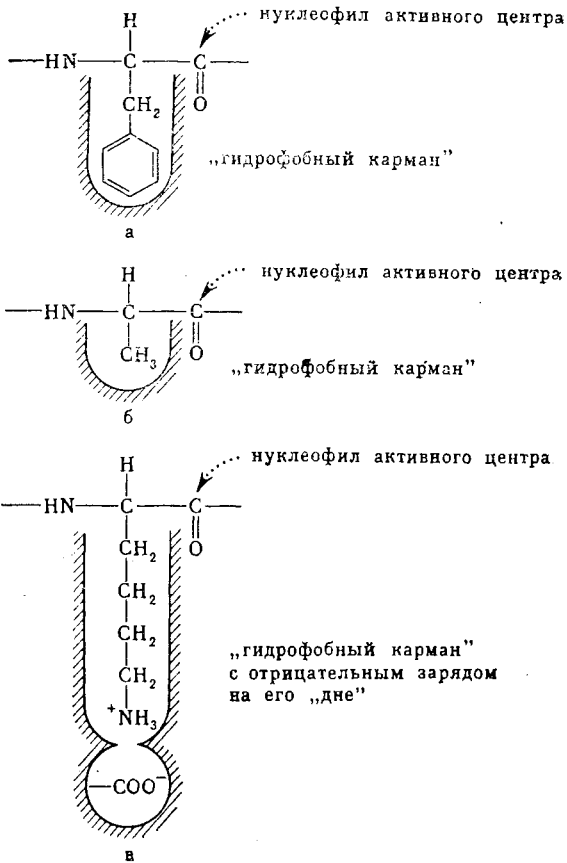


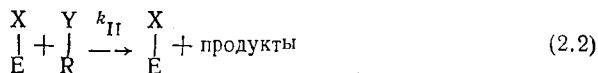
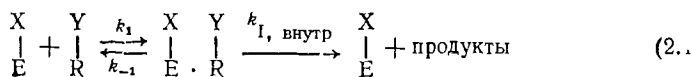
Рис. 11. Схематическое изображение взаимодействия пептидных субстратов с сериновыми протеазами, активный центр которых состоит из пространственно разделенных сорбционного и каталитического участков:

а — α -химотрипсин; б — эластаза; в — трипсин

или меньшей степени отчетливо проследить и для многих других ферментов. Тем не менее представление о пространственной разделенности функциональных областей активного центра не следует, по-видимому, считать обязательным для ферментативного катализа. Оно лишь позволяет упростить анализ кинетической роли сорбционных взаимодействий между молекулами субстрата и катализатора [4].

Теоретическая модель. Рассмотрим взаимодействие двух частиц, каждая из которых имеет два реагирующих центра. Один, где происходят химические превращения с относительно высокой свободной энергией активации (X и Y), и другой для сорбционных взаимодействий (R или, соответственно, E), которые идут весьма быстро (с малой свободной энергией активации); см. гл. I. Эта система может быть пере-

ведена из начального в конечное состояние двумя путями:



где k_1 , k_{II} и $k_{I, \text{внутр}}$, k_{-1} — константы скорости второго и, соответственно, первого порядков. Реакция (2.1) моделирует ферментативный, а реакция (2.2) — обычный гомогенно-каталитический процесс, в котором невалентные (сорбционные) взаимодействия между группами E и R не реализуются. Для того чтобы решить, какой вклад в скорость ферментативного процесса вносит образование фермент-субстратного комплекса XE·RY, следует провести оценку скоростей химического процесса по первому и второму путям.

В случае ферментативной реакции (2.1) учтем, что стационарное состояние ее устанавливается быстро (см. гл. V). Примем также обычное для ферментативных реакций условие об избытке концентрации одного из реагентов (субстрат) по сравнению с другим (катализатор), т. е. $[RY] \gg [EX]$ (см. гл. V и VI). Тогда для стационарной скорости реакции, протекающей по ферментативному пути, имеем выражение, известное как уравнение Михаэлиса:

$$v_I = \frac{k_{I, \text{внутр}} [EX] [RY]}{K_m + [RY]}, \quad (2.3)$$

где K_m — константа Михаэлиса; $K_m = (k_{-1} + k_{I, \text{внутр}})/k_1$. Скорость гомогенно-каталитической реакции определяется из закона действующих масс:

$$v_{II} = k_{II} [EX] [RY]. \quad (2.4)$$

Для сравнения скоростей обоих процессов удобно рассмотреть две крайние кинетические области концентраций субстрата.

1. При $[RY] \ll K_m$ процесс (2.1) подчиняется закону второго порядка. Это видно из уравнения (2.3), которое для эффективной константы скорости второго порядка k_I дает выражение

$$k_I = k_1 k_{I, \text{внутр}} / (k_{-1} + k_{I, \text{внутр}}). \quad (2.5)$$

Допустим, что химическое превращение фермент-субстратного комплекса XE·RY протекает намного быстрее десорбции субстрата с активного центра, т. е. $k_{I, \text{внутр}} \gg k_{-1}$. В данном случае значение k_I определяется скоростью диффузии субстрата к активному центру ($k_I \approx k_1$) и процесс (2.1) фактически лишен специфики, которую в него вносит взаимодействие E·R (вернее, свободная энергия этой сорбции). Поэтому больший интерес вызывает обратное соотношение кон-

стант скоростей, когда $k_{I, \text{внутр}} \ll k_{-1}$, и, следовательно, уравнение (2.3) можно упростить:

$$v_I = (k_{I, \text{внутр}} / K_s) [EX] [RY], \quad (2.6)$$

где $K_s = k_{-1}/k_1$ — константа диссоциации фермент-субстратного комплекса. В этих условиях отношение скоростей реакций, протекающих по ферментативному (2.1) и, соответственно, гомогенно-каталитическому (2.2) путям, равно

$$(v_I / v_{II})_{[RY] \ll K_m} \approx k_{I, \text{внутр}} / K_s k_{II}. \quad (2.7)$$

2. При более высоких концентрациях RY, а именно при $[RY] \gg K_m$, фермент «насыщен» субстратом и, следовательно, скорость процесса (2.1) кинетически контролируется химическим превращением фермент-субстратного комплекса:

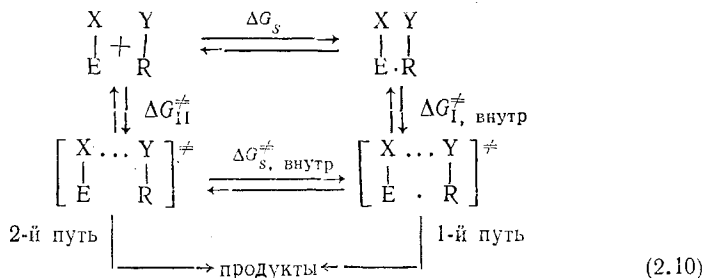
$$v_I = k_{I, \text{внутр}} [EX], \quad (2.8)$$

как это следует из (2.3), т. е. это реакция первого (или в общем случае псевдопервого) порядка. В данном случае отношение скоростей реакций (2.1) и (2.2) зависит от концентрации субстрата RY:

$$(v_I / v_{II})_{[RY] \gg K_m} \approx k_{I, \text{внутр}} / k_{II} [RY]. \quad (2.9)$$

Проанализируем полученные соотношения (2.7) и (2.9) более подробно с использованием теории абсолютных скоростей реакций [5].

Бимолекулярное взаимодействие фермента с субстратом. Для решения задачи о кинетической роли комплексообразования в ферментативном катализе целесообразно записать реакции (2.1) и (2.2) в виде следующей схемы:



где величины типа ΔG — стандартные свободные энергии соответствующих равновесных процессов; $\Delta G_s = RT \ln K_s$ — свободная энергия образования связи E·R между ферментом и субстратом (K_s — константа диссоциации фермент-субстратного комплекса); $\Delta G_{s, \text{внутр}}^\ddagger$ — свободная энергия образования этой же связи во внутримолекулярном режиме при переходе от активированного комплекса реакции (2.2) к активированному комплексу процесса (2.1); ΔG_{II}^\ddagger и $\Delta G_{I, \text{внутр}}^\ddagger$ —

свободные энергии активации для химического взаимодействия $X...Y$ в бимолекулярном и, соответственно, внутримолекулярном процессах. В соответствии со схемой (2.10) на рис. 12 представлена диаграмма изменений стандартной свободной энергии реакций (2.1) и (2.2).

Чтобы выявить, какой вклад в скорость ферментативного процесса (1-й путь) вносит дополнительное комплексообразование реагентов $E \cdot R$, нужно учесть, что свободная энергия — это термодинамический потенциал, величина которого не зависит от пути перехода (в случае обратимых процессов), а определяется лишь разницей в уровнях исходного и конечного состояний. Следовательно, для перехода из исходного состояния реакции ($EX + RY$) в активированное (переходное) состояние ферментативного пути ($\overline{EX...RY}^\ddagger$) должно быть справедливым:

$$\Delta G_s + \Delta G_{I, \text{внутр}}^\ddagger = \Delta G_{II}^\ddagger + \Delta G_{s, \text{внутр}}^\ddagger \quad (2.11)$$

Это означает, что разница свободных энергий активации того и другого реакционного пути дана следующим отношением:

$$\Delta G_{II}^\ddagger - \Delta G_I^\ddagger = -\Delta G_{s, \text{внутр}}^\ddagger \quad (2.12)$$

где суммарная свободная энергия активации ферментативной реакции

$$\Delta G_I^\ddagger = \Delta G_s + \Delta G_{I, \text{внутр}}^\ddagger \quad (2.13)$$

Из теории абсолютных скоростей реакций имеем:

$$v_I \cong (kT/h) \overline{[EX...RY]^\ddagger} \quad (2.14)$$

и, соответственно,

$$v_{II} \cong (kT/h) \overline{[EX...RY]^\ddagger} \quad (2.15)$$

где k — постоянная Больцмана; T — абсолютная температура; h —

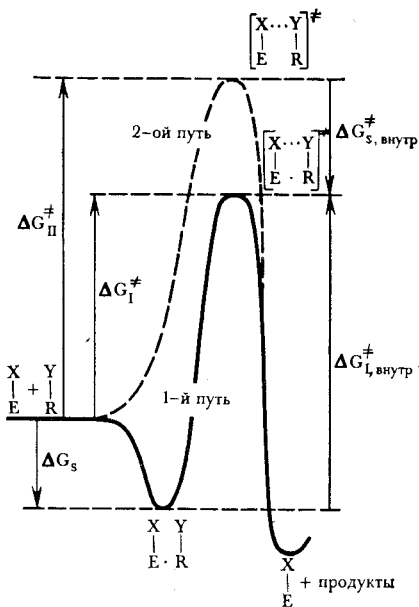


Рис. 12. Диаграмма изменений стандартной свободной энергии по координате реакции:

1-й путь — для процесса (2.1); 2-й путь — для (2.2); направление стрелок определяет знак величины свободной энергии (вверх — положительный, вниз — отрицательный)

постоянная Планка. Концентрации переходных состояний равны:

$$\left. \begin{aligned} [\overline{\text{EX} \dots \text{YR}}]^\ddagger &= e^{-\frac{\Delta G_I^\ddagger}{RT}} [\text{RY}] [\text{EX}]; \\ [\text{EX} \dots \text{YR}]^\ddagger &= e^{-\frac{\Delta G_{II}^\ddagger}{RT}} [\text{RY}] [\text{EX}], \end{aligned} \right\} \quad (2.16)$$

где e — основание натуральных логарифмов; R — универсальная постоянная. Подстановка (2.16) в (2.14) и (2.15) дает уравнения для скоростей реакций:

$$v_I = (kT/h) e^{-\frac{\Delta G_I^\ddagger}{RT}} [\text{EX}] [\text{RY}]; \quad (2.17)$$

$$v_{II} = (kT/h) e^{-\frac{\Delta G_{II}^\ddagger}{RT}} [\text{EX}] [\text{RY}]. \quad (2.18)$$

На основании (2.17) и (2.18) отношение скоростей ферментативной и гомогенно-каталитической реакции (2.7) можно записать в другом виде:

$$(v_I / v_{II})_{[\text{RY}] \ll K_s} \approx e^{-\frac{\Delta G_{s, \text{внутр}}^\ddagger}{RT}} \quad (2.19)$$

если учесть равенство (2.12). Из (2.19) видно, что дополнительное взаимодействие E и R , сопровождающее химическую реакцию между X и Y , может, если оно термодинамически выгодно, привести к ускорению реакции. Действительно, при $\Delta G_{s, \text{внутр}}^\ddagger < 0$ имеем $v_I / v_{II} > 1$. Механизм ускорения заключается фактически в том, что образование связи $E \cdot R$ стабилизирует переходное состояние $—X \dots Y—$ химической реакции.

Обратим внимание, что образование промежуточного фермент-субстратного комплекса (комплекса Михаэлиса) само по себе вовсе не оказывает влияния на ускорение ферментативной реакции (в кинетическом режиме второго порядка, т. е. при $[\text{RY}] \ll K_s$). Дело в том, что концентрация стабилизированного пере-

ходного состояния $[\overline{\text{EX} \dots \text{YR}}]^\ddagger$, которая определяет скорость ферментативного процесса (уравнение 2.14), не зависит от пути его образования и определяется только разностью стандартных свободных энергий исходного и активированного состояния (уравнение 2.16). Тем не менее фермент-субстратный комплекс реально существует в энзиматических реакциях [1] (см. гл. V и VI). Это связано с кинетическими особенностями процесса образования связи $E \cdot R$. В большинстве энзиматических процессов эта связь возникает за счет взаимодействия невалентного типа (гидрофобные, ионные, нон-дипольные взаимодействия, водородные связи). Известно, что скорости таких процессов близки к скоростям диффузии и, следовательно, имеют чрезвычайно большие значения (см. гл. I). Поэтому образование фермент-субстратного комплекса $XE \cdot RY$ всегда превалирует над «двухточечным» взаимодействием исходных частиц, в результате которого ста-

лизованное переходное состояние $[\overline{\text{EX} \dots \text{YR}}]^\ddagger$ могло бы возникнуть в одном акте (в одну стадию). Следовательно, для эффективности катализа существование фермент-субстратного комплекса важно лишь в том смысле, что природа связи между ферментом и субстратом аналогична дополнительной связи $E \cdot R$ в переходном состоянии реакции.

«Внутримолекулярное» (псевдомономолекулярное) превращение фермент-субстратного комплекса. Кинетические закономерности катализа в условиях, когда фермент «насыщен» субстратом (при $[RY] \gg K_s$), несколько другие. В этом случае кинетика ферментативного процесса определяется внутримолекулярным химическим превращением комплекса $XE \cdot RY$ и следует уравнению (2.8). Это уравнение удобно записать по аналогии с (2.17) иначе:

$$v_I = (kT/h) e^{-\frac{\Delta G_{I, \text{внутр}}^\ddagger}{RT}} [EX], \quad (2.20)$$

чтобы представить эффективность ферментативного катализа в виде соотношения скоростей реакций:

$$(v_I / v_{II})_{[RY] \gg K_s} \approx e^{\frac{\Delta G_s - \Delta G_{s, \text{внутр}}^\ddagger}{RT}} / [RY], \quad (2.21)$$

которое следует из (2.18), (2.20) и (2.11).

Из уравнения (2.21) видно, что термодинамически эффективность ферментативного катализа определяется разницей свободных энергий межмолекулярного (при образовании комплекса Михаэлиса) и внутримолекулярного (в переходном состоянии реакции) образования связи $E \cdot R$. Следовательно, в количественном отношении кинетическая роль комплексообразования $E \cdot R$ в ускорении ферментативной реакции представляется несколько иной, чем в кинетическом режиме второго порядка (уравнение 2.19). Однако и здесь движущей силой катализа остается свободная энергия взаимодействия $E \cdot R$ именно в переходном состоянии реакции (а не в промежуточном комплексе). Действительно, чем более термодинамически выгодным будет внутримолекулярное взаимодействие $E \cdot R$ в активированном состоянии (чем более отрицательные значения примет величина $\Delta G_{s, \text{внутр}}^\ddagger$), тем более благоприятным должно быть отношение v_I / v_{II} для ферментативной реакции [см. (2.21)]. Это связано с тем (см. рис. 12), что барьер свободной энергии активации ферментативной реакции ($\Delta G_{I, \text{внутр}}^\ddagger$) в этом случае уменьшается (по сравнению с ΔG_{II}^\ddagger) и, следовательно, скорость процесса [уравнение (2.20)] возрастает. Наоборот, при заданном значении $\Delta G_{s, \text{внутр}}^\ddagger$ термодинамически более благоприятное взаимодействие $E \cdot R$ в исходном состоянии реакции (фермент-субстратный комплекс $XE \cdot RY$) будет тормозить ее протекание. Так, более отрицательные значения ΔG_s приводят к неблагоприятным значениям v_I / v_{II} в отношении ферментативного процесса [уравнение (2.21)]. Это связано с тем, что активационный барьер $\Delta G_{I, \text{внутр}}^\ddagger$ (см. рис. 12), определяющий скорость превращения фермент-субстратного комплекса [уравнение (2.20)], при этом возрастает.

Ускорение ферментативной реакции в принципе может иметь место лишь в том случае, если взаимодействие $E \cdot R$ в переходном состоянии термодинамически выгодно. Действительно, если принять $\Delta G_{s, \text{внутр}}^\ddagger = 0$ (и, следовательно, полагать, что отсутствует движущая сила образования связи $E \cdot R$ в активиро-

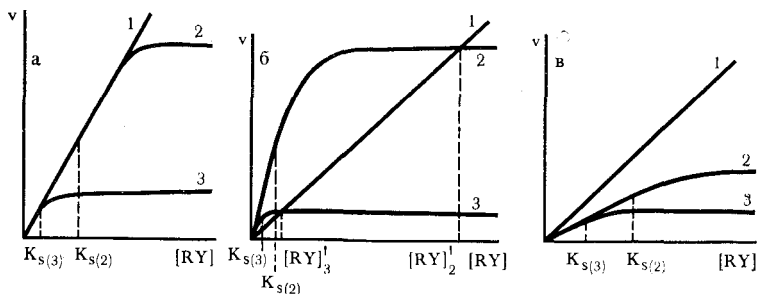


Рис. 13. Зависимость скоростей реакций от концентрации субстрата:

1 — для гомогенно-каталитической реакции (1.7) (проведена произвольно); 2, 3 — для ферментативной реакции (1.6) при условии: а — $\Delta G_{s, \text{внутр}}^{\ddagger} = 0$ (т. е. $k_{I, \text{внутр}}/K_s = k_{II}$); б — $\Delta G_{s, \text{внутр}}^{\ddagger} < 0$ (т. е. $k_{I, \text{внутр}}/K_s > k_{II}$); в — $\Delta G_{s, \text{внутр}}^{\ddagger} > 0$ (т. е. $k_{I, \text{внутр}}/K_s < k_{II}$), приняв для кривых 2 значения свободной энергии ΔG_s термодинамически менее благоприятными, чем для кривых 3

ванном комплексе), то из (2.21) вытекает, что $v_I/v_{II} < 1$, поскольку отношение $e^{\Delta G_s/RT}/[RY]$ можно записать как $K_s/[RY]$ (так как $\Delta G_s = RT \ln K_s$), что гораздо меньше единицы в том интервале концентраций субстрата, который мы условились рассматривать ($[RY] \gg K_s$). Следовательно, ферментативная реакция будет протекать всегда медленнее гомогенно-каталитической реакции независимо от прочности комплекса Михаэлиса, т. е. независимо от величины стандартной свободной энергии сорбции ΔG_s (рис. 13, а).

Если же $\Delta G_{s, \text{внутр}}^{\ddagger} < 0$ (и, следовательно, переходное состояние ферментативной реакции стабилизировано связью E·R), из уравнения (2.21) следует, что всегда существует такой интервал концентраций субстрата, в котором $v_I/v_{II} > 1$, т. е. ферментативный процесс протекает быстрее гомогенно-каталитической реакции. Однако благоприятствующие катализу значения концентрации субстрата RY не должны быть слишком большими, как видно из уравнения (2.21), причем верхняя граница этого интервала дана значением

$$[RY]' = e^{\frac{\Delta G_s - \Delta G_{s, \text{внутр}}^{\ddagger}}{RT}} \quad (2.22)$$

при котором $v_I/v_{II} = 1$ (рис. 13, б).

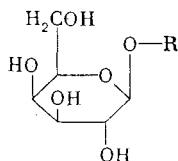
С другой стороны, образование связи E·R не в переходном состоянии, а в исходном (в комплексе XE·RY) играет отрицательную роль в катализе: чем прочнее фермент-субстратный комплекс (чем более отрицательные значения принимает величина ΔG_s), тем меньше значение $[RY]'$, равное концентрации субстрата, до которой ферментативный процесс (2.1) по скорости превалирует над гомогенно-каталитической реакцией (2.2), и тем меньше, как видно из (2.21), сам эффект ускорения. Все эти положения иллюстрирует рис. 13.

§ 2. Механизмы стабилизации переходного состояния химической реакции второго порядка за счет дополнительных сорбционных взаимодействий

Дополнительное сорбционное взаимодействие E·R между реагентами (схема 2.10), которое приводит к ускорению ферментативной реакции второго порядка (уравнение 2.19), может быть гидрофобным,

электростатическим или приводит, например, к образованию водородной связи. Указанные сорбционные механизмы стабилизации наиболее распространены в ферментативных реакциях. В принципе природа связи E·R может быть и другой, в частности, нельзя исключить образование лабильной химической (ковалентной) связи, которая также могла бы стабилизировать переходное состояние катализируемой реакции.

Гидрофобное взаимодействие фермент — субстрат. Для экспериментальной проверки соотношения (2.19) целесообразно использовать, например, гомологический ряд субстратов, содержащих набор модифицированных групп R; это позволит варьировать свободную энергию взаимодействия E·R. В качестве примера рассмотрим реакцию гидролиза *n*-алкил-β-D-галактопиранозидов типа



(где $R = (CH_2)_nH$, $n = 1-8$), катализируемую β-галактозидазой [6]. В неферментативной реакции размер нормального алифатического заместителя R оказывает слабое стерическое и индукционное влияние на скорость гидролиза простой эфирной связи (при увеличении размера заместителя можно ожидать даже торможение реакции) [7]. В ферментативной реакции картина выглядит по-другому. На рис. 14 сопоставлены величины стандартной свободной энергии активации (ΔG_1^\ddagger) для ряда субстратов, различающихся размерами *n*-алкильной боковой группы R, с соответствующими инкрементами стандартной свободной энергии переноса этой группы из воды в органический растворитель ($\Delta G_{экстр}^R$ (см. раздел «Экстракционная модель» в гл. I). Наблюдаемое понижение свободной энергии активации по мере увеличения размеров *n*-алкильной группы объясняется тем, что дополнительное сорбционное (гидрофобное) взаимодействие E·R стабилизирует переходное состояние реак-

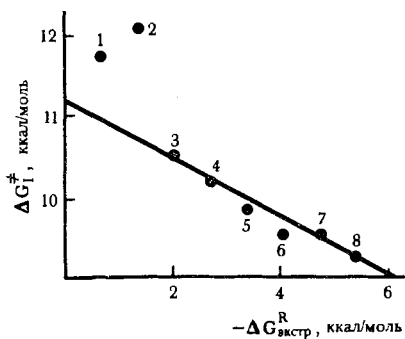


Рис. 14. Сопоставление величин стандартной свободной энергии активации ΔG_1^\ddagger для реакции гидролиза *n*-алкил-β-D-галактопиранозидов β-галактозидазой [6] с соответствующими инкрементами свободной энергии переноса *n*-алкильной группы из воды в октанол $\Delta G_{экстр}^R$, если заместитель:

1 — метил; 2 — этил; 3 — *n*-пропил; 4 — *n*-бутил; 5 — *n*-амил; 6 — *n*-гексил; 7 — *n*-гептил; 8 — *n*-октил

Гидролиз метиловых эфиров N-ацетилзамещенных α -L-аминокислот типа $RCH(NHCOCH_3)C(O)OCH_3$ на активном центре трипсина [9]

α -Аминокислота	R	Константы скорости второго порядка, k_f , внутр/ K_s , $M^{-1} \cdot c^{-1}$
Глицин α -Аминогептановая	H— H(CH ₂) ₅ — +	3 · 10 ⁻² 9
Лизин Аргинин *	NH ₃ (CH ₂) ₄ — H ₂ N—C—NH—(CH ₂) ₃ — +NH ₂	2 · 10 ⁵ 5 · 10 ⁶
Цитруллин *	H ₂ N—C—NH—(CH ₂) ₃ O	4

* N-тозилпроизводные.

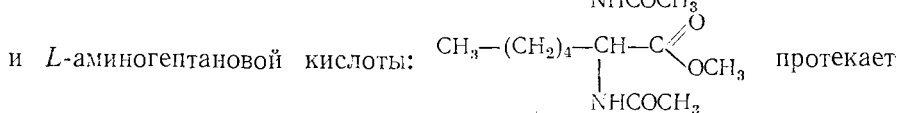
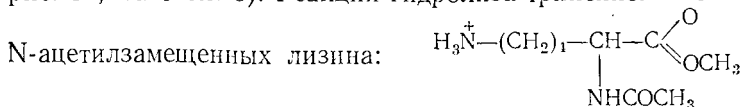
полипептидной цепи, контактирующими (в рамках термодинамически уравновешенной третичной структуры) с водой. В результате взаимодействия с субстратом глобула может образовать новую, термодинамически более благоприятную конформацию. Так, по-видимому, устроена сорбционная область активного центра α -химотрипсина, для которого $\alpha = 2$ (см. гл. IV).

Из сказанного можно сделать вывод, что при гидрофобном фермент-субстратном взаимодействии типа E·R (схема 2.10) величина $\Delta G_{s, \text{внутр}}^\ddagger$ (уравнение 2.19) принимает существенные значения даже при не слишком больших гидрофобных фрагментах R. Так, для весьма распространенной в живой природе бензильной группы (встречающейся в молекулах производных фенилаланина) понижение свободной энергии активации, обусловленное «погружением» ее (переносом из воды) в гидрофобную среду активного центра (при образовании переходного состояния химической реакции), может составить величину вплоть до -7 ккал/моль ($-29,4$ кДж/моль) в зависимости от значения $\alpha \leq 2$, которое реализуется в данной энзиматической системе. Это соответствует ускорением реакции вплоть до 10^5 раз.

Столь подробное рассмотрение роли гидрофобных взаимодействий между субстратом и ферментом в ускорении реакции оправдано тем, что данный тип взаимодействия встречается в огромном числе энзиматических систем, например в реакциях, катализируемых ацетилхолинэстеразой [10], пепсином [11], липоксигеназой [12], цитохромом P-450 [13], коэнзим А синтетазой [14], α -химотрипсином (см. гл. IV) и многими другими ферментами [1, 15, 16].

Электростатическое взаимодействие фермент — субстрат. Боковые группы R субстратной молекулы могут взаимодействовать с белком E. Электростатически (при наличии противоположно заряженных групп в реагирующих частицах). Электростатическая стабилизация переход-

ного состояния наблюдается в механизме катализа трипсином (см. рис. 11, в и табл. 6). Реакция гидролиза трипсином метиловых эфиров



с участием заряженного субстрата в 10^4 раз быстрее, чем в случае электронейтрального. Еще большее соотношение констант скоростей (10^6 раз) имеет место в реакциях производных аргинина и его незаряженного аналога — цитруллина. Это означает, что свободная энергия «внутримолекулярного» (в переходном состоянии) электростатического взаимодействия $E \cdot R$ [$\Delta G_{s, \text{внутр}}^{\ddagger}$; см. уравнение (2.19)] достигает значений $-(6-9)$ ккал/моль, т. е. $-(25,2-37,8)$ кДж/моль. Эти величины, наблюдаемые на опыте, согласуются с теоретической оценкой свободной энергии сорбции (см. гл. I).

Электростатическое взаимодействие фермент-субстрат играет положительную роль также и в катализе карбоксипептидазой А, которая специфически отщепляет аминокислоты от С-конца пептидов и полипептидных цепей белков. Заряженная карбоксильная группа концевого аминокислотного остатка при образовании комплекса Михаэлиса электростатически взаимодействует с положительно заряженной гуанидиновой группой Arg-145 (см. схему на стр. 19 и рис. 7). Метилирование концевой карбоксильной группы, которое элиминирует электростатическое взаимодействие фермент—субстрат, практически полностью тормозит катализ карбоксипептидазой А [17].

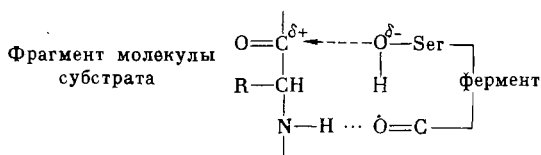
Стабилизация переходного состояния реакции за счет образования водородных связей. Энтальпия образования водородной связи ΔH составляет $-(4-8)$ ккал/моль, т. е. $-(16,8-33,6)$ кДж/моль (см. § 6 в гл. 1). Если строение переходного состояния $X \dots Y$ такое, что не требует «замораживания» дополнительных связей при сближении групп E и R (и тем самым обеспечивает образование «внутримолекулярной» водородной связи без потери энтропии), то величина $\Delta G_{s, \text{внутр}}^{\ddagger}$ (уравнение 2.19) определится указанным значением ΔH . Следовательно, ускорение реакции в этом случае может достигать значений $(v_I/v_{II}) \approx \approx 10^2-10^5$. В противном случае, когда образование дополнительной водородной связи в переходном состоянии требует дальнейшего «замораживания» его структуры, термодинамически невыгодное изменение энтропии на каждую «замороженную» связь составит $-(5-7)$ ккал/моль/град (для модели с подвижными боковыми группами аминокислотных остатков, включенных в жесткую полипептидную цепь) [18]*. Это соответствует увеличению свободной энергии акти-

* Некоторые оценки энтропийных потерь при ограничении внутренних вращательных степеней свободы можно найти также в [19—21].

вазии на 1,5—2 ккал/моль (6,3—8,4 кДж/моль), что уменьшит возможное ускорение реакции.

Образование водородных связей между субстратом и активным центром происходит при гидролизе полисахаридов лизоцимом [22—24]. К сожалению, кинетическую роль, которую в катализе играет сорбция субстрата на ферменте, удалось здесь вскрыть пока лишь качественно.

Остановимся более подробно на катализе сериновыми протеазами. Эти ферменты отличаются лишь некоторыми деталями построения их активных центров, в частности, механизмом сорбции боковой субстратной группы (см. рис. 11). Общее же в механизме действия этих ферментов — это сорбция α -ациламидного субстратного фрагмента при образовании им водородной связи с карбонильной группой полипептидной цепи фермента [23, 25]:



Образование водородной связи фермент — субстрат (пунктир) стабилизирует переходное состояние нуклеофильной атаки, что приводит к ускорению реакции (табл. 7). Соединения I, III и IV (не содержащие α -ациламидного фрагмента) лишь слабо отличаются по относительной реакционной способности их на активном центре фермента (см. примечание к табл. 7). В то же время наличие донора водородной связи в молекуле субстрата (α -ациламидный фрагмент) приводит к ускорению реакции на один (соединения III и V) или на два (соединения I и II) десятичных порядка. Интересно отметить, что в случае субстратов VI и VII с жесткой (циклической) структурой наблюдаемое ускорение (110 раз) значительно превосходит эффект (16 раз), свойственный соединениям III и V с незакрепленной структурой. Можно полагать, что в последнем случае образование водородной связи фермент — субстрат накладывает более существенные энтропийные ограничения на подвижность (внутренние вращательные степени свободы) субстратной молекулы. Это и должно уменьшить (как уже было сказано) суммарный вклад комплексобразования E·R в ускорение реакции.

* * *

В реакции полимерных или олигомерных субстратов, где наблюдается несколько разных по своей природе сорбционных эффектов, ускорение реакции за счет стабилизации (концентрирования) переходного состояния может быть огромным, как, например, при гидролизе сложноэфирной связи в пептидных *n*-нитрофенилкарбоксилатах, катализируемом папаином. Ферментативный процесс идет через промежуточное образование ацилфермента, образующегося при ацилировании субстратом остатка Cys-25 (см. схему на стр. 19, где X — это *n*-нитро-

Гидролиз эфиров β -фенилпропионовой кислоты и ее производных
 α -химотрипсином и субтилизином [25]

Строение субстрата	Фермент	Константы скорости второго порядка (в относ. ед*)
I	Субтилизин α -Химотрипсин	1
II	Субтилизин α -Химотрипсин	220 132
III	α -Химотрипсин	1
IV	То же	0,3
V	»	16
VI	»	1
VII	»	110

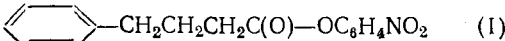
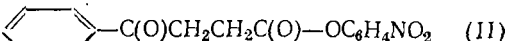

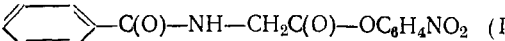
* Значения исправлены с учетом стерического и индукционного влияния α -ациламидного (или, соответственно, O-ацил) заместителя на реакцию щелочного гидролиза.

фенольная уходящая группа) [26]. Скорость этой реакции закономерно растет с увеличением числа водородных связей, образуемых «химически инертным» фрагментом в молекуле субстрата с ферментом (табл. 8). Казалось бы, однако, что в случае субстрата IV суммарный эффект ускорения должен быть значительно большим, если учесть, что это соединение (с наиболее длинной цепью в молекуле) взаимодействует с ферментом также и гидрофобно (более короткие субстраты в переходном состоянии реакции не достигают до гидрофобной области активного центра; см. схему на стр. 19). Тем не менее, реакционная способность соединения IV отличается от III не сильно. Это связано с тем, что эффект ускорения не может быть сколь угодно большим. Наложённые на него ограничения имеют следующую природу.

Во-первых, при увеличении числа сорбционных взаимодействий типа E·R (1-й путь механизма 2.10) суммарный эффект ускорения имеет предел из-за энтропийных потерь, возникающих при образовании слишком жесткой структуры переходного состояния. Теоретически оценить этот предел трудно. Укажем лишь, что эффект ускорения на опыте достигает значений по крайней мере в 10^7 раз (см., например, табл. 8).

Таблица 8

Гидролиз папаином *p*-нитрофениловых эфиров [27]

Строение субстрата*	Константы скорости второго порядка (в относ. ед.)
	1
	$4,5 \cdot 10^3$
	$2,2 \cdot 10^5$
	$1,7 \cdot 10^7$

* Пунктиром отмечены потенциально возможные водородные связи между сорбированным субстратом и ферментом.

Во-вторых, скорость катализируемой реакции не может превысить предел, который для бимолекулярного взаимодействия следует из теории реакций, контролируемых диффузией [см. анализ исходного уравнения (2.5) на стр. 37] [28]. Это означает, что эффективная константа скорости второго порядка не может превысить значения

10^8 — 10^{10} М⁻¹·с⁻¹ (см. гл. VII) независимо от того, сколь большое стабилизирующее воздействие на переходное состояние реакции оказывает дополнительная сорбция E·R.

§ 3. Механизм сближения и ориентации при «внутримолекулярном» превращении комплекса между реагентами

При достаточно высоких концентрациях субстрата скорость ферментативной реакции определяется превращением промежуточного фермент-субстратного комплекса (уравнение 2.8). Чтобы оценить эффективность катализа в этих условиях, запишем на основании (2.11) соотношение скоростей ферментативной и гомогенно-каталитической реакций (2.21) в ином виде:

$$(v_I / v_{II})_{[RY]} > K_s \approx e^{\frac{\Delta G_{II}^\ddagger - \Delta G_{I, \text{внутр}}^\ddagger}{RT}} / [RY]. \quad (2.25)$$

Примем далее, что образование переходного состояния бимолекулярной реакции (2.2) условно происходит в две стадии: на первой из них молекулы реагентов необходимо сблизить в положение с тесно примыкающими реагирующими центрами X и Y. Лишь затем может идти собственно химическое взаимодействие. Поэтому условно свободную энергию активации можно разделить на два члена:

$$\Delta G_{II}^\ddagger = \Delta G_{\text{ориент}}^{\ddagger \text{сблиз.}} + \Delta G_{II, \text{внутр}}^\ddagger. \quad (2.26)$$

Величина $\Delta G_{\text{ориент}}^{\ddagger \text{сблиз.}}$ соответствует главным образом термодинамически невыгодным потерям энтропии, обусловленным остановкой поступательного (для одной частицы), а также вращательного и других движений, что необходимо для сближения и взаимной ориентации реагирующих частиц. Последующее химическое взаимодействие (идущее «внутримолекулярно» в таком условно замороженном комплексе между реагентами) характеризуется свободной энергией активации $\Delta G_{II, \text{внутр}}^\ddagger$.

В реакции, протекающей по ферментативному пути (исходное состояние — фермент-субстратный комплекс), затраты свободной энергии типа $\Delta G_{\text{ориент}}^{\ddagger \text{сблиз.}}$ в большей части должны отсутствовать. Дело в том, что в комплексе XE·RY за счет свободной энергии сорбции E·R погашено поступательное движение одной из частиц, а возможно (в зависимости от конкретной модели) сориентированы по отношению друг к другу (хотя бы частично) реакционные центры X и Y. Иными словами, при образовании фермент-субстратного комплекса происходит перемещение вдоль координаты реакции одновременно также и системы X + Y. В результате исходное состояние ферментативной реакции (комплекс Михаэлиса) уже содержит некоторые элементы процесса активации, которые необходимы для достижения переходного состояния X...Y. На этом основании разницу свободных энергий, определяющих показатель в правой части уравнения (2.25), запишем как

$$\Delta G_{II}^\ddagger - \Delta G_{I, \text{внутр}}^\ddagger = \Delta G_{\text{ориент}}^{\ddagger \text{сблиз.}}, \quad (2.27)$$

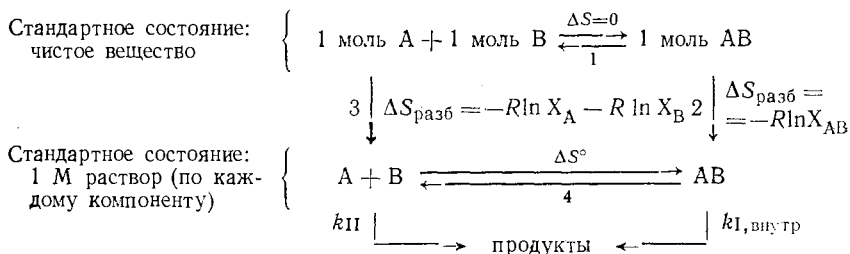
Оценка свободной энергии сближения и ориентации. Для оценки величины $\Delta G^{\ddagger}_{\text{сближ, ориент}}$, используют несколько подходов.

1. Отношение констант скоростей $k_{I, \text{внутр}}/k_{II}$, в уравнении (2.9) имеет размерность концентрации и равно тому значению концентрации избыточного реагента RY , при котором реакция второго порядка протекает псевдомономолекулярно с константой скорости, численно равной константе скорости внутримолекулярного превращения [29]. Следовательно, это отношение можно рассматривать как оценку эффективной концентрации группы X в непосредственной близости от Y в комплексе $XE \cdot RY$. Для молекул (или, вернее, реагирующих групп), имеющих размер молекулы воды, предельное значение локальной их концентрации не превышает величины концентрации воды в воде, т. е.

$$k_{I, \text{внутр}}/k_{II} \approx 55 \text{ M.} \quad (2.28)$$

Вклад свободной энергии в ускорение внутримолекулярной (ферментативной) реакции, соответствующий фактору 55, равен $\Delta G_{II}^{\ddagger} - \Delta G_{I, \text{внутр}}^{\ddagger} = \Delta G^{\ddagger}_{\text{сближ, ориент}} = 2,4$ ккал/моль (10,1 кДж/моль).

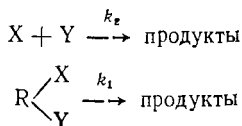
Термодинамическое значение $k_{I, \text{внутр}}/k_{II} = 55 \text{ M}$ связано с энтропией разбавления. Это видно из следующей схемы:



где A и B — компоненты реакции; AB — гипотетический комплекс, в котором реагенты просто сближены без изменения вращательной, колебательной и электронной энергий. Это значит, что компоненты A и B в AB не взаимодействуют и, если они неразличимы, простое их смешение (путь 1) не приводит к изменению энтропии системы. Энтропии разбавления $\Delta S_{\text{разб}}$ (пути 2 и 3) зависят, как известно из термодинамики, от величины молярной доли (X), полученной при разбавлении соответствующего компонента; при этом для 1 M водных растворов веществ с низкой молекулярной массой $X_A = X_B = X_{AB} = 1/55$. Поскольку изменение энтропии процессов, идущих по пути 1, 2, можно приравнять к энтропийному изменению на пути 3, 4, то $\Delta S^{\circ} = -R \ln 55$, что соответствует -8 ккал/моль/град (33,6 Дж/моль/град).

Полученная оценка отражает лишь вероятность того, что реагирующие группы во внутримолекулярной реакции найдутся вблизи друг друга. Если принять во внимание, что в исходном состоянии внутримолекулярной реакции взаимодействующие группы X и Y могут оказаться также и сориентированными (что благоприятно для образования переходного состояния), то величина $\Delta G^{\ddagger}_{\text{сближ, ориент}}$ может принимать гораздо большие значения, чем следует из (2.28). Для ее эмпирической оценки используют следующие два подхода.

2. Сравнивают константы скорости межмолекулярных (k_2) и аналогичных по химическому механизму внутримолекулярных (k_1) реакций:



Некоторые примеры рассмотрены нами в гл. III, где показано, что в зависимости от степени сближения и ориентации реагирующих групп X и Y в соединении X—R—Y отношение k_1/k_2 принимает значения до 10^7 М. Аналогичные эффекты ускорения следует ожидать (и они должны быть) также и в механизме ферментативного катализа (при внутримолекулярном превращении фермент-субстратного комплекса XE·RY).

3. Рассматривают энтропии различных ассоциативных процессов, в частности реакций димеризации в жидкой фазе (см. § 6, гл. I). Наиболее подробно изучена димеризация циклопентадиена (по Дильсу—Альдеру) [20, 30]. Для суммарной потери энтропии поступательного и вращательного движений во многих бимолекулярных реакциях в растворе представляются вероятными значения вплоть до -45 кал/моль/град ($0,189$ кДж/моль/град) (стандартное состояние 1 М, 25°C). Это согласуется с оценками энтропии поступательных и вращательных степеней свободы молекул в газовой фазе (см. табл. 9). Пре-

Таблица 9

Типичные значения энтропии поступательного, вращательного и колебательного движений [20]

Движение	S^{****} , кал·град ⁻¹ ·моль ⁻¹
Три степени свободы поступательного движения при мол. массе 20—200 (станд. состояние 1 М)*	29—36**
Три степени свободы вращательного движения*:	
вода	10,5
<i>n</i> -пропан	21,5
эндо-дихлорпентадиен	27,2
Внутреннее вращение***	
Колебания* (ω , см ⁻¹):	
1000	0,1
400	1,0
100	3,4

* Вычислено по известным в термодинамике уравнениям для поступательного (уравнение Закура—Тетроде), вращательного (жесткий ротатор) и колебательного (гармонический осциллятор) движений в газовой фазе.

** Как видно из таблицы, типичное значение поступательной энтропии в газовой фазе составляет около 30 кал/моль/град; в растворе это значение должно быть уменьшено на 3 ± 5 кал/моль/град [21].

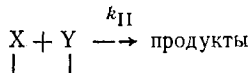
*** Более подробно см. в [20].

**** Пересчетный коэффициент: 1 ккал/моль = 4,2 кДж/моль.

дельное значение суммарной энтропии сближения и ориентации реагентов ($\Delta G_{\text{ориент}}^{\text{сближ.}}$) должно быть меньше и равно примерно — 35 кал/моль/град ($-0,147$ кДж/моль/град) [20], если учесть, что в ассоциате появляются новые (низкочастотные) колебания вдоль образовавшихся связей [19, 31]. Следовательно, величина $\Delta G_{\text{ориент}}^{\text{сближ.}}$ может достигать значений порядка 10—11 ккал/моль (42—46,2 кДж/моль). На этом основании Дженкс с сотр. [20, 21], Брюс [32, 33] и др. [34, 35] полагают, что ускорения внутримолекулярных реакций, наблюдаемые на опыте по сравнению с бимолекулярными процессами, следует объяснить вплоть до значений $k_1/k_2 \approx 10^8$ М тем, что реагирующие группы X и Y в исходном состоянии внутримолекулярного превращения сближены и сориентированы нужным образом для химического взаимодействия.

Существуют и другие объяснения столь высоких эффектов ускорения внутримолекулярных (ферментативных) процессов; среди них наиболее популярно представление Кошланда мл. с сотр. [36, 37] об «орбитальном управлении» (orbital steering) внутримолекулярных реакций. Эта концепция, однако, подвергалась критике за необоснованное введение новой терминологии [33, 34], а также в связи с тем, что авторы ее, принимая в расчет весьма тонкие эффекты ориентации взаимодействующих орбиталей, недооценивают тот очевидный вклад, который вносит в ускорение внутримолекулярных реакций «замораживание» поступательных и вращательных степеней свободы реагирующих групп в целом [21].

4. Максимальный эффект сближения и ориентации можно оценить также исходя из теории статистической термодинамики. Будем полагать, что реакция



может протекать лишь в том случае, если центр масс группы Y находится в пределах элемента объема δV на расстоянии \vec{r} от центра масс X (рис. 15, а). Лишь после этого может произойти перераспределение электронов, сопровождающееся разрывом старых и образованием новых связей.

Как следует из определения модели, свободную энергию активации бимолекулярной реакции ΔG_{II}^{\ddagger} условно можно разбить на два слагаемых, что и предполагает уравнение (2.26). Первое слагаемое $\Delta G_{\text{ориент}}^{\text{сближ.}}$ отвечает процессу сближения и ориентации реагирующих центров при образовании пары X и Y (рис. 15, а) и учитывает поступательные и частично вращательные степени свободы. Так, в конкретном случае гидролиза сложного эфира свободное вращение молекулы воды может сохраниться лишь вокруг оси, изображенной пунктиром (рис. 15, б). Второе слагаемое $\Delta G_{II, \text{внутр}}^{\ddagger}$ отвечает дальнейшему химическому взаимодействию; оно учитывает изменения вращательных, колебательных и электронных степеней свободы реагирующих молекул.

Согласно уравнению (2.26) скорость бимолекулярной реакции можно представить двояко: $k_{II} [X][Y]$ (если исходить из суммарной

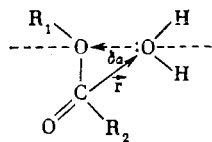
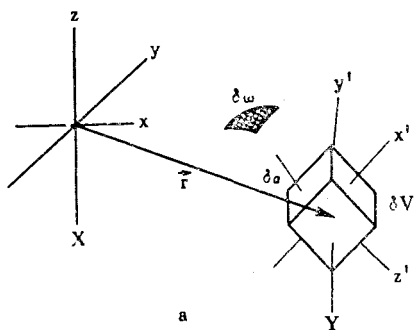


Рис. 15. Взаимная ориентация двух взаимодействующих центров X и Y, сближенных на расстояние \vec{r} таким образом, что Y находится в пределах объема δV и угловых параметров $\delta\alpha$ и $\delta\omega$ (a); гидролиз сложного эфира (б)

свободной энергии активации ΔG_{II}^{\ddagger}) и как $k_{II, \text{внутр}} [(-X \dots Y)_{\text{сближ. ориент}}]$, где $[(-X \dots Y)_{\text{сближ. ориент}}]$ — концентрация пар молекул X— и Y— в растворе, в которых группа Y находится в пределах объема δV на требуемом расстоянии от X, а значение $k_{II, \text{внутр}}$ — константа скорости химического взаимодействия при условии, что реагенты X— и Y— уже сближены и необходимым образом сориентированы. Значение $[(-X \dots Y)_{\text{сближ. ориент}}]$ можно вычислить, поскольку в гомогенном растворе молекулы распределены равномерно. Объемная доля раствора, в которой должны находиться молекулы —Y, равна $[-X]N\delta V$, где N — число Авогадро. Следовательно, концентрация пар типа $(-X \dots Y)_{\text{сближ. ориент}}$ равна $[-X]N\delta V[-Y]$ (если пренебречь возможностью переменны —X и —Y местами). В итоге имеем

$$k_{II} [-X] [-Y] = k_{I, \text{внутр}} N\delta V [-X] [-Y],$$

откуда следует

$$k_{I, \text{внутр}} / k_{II} = \frac{1}{N\delta V}. \quad (2.29)$$

Это уравнение имеет фундаментальное значение для понимания механизма ускорения внутримолекулярных реакций и для оценки его величины. Оно следует также из строгой статистической теории [38] как предельный случай при малых δV порядка нескольких кубических \AA .

Как видно из (2.29), эффект ускорения существенно зависит от степени сближения (и ориентации) реагирующих центров в исходном состоянии внутримолекулярной реакции. Допустим, что δV представляет собой объем молекулы воды, т. е. $30 \text{\AA}^3 = 3 \cdot 10^{-26}$ л. Тогда

$$k_{I, \text{внутр}} / k_{II} = \frac{1}{6 \cdot 10^{23} \times 3 \cdot 10^{-26}} \approx 55 \text{ М},$$

что совпадает с (2.28). Однако степень сближения может быть значительно большей, а именно, в пределе критический объем δV — это, по-видимому, сфера, диаметр которой равен амплитуде колебаний образующейся связи, т. е. примерно $0,05 \text{ \AA}$ [38]. Тогда $\delta V \approx 0,55 \cdot 10^{-31}$ л и, следовательно,

$$k_{\text{I, внутр}} / k_{\text{II}} \approx 3 \cdot 10^7 \text{ М.} \quad (2.30)$$

Столь малое значение δV может иметь физический смысл лишь в том случае, если рассматривать взаимодействие реагирующих функциональных групп на уровне атомов. При этом реагирующие атомы должны вступать в столь тесный контакт, при котором возможно существенное ограничение вращательной подвижности группы в целом. Следовательно, требуемое сближение затрагивает не только поступательные, но частично и вращательные степени свободы, что уже связано с ориентацией молекул. Однако данная модель не детализирует, какие именно вклады вносят в этот механизм по отдельности потери поступательной и вращательной подвижности групп. Это является следствием определения понятия сближения, принятого в [38], согласно которому эффект сближения связан с вероятностью обнаружения Y в объеме δV и «включает требование не только наблюдения необходимого расстояния от X , но также и ориентированного расположения Y вдоль оси образуемой связи». Оба эти эффекта **взаимосвязаны**. Действительно, более тесное сближение реагирующих атомов требует также более точной ориентации взаимодействующих групп. Оба эффекта в принципе можно рассмотреть по отдельности, если разделить анализировать энтропию поступательного и, соответственно, вращательного движений взаимодействующих молекул (см. табл. 9 и ее обсуждение в тексте). Однако и здесь полностью разделить эти энтропийные вклады можно лишь для реакций в газовой фазе; для раствора этого сделать нельзя [20]. Можно лишь думать, что эти эффекты так же, как и в газе, соизмеримы [21] и, следовательно, каждый из них вносит в эффект ускорения внутримолекулярных реакций вклад не более чем в 10^3 — 10^4 раз.

На более ранних этапах формирования взглядов на природу ферментативного катализа сложилась более простая статистическая модель [39, 40], в которой реагирующие группы принимают ту или иную ориентацию в пространстве, независимую друг от друга. Взаимодействие этих групп предполагает их сближение в ассоциат типа АВ (см. схему на стр. 51) с константой ассоциации $1/55 \text{ М}^{-1}$, причем дальнейшее химическое взаимодействие возможно только при контакте молекул определенными участками поверхности, занимающими небольшую долю их общей поверхности. Вероятность такой благоприятной ориентации двух молекул небольшого размера оценивается в 10^{-3} — 10^{-4} и, следовательно, правильная ориентация групп в исходном состоянии внутримолекулярной реакции может обеспечить ускорение в 10^3 — 10^4 раз [32, 37, 40, 41]. Как видно, эта модель предсказывает меньшие эффекты ускорения (в сумме не более чем 55×10^4 раз) по сравнению с (2.30). Однако это обстоятельство вызвано лишь тем, что разные авторы принимают разные предельные значения для оценки необходимой степени сближения и, соответственно, ориентации реагирующих молекул (см. также [21]).

Величина предельного ускорения, которую дает уравнение (2.30), совпадает с оценкой максимально возможной величины $\Delta G^{\ddagger}_{\text{сближ, ориент}}$ порядка 10 — 11 ккал/моль (42 — $46,2$ кДж/моль), полученной исходя из предельных значений потери энтропии поступательного и вращательного движений ассоциирующих молекул (см. табл. 9 и ее обсуждение в тексте). Иными словами, оба подхода (классический термодинамический и статистический) приводят к взаимосогласующимся результатам при оценке вклада, который эффекты сближения и ориентации могут

внести в механизм ускорения ферментативных (или, соответственно, внутримолекулярных) реакций.

Структурные и термодинамические предпосылки механизма сближения и ориентации в ферментативном катализе. Итак, для эффективности катализа важно, чтобы «замораживание» реагирующих центров X и Y, которое происходит в комплексе $XE \cdot RY$ (и сопровождается образованием связи $E \cdot R$), как можно больше приблизило реакцию к переходному состоянию $X \dots Y$. Для этого необходимо, чтобы строение активного центра в высшей мере было комплементарным по отношению к той структуре молекулы субстрата, которую она должна принять в переходном состоянии реакции. Именно поэтому активный центр ферментов расположен обычно в складках полипептидных цепей, образующих как бы «щель». Где-то в глубинных участках этой щели расположены аминокислотные остатки, взаимодействующие с субстратом. Благодаря такой структуре активного центра при переходе молекулы субстрата из свободнодвижущегося состояния (из раствора) в сорбированное состояние (когда она, образно говоря, втискивается в активный центр) происходит необходимое для реакции «замораживание» вращательных степеней свободы и сближение ее с каталитически активными группами белка.

Однако структурных предпосылок (налагающих требования к геометрии активного центра) недостаточно для катализа. Термодинамически невыгодному процессу сближения и ориентации прежде всего нужна движущая сила, благодаря которой суммарный процесс пошел бы спонтанно. В ферментативном катализе роль такой движущей силы играет свободная энергия сорбции субстрата на ферменте*.

Иными словами, термодинамическая предпосылка механизма сближения и ориентации реагирующих групп X и Y в комплексе $XE \cdot RY$ состоит в том, что «замораживание» молекулы субстрата (или также некоторых каталитических фрагментов активного центра) идет за счет свободной энергии сорбции $E \cdot R$. Чтобы показать это, учтем, что образование фермент-субстратного комплекса можно представить в виде модели (см. § 6 гл. I), в которой на первом этапе происходит остановка поступательного движения субстрата с одновременным «замораживанием» вращательных и некоторых других степеней свободы. Лишь после этого в собственном акте сорбции может реализоваться выигрыш свободной энергии гидрофобного и других видов взаимодействий (если они существуют), которую обозначим $\Delta G_{s, \text{внутр}}$. Таким образом получим

$$\Delta G_s = \Delta G_{\text{сближ, ориент}} + \Delta G_{s, \text{внутр}} \quad (2.31)$$

Уравнение (2.31) и его связь с другими термодинамическими показателями схемы (2.10) можно представить в виде диаграммы, описывающей

* Для объяснения высокой эффективности ферментативного катализа Эмиль Фишер (1894) предложил образное сравнение: «активный центр организован так, что субстрат входит в него как ключ в замок». В свете современных представлений этого явно недостаточно. Если говорить на языке Эмиля Фишера, то, во-первых, ключ должен был бы быть плохо подогнанным к замку и, кроме того, нужно было бы принять во внимание также и силу, которая ключ повернула бы.

вающей изменение стандартной свободной энергии по координатам реакций (2.1) и (2.2) (рис. 16). Преобразуем далее (2.31) к виду

$$\Delta G_{\text{сближ., ориент}}^{\#} = \Delta G_s - \Delta G_{s, \text{внутр}}, \quad (2.32)$$

где правая часть полученного уравнения тождественно равна (в силу 2.11) разности $\Delta G_{\text{II}}^{\#} - \Delta G_{\text{I, внутр}}^{\#}$, которая и определяет ускорение ферментативной реакции по сравнению с гомогенно-каталитическим процессом (см. уравнение 2.25).

Из (2.32) видно, чем более термодинамически выгодным (чем более отрицательным) будет значение свободной энергии внутримолекулярного взаимодействия $E \cdot R$, тем большего эффекта сближения и ориентации ($\Delta G_{\text{сближ., ориент}}^{\#} > 0$) может достичь последующее внутримолекулярное химическое превращение комплекса $XE \cdot RY$. Поскольку предельное значение $\Delta G_{\text{сближ., ориент}}^{\#}$ может достигать, как было показано, 10—11 ккал/моль (42 — 46,2 кДж/моль), то приблизительно такая же величина (абсолютная) должна быть у свободной энергии сорбционного взаимодействия $\Delta G_{s, \text{внутр}}$. В противном случае образование комплекса $XE \cdot RY$ было бы мало эффективным (по величине ΔG_s ; см. уравнение 2.32). В принципе активные центры ферментов действительно устроены так, что они способны обеспечить столь высокие свободные энергии сорбции субстрата на ферменте (см. § 2 этой главы).

Казалось бы в таком случае, что эффективность ферментативного катализа должна возрастать при увеличении потенциальной свободной энергии внутримолекулярного взаимодействия ($-\Delta G_{s, \text{внутр}}$). Это действительно происходит в ферментативных реакциях второго порядка (см. § 2 этой главы), однако при $[RY] \gg K_s$, когда исходное состояние реакции — это фермент-субстратный комплекс, такое требование не достаточно. Из (2.32) видно, если более благоприятные условия для сорбции (при изменении, например, структуры субстрата) приводят одновременно (и в той же мере) к увеличению также и прочности образующегося комплекса $XE \cdot RY$ (к более отрицательным значениям ΔG_s), эффект

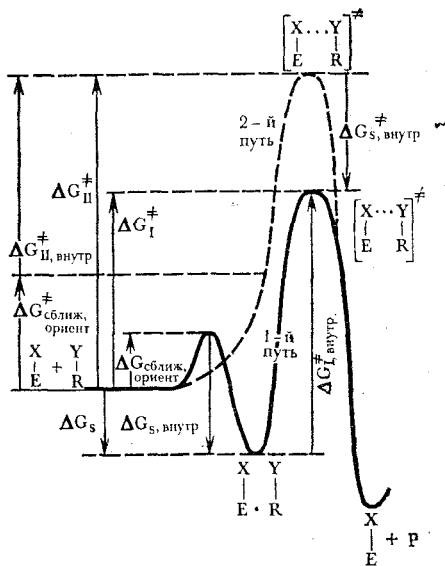


Рис. 16. Диаграмма изменений стандартной свободной энергии реакции (2.1) (1-й путь) и (2.2) (2-й путь) с учетом «эффекта сближения и ориентации» реагентов (ср. с рис. 12)

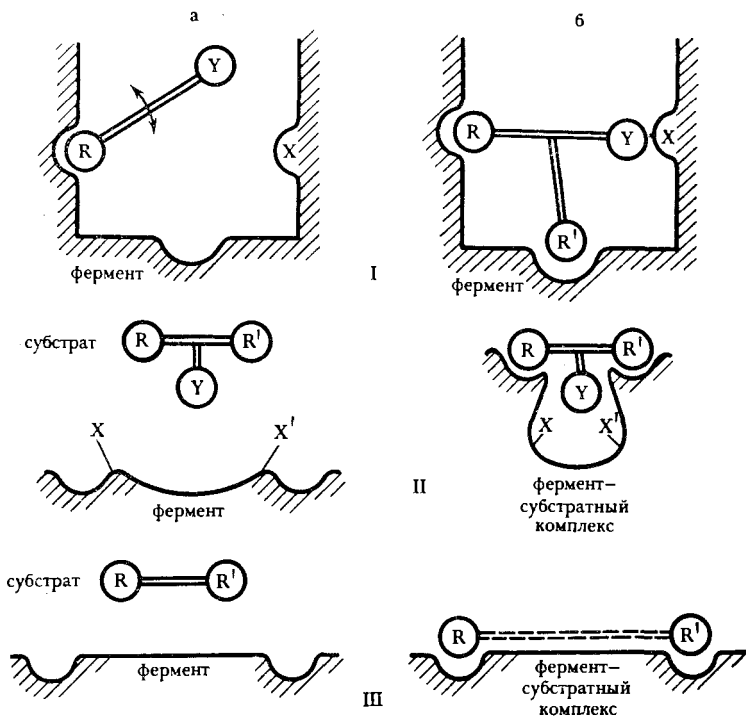


Рис. 17. Механизмы, которые могут объяснить постоянство суммарной свободной энергии сорбции при одновременном понижении свободной энергии активации химического превращения фермент-субстратного комплекса:

I — эффекты сближения и ориентации; II — механизм индуцированного соответствия; III — механизм «напряжения»

сближения и ориентации (и, следовательно, эффект ускорения реакции) останется тем же. Это означает, что по возможности большая часть потенциальной свободной энергии сорбции должна быть потрачена при образовании комплекса $XE \cdot RY$ на термодинамически невыгодное сближение и ориентацию реагирующих групп, чтобы не дать реализоваться ей в виде наблюдаемой на опыте свободной энергии связывания (ΔG_s).

Механизм, с помощью которого ферменты реализуют этот принцип, можно раскрыть в самом общем виде на модели (рис. 17, I). Пусть системе *a* присущи какие-то определенные значения величин ΔG_s и $\Delta G_{I, \text{внутр}}^{\ddagger}$ (характеризующих, соответственно, сорбцию группы R на ферменте и последующее химическое взаимодействие X и Y). Для другого субстрата (система *б*), содержащего в молекуле два фрагмента R и R', способных сорбироваться на ферменте, потенциальная свободная энергия сорбции в принципе должна быть термодинамически более благоприятной. С другой стороны, образование фермент-субстратного комплекса в этом случае явно сопряжено с гораздо большими

ограничениями как внешних, так и внутренних вращательных степеней свободы, чем в системе α . Поэтому (в условиях такой компенсации потенциальной свободной энергии сорбции и сопровождающих сорбцию потерей энтропии) может оказаться, что наблюдаемые значения ΔG_s , отражающие суммарный эффект (уравнение 2.31), примут для обеих моделей примерно одинаковые значения. Эти модели, однако, должны отличаться по свободной энергии активации последующего химического взаимодействия $X + Y$, протекающего в фермент-субстратном комплексе. В модели, изображенной на схеме a (рис. 17, I), образованию переходного состояния $X...Y$ должно предшествовать дальнейшее сближение и ориентация реагирующих центров X и Y , что потребует существенных затрат энтропии и внесет, соответственно, термодинамически невыгодный вклад в свободную энергию активации. В структуре усложненной модели (схема б), обладающей более высокой потенциальной свободной энергией сорбции $\Delta G_{s, \text{внутр}}$, реагирующие центры уже сближены, а возможно (в зависимости от более конкретных условий модели) и частично сориентированы. Следовательно, свободная энергия активации, характеризующая превращение фермент-субстратного комплекса $\Delta G_{i, \text{внутр}}^{\ddagger}$, будет в этом случае более благоприятной.

Подобного рода закономерности (а именно, увеличение потенциальной сорбционной способности субстрата не отражается на экспериментальном показателе сорбции, но последующая химическая реакция протекает быстрее) широко распространены в ферментативном катализе. Так, при изучении гидролиза центральной пептидной связи в серии синтетических субстратов под действием пепсина (табл. 10)

Таблица 10

Гидролиз пептидов пепсином [42]

Пептид	Константа Михаэлиса, $M \cdot 10^{-3}$	Константа скорости первого порядка, s^{-1}
N-Кбз-Gly-His-Phe-Phe-O-этил	0,80	2,43
N-Кбз-Gly-His-Phe-Trp-O-этил	0,23	0,51
N-Кбз-Gly-His-Trp-Phe-O-этил	0,18	0,31
N-Кбз-Gly-His-Phe-Tyr-O-этил	0,23	0,16
N-Кбз-Gly-His-Tyr-Phe-O-этил	0,68	0,13
N-Кбз-Gly-His-Tyr-Tyr-O-этил	0,24	0,0094
N-Кбз-Gly-His-Phe-Leu-O-этил	0,56	0,0025

было найдено, что каталитические константы скорости различаются в 1000 раз, хотя наблюдаемые константы Михаэлиса (пропорциональные K_s , а возможно, и равные константе диссоциации фермент-субстратного комплекса) различаются всего лишь в 4 раза. Другой пример — катализ α -химотрипсином (см. гл. IV).

К сожалению, трактовка таких результатов в рамках механизма сближения и ориентации не однозначна, поскольку объяснение можно дать и с помощью других теорий (см. следующий параграф).

§ 4. Механизмы напряжения и индуцированного соответствия

Согласно теории индуцированного соответствия, выдвинутой Кошландом мл. [43, 44], в свободном ферменте (в отсутствие субстрата) каталитически активные группы X и X' расположены так, что они не могут одновременно взаимодействовать с субстратным фрагментом Y (см. схему *a* на рис. 17, *II*). Энергетически менее предпочтительная, но каталитически активная конформация активного центра образуется лишь в фермент-субстратном комплексе (схема *b*). На образование ее тратится часть свободной энергии сорбции.

Авторы другой теории (Ламри и Эйринг [45, 46], Дженкс [29, 47]) полагают, что силы сорбции используются для создания напряжений (деформаций) в молекулах реагирующих компонентов, способствующих протеканию реакции. Если же активный центр фермента жесткий, то субстрат, чтобы он мог с ним связаться, должен претерпеть некоторую деформацию (см. рис. 17, *III*). При этом предполагается, что активный центр устроен так, что в результате деформации молекула субстрата активизируется (т. е. приобретает некоторые свойства, важные для образования переходного состояния реакции). В противном случае, когда жесткой является молекула субстрата, а конформационно лабилен фермент, схему катализа можно представить так же, как для механизма индуцированного соответствия (рис. 17, *II*). Легче всего представить индуцированное субстратом (или, в противном случае, белком) искажение конформации, которое включает сжатие (или растяжение) связей или изменение углов между связями. В общем случае, рассматривая строение молекулы субстрата или белка в более общем виде, под «напряжением структуры» можно понимать также и, например, десольватацию функциональных групп, принимающих участие в химической реакции.

В реальных системах ни субстрат, ни фермент не являются жесткими молекулами. Поэтому при связывании претерпевают конформационные изменения, как правило, молекулы обоих реагентов. Это означает, что провести четкую грань между различными механизмами катализа (рис. 17, *II* и *III*) не представляется возможным. Более того, даже обычный механизм ориентации реагирующих групп (см. § 3 этой главы) в ряде случаев можно трактовать как создание некоторых напряжений в структуре молекул реагентов. Поэтому, чтобы не дать себя дезориентировать изобилием предложенных теорий и механизмов (а также поправок и уточнений к ним), важно помнить, что отличие между ними состоит лишь в используемых терминах (таких как принудительная ориентация, индуцированное соответствие, механизм «дыбы», щелевой эффект и т. п.) и некоторых частных предпосылках о строении активного центра. Термодинамическая же сущность всех этих теорий одна: **потенциальная свободная энергия связывания (сорбции) субстрата на ферменте тратится на понижение барьера свободной энергии активации последующей химической реакции.**

Иллюстрацией такого рода механизмам могут служить реакции, катализируемые карбоксипептидазой А. Сближение и ориентация молекулы субстрата по отношению к каталитически активным группам

белка происходит при электростатическом взаимодействии свободной карбоксильной группы субстрата с гуанидиновой группировкой Arg-145 (см. схему на стр. 19). Связывание субстрата на ферменте влечет за собой нарушение системы водородных связей в белке и индуцирует поворот боковой группы Tug-248 с перемещением ее гидроксильной группы на 12 Å (ср. рис. 5 и 7). В результате между этой группой и амидным атомом азота квазисубстрата образуется водородная связь. Возникновение этой новой водородной связи должно существенно облегчить гидролиз пептидной связи, протекающий по механизму, который предложил Мильдван (см. схему на стр. 19). В этой же реакции связывание субстрата приводит к созданию некоторого «сольватационного напряжения» в ферменте. Так, в фермент-субстратном комплексе карбонильная группа субстратной молекулы оказывается вблизи иона цинка, входящего в активный центр (см. рис. 7). Это приводит к вытеснению из его сольватной оболочки нескольких молекул воды [23]; в результате ион цинка поляризует карбонильную группу субстрата, резко усиливая тем самым ее электрофильную реакционную способность (см. схему на стр. 19). Таким образом, в катализе карбоксипептидазой А наряду с основным механизмом сближения и ориентации играют не последнюю роль также и эффекты индуцированного соответствия и напряжения. Сочетание различных механизмов широко распространено и в других ферментативных реакциях.

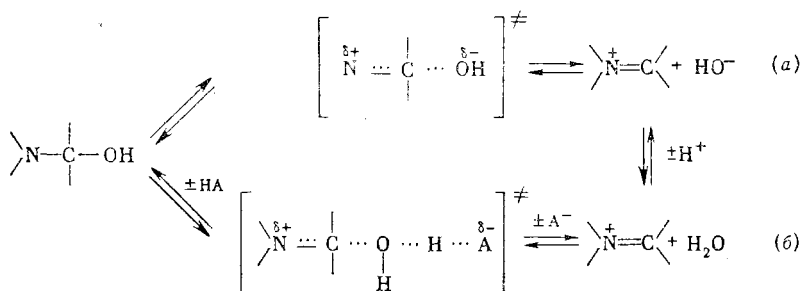
§ 5. Полифункциональный характер химических механизмов ферментативного катализа

Наряду с катализом за счет свободной энергии сорбции (см. § 1—4 этой главы) ферментативные реакции находят источник ускорения в том, что молекула субстрата подвергается химической атаке не одной каталитической группой (как это происходит в гомогенно-каталитических реакциях второго порядка), а сразу несколькими. Это связано с тем, что третичная структура белка позволяет сосредоточить в активном центре фермента значительное число электрофильных и нуклеофильных групп, таких как имидазольная, карбоксильная, сульфидрильная, аммонийная, фенольная и др. (см. гл. I), которые, как известно из гомогенного катализа, представляют собой общекислотные и общесосновные катализаторы*. Именно поэтому в промежуточных фермент-субстратных комплексах в принципе возможна атака сорбированной субстратной молекулы по механизмам общего кислотно-основного катализа.

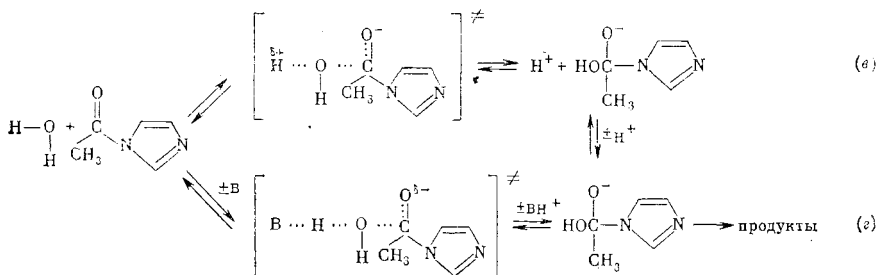
Попытаемся ответить на два вопроса: 1) какова сущность катализа по общекислотному и общесосновному механизмам вообще и 2) какие особенности сопровождают эти механизмы в ферментативных процессах в частности. Для ответа на первый вопрос проанализируем разли-

* Авторы полагают, что читатель знаком с основными положениями гомогенного катализа и прежде всего с механизмами катализа кислотно-основного [29, 48—51].

чия в механизме катализируемого и некаталитического путей на примере двух реакций. Первая — дегидратация карбиноламина:



Некаталитический путь (схема *a*) требует образования в качестве промежуточного продукта нестабильного (термодинамически неустойчивого) иона HO^- . Механизм общекислотного катализа (схема *b*) состоит в передаче протона из молекулы катализатора AH в прямом направлении реакции и в удалении протона сопряженным основанием катализатора в обратном направлении. Вторая реакция — гидролиз ацилимидазола — поддается катализу общими основаниями:

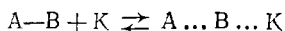


В некатализируемом процессе (*a*) в качестве промежуточного соединения должен образоваться свободный ион гидроксония; в механизме общесосновного катализа (*b*) катализатор B отрывает протон в прямом направлении реакции и сопряженная кислота катализатора присоединяет протон в обратном направлении.

Значительный вклад в свободную энергию активации некаталитических путей для той и другой реакций вносят энергетические затраты на образование термодинамически неустойчивых промежуточных соединений (ионов OH^- или, соответственно, H_3O^+). Так, Дженкс [29] полагает, что стандартные свободные энергии образования любой из этих промежуточных частиц равны 10 — 13 ккал/моль (42—54,6 кДж/моль) (при pH 7). В отличие от этого каталитические пути обеих реакций (будь это общекислотный в первой реакции или общесосновной катализ во второй) не требуют образования нестабильных промежуточных продуктов, поскольку участие общего кислотного

или, соответственно, общесосновного катализатора стабилизирует электронную конфигурацию переходного состояния (см. схемы а—г).

Механизм стабилизации имеет в данном случае много общего с широко распространенным [50] явлением активации субстрата (АВ) под действием катализатора (К) по типу:



Затрата свободной энергии на разрыв прочной связи А—В компенсируется (хотя бы частично) образованием новых связей между субстратом и катализатором (в переходном состоянии реакции). Подобного рода эффекты определяют, в общем, пути протекания многих некаталитических реакций, когда разрыв связи облегчается путем образования промежуточных соединений [52]. При этом чем больше энергия образующейся связи, тем больше понижается энергия активации (табл. 11).

Таблица 11

Понижение энергии активации газофазных реакций, где разрыв прочной связи сопровождается образованием новых связей (в промежуточных соединениях) [52]

Реакция	Разрываемая связь	Энергия активации, ккал/моль
$H_2 \rightarrow 2H \cdot$	H—H	104
$H_2 + I_2 \rightarrow 2HI$	H—H	41
$H_2 + Cl \cdot \rightarrow H \cdot + HCl$	H—H	5
$Cl_2 \rightarrow 2Cl \cdot$	Cl—Cl	58
$Cl_2 + H \cdot \rightarrow HCl + Cl \cdot$	Cl—Cl	2,5

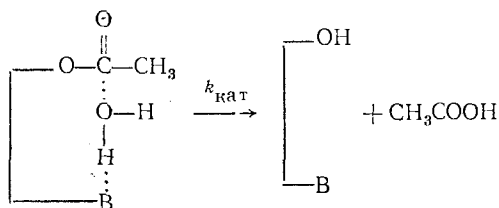
Иными словами, сущность общего кислотно-основного катализа сводится к стабилизации переходного состояния реакции за счет более благоприятного распределения электронов между разрываемыми и образующимися связями. Если это так, то катализируемую реакцию должно было бы сопровождать прежде всего понижение энтальпии активации [53]. Действительно, для целого ряда гидролитических реакций было найдено, что увеличение кинетического порядка на единицу (т. е. введение либо общесосновного, либо общекислотного катализатора) приводит к понижению наблюдаемой энтальпии активации на 3—6 ккал/моль (12,6—25,2 кДж/моль) [49] (см. также гл. III). Это должно, казалось бы, привести к ускорениям катализируемых реакций в 10^2 — 10^4 раз.

С другой стороны, энтропия активации каталитической реакции должна быть термодинамически менее благоприятной, поскольку в нее дополнительно войдут потери поступательных, а частично вращательных степеней свободы молекулы общекислотного (или общесосновного) катализатора, а также, возможно, и энтропийные затраты, обусловленные увеличением жесткости структуры переходного состояния в целом*. Действительно, для гидролитических реакций было найде-

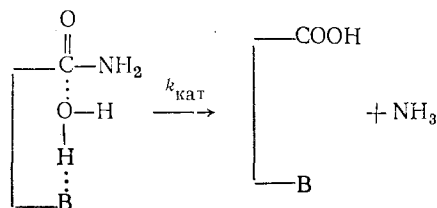
* В общем случае, конечно, для реакций в растворе следует ожидать также и существенных сольватационных эффектов и поэтому суммарная термодинамическая картина может быть еще более сложной.

но, что более благоприятная энтальпия активации обшечислотного или общесосновного катализа почти полностью компенсируется неблагоприятным для реакции изменением энтропии активации [49] (см. также гл. III). В сумме обоих эффектов каталитические реакции обнаруживают по свободным энергиям активации лишь незначительное преимущество перед соответствующими некатализируемыми процессами.

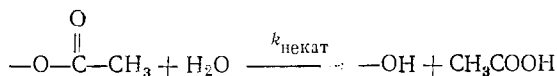
Неблагоприятных энтропийных затрат, свойственных межмолекулярным взаимодействиям высокого кинетического порядка, можно избежать (хотя бы частично), если реакционные компоненты включить уже в исходном состоянии реакции в состав одной молекулы (за счет эффектов сближения и ориентации; см. § 3 этой главы). В качестве примера рассмотрим внутримолекулярный общесосновной катализ гидролиза сложноэфирной:



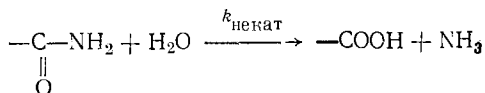
или амидной связей:



Для оценки эффективности внутримолекулярного общесосновного катализа сравним константы скорости $k_{\text{кат}}$ с аналогичными кинетическими показателями для реакции с участием сложного эфира:



или амида:



не содержащих в молекуле каталитической группы В. В зависимости от природы общесосновного катализатора В отношение $k_{\text{кат}}/k_{\text{некат}}$ принимает значения: ~ 200 для карбоксильного аниона, ~ 1000 для нейтрального имидазола или же около 800 в случае гидроксильной группы (см. гл. III). Проведенная оценка показывает, что эффект уско-

рения за счет общесосновного катализа может быть значительным, если катализатор действует внутримолекулярно (и, следовательно, в значительной мере отсутствуют неблагоприятные потери энтропии, которых иначе следовало бы ожидать при торможении хотя бы поступательного движения молекулы катализатора перед тем, как включить ее в переходное состояние реакции).

Аналогичная ситуация реализуется, по-видимому, также и в ферментативных реакциях. Взаимодействие с субстратом одной функциональной группы белка может быть усилено за счет участия в реакции какой-либо другой, рядом расположенной группы нуклеофильного или электрофильного характера. Так, например, при гидролизе пептидной связи на активном центре карбоксипептидазы А (см. схему на стр. 19) нуклеофильная атака молекулой воды усилена за счет общесосновного катализа со стороны карбоксильной группы остатка Glu-270 (а возможно и под действием гидроксильной группы остатка Tug-248). Общекислотный катализ осуществляет, по-видимому, Tug-248. Кроме того, расщепление пептидной связи субстрата может быть существенно облегчено в результате электрофильной атаки атомом Zn.

Другой пример — реакция, катализируемые папианом (см. схему на стр. 19). Нуклеофильная атака карбонильной группы субстрата остатком Cys-25 усилена за счет общесосновного катализа со стороны His-159 и общекислотным катализом под действием Gln-19.

Как видно из этих примеров, в принципе возможны два механизма, по которым две функциональные группы фермента взаимодействуют с субстратом: 1) обе группы обладают однотипной природой, например, нуклеофильной (Nu),



2) или же разнотипной, когда, например, нуклеофильная атака усилена действием электрофила (El):



При участии большего числа нуклеофильных и электрофильных групп возможно большее число их комбинаций. Это разнообразие частных механизмов породило многочисленные теории катализа, которые, однако, отличаются лишь используемыми терминами, как, например: «эстафетная передача заряда» [23] (для механизма d), «пушпульное» взаимодействие (или же принцип «тяни-толкай») [29, 49, 60] (для механизма e), «цепь переноса заряда (или связи)» [50]. Термодинамическая же сущность всех этих механизмов одна: они стабилизируют переходное состояние реакции за счет более благоприятного распределения электронов между разрывающимися и образующимися связями.

В настоящее время трудно указать ферментативную реакцию, в механизме которой участие общесосновного или общекислотного катализа строго доказано. Нельзя считать законченными даже исследования столь хорошо изученных сериновых протеаз, в частности α-химотрип-

сина (см. гл. IV). Для огромного числа ферментативных процессов механизм согласованного кислотно-основного катализа остается при отсутствии полного экспериментального подтверждения всего лишь привлекательной, хотя и разумной гипотезой [29, 48, 49]. Сейчас именно сюда направлены основные усилия физико-химиков, работающих в области ферментативного (или внутримолекулярного) катализа.

Нерешен также и вопрос о ковалентном катализе. В ряде ферментативных реакций образуются промежуточные соединения с ковалентной связью между ферментом и субстратом [29, 48, 49]. В качестве примера можно указать на протеазы, где в ходе ферментативной реакции образуется ацилфермент (см. гл. IV). Трудно сказать, почему реакция не протекает прямо, а идет через образование промежуточного соединения с ферментом (или коферментом). В этом отношении Дженкс [29] указал, что «именно здесь могут быть заложены важные химические закономерности ферментативного катализа, которые в настоящее время почти или вообще не поняты». Не исключено, однако, что причина простая, а именно, что в ковалентно-связанном промежуточном соединении легче, чем в сорбционном фермент-субстратном комплексе, реализуются различного рода механизмы напряжения, которые позволяют использовать свободную энергию сорбции «химически инертных» субстратных фрагментов на ферменте на понижение активационного барьера скоростьюлимитирующей химической стадии (см. § 4 этой главы). Возможно, наличие промежуточных соединений в ферментативных механизмах отражает лишь сложную картину участия в реакции большого числа функциональных групп, многие из которых вообще склонны образовывать метастабильные продукты (как, например, имидазольная группа [29]). Иными словами, образование промежуточных соединений хотя и сопровождает ферментативный катализ, но, возможно, не имеет прямого отношения к наблюдаемым ускорениям.

Ясно одно, что по аналогии с эффектами, обнаруженными во «внутримолекулярных» неферментативных реакциях, включение в переходное состояние дополнительной функциональной группы, действующей по механизму общесосновного (или общекислотного) катализа, в принципе может ускорить реакцию в сотни или даже тысячи раз. Существуют по крайней мере две причины, в силу которых эффекты общего кислотно-основного катализа могут оказаться в ферментативных системах еще более действенными, чем в неферментативных внутримолекулярных реакциях.

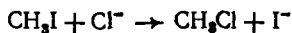
1. В активных центрах ферментов в рамках относительно жесткой третичной структуры белка взаимодействующие функциональные группы уже в исходном состоянии реакции в гораздо большей степени сближены и сориентированы, чем в большинстве неферментативных внутримолекулярных процессов

2. Аполярная (в частности, дегидратированная) микросреда некоторых активных центров должна способствовать десольватации (хотя бы частичной) электрофильных и нуклеофильных центров, что усиливает их взаимодействие (см. следующий параграф).

§ 6. Эффекты микросреды. Внутренняя реакционная способность функциональных групп белка

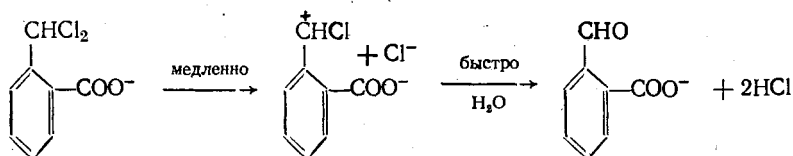
Известно, что реакционная среда может оказывать существенное влияние на скорость химического взаимодействия [54—56]. Например, скорость нуклеофильного замещения с участием анионов резко воз-

растает в органическом растворителе по сравнению с водой [57, 58]. Так, константа скорости второго порядка реакции



принимает в различных растворителях следующие значения ($\text{M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$): $3 \cdot 10^{-6}$ (вода); $3 \cdot 10^{-6}$ (метанол); $5 \cdot 10^{-5}$ (формамид); $2 \cdot 10^{-4}$ (метилформамид); 2,5 (диметилформамид); 8 (диметилацетамид). Наблюдаемое ускорение более чем в 10^6 раз связано с десольватацией ионного реагента в апротонном растворителе. По аналогичным причинам (десольватация электрофильных и нуклеофильных центров) общий кислотно-основной катализ легче протекает в органических растворителях, чем в воде [54—56, 59, 60] (см. также гл. III).

Среда может оказывать также существенное влияние на различного рода электростатические взаимодействия между реагентами. Так, например, для реакции типа



отношение наблюдаемых констант скоростей, измеренных для *орто*- и *пара*-изомеров, возрастает примерно в 100 раз в 50%-ном диоксане по сравнению с водой [61]. Наблюдаемый эффект обусловлен электростатической стабилизацией промежуточно образующегося катиона под действием рядом расположенной карбоксильной группы (возможно, в переходном состоянии). Электростатическому взаимодействию должно способствовать понижение диэлектрической проницаемости среды при переходе от воды к водно-органическому растворителю. Это и наблюдается на опыте в виде ускорения реакции.

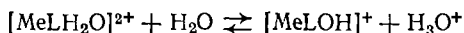
Подобного рода эффекты возможны также и в ферментативных реакциях, поскольку микросреда активного центра многих ферментов обнаруживает по своей полярности или диэлектрической проницаемости свойства скорее органических растворителей, чем воды (см. гл. I). По аналогии с эффектами, наблюдаемыми в неферментативных реакциях, десольватация реагирующих групп в активных центрах ферментов может дать ускорение более чем в 10^6 раз [29] (если сравнивать ферментативный процесс с гомогенно-каталитической реакцией, идущей в воде). В литературе пока не описаны системы, для которых было бы строго доказано участие сольватационных эффектов или электростатической стабилизации в ферментативном катализе.

Можно лишь указать, что в ряде случаев ионизирующиеся группы активного центра, которые при действии фермента несут функциональную нагрузку, действительно имеют необычную величину pK_a (табл. 12). Безусловно, большую роль здесь играют эффекты микросреды.

Эффективные значения pK_a для некоторых функциональных групп [23]

Функциональные группы	pK_a
Дистальная карбонильная группа:	
глутаминовая кислота	4,2—4,5
Glu-35 в лизоциме	6,3
Glu-270 в карбоксипептидазе	7,2
Гидроксильная группа:	
тирозин	9,7—10,1
Tyr-248 в карбоксипептидазе	7,9
Имидазольная группа:	
гистидин	6,7—7,1
His-67 в карбоксипептидазе	9,1
His-159 в паллаине	4,2
His-12 в рибонуклеазе	5,8
His-119 в рибонуклеазе	6,2

Другой пример — эффективные значения pK_a молекулы воды, встроенной в металлосодержащий (Me) комплекс:



которые существенно зависят от природы лиганда L [62]. В этом отношении весьма показательны данные для комплексов Co^{2+} с 2,2',2''-триаминотриэтиламинол и его N-метилированным производным 2,2',2''-три (N,N-диметил)триэтиламинол. В первом случае молекула воды, входящая в координационную сферу металла, расположена рядом с гидрофильными первичными аминогруппами, в то время как в присутствии метилированного лиганда она находится в окружении гидрофобных метильных групп. Это приводит к наблюдаемому сдвигу pK_a с 10,2 до 8,8. Аналогичная ситуация реализуется, по-видимому, также и в активных центрах ферментов за счет гидрофобного окружения связанной воды углеводородными боковыми группами аминокислотных остатков. Так, в активном центре карбоангидразы (осуществляющей гидратацию двуокиси углерода) наблюдаемое значение pK_a для молекулы H_2O , связанной с ионом Co (II) или Zn (II), лежит в пределах 7—8, что на 2 единицы меньше, чем при протолизе комплексов $[Zn(H_2O)_6]^{2+}$ или $[Co(H_2O)_6]^{2+}$ [62].

§ 7. Заключение

Так, структурные особенности поверхностного слоя белковых глобул позволяют сосредоточить в активном центре большое число различных по химической природе функциональных групп, способных не только сорбировать молекулу субстрата, но также и взаимодействовать с ней химически (см. гл. I). Среда активного центра обладает высокоразвитой **микрорегетерогенностью**, где гидрофобные участки с исключительно низкой диэлектрической проницаемостью и полярностью (по сравнению с водой) чередуются с сильно гидратированными полярными областями с высоким электростатическим потенциалом и т. д. Поверхностный слой характеризуется также и повышенной микровязкостью. Все эти эффекты способствуют в конечном итоге **многоцентровому** взаимодействию фермента (его активного центра) с молекулой субстрата.

Наиболее существенными представляются три причины ускорений ферментативных реакций (по сравнению с гомогенно-каталитическим процессами):

1) сорбционные взаимодействия с белком боковых субстратных групп обеспечивают ускорение реакции порядка 10^7 раз и более (§ 1—4 этой главы);

2) полифункциональный катализ (типа общего кислотного-основного катализа) вполне может привести к ускорениям, превышающим величину 10^3 (см. § 5 этой главы);

3) весьма существенное влияние на ферментативную реакцию (изменение скоростей на несколько десятичных порядков) могут оказать также и эффекты микросреды активного центра (§ 6 этой главы).

В целом на основании этих физико-химических механизмов можно ожидать суммарных эффектов ускорения более чем в 10^{10} раз. Как видно, это вполне покрывает тот масштаб ускорений, который отличает ферментативный катализ от механизмов гомогенно-каталитического типа (см. гл. I).

ЛИТЕРАТУРА К ГЛ. II

1. Уэбб Л. Ингибиторы ферментов и метаболизма. М., «Мир», 1966.
2. Мосолов В. В. Протеолитические ферменты. М., «Наука», 1971.
3. Steitz T. A., Henderson R., Blow D. M. J. Mol. Biol., **46**, 337 (1969).
4. Березин И. В., Мартинек К. Журн. всеос. хим. общ-ва им. Д. И. Менделеева, **16**, 411 (1971).
5. Глессстон С., Лейдлер К., Эйринг Г. Теория абсолютных скоростей реакций. М., ИЛ, 1948.
6. van der Groen G., Wouters-Leysen J., Yde M., De Bruyne C. K. Eur. J. Biochem., **38**, 122 (1973).
7. Тафт Р. В. В кн.: «Пространственные эффекты в органической химии». М., ИЛ, 1960.
8. Berezin I. V., Kazanskaya N. F., Klyosov A. A., Martinek K. FEBS Lett., **15**, 125 (1971).
9. Sanborn V. M., Hein G. E. Biochemistry, **7**, 3616 (1968).
10. Кабачник М. И. и др. Усп. химии, **39**, 1050 (1970).
11. Schlomowitz M., Shaw A., Jackson W. T. J. Biol. Chem., **243**, 2821 (1968).
12. Mitsuda H., Yasumoto K., Yamamoto A. Arch. Biochem. Biophys., **118**, 664 (1967).
13. Jefcoate C., Gaylor J., Calabrese R. Biochemistry, **8**, 3455 (1969).
14. Suzue G., Marcel Y. L. J. Biol. Chem., **247**, 6781 (1972).
15. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М., «Мир», 1966.
16. Барман Т. Е. Enzyme Handbook. Berlin — Heidelberg — New York, Springer Verlag, 1969.
17. Lipscomb W. N. Tetrahedron, **30**, 1725 (1974).
18. Laskowski M., Scheraga H. A. J. Amer. Chem. Soc., **76**, 6305 (1954).
19. Steinberg I., Scheraga H. A. J. Biol. Chem., **238**, 172 (1963).
20. Page M. I., Jencks W. P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **68**, 1678 (1971).
21. Jencks W. P., Page M. I. Biochem. Biophys. Res. Commun., **57**, 887 (1974).

22. Филлипс Д. В. сб.: «Молекулы и клетки». Вып. 3. М., «Мир», 1968.
23. Blow D. M., Steitz T. A. *Ann. Rev. Biochem.*, **39**, 63 (1970).
24. Ленинджер А. Биохимия. М., «Мир», 1974.
25. Matta M. S., Staley D. D. *J. Biol. Chem.*, **249**, 732 (1974).
26. Drenth J., Sluyster man L. A. *Proc. Kon. Ned. Akad. v. Wetensch.*, **C78**, 104 (1975).
27. Akhtar M., Wilton D. C. *Ann. Repts. Progr. Chem.*, **B68**, 167 (1972).
28. Phillip M., Bender M. L. *Nature — New Biology*, **241**, 44 (1973).
29. Дженкс В. Катализ в химии и энзимологии. М., «Мир», 1972.
30. Larsen J. W. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **50**, 839 (1973).
31. Cook D. B., Mc Kenna J. *J. Chem. Soc. — Perkin II*, **1974**, 1223.
32. Bruice T. C., Brown A., Harris D. O. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **68**, 658 (1971).
33. Bruice T. C. *Nature*, **237**, 335 (1972).
34. Сапон В. *J. Chem. Soc.*, **B 1971**, 1207.
35. Milstein S., Cohen L. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **67**, 1143 (1970); *J. Amer. Chem. Soc.* **94**, 9158 (1972).
36. Storm D. R., Koshland D. E., Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **66**, 445 (1970); *J. Amer. Chem. Soc.*, **94**, 5805 (1972); **94**, 5815 (1972).
37. Dafforn G. A., Koshland D. E. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**, 2463 (1971); *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **52**, 779 (1973).
38. Delisi C., Crothers D. M. *Biopolymers*, **12**, 1689 (1973).
39. Koshland D., Jr. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **47**, Suppl. 1, 217 (1956).
40. Koshland D. E., Jr. *J. Theoret. Biol.*, **2**, 75 (1962).
41. Hoare D. G. *Nature*, **236**, 437 (1972).
42. Иноуэ К., Fruton J. S. *Biochemistry*, **6**, 1765 (1967).
43. Koshland D. E., Jr. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **44**, 98 (1958); *Advan. Enzymol.*, **22**, 45 (1960).
44. Koshland D. E., Jr., Neet K. E. *Ann. Rev. Biochem.*, **37**, 359 (1968).
45. Lumry R. In «The Enzymes» (P. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck, eds.). V. 1. New York, Acad. Press, 1959.
46. Ламри Р., Бильтонен Р. В сб.: «Структура и стабильность биологических макромолекул». М., «Мир», 1973.
47. Jencks W. P. In «Current Aspects of Biochemical Energetics» (Kaplan N. O., Kennedy E. P., eds.). New York, Acad. Press Inc., 1966.
48. Bender M. L. *Mechanisms of Homogeneous Catalysis from Protons to Proteins*. New York — Toronto, Wiley Interscience, 1971.
49. Брюс Т., Бенкович С. Механизмы биоорганических реакций. М., «Мир», 1970.
50. Полторако О. М., Чухрай Е. С. Физико-химические основы ферментативного катализа. М., «Высшая школа», 1971.
51. Ашмор П. Катализ и ингибирование химических реакций. М., «Мир», 1966.
52. Hammes G. G. *Nature*, **204**, 342 (1964).
53. Niemann C. *Science*, **143**, 1287 (1964).
54. Энтелис С. Г., Тигер Р. П. Кинетика реакций в жидкой фазе. Количественный учет влияния среды. М., «Химия», 1973.
55. Амиэ Э. Влияние растворителя на скорость и механизм химических реакций. М., «Мир», 1968.
56. Райхардт Х. Растворители в органической химии. Л., «Химия», 1973.
57. Паркер А. Усп. хим., **32**, 1270 (1961).
58. Parker A. J. *Adv. Phys. Org. Chem.*, **5**, 173 (1967).
59. Rogers G. A., Bruice T. C. *J. Amer. Chem. Soc.*, **96**, 2473 (1974).
60. Swain C. G., Brown T. F. *J. Amer. Chem. Soc.*, **74**, 2534, 2538 (1952).
61. Vitullo V. P., Grossman N. E. *J. Org. Chem.*, **38**, 179 (1973).
62. Coates J. H., Gentle G., J., Lincoln S. F. *Nature*, **249**, 773 (1973).

МОДЕЛИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА

Оловянная мышь может быть удовлетворительной моделью живой мыши, если только не обращать внимания на то, что одна состоит из олова, а другая — из белка.

У. Р. Эшби. «Введение в кибернетику». М., ИЛ, 1959.

Переходя к рассмотрению систем, моделирующих действие ферментов, в первую очередь уясним, что нужно понимать под моделью и какие проблемы могут быть решены с помощью моделирования. Понятие «модель» имеет вполне строгое формально-логическое определение, сущность которого сводится к тому, что между моделью и объектом моделирования может быть установлено некоторое взаимно однозначное соответствие [1, 2]. Это соответствие может быть самого общего порядка. Например, Эшби [2] ставит следующую задачу: «До какой степени Гибралтарская скала является моделью мозга?» Ответ, совершенно точный, гласит, что Гибралтарская скала является моделью мозга в том отношении, что «она существует, как и мозг» [2]. Однако моделирование такого типа, хоть и вполне корректно, вызывает все же некоторое неудовлетворение. Здесь уместно обратиться ко второму поставленному вопросу: для чего нужна модель? Для того, чтобы исследовать на ней какие-то свойства моделируемого объекта, которые в силу его сложности или других причин не могут или пока не могут быть изучены непосредственно на самом объекте. Свойства эти, как правило, гипотетического характера и поэтому моделирование часто используют как способ проверки гипотез. Ясно, что чем точнее будет модель, тем с большей уверенностью можно будет переносить полученные с ее помощью результаты на сам моделируемый объект. Однако здесь, как и во многих других случаях, необходима «золотая середина»: слишком общая модель мало информативна, но слишком точная модель будет также сложна, как и сам объект, и тоже принесет мало пользы. Напрашивается естественный вывод: хорошая модель должна точно соответствовать объекту лишь в существенных свойствах. Какие же свойства ферментов следует признать существенными и, следовательно, стараться отразить в соответствующих моделях?

Важную роль в понимании природы ферментативного катализа сыграло (и продолжает играть) изучение механизмов органического катализа, а также катализа ионами и комплексами металлов. Это связано с тем, что в активные центры ферментов входят боковые группы аминокислот, такие как имидазольная, карбоксильная, гидроксильная, или аминогруппа, либо ионы металлов (Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} и др.), координационно связанные с этими группами. Поэтому еще в первых работах по моделированию ферментативного катализа возникло естественное стремление выяснить, могут ли эти группы, точнее простые молекулы, в состав которых они входят, или ионы и их простые комплексы сами ката

лизировать те же или похожие реакции, что и ферменты? Выяснилось, что во многих случаях это возможно (см., например, [3—6]), однако активность таких простых катализаторов всегда оказывается на много порядков ниже, чем ферментов.

Современному понятию «модель фермента» вполне отвечают лишь более сложные системы, позволяющие исследовать факторы, усиливающие реакционную способность отдельных функциональных групп. Среди факторов, привлекаемых для объяснения этого усиления, наибольшее предпочтение отдается эффектам сближения, ориентации и напряжения, а также полифункциональности и влияния соседних групп типа систем с «эстафетной передачей заряда». Исследованию этих эффектов на модельных системах и будет посвящена данная глава. Рассмотренные в ней примеры, разумеется, охватывают лишь малую часть всего, что сделано в этой области, и отобраны главным образом из соображений наглядности и новизны.

Исследования многих систем, изучавшихся вначале лишь как модельные, со временем выделились в самостоятельные разделы химии. Так произошло с внутримолекулярными реакциями, катализом полимерами и мицеллами поверхностно-активных веществ.

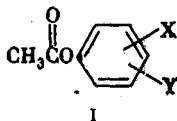
И, наконец, обратим внимание еще на один аспект моделирования, имеющий важное прикладное значение, — это создание высокоактивных и высокоспецифичных катализаторов, действующих по принципам ферментативного катализа. В настоящее время, однако, в этом направлении делаются лишь первые шаги, по которым трудно судить о реальных перспективах в этой области. В качестве примера можно указать на успехи в моделировании нитрогеназы — фермента, катализирующего реакцию восстановления молекулярного азота [7, 8]. Не исключено, что с помощью систем, моделирующих нитрогеназу, можно будет решить важную прикладную задачу — фиксацию азота в мягких условиях.

§ 1. Стабилизация переходного состояния реакции за счет дополнительных нековалентных взаимодействий между реагентами

Важная роль в ферментативном катализе отведена сорбции на активном центре боковых фрагментов субстратной молекулы, не претерпевающих в ходе реакции никаких химических изменений. Теоретический анализ двухцентрковой модели химического взаимодействия, приведенный в гл. II, показал, что кинетическая роль подобного комплексообразования реагентов сводится фактически к стабилизации переходного состояния реакции и, тем самым, к понижению свободной энергии активации катализируемой реакции. В этом параграфе будут рассмотрены кинетические показатели некоторых неферментативных моделей, на примере которых удобно проиллюстрировать то, что реализация дополнительных взаимодействий реагентов за счет их боковых «химически инертных» групп действительно приводит к ускорению реакции. Это взаимодействие (типа E·R, см. схему 2.10) может быть электростатическим или гидрофобным, а также протекать с образова-

нием водородной связи или комплекса с переносом заряда и т. п. Природа сил, обеспечивающих такого рода взаимодействия, в данной книге рассматриваться не будет, подробнее см. [5, 9]. Основное внимание будет уделено кинетическим проявлениям взаимодействий того или иного типа в реакциях второго порядка.

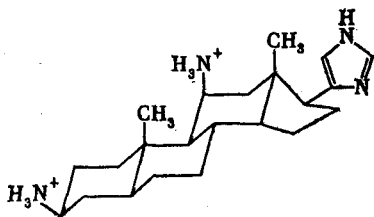
Электростатическое взаимодействие. Эффекты, обусловленные электростатическим взаимодействием боковых групп в молекулах реагентов, удобно рассмотреть на примере гидролиза сложных эфиров следующего строения:



где

	а	б	в	г	д	е	ж
X	H	H	2-NO ₂	3-COO ⁻	4-COO ⁻	4-SO ₃ ⁻	4-N(CH ₃) ₃ ⁺
Y	4-NO ₂	3-NO ₂	4-NO ₂	6-NO ₂	6-NO ₂	6-NO ₂	6-NO ₂

протекающего по механизму нуклеофильного замещения с участием имидазолсодержащего положительно заряженного стероида [10]:



В качестве реакции сравнения, в которой гидролиз сложного эфира (I) проходил бы по тому же механизму, но без дополнительных нековалентных взаимодействий со стероидным фрагментом нуклеофила, выбрана реакция соединений (I, а—ж) со свободным имидазолом. Для незаряженных эфиров (I, а—в) логарифм константы скорости взаимодействия с нуклеофилом (II) $\lg k_{II}$ прямо пропорционален логарифму константы скорости взаимодействия с имидазолом $\lg k_{Im}$ (рис. 18). Соединения (I, г—е) реагируют несколько быстрее за счет электростатического взаимодействия разноименных зарядов в молекулах реагентов. Это проявляется положительным отклонением величины $\lg k_{II}$ от нормировочной прямой, полученной для незаряженных эфиров (рис. 18). В противоположность этому соединение (I, ж) обнаруживает отрицательное отклонение из-за отталкивания одноименных зарядов в молекулах реагентов.

Кинетический эффект, обусловленный дополнительным электростатическим взаимодействием между молекулами реагентов, исчезает при повышении ионной силы раствора. На это указывает то, что при

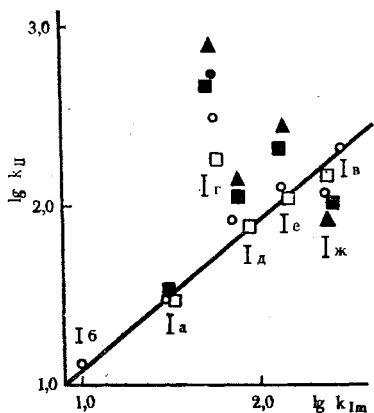
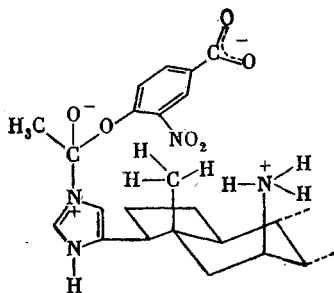


Рис. 18. Логарифмическая зависимость между константами скорости взаимодействия феноловых эфиров (I, α — κ) со стероидом (II) k_{II} и имидазолом k_{Im} [10]; если ионная сила (M KCl):

□ — 0,94; ○ — 0,10; ■ — 0,014; ● — 0,0054; ▲ — 0 (экстраполировано)

поля, обеспечивающие более сильное притяжение ионов.

Интерес вызывает специфичность реакций, катализируемых основанием (II). Для эфира (I, δ), отличающегося от наиболее оптимального субстрата (I, ϵ) только лишь расположением карбоксильной группы, наблюдаемый эффект ускорения значительно ниже — всего в два раза (рис. 18). Это связано с тем, что электростатическое взаимодействие $-\text{COO}^-$ и $-\text{NH}_3^+$ групп в случае (I, δ) [переходное состояние (III)] затруднено:

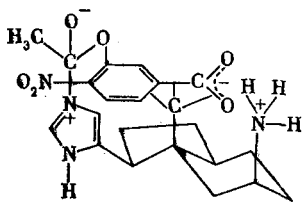


III

Напротив, в случае (I, ϵ) имеются благоприятные условия для их тесного контакта [переходное состояние (IV)]:

высокой ионной силе значения $\lg k_{II}$ попадают для большинства эфиров на прямую $\lg k_{II} - \lg k_{Im}$, проведенную для незаряженных эфиров (рис. 18).

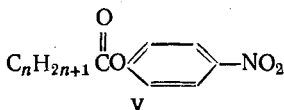
Максимальный эффект ускорения, наблюдаемый для сложного эфира (I, ϵ), достигает 15 раз (при экстраполяции k_{II} на нулевую ионную силу, рис. 18). Это соответствует понижению свободной энергии активации реакции примерно на 1,5—2 ккал/моль (6,3—8,4 кДж/моль), что, по-видимому, представляет собой максимальное значение, которое можно ожидать для реакций с участием одних низкомолекулярных веществ [5]. Значительно большие электростатические эффекты наблюдаются для макромолекулярных систем: полимеров и мицелл (см. § 4 и 6 этой главы), где существуют сильные электростатические



IV

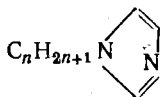
Электростатические взаимодействия в реакциях между низкомолекулярными веществами широко распространены [5, 11].

Гидрофобные взаимодействия. Рассмотрим кинетику гидролиза *n*-нитрофениловых эфиров



V

под действием *N*-алкилимидазолов



VI

где *n* изменяется от 1 до 10. Для всех изученных пар реагентов [12] реакция обнаруживает первый порядок как по сложному эфиру, так и по нуклеофилу, что указывает на отсутствие эффектов мицеллообразования.

При анализе значений наблюдаемых констант скорости второго порядка k_2 следует иметь в виду в принципе два возможных эффекта, вызываемых увеличением длины (*n*) алифатических групп в молекулах реагентов: возрастание стерических препятствий, тормозящих реакцию, и, с другой стороны, возрастание свободной энергии гидрофобного взаимодействия реагентов, приводящего к стабилизации переходного состояния реакции и тем самым к ее ускорению. В нуклеофиле (VI) алкильный заместитель отделен от реакционного центра имидазольным кольцом. Поэтому при увеличении *n* в имидазолах (VI) стерические эффекты должны быть выражены в гораздо меньшей степени, чем для сложных эфиров (V), где заместитель расположен непосредственно у атакующего карбонильного атома углерода. Следовательно, можно допустить в первом приближении, что стерические эффекты зависят только от свойств эфира. И если принять, наконец, что стерический эффект торможения реакции алкильным заместителем в ацильной группе вносит одинаковый вклад как в щелочной, так и в катализируемый имидазолами (VI) гидролиз, то необходимая поправка может быть внесена простым делением величин k_2 на соответствующее для данного сложного эфира (V) значение константы скорости щелочного гидролиза k_{OH} .

Зависимость $\lg(k_2/k_{OH})$ от числа углеродных атомов n в ацильной части сложного эфира (V) [при различных значениях числа углеродных атомов в алкильном заместителе в имидазолах (VI)] представлена на рис. 19. При значениях $n < 5-6$ величина k_2/k_{OH} слабо зависит от n при изменении длины углеводородных цепей как в том, так и другом реагенте. Это может быть связано с тем, что при образовании переходного состояния реакции имидазольное кольцо и сложноэфирная группа должны быть взаимно расположены таким образом, что короткие алкильные цепи реагентов просто не могут дотянуться друг до друга. При больших значениях n контакт цепей становится возможным и их взаимодействие приводит к значительному ускорению реакции. Система симметрична в том смысле, что увеличение n как в сложном эфире, так и в нуклеофиле (VI) приводит к одинаковому возрастанию скорости. В среднем введение каждой метиленовой группы (свыше первых 5—6) приводит к ускорению реакции в 2,5 раза. Это отвечает понижению свободной энергии активации реакции на 550 кал/моль (2,3 кДж/моль) на каждую метиленовую группу, что представляет собой величину, типичную для гидрофобных взаимодействий углеводов [5, 9, 13].

При взаимодействии реагентов с наиболее длинными алкильными цепями (n -нитрофенилдеканоат и N -децилимидазол) в скорости реакции проявляется 6 углеродных атомов из каждой цепи (рис. 19). Максимальный эффект ускорения в этом случае составляет 600—800 раз, что соответствует понижению свободной энергии активации примерно на 4 ккал/моль (16,8 кДж/моль).

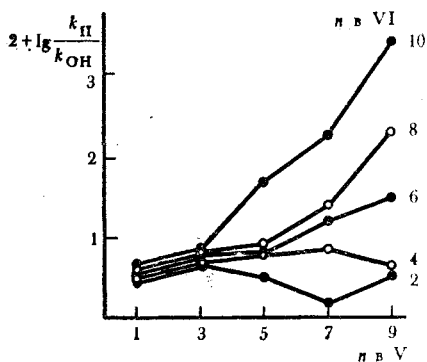


Рис. 19. Зависимость скорости взаимодействия N -алкилимидазолов (VI) с n -нитрофениловыми эфирами алифатических карбоновых кислот (V), отнесенной к скорости их щелочного гидролиза, от числа углеродных атомов n в n -алифатических цепях реагентов [12]

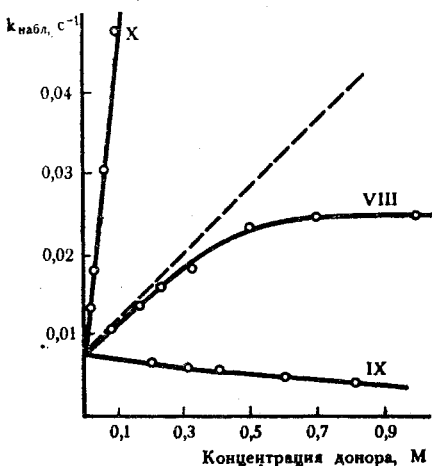
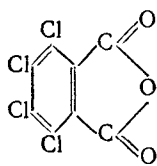


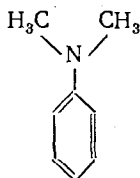
Рис. 20. Зависимость наблюдаемой константы скорости сольволиза тетрахлорфталевого ангидрида (VII) в метаноле от концентрации N,N -диметиланилина (VIII), n -диметоксисбензола (IX) и пиридина (X) [15]

Еще одним примером системы, полностью аналогичной только что рассмотренной, может служить аминолиз тех же *p*-нитрофениловых эфиров (V) длинноцепочечными алифатическими аминами, изученный в работе [14]. Масштабы и природа эффектов, наблюдаемых в обеих системах, одинаковы. Другие примеры ускорения реакций за счет гидрофобных взаимодействий, приводящих к концентрированию реагентов, будут рассмотрены в разделах, посвященных катализу полимерами и мицеллами.

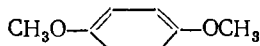
Комплексы с переносом заряда. Влияние образования комплекса с переносом заряда (КПЗ) на кинетику реакций в растворе можно проиллюстрировать на примере сольволиза тетрахлорфталевого ангидрида (VII) в метаноле в присутствии *N,N*-диметиланилина (VIII), *p*-диметоксибензола (IX) или пиридина (X) [15]:



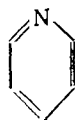
VII



VIII



IX



X

Все три донорных компонента, потенциально способных образовывать КПЗ с ангидридом (VII), влияют на его сольволиз различным образом (рис. 20). Зависимость наблюдаемой константы скорости псевдопервого порядка $k_{\text{набл}}$ от концентрации нуклеофила (VIII) имеет вид кривой с насыщением, что указывает, по-видимому, на образование комплекса между реагентами (см. гл. VI). Действительно, константа ассоциации соединений (VII) и (VIII), вычисленная из кинетических данных и равная $2,3 \pm 0,2 \text{ M}^{-1}$, удовлетворительно совпадает с величиной $1,7 \pm 0,5 \text{ M}^{-1}$, найденной спектрофотометрическим титрованием.

В случае пиридина (X), обладающего значительно меньшей донорной способностью, чем *N,N*-диметиланилин (VIII), образование КПЗ не удается обнаружить ни кинетически [величина $k_{\text{набл}}$ линейно возрастает при увеличении концентрации (X)], ни спектрофотометрически.

И, наконец, *p*-диметоксибензол (IX), не содержащий нуклеофильных групп, способных катализировать сольволиз ангидрида (VII) по нуклеофильному или общесосновному механизмам, ингибирует реакцию вследствие образования КПЗ с константой устойчивости $1,1 \text{ M}^{-1}$. Вероятные причины этого — стерические затруднения для взаимодействия метанола с реакционным центром в молекуле ангидрида (VII), находящейся в комплексе, а также уменьшение эффективного положительного заряда на карбонильном углероде в сольволизуемой молекуле (VII) при переносе электрона от донора (IX). (Аналогичный пример, показывающий общность данного явления, — это ингибирование

донорной молекулой аценафтена реакции динитрофталевого ангидрида с пиридином в бензоле [16].)

При объяснении кинетической роли, которую играет комплексообразование сольволизуемой молекулы (VII) с нуклеофилом (VIII) (рис. 20), встал вопрос о том, является ли образующийся КПЗ «продуктивным» с точки зрения катализа, т. е. сохраняется ли комплексообразование и в переходном состоянии реакции (см. гл. II). Менжер [15] полагает, что нет, и при этом опирается на следующее рассуждение. В аналогичной, но заведомо не включающей предварительного комплексообразования реагентов реакции с *n*-нитрофенилацетатом реакционная способность пиридина (X) примерно в 10 раз выше, чем *N,N*-диметиланилина (VIII). Если такое же соотношение реакционных способностей сохраняется и в реакции их с ангидридом (VII), то зависимость $k_{\text{набл}}$ от концентрации (VIII) (в отсутствие комплексообразования) может быть выражена пунктирной прямой (рис. 20). Видно, что на опыте образование КПЗ приводит к отрицательному отклонению от этой теоретической зависимости, т. е. к торможению реакции при высоких концентрациях нуклеофила (VIII). Следовательно, дополнительное комплексообразование, которое кинетически проявляется на опыте, непродуктивно, т. е. играет роль «внутреннего ингибитора» реакции (см. гл. II, кривые 1 и 2 на рис. 13, в). Причиной этого может быть как неблагоприятное взаимное расположение диметиламиногруппы (VIII) и карбонильного углерода (VII) в комплексе, так и торможение реакции в результате образования КПЗ с донорной молекулой (VIII) по тем же причинам, что и в ранее рассмотренном случае с участием (IX). Этот пример показывает, с какой осторожностью следует подходить к анализу наблюдаемых «михаэлисовских» зависимостей.

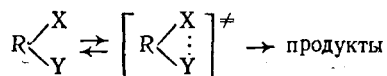
Другие примеры, иллюстрирующие влияние образования КПЗ на скорости реакций, можно найти в [5, 16, 17].

§ 2. Внутримолекулярные реакции

«Внутримолекулярный кинетический режим» способствует ускорению ферментативных реакций (см. гл. II). В связи с этим привлекают внимание исследования неферментативных внутримолекулярных реакций, где взаимодействующие функциональные группы ковалентно присоединены к одной молекуле. Значительный интерес в этих исследованиях представляет сопоставление скоростей внутри- и соответствующих межмолекулярных реакций (для оценки эффекта сближения), а также выявление специфических факторов, оказывающих влияние на «собственную» (внутримолекулярную) реакционную способность присоединенных функциональных групп (их взаимное расположение — эффекты ориентации, влияние заместителей или «микросреды» и т. д.).

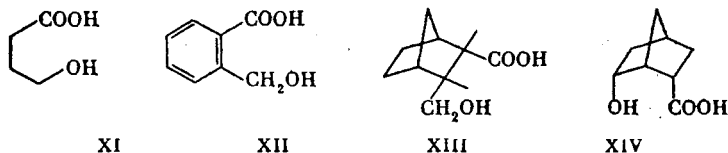
В настоящем параграфе будут рассмотрены типичные экспериментальные данные по внутримолекулярным реакциям, анализ которых будем проводить, исходя из теоретических представлений, изложенных в гл. II.

Реакции циклизации. Любая внутримолекулярная реакция между функциональными группами X и Y включает, хотя бы в переходном состоянии, промежуточное образование цикла:



Поэтому имеет смысл рассмотреть в первую очередь именно реакции циклизации, тем более, что некоторые из них изучались как модели ферментов [18, 19].

В последние годы широкую известность приобрело исследование Сторма и Кошланда [18], посвященное лактонизации ряда оксикислот:



(константа скорости первого порядка k_1). В качестве межмолекулярной реакции сравнения была использована этерификация этилового спирта уксусной кислотой (константа скорости второго порядка k_2). Ими было установлено, что отношение* k_1/k_2 значительно (для XIV в $2 \cdot 10^4$ раз) превышает значение 55 М, возрастая по мере увеличения жесткости углеводородной цепи при переходе от XI к XIV** (табл. 13). На этом основании Сторм и Кошланд пришли к выводу, что в ускорении внутримолекулярной реакции лактонизации играет роль точная взаимная ориентация взаимодействующих орбиталей. Они назвали этот эффект «орбитальным управлением» и приписали ему решающую роль в объяснении высокой активности ферментов.

Аргументом в пользу «орбитального управления» Сторм и Кошланд [18] считают, что в ряду соединений XI—XIV при замене атома O на S происходит сильное изменение порядка расположения этих соединений по их реакционной способности. Относительные скорости образования соответствующих тиолактонов XI : XII : XIII : XIV = 70 : 115 : $2,5 \cdot 10^4$: 427 (ср. с данными табл. 13). В ферментативных системах замена OH-группы серина активного центра на SH-группу также приводит к значительному изменению скорости. Например, такая модификация субстрата вызывает сильное уменьшение активности фермента [22]. Подобные аргументы, однако, нельзя считать вполне обоснованными. Замена O на S сопровождается не только небольшими изменениями в геометрии системы (что считается в [18] основным следствием такой замены), но также значительными изменениями в электронном строении. Известно, например, что

* При обсуждении относительных величин k_1/k_2 авторы [18] внесли поправки на существование конформеров и оттапливание метиленовых групп при циклизации для оксикислот XI—XIII (см. табл. 13). Здесь не будут рассмотрены способы внесения этих поправок, поскольку они были подвергнуты критике некоторыми исследователями [20].

** Для соединения XII в качестве бимолекулярной реакции сравнения следовало бы выбрать этерификацию не уксусной, а бензойной кислоты этанолом, идущую примерно в 300 раз медленнее [21]. Неправильным выбором реакции сравнения можно объяснить несколько заниженное значение k_1/k_2 для этого соединения в табл. 13. Более обоснованная величина $k_1/k_2 = 9 \cdot 10^3$ М.

Скорости кислотнокатализируемой лактонизации ряда оксикислот и этерификации этанола уксусной кислотой [18]

Реагенты	$k_{\text{H}_3\text{O}^+}$, $\text{M}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$	k_1/k_2^{**} , М	k_1/k_2 , М (исправ- ленные значения)
$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + \text{CH}_3\text{COOH}$	$1,09 \cdot 10^{-3*}$	—	—
XI	$8,6 \cdot 10^{-2}$	79	$2,3 \cdot 10^4$
XII	$3,32 \cdot 10^{-2}$	$30,5^{***}$	93^{***}
XIII	7,23	6630	$9,1 \cdot 10^4$
XIV	$1,12 \cdot 10^3$	$1,03 \cdot 10^6$	$1,03 \cdot 10^6$

* В $\text{M}^{-2} \cdot \text{мин}^{-1}$.

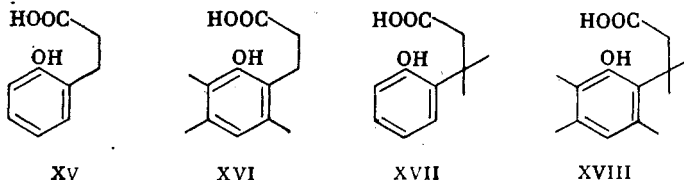
** Отношение $k_{\text{H}_3\text{O}^+}$ для XI—XIV к $k_{\text{H}_3\text{O}^+}$ для этерификации уксусной кислоты этано-
лом.

*** В оригинале, видимо ошибочно, приведены цифры в 10 раз большие.

механизмы гидролиза простых эфиров и тиоэфиров значительно различаются между собой [6], и это может привести к изменению стадии, определяющей скорость реакции при переходе от кислородсодержащих соединений к их тиоаналогам.

Сторм и Кошланд [18] недооценили роли сближения, ограничившись для ее оценки одним фактором разбавления, равным 55 М (см. § 3 гл. II). В действительности эффект сближения может быть значительно большим, и тогда наблюдаемое значение k_1/k_2 для XIV (см. табл. 13) не выходит за рамки предельной величины, предсказанной уравнением (2.30).

Другой пример реакции циклизации — лактонизация ряда оксигидрокоричных кислот. Константы скорости кислотнокатализируемой и спонтанной лактонизации оксикислот (XV—XVIII) приведены в табл. 14.



В качестве межмолекулярной реакции сравнения принята этерификация уксусной кислоты фенолом. Значения k_1/k_2 для кислотнокатализируемой реакции вполне могут быть объяснены сближением и ориентацией в случае XV—XVII, однако для XVIII получено отношение k_1/k_2 , далеко выходящее за рамки предельного значения, которое следует из уравнения (2.30). Мильштейн и Коун [19] полагают, что этот эффект обусловлен «замораживанием» конформации оксикислоты, удобной для реакции, за счет взаимодействия метильных групп алифатической цепи и кольца. Другими словами, реагирующие группы предельно

Константы скорости кислотнокатализируемой $k_{H_3O^+}$ и спонтанной k_{H_2O} лактонизации оксикислот XV—XVIII [19]

Реагент	$k_{H_3O^+}$, $M^{-1} \cdot c^{-1}$	k_{H_2O} , c^{-1}	k_1/k_2^{**} , M	$K_{равн}$
XV	$5,94 \cdot 10^{-6}$	$3,26 \cdot 10^{-6}$	$5,94 \cdot 10^4$	0,0373
XVI	$6,22 \cdot 10^{-6}$	$3,34 \cdot 10^{-6}$	$6,22 \cdot 10^4$	0,621
XVII	$2,62 \cdot 10^{-2}$	$3,63 \cdot 10^{-5}$	$2,62 \cdot 10^8$	25,67
XVIII	$5,9 \cdot 10^6$	$8,5 \cdot 10^{-2}$	$5,9 \cdot 10^{16}$	>99
$C_6H_5OH + CH_3COOH$	10^{-10*}	—	—	$3,8 \cdot 10^{-6}$

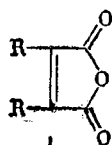
* В $M^{-2} \cdot c^{-1}$.** Отношение величин $k_{H_3O^+}$ для XV—XVIII к $k_{H_3O^+}$ для этерификации уксусной кислоты фенолом.

сближены и правильно сориентированы. Однако такое представление неверно. Одни эти эффекты не могут объяснить значения $k_1/k_2 \gg 10^7$ (см. § 3 гл. II). В свою очередь построение молекулярной модели (XVIII) показывает, что метильные группы алифатической цепи и кольца находятся на расстоянии, заметно меньшем, чем это позволяет сумма их ван-дер-ваальсовых радиусов. Следовательно, между этими группами должно существовать сильное отталкивание, которое и обуславливает сжатие гидроксильной и карбоксильной групп, приводящее к дополнительному ускорению реакции. Рентгеноструктурный анализ кристаллического состояния XVIII подтверждает этот вывод [97].

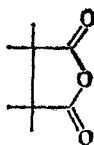
При переходе от XV к XVIII величина $k_{H_3O^+}$ возрастает намного сильнее, чем k_{H_2O} (10^{11} по сравнению с $\sim 10^4$, см. табл. 14). Переходные состояния кислотнокатализируемой и некатализируемой реакций геометрически одинаковы и различаются только степенью разделения зарядов и поляризации связей. Это также указывает на то, что аномально высокое значение $k_{H_3O^+}$ для XVIII не связано с какими-либо геометрическими факторами типа «орбитального управления».

Между константами скорости $k_{H_3O^+}$ и константами равновесия $K_{равн}$ изученных реакций существует четкая корреляция (см. табл. 14): большие значения $k_{H_3O^+}$ соответствуют увеличению $K_{равн}$. Это говорит о том, что как стабильность, так и реакционная способность циклических систем обусловлена одними и теми же факторами.

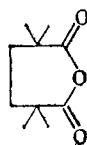
Высокая стабильность некоторых циклических соединений давно известна в органической химии [23]. Например, циклические ангидриды XIX—XXI образуются самопроизвольно



XIX



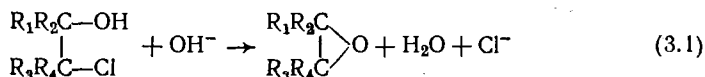
XX



XXI

из соответствующих дикарбоновых кислот, в то время как незамещенные, и тем более ациклические ангидриды в воде легко гидролизуются. Это явление получило название «гем-диалкильный эффект» и было объяснено тем, что алкильные заместители тормозят вращение вокруг углерод-углеродных связей в соединении с открытой цепью, значительно понижая их энтропию, в то время как в циклическом соединении свободное вращение отсутствует и этих энтропийных потерь при образовании ангидрида нет. Подобная интерпретация кинетических данных была использована Брюсом [24]. С точки зрения процесса образования переходного состояния отсутствие свободного вращения как раз и означает сближение и ориентацию реагирующих групп [25].

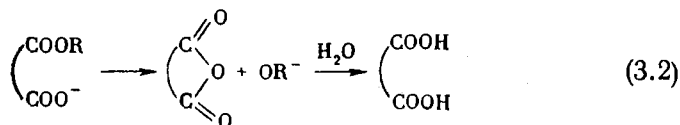
Кинетическое проявление «гем-диалкильного» эффекта было обнаружено при исследовании реакции образования оксипиранового кольца:



Относительные скорости реакции (3.1) для ряда хлоргидринов приведены в табл. 15. Ускорение, наблюдаемое при переходе от этиленхлоргидрина к тетраметилэтиленхлоргидрину ($\sim 10^4$) того же порядка (и, вероятно, такой же природы), как и при переходе от XI к XIV (см. табл. 13) или от XV к XVIII (см. значения k_{H_2O} в табл. 14).

Внутримолекулярный катализ. В этом разделе будут рассмотрены собственно каталитические внутримолекулярные реакции, где одна из функциональных групп (Y) в молекуле Y—R—X выступает в роли катализатора какого-либо превращения соседней группы X. Такие системы можно рассматривать как близкие модели ферментативных реакций.

Катализ карбоксильной группой. Рассмотрим нуклеофильный катализ гидролиза моноэфиров дикарбоновых кислот [26]:



Скорость реакции, измеренная по выделению аниона RO^- , равна скорости образования промежуточного циклического ангидрида. Таким образом, здесь идет циклизация. Сопоставление экспериментальных данных для реакции (3.2) (табл. 16) с кинетическими показателями реакции лактонизации (см. табл. 13) показывает, что эти реакционные системы схожи; в них приблизительно одинаковы как характер изменения структуры реагентов, так и величина наблюдаемых эффектов. Очевидно, одинаковы должны быть и причины ускорения реакций [27]. Сравнение констант скоростей внутримолекулярного процесса, приведенных в табл. 16, с соответствующими величинами для межмолекулярной реакции осложнено тем, что гидролиз замещенных фенил-ацетатов под действием ацетат-иона скорее всего идет по механизму ацетосновного катализа, а не путем нуклеофильной атаки с промежу-

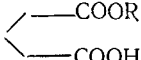
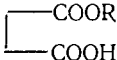
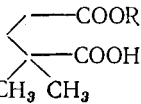
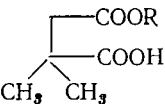
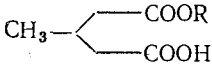
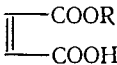
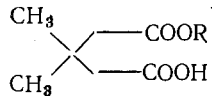
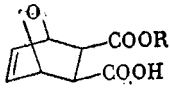
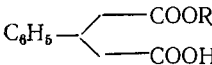
Относительные скорости образования окисей
олефинов по реакции (3.1) [23]

Соединение	Относительная скорость	Соединение	Относительная скорость
$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{—OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{—Cl} \end{array}$	1	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3\text{—C—OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{—Cl} \end{array}$	252
$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{—OH} \\ \\ \text{CH—Cl} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	5,5	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3\text{—C—OH} \\ \\ \text{CH—Cl} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	1 360
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH—OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{Cl} \end{array}$	21	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH—OH} \\ \\ \text{CH}_3\text{—C—Cl} \end{array}$	2 040
$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{—OH} \\ \\ \text{CH}_3\text{—C—Cl} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	248	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3\text{—C—OH} \\ \\ \text{CH}_3\text{—C—Cl} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	11 600

точным образованием ангидрида [5]. Скорость нуклеофильной реакции должна быть еще меньше наблюдаемой скорости гидролиза. Следовательно, отношение k_1/k_2 может дать в этом случае лишь нижний предел ускорения. По оценке Брюса [27], это отношение достигает $5 \cdot 10^7$ М для моноэфира 5,6-эндоксо- Δ^4 -тетрагидрофталевой кислоты (последнее соединение в табл. 16), что находится уже на «пределе возможностей» механизма сближения и ориентации [см. гл. II, уравнение (2.30)]. Рассмотрение активационных параметров реакции (3.2) показывает, что увеличение скорости гидролиза соединений, приведенных в табл. 16, связано с увеличением именно энтропии активации [26]. Это также согласуется с выводом об определяющей роли эффектов сближения и ориентации в наблюдаемом ускорении.

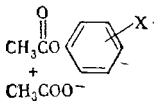
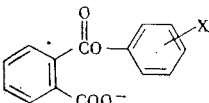
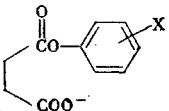
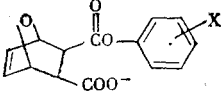
На примере реакции (3.2) Брюс с сотр. изучил вопрос о роли микро-среды во внутримолекулярных реакциях [28]. Скорость бимолекулярного взаимодействия ацетатного иона с моно- и динитрофенилацетатами значительно возрастает при переходе от воды к апротонному

Константы скорости гидролиза моно- *п*-бромфениловых эфиров ряда дикарбоновых кислот [26]

Реагент $R=p-C_6H_4Br$	k_1 , мин ⁻¹	k_1 (относи- тельная величина)	Реагент $R=p-C_6H_4Br$	k_1 , мин ⁻¹	k_1 (относи- тельная величина)
	0,00444	1		1,02	230
	0,016	3,2		3,2	720
	0,0194	4,4		45,3	10 200
	0,085	19		234	52 700
	0,015	3,4			

растворителю — диметилсульфоксиду (табл. 17). Это вполне закономерно для ион-молекулярных реакций, что уже отмечалось в гл. II. (Выбор нитрозамещенных эфиров обусловлен тем, что их реакции идут именно по нуклеофильному механизму, характерному для внутримолекулярных реакций.) На основании этого можно было бы предположить [5], что значительный вклад в наблюдаемое ускорение внутримолекулярной реакции (3.2) (константа скорости первого порядка k_1) по сравнению с соответствующей межмолекулярной реакцией (нуклеофильная атака замещенного фенилацетата ацетатным ионом; константа скорости второго порядка k_2) вносит десольватация карбоксилатного аниона при сближении его со сложноефирной группой. Такая десольватация вполне вероятна. Экспериментально этот вопрос можно решить, сопоставив величины k_1/k_2 в воде и в диметилсульфоксиде. В последнем случае карбоксилатный анион уже десольватирован и, следовательно, значение k_1/k_2 должно было бы уменьшиться, если справедлив десольватационный механизм ускорения, наблюдаемого во внутримолекулярной реакции. Однако перенос реагентов из воды в диметилсульфоксид не только не уменьшает, но в некоторых случаях даже увеличивает значение k_1/k_2 (см. табл. 17). Это указывает на отсутствие вклада десольватации карбоксилатного аниона в величину константы скорости внутримолекулярной реакции (k_1) в этом и, вероятно, в других подобных процессах.

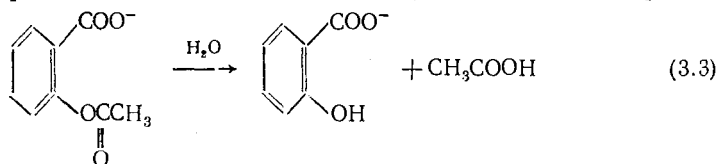
Скорости гидролиза замещенных фенилacetатов в воде и в диметилсульфоксиде [28]

Реагенты	X	$k_1(\text{H}_2\text{O}), \text{c}^{-1}$	$k_1(\text{CH}_3\text{SOCH}_3), \text{c}^{-1}$	$k_1/k_2, \text{M}$	
				H_2O	CH_3SOCH_3
	2,4-NO ₂	4,3 · 10 ⁻⁴ *	51*		
	4-NO ₂	3,95 · 10 ⁻⁶ *	0,1*		
	3-NO ₂	9,6 · 10 ⁻⁷ *	2,7 · 10 ⁻³ *		
	4-Br	9,3 · 10 ⁻⁸ **, **	1,86 · 10 ⁻⁵ **, **		
	H	2,6 · 10 ⁻⁸ **, **	1,7 · 10 ⁻⁸ **, **		
4-OCH ₃	6,6 · 10 ⁻⁹ **, **	1,07 · 10 ⁻⁷ **, **			
	4-Br	0,388	96,0	4,2 · 10 ⁶	5,2 · 10 ⁶
	H	0,072	3,2	2,8 · 10 ⁶	1,9 · 10 ⁶
	4-OCH ₃	0,0318	0,21	4,8 · 10 ⁶	2,0 · 10 ⁶
	4-Br	1,25 · 10 ⁻³	40,0	1,35 · 10 ⁵	2,2 · 10 ⁶
	H	2,3 · 10 ⁻³	1,8	8,8 · 10 ⁴	1,1 · 10 ⁶
	4-OCH ₃	1,07 · 10 ⁻³	0,18	1,6 · 10 ⁵	1,7 · 10 ⁶
	4-OCH ₃	0,867	177,0	1,3 · 10 ⁸	1,7 · 10 ⁹

* k_2 в $\text{M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$.

** Вычислено по Гамметовской зависимости.

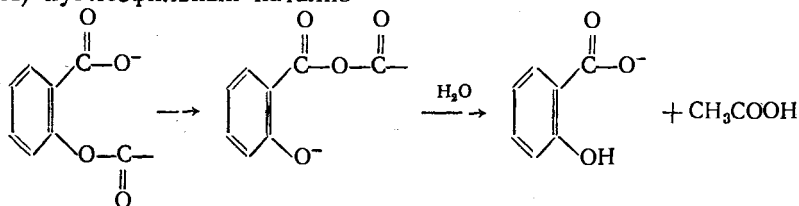
Другая подробно изученная система — гидролиз аниона аспирина:



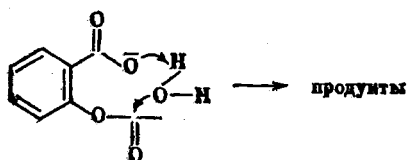
Скорость реакции (3.3) не зависит от pH выше $\text{p}K_a$ карбоксильной группы и в 180 раз превышает величину, наблюдаемую для гидролиза ацетилметилсалицилата (соединение, в котором карбоксильная группа этерифицирована и, следовательно, не может ионизироваться и выступать в роли катализатора). Это доказывает существование внутримолекулярного катализа в реакции (3.3) [29, 30].

В принципе возможны три механизма катализа, которые нельзя различить по pH-зависимости скорости реакции:

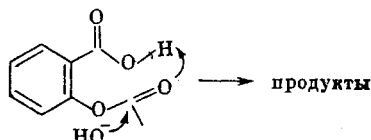
(А) нуклеофильный катализ



(Б) общесосновой катализ



(В) общекислотный и специфический основной катализ

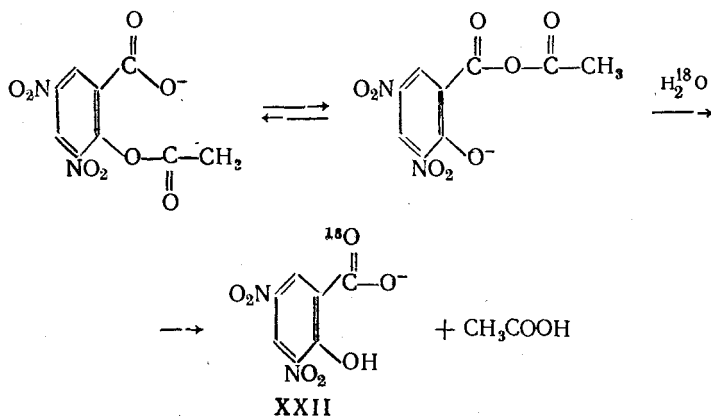


Протекание реакции (3.3) в воде, содержащей молекулы H_2^{18}O , не приводит к обогащению продукта изотопом ^{18}O , что должно было бы наблюдаться при механизме (А). Кроме того, значение энтропии активации этой реакции, равное $-22,5$ кал/моль/град ($-94,5$ Дж/моль/град), очень большое (по абсолютной величине), что не характерно для истинно мономолекулярной реакции. Дейтериевый изотопный эффект ($k_{\text{H}_2\text{O}}/k_{\text{D}_2\text{O}} = 2,2$) слишком велик для нуклеофильной реакции, в которой отсутствует перенос протона на стадии, определяющей скорость реакции [29]. Таким образом, механизм (А) следует исключить. Гораздо труднее сделать выбор между механизмами (Б) и (В). Для этой цели было исследовано влияние заместителей на скорость гидролиза 4- и 5-замещенных аспиринов. Сопоставление полученных результатов с данными для межмолекулярных реакций позволило отдать предпочтение механизму (Б) [31].

Чтобы различить механизмы (Б) и (В), также можно использовать иной подход, основанный на замене воды другим нуклеофилом, например семикарбазидом, гидроксилмином, метиламином и т. д., для которого участие в реакции в той или иной ионной форме было бы более определенным, чем для воды, которая может реагировать как в виде H_2O , так и OH^- . Кинетический анализ этой системы показал, что действительно предпочтение следует отдать механизму общесоснового катализа (Б) с внутримолекулярным участием карбоксилатного иона [32].

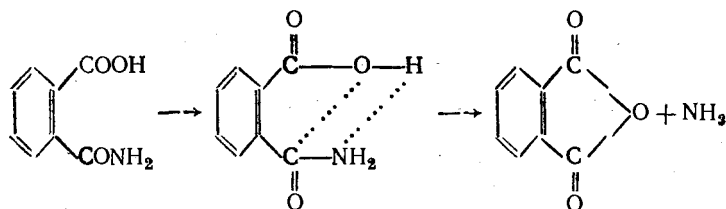
Можно предположить, что нуклеофильный механизм (А) все-таки играет роль при гидролизе замещенных аспиринов с более «хорошей»

уходящей группой, как это происходит в межмолекулярных реакциях [33]. Действительно, для гидролиза динитроаспирина в $^{18}\text{OH}_2$ было обнаружено обогащение продукта (XXII) изотопом ^{18}O , что доказывает протекание реакции по нуклеофильному механизму [30]:

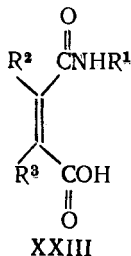


Существует ли внутримолекулярный катализ недиссоциированной карбоксильной группой? Динитроаспирин в кислой форме гидролизуется в 28 раз быстрее, чем в анионной, и в 200 раз быстрее своего метилового эфира [34]. Для незамещенного аспирина катализ $-\text{COOH}$ группой также существует, но выражен слабее (скорость гидролиза в 16 раз выше, чем для метилового эфира) [29].

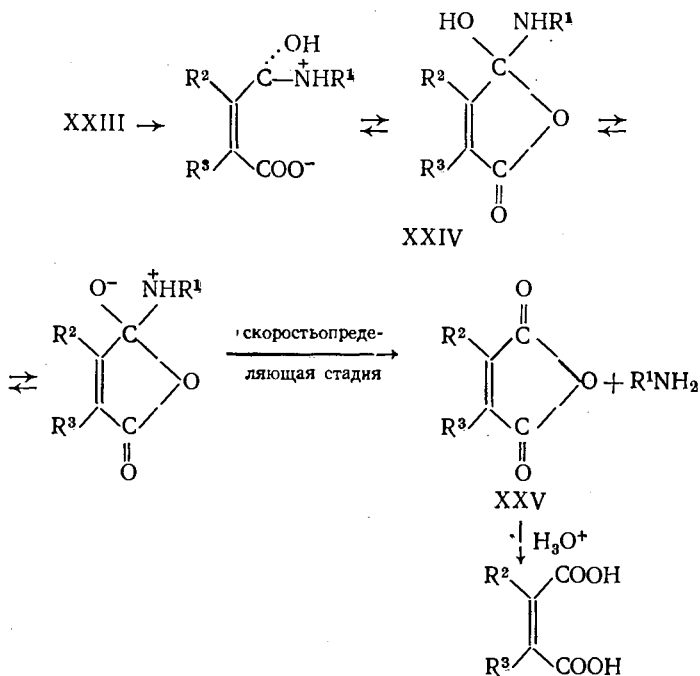
Очень высокой эффективностью обладает карбоксильная группа в гидролизе амидов. Скорость гидролиза моноамида фталевой кислоты в 10^5 — 10^6 раз превышает скорость гидролиза моноамида терефталевой кислоты [6]. Для первой реакции предложен следующий механизм:



Более подробно были исследованы кинетика и механизм гидролиза моноамидов производных малеиновой кислоты [35, 36]:



Кинетические данные свидетельствуют о протекании гидролиза XXIII по следующему механизму:



Возможность промежуточного образования ангидрида XXV связана с обсуждавшейся в предыдущем разделе повышенной термодинамической стабильностью циклических ангидридов, в частности малеинового (XIX). Межмолекулярный катализ гидролиза амидов карбоксильной группой вообще не известен не только по нуклеофильному, но и по какому-либо другому механизму, что создает трудность выбора межмолекулярной реакции сравнения. Кирби [35] выбрал в качестве такой реакции сравнения гидролиз N-метилакриламида (при pH 3). Поскольку и в этой реакции не удастся обнаружить катализа карбоксильной группой, то сравнение ее скорости со скоростями внутримолекулярных реакций дает фактически нижнюю оценку эффекта ускорения, обусловленного протеканием реакции во внутримолекулярном режиме. Из табл. 18 видно, что уже для незамещенной малеиновой кислоты ($R^3 = R^2 = \text{H}$) величина $k_1/k_2 \geq 2 \cdot 10^6$, что практически исчерпывает возможности эффектов сближения и ориентации (см. уравнение 2.30). Введение одного алкильного заместителя ($R^2 = \text{H}$, R^3 варьировали от CH_3 до *tert*- C_4H_9) приводит к сравнительно небольшому ускорению. Однако при введении сразу двух заместителей ($R^2 = R^3 = \text{CH}_3$) происходит столь резкое ускорение, что величина $k_1/k_2 \geq 5 \cdot 10^{10}$ выходит далеко за рамки предсказываемого на основании уравнения (2.30). Столь большой эффект, по мнению авторов [35], связан с тем, что взаимное отталкивание алкильных групп вызывает

сжатие реагирующих групп с противоположной стороны молекулы. Это сжатие частично преодолевает их ван-дер-ваальсово отталкивание и таким образом способствует протеканию реакции. Аргументом в пользу такой интерпретации служит то, что весь наблюдаемый эффект ускорения связан с понижением энthalпии активации реакции (ср. с системой Брюса, табл. 16), а не с увеличением энтропии. Анализ рентгеноструктурных данных также указывает на сближение карбоксильной и амидной групп при введении алкильных заместителей [35]. Плоская структура молекулы XXIII около двойной связи позволяет изобразить ее графически. На рис. 21 изображена молекула XXIII при $R^2 = R^3 = H$ с использованием длин связей и ван-дер-ваальсовых радиусов атомов, приведенных в [9]. Видно, что между атомами H не возникает никакого отталкивания, а карбонильный углерод амидной группы и кислород карбоксильной группы, между которыми должно происходить образование связи с получением ангидрида, находятся на предельно близком расстоянии, допускаемым их ван-дер-ваальсовыми радиусами. Таким образом, уже в этой молекуле реализуется полностью эффект сближения. Замена H на CH_3 приводит к сильному отталкиванию групп R^2 и R^3 . Из рис. 21 видно, что метильные группы, ван-дер-ваальсовы границы которых обозначены пунктирными дугами, должны были бы сильно перекрываться. Следовательно, они должны раздвинуться, что приведет к сближению взаимодействующих реакционных центров с противоположной стороны на расстояние, меньшее, чем сумма их ван-дер-ваальсовых радиусов. Такая возможность сближения и, наоборот, раздвижения амидной и карбоксильной групп особенно наглядно проявляется в циклических производных XXIII (см. табл. 18). Если в шестичленном цикле происходит некоторое сжатие реагирующих групп, то в напряженных пяти- и тем более четырехчленном циклах сжатие уже заменяется раздвижением групп в результате сжатия с противоположной стороны двойной связи. Замена метильных групп на более объемные изопропильные, как видно из табл. 18, не приводит к ускорению реакции. Этот результат, казалось бы противоречащий изложенному объяснению наблюдаемых эффектов, обусловлен сменой скоростьопределяющей стадии. При $R^2 = R^3 =$ изопропил скоростьопределяющей стадией становится диф-

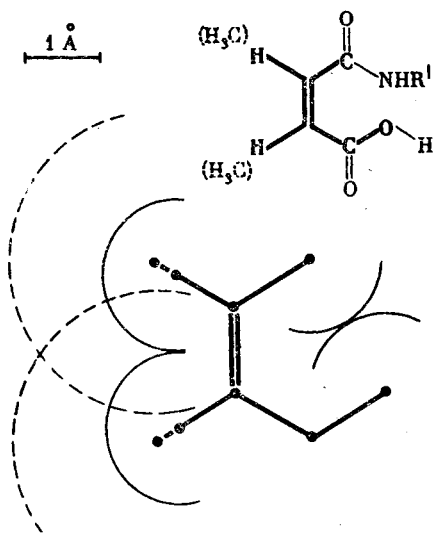





Рис. 21. Структура участка молекулы моноамида малеиновой кислоты, выделенного жирным на приведенной формуле:
сплошные дуги — ван-дер-ваальсовы радиусы атомов H, C и O; пунктирные — группа CH_3

Относительные скорости гидролиза моноамидов замещенных
маленных кислот XXIII [35, 36]

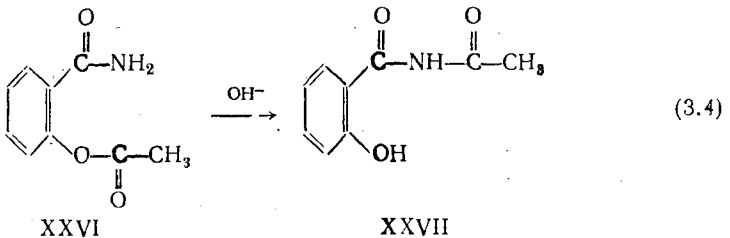
R ³	R ²	R ¹	Относительная скорость
H	H	CH ₃	1
CH ₃	H	CH ₃	31,2
C ₂ H ₅	H	CH ₃	32,8
изо-C ₃ H ₇	H	CH ₃	44,5
трет-C ₄ H ₉	H	CH ₃	68,0
CH ₃	CH ₃	н-C ₃ H ₇	23 500
изо-C ₃ H ₇	изо-C ₃ H ₇	н-C ₃ H ₇	23 500
		CH ₃	540
		CH ₃	4,2 · 10 ⁻⁵
		CH ₃	4,2 · 10 ⁻⁶
N-метилакриламид (рН 3)			5 · 10 ⁻⁷

фузионно контролируемый перенос протона, по-видимому, в промежуточном продукте XXIV [36].

Примеры внутримолекулярного катализа карбоксильной группой в гидролизе ацеталей и фосфатов можно найти в [29, 37, 38].

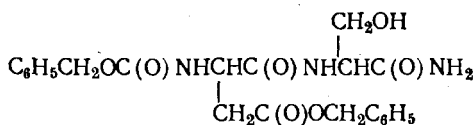
Катализ амидной группой. Амидная группа — наиболее распространенная функциональная группа белков, поэтому ее возможное участие в качестве компонента активных центров ферментов вызывает несомненный интерес. По своим физико-химическим свойствам амидная группа весьма инертна. Это слабая кислота и слабое основание. Например, значение pK_{a1} сопряженной кислоты ацетамида равно $-0,48$, а $pK_{a2} = 15,1$ [29]. Каталитические свойства амидной группы в межмолекулярных гидролитических реакциях неизвестны, однако она способствует значительному ускорению внутримолекулярных реакций.

Реакция (3.4) идет в нейтральной среде со скоростью пропорциональной концентрации OH^- и характеризуется довольно высокой



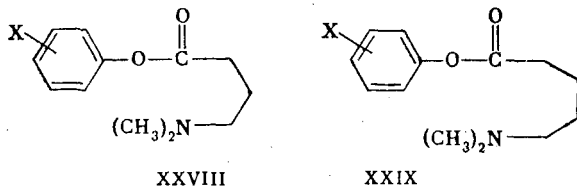
константой скорости второго порядка $1,2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ при 25° [39]. Это система, аналогичная гидролизу аспирина, причем XXVI реагирует в нейтральной среде значительно быстрее, чем аспирин и аналогичная молекула, содержащая имидазольную группу (XXX, см. стр. 92), несмотря на то, что карбоксильная и имидазольная группы считаются значительно более «реакционноспособными» (хотя бы с точки зрения их кислотно-основных свойств), чем «инертная» амидная группа. Кордес и сотр. [39] приняли в качестве реакции сравнения взаимодействие ацетамида с *n*-нитрофенилацетатом, однако измерить скорость этой реакции им не удалось. Из полученных результатов можно лишь заключить, что скорость реакции (3.4) не менее чем в 60 000 раз выше скорости взаимодействия *n*-нитрофенилацетата с 1 М ацетамида. Механизм реакции (3.4) по аналогии с подобной реакцией образования фталимидов [40], вероятно, включает депротонирование амидной группы XXVI гидроксил-ионом и последующую нуклеофильную атаку образующимся анионом сложнэфирной группы (с образованием XXVII). Дальнейший (щелочной) гидролиз XXVII идет сравнительно медленно (константа скорости равна $0,75 \text{ M}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$).

Другой пример — участие амидной группы во внутримолекулярном гидролизе бензилового эфира:



щелочной гидролиз которого идет в 10^7 раз быстрее, чем бензилпропионата [41]. Показано промежуточное образование имида в этой реакции, доказывающее нуклеофильный катализ амидной группой.

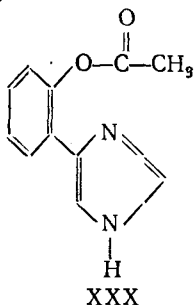
Катализ аминогруппой. Внутримолекулярный катализ третичной аминогруппой был изучен на примере реакций гидролиза феноловых эфиров ω -*N,N*-диметиламинобутановой (XXVIII) и ω -*N,N*-диметиламинопентановой (XXIX) кислот [42]. В качестве межмолекулярной реакции сравнения удобно принять



гидролиз замещенных фенолацетатов, катализируемый триметиламином. Брюс и Бенкович показали, что как внутри-, так и межмолекулярная реакции идут по одному и тому же механизму нуклеофильного катализа. Отношение k_1/k_2 для этих реакций лежит в пределах от 10^3 до $5 \cdot 10^3 \text{ M}$ для всех изученных заместителей, причем XXVIII гидролизуется всегда в ~ 2 раза быстрее XXIX. Энергии активации внутри- и межмолекулярной реакций совпадают и все различие между ними,

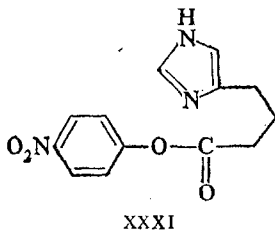
следовательно, связано с энтропийными факторами. Это обстоятельство, а также абсолютная величина k_1/k_2 согласуется с представлением о том, что в данном случае происходит сближение групп без существенной их ориентации, поскольку гибкая углеводородная цепь, соединяющая эти группы, обеспечивает лишь небольшое превышение эффекта «разбавления» 55 M (см. § 3 гл. II).

Катализ имидазольной группой. Хорошо известен межмолекулярный катализ имидазолом и его производными [5, 6]. Также подробно исследованы внутримолекулярные реакции имидазольной группы [6, 29]. Рассмотрение этих реакций удобно начать с системы, напоминающей уже знакомый нам гидролиз аспирина (3.3). Фельтон и Брюс [43, 44] исследовали гидролиз соединения XXX, который идет в 4 раза быстрее, чем реакция (3.3)



с внутримолекулярным участием карбоксильной группы. Здесь возможны те же три механизма (А), (Б) и (В). Было показано [44], что гидролиз XXX идет по механизму общего основного катализа (Б), как и в случае аспирина. Рассчитанная по корреляционным уравнениям константа скорости гидролиза XXX нейтральной молекулой воды в 1000 раз ниже наблюдаемой величины. Этот эффект и может быть приписан участию имидазольной группы.

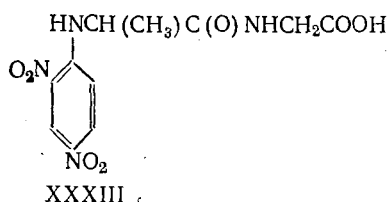
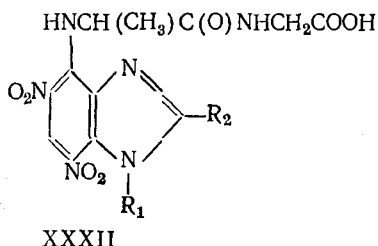
Сравнительно небольшое ускорение наблюдал Брюс [45] при исследовании внутримолекулярного выделения *n*-нитрофенола в *n*-нитрофениловом эфире γ -(4'-имидазолил) бутановой кислоты (XXXI), т. е. в системе, аналогичной XXVIII:



Гидролиз XXXI идет по нуклеофильному механизму. Константу скорости выделения *n*-нитрофенола в этом процессе (200 мин^{-1}) следует сопоставить с константой скорости взаимодействия *n*-нитрофенилацетата с 4-метилимидазолом, равной $25 \text{ M}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ [6]. Таким образом,

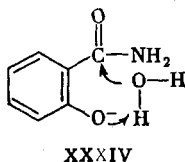
В этом случае $k_1/k_2 = 8$ М. В действительности эта цифра должна быть в несколько раз больше, так как константа k_1 была измерена в 50%-ном этаноле, а k_2 — в воде. Известно [6], что скорость взаимодействия имидазола с *n*-нитрофенилацетатом уменьшается в присутствии органического растворителя (в 3 раза в 30%-ном этаноле). По-видимому, здесь реализуется для отношения k_1/k_2 величина около 55 М, т. е. минимальный эффект сближения (ср. с XXVIII). Интересно, что скорость выделения *n*-нитрофенола из XXXI практически равна скорости внутримолекулярного ацилирования α -химотрипсина *n*-нитрофенолацетатом ($k_1 = 180 \text{ мин}^{-1}$ [46]) в комплексе Михаэлиса.

Интересный пример участия имидазольной группы в гидролизе пептидной связи описан Коуном с сотр. [47]. Был исследован гидролиз следующих пептидов:

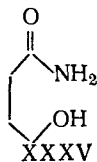


где $R_1, R_2 = \text{H}, \text{CH}_3$, а также других дипептидов (Gly-Gly, Ala-Ala) аналогичного строения. Из зависимости скорости гидролиза XXXII от pH следует, что каталитически активной является протонированная имидазольная группа. Скорость гидролиза протонированного XXXII при $R_1 = R_2 = \text{CH}_3$ в 65 000 раз выше, чем XXXIII. Однако механизм катализа остается невыясненным. Отсутствует корреляция величин скорости гидролиза протонированного XXXII и pK_a имидазола, варьируемых введением различных заместителей R_1 и R_2 . Кроме того, построение молекулярной модели (XXXII) показывает невозможность общего кислотного катализа имидазольной группой по стерическим причинам. Ясно лишь, что имидазольная группа в протонированной форме может быть эффективным катализатором гидролиза пептидной связи.

Катализ гидроксильной группой. Гидроксильная группа, подобно амидной, обладает исключительно слабо выраженными кислотно-основными свойствами. Для нее также не известен межмолекулярный катализ в гидролитических реакциях. Внутримолекулярное участие неонизованной гидроксильной группы обнаруживает гидролиз амида XXXIV, идущий по механизму общего основного катализа [48]:



Примером внутримолекулярного катализа гидроксильной группой как в ионизованной, так и в нейтральной формах может служить гидролиз γ -оксибутирамида (XXXV) [49]:



Скорость реакции описывается следующим уравнением:

$$v = (-k_{\text{OH}} [\text{OH}^-] + k_0) [\text{XXXV}],$$

в то время как для бутирамида член k_0 отсутствует. Эффект ускорения под влиянием гидроксильной группы составляет 10—20 раз для щелочного гидролиза и не менее 800 раз для гидролиза непосредственно водой. Механизм гидролиза XXXV включает атаку амидной группы свободной или ионизированной гидроксильной группой с промежуточным образованием бутиролактона.

* * *

Итак, внутримолекулярные реакции характеризуются значительно большими скоростями, чем соответствующие межмолекулярные процессы. Наблюдаемые значения отношения k_1/k_2 для констант скоростей внутримолекулярной реакции k_1 и межмолекулярной реакции сравнения k_2 вплоть до 10^7 М могут быть объяснены сближением и взаимной ориентацией реагирующих групп (уравнение 2.30). То, что в некоторых системах удалось реализовать ускорения, значительно превосходящие теоретический предел механизма сближения и ориентации, находит объяснение в механизме «напряжения» (при сжатии реакционных центров, сопровождающем отталкивание боковых «химически инертных» групп).

Кроме того, важно указать, что довольно часто внутримолекулярные реакции идут не по тем механизмам, что межмолекулярные. Более того, обыкновенно группы, вообще не обладающие заметной каталитической активностью в межмолекулярных реакциях, приобретают ее во внутримолекулярных процессах. Это обстоятельство необходимо учитывать при рассмотрении механизмов ферментативных реакций.

§ 3. Эффекты полифункциональности

Активные центры ферментов содержат, как правило, несколько функциональных групп, принимающих участие в активации субстрата (см. гл. II). Можно представить себе два механизма этого явления: все группы обладают однотипной природой, например нуклеофильной Nu:



или разнотипной:

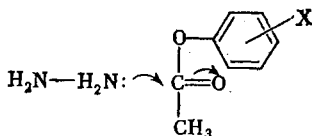


Присутствие второго нуклеофила или дополнительная электрофильная (E1) активация субстрата могут, в принципе, повлиять на распределение электронной плотности в переходном комплексе так, что энергия его образования окажется более низкой. Однако включение в переходный комплекс дополнительной частицы должно приводить к неблагоприятному изменению энтропии при его образовании. Суммарное изменение свободной энергии активации, определяющей скорость реакции, будет таким образом зависеть от относительной величины изменения ΔH^\ddagger и $T\Delta S^\ddagger$. Этот вопрос был подробно исследован Брюсом и Бенковичем [50] на примере реакций замещенных фенилацетатов с гидразином и имидазолом.

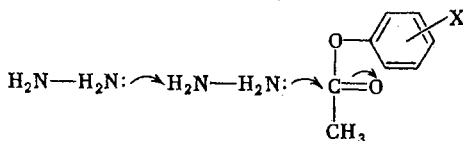
Наблюдаемая константа скорости псевдопервого порядка расщепления сложного эфира при реакции с гидразином имеет вид

$$k = k_{\text{H}} [\text{NH}_2\text{NH}_2] + k_{00} [\text{NH}_2\text{NH}_2]^2 + k_{0\text{K}} [\text{NH}_2\text{NH}_2] [\text{NH}_2\text{NH}_3^+] \quad (3.7)$$

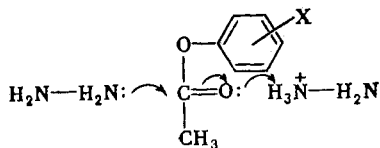
где k_{H} — константа скорости нуклеофильной реакции:



k_{00} — константа скорости реакции, катализируемой общим основанием типа уравнения (3.5):



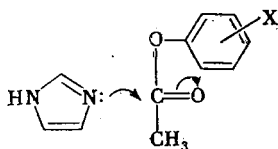
$k_{0\text{K}}$ — константа скорости реакции, катализируемой общей кислотой типа уравнения (3.6):



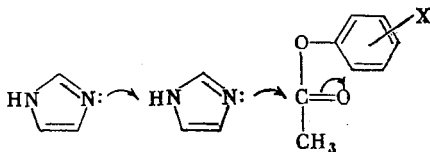
Как видно, на этом примере можно проследить за изменением активационных параметров при переходе от некаталитической (k_{H}) бимолекулярной реакции к каталитическим (k_{00} и $k_{0\text{K}}$) тримолекулярным процессам. Величины констант, отвечающих уравнению (3.7), а также соответствующие активационные параметры приведены в табл. 19. Там же приведены константы скорости и активационные параметры реакции с имидазолом, для которой

$$k = k_{\text{H}} [\text{Им}] + k_{00} [\text{Им}]^2, \quad (3.8)$$

где k_H — константа скорости нуклеофильной реакции:



k_{00} — реакции, катализируемой общим основанием:



Как видно из табл. 19, увеличение порядка реакции на единицу приводит к понижению энthalпии активации на 3—6 ккал/моль (12,6—25,2 кДж/моль). Эта величина отражает, в первом приближе-

Таблица 19

Константы скорости и активационные параметры реакций гидразина и имидазола с замещенными фенилацетатами [50]

Заместитель	k_H , $M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$	ΔH^\ddagger , ккал/моль	$T\Delta S^\ddagger$, ккал/моль	k_{00} , $M^{-2} \cdot \text{мин}^{-1}$	ΔH^\ddagger , ккал/моль	$T\Delta S^\ddagger$, ккал/моль	k_{00} , $M^{-2} \cdot \text{мин}^{-1}$	ΔH^\ddagger , ккал/моль	$T\Delta S^\ddagger$, ккал/моль
$n\text{-NO}_2^*$	327	6,8	-9,7						
$m\text{-NO}_2^*$	39,7	10,9	-6,5						
H^*	0,245	11,3	-9,0	10,75	4,1	-14,2	2,62	0,9	-18,4
$n\text{-CH}_3^*$	0,130	12,0	-8,6	7,86	5,8	-12,7	1,98	0,3	-19,1
$n\text{-OCH}_3^*$	0,097			8,20	5,0	-13,4	1,02	1,5	-17,9
$n\text{-CH}_3^{**}$	0,333	6,2	-14,4	0,105	5,5	-15,8			
$n\text{-OCH}_3^{**}$	0,323			0,095					

* Реакция с гидразином, константы скорости приведены при 18°C.

** Реакция с имидазолом, константы скорости приведены при 34°C.

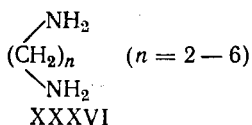
нии, эффект более благоприятного распределения электронной плотности в переходных состояниях полифункциональных (многокомпонентных) систем. С другой стороны, этот благоприятствующий реакции энthalпийный вклад сопровождается практически эквивалентным уменьшением энтропийного члена $T\Delta S^\ddagger$. Об определенной общности наблюдаемого явления свидетельствует то, что для 10 различных

гидролитических реакций [6, 50], кинетический порядок n которых равен или превышает 2, выполняется следующее соотношение:

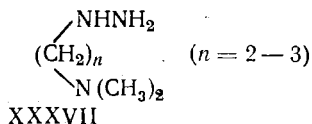
$$-\frac{T\Delta S^\ddagger \text{ (ккал/моль)}}{4,5 \text{ (ккал/моль)}} = n. \quad (3.9)$$

Этот своеобразный «компенсационный эффект» открывает, казалось бы, довольно простой путь к созданию высокоактивных катализаторов: достаточно синтетическим путем объединить в одну молекулу хотя бы две функциональные группы, потенциально способные одновременно [по механизмам типа (3.5) или (3.6)] участвовать в образовании переходного состояния. Включение их в одну молекулу уже в исходном состоянии реакции может в значительной степени снизить энтропийные потери, необходимые при построении переходного состояния. В то же время энтальпийный выигрыш бифункционального катализа (3—6 ккал/моль, т. е. 12,6—25,2 кДж/моль) мог бы обеспечить ускорение реакции в 10^2 — 10^4 раз по сравнению с монофункциональным катализатором.

Однако в действительности все обстоит гораздо сложнее. Попытка создать такой бифункциональный катализатор была предпринята Брюсом и Федором [51] на примере взаимодействия фенилацетата с диаминами следующего строения:



а также с аминопроизводными гидразина:



Для аминолиза фенилацетата аммиаком доказано существование в этой реакции общего основного катализа [52]. Для реакции с гидразином, как мы уже видели, возможен как общий основной, так и общий кислотный катализ [см. уравнение (3.7)]. Тем не менее диамины (XXXVI) обнаруживают реакционную способность, которая не выходит за рамки зависимости Бренстеда, полученной для ряда монофункциональных аминов [51] (рис. 22). Это указывает на отсутствие ожидаемого дополнительного эффекта второй аминогруппы.

Поведение молекул (XXXVII) оказалось более сложным. Зависимость скорости от pH определяется значением pK_a аминогруппы, причем монопротонированная (по аминогруппе) молекула не реакционна. Это позволяет сразу отвергнуть механизм общего кислотного катализа. Поэтому можно было бы полагать (следуя наблюдаемой pH-зависимости), что идет нуклеофильная атака диметиламиногруппой. В этом случае скорость реакции с участием XXXVII (точки 14) нужно сопоставить со скоростью реакции с триметиламином

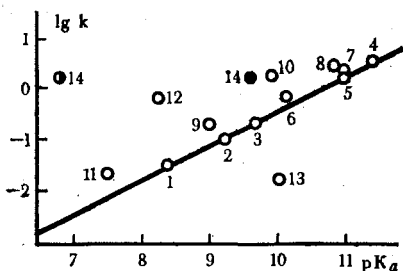
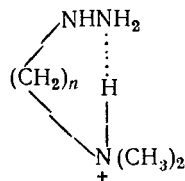


Рис. 22. Зависимость Брэнстеда для реакции азотсодержащих нуклеофилов с ацетатом [51] [прямая проведена по точкам 1—5; для 14 значение $\lg k$ отложено против pK_a аминной (●) и против pK_a гидразиновой (○) групп]:

- (1) NC1=CC=CC=C1O; (2) N; (3) NCC(=O)[O-];
 (4) NC1=CC=CC=C1; (5) CC(C)N;
 (6) NCCCN; (7) NCCCN;
 (8) NCCCCN; (9) NCCCN;
 (10) NCCCN; (11) NCCCN;
 (12) NCCCN; (13) N(C)C;
 (14) CCNCCN

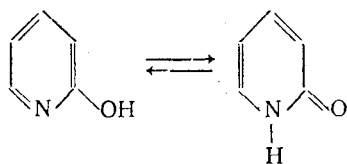


В этом случае на графике, соответствующем зависимости Брэнстеда, соединение XXXVII следует отнести не к абсциссе, равной pK_a диметиламиногруппы (pK_a триэтиламина), а к более низкому значению pK_a , соответствующему этилгидразину (рис. 22). При таком подходе скорость ацилирования XXXVII ацетатом оказывается в 10^3 выше величины, отвечающей его основности. Такое положительное отклонение можно объяснить хотя бы частично так называемым α -эффектом (см. [5, 6]), обуславливающим, кстати говоря, положительное отклонение точки 12 для гидразина (рис. 22). Однако в значительной степени ($\sim 10^2$) наблюдаемое ускорение должно быть связано с общим основным катализом диметиламиногруппой.

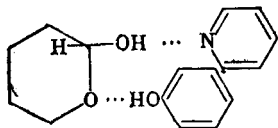
Таким образом, в общем виде возможность искусственного создания бифункционального катализатора можно считать доказанной, однако создать действительно высокорекционноспособную систему по сравнению с монофункциональными молекулами все же еще не удалось.

По-видимому, до сих пор единственным примером безусловного повышения каталитической активности при объединении в одной молекуле двух функциональных групп является мутаротация тетраметилглюкозы в бензоле, катализируемая α -пиридоном [53], находящимся в таутомерном равновесии с оксипиридином:

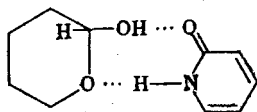
(точка 13), которая, как видно на рис. 22, в 100 раз меньше (в свою очередь реакция с триметиламином идет на 2 порядка медленнее, чем следовало бы на основании зависимости Брэнстеда, что, вероятно, связано со стерическими затруднениями). Это указывало бы, что реакция усилена общесосновным катализом гидразиновой группой. Однако такой механизм не возможен для третичной аминогруппы [51]. Поэтому остается заключить, что нуклеофильную атаку все же ведет гидразиновая группа, однако в монокатионе она дезактивирована катионной диметиламиногруппой:



Эффективный катализатор мутаротации в этих условиях—смесь фенола с пиридином (причем реакция имеет первый порядок по каждому из реагентов). Это согласуется с кислотно-основным катализом по ехеме

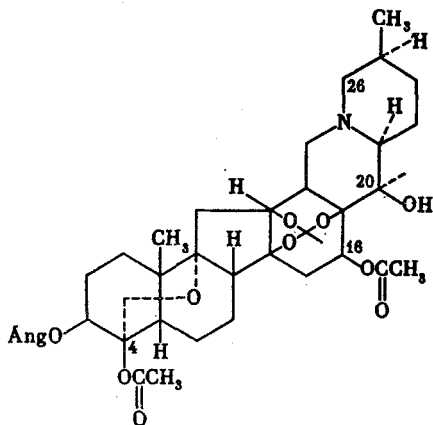


Однако α -пиридон (XXXVIII), объединяющий кислотную и основную функции в одной молекуле, катализирует реакцию значительно сильнее, чем смесь фенола с пиридином, а именно, скорость реакции в присутствии 0,001 М XXXVIII в 7000 раз выше, чем в присутствии смеси 0,001 М фенола и 0,001 М пиридина. Механизм катализа может быть в данном случае изображен [6] таким образом:



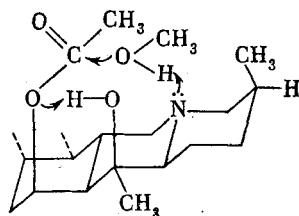
Интересно отметить, что скорость катализируемой XXXVIII мутаротации в бензоле в 10 раз выше, чем скорость мутаротации в воде, катализируемой H_3O^+ ионом, однако в водном растворе XXXVIII каталитически не активен.

Сильный полифункциональный катализ описан [54] для случая метанолиза стероида (XXXIX), содержащего сложноэфирные группы в положениях 4, 16. Группа в положении 4, как и все алифатические



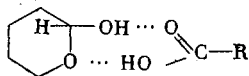
XXXIX

сложные эфиры, не подвергается метанолизу с измеримой скоростью, однако в положении 16 метанолиз идет с константой скорости $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ при 25° . Механизм метанолиза XXXIX может быть представлен схемой бифункционального общесосновного-общекислотного катализа:



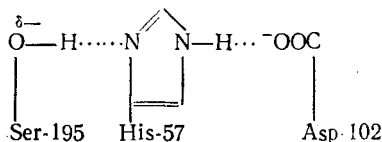
Участие в катализе группы OH (в 20-м положении) доказывается замедлением сольволиза в 10^3 раз для стероида, содержащего простую эфирную связь между C-20 и C-26. На участие третичного азота в механизме реакции указывает замедление сольволиза в 25 раз при формилировании этого атома.

Довольно часто допускают полифункциональный катализ оксианионами: фосфатом, бикарбонатом или свободными карбоновыми кислотами. Предположение о полифункциональности основано, как правило, на том, что эти соединения обладают каталитической активностью значительно большей, чем сравнимые с ними по кислотно-основным свойствам, но заведомо монофункциональные соединения. Например, мутаротация тетраметилглюкозы в бензоле [53] катализируется трихлоруксусной кислотой ($pK_a = 0,7$) в 540 раз эффективней, чем пикриновой ($pK_a = 0,8$); и даже гораздо более слабая бензойная кислота ($pK_a = 4,2$) в 76 раз эффективнее пикриновой. Это можно объяснить механизмом с одновременным участием карбонильной и гидроксильной групп:



В водном растворе бифункциональные катализаторы также эффективны, однако, как правило, приводят к сравнительно небольшим ускорениям. Например, гидролиз 4-оксибутиранилида очень слабо катализируется имидазолом, в то время как фосфат, обладающий такой же основностью, приводит к более чем десятикратному ускорению реакции [55]. Это, пожалуй, один из наиболее сильных эффектов такого рода, наблюдавшихся в водном растворе.

Много попыток было сделано по созданию модели системы с «эстафетной передачей заряда», которая функционирует в активном центре α -химотрипсина (а возможно, и других сериновых протеаз):

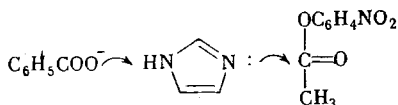


Нуклеофильная способность гидроксильной группы Ser-195, атакующей субстрат, усилена благодаря существованию системы водородных связей с участием остатков His-57 и Asp-102 (см. гл. IV). Поскольку предполагается, что карбоксильная группа в ферменте находится в гидрофобном окружении, модельные системы строились на основании реакций, идущих в неводных растворителях.

Так было найдено [56], что взаимодействие *n*-нитрофенилацетата с имидазолом в ацетонитриле, содержащем 1,0 М воды и смесь $N(CH_3)_4ClO_4 + N(CH_3)_4C_6H_5COO$, суммарная концентрация которых поддерживалась равной 0,01 М, подчиняется кинетическому уравнению типа (3.8):

$$k_{набл} = k_n [Им] + k_{oo} [Им]^2 + k'_{oo} [Им] [C_6H_5COO^-], \quad (3.10)$$

где $k_n = 3,1 \cdot 10^{-3} \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$; $k_{oo} = 1,3 \cdot 10^{-2} \text{ М}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$; $k'_{oo} = 1,0 \text{ М}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Здесь в отличие от водного раствора, где второй порядок по имидазолу (или гидразину) наблюдается только для эфиров с «плохими» уходящими группами (см. табл. 19), второй порядок наблюдается и для *n*-нитрофенилового эфира. Это связано с тем, что нуклеофильная атака карбонильного углерода сложноэфирной группы имидазолом сопровождается разделением зарядов в переходном состоянии, поэтому она сильно тормозится в неводном растворителе (k_n в воде равна $0,48 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ [57]). В результате этого замедления даже для реакции с *n*-нитрофениловым эфиром становится заметным на опыте общий основной катализ второй молекулой имидазола. Присутствие в уравнении (3.10) члена с k'_{oo} указывает на участие в реакции механизма общесосновного катализа:

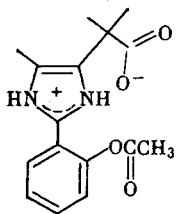


вполне аналогичного механизму с эстафетной передачей заряда. Однако не следует забывать, что реакция в ацетонитриле сильно замедлена и общесосновной катализ бензоатным ионом даже не доводит ее скорость до скорости нуклеофильного взаимодействия имидазола с *n*-нитрофенилацетатом в воде. Действительно, максимальное значение константы скорости псевдвторого порядка (при $[C_6H_5COO^-] = 0,01 \text{ М}$) равно $0,01 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ [56].

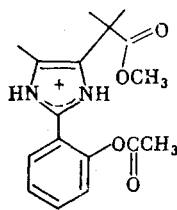
Значительно большие эффекты ускорения были получены при исследовании аминолиза *n*-нитрофенилацетата пиперидином и имидазолом в безводном толуоле, содержащем бензоат *тетра-н*-гексиламмония [58]. Для реакции с пиперидином (П) получено выражение типа (3.10): $k_{набл} = k_n [П] + k_{oo} [П]^2 + k'_{oo} [П] [C_6H_5COO^-]$, где $k_n = 0,011 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$; $k_{oo} = 0,24 \text{ М}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$; $k'_{oo} = 280 \text{ М}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Так как бензоат в водном растворе гораздо менее основан, чем пиперидин, а каталитической активностью в толуоле обладает более высокой ($k'_{oo} \gg k_{oo}$), Менджер с сотр. [58] полагают, что в толуоле эти молекулы

различаются по основности в обратном порядке, что, впрочем, допускается и для химотрипсина [59].

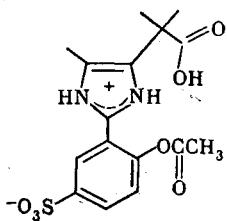
Возможность существования системы с эстафетной передачей заряда в водном растворе подробно исследовалась Брюсом с сотр. [60]. Были синтезированы молекулы, содержащие сближенные карбоксильную, имидазольную и сложноэфирную или только две последние группы:



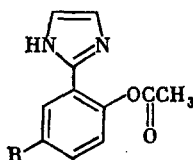
XL



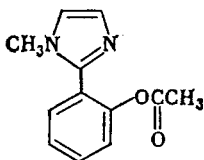
XLI



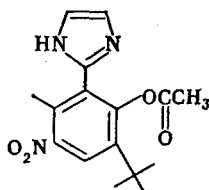
XLII



XLIII



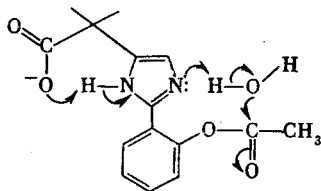
XLIV



XLV

(a) R = H; б) R = SO₃⁻

Имидазольная группа функционирует при гидролизе этих соединений как общесной катализатор. Предполагаемое участие карбоксильной группы может быть представлено с помощью механизма



эквивалентной системе с «эстафетной передачей заряда», действующей на стадии гидролиза ацилфермента (см. гл. IV).

Из зависимостей скоростей гидролиза XL—XLV от pH были вычислены константы скорости k_0 , отвечающие реакции с незаряженной формой имидазола. Полученные данные удобно представить в виде Бренстедовской зависимости $\lg k_0$ от ΔpK_a (ΔpK_a — разность pK_a уходящего фенола и pK_a имидазольной группы). Эта зависимость показана на рис. 23. Отрицательное отклонение для XLIV можно объяснить особенностями катализа N-метилированным имидазолом [60]. Для соединения XLI, XLIII а и б, XLV, не содержащих карбоксильной группы, величина $\lg k_0$ линейно зависит, причем с очень небольшим наклоном, от ΔpK_a . Введение карбоксильной группы в анионной форме приводит к положительному отклонению от этой прямой. Как видно из рис. 23, участие карбоксилатаниона несомненно приводит к ускорению, однако оно невелико (приблизительно в 3 раза) и, по мнению авторов [60], не может играть существенной роли в ферментативном катализе. При переходе от водного раствора к ацетонитрилу, содержащему 3,3 М воды, эффект почти не усилился. Константа скорости гидролиза XLII в этом растворителе лишь в 4,5 раза выше константы скорости гидролиза XLIII б, причем также почти не изменились и абсолютные скорости гидролиза этих соединений. В этом состоит определенное отличие этой системы от предыдущих, где было найдено, что реакция в неводном растворителе сильно тормозится, но зато и сильно ускоряется карбоксилатными анионами.

В итоге на основании модельных экспериментов можно заключить [60], что система с эстафетной передачей заряда может эффективно действовать только в каких-то совершенно специфических структурных условиях, которые в ферменте существуют благодаря гетерогенной природе белковой макромолекулы. А именно, для функционирования такого трехкомпонентного катализатора требуется, по-видимому, полная дегидратация карбоксильной группы, но при этом должен сохраниться свободным доступ для воды к расположенной рядом имидазольной группе.

§ 4. Полимерные модели

Макромолекулярная природа белков, естественно, заставляет обратиться к каталитическим системам на основе синтетических полимеров как моделям ферментов. Именно в полимерных системах представляется наиболее вероятной возможность создания катализаторов, приближающихся по своей активности и принципам действия к ферментам [61].

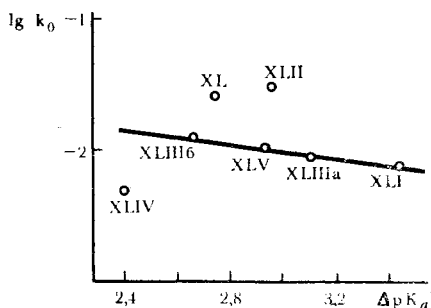
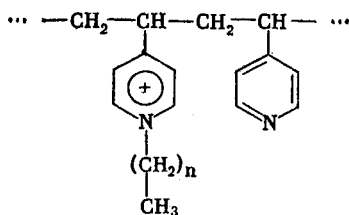


Рис. 23. Зависимость константы скорости гидролиза соединений (XL—XLV), содержащих незаряженную имидазольную группу, от разности pK_a уходящего фенола и имидазольной группы [61]

Практически неограниченная возможность синтеза и модификации полимерных молекул позволяет сочетать в пределах одной макромолекулы различные функциональные группы, необходимые для создания как сорбционного, так и каталитического участков активного центра. Такую задачу, однако, можно решить лишь в том случае, если удастся синтезировать полимер с определенной третичной структурой, одинаковой для всех макромолекул и стабильной во времени. Вопрос о принципиальной возможности построения таких систем рассмотрен В. А. Кабановым [62].

1. Как правило, макромолекула синтетического полимера в растворе не имеет определенной третичной структуры, а находится скорее в виде статистического клубка. Лишь для некоторых полимеров, характеризующихся взаимодействием между отдельными звеньями полимерной цепи, можно предполагать образование более компактных частиц, как, например, в алкилированном поливинилпиридине:



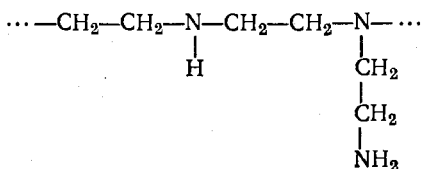
XLVI

В молекуле XLVI гидрофобное взаимодействие между углеводородными цепями хотя и приводит к некоторым элементам упорядоченности (аполярное ядро, окруженное гидрофильными заряженными группами), однако и здесь трудно говорить об определенной, одинаковой для всех макромолекул структуре.

2. Анализ этой проблемы методами математического моделирования показывает, что создание «закрепленной» структуры все же возможно, но только для макромолекул, обладающих достаточной жесткостью цепей и с сильно взаимодействующими звеньями. Другой путь — это присоединение к макромолекуле групп, способных к взаимодействию [при условии обеспечения их миграции вдоль цепи (сополимер с переменной первичной структурой)]. Следует ожидать, что в таком сополимере должен протекать процесс самонастройки, т. е. самопроизвольный процесс «выбора» макромолекулой конформации, отвечающей минимуму свободной энергии. Теоретический анализ показал, что для сополимера данной молекулярной массы и состава существует лишь небольшой набор таких «закрепленных» конформаций. Экспериментальным обоснованием для таких представлений послужили исследования о влиянии поверхностно-активных веществ на структуру полиэлектролитов в растворе [62, 63]. В подобного рода системах роль мигрирующих взаимодействующих групп играют ионы поверхностно-активных веществ, электростатически присоединенные к цепи полиэлектролита и гидрофобно-взаимодействующие между собой углеводородными радикалами.

Итак, создание синтетическим путем макромолекулы с уникальной устойчивой третичной структурой в принципе возможно. Трудно, однако, сказать, какова вероятность отбора при синтезе именно каталитически активной конформации. Тем не менее (даже без «закрепленной» третичной структуры) полимерные модели привлекают к себе столь широкое внимание, что число работ, посвященных этим системам, исчисляется сотнями. Однако обнаруживаемое увеличение реакционной способности функциональных групп, присоединенных к полимерной цепи, в большинстве изученных систем обусловлено лишь «тривиальными» эффектами среды (приводящими, например, к кажущемуся сдвигу pK_a) или же локальным концентрированием субстрата на полимере [62]. Те же эффекты играют основную роль и в мицеллярном катализе (см. § 6 этой главы). Это не удивительно, поскольку макромолекулярные частицы «полимерного мыла» (типа XLVI) по таким свойствам, как характер взаимодействия гидрофобных и гидрофильных фрагментов друг с другом и с другими компонентами раствора, подвижность отдельных звеньев, диэлектрическая проницаемость и др., близки к мицеллам поверхностно-активных веществ [64]. Рассмотрим некоторые примеры.

Полиэтиленмин (XLVII) практически не реагирует с *n*-нитрофениловыми эфирами карбоновых кислот, хотя и содержит нуклеофиль-

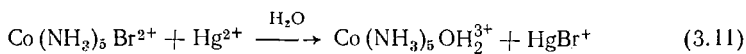


XLVII

ные атомы азота. Каталитическая активность в реакции гидролиза указанных субстратов возникает лишь при ацилировании XLVII жирными кислотами [65] или при алкилировании его бензилхлоридом [66, 67]. Для бензилированного XLVII показано, что появление каталитической активности сопровождается резким уменьшением характеристической вязкости раствора. По-видимому, такое явление связано с глобулизацией модифицированных («гидрофобизованных») молекул (XLVII), т. е. с образованием мицеллоподобных частиц. Отношение константы скорости второго порядка для взаимодействия субстрата с полимерным нуклеофилом к аналогичной константе скорости для реакции сравнения, протекающей с участием низкомолекулярного аналога (диметилбензиламин), достигает величины 10^2 — 10^5 в зависимости от степени бензилирования (гидрофобизации) полимера и длины углеводородной цепи в ацильном остатке субстрата. Увеличение степени гидрофобности как полимера, так и субстрата усиливает каталитический «полимерный эффект». Это как раз и согласуется с представлением, что причина наблюдаемого ускорения заключается в концентрировании субстратных молекул (за счет гидрофобных взаимодействий) на полимере (вблизи нуклеофила). В целом масштаб и природа (механизм) каталитического эффекта обнаруживают полную аналогию с

изменением реакционной способности нуклеофилов при сорбции их в поверхностном слое ионных мицелл (см. § 6 этой главы).

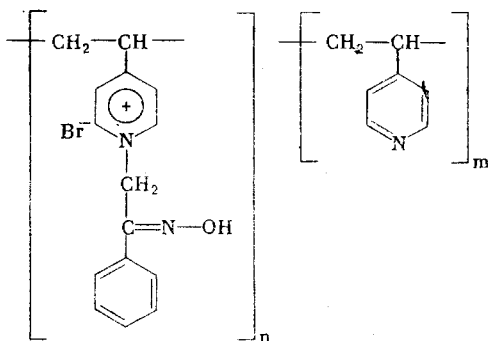
Роль электростатических эффектов в катализе полиэлектролитами изучил Моравец [68, 69]. Примером такой системы могут служить реакции акватации типа



в присутствии поливинилсульфатов [70]. Введение полианиона в реакцию (3.11) приводит к ее ускорению примерно в 10^6 раз. Механизм ускорения заключается в том, что в результате сорбции катионов реагентов на полианионе происходит их сближение (концентрирование). На реакцию (3.11) оказывают каталитическое влияние также анионные мицеллы алкилсульфонатов, причем в мицеллярной системе наблюдаются те же явления (величина ускорения, ингибирование противоионами), что и в полимерной [71].

И, наконец, укажем на одновременное проявление электростатических и гидрофобных эффектов в катализе «гидрофобизованными» полиэлектролитами. Так, полистиролсульфо кислота обнаруживает повышенную каталитическую активность (по сравнению с мономером) в кислотнокатализируемой реакции гидролиза сложных эфиров алифатических кислот [72]. Механизм ускорения заключается, по-видимому, в следующем. Гидрофобное взаимодействие между углеводородными фрагментами молекулы сложного эфира и аполярными областями в полимерной частице обеспечивает концентрирование субстрата на полимере. Кроме того, необходимо также принять во внимание концентрирование ионов водорода в поверхностном слое полимерной частицы за счет их электростатического взаимодействия с отрицательным зарядом полимера. Этот эффект приводит к локальному понижению рН вблизи сорбированных реагентов и благоприятствует протеканию кислотнокатализируемой реакции.

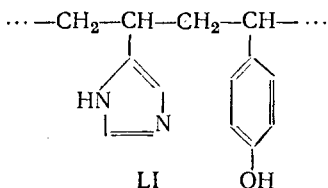
Другой пример — повышенная реакционная способность оксимной группы в частично алкилированном поливинилпиридине следующего строения [73]:



XLVIII

тацию, но ясно одно, что одним механизмом сближения его объяснить нельзя.

В настоящее время на поиски эффектов полифункциональности в полимерном катализе направлены значительные усилия. В литературе стал уже классическим пример [77] реакции гидролиза *n*-нитрофенилацетата, катализируемой сополимером



содержащим имидазольные и фенольные группы в мольном соотношении 1:2. Из рН-зависимости для скорости реакции, приведенной в табл. 20, видно, что во взаимодействии с субстратом принимает участие

Таблица 20

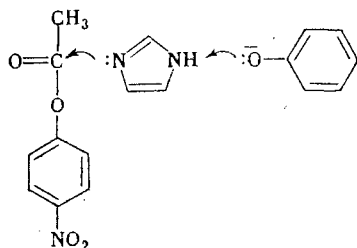
Гидролиз *n*-нитрофенилацетата в присутствии полимерных имидазолсодержащих катализаторов [77]*

рН	$10^4 \cdot k_{\text{набл}}, \text{ мин}^{-1}$		
	Сополимер (LI)	Поливинилимидазол	Имидазол**
7,4	3,0	2,1	2,6
8,2	5,1	3,0	2,4
9,1	28,6	3,2	2,7

* В 80%-ном этаноле при концентрации имидазола $2,6 \cdot 10^{-4}$ М.

** В водном растворе $10^4 k_{\text{набл}} = 52 \text{ мин}^{-1}$ (вычислено по данным [6]).

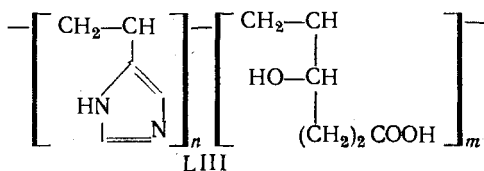
функциональная группа сополимера с $pK_a > 8$. Это, по-видимому, фенольная группа, поскольку pK_a имидазольного остатка ~ 7 . Исходя из того, что в условиях опыта [77] фенолят-ион не реагирует с *n*-нитрофенилацетатом, авторы для объяснения наблюдаемой рН-зависимости (см. табл. 20) предполагают образование бифункционального каталитического центра, содержащего имидазольную и ионизованную гидроксильную группы, например:



ЛИ

Нам, однако, представляется более вероятным другой механизм. Обратим внимание, что реакция проводилась в среде с пониженной диэлектрической проницаемостью (80%-ный этанол), что, с одной стороны, способствует проявлению полифункциональных механизмов (см. § 3 этой главы), но, с другой стороны, сильно тормозит реакцию электронейтрального имидазола (см. табл. 20) [78]*. Поэтому не исключено, что ионизация рядом расположенной фенольной группы лишь создает предпосылки для благоприятствующего реакции локального изменения среды вокруг имидазольного нуклеофила.

Указания на возможное участие в катализе полифункционального механизма были получены и для реакций с участием поливинилимидазола [85] или поливинилбензимидазола [86] (предполагается одновременное участие электронейтральной и анионной форм нуклеофила), а также для сополимера (LIII):



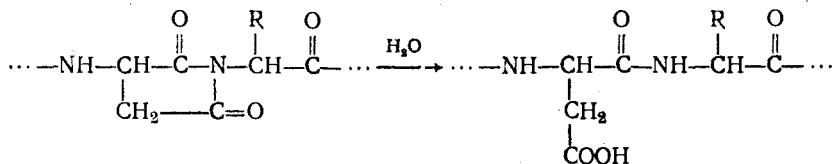
где в принципе возможно, что в переходном состоянии принимают участие имидазольная, гидроксильная и карбоксильная группы [87]. Однако во всех этих случаях эффект ускорения, который можно было бы отнести к механизму полифункционального действия, не превышает 5 раз.

Исследованы также каталитические свойства поли- α -аминокислот, полученных тепловой полимеризацией мономеров [88]**. Как правило, реакционная способность боковых групп аминокислотных остатков в этих полимерах (например, имидазольной группы гистидина, участвующей в нуклеофильном катализе гидролиза *l*-нитрофениловых эфиров) не превышает реакционную способность свободных аминокислот.

Резюмируя, отметим, что полимерный катализ, по-видимому, еще далеко не исчерпал всех возможностей, которые потенциально заложены

* Вообще, по-видимому, пониженная диэлектрическая проницаемость в среде полимерной частицы являлась причиной низкой активности многочисленных имидазолсодержащих полимерных катализаторов [79—83]. На это указывают также данные по реакционной способности *N*-алкилимидазолов, сорбированных ионными мицеллами поверхностно-активных веществ [84].

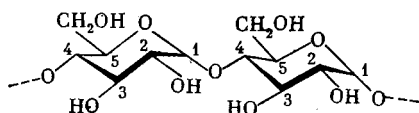
** Интересная особенность полиаминокислотных катализаторов [88] — это обнаруженная для них тепловая денатурация, которая, как оказалось, связана с гидролизом имидных связей, побочно образующихся при синтезе полимеров, например:



ны в нем как модели ферментативных механизмов. Основные усилия должны быть направлены сейчас прежде всего на создание полуфункциональных макромолекул с относительно закрепленной третичной структурой, устойчивой во времени [62].

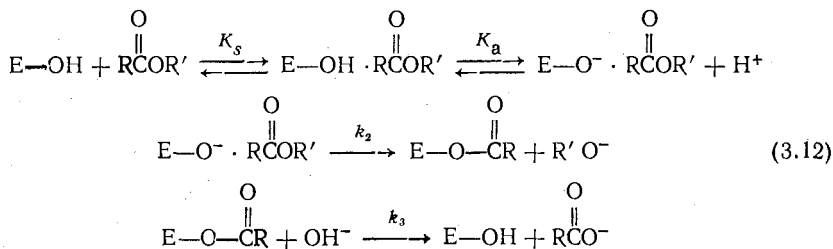
§ 5. Катализ циклоамилозами

Представление об исключительно точном геометрическом соответствии молекулы субстрата активному центру фермента как об источнике высокой специфичности при ферментативном катализе послужило основой для исследования каталитических свойств молекул циклоамилоз, обладающих строгой и хорошо известной геометрией [89]. Химически циклоамилозы представляют собой циклические полимеры, содержащие не менее шести *D*(+)-глюкопиранозных структурных единиц, соединенных α -(1,4)-глюкозидными связями. Участок цепи циклоамилозы имеет следующий вид:



Структура циклоамилоз была подробно исследована рентгенографически и методом ЯМР [89]. Важнейшие физические свойства наиболее распространенных циклоамилоз приведены в табл. 21. Циклоамилозы могут образовывать так называемые соединения включения с большим числом органических молекул, способных по своим размерам помещаться в полость, образованной полимерным кольцом. Константы устойчивости таких ассоциатов обычно лежат в пределах от 1 до 10^4 М, причем в первую очередь определяются гидрофобностью и размерами связываемых молекул.

Подробно изучен катализ циклоамилозами гидролиза ряда феноловых эфиров [90]. Эта реакция идет по следующему механизму:



напоминающему механизм гидролиза химотрипсином (см. гл. IV). В схеме (3.12) E—OH представляет собой циклоамилозу, причем было показано модификацией групп, что активна OH-группа в положении С-2. Зависимость скорости реакции от концентрации циклоамилозы имеет характерный вид кривой с насыщением. Авторами обнаружено также четко выраженное явление конкуретного ингибирования.

Физические свойства циклоамилоз [89]

Циклоамилоза	Число остатков глюкозы	Размеры полости, Å		Растворимость в воде, г/100 мл
		диаметр	глубина	
Циклогексаамилоза . . .	6	4,5	6,7	14,5
Циклогептаамилоза . . .	7	7,0	7,0	18,5
Циклооктаамилоза . . .	8	8,5	7,0	23,2

Константы скорости и равновесия для случая циклогексаамилозы приведены в табл. 22. Основной вывод, к которому можно прийти,

Таблица 22

Кинетические данные для катализируемого циклогексаамилозой гидролиза замещенных фенилацетатов [90]

Заместитель	$10^4 k^*$, с ⁻¹	$10^4 k_z^{**}$, с ⁻¹	k_z/k_0	$10^{-2} K_s^{-1}$, М ⁻¹
<i>p</i> -трет-С ₄ С ₉	6,07	22	1,1	1,54
<i>p</i> -СН ₃	6,64	6,7	3,3	0,9
<i>p</i> -NO ₂	69,4	243	3,5	0,83
<i>p</i> -COOH	12,5	67	5,4	0,67
<i>o</i> -СН ₃	3,84	72	19	0,53
Н	8,04	219	27	0,45
<i>m</i> -COOH	8,15	555	68	0,095
<i>m</i> -СН ₃	1,96	658	95	0,59
3,5-СН ₃	5,80	1150	200	0,67
<i>m</i> -С ₂ Н ₅	5,49	1330	240	0,93
<i>m</i> -трет-С ₄ Н ₉	4,90	1290	260	5,0
<i>m</i> -NO ₂	56,0	17000	300	0,53

* Константа скорости псевдопервого порядка некаталитического гидролиза при рН 10,6 и 25°C.

** рН 10,6.

рассматривая эти данные, состоит в том, что наблюдаемое ускорение k_z/k_0 значительно выше для мета-замещенных эфиров, чем для пара-. Этот эффект сильно зависит от размеров кольца, как видно из табл. 23. В случае большого восьмичленного цикла специфичность катализа полностью исчезает. Авторы полагают, что эффект специфичности связан с плотным прижиманием сложноэфирной группы к ОН-группе катализатора в случае мета-замещенных эфиров (рис. 24, б). Для пара-производных (рис. 24, а) сближение сложноэфирной и гидроксильной групп затруднено, если полость мала, но может происходить свободно, если полость имеет большие размеры. Таким образом, заметное различие во взаиморасположении реагирующих групп может проявляться лишь при небольших размерах кольца.

Поскольку циклоамилозы содержат асимметрические атомы углерода, можно ожидать проявления в катализируемых ими реакциях

Влияние размеров кольца циклоамилозы на относительную специфичность к мета-замещенным эфирам [90]

Заместитель	$k_{\text{набл}}^*/k_0$		
	Циклогексаамилоза	Циклогептаамилоза	Циклооктаамилоза
<i>m</i> -трет- C_4H_9	226	250	54
<i>n</i> -трет- C_4H_9	1,7	2,2	41
<i>m</i> -Cl	113	18	7,8
<i>n</i> -Cl	3,0	10	8,8
<i>m</i> -NO ₂	103	54	10,0
<i>n</i> -NO ₂	2,6	6,7	6,2

* Константа скорости гидролиза псевдопервого порядка в присутствии 0,01 М циклоамилозы.

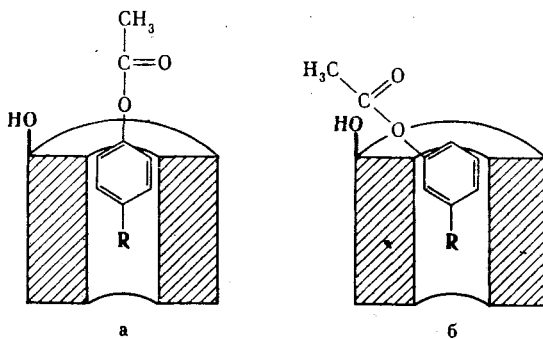
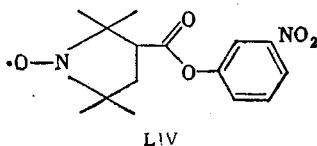


Рис. 24. Включение молекул *n*-замещенного (а) и *m*-замещенного (б) фенилацетатов в циклоамилозу, приводящее к вынужденному сближению 2-ОН группы амилозы и сложноэфирной группы субстрата в случае б

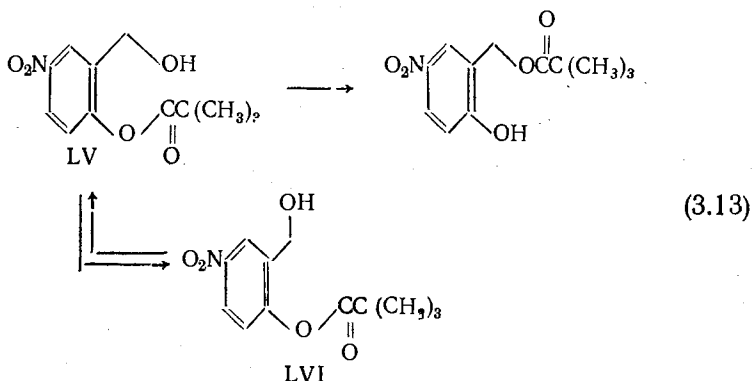
стереоспецифичности. Это действительно наблюдается. Например, гидролиз сложного эфира с асимметрическим атомом углерода



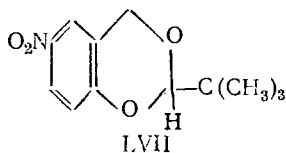
катализируемый циклогексаамилозой, идет по нуклеофильному механизму через промежуточное образование ацилпроизводного (k_2) и последующее деацилирование (k_3) [91]. Величина k_3 , а также константы ассоциации LIV с циклогексаамилозой для обоих энантиомеров совпадают, однако k_2 различаются в 8 раз. Другим примером высокой стереоспецифичности может служить катализируемый циклогексаамилозой гидролиз фосфорорганических соединений [92, 93].

Ускорения в реакциях, катализируемых циклоамилозами, могут быть обусловлены также эффектом микросреды. Например, процесс декарбоксилирования кислот, скорость которого возрастает при понижении диэлектрической проницаемости среды, ускоряется в 10—15 раз также и в присутствии циклоамилоз [89, 94, 95]. В этом случае, естественно, отсутствует зависимость эффективности катализа от положения заместителя и размеров кольца.

В связи с моделированием ферментативного катализа особый интерес представляет способность циклоамилоз индуцировать конформацию субстрата, близкую к переходному состоянию реакции. Примером такого «конформационного» ускорения, обусловленного созданием напряжения в молекуле субстрата, может служить влияние циклоамилоз на внутримолекулярную реакцию:



Реакция (3.13) в 6 раз ускоряется в присутствии циклогексаамилозы. Бендер с сотр. [96] полагает, что наблюдаемое ускорение вызвано тем, что при включении молекулы исходного реагента в полость циклогексаамилозы происходит преимущественное связывание ее именно в реакционноспособной конформации LV со сближенными реагирующими группами, а не LVI. Такое вынужденное сближение требует затраты энергии. Можно полагать, что на это тратится часть свободной энергии связывания субстрата на гексаамилозе. Такое представление находит подтверждение в том, что молекула LVII, которую можно рассматривать как структурный аналог переходного состояния реакции (3.13) и где явно не нужно тратить энергию на изменение конформационного состояния, имеет константу связывания с циклогексаамилозой, равную 82 M^{-1} , что в 4 раза больше величины 21 M^{-1} , характеризующей связывание субстрата LV—LVI. Это примерно соответствует наблюдаемому ускорению реакции.



Следует, однако, отметить, что приведенная оценка эффекта ускорения за счет вынужденного сближения групп в циклогексаамилозе несколько занижена. Дело в том, что в присутствии другого полисахарида — гептаамилозы эта же реакция тормозится в 5 раз. Наблюдаемое торможение, вероятно, не связано с какими-либо стерическими эффектами, так как в гептаамилозе цикл больше, чем в гексаамилозе (см. табл. 21), а это, как мы уже видели, приводит к исчезновению стерического влияния циклоамилоз на кинетику реакций (см. табл. 23). Наиболее вероятное объяснение этого торможения — неблагоприятный эффект микросреды. Действительно, из общих соображений реакция (3.13) должна тормозиться при понижении диэлектрической проницаемости [89]. Этот эффект должен иметь место и в случае шестичленного цикла. Тогда, полагая, что в семичленном цикле не происходит никакого вынужденного сближения групп, а проявляется только отрицательный эффект микросреды, получаем, что эффект напряжения, возникающего в молекуле субстрата при сорбции ее гексаамилозой, приводит фактически к 30-кратному ускорению.

§ 6. Реакции в присутствии мицелл поверхностно-активных веществ*

Мицеллообразующие поверхностно-активные вещества (ПАВ) характеризуются ярко выраженной дифильностью, т. е. их молекулы включают как гидрофобные, так и гидрофильные группы, например:

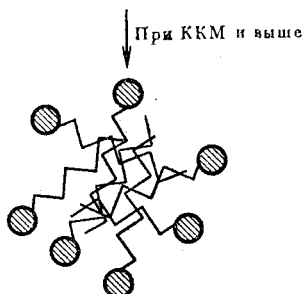
$\text{H}(\text{CH}_2)_{16}-\text{N}(\text{CH}_3)_3 \text{Br}^-$ бромистый цетилтриметиламмоний (ЦТАБ);

$\text{H}(\text{CH}_2)_{12}-\text{OSO}_3^- \text{Na}^+$ додецилсульфат натрия (ДСН);

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{H}$ неионогенное ПАВ на основе гидрофобизованного полиэтиленгликоля

В водном растворе молекулы ПАВ выше определенной концентрации (критическая концентрация мицеллообразования, ККМ) агрегируют, образуя так называемые мицеллы [98, 99]:

Гидрофобная углеводородная часть Гидрофильная группа



* Физико-химические основы мицеллярного катализа изложены в [98].

Значительные размеры мицелл (30 Å и более) позволяют рассматривать их (по крайней мере геометрически) как некоторую псевдофазу, которая, однако, не отделяется от водного раствора в виде макрофазы, а существует в диспергированном состоянии, образуя устойчивый изотропный раствор.

Характерная особенность структуры мицелл — это гидрофобное ядро, образованное углеводородными цепями молекул ПАВ, окруженное гидрофильным слоем их головных групп. Этим создается некоторое подобие мицеллярной структуры со структурой глобулярных белков (см. гл. I). Однако если белковая глобула — это относительно жесткое и весьма неоднородное образование, то мицелла ПАВ, напротив, носит псевдожидкий характер [100] и образована совершенно идентичными молекулами ПАВ. Хотя эти различия и накладывают существенные ограничения на использование мицелл как моделей ферментов [101], с другой стороны, именно благодаря простоте в построении мицелл в мицеллярных системах наиболее четко и достоверно могут быть прослежены такие эффекты, как стабилизация переходного состояния химической реакции за счет дополнительных сорбционных взаимодействий (или же сближение реагентов при их концентрировании), далее сдвиг pK_a реагирующих групп и влияние микросреды на скорость реакции.

Влияние мицелл ПАВ на химические реакции обусловлено их свойством сорбировать (связывать) различные низкомолекулярные вещества. В силу псевдожидкого строения мицелл связывание носит характер распределения низкомолекулярного вещества между мицеллярной и водной «фазами» и может быть охарактеризовано константой распределения P :

$$P = \frac{[A]_{\text{м}}}{[A]_{\text{в}}}, \quad (3.14)$$

определяемой для данного вещества A уравнением (3.14). Индексами «м» и «в» здесь и в дальнейшем отмечены величины, относящиеся к мицеллярной и водной «фазам» соответственно. Для неполярных ве-

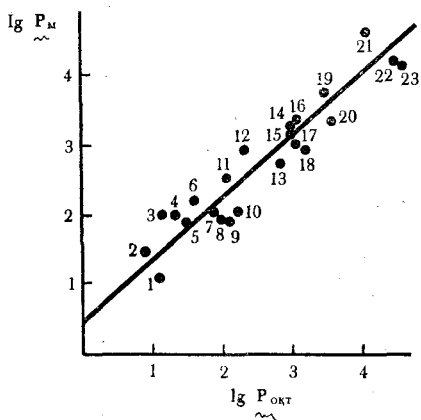


Рис. 25. Зависимость констант распределения органических соединений между водой и мицеллами (P_m) [102, 103] от констант распределения в системе вода — октанол $P_{\text{окт}}$ [104], если распределяемое вещество (ПАВ):

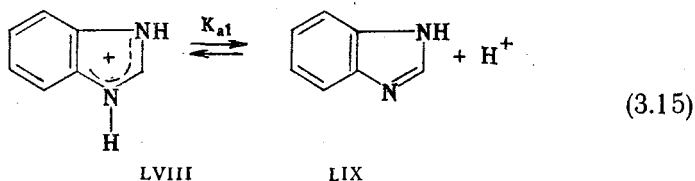
- 1 — метилбромид (ДСН, ЦТАБ); 2 — анилин (ДСН); 3 — метилбензимидазол (ЦТАБ); 4 — бензимидазол (ЦТАБ); 5 — бензальдегид (ДСН); 6 — 5-нитробензимидазол (ЦТАБ); 7 — *n*-нитрофенол (ДСН); 8 — *n*-нитрофенилacetат (ЦТАБ); 9 — бензол (ДСН); 10 — 2-бутирамидо-5-метилфенол (Тритон X-100); 11 — бензол (ЦТАБ); 12 — 5,6-диметилбензимидазол (ЦТАБ); 13 — 2-(2-фуранидо)-5-метилфенол (Тритон X-100); 14 — *n*-нитрофенилбутират (ЦТАБ); 15 — *n*-нитрофенилтриметилacetат (ЦТАБ); 16 — 2-бензамидо-5-метилфенол (Тритон X-100); 17 — α -нафтол (Тритон X-100); 18 — анизилтиоэтан (ДСН); 19 — 6-нитро-1-нафтол (Тритон X-100); 20 — *n*-нитрофенилсалцилат (ЦТАБ); 21 — 4-хлор-1-нафтол (Тритон X-100); 22 — *n*-нитрофенилгептаноат (ЦТАБ); 23 — *n*-нитрофенилгидроциннамат (ЦТАБ)

ществ движущей силой перехода их из воды в мицеллярную фазу является гидрофобное взаимодействие. На это указывает линейная корреляция величин P с константами распределения тех же веществ между водой и органическим растворителем, например октанолом (рис. 25).

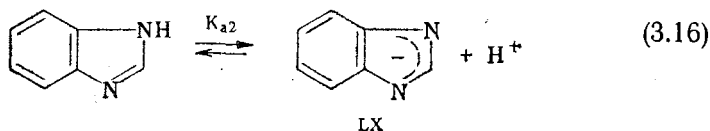
Ионы связываются в поверхностном слое мицеллы за счет электростатического взаимодействия с заряженными группами ПАВ. Коэффициент распределения зависит от электростатического потенциала мицеллы и равен примерно 10—100 для ионов с единичным зарядом, противоположным по знаку заряду мицеллы [98]. Естественно, ионы, одновременно заряженные с мицеллой, ею отталкиваются.

Связанные молекулы (или ионы) некоторым образом ориентированы в мицелле. Так, гидрофильные группы молекул (такие как OH, COOH, C=O, NH₂) стремятся сохранить при связывании контакт с водой и поэтому они локализируются в поверхностном слое; гидрофобные фрагменты связанных молекул расположены, как правило, в ядре мицеллы.

Кажущийся сдвиг pK_a под действием мицелл и его кинетические проявления. В случае ионогенного вещества, например бензимидазола

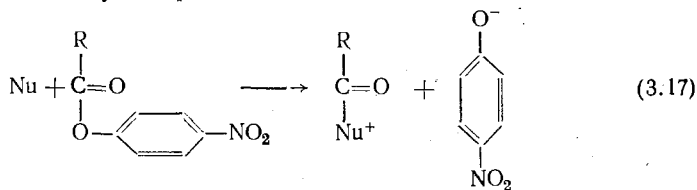


(где K_{a1} — константа диссоциации), катион и незаряженная форма по-разному будут связываться мицеллой. На анионной мицелле (состоящей, например, из додецилсульфата натрия) будет происходить более сильное связывание катионной формы бензимидазола, чем нейонной. Это должно привести к смещению равновесия (3.15) влево и, следовательно, к повышению наблюдаемого на опыте значения $pK_{a1, \text{эксп}}$ (рис. 26). Наоборот, катионные мицеллы (состоящие, например, из бромистого цетилтриметиламмония) более эффективно сорбируют незаряженную форму реагента (по сравнению с катионом бензимидазола) и, следовательно, смещают равновесие (3.15) вправо. Таким образом в присутствии катионных мицелл происходит сдвиг экспериментальной величины $pK_{a1, \text{эксп}}$ к более низким ее значениям (рис. 26) [105]. Аналогичным образом (с помощью добавки ПАВ при заданном значении pH) можно регулировать и второе ионогенное равновесие с участием бензимидазольного аниона, образующегося при более высоких значениях pH [105]:



Допустим, что незаряженная и ионная формы вещества, распределяемого между мицеллами, различаются по реакционной способности,

например, в реакции нуклеофильного замещения типа



Катион (LVIII) не может быть нуклеофилом, в то время как анион (LX) примерно в 10^3 раз более реакционноспособен, чем электронейтральная форма бензимидазола (LIX) [5, 6]. В этом случае с помощью добавки ПАВ можно регулировать при заданном значении pH относительную концентрацию того или другого нуклеофила и, тем самым, оказывать влияние на скорость реакции (3.17). На рис. 27 видно, что ниже ККМ добавка ЦТАБ не оказывает влияния на эффективную константу скорости, однако выше ее (при образовании мицелл) скорость процесса возрастает в 10^5 раз [106].

Эффект ускорения в мицеллярном катализе [и, в частности, в реакции (3.17) с участием бензимидазола] имеет и другие причины, чем кажущийся сдвиг pK_a ионогенного реагента. Это — концентрирование реагентов в мицеллярной фазе и влияние микросреды поверхностного слоя мицелл [98]. Рассмотрим этот вопрос подробнее на примере реакции n -го порядка [108].

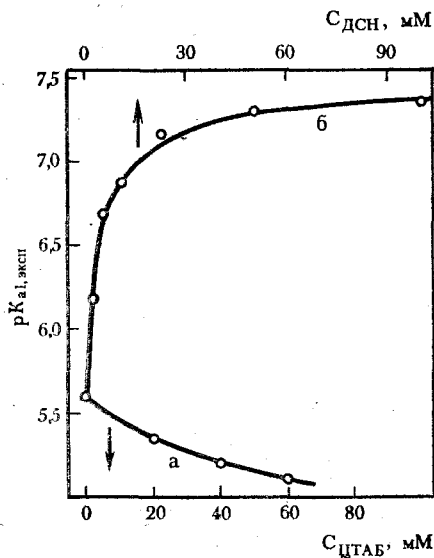


Рис. 26. Зависимость кажущегося значения pK_a бензимидазола от концентрации поверхностно-активных веществ [105]:
а — ЦТАБ; б — ДСН

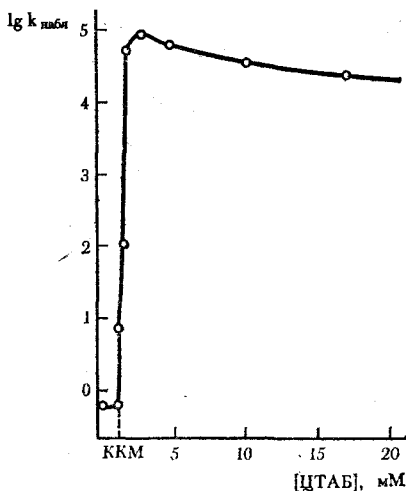
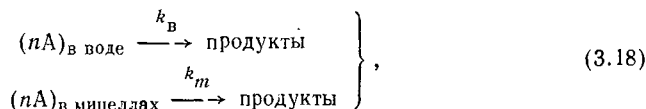


Рис. 27. Зависимость логарифма эффективной константы скорости, $M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$, реакции (3.17) от концентрации ЦТАБ при ацилировании бензимидазола (pH 8,8) [106].

Кинетическая теория мицеллярного катализа. Наблюдаемую скорость реакции



усредненную по объему всей системы, можно выразить через скорости реакции в мицеллярной (v_m) и водной ($v_{\text{в}}$) фазах:

$$v = k_{\text{набл}} [A]_0^n = v_m CV + v_{\text{в}} (1 - CV), \quad (3.19)$$

где V — мольный объем ПАВ и C — его концентрация за вычетом ККМ. Полагая, что в каждой из фаз выполняется закон действующих масс, можно записать:

$$\left. \begin{array}{l} v_m = k_m [A]_m^n; \\ v_{\text{в}} = k_{\text{в}} [A]_{\text{в}}^n. \end{array} \right\} \quad (3.20)$$

Связь между общей концентрацией реагента $[A]_0$ и истинными концентрациями в соответствующих фазах дана уравнением (3.14).

Важное допущение в этой теории заключается в том, что равновесное распределение реагентов не смещается в результате протекания химической реакции. Такое допущение оправдано тем, что обмен молекул между водой и мицеллами происходит достаточно быстро [98]. Тогда из уравнений (3.14), (3.19) и (3.20) следует, что эффективная константа скорости n -го порядка, наблюдаемая на опыте,

$$k_{\text{набл}} = \frac{k_m P^n CV + k_{\text{в}}}{(1 + PCV)^n}, \quad (3.21)$$

если принять, что реакция протекает в разбавленном растворе ПАВ ($CV \ll 1$) и реагент прочно связывается с мицеллой ($P \gg 1$) [108].

Проанализируем уравнение (3.21) более детально для случая, когда мицеллярный эффект столь велик, что можно пренебречь протеканием реакции в водной фазе. В этих условиях максимальное ускорение

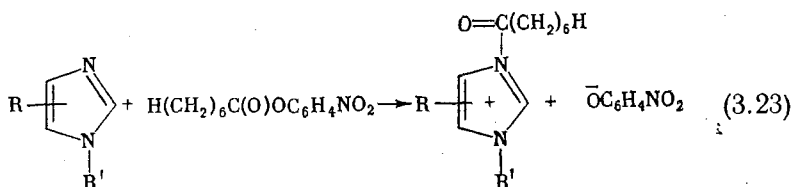
$$(k_{\text{набл}}/k_{\text{в}})_{\text{макс}} \approx \underbrace{\frac{k_m}{k_{\text{в}}}}_a P^{n-1} \underbrace{\frac{(n-1)^{n-1}}{n^n}}_b. \quad (3.22)$$

Множитель a в правой части уравнения (3.22) отражает тот вклад, который в мицеллярный эффект вносит влияние среды на истинные константы скорости реакции (3.18). Множитель b соответствует эффекту концентрирования (сближения) реагирующих молекул в мицеллярной фазе.

Оценка эффекта концентрирования реагентов в мицеллах. Коэффициент распределения для достаточно гидрофобных соединений

(см. рис. 25) или же вдобавок электростатически заряженных принимает значения вплоть до 10^2 — 10^4 [98]. Следовательно, максимальное ускорение бимолекулярной реакции составит величину более чем 10 — 10^3 только лишь за счет концентрирования реагентов в мицеллах (т. е. при $k_m/k_b \approx 1$). В общем случае эффективность мицеллярного катализа возрастает примерно в P раз при увеличении кинетического порядка на единицу [что следует из уравнения (3.22), поскольку фактор $(n-1)^{n-1}/n^n$ незначительно изменяется для $n = 2$ — 5].

Влияние среды. Рассмотрим реакцию ацилирования замещенных имидазолов *n*-нитрофенилгептаноатом [109, 110]:



протекающую в присутствии мицелл ЦТАБ. Переход из воды в мицеллярную среду приводит к значительному замедлению реакции с участием электронейтральных имидазолов ($k_m/k_b \approx 0,01$) (рис. 28). Это объясняется тем, что в переходном состоянии этой реакции происходит разделение зарядов и, следовательно, неполярная среда мицеллы (с низкой диэлектрической проницаемостью и слабой сольватирующей способностью) неблагоприятна для ее протекания.

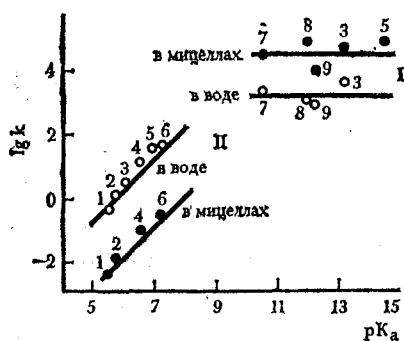


Рис. 28. Зависимость логарифма константы скорости ($\text{M}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$) от основности нуклеофила ($\text{p}K_a$) для реакции ацилирования *n*-нитрофенилгептаноатом нейтральной формы (II) и анионов (I) имидазольных производных в воде (k_b) и в мицеллярной «фазе» (k_m), соответственно [109], если соединения:

1 — *N*-метилбензимидазол; 2 — фенилимидазол; 3 — 4(5)-фенилимидазол; 4 — *N*-бензимидазол; 5 — *N*-бензоилистидин; 6 — *N*-гептилимидазол; 7 — 5(6)-нитробензимидазол; 8 — 4(5)-бромимидазол; 9 — бензимидазол

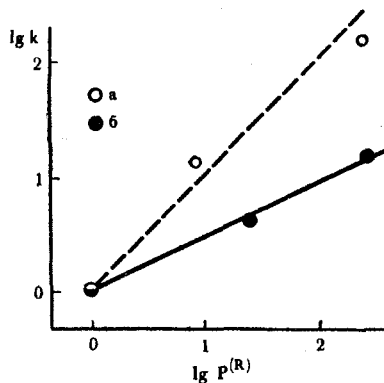
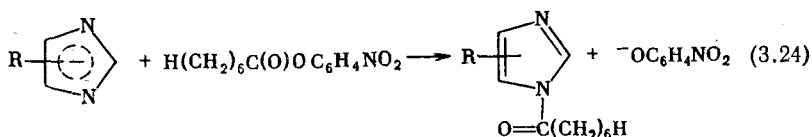


Рис. 29. Константы скорости второго порядка (в относительных единицах) реакции ацилирования *n*-нитрофенилкарбоксилатами (ацетат, бутират, валерат, гептаноат) в зависимости от относительной гидрофобности субстрата для различных нуклеофилов:

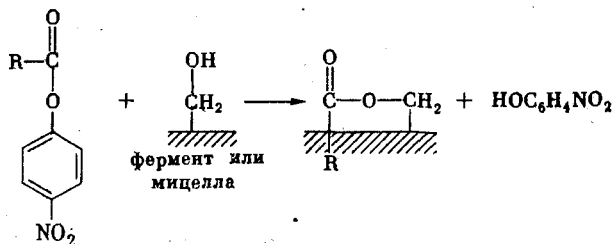
пунктир — ацилирование α -химотрипсина; а — реакция ацилирования бензимидазольного аниона в поверхностном слое катионных мицелл; б — ацилирование алкоксильной группы в мицеллах нуклеофильного ПАВ [112]

В реакции ацилирования имидазольных анионов



существует обратная зависимость (рис. 28): при переносе реагентов из воды в среду мицеллы значение константы скорости реакции возрастает более чем в 10 раз, т. е. $(k_m/k_w) > 10$. Это объясняется тем, что бензимидазольный анион, будучи связан в поверхностном слое мицеллы, частично дегидратирован и, следовательно, должен обладать большей реакционной (нуклеофильной) способностью. Подобного рода эффекты микросреды могут играть определенную роль в повышении реакционной способности каталитических групп активных центров ферментов (см. § 6 гл. II).

Мицеллярная модель действия α -химотрипсина. Катализ гидролиза сложных эфиров мицеллами ПАВ следующего строения: $\text{H}(\text{CH}_2)_{16}(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ можно рассматривать [111] как модель действия фермента α -химотрипсина. В том и другом случае алифатическая гидроксильная группа осуществляет нуклеофильную атаку субстрата:

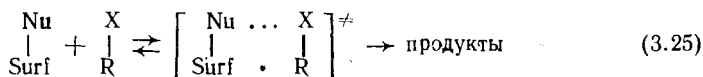


с последующим гидролизом промежуточного ацилпроизводного (см. гл. IV).

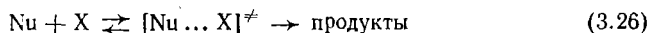
Специфичность функциональных мицелл, состоящих из нуклеофильного ПАВ, так же как и фермента, определяется гидрофобным взаимодействием между субстратной группой R и катализатором. Это следует из данных на рис. 29, где отложена зависимость относительных значений константы скорости второго порядка ацилирования того и другого катализатора от гидрофобности группы R в молекуле сложного эфира. В качестве показателя гидрофобности приняты значения парциальных коэффициентов распределения группы R между водой и октанолом (см. раздел «Экстракционная модель» в гл. I, а также рис. 25). Из наблюдаемых в опыте линейных зависимостей следует, что для того и другого катализатора справедливо утверждение: чем гидрофобнее субстрат, тем быстрее протекает химическая реакция.

Однако наклон прямой *b*, соответствующей мицеллярной реакции, несколько меньше, чем в случае ферментативного процесса (пунктир). Это связано с тем, что алкоксильный анион в мицелле расположен в гидратированном поверхностном слое (а это снижает эффективность гидрофобного взаимодействия). Действительно, если нуклеофил несколько углублен в мицеллу, что происходит в случае бензимидазольного аниона [110], то специфичность мицеллярного катализа (точки на пунктире) вполне соответствует ферментативному (пунктир). Различия в константах скоростей реакций с участием наименее (ацетат) и наиболее гидрофобного (гептаноат) субстратов превышают два порядка (рис. 29).

Наблюдаемое ускорение реакций с увеличением гидрофобности субстрата обусловлено тем, что боковая субстратная группа R сорбируется на «активной поверхности» (Surf) катализатора:



Это приводит к стабилизации переходного состояния реакции (3.25) по сравнению с процессом



где сорбционные взаимодействия отсутствуют. Понижение стандартной свободной энергии активации процесса (3.25) (рис. 30) равно инкременту свободной энергии экстракции фрагмента R из воды в среду поверхностного слоя частицы катализатора (белка или мицеллы).

Полифункциональный катализ на мицеллах. Многоцентровая атака субстрата электрофильными и нуклеофильными группами фермента в принципе может привести к существенному понижению свободной энергии активации катализируемой реакции (см. § 5 гл. II). Однако, как уже отмечалось, на основании одних только теоретических предпосылок трудно оценить вклад полифункционального катализа в ускорение сложных ферментативных процессов. В этом отношении полезную информацию может дать исследование модельных (неферментативных) реакций с более высоким кинетическим порядком, чем второй, поскольку можно полагать, что переходное состояние таких реакций

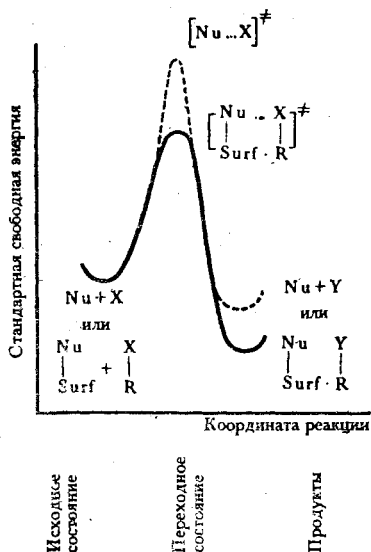


Рис. 30. Изменение стандартной свободной энергии по координатам реакций (3.25) и (3.26)

во многом аналогично переходному состоянию, возникающему в активном центре фермента (см. § 3 этой главы). Действительно, для целого ряда реакций было показано, что включение в переходное состояние реакции дополнительной молекулы общесосновного или общекислотно-го катализатора приводит к понижению энтальпии активации (см. табл. 19 и ее обсуждение в тексте). С другой стороны, однако, межмолекулярный катализ сопровождается неблагоприятным понижением энтропии активации, обусловленным прежде всего потерей поступательного (а частично и вращательного) движения дополнительной (каталитической) частицы [см. § 5 гл. II и уравнение (3.9)]. Оценка этой величины соответствует увеличению свободной энергии активации на 3—5 ккал/моль (12,6—21 кДж/моль). В связи с этим реакции высокого кинетического порядка отличаются малой эффективностью в разбавленном растворе.

Совсем по-другому обстоит дело с реакциями, протекающими на мицеллах. Если реагент способен сорбироваться на мицелле, то увеличение кинетического порядка реакции приводит к большей эффективности мицеллярного катализа [см. уравнение (3.22)]. Иными словами, при включении в реакцию дополнительного реагента (например, общесосновного или общекислотно-го катализатора) следует ожидать, что эффективное значение свободной энергии активации реакции, протекающей при оптимальной концентрации детергента, понизится по сравнению со свободной энергией реакции, идущей в воде (в отсутствие ПАВ), примерно на величину $RT \ln P$, т. е. на величину 3—5 ккал/моль (12,6—21 кДж/моль) (при $P \approx 10^2$ — 10^3 и T 300 К). Это понижение эффективного значения свободной энергии активации обусловлено тем, что переход молекулы реагента из воды (исходное состояние) в переходное состояние, находящееся в мицеллярной фазе, термодинамически более выгодно, чем переход этой же молекулы в тождественное переходное состояние реакции, идущей в воде.

Как видно, свободная энергия переноса молекулы реагента из воды в мицеллярную «фазу» может практически полностью компенсировать предполагаемую потерю энтропии при включении молекулы общесосновного или общекислотно-го катализатора в переходное состояние реакции. Эта компенсация и обуславливает некоторое подобие механизмов ферментативного и мицеллярного катализа. В отличие от реакций высокого кинетического порядка, протекающих в результате взаимодействия низкомолекулярных реагентов непосредственно в растворе, в том и другом случае катализа почти отсутствует неблагоприятный инкремент свободной энергии активации, связанный с потерей поступательного и вращательного движений при включении в переходное состояние реакции дополнительной частицы. Разумеется, конкретный механизм этого явления в каждом из видов катализа несколько иной. В мицеллярном катализе имеет место рассмотренная выше компенсация энтропийных потерь за счет свободной энергии термодинамически выгодных ионных и гидрофобных взаимодействий реагента с мицеллой. В ферментативном катализе компоненты активного центра (электрофильные и нуклеофильные группы) заранее связаны с белковой глобулой (как правило, химически) и обладают до-

вольно жесткой ориентацией, благодаря чему создается специфическая трехмерная конформация активного центра.

Определенные успехи в реализации этих теоретических предпосылок были достигнуты для реакции третьего порядка, какой является кислотнокатализируемый синтез бензилиденанилина [108].

* * *

В заключение подчеркнем, что значимость модельных экспериментов ни в коей мере не обесценивается тем, что величины каталитических эффектов в ферментативных и модельных системах пока несоизмеримы. Причина большей эффективности ферментов по сравнению с их моделями заключается фактически лишь в том, что белковые катализаторы используют (благодаря их более сложной молекулярной структуре) одновременно несколько источников ускорения катализируемой реакции.

Важно другое: на моделях удается (хотя бы по отдельности) реализовать практически все механизмы (или основные черты механизмов), по которым протекают ферментативные реакции. Это должно вселять в нас уверенность, что основные принципы биологического катализа поняты правильно.

ЛИТЕРАТУРА К ГЛ. III

1. *Философская энциклопедия*. Т. 3. М., «Советская энциклопедия», 1964.
2. Эшби У. Р. Введение в кибернетику. М., ИЛ, 1959.
3. Koshland D. E., Neet K. E. *Ann. Rev. Biochem.*, **37**, 359 (1968).
4. Лангенбек В. *Органические катализаторы*. М., ИЛ, 1961.
5. Дженкс В. Катализ в химии и энзимологии. М., «Мир», 1972.
6. Брюст Т., Бенкович С. *Механизмы биоорганических реакций*. М., «Мир», 1970.
7. Вольпин М. Е., Шур В. Б. *Журн. Всес. хим. общ-ва им. Д. И. Менделеева*, **12**, 31 (1967).
8. Шилов А. Е. *Успехи химии*, **43**, 863 (1974).
9. Уэбб Л. *Ингибиторы ферментов и метаболизма*. М., «Мир», 1966.
10. Guthrie J. P., Ueda Y. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, **1974**, 111.
11. Holmquist B., Bruice T. C. *J. Amer. Chem. Soc.*, **91**, 2985 (1969).
12. Blyth C. A., Knowles J. R. *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 3021 (1971).
13. Мартинек К., Левашов А. В., Березин И. В. *Мол. биол.*, **4**, 517 (1970).
14. Blyth C. A., Knowles J. R. *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 3017 (1971).
15. Menger F. M. *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 4387 (1968).
16. Dupire S., Nagy B., Nagy O. B., Bruylants A. *J. Chem. Soc., Perkin II*, **1974**, 478.
17. Menger F. M., Bender M. L. *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 131 (1966).
18. Storm D. N., Koshland D. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S.)*, **66**, 445 (1970).
19. Milstein S., Cohen L. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S.)*, **67**, 1143 (1970); *J. Amer. Chem. Soc.*, **94**, 9158 (1972).
20. Сапон В. *J. Chem. Soc. (B)*, **1971**, 1207.
21. *Tables of Chemical Kinetics*, USA NBS Circular 510 (1951).
22. Neet K. E., Nanci A., Koshland D. E. *J. Biol. Chem.*, **243**, 6392 (1968).
23. Илэлл Э. Л. *Стереохимия соединений углерода*. М., «Мир», 1965.

24. Bruice T. C., Brown A., Harris D. O. Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S.) **68**, 658 (1971).
25. Delisi C., Crothers D. M. Biopolymers, **12**, 1689 (1973).
26. Bruice T. C., Pandit U. K. J. Am. Chem. Soc., **82**, 5858 (1960).
27. Bruice T. C. Nature, **237**, 335 (1972).
28. Bruice T. C., Turner A. J. Am. Chem. Soc., **92**, 3422 (1970).
29. Kirby A. R., Fersht A. R. Progress in Bioorg. Chem. V. 1, 1 (1971).
30. Fersht A. R., Kirby A. J. J. Am. Chem. Soc., **89**, 4857 (1967).
31. Fersht A. R., Kirby A. J. J. Am. Chem. Soc., **89**, 4853 (1967).
32. Pierre T. St., Jencks W. P. J. Am. Chem. Soc., **85**, 3017 (1963).
33. Gold V., Oakenfull D. G., Riley T. J. Chem. Soc. (B), **1968**, 515.
34. Fersht A. R., Kirby A. J. J. Am. Chem. Soc., **90**, 5826 (1968).
35. Kirby A. J., Lancaster P. W. J. Chem. Soc., Perkin II, **1972**, 1206.
36. Alderley M. F., Kirby A. J. Lancaster P. W., J. Chem. Soc., Chem. Comm., **1972**, 570.
37. Capon B. Chem. Rev., **69**, 407 (1969).
38. Bender M. L., Lawlor J. M. J. Am. Chem. Soc., **85**, 3010 (1963).
39. Behme M. T., Cordes E. H. J. Org. Chem., **29**, 1255 (1964).
40. Shafer J. A., Morawetz H. J. Org. Chem., **28**, 1899 (1963).
41. Bernhard S. A., Berger A., Carter J. H., Katchalsky E., Sela M., Shalitin Y. J. Am. Chem. Soc., **84**, 2421 (1962).
42. Bruice T. C., Bencovic S. J. J. Am. Chem. Soc., **84**, 1 (1962).
43. Felton S. M., Bruice T. C. J. Chem. Soc., Chem. Comm., **1968**, 907.
44. Felton S. M., Bruice T. C. J. Am. Chem. Soc., **91**, 6721 (1969).
45. Bruice T. C. J. Am. Chem. Soc., **81**, 5444 (1959).
46. Spencer T., Sturtevant J. M. J. Am. Chem. Soc., **81**, 1874 (1959).
47. Kirk K. L., Cohen L. A. J. Org. Chem., **34**, 390 (1969).
48. Bruice T. C., Tanner D. W. J. Org. Chem., **30**, 1668 (1965).
49. Bruice T. C., Marquardt F. -Hans. J. Am. Chem. Soc., **84**, 365 (1962).
50. Bruice T. C., Benkovic S. J. J. Am. Chem. Soc., **86**, 418 (1964).
51. Bruice T. C., Fedor L. R. J. Am. Chem. Soc., **86**, 4117 (1964); Bruice T. C., Willis R. G. J. Am. Chem. Soc., **87**, 531 (1965).
52. Bruice T. C., Mayahi M. F. J. Am. Chem. Soc., **82**, 3067 (1960).
53. Swain C. G., Brown T. F. J. Am. Chem. Soc., **74**, 2534, 2538 (1952).
54. Kurchan S. M., Eriksen S. P., Friedman M. J. Am. Chem. Soc., **88**, 347 (1966).
55. Cunningham B. A., Schmir G. L. J. Am. Chem. Soc., **89**, 917 (1967).
56. Wallerberg G., Boger J., Haake P. J. Am. Chem. Soc., **93**, 4938 (1971).
57. Jencks W. P., Carriuolo J. J. J. Am. Chem. Soc., **82**, 1778 (1960).
58. Menger F. M., Vitale A. C. J. Am. Chem. Soc., **95**, 4931 (1973).
59. Hunkapiller M., Smallcombe S., Whitaker D., Richards J. N. Biochemistry, **12**, 4732 (1973).
60. Rogers G. A., Bruice T. S. J. Am. Chem. Soc., **96**, 2473 (1974).
61. Кабанов В. А. Журн. Всес. хим. об-ва им. Менделеева, **16**, 446 (1971).
62. Кабанов В. А. Пленарные доклады на 3-м симпозиуме по физиологически активным синтетическим полимерам и макромолекулярным моделям биополимеров. Рига, «Зинатне», 1973, с. 92.
63. Зезин А. Б., Бакеев Н. Ф., Фельдштейн М. М. Высокомолекулярные соединения. **14B**, 279 (1972).
64. Cordes E. N., Gitler C. In «Progress in Bioorganic Chemistry» (Kaiser E. T. and Kezdy F. J., eds.), V. 2, Toronto-New York, J. Wiley & S., 1973.
65. Klotz I. M., Stryker V. H. J. Am. Chem. Soc., **90**, 2717 (1968).
66. Pshchetskij V. S., Murtazaeva G. A., Кабанов В. А. European Polym. J., **10**, 571 (1974).

67. P shezhetskij V. S., Murtazaeva G. A., Kabanov V. A. *European Polym. J.*, **10**, 581 (1974).
68. Morawetz H. *Adv. Cat.*, **20**, 341 (1969).
69. Моравец Г. *Макромолекулы в растворе*. М., «Мир», 1967.
70. Morawetz H., Vogel B. *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 563 (1968).
71. Cho J. - R., Morawetz H. *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 375 (1972).
72. Каргин В. А., Кabanov В. А., Каргина О. В. *Докл. АН СССР*, **153**, 845 (1963).
73. Kirsh Yu. S., Rahnanskaya A. A., Lukovkin G. M., Kabanov V. A. *European Polym. J.*, **10**, 393 (1974).
74. Yatsimirsky A. K., Martinek K., Berezin I. V. *Tetrahedron*, **27**, 2855 (1971).
75. Klotz J. M., Royer G. - P., Scarpa J. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S.)*, **68**, 263 (1971).
76. Kiefer H. C., Congdon W. I., Scarpa J. S., Klotz J. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S.)*, **69**, 2155 (1972).
77. Overberger C. G., Salomon J. C., Yaroslavsky S. *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 6231 (1967).
78. Осипов А. П., Мартинек К., Яцимирский А. К., Березин И. В. *Докл. АН СССР*, **215**, 914 (1974).
79. Overberger, G. G. Salomon J. C. *Accs. Chem. Res.*, **2**, 217 (1969).
80. Overberger G. G., Okamoto Y. *Macromolecules*, **5**, 363 (1972).
81. Kunitake T., Shinkai S. *Bull. Chem. Soc. Jap.*, **43**, 2581 (1970).
82. Kunitake T., Shinkai S. *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 4247, 4256 (1971).
83. Overberger C. G., Shen C. - M. *Bioorg. Chem.*, **1**, 1 (1971).
84. Осипов А. П., Мартинек К., Яцимирский А. К., Березин И. В. *Изв. АН СССР, сер. хим.*, № 9 (1974).
85. Overberger C. G., Pierre T. St., Vorchheimer N., Lee J., Yaroslavsky S. *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 296 (1965).
86. Overberger C. G., Podsiadly C. J. *Bioorg. Chem.*, **3**, 16, 35 (1974).
87. Shimizu T., Fukuta A., Watanabe T., Kato S. *Makromolekulare Chemie*, **175**, 119 (1974).
88. Rohlfing D. L., Fox S. W. *Adv. Cat.*, **20**, 373 (1969).
89. Griffiths D. W., Bender M. L. *Adv. Cat.*, **23**, 209 (1973).
90. Cramer F., Seanger W., Spatz H. - Ch. *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 14 (1967).
91. Flohr K., Paton R. M., Kaiser E. T. *Chem. Comm.*, **1971**, 1621.
92. Van Hooidonk C., Breebaart-Hansen J. C. A. E. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas.*, **89**, 289 (1970).
93. Van Hooidonk C., Breebaart-Hansen J. C. A. E. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas.*, **90**, 680 (1971).
94. Cramer F., Кампе W. *Tetrahedron Lett.*, **1962**, 353.
95. Cramer F., Кампе W. *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 1115 (1965).
96. Griffiths D. W., Bender M. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 1679 (1973).
97. Karle J. M., Karle I. L. *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 9182 (1972).
98. Березин И. В., Мартинек К., Яцимирский А. К. *Усп. хим.*, **42**, 1729 (1973).
99. Фридрихсберг Д. А. *Курс коллоидной химии*. Л., «Химия», 1974.
100. Шиннода К., Накагава Т., Тамамуси Б., Исемура Т. *Коллоидные поверхностно-активные вещества*. М., «Мир», 1966.
101. Моравец Н. *Adv. Cat.*, **20**, 341 (1969).
102. Яцимирский А. К. *Мицеллярный катализ*. Канд. дисс. МГУ, 1971.
103. Осипов А. П. *Мицеллярные эффекты в имидазольном катализе*. Канд. дисс. МГУ, 1974.
104. Hansch C. *Chem. Rev.*, **71**, 525 (1971).
105. Яцимирский А. К., Осипов А. П., Мартинек К., Березин И. В. *Колл. журн.*, **37**, 526 (1975).

Представление о структуре и функциях этого фермента сформировалось в результате усилий многочисленных биохимических школ, которые при решении этой сложной задачи воспользовались разносторонними теоретико-методическими подходами, см., например, обзоры [2, 6—16]. В этой главе будут рассмотрены преимущественно лишь те исследования, которые имеют непосредственное отношение, во-первых, к выяснению структурных предпосылок субстратной специфичности химотрипсина и, во-вторых, к ее кинетическим проявлениям.

Наиболее важная информация о строении молекулы химотрипсина (молекулярная масса 25 000) была получена с помощью рентгеноструктурных исследований последних лет, проведенных Блоу с сотр. [14, 17—19]. Как итог своих исследований авторы представили трехмерную модель молекулы химотрипсина (см. рис. 3). В согласии с ранними общими представлениями о строении белков было найдено, что все заряженные группы в молекуле этого фермента направлены в сторону водного растворителя (за исключением трех, которые выполняют специфические функции либо в механизме активации зимогена, либо в механизме действия активного центра). Особенности расположения аминокислотных остатков с гидрофобными боковыми цепями внутри белковой глобулы также согласуются с ранними представлениями о важной роли гидрофобных взаимодействий в стабилизации третичной структуры белков (см. гл. 1).

Рентгеновские исследования комплексов химотрипсина с субстратоподобными ингибиторами сыграли принципиальную роль в установлении структурных предпосылок каталитической функции его активного центра (см. § 2 этой главы). Однако для выяснения динамических аспектов действия активного центра оказались особенно плодотворными подходы химической кинетики (см. § 5, 6 этой главы). Успехи кинетических исследований были во многом предопределены открытием М. Бергмана и Д. Фрутона и позднее Г. Нейрата и их сотрудинок, которые установили, что химотрипсин способен гидролизовать не только сложные белковые молекулы, но также и простые низкомолекулярные синтетические субстраты (амиды, сложные эфиры и др.) [20].

§ 2. Общие сведения о механизме действия химотрипсина и его субстратной специфичности

Химотрипсин по силе каталитического действия (при гидролизе амидов и сложных эфиров *N*-ацилзамещенных-*L*-аминокислот) примерно в 10^6 раз превосходит как OH^- , так и H_3O^+ , хотя он действует в нейтральном растворе (табл. 24) [21, 22].

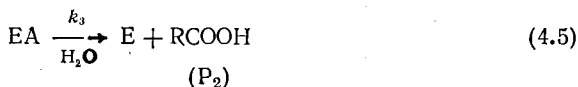
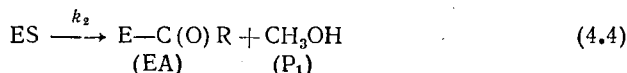
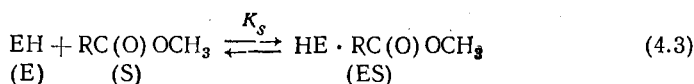
Этот фермент действует весьма избирательно по отношению к структуре молекулы субстрата. В то время как константы скоростей щелочного гидролиза метиловых эфиров уксусной кислоты и *N*-ацетил-*L*-фенилаланина различаются весьма слабо (не более чем на порядок), ферментативный гидролиз аминокислотного субстрата протекает по крайней мере в 10^6 раз быстрее (см. табл. 24).

Оба эти фундаментальных свойства ферментов (способность ускорять реакцию и специфичность катализа) часто взаимосвязаны, и эта

скими, кинетическими и другими методами (см. [26, 27], а также литературу к [2, 7]). Можно полагать, что ацилирование активного центра представляет собой единственно возможный путь гидролиза химотрипсина также и амидов [28].

В случае специфических субстратов промежуточный ацилфермент — весьма нестабильное соединение (время жизни $\sim 0,01$ с) [26], которое гидролизует под действием воды с образованием кислоты и регенерацией свободного фермента.

В итоге ферментативный гидролиз можно представить в виде следующей схемы:



Однако в действительности химические стадии (4.4) и (4.5) не являются, по-видимому, «кинетически индивидуальными». В литературе предполагают, что как стадия ацилирования [9, 24, 29, 30], так и деацилирования [31] включает быстрое (и равновесное?) образование промежуточного соединения, соответствующего новому конформационному состоянию фермента (см. также § 6 этой главы).

Химический механизм реакций гидролиза, катализируемых химотрипсином. При гидролизе молекулы субстрата, сорбированной на активном центре, в роли атакующего нуклеофила выступает OH-группа Ser-195 [2, 6—9, 32]. Химика-органика, малознакомого со специфической реакцией, протекающей с участием белков, могло бы насторожить то, что нуклеофильность гидроксильной серина в модельных низкомолекулярных соединениях низка, поскольку при физиологических значениях pH 7—8 группа OH слабо ионизована ($pK_a \sim 13,6$) [33, 34]. В связи с этим укажем, что исключительно высокая активность Ser-195 связана именно с его окружением в активном центре. Так, в среде 8 M мочевины (при денатурации белка) он теряет свои уникальные свойства [35, 36].

В образовании сложного нуклеофила, обладающего высокой степенью эффективности действия, принимает участие наряду с Ser-195 также и имидазольная группа His-57 (см. [2, 6—9, 16]). При этом атом азота $N^{\delta 2}$ гистидина образует водородную связь с кислородом гидроксильной серина (рис. 31). Вторая водородная связь, как полагают Блоу и др. [37], существует между атомом азота $N^{\delta 1}$ гистидина-57 и карбоксильной группой остатка Asp-102, расположенного в глубине ферментной глобулы. Система водородных связей приводит к увеличению отрицательного заряда на гидроксильной группе Ser-195, что способствует усилению ее нуклеофильности.

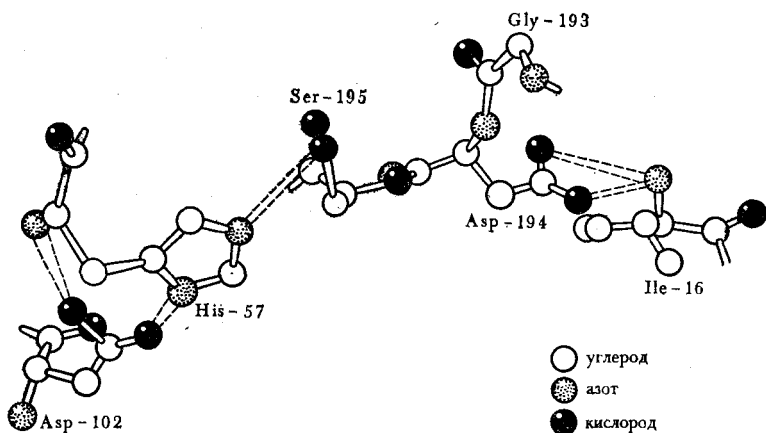
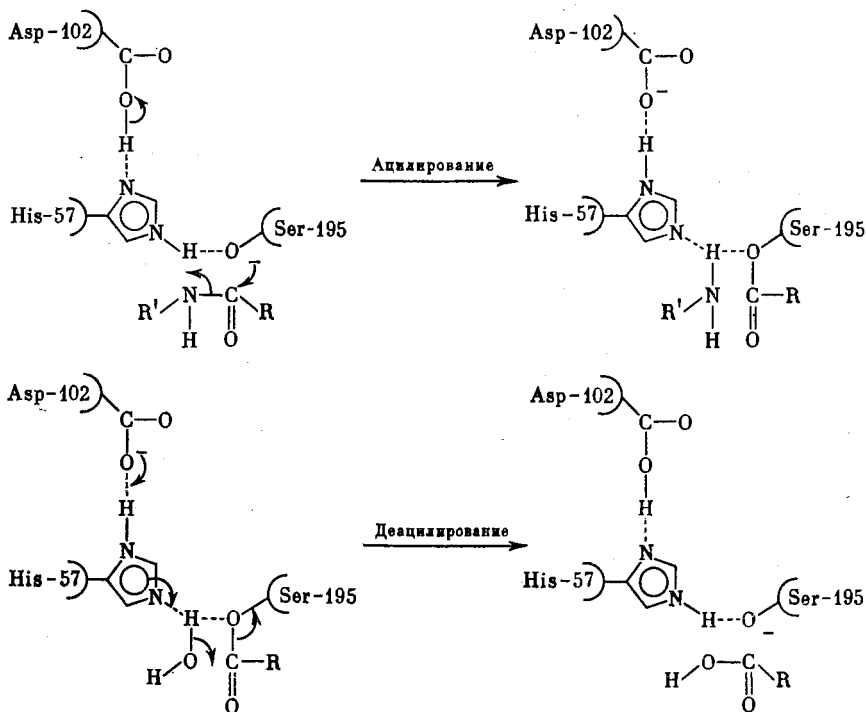


Рис. 31. Расположение аминокислотных остатков в каталитическом участке активного центра химотрипсина по рентгеноструктурным данным [37]

Возможный химический механизм гидролитического действия химотрипсина, который согласуется со всеми экспериментальными данными*, следующий:



* Ранее были предложены и другие механизмы действия (см. [6—9, 38, 39]). Здесь рассматривается механизм, структурные предпосылки которого согласуются с рентгеноструктурными данными для кристаллических комплексов фермент — субстратоподобный ингибитор.

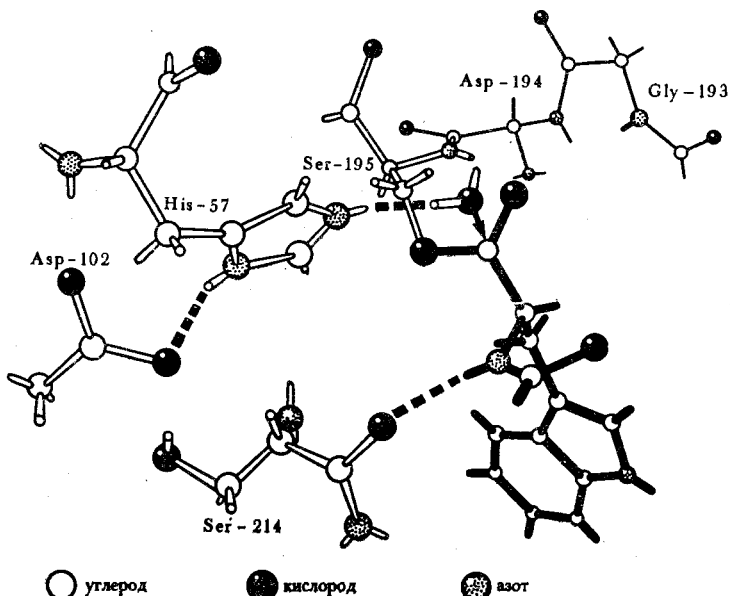


Рис. 32. Строение активного центра в ацилферменте по Хендерсону [18]:

черным обозначен субстратный остаток (N-формил-L-триптофанил); стрелка показывает направление атаки молекулой воды карбонильного углерода ацильной группы

На стадии ацилирования происходит нуклеофильная атака карбонильного углерода субстрата обобщенным нуклеофилом активного центра: Ser-195... His-57... Asp-102. В результате ацилирования активного центра происходит поворот остатка Ser-195 вокруг $C_{\alpha}-C_{\beta}$ -связей, что сопровождается перемещением атома кислорода на $\sim 2,5$ Å. При этом имидазольная группа His-57 перемещается в сторону растворителя [18]. В результате имидазольная группа His-57, будучи включенной в свободном ферменте (и, по-видимому, в комплексе Михаэлиса) в водородную связь с Ser-195 (рис. 31), в ацилферменте предоставляет свой N^ε атом для образования водородной связи с водой (рис. 32). В итоге активированная молекула воды приобретает способность эффективно атаковать карбонильный углерод субстрата на стадии деацилирования. При этом образуется кислотный продукт гидролиза и регенерируется свободный фермент. Таков в общих чертах химический механизм гидролитического действия химотрипсина.

Специфичность действия химотрипсина. Анализ понятия «специфичность фермента» провели Бендер и Кежди [7]. Из этого емкого термина имеет смысл выделить три типа специфичности: специфичность к среде, специфичность к реакции и субстратную специфичность.

Специфичность к среде. Химотрипсин реагирует в водной среде (реакционную способность обнаруживают также и влажные его кристаллы [40]). В неводных растворителях (например, в диметилсульфо-

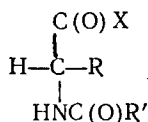
ксиде) фермент теряет свои специфические каталитические свойства [41]. Причина заключается в том, что в отсутствие воды нарушается баланс сил, поддерживающих нативную структуру ферментной глобулы, и она претерпевает существенные конформационные изменения. При этом разрушается активный центр.

Зависимость скоростей реакций, катализируемых химотрипсином, от pH обнаруживает оптимум при $\text{pH} \sim 8$ [42]. Механизм зависимости химотрипсинового катализа от pH заключается в следующем [6—9, 13, 43, 44]. Эффективные константы скоростей химических стадий ферментативной реакции k_2 и k_3 сохраняют постоянное значение при щелочных и нейтральных значениях pH, но при дальнейшем понижении pH они уменьшаются. Сигмоидальный характер этих зависимостей указывает на участие в катализе ионогенной группы фермента с $\text{pK}_a \sim 7$. Многие годы полагали, что этой группой является имидазольный фрагмент His-57, однако позднее она была идентифицирована как карбоксил Asp-102 [45]. Ее протонизация разрушает водородные связи в составном нуклеофиле (рис. 32), что приводит к потере ферментом каталитической способности.

С другой стороны, константа диссоциации фермент-субстратного комплекса K_s сохраняет постоянное значение при кислых и нейтральных значениях pH, но с дальнейшим увеличением pH она возрастает [13, 46]. Последнее объясняют тем, что правильная стереохимическая конформация активного центра обусловлена взаимодействием ионной пары (Asp-194)— $\text{COO}^- \dots {}^+\text{NH}_3$ — (Pе-16), находящейся внутри ферментной глобулы (см. рис. 31). В результате депротонизации α -аминогруппы Pе-16 (с $\text{pK}_a \sim 8,5-9$) происходит разрушение «солевого мостика», что приводит к потере ферментом сорбционной способности. Это представление согласуется с данными рентгеновского анализа структуры кристаллического химотрипсина [17], однако важность именно α -аминогруппы Pе-16 для катализа поставлена под сомнение в ряде работ [47, 48].

Специфичность к реакции. Химотрипсин катализирует реакцию переноса ацильной группы субстрата на различные нуклеофильные акцепторы, в качестве которых могут выступать не только вода (гидролиз), но и спирты, амины, пептиды, гидразины, имидазол и др. [49—53]

Субстратная специфичность химотрипсина. Специфические каталитические свойства ферментов обусловлены многоочечным (многоцентровым) взаимодействием между субстратом и белком [54] (см. гл. I и II). В многоцентровом взаимодействии фермент — субстрат важная роль отведена сорбции на белке боковых, «химически инертных» фрагментов субстратной молекулы. При анализе этого вопроса для реакций, катализируемых химотрипсином, будем исходить из модельной структуры [55] его субстратов:



где R (специфическая боковая группа L-аминокислоты) и α -ациламидная группа ($-\text{NHCOR}'$) — «химически инертные» фрагменты; X — уходящая группа в реакции гидролиза амидного или сложноэфирного субстрата (равная $-\text{NHR}''$ или соответственно $-\text{OR}'''$). Каждый из фрагментов субстратной молекулы играет определенную, присущую ему роль на отдельных стадиях ферментативной реакции.

Реакционный фрагмент $-\text{C(O)X}$ не принимает практически никакого участия в нековалентном связывании (сорбции) молекулы субстрата

на ферменте. Это относится как к специфическим субстратам (табл. 25), так и к их неспецифическим аналогам — производным, например, гидрокоричной кислоты (табл. 26). Группа X оказывает лишь индукционное и стерическое влияние на последующую химическую стадию ферментативной реакции. Наблюдаемая при этом зависимость скорости ацилирования химотрипсина амидами или алкильными и арильными эфирами специфических субстратов от строения уходящей группы X соответствует изменениям скорости щелочного гидролиза тех же производных (табл. 27).

Таблица 25

Константы равновесия при образовании комплекса с активным центром химотрипсина производных N-ацетил-L-тирозина $\text{НОС}_6\text{H}_4\text{СН}_2\text{СН}(\text{NHCOCH}_3)\text{C}(\text{O})\text{X}$ [7, 55—58]

Соединение	—C(O)X	$K_s, \text{M} \cdot 10^{-3}$
Амид	—CONH ₂	32
Метиламид	—CONHCH ₃	61
Глицинамид	—CONHCH ₂ COOH	23
Гидразид	—CONHNH ₂	30
Гидроксиамид	—CONHOH	43
Этиловый эфир	—COOC ₂ H ₅	17

Таблица 26

Константы равновесия при образовании комплекса с активным центром химотрипсина производных гидрокоричной кислоты, $\text{C}_6\text{H}_5(\text{СН}_2)_2\text{C}(\text{O})\text{X}$ [41, 59, 60]

Соединение	—C(O)X	$K_s, \text{M} \cdot 10^{-3}$
Амид	—CONH ₂	4,5
Метилловый эфир	—COOCH ₃	3,3
β-Фенилэтиловый спирт	—CH ₂ OH	5,3

Таблица 27

Сравнение констант скоростей второго порядка для ферментативного и щелочного гидролиза некоторых производных N-ацетил-L-фенилаланина * [7,61]

Субстрат	Ферментативный гидролиз k_2/K_s		Щелочной гидролиз k_{OH}
	$\text{M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$	относительные значения	относительные значения для ацетатов
Амид	7,2	1	1
Этиловый эфир	$0,8 \cdot 10^5$	10^4	$0,27 \cdot 10^4$
Метилловый эфир	10^5	10^4	$0,55 \cdot 10^4$
p-Нитрофениловый эфир	$0,7 \cdot 10^7$	10^6	$0,3 \cdot 10^6$

* Аналогичное сравнение было проведено для производных N-ацетил-L-триптофана [7,61] и алифатических эфиров N-ацетил-L-валина [62].

Гидролиз химотрипсином некоторых сложных эфиров (рН 7,8; 25°C, 0,1 М КСl) [41, 58, 60, 63]

Константы равновесия и скоростей	Субстраты			
	$\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3$	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3 \\ \\ \text{NHCOCH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CH}(\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3) \\ \\ \text{NHCOCH}_3 \end{array}$
K_s, M	0,4	$0,3 \cdot 10^{-2}$	0,7	$0,76 \cdot 10^{-2}$
$k_2/K_s, \text{M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$	$\ll 0,1$	$2 \cdot 10^2$	0,15	$1,05 \cdot 10^5$
k_2, c^{-1}	~ 0	0,67	0,1	$0,8 \cdot 10^3$
k_3, c^{-1}	0,008	0,15—0,25	1,2	110
k_3^L/k_3^D	—	—	—	6400

Доминантную роль в нековалентном связывании субстрата на ферменте играет сорбционное взаимодействие с белком боковой группы R (табл. 28). Из таблицы видно, что введение углеводородной группы $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$ — как в молекулу метилацетата (при переходе к метилгидроциннамату), так и в молекулу метилацетурата (при переходе к N-ацетил-L-фенилаланинату) обуславливает увеличение константы сорбции (K_s^{-1} , M^{-1}) примерно на 2 порядка. С другой стороны, наличие в молекуле субстрата достаточно объемной углеводородной группы R приводит также и к ускорению на несколько порядков химических стадий ферментативной реакции.

Не менее важным структурным элементом молекулы субстрата является и α -ациламидная группа. Этот субстратный фрагмент не оказывает заметного влияния на свободную энергию образования комплекса Михаэлиса, однако, как видно из табл. 28, наличие его в молекуле сложного эфира приводит к существенному ускорению последующих химических стадий ферментативной реакции и обуславливает также стереоспецифичность катализа по отношению к L-энантиомерам.

Для объяснения этих фактов активный центр химотрипсина представляют обычно (в развитие идей школы Нимэнна [55, 64]) состоящим из участков, комплементарных по отношению к отдельным фрагментам молекулы специфического субстрата [7, 59, 65]. Движущая сила сорбции фрагмента R на ферменте — это гидрофобное взаимодействие. Фактически образование комплекса фермент — субстрат обусловлено тем, что боковая гидрофобная субстратная группа подвергается термодинамически выгодной «экстракции» из воды в органическую среду белка (см. § 4—6 этой главы). Молекулярная модель активного центра была предложена Блоу с сотр. [66] на основании результатов рентгеноструктурного анализа кристаллического химотрипсина (см. рис. 9). Размеры гидрофобной полости в районе активного центра составляют $(10-12) \times (5,5-6,5) \times (3,5-4)$ Å. Эти размеры достаточны, чтобы вместить боковую цепь триптофана или тирозина, но вместе с тем форма полости делает возможной только лишь одну, строго определенную ориентацию плоскости ароматического кольца.

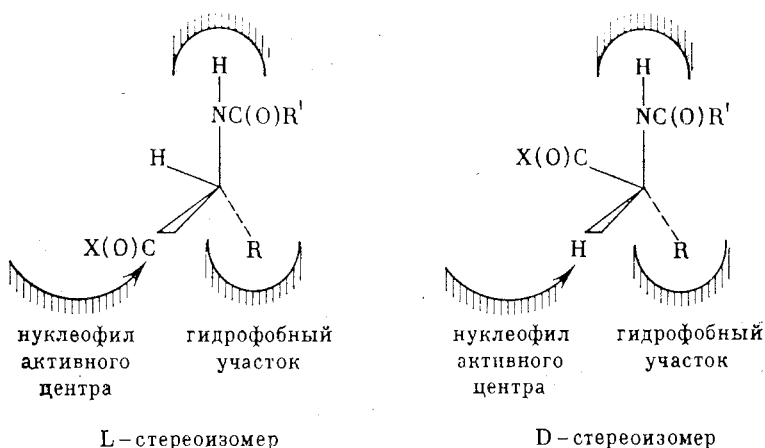
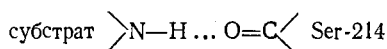


Рис. 33. Стереоспецифическое связывание молекулы субстрата на активном центре химотрипсина

Между α -ациламидной группой субстрата и ее акцептором на ферменте происходит, по-видимому, образование водородной связи (см. рис. 32). Результаты рентгеноструктурного анализа [18, 66—68] указывают, что этим акцептором должна быть карбонильная группа остатка Ser-214:



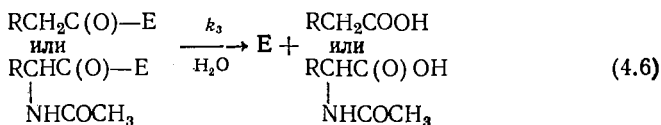
В итоге сорбционных взаимодействий между боковыми «химически инертными» группами субстрата и комплементарными участками активного центра происходит связывание субстратной молекулы на ферменте в положении, стереоспецифически ориентированном по отношению к нуклеofilу активного центра (как это показано на рис. 33). Силы сорбции стабилизируют тем самым переходное состояние реакции и приводят поэтому к ее ускорению (см. гл. II, схема 2.10).

Изложенная концепция, которая качественным образом вскрывает причины специфичности фермента по отношению к структуре субстрата, представляет собой синтез взглядов ряда научных школ, работающих в области физико-органической химии и ферментативного катализа (Бендер, Дженкс, Брюс, Блоу, Ноулис, Берххард, Гесс и др.). Ее количественное кинетико-термодинамическое обоснование (в приложении к химотрипсину, как одному из наиболее изученных ферментов) было получено прежде всего в исследованиях, проводимых в Московском университете [15]. В последующих параграфах будут детально рассмотрены наиболее важные, по-нашему мнению, аспекты этой проблемы. При этом будет сконцентрировано внимание именно на взаимосвязи между структурой и реакционной способностью субстратов и оставлены, по-существу, вне поля зрения «ингибиторные подходы», изложенные весьма подробно в [16].

§ 3. Кинетическая роль в химотрипсиновом катализе комплексообразования с активным центром α -ациламидной субстратной группы

Наличие α -ацетиламидного заместителя в молекуле сложного алифатического эфира обуславливает лишь малозначительное ускорение его спонтанного «щелочного» гидролиза. Это связано с тем, что положительный индукционный эффект данного заместителя в значительной мере компенсируется, по-видимому, отрицательным стерическим эффектом. Так, константы скоростей щелочного гидролиза метилацетата и метилглицината или, соответственно, метилгидроциннамата и метилового эфира α -N-ацетил-L-фенилаланина отличаются друг от друга менее чем на порядок (см. табл. 24). Ферментативная же реакция значительно более чувствительна к наличию в молекуле субстрата α -ациламидного фрагмента ([59, 69], см. табл. 24, сравните данные для эфиров уксусной кислоты и глицина или, соответственно, для производных гидрокоричной кислоты и N-ацетил-L-фенилаланина).

Для того чтобы проанализировать этот вопрос количественно, сравним реакционную способность промежуточных ацилферментов $RCH_2C(O)-E$, не содержащих в субстратном остатке α -ациламидной части, и, соответственно, ацилферментов $RCH(NHCOCH_3)C(O)-E$, производных α -N-ацетилзамещенных L-аминокислот:

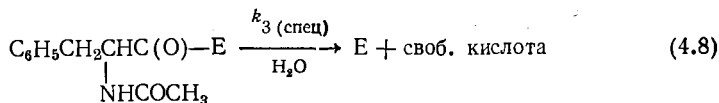


Экспериментальные данные [70], которые представлены на рис. 34, описывает следующее корреляционное уравнение:

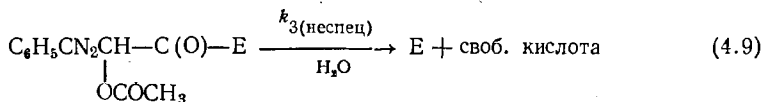
$$\lg k_3 (NHCOCH_3) \approx \lg k_3 (H) + 2,4, \quad (4.7)$$

где принадлежность константы скорости гидролиза к тому или другому типу ацилферментов указана в виде индексов. Из уравнения (4.7) следует, что α -ацетиламидная группа в субстратном остатке вносит практически постоянный инкремент в понижение свободной энергии активации их гидролиза независимо от размеров боковой группы R. А именно, наблюдаемое 250-кратное ускорение реакции специфических субстратов (содержащих в молекуле α -ациламидный фрагмент) соответствует понижению свободной энергии активации гидролиза на 3,3 ккал/моль (13,9 кДж/моль).

Специфический вклад, который в понижение свободной энергии активации вносит сорбция на ферменте α -ациламидной группы субстрата, можно оценить также и по другому, если сравнить реакционные способности по отношению к химотрипсину для производного α -N-ацетилфенилаланина:



и его О-аналога, не содержащего α -ацетиламидной группы, а именно α -О-ацетил-*L*-фениллактата:



Отношение $k_3(\text{спец})/k_3(\text{неспец})$ найдено [59] равным примерно 300, что соответствует $\Delta\Delta G_3^\ddagger \approx -3,5$ ккал/моль ($-14,7$ кДж/моль).

Механизм ускорения удалось вскрыть при исследовании температурной зависимости ферментативной реакции [70, 71]. На рис. 35 приведены активационные параметры стадии гидролиза для двух рядов ацилферментов (уравнение 4.6). Из этих данных видно, что реакции гидролиза ацилхимотрипсинов, содержащих в субстратном остатке ту же самую группу R, протекают с почти одинаковой энтальпией активации. В то же время наличие в субстратном остатке α -ацетиламидной группы приводит к выигрышу в энтропии активации порядка 10—12 кал/моль/град ($42-50,4$ Дж/моль/град). Этот результат показывает, что активный центр выступает в роли «энтропийной ловушки» субстрата. Иными словами, энтропийный характер ускорения реакции, наблюдаемого в случае специфических субстратов, подтверждает представление о том, что сорбционное взаимодействие между α -ацил-

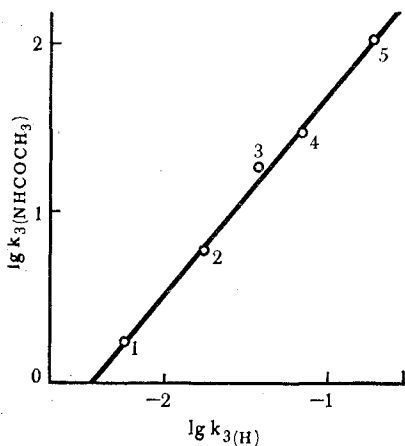


Рис. 34. Влияние α -ацетиламидной группы в субстратном остатке на эффективную константу скорости гидролиза ацилхимотрипсинов типа $\text{RCH}_2\text{C}(\text{O})\text{E}$ ($k_3(\text{H})$) и $\text{RCH}(\text{NHCOCH}_3)\text{C}(\text{O})\text{E}$ ($k_3(\text{NHCOCH}_3)$) [70], если R:

1 — этил; 2 — *n*-пропил; 3 — *n*-бутил;
4 — *n*-амил; 5 — бензил

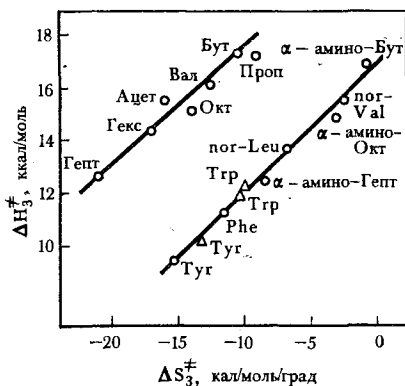


Рис. 35. Линейная зависимость между энтальпией и энтропией активации при гидролизе ацилхимотрипсинов — производных нормальных алифатических карбоновых кислот (левая прямая) и α -*N*-ацетилзамещенных *L*-аминокислот (правая прямая) [70, 71]. (Значения ΔH_3^\ddagger и ΔS_3^\ddagger соответствуют температурному интервалу 5—30°C)

амидной субстратной группой и активным центром ориентирует и «замораживает» гидролизуемую сложноэфирную связь в стерически выгодном для реакции положении по отношению к обобщенному нуклеофилу активного центра (см. рис. 33). В этой связи становится понятным, почему наличие α -ациламидного фрагмента не оказывает влияние, как уже отмечалось (см. стр. 134), на показатели сорбции субстрата на ферменте при образовании комплекса Михаэлиса (см. значения K_s в табл. 28). Дело в том, что закрепление субстратной молекулы в термодинамически невыгодной конформации с заторможенным внутренним вращением может полностью израсходовать потенциальную свободную энергию сорбции (см. рис. 17, I и § 3 и 4, гл. II).

Что касается природы сорбционного взаимодействия фермент — субстрат, то следует подчеркнуть, что с точки зрения термодинамики образование водородной связи (как это предполагает модель Хендерсона, см. рис. 32) представляется вполне разумным, поскольку энтальпия ее в аполярной среде достаточно велика — (4—6) ккал/моль, т. е. — (16,8—25,2) кДж/моль [59, 72], чтобы компенсировать необходимые для реакции потери энтропии при внутримолекулярном «замораживании» в ацилферменте вращательного движения субстратного остатка.

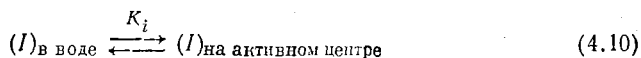
Согласно оценке, проведенной Ласковским и Шерага [72], изменение энтропии на каждую «замороженную» связь в боковой группе аминокислотного остатка, связанного с жесткой полипептидной цепью, составляет примерно — (4—7) кал/моль/град [— (16,8—29,4) Дж/моль/град]. Поэтому исходя из найденной величины $\Delta\Delta S_3^{\ddagger} \approx 10$ — 12 кал/моль/град (42—50,4 Дж/моль/град) можно полагать, что в случае специфических субстратов, содержащих α -ацетиламидную группу, происходит уже в исходном состоянии реакции (в ацилферменте или, соответственно, в комплексе Михаэлиса) почти полное, благоприятное для реакции «замораживание» всего фрагмента —C—C(O)—O—, центральная карбонильная группа которого претерпевает химическое превращение.

§ 4. Гидрофобная область активного центра химотрипсина

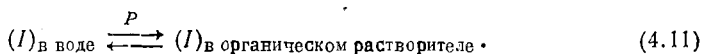
Глобула химотрипсина содержит лишь один комплексуемый центр, способный быстро и обратимо сорбировать углеводородные молекулы, — это активный центр фермента [73]. Гипотеза о существовании гидрофобной области в активном центре химотрипсина была выдвинута в начале 60-х годов на основании исследования ингибирующих свойств большого числа производных бензола, нафталина и других ароматических соединений [74—76]. Эта гипотеза находит подтверждение в том, что связывание с активным центром некоторых конкурентных ингибиторов, содержащих хромофорные группы, приводит к сдвигу их спектра в длинноволновую область [77—79]. Анализируя величину спектрального сдвига, Кэллос и Эвейтис [80] пришли к выводу, что активный центр фермента по величине диэлектрической постоян-

ной* приближается к циклогексану. Действительно, такой же сдвиг спектра происходит и при других гидрофобных взаимодействиях, например при солюбилизации хромофоров мицеллами детергентов [82], при гидрофобном «слипании» их с частичками тефлона в водной суспензии или при добавлении к водным растворам этих веществ малополярных растворителей, таких как диоксан, этиленгликоль, циклогексан и др. [77, 78, 80].

Для оценки эффективности гидрофобного взаимодействия фермент — органический лиганд оказалась полезной экстракционная модель, в рамках которой сравнивают термодинамические показатели комплексообразования:



с аналогичными данными для процесса экстракции лиганда из воды органическим растворителем:



Показателем гидрофобности лиганда служит в данном случае коэффициент его распределения P между водой и органической фазой (см. § 6 гл. I).

Ароматические обратимые конкурентные ингибиторы. Яркие корреляции между ферментативным (4.10) и модельным (4.11) процессами обнаруживают данные, полученные для производных бензола [83, 84]. Эти соединения можно рассматривать как аналоги боковой группы R в молекуле специфических субстратов (фенилаланин, тирозин). В ряду монозамещенных бензолов отчетливо выявляются две группы ингибиторов (рис. 36). Если ввести в молекулу бензола (точка I) гидрофобный заместитель (точки 2—7), то это приводит к резкому усилению ингибирующих свойств данного соединения. Поскольку наклон соответствующей прямой $\lg K_i - \lg P$ равен единице, т. е. фактически имеем

$$\Delta G_i \approx \Delta G_{\text{эстр}} + \text{const}, \quad (4.12)$$

то можно заключить, что инкремент свободной энергии переноса гидрофобного фрагмента молекулы ингибитора из воды в активный центр фермента практически равен инкременту свободной энергии экстракции этого фрагмента из воды органическим растворителем. Это означает, по-видимому, что боковая группа в молекуле ингибитора при обратимом взаимодействии его с химотрипсином подвергается полной «экстракции» гидрофобной средой активного центра.

Совершенно иным, однако, выглядит поведение монозамещенных бензолов, содержащих в молекуле полярную группу. Как видно из

* При трактовке природы спектральных сдвигов нужно соблюдать известную осторожность. Волькенштейн с сотр. [81] показали, что смещение $\lambda_{\text{макс}}$ красителя профлавина определяет не диэлектрическая проницаемость среды, а ее показатель преломления. Так, при переходе от воды ($\epsilon = 81$, $n_D = 1,33$) к диоксану ($\epsilon = 2,4$; $n_D = 1,42$) и к формамиду ($\epsilon = 109,5$; $n_D = 1,44$) происходит одинаковое смещение $\lambda_{\text{макс}}$.

рис. 36, введение полярной группы в молекулу бензола (точка 1) лишь незначительно влияет на ингибирующие свойства этих соединений (точки 8, 9, 22, 23, 26). В то же время эти ингибиторы сильно различаются по эффективности экстракции их из воды *n*-октанолом. Такая же закономерность наблюдается и в случае ди- или тризамещенных бензолов. Введение дополнительного гидрофобного заместителя в молекулу фенола (точка 9) или бензамида (точка 26) приводит к усилению ингибирующих свойств этих производных (см. точки 9—21 и 26—27, соответственно), которое количественно также может быть описано выражением (4.12). Это означает, что гидрофобные заместители в молекуле фенола или бензамида полностью переходят из водного раствора в среду активного центра. Но так же как и в случае монозамещенных бензолов, наличие в молекуле фенола или бензамида дополнительных полярных заместителей оказывает лишь незначительное влияние на их связывание ферментом (точки 24, 25, 28, 29). Поэтому в итоге можно заключить, что при комплексобразовании химотрипсина с ароматическими соединениями (замещенными бензолами) «экстракции» активным центром подвергается только гидрофобный остов молекулы ингибитора, тогда как боковые полярные группы остаются, по-видимому, в исходном гидратированном состоянии.

Этот вывод представляется весьма нетривиальным. С одной стороны, принимая во внимание наблюдаемую полную «экстракцию» гидрофобного остова молекулы ингибитора активным центром, полученный результат подтверждает современную концепцию механизма образования комплекса фермент — ингибитор, согласно которой существует аналогия между процессом комплексобразования и адсорбцией органических молекул на поверхности раздела фаз вода — масло или же их соллюбилизацией мицеллами поверхностно-активных веществ [85]. Однако этой концепции явно противоречит то, что полярные группы в молекуле ингибитора не оказывают практически никакого влияния на прочность связывания его с химотрипсином. Дело в том, что недавно А. В. Левашовым [86] было показано, что полярные заместители в ароматическом ядре в одинаковой мере затрудняют как процесс экстракции ароматических соединений октанолом, так и процесс адсорбции этих соединений на поверх-

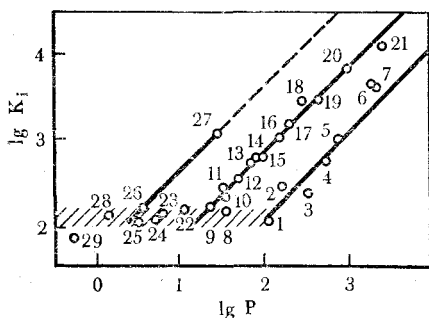


Рис. 36. Константы ассоциации K_i , M^{-1} , замещенных бензолов с активным центром фермента и их зависимость от коэффициентов распределения P этих соединений в системе вода — октанол [83, 84]:

- 1 — бензол; 2 — *N,N*-диметиланилин; 3 — толуол; 4 — хлорбензол; 5 — бромбензол; 6 — нафталин; 7 — акридин; 8 — бензонитрил; 9 — фенол; 10 — 3-метоксифенол; 11 — 4-CN-фенол; 12 — 4-фторфенол; 13 — *p*-крезол; 14 — *m*-крезол; 15 — 2-хлорфенол; 16 — 2-бромфенол; 17 — 4-хлорфенол; 18 — 4-бромфенол; 19 — 2-нафтол; 20 — 2,4-дихлорфенол; 21 — 2,4-дибромфенол; 22 — ацетанилид; 23 — анилин; 24 — резорцин; 25 — гидрохинон; 26 — бензамид; 27 — *p*-бромбензамид; 28 — *p*-оксибензамид; 29 — *p*-аминофенол

ности раздела фаз вода — воздух (сравнивая данные для бензола, фенола, анилина, *m*- и *p*-крезолов, резорцина и гидрохинона) или также процесс солюбилизации их мицеллами детергентов (сравнивая данные для нафталина, нафтиламина, нафтола и диоксианафталинов). Как видно, в отличие от модельных процессов, движущей силой которых также служат гидрофобные взаимодействия, механизм образования комплекса фермент — ароматический ингибитор проявляет весьма уникальное «совершенство», не обнаруживая никаких затруднений при сорбции гидрофобной молекулы ингибитора со стороны ее полярных фрагментов.

Это интересное явление еще не нашло достоверной физико-химической трактовки. Можно лишь полагать, что причины его заложены в том, что сложноорганизованный (микрорегерогенный) и относительно жесткий сорбционный участок активного центра в отличие от «жидких экстракционно-адсорбционных» моделей представляет собой (если рассматривать это явление в высшей степени формально) как бы «щипцы», которые в результате гидрофобных взаимодействий «ухватывают» в молекуле ингибитора лишь ее гидрофобный остов, центральной группой которого является плоское ароматическое ядро. Эта гипотеза находит отражение в молекулярной модели активного центра, предложенной Блоу с сотр. [66] на основании результатов рентгеноструктурного анализа кристаллического химотрипсина (см. рис. 9). Как уже отмечалось, форма полости делает возможной лишь одну, строго определенную ориентацию плоскости ароматического кольца.

В связи с этим интересно отметить, что эффективность адсорбции ароматических соединений на твердых поверхностях (угле) практически не зависит от наличия в ядре каких-либо заместителей [87, 88]. Поэтому в случае полужесткой модели гидрофобного кармана в белке, для того чтобы объяснить полную «экстракцию» глобулой различных гидрофобных заместителей в молекуле ингибитора, необходимо допустить, что аминокислотные остатки, расположенные вблизи «щипцов», обладают все-таки некоторой подвижностью, которая обеспечивает обволакивание неароматических гидрофобных фрагментов «псевдожидкой» средой активного центра.

Таким образом, представление о жесткой ориентации плоского ароматического кольца, которое следует из рентгеновского исследования структуры кристаллического фермента, своеобразно проявляется косвенным образом также и в термодинамике образования в водном растворе комплекса активного центра с ароматическими соединениями.

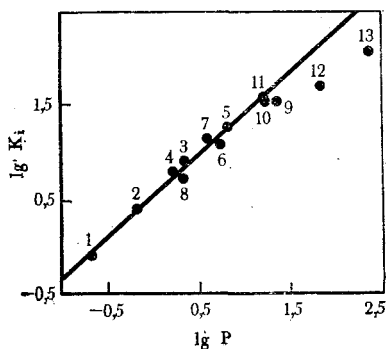


Рис. 37. Константы сорбции K_i , M^{-1} , алифатических спиртов на активном центре фермента и их зависимость от коэффициентов распределения P в системе вода — октанол [85, 83]:

1 — метанол; 2 — этанол; 3 — пропанол; 4 — изопропанол; 5 — *n*-бутанол; 6 — изобутанол; 7 — втор-бутанол; 8 — трет-бутанол; 9 — *n*-пентанол; 10 — изопентанол; 11 — циклогексанол; 12 — *n*-гексанол; 13 — гептанол

Алифатические обратимые конкурентные ингибиторы. Как видно из рис. 37, сорбционный участок активного центра малоспецифичен по отношению к структуре алифатической цепи в молекуле ингибитора (алканола)*. Независимо от того, является ли алифатическая цепь нормальной или разветвленной, эффективность обратимого связывания алканола ROH на активном центре определяется «валовой гидрофобностью» группы R . А именно, величина $\lg K_i$, характеризующая прочность комплекса, возрастает линейно (с наклоном, близким к единице) со степенью распределения $\lg P$ этих соединений между водой и стандартной органической фазой (n -октанол). Наблюдаемая при этом величина инкремента свободной энергии переноса CH_2 -группы из воды в среду активного центра равна приблизительно —700 кал/моль (2,9 кДж/моль) (для низших членов гомологического ряда). Эта величина близка к значению инкремента свободной энергии, которое следует из известного в коллоидной химии правила Дюкло—Траубе [90—92] и характерна для свободной энергии перехода «жидкой» CH_2 -группы из воды в неводную (гидрофобную) среду [85]. Все это позволяет рассматривать гидрофобную область активного центра химотрипсина как «каплю» органического растворителя, расположенную в поверхностном слое белковой глобулы. Эта «капля» либо адсорбирует гидрофобный ингибитор из воды на поверхность раздела фаз, либо, будучи расположенной несколько углубленно, полностью экстрагирует его. С точки зрения микроскопической структуры гидрофобной области правильнее было бы рассматривать ее как фрагмент мицеллы, однако такая детализация представляется излишней, поскольку известно, что свободная энергия перехода n -алканов из воды в микроскопическую среду мицеллы додецилсульфата слабо отличается от свободной энергии выхода тех же соединений из воды в макроскопическую жидкую неполярную фазу [93].

«Экстракционный» механизм взаимодействия активного центра фермента с углеводородной группой молекулы ингибитора нашел подтверждение при сопоставлении общей термодинамической картины этого процесса с данными, характеризующими растворение тех же соединений (n -алканола) в воде [94, 95].

Можно было бы возразить, что растворение спиртов в воде — это неудачный пример стандартного модельного процесса, поскольку в каждом из спиртов алифатическая группа R находится в различном окружении. Однако это обстоятельство оказывает лишь слабое влияние не только на свободную энергию растворения [85], но также и на энтальпию этого процесса, поскольку теплоты испарения n -алканолов линейно зависят от длины цепи [96]. Кроме того, инкремент теплоты испарения на CH_2 -группу тот же самый как в случае n -алканолов, так и жидких углеводов [96].

На рис. 38 обращает на себя внимание весьма близкий характер изменения термодинамических функций от длины углеводородного

* В литературе неоднократно подвергали сомнению способность алифатических соединений выступать в роли конкурентных ингибиторов реакций, катализируемых химотрипсином. Однако позднее было показано, что даже столь слабое липофильное соединение, каким является ацетонитрил, обнаруживает все-таки специфические свойства конкурентного ингибитора [89].

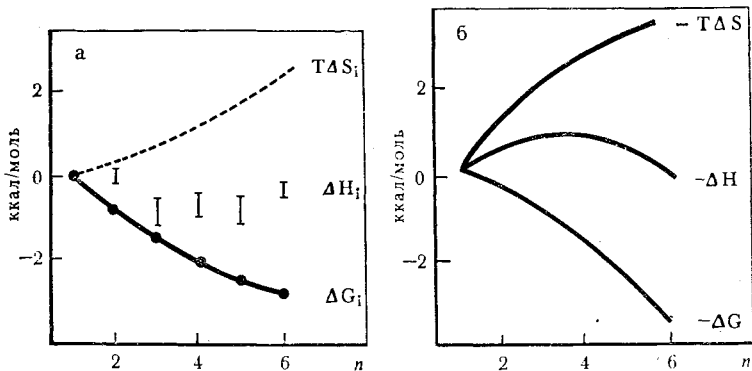
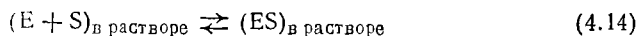
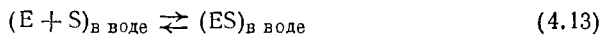


Рис. 38. Зависимость от длины алифатической цепи в молекуле $N(\text{CH}_2)_n\text{OH}$ термодинамических характеристик следующих процессов:
 а — образование комплекса *n*-алканолов с активным центром химотрипсина [83, 94, 95] (значения ΔG_i отнесены к 25°C, ΔH_i и ΔS_i постоянны в интервале 5–30°C);
 б — растворение *n*-алканолов в воде [97]

остатка в том и другом случае. Как видно, главная движущая сила образования комплекса фермент — ингибитор — это **положительное** изменение энтропии при переходе группы из водной фазы в среду активного центра. В самой общей форме это явление (большие изменения энтропии, **благоприятствующие** образованию комплекса E·R) можно объяснить исходя из представлений о гидрофобном взаимодействии как результате разрушения высокоорганизованной гидратной оболочки вокруг группы R при взаимодействии ее с активным центром фермента.

Влияние среды на гидрофобное взаимодействие активного центра химотрипсина с субстратами и ингибиторами. Исследование эффектов среды — это классический подход к изучению природы комплексообразования. В приложении к химотрипсину результаты таких исследований подтвердили гидрофобный характер фермент-субстратных взаимодействий.

Солевой эффект при образовании комплекса активного центра с метилгидроциннаматом. Солевые эффекты, наблюдаемые при образовании комплекса Михаэлиса, довольно слабые [76], и поэтому достаточно обоснованное обсуждение их природы может быть дано лишь при использовании ряда солей. Результаты такого исследования, выполненного в приложении к образованию комплекса химотрипсина с метилгидроциннаматом [98], даны на рис. 39. Прежде чем анализировать эти данные, напомним, что термодинамику процессов образования комплекса Михаэлиса в воде и, соответственно, в водном растворе, содержащем третий компонент (соль, органический растворитель и т. п.):



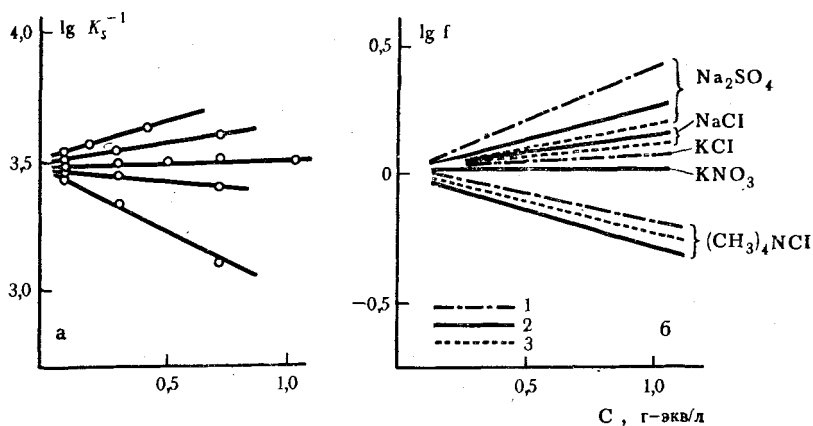


Рис. 39. Влияние концентрации и природы соли на константу диссоциации K_s комплекса метилгидроциннамата с активным центром химотрипсина (а) и на коэффициенты активности f неэлектролитов (б) [98]:

1 — бензол; 2 — фенол; 3 — анилин

определяют соответствующие константы диссоциации фермент-субстратного комплекса ES в воде и, соответственно, в растворе:

$$(K_s)_B = K_s^0 \left(\frac{f_E f_S}{f_{ES}} \right)_B^{-1}; \quad (4.15)$$

$$(K_s)_P = K_s^0 \left(\frac{f_E f_S}{f_{ES}} \right)_P^{-1}; \quad (4.16)$$

где f — коэффициенты активности соответствующих компонентов; K_s^0 — термодинамическая константа диссоциации при бесконечном разбавлении всех компонентов. При проведении ферментативной реакции концентрации фермента и субстрата низки, поэтому можно принять, что коэффициенты активности компонентов в воде равны практически 1. Иными словами, в уравнении (4.15) имеем $(K_s)_B \approx K_s^0$. Поэтому из (4.15) и (4.16) следует:

$$\lg \left((K_s)_B / (K_s)_P \right) = \lg (f_S)_P + \lg \left(\frac{f_E}{f_{ES}} \right)_P. \quad (4.17)$$

На рис. 39, а дана найденная на опыте зависимость левой части уравнения (4.17) от концентрации и природы соли. Для сравнения на рис. 39, б приведено изменение с концентрацией той или другой соли коэффициентов активности бензола и его производных. Эти соединения следует рассматривать как структурные аналоги боковой цепи в молекуле субстрата (они же являются классическими конкурентными ингибиторами). При сравнении рис. 39, а и б видно, что эффективность образования комплекса Михаэлиса изменяется с ионной силой при

переходе от одной соли к другой симбатно изменению коэффициентов активности ароматических соединений. Это указывает на то, что в правой части уравнения (4.17) основную роль играет именно первый член, содержащий коэффициент активности субстрата.

Возможные причины, обуславливающие инвариантность с изменением природы и концентрации соли второго члена, $\lg(f_E/f_{ES})_p$, могут быть следующими: 1. Коэффициенты активности обоих ферментных компонентов не обнаруживают солевого эффекта, т. е. $f_E = f_{ES} = 1$; это означает, что сорбционная область активного центра как в свободном ферменте, так и в комплексе Михаэлиса представляет собой замкнутый участок поверхностного слоя глобулы, не контактирующий с водой:



Сорбционная область в данном случае представляет собой фрагмент поверхностного слоя белка, напоминающий мицеллу ПАВ (где гидрофобные цепи экранированы от воды полярными группами, см. § 6 гл. III).

2. Априори нельзя исключить альтернативную возможность, что оба коэффициента активности f_E и f_{ES} изменяются в присутствии соли одинаково. Для объяснения такого феномена можно предложить модель активного центра, где сорбционная область — это щель, контактирующая с водой и «высланная» преимущественно углеводородными фрагментами полипептидной цепи:



В этом случае естественно допустить, что сорбция углеводородного фрагмента молекулы субстрата (или ингибитора) не должна менять природу сорбционного участка на поверхности ферментной глобулы (по сравнению со свободным ферментом). Следовательно, оба коэффициента активности f_E и f_{ES} могут одинаковым образом зависеть от состава среды.

В свете рентгеновских исследований, направленных на выяснение структуры кристаллического фермента, ближе к истине, по-видимому, вторая модель (ср. рис. 9); см. также обсуждение этой модели в § 6 этой главы.

S-образный характер зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата в катализе химотрипсином. Изменение среды в результате добавки органических соединений также оказывает заметное влияние на эффективность сорбции на активном центре химотрипсина гидрофобных компонентов реакции. Причина этого заключается, как правило, в том, что органическая добавка, повышая растворимость субстрата (или субстратоподобного ингибитора) в воде, «удерживает» его в водном растворе и затрудняет тем самым

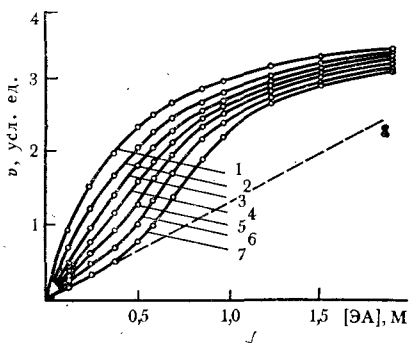


Рис. 40. Зависимость начальной стационарной скорости реакции гидролиза этилацетурата (ЭА) под действием химотрипсина [99] от начальной концентрации субстрата при различных концентрациях N-ацетил-D-триптофана, мМ: 1 — без добавки; 2 — 2; 3 — 3; 4 — 4; 5 — 5; 6 — 7,5; 7 — 10; кривая 8 (пунктир) проведена теоретически и она описывает механизм конкурентного ингибирования ($K_i = 3 \text{ мМ}$)

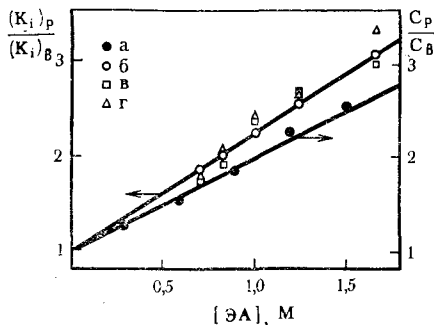
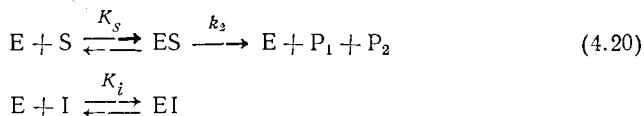


Рис. 41. Влияние высоких концентраций субстрата (этилацетурат, ЭА) на сорбцию химотрипсином обратимого конкурентного ингибитора N-ацетил-D-триптофана:

α — отношение растворимостей (C_p/C_B) амида N-ацетил-D-триптофана в водном растворе этилацетурата (C_p) и в воде (C_B) [99]; $\beta, \sigma, \varepsilon$ — отношение констант ингибирования ($(K_i)_p / (K_i)_B$) ацетил-D-триптофаном реакции ферментативного гидролиза этилацетурата [99]; значения ($K_i)_p$ вычисляли по формуле (4.21) из кривых на рис. 40 при высоких концентрациях субстрата для следующих концентраций ингибитора (мМ); β — 10; σ — 5; ε — 3,5; значение ($K_i)_B$ было измерено при низких концентрациях этилацетурата или также при использовании специфических субстратов [10]

его переход из раствора в гидрофобное окружение активного центра [85]. В том случае, когда среду «портит» один из компонентов реакции, это приводит к курьезной зависимости начальной скорости ферментативного процесса от концентрации данного компонента. Так, при ингибировании N-ацетил-D-триптофаном реакции гидролиза химотрипсином этилацетурата наблюдаемая на опыте зависимость начальной скорости процесса v от концентрации субстрата $[S]_0$ имеет S-образный характер [99] (рис. 40). Как правило, S-образные отклонения от зависимости Михаэлиса многие авторы склонны приписывать только аллостерическим или кооперативным взаимодействиям [100]. Однако S-образному эффекту, наблюдаемому в данной системе, можно дать более простое объяснение.

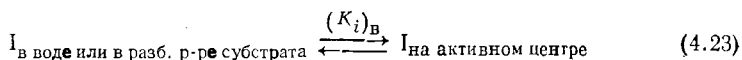
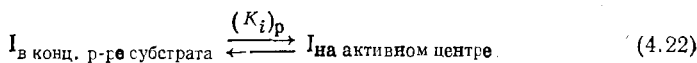
При малых концентрациях субстрата (этилацетурат) N-ацетил-D-триптофан — это конкурентный ингибитор реакции ферментативного гидролиза:



В этом случае начальная скорость процесса (при установившихся равновесиях и $[S]_0, [I]_0 \gg [E]_0$) дается обычным выражением:

$$v = \frac{k_2 [S]_0 [E]_0}{K_s (1 + [I]_0 / K_i) + [S]_0}, \quad (4.21)$$

графическое изображение которого — гипербола Михаэлиса [101]. Эта простая схема конкурентного ингибирования (4.20) формально остается справедливой также и при высоких концентрациях субстрата. Но в этом случае в результате изменения среды возрастает растворимость ингибитора в водном растворе, что термодинамически затрудняет его «экстракцию» активным центром фермента. Фактически на опыте с увеличением концентрации субстрата возрастает эффективное значение константы K_i диссоциации фермент-ингибиторного комплекса, что и приводит к увеличению скорости процесса (ср. кривые 7 и 8 на рис. 40) и обуславливает тем самым S-образное отклонение кривой $v - [S]_0$ от гиперболической зависимости Михаэлиса. На справедливость этой концепции указывают данные, которые приведены на рис. 41. Как следует из термодинамики, между константами равновесий



должна существовать простая связь:

$$(K_i)_p / (K_i)_в = C_p / C_в, \quad (4.24)$$

где $C_в$, C_p — растворимости ингибитора соответственно в воде (или в достаточно разбавленном растворе субстрата) и в концентрированном растворе субстрата. Действительно, на рис. 41 видно, что соотношение (4.24) согласуется с экспериментальными данными.

Этот пример разобран столь подробно лишь для того, чтобы подчеркнуть, насколько важно учитывать свойства реакционной среды (ее изменение с изменением концентрации компонентов реакции) при кинетическом исследовании механизма реакции, особенно в случае сложных, многокомпонентных ферментативных процессов.

§ 5. Пространственное взаимоотношение сорбционной гидрофобной области в активном центре и каталитически активных групп *

При исследовании строения и функций активного центра химотрипсина оказался плодотворным хорошо зарекомендовавший себя в гомогенном и гетерогенном катализе метод, устанавливающий взаимосвязь между структурой молекулы субстрата и его реакционной способно-

* Представление об активном центре химотрипсина как структуре, состоящей из пространственно и функционально разделенных участков (сорбционного и каталитического), в литературе сложилось раньше [102], чем появились рентгеновские данные о структуре кристаллического фермента. В этом сыграли важную роль исследования механизма действия ряда ингибиторов [16]. Используемые подходы могут оказаться весьма полезными при изучении структуры и функций активного центра других ферментов.

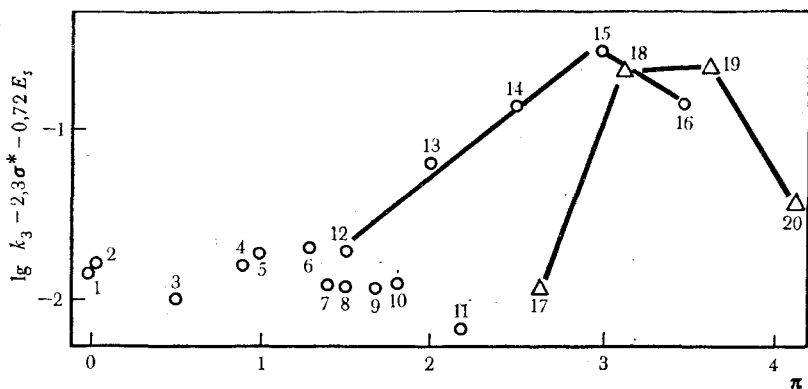


Рис. 42. Зависимость специфического эффекта S в реакции гидролиза ацилферментов типа $RC(O)E$ от показателя гидрофобности π субстратной группы R [21], если заместители R :

- (1) H ; (2) CH_3OCH_3 ; (3) CH_3 ; (4) $ClCH_2$; (5) CH_2CH_2 ; (6) $(CH_2)_3CH$; (7) $Cl(CH_2)_2$; (8) ICH_2 ; (9) $(CH_2)_2CHCH_2$; (10) $(CH_2)_3C$; (11) $(CH_2)_3CCH_2$; (12) $CH_2(CH_2)_2$; (13) $CH_2(CH_2)_3$; (14) $CH_2(CH_2)_4$; (15) $CH_2(CH_2)_5$; (16) $CH_2(CH_2)_6$; (17) $C_6H_5CH_2$; (18) $C_6H_5(CH_2)_2$; (19) $C_6H_5(CH_2)_3$; (20) $C_6H_5(CH_2)_4$.

стью. Физико-органическая химия для этой цели широко использует кинетический подход Гамметта и Тафта—Ингольда, основанный на представлении, что **индукционные** и **стерические** эффекты отдельных заместителей в молекуле реагента вносят аддитивные вклады в общую скорость реакции [103]. В случае ферментативных процессов необходимо принять во внимание также и возможное влияние на скорость реакции **специфического** фактора, обусловленного сорбцией на активном центре «химически инертных» субстратных групп. Для количественной оценки такого специфического эффекта [104] необходимо модифицировать уравнение Тафта—Ингольда, введя в него дополнительный член S :

$$\lg k = \rho^* \sigma^* + \delta E_s + S + \text{const.} \quad (4.25)$$

Рассмотрим экспериментальные данные по кинетике гидролиза промежуточных ацилферментов типа $R-C(O)-E$, представленные на рис. 42. В случае ацилферментов, содержащих в субстратном остатке **разветвленную** или достаточно **короткую нормальную** алифатическую цепь (точки 1—12), константы скорости деацилирования k_3 укладываются в следующее корреляционное уравнение [21]:

$$\lg k_3 = 2,3\sigma^* + 0,72E_s - 1,8. \quad (4.26)$$

Как видно из последнего уравнения, изменение реакционной способности этих ацилферментов обусловлено лишь стерическим E_s и индукционным σ^* влиянием субстратного остатка.

Совершенно иной представляется картина в случае ацилферментов, производных **нормальных** алифатических карбоновых кислот, типа $H(CH_2)_nC(O)E$. Эти соединения обнаруживают резкие отклонения от линейной зависимости (4.26), как это видно из рис. 42 (точки 13—16).

Столь необычное для гомогенного катализа явление обусловлено специфическим (сорбционным) взаимодействием субстратного остатка R с белком.

Поскольку специфическое взаимодействие углеводородных субстратных фрагментов с активным центром химотрипсина гидрофобно (см. § 2 и 4 этой главы), то специфический член S в уравнении (4.25) разумно представить в виде функции от показателя гидрофобности заместителя R. Таким параметром может служить константа π по Ганшу [105, 106], где $\pi \equiv \lg P$; величина P — это парциальный коэффициент распределения группы R между водой и стандартным органическим растворителем (n -октанол) [см. уравнение (4.11)].

В этом случае для соединений с числом CH_2 -групп от 3 до 6 (рис. 42, точки 12—15) справедливо следующее корреляционное уравнение [21]:

$$\lg k_3 \approx 0,80\pi - 3,3. \quad (4.27)$$

«Стерический» и «индукционный» члены в этом уравнении опущены, поскольку соответствующие характеристики E_s и σ^* для нормальных алифатических заместителей C_3 — C_6 близки [103].

Уравнение (4.27) означает, что величина специфического эффекта в скорости ферментативной реакции линейно возрастает с увеличением показателя гидрофобности π субстратной группы R. Это находится в резком диссонансе с данными по модельной реакции щелочного гидролиза этиловых [107—109] или n -нитрофениловых [110—112] эфиров тех же карбоновых кислот, где константа скорости второго порядка практически не зависит от длины алифатической цепи. В ферментативной же реакции с увеличением углеводородного фрагмента в субстратном остатке понижается свободная энергия активации примерно на -600 кал/моль ($-2,5$ кДж/моль) на каждую CH_2 -группу [что следует из (4.27)], если учесть, что значение π для CH_2 -группы равно 0,5. Найденное значение $\Delta\Delta G_3^\ddagger$ согласуется с величиной свободной энергии сорбции на активном центре алифатических соединений (см. § 4 этой главы).

Сравнивая уравнения (4.26) и (4.27), следует заключить, что «гидрофобный» специфический эффект в химотрипсиновом катализе сильно зависит от геометрии (пространственного строения) субстратной группы R (сравни коэффициенты при π в этих уравнениях). Наглядно это показано на рис. 42, где отложена величина специфического эффекта S от показателя гидрофобности π боковой субстратной группы R. Видно, что в общем случае специфический эффект проявляется при гидролизе лишь тех ацилферментов $\text{R}-\text{C}(\text{O})-\text{E}$, которые содержат в субстратном остатке нормальную (неразветвленную) алифатическую или фенилалкильную группу. Из этого следует, что гидрофобная полость в активном центре фермента, взаимодействующая с субстратной группой, представляет собой **узкую** «щель», в которую способна погрузиться только лишь линейная алифатическая или плоская арилалкильная углеводородная цепь молекулы субстрата. Геометрические свойства этой полости в активном центре не позволяют сорбироваться в ней разветвленным субстратным фрагментам. Во-вторых, наличие оптимума на кривой функции $S-\pi$ (при $n = 6$, см. рис. 42,

точка 15) указывает на ограниченность **продольного** размера узкой гидрофобной «щели». Как видно из рис. 42, нормальная алифатическая цепь в субстратном остатке достигает передней границы гидрофобной полости при $n = 2-3$ и затем более длинные цепи с $n > 6$ не укладываются уже полностью в гидрофобную щель.

Те же закономерности характеризуют также и кинетику гидролиза химотрипсина специфических аминокислотных субстратов как на стадии ацилирования, так деацилирования [21, 113]. Пространственное взаимоотношение сорбционной и каталитической областей в активном центре нашло отражение также и в эффективности комплексообразования с химотрипсином бифункциональных ингибиторов, алкил- и фенилалкилборных кислот [114, 115].

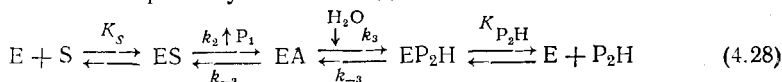
Эти результаты (см. рис. 42) интересно сопоставить с данными по структуре кристаллического химотрипсина. Согласно Стейтцу и др. [66], гидрофобная полость в кристаллическом ферменте (см. рис. 9) действительно узка (3,5—4 Å) и длина ее не превышает 10 Å. Таким образом, рентгеновские исследования структуры кристаллического фермента [66] и кинетические исследования его субстратной специфичности в водном растворе [21] привели к взаимно согласующимся данным о геометрии активного центра химотрипсина.

§ 6. Кинетическая роль в химотрипсиновом катализе комплексообразования гидрофобного субстратного фрагмента с активным центром

Гидрофобное фермент-субстратное взаимодействие вносит важный вклад в специфичность химотрипсинового катализа (см. § 2, 4, 5 этой главы). Это связано с тем, что составной нуклеофил, входящий в активный центр фермента и принимающий участие в атаке сорбированной молекулы субстрата, расположен в поверхностном слое белковой глобулы [17—19, 66, 67]. Реакции, катализируемые химотрипсином, протекают таким образом вблизи поверхности раздела фаз вода — белок и сопровождаются термодинамически выгодным переносом (полным или частичным) гидрофобных фрагментов молекулы субстрата из одной среды (вода) в другую (белок). Свободная энергия такого рода гидрофобного взаимодействия, сопровождающего химическую реакцию между ферментом и субстратом, зависит от структуры субстрата, а также от геометрической конгруэнтности ее по отношению к активному центру (см. § 5 этой главы).

В настоящем параграфе будут рассмотрены главным образом динамические аспекты данной проблемы, а именно будет показано, как изменяется свободная энергия гидрофобного фермент-субстратного взаимодействия по координате реакции [116].

Изменение свободной энергии по координате реакции. При рассмотрении этой задачи будем исходить из того, что реакция химотриптического гидролиза метиловых эфиров *N*-ацетил-*L*-аминокислот, т. е. $RCH(NHCOCH_3)C(O)OCH_3$, протекает по крайней мере через 3 метастабильных промежуточных соединения [117]:



где P_1 — метанол; P_2H — N-ацетил-L-аминокислота (в недиссоциированной форме); ES и EP_2H — комплексы Михаэлиса фермента с субстратом и кислотным продуктом соответственно и EA — ацилфермент.

Значения K_s , k_2 , k_{-2} и k_3 были измерены на опыте [116]. Это позволило вычислить как свободные энергии равновесного образования фермент-субстратного комплекса ($\Delta G_s = -2,3RT \lg K_s^{-1}$) и ацилфермента ($\Delta G_a = -2,3 \lg k_2/k_{-2} K_s$), так и свободные энергии активации химических стадий [$\Delta G_2^\ddagger = 2,3RT \lg(k_2/kT/h)$ и $\Delta G_3^\ddagger = 2,3RT \lg(k_3/kT/h)$ соответственно].

Из рис. 43 видно, что все эти величины (ΔG_s , ΔG_a , ΔG_2^\ddagger , ΔG_3^\ddagger), характеризующие свободную энергию фермент-субстратного взаимодействия в различных промежуточных состояниях реакции, линейно* зависят от свободной энергии переноса субстратного фрагмента R из воды в органический растворитель ($\Delta G_{\text{экстр}}^R$)** . Поэтому на рис. 44 профиль свободной энергии — координата реакции приведен лишь для крайних членов исследуемого ряда субстратов. При построении диаграммы были сделаны два допущения: 1) свободная энергия валовой реакции $S + H_2O \rightleftharpoons P_1 + P_2H$ — это постоянная величина для всех членов изохимического ряда субстратов и равная приблизительно нулю [116, 117]; 2) $K_{P_2H} \approx K_s$, поскольку константа Михаэлиса в реакциях, катализируемых хитотрипсином, слабо зависит от природы уходящей группы (см. табл. 25 и 26) [6, 7, 119]. Проанализируем далее, как изменяется профиль свободной энергии — координата реакции при вариации структуры субстрата.

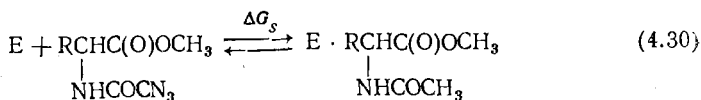
Равновесное образование метастабильных промежуточных соединений (специфичность связывания). Линейные зависимости $\Delta G_s - \Delta G_{\text{экстр}}^R$ и $\Delta G_a - \Delta G_{\text{экстр}}^R$, представленные на рис. 43, характеризуются тангенсом угла наклона, равным примерно единице. Этот факт имеет простой физический смысл. А именно, отсюда следует, что свободная энергия образования метастабильных промежуточных соединений ES и EA изменяется в результате вариации структуры субстрата ровно настолько, насколько изменяется свободная энергия переноса переменного субстратного фрагмента R из воды в органический растворитель, т. е.

$$\Delta \Delta G_s \approx \Delta \Delta G_a \approx \Delta \Delta G_{\text{экстр}}^R \quad (4.29)$$

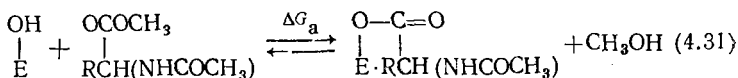
* Конечно, такое поведение наблюдается лишь в известных пределах, которые зависят от геометрической конгруэнтности субстратной группы R по отношению к активному центру (см. § 5 этой главы). Отклонение значений ΔG_s и ΔG_2^\ddagger от линейных зависимостей, наблюдаемое для производного глицина (соединение 1), обусловлено тем, что этот «укороченный» субстрат, не содержащий фактически углеводородной группы R, связывается в комплексе Михаэлиса «непродуктивно», см., например [7, 118].

** В случае углеводородных фрагментов величина $\Delta G_{\text{экстр}}^R$ не зависит практически от природы органического растворителя (см. раздел «Экстракционная модель» в гл. 1).

Поэтому можно заключить, что как при образовании комплекса Михаэлиса



так и при ацилировании фермента



субстратная группа R полностью погружается в неводную среду активного центра. При этом за счет термодинамически выгодного взаимодействия E · R происходит смещение обоих равновесий (4.30) и (4.31) вправо.

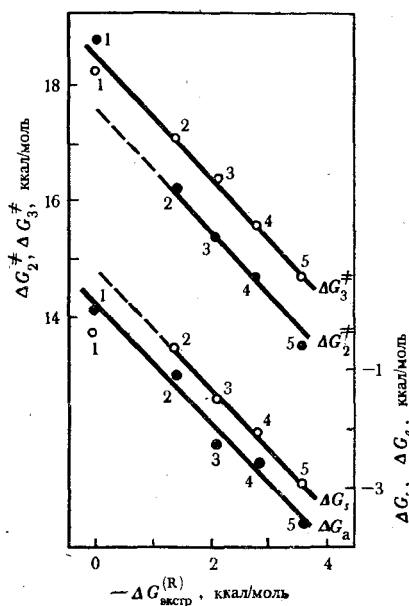


Рис. 43. Свободные энергии образования фермент-субстратного комплекса ΔG_s и ацилфермента ΔG_a и свободные энергии активации каталитических стадий ацилирования ΔG_2^{\ddagger} и гидролиза ацилфермента ΔG_3^{\ddagger} в зависимости от свободной энергии переноса $\Delta G_{\text{экстр}}^{\text{R}}$ субстратной группы R из воды в органический растворитель (n-октанол), если в субстрате $\text{RCH}(\text{NHCOCH}_3)\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3$ заместитель R:

1 — H; 2 — CH_3CH_2 ; 3 — $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2$; 4 — $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3$; 5 — $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$

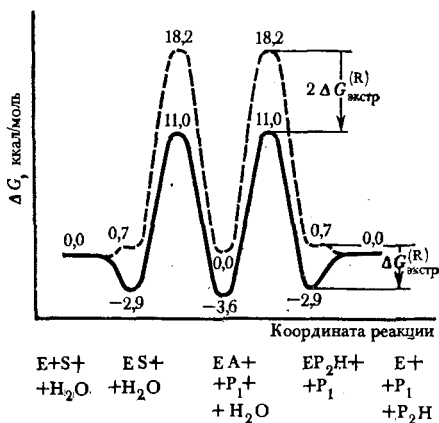


Рис. 44. Изменение свободной энергии фермент-субстратного взаимодействия по координате реакции (4.28) для химотриптического гидролиза метиловых эфиров N-ацетил-L-фенилаланина (сплошная линия) и N-ацетилглицина (пунктирная линия) [116]. (Для диаграммы использованы значения стандартных свободных энергий, полученные интерполяцией линейных зависимостей, приведенных на рис. 43).

учесть приближенный характер проведенных оценок, то, сравнивая найденные значения ΔG_a [ферментативная реакция (4.32)] и $\Delta G_{\text{мод}}$ [неферментативная реакция (4.33)], можно лишь заключить, что белковый остов, окружающий в первой реакции сериновый остаток, оказывает, по-видимому, на стандартную свободную энергию перэтерификации субстрата (в отсутствие гидрофобного фрагмента R) лишь слабое влияние.

Механизм кинетической специфичности химотрипсина. Размер «химически инертного» фрагмента R в субстратной молекуле оказывает влияние не только на связывание субстрата ферментом, но, что более удивительно, на кинетику химических стадий. Скорость как стадии ацилирования (k_2), так и гидролиза промежуточного ацилфермента k_3 [см. уравнение (4.28)] возрастает при увеличении гидрофобности фрагмента R. Количественное описание кинетической специфичности дает уравнение

$$\Delta\Delta G_2^\ddagger \approx \Delta\Delta G_3^\ddagger \approx \Delta\Delta G_{\text{эстр}}^R, \quad (4.37)$$

которое следует из линейных зависимостей (с тангенсом угла наклона, равным единице), приведенных на рис. 43.

Прежде чем дать объяснение кинетической специфичности химотрипсина, обратим внимание на следствие, которое вытекает из (4.29) и (4.37) и заключается в том, что образование переходного состояния любой из химических стадий сопровождается выигрышем свободной энергии, равным $2\Delta G_{\text{эстр}}^R$ (в бимолекулярном процессе из исходных реагентов) [16, 122]. Это положение весьма наглядно иллюстрирует диаграмма, приведенная на рис. 44. Так, например, в процессе ацилирования фермента, протекающем в кинетическом режиме реакции второго порядка:



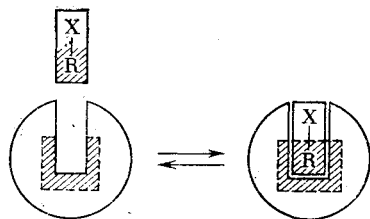
для свободной энергии активации $\Delta G^\ddagger = \Delta G_s^\ddagger + \Delta G_2^\ddagger$ из (4.29) и (4.37) имеем:

$$\Delta\Delta G^\ddagger \approx 2\Delta\Delta G_{\text{эстр}}^R. \quad (4.39)$$

Наблюдаемому эффекту [уравнение (4.39)] трудно найти объяснение с помощью простой экстракционной модели (схема 4.18), где механизм гидрофобного фермент-субстратного взаимодействия представляет собой лишь перенос субстратного фрагмента R из воды в неводную среду и, следовательно, выигрыш свободной энергии не может превысить величину $\Delta G_{\text{эстр}}^R$.

Очевидно, механизм гидрофобного фермент-субстратного взаимодействия более сложный, чем (4.18). По-видимому, гидрофобная полость в активном центре фермента контактирует в свободном состоянии с водой и образование комплекса с субстратом RX полностью или частично (в зависимости от размеров субстратной группы R) экранирует

ее от воды (вытесняет из нее воду):



(4.40)

Такой процесс должен быть термодинамически более выгодным, чем (4.18), поскольку в него вносит свой вклад не только субстрат (за счет переноса гидрофобного фрагмента R из воды в органическую среду белка), но также и фермент, гидрофобная полость которого при взаимодействии с субстратом теряет термодинамически невыгодный контакт с водой* [15, 116]. При условии полного вытеснения воды из гидрофобной полости активного центра выигрыш свободной энергии гидрофобного фермент-субстратного взаимодействия должен быть по сравнению с (4.18) двойным и, следовательно, равным $2\Delta G_{\text{экстр}}^R$.

В согласии с механизмом (4.40) субстратоподобный ингибитор действительно вытесняет из активного центра несколько молекул воды, как это было обнаружено при рентгеноструктурном анализе кристаллического химотрипсина [123]. Однако этот механизм не согласуется с данными по влиянию среды на гидрофобное фермент-субстратное взаимодействие (см. § 4 этой главы). Кроме того, механизм (4.40) противоречит тому, что двойной выигрыш свободной энергии экстракции реализуется лишь в переходном состоянии химической реакции [см. уравнение (4.39)], в то время как в комплексе Михаэлиса вклад гидрофобного фермент-субстратного взаимодействия меньше [см. уравнение (4.29)]. Иными словами, в химотрипсиновом катализе не вся потенциальная свободная энергия сорбции, которую предполагает модель (4.40), равная $2\Delta G_{\text{экстр}}^R$, реализуется в виде прочного связывания субстрата с ферментом. Из диаграммы, представленной на рис. 44, видно, что в комплексе Михаэлиса (или ацилферменте) реализуется в виде свободной энергии связывания E·R лишь инкремент свободной энергии сорбции, отражающий перенос субстрата из воды в неводное окружение (в среду белковой глобулы), равный $\Delta G_{\text{экстр}}^R$ [см. также уравнение (4.29)]. Для объяснения этих фактов следует допустить, что гидрофобное фермент-субстратное взаимодействие идет в две стадии**: 1) образование фермент-субстратного комплекса протекает по механизму (4.19), который не противоречит данным по солевому эффекту (на их основании он был и предложен), и термодинамические закономерности его согласуются с уравнением (4.29). Этот механизм также предполагает вытеснение нескольких молекул воды из

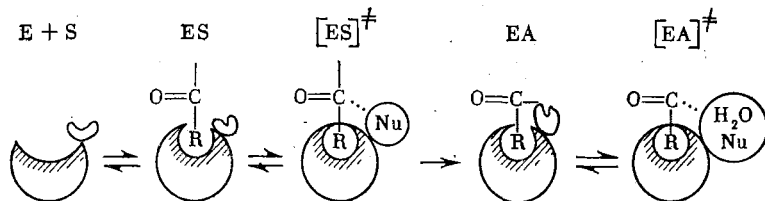
* Такое термодинамически невыгодное состояние активного центра сохраняется в свободном ферменте за счет термодинамически уравновешенной третиной структуры всей глобулы.

** Возможно, механизм (4.40) реализуется в катализе другими ферментами.

сон [18] пришел к выводу, что смещение карбонильного атома углерода в субстратном остатке ацилфермента всего лишь на 0,6 Å может вызвать изменение активности более чем в 10^3 раз (а эта цифра как раз отражает диапазон специфичности химотрипсина на каталитических стадиях).

Имеются также многочисленные косвенные данные, которые согласуются с представлением, что связывание субстрата (или субстратоподобного ингибитора) на ферменте сопровождаются конформационными изменениями в белковой глобуле ([13, 70, 126, 127]).

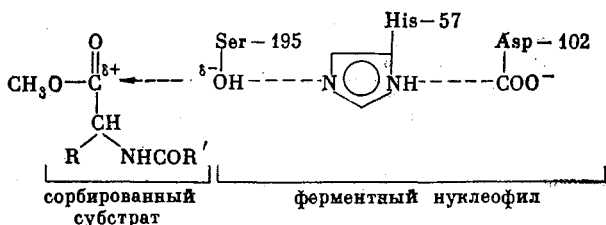
Механизм, учитывающий конформационную подвижность активного центра при взаимодействии его с субстратом, можно схематически представить в виде следующей модели [15]:



Такой механизм согласуется с результатами исследования быстрой (предстадионарной) кинетики ферментативного процесса [13, 24, 29].

§ 7. Собственная реакционная способность составного нуклеофила, входящего в активный центр химотрипсина

Как уже указывалось, в результате сорбции субстрата на ферменте субстратный карбонил оказывается расположенным вблизи нуклеофила активного центра (см. рис. 33). На стадии ацилирования головная группа ферментного нуклеофила — это гидроксил Ser-195, взаимодействующий с имидазольной группой His-57. Не исключено, что в реакции принимает участие карбоксильная группа Asp-102 (см. рис. 31) и все эти группы образуют систему с «эстафетной передачей заряда» [19, 37]:



При последующем гидролизе промежуточного ацилфермента [уравнения (4.2—4.5)] нуклеофильную атаку осуществляет молекула воды, реакционная способность которой усилена взаимодействием ее с имидазолом His-57 (см. рис. 32). Возможно, карбоксильная группа Asp-102 принимает участие также и на этой стадии:

ного фермент-субстратного взаимодействия E·R в ускорение ферментативной реакции не зависит от характера α-ациламидного заместителя [62, 129]. Так, данные для α-N-ацетилпроизводных (рис. 45, а) описывает следующее корреляционное уравнение:

$$\lg k_2/K_s \approx 2\pi_R - 0,8, \quad (4.43)$$

в то время как для α-N-бензоилпроизводных (рис. 45, б) имеем

$$\lg k_2/K_s \approx 2\pi_R + 0,1. \quad (4.44)$$

Замена в молекуле субстрата α-N-ацетила на α-N-бензоил хотя и приводит к увеличению реакционной способности примерно на порядок (сравни постоянные члены в правой части 4.43 и 4.44), но тем не менее влияние субстратного фрагмента R на скорость реакции остается одинаковым для обоих рядов субстратов. Это следует из того, что в пределах ошибок эксперимента множители при π_R совпадают.

Увеличение гидрофобности α-ациламидного остатка в молекуле субстрата также приводит к ускорению реакции (4.42), хотя и менее значительному. Из данных Нимэнна и др., которые проанализированы нами на рис. 46, следует, что реакционная способность метиловых эфиров N-ацилпроизводных L-аланина линейно зависит от гидрофобности α-ациламидного заместителя:

$$\lg k_2/K_s \approx 0,6\pi_{R'} - 0,05. \quad (4.45)$$

Отсутствие индукционного эффекта объясняется тем, что в данном ряду соединений при вариации заместителя R' слабо изменяется как скорость щелочного гидролиза (в пределах фактора «два»), так и величина pK_a соответствующих карбоновых кислот, или же, наконец, значение σ*-фактора по Тафту — Ингольду для α-ациламидного заместителя (см. литературу к [129]). Отсутствие стерического эффекта, возможно, обусловлено тем, что «химически инертный» остов субстратной молекулы, будучи сорбированным и тем самым закрепленным в полости активного центра, либо вообще не вызывает затруднений для атаки ферментным нуклеофилом, либо дает стерический эффект, примерно одинаковый во всем ряду исследуемых соединений.

С помощью линейных зависимостей типа $\lg k_2/K_s - \pi_{R'}$ можно описать реакционную способность метиловых эфиров также и других N-ацилзамещенных α-L-аминокислот (Val, Tug, Phe и др.), причем наклон сохраняет постоянное значение, равное примерно 0,6 [62]. Это означает, что гидрофобное взаимодействие с ферментом субстратного фрагмента R' вносит аддитивный вклад в ускорение реакции, поскольку величина вклада не зависит от природы специфической боковой группы R в молекуле аминокислоты.

Количественно проанализировать влияние на скорость реакции ацилирования (4.42) сорбции на ферменте одного NH-фрагмента, входящего в α-ациламидную часть субстрата (см. рис. 33), не представляется возможным. В литературе почти отсутствуют данные по скорости ацилирования химотрипсина метиловыми эфирами типа RCH₂C(O)OCH₃ или RCH(OCOR')C(O)OCH₃, не содержащими этого

фрагмента, поскольку такие субстраты весьма медленно реагируют с этим ферментом. Тем не менее вклад, который в ускорение катализируемой реакции вносит образование фермент-субстратной водородной связи (субстрат—NH... Ser-214), также является, по-видимому, аддитивным. Такая уверенность основана на том, что аддитивная модель справедлива для последующей химической стадии ферментативного процесса, стадии деацилирования. Это было показано на примере реакции (4.6).

Внутренняя реакционная способность нуклеофила, действующего в свободном ферменте. В итоге проведенного анализа можно считать доказанным постулат Бендера и Кежди [7] о том, что эффекты субстратных заместителей в химотрипсиновом катализе имеют аддитивный характер. Такое свойство ферментативного процесса означает, что свободная энергия того или другого сорбционного фермент-субстратного взаимодействия (стабилизирующего переходное состояние) входит в общую свободную энергию активации химической реакции в виде взаимно независимых слагаемых, а именно:

$$\Delta G^\ddagger = \Delta G^\ddagger_{\text{в отсутствие сорбции}} + \Delta G_{\text{гидрофоб. взаимодей.}}^{\text{E}\cdot\text{R}} + \Delta G_{\text{гидрофоб. взаимодей.}}^{\text{E}\cdot\text{R}'} + \Delta G_{\text{водород. связь}}$$
(4.46)

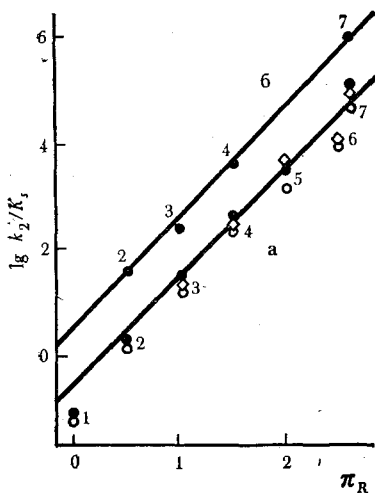


Рис. 45. Влияние гидрофобного фермент-субстратного взаимодействия на реакцию гидролиза химотрипсином метиловых эфиров N-ацетилзамещенных (а) и N-бензоилзамещенных (б) α -L-аминокислот (RCH(NHCOR')C(O)OCH₃) [129], если аминокислотные производные: 1 — Gly; 2 — Ala; 3 — α -аминобут; 4 — α -Val; 5 — α -Leu; 6 — α -аминогепт; 7 — Phe

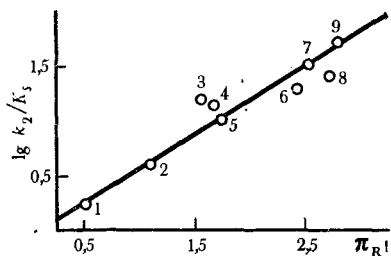


Рис. 46. Константы скорости второго порядка (k_2/K_S , M⁻¹·с⁻¹) для ацилирования химотрипсина метиловыми эфирами N-ацилпроизводных L-аланина, CH₃CH(NHCOR')C(O)OCH₃, в зависимости от показателя гидрофобности заместителя R' [129], если ацильная группа: 1 — ацетил; 2 — пиколинил; 3 — никотинил; 4 — изоникотинил; 5 — фурилл; 6 — 2-хинолинил; 7 — тиофенил; 8 — бензоил; 9 — o-аминобензоил

где валовая величина ΔG^\ddagger следует из экспериментальных данных k_2/K_s ; ΔG^\ddagger в отсутствие сорбции—свободная энергия активации реакции ацилирования, протекающей в отсутствие дополнительных сорбционных взаимодействий между «химически инертными» субстратными фрагментами и ферментом. Уравнение (4.46) имеет центральное значение для решения поставленной проблемы, поскольку на его основании можно вычислить искомую величину ΔG^\ddagger в отсутствие сорбции. Для этой цели используем уравнения (4.43)—(4.45), из которых следуют эффективные значения $\Delta G_{\text{Гидрофоб. взаимодей.}}^{\text{E}\cdot\text{R}}$ и $\Delta G_{\text{Гидрофоб. взаимодей.}}^{\text{E}\cdot\text{R}'}$, характеризующие гидрофобное фермент-субстратное взаимодействие в переходном состоянии. К сожалению, значение $\Delta G_{\text{водород. связь}}$ остается неизвестным; его можно лишь оценить из данных по деацилированию [уравнение (4.7)], если принять во внимание некоторые факты и согласиться на ряд допущений. Во-первых, можно было бы думать, что наблюдаемое ускорение [уравнение (4.7)] отражает суммарный вклад, который в скорость реакции (4.6) вносит весь α -ацетиламидный фрагмент NHCOCH_3 . Однако это не так. Гидрофобность заместителя R' в α -ацетиламидном фрагменте $-\text{NHCOR}'$ не оказывает практически никакого влияния на скорость стадии деацилирования [62]. Поэтому можно заключить, что постоянный член в правой части уравнения (4.7) отражает фактически лишь аддитивный эффект одного C(O)NH -фрагмента. Во-вторых, нужно принять, что сорбция на ферменте субстратного NH -фрагмента в одинаковой мере приводит к ускорению обеих химических стадий ферментативного процесса (k_2/K_s и k_3). На справедливость такого допущения указывает следующее. Реакционные способности метилового эфира α -*N*-ацетилфенилаланина и его кислородного аналога (α -*O*-ацетил-*L*-фениллактата, который не содержит α - NH -фрагмента, способного образовать с ферментом водородную связь) действительно различаются примерно в одинаковой мере как на стадии ацилирования (в 135 раз для констант скорости k_2/K_s) [130], так и на стадии деацилирования (в 300 раз) [59]. Поэтому можно заключить, что искомую величину $\Delta G_{\text{водород. связь}}$ с достаточной точностью отражает постоянный член в уравнении (4.7), если исправить его на индукционный и стерический эффекты α -ацетиламидного заместителя. В-третьих, нужно оценить величину поправки, равную $-(\rho^* \sigma^* + \delta E_s)$, по Тафту—Ингольду. Если воспользоваться значениями $\rho^* = 2,3$; $\delta = 0,72$; $\sigma^* = 0,56$ и $E_s = -0,39$ (см. литературу к [129]), то поправка, которую следует внести в постоянный член правой части уравнения (4.7), составит всего $-1,0$.

В итоге взаимосвязь структуры и реакционной способности метиловых эфиров *N*-ацилзамещенных α -*L*-аминокислот можно описать следующим общим уравнением:

$$\lg k_2/K_s \approx \lg k_{11} + 2\pi_{\text{R}} + 0,6\pi_{\text{R}'} + 1,4, \quad (4.47)$$

где константа скорости второго порядка k_{11} отражает внутреннюю реакционную способность ферментного нуклеофила в отвлеченной от реаль-

ности реакции, в которой боковые субстратные группы не принимают участия в сорбции на ферменте. Значение k_{II} следует из совместного решения уравнений (4.43) или (4.44) и (4.47), принимая значения π_R для ацетильной или бензоильной групп равными 0,5 и 2,1, соответственно; значение k_{II} также можно найти при совместном решении уравнений (4.45) и (4.47), полагая π_R в случае производных аланина равным 0,5 (значения π заимствованы из [105, 106]). В том и другом случае имеем

$$\lg k_{II} \approx -2,5. \quad (4.48)$$

Это означает следующее.

В свободном ферменте нуклеофил активного центра обладает весьма низкой внутренней реакционной способностью, гораздо меньшей, например, реакционной способности иона гидроксила или алкоксильных ионов (табл. 29).

Реакционная способность нуклеофила, действующего в фермент-субстратном комплексе. Для более детального обсуждения реакционной способности составного нуклеофила, действующего в активном центре, обратимся к механизмам, по которым силы сорбции субстрата на ферменте стабилизируют переходное состояние химической реакции.

Весьма просто была интерпретирована кинетическая роль сорбции на ферменте α -ациламидной группы субстрата (см. § 3 этой главы). Сейчас нет сомнений в том, что образование водородной связи между ферментом и α -ациламидным NH-фрагментом (см. рис. 32) «замораживает» молекулу субстрата в благоприятной ориентации ее по отношению к нуклеофилу активного центра. Аналогичную природу имеет, по-видимому, дополнительный, весьма слабый эффект гидрофобности α -ациламидной группы [уравнение (4.45)].

Таблица 29

Взаимодействие различных нуклеофилов с метиловым эфиром N-ацетил-L-фенилаланина [129]

Нуклеофил	Константа скорости второго порядка, $M^{-1} \cdot c^{-1}$
Химотрипсин	$10^5 (k_2/K_s)$
Нуклеофил в активном центре химотрипсина при отсутствии сорбционных фермент-субстратных взаимодействий	$3 \cdot 10^{-3} (k_{II})$
Ферментный нуклеофил в комплексе химотрипсина с метиловым эфиром N-ацетил-L-фенилаланина	$\sim 1(k_{II, ES})$
OH^-	2
$CH_3CH_2O^-$	8

Более сложным представляется вопрос о механизме стабилизации переходного состояния за счет гидрофобного взаимодействия с ферментом второго субстратного фрагмента, а именно боковой группы R. Из механизма (4.41) следует, что реакционная способность нуклеофила,

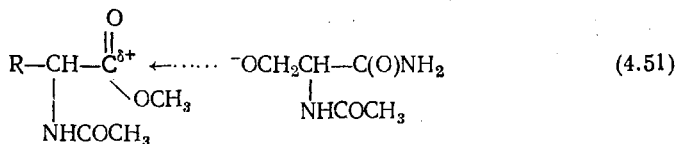
действующего в фермент-субстратном комплексе, должна отличаться от характеристики нуклеофила в свободном ферменте ($\lg k_{II}$) тем, что при комплексообразовании на дополнительную «организацию» активного центра затрачивается часть (а именно половина, см. рис. 44) свободной энергии гидрофобного взаимодействия фермента с субстратным фрагментом R. В таком случае уравнение (4.47) удобно привести к следующему виду:

$$\lg k_2/K_s \approx \lg k_{II, ES} + \pi_R + 0,6\pi_{R'} + 1,4 \quad (4.49)$$

и представить тем самым реакционную способность нуклеофила, действующего в продуктивном фермент-субстратном комплексе, в следующем виде:

$$\lg k_{II, ES} \approx \lg k_{II} + \pi_R \cdot \quad (4.50)$$

Как видно из уравнения (4.50), характеристика реакционной способности нуклеофила, действующего в фермент-субстратном комплексе, зависит от природы сорбированного субстрата. В табл. 29 приведено значение $k_{II, ES}$ для реакции ацилирования химотрипсина одним из наиболее специфических субстратов, производным фенилаланина. Интересно сравнить это значение с реакционной способностью алкоксильных ионов, поскольку головная группа ферментного нуклеофила — это алифатический гидроксил остатка Ser-195, протон которого взаимодействует с имидазольной группой His-57. Значение константы скорости реакции метилового эфира N-ацетил-L-фенилаланина с алкоксильным ионом N-ацетилсеринамида



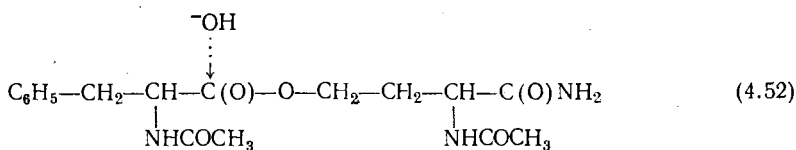
не выходит за рамки следующей оценки [129]: $0,1 \ll k \leq 1$. Как видно из табл. 29, эта оценка, характеризующая неферментативную модельную реакцию (4.51), поразительно совпадает (учитывая приближенный характер проведенных вычислений) с кинетической характеристикой $k_{II, ES} \approx 1$ для ферментативной реакции. На этом основании можно заключить следующее.

Внутренняя реакционная способность ферментного нуклеофила, действующего в комплексе химотрипсина с высокоспецифическим субстратом (производным L-фенилаланина), весьма близка к реакционной способности алкоксильного иона N-ацетилсеринамида. Это означает, что в комплексе химотрипсина со специфическим субстратом (т. е. в исходном состоянии стадии ацилирования) протон OH-группы Ser-195 полностью смещен к имидазолу His-57. В отличие от этого в свободном ферменте «цепь переноса заряда», по-видимому, не полностью собрана, поскольку здесь внутренняя реакционная способность ферментного нуклеофила значительно меньше, примерно на 3 порядка (сравни значения k_{II} и $k_{II, ES}$, приведенные в табл. 29), чем в фермент-субстратном комплексе.

Гидролиз промежуточного ацилхимотрипсина. Для того чтобы решить вопрос о внутренней реакционной способности ферментного нуклеофила, действующего в ацилферменте, сравним скорость этой псевдовнутримолекулярной реакции с аналогичной межмолекулярной реакцией. Атакующая группа составного нуклеофила — это молекула воды, «эффективная» концентрация которой в псевдовнутримолекулярных реакциях вряд ли может превысить, как полагает Дженкс [10], значение 55М, даже если учитывать некоторую степень ориентации молекулы воды при связывании ее в «систему с переносом заряда» (см. § 3 в гл. II). Следовательно, эффективную величину константы скорости второго порядка, которая следует из экспериментальных значений k_3 , можно принять равной $k_3/55$.

Ацилхимотрипсины — это сложные эфиры с участием алифатической ОН-группы остатка Ser-195. Поэтому вполне можно сравнить вычисленные значения эффективной константы скорости второго порядка ($k_3/55$) с данными по гидролизу сложноэфирной связи в соответствующих О-ацилзамещенных N-ацетилсеринамидах. Из табл. 30 видно, что гидролиз ацетилхимотрипсина, субстратный остаток которого не содержит фрагментов, которые могли бы сорбироваться на ферменте, протекает почти на 4 порядка медленнее, чем щелочной гидролиз сложноэфирной связи в О,N-диацетилсеринамиде (сравни константы скорости второго порядка). Это указывает на весьма низкую внутреннюю реакционную способность ацилферментного нуклеофила.

Совершенно другую картину имеем в случае специфического ацилфермента. Так, константа скорости ферментативного гидролиза ($k_3/55$) одного из наиболее специфических соединений, N-ацетил-L-фенилаланилхимотрипсина, практически совпадает с константой скорости для щелочного гидролиза метилового эфира N-ацетил-L-фенилаланина (см. табл. 30). Можно думать, что щелочной гидролиз более близкой к ацилферменту неферментативной модели, а именно О-(N-ацетил-L-фенилаланил)-N-ацетилсеринамида:



протекает лишь не намного быстрее, поскольку константы скорости для метилацетата и О,N-диацетилсеринамида отличаются всего лишь в 4 раза (см. табл. 30). Отсюда можно прийти к следующему выводу.

Реакционная способность молекулы воды, принимающей участие в гидролизе специфического ацилфермента (встроенной в активный центр N-ацетил-L-фенилаланилхимотрипсина), близка к реакционной способности гидроксильного иона. Поэтому можно заключить, что в ацилферменте, содержащем специфический субстратный остаток, протон молекулы воды, встроенной в активный центр, смещен в сторону имидазола His-57' практически нацело.

Такое представление согласуется с данными по относительной скорости катализируемого гидролиза сложных эфиров и амидов. Из табл.

Гидролиз сложноэфирной связи в некоторых ацилхимотрипсинах и модельных соединениях [129]

Соединение	Механизм реакции	k_s, c^{-1}	Константа скорости второго порядка, $M^{-1} \cdot c^{-1}$
Ацетилхимотрипсин	Ферментативная реакция	0,008	$1,4 \cdot 10^{-4}$
O, N-диацетилсеринамид	Щелочной гидролиз	—	0,8
	Нейтральный гидролиз, катализируемый основанием, в имидазольном буфере	—	$6 \cdot 10^{-6}$
Метилацетат	Щелочной гидролиз	—	0,2
N-ацетил-L-фенилаланил-химотрипсин	Ферментативная реакция	100	1,8
Метиловый эфир N-ацетил-L-фенилаланина	Щелочной гидролиз	—	1,9

Таблица 31

Относительные скорости катализируемого гидролиза сложных эфиров и амидов [131]

Катализатор	Сложный эфир	Амид	$k_{сл. \text{ эфир}}/k_{амид}$
-ОН H_3O^+ Химотрипсин	Метилацетат	Ацетамид	3400
	»	»	9
	Метиловый эфир N-ацетил-L-фенилаланина	Амид N-ацетил-L-фенилаланина	1000

31 видно, что относительная скорость существенно зависит от механизма реакции, будь это щелочной гидролиз или кислотный катализ. В случае химотрипсина этот кинетический показатель совпадает практически с характеристикой для нуклеофильной атаки гидроксильным ионом (см. также табл. 27). Наряду с этим интересно отметить, что найденные для ферментативной реакции значения констант Тафта ρ^* и δ [уравнение (4.26)] весьма близки к соответствующим характеристикам щелочного гидролиза ацилзамещенных этиловых или фениловых эфиров [132, 133]. Эта же закономерность характеризует большое число ацилферментов [134, 135].

* * *

Итак, изучая взаимосвязь структуры субстратов и их реакционной способности, можно, в принципе, оценить собственную реакционную способность нуклеофила, действующего в активном центре. К сделанным выводам остается добавить следующее.

1. Относительно низкий уровень собственной реакционной способности, который обнаруживает ферментный нуклеофил в свободном химотрипсине, имеет, по-видимому, важное биологическое значение. Дело в том, что такое свойство активного центра химотрипсина значительно ограничивает возможность неспецифических реакций при физиологических условиях.

2. Для познания природы ферментативного катализа представляет несомненный интерес другой результат, а именно то, что реакционная способность составного нуклеофила, действующего в активном центре, значительно возрастает при сорбции на ферменте специфического субстрата. Следует, однако, помнить, что этот результат (см. стр. 162) исходит из допущения, справедливость которого в принципе можно оспаривать.

3. Особого внимания заслуживает вывод (см. стр. 163), справедливость которого не ограничена никаким допущением. Напомним, что он непосредственно следует из того, что в случае специфического субстрата (метилового эфира *N*-ацетил-*L*-фенилаланина) константы скорости щелочного гидролиза и катализируемого ферментом водного гидролиза (на скоростьлимитирующей стадии, $k_3/55$) практически совпадают (табл. 30). Поэтому можно считать, что роль химотрипсина как катализатора реакции гидролиза сводится к сорбции на активном центре «химически инертных» фрагментов субстратной молекулы с последующим использованием сил сорбции для следующих действий: 1) поляризации молекулы воды, встроенной в активный центр ацилфермента настолько, что она полностью депротонирована; 2) жесткому закреплению (ориентации) субстратного карбонила по отношению к атакующему нуклеофилу (образовавшемуся гидроксильному иону), чтобы «эффективная концентрация» последнего достигла предельного для воды значения — 55М.

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ IV

1. Нейрат Г. В кн. «Молекулы и клетки», М., «Мир», 1966.
2. Мосолов В. В. Протеолитические ферменты. М., «Наука», 1971.
3. Штрауб Ф. Б. Биохимия. Будапешт, Изд-во АН Венгрии, 1965.
4. Bergmann M., Fruton J. S. *Advan. Enzymol.*, **1**, 63 (1941).
5. Bergmann M. *Advan. Enzymol.*, **2**, 49 (1942).
6. Cunningham L. *Comprehensive Biochem.*, **16**, 85 (1965).
7. Bender M. L., Kezdy F. J. *Ann. Rev. Biochem.*, **34**, 49 (1965).
8. Брюст Т., Бенкович С. Механизмы биоорганических реакций М., «Мир», 1970.
9. Бернхард С. Структура и функция ферментов. М., «Мир», 1971.
10. Дженкс В. Катализ в химии и энзимологии. М., «Мир», 1972.
11. Ламри Р., Бильтонен Р. В сб.: «Структура и стабильность биологических макромолекул». М., «Мир», 1973.
12. Luthy R. In «Electron and Coupled Energy Transfer in Biological Systems» (King and Klingenberg, eds.), v. 1, part A, New York, Marcel Dekker, 1971.
13. Hess G. P. In «The Enzymes», v. 3, New York and London, Acad. Press, 1971.
14. Blow D. M., Steitz T. A. *Ann. Rev. Biochem.*, **39**, 63 (1970).

15. Березин И. В., Мартинек К. В сб.: «Структура и функции активных центров ферментов». М., «Наука», 1974.
16. Березин И. В., Мартинек К. В сб.: «Структура и функции ферментов». Изд-во МГУ, 1972.
17. Matthews B. W., et al. *Nature*, **214**, 652 (1967).
18. Henderson R. J. *Mol. Biol.*, **54**, 341 (1970).
19. Birktoft J. J., et al. *Phil. Trans. Roy. Soc. (London)*, **B 257**, 67 (1970).
20. Neurath H., Schwert G. W. *Chem. Rev.*, **46**, 69 (1950).
21. Dorovska V. N., Varfolomeyev S. D., Kazanskaya N. F., Klyosov A. A., Martinek K. *FEBS Letters* **23**, 122 (1972).
22. Bruice T. C. *Brookhaven Symp. Biol.*, **15**, 52 (1962).
23. Phillip M., Bender M. L. *Nature-New Biology*, **241**, 44 (1973).
24. Hess G. P., et al. *Phil. Trans. Roy. Soc. (London)*, **B257**, 89 (1970).
25. Березин И. В., Варфоломеев С. Д., Мартинек К. *Усп. хим.*, **43**, 835 (1974).
26. Miller Ch. G., Bender M. L. *J. Amer. Chem. Soc.*, **90**, 6850 (1968).
27. Wählby S. *Acta Chem. Scand.*, **24**, 2429 (1970).
28. Berezin I. G., Kazanskaya N. F., Klyosov A. A., Svendas V. K. *Eur. J. Biochem.*, **38**, 529 (1973).
29. Bernhard S. A., Gutfreund H. *Trans. Phil. Trans. Roy. Soc. (London)*, **B 257**, 105 (1970).
30. Himoe A., Brandt K., Hess G. P. *J. Biol. Chem.*, **242**, 3963 (1967).
31. Rossi G. L., Bernhard S. A. *J. Mol. Biol.*, **55**, 215 (1971).
32. Bender M. L., Kezdy F. J. *J. Amer. Chem. Soc.*, **86**, 3704 (1964).
33. Bruice T. C., Fife T. H., Bruno J. J. *Biochemistry*, **1**, 7 (1962).
34. Thanasi J. W., Bruice T. C. *J. Amer. Chem. Soc.*, **88**, 747 (1966).
35. Anderson B. M., Cordes E. H., Jencks W. P. *J. Biol. Chem.*, **236**, 455 (1961).
36. Bender M. L., Schonbaum G. R., Zerner B. *J. Amer. Chem. Soc.*, **84**, 2541 (1962).
37. Blow D. M., Birktoft J. J., Hartley B. S. *Nature*, **221**, 337 (1969).
38. Polgar L., Bender M. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **64**, 1335 (1969); *Polgar L. J. Theoret. Biol.*, **31**, 165 (1971).
39. Полгар Л. В сб.: «Структура и функции активных центров ферментов». М., «Наука», 1974.
40. Rossi G. L., Bernhard S. A. *J. Mol. Biol.*, **49**, 85 (1970).
41. Klyosov A. A., Van Viet N., Berezin I. V. *Eur. J. Biochem.*, **59**, 3 (1975).
42. Bender M. L., Clement G. E., Kezdy F. J., Heck H. d'A. *J. Amer. Chem. Soc.*, **86**, 3680, 3690 (1964).
43. Fersht A. R., Renard M. *Biochemistry*, **13**, 1416 (1974).
44. Kasserra H. P., Laidler K. J. *Can. J. Biochem.*, **47**, 4031 (1969).
45. Hunkapiller M., Smallcombe S., Whitaker D., Richards J. N. *Biochemistry*, **12**, 4732 (1973).
46. Johnson C. H., Knowles J. R. *Biochem. J.*, **103**, 428 (1967).
47. Valenzuela P., Bender M. L. *J. Amer. Chem. Soc.*, **93**, 3783 (1971).
48. Marini M. A., Martin C. J. *Eur. J. Biochem.*, **19**, 162 (1971).
49. Inward P. W., Jencks W. P. *J. Biol. Chem.*, **240**, 1986 (1965).
50. Erand R. M., Wilson I. B. *J. Biol. Chem.*, **240**, 1104 (1965).
51. O'Leary M. H., Kluetz M. D., *J. Amer. Chem. Soc.*, **93**, 7341 (1971).
52. Wedler F. C., Killian F. L., Bender M. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **65**, 1120 (1970).
53. Березин И. В., Казанская Н. Ф., Клёсов А. А. *Биохимия*, **36**, 108 (1971).
54. Bergmann M. *Harvey Lectures Ser.*, **31**, 37 (1936).
55. Hein G. E., Niemann C. *Proc. Natl. Sci. U.S.A.*, **47**, 1341 (1964); *J. Amer. Chem. Soc.*, **84**, 4495 (1962).
56. Zerner B., Bender M. L. *J. Amer. Chem. Soc.*, **86**, 3669 (1964).

57. Brandt K. G., Himoe A., Hess G. P. *J. Biol. Chem.*, **242**, 3973 (1967).
58. Berezin I. V., Kazanskaya N. F., Klyosov A. A. *FEBS Letters*, **15**, 121 (1971).
59. Ingles D. W., Knowles J. R., *Biochem. J.* **108**, 561 (1968).
60. Левашов А. В. Исследование гидрофобного взаимодействия активного центра химотрипсина с конкурентными ингибиторами. Канд. дисс., МГУ, 1970.
61. Zerner B., Bond R., Bender M. L. *J. Amer. Chem. Soc.*, **86**, 3674 (1964).
62. Berezin I. V., Kazanskaya N. F., Klyosov A. A., Martinek K. *FEBS Letters*, **15**, 125 (1971).
63. Доровска В. Н. Специфичность химотрипсина. Канд. дисс., МГУ, 1972.
64. Hamilton C. L., Niemann C., Hammond G. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **55**, 664 (1966).
65. Cohen S. G., Schultz R. M. *J. Biol. Chem.*, **243**, 2607 (1968).
66. Steitz T. A., Henderson R., Blow D. M. *J. Mol. Biol.*, **46**, 337 (1969).
67. Birkoft J. J., Blow D. M. *J. Mol. Biol.*, **68**, 187 (1972).
68. Segal D. M., Powers J. C., Cohen G. H., Davies D. R., Wilcox P. E. *Biochemistry*, **10**, 3728 (1971).
69. Cohen S. G. *Trans. N. Y. Acad. Sci., Ser. II*, **31**, 705 (1969).
70. Martinek K., Dorovska V. H., Berezin I. V. *Biochim. Biophys. Acta.*, **271**, 80 (1972).
71. Мартинек К., Доровска В. Н., Варфоломеев С. Д. *Биохимия*, **37**, 662 (1972).
72. Laskowski M., Scheraga H. *J. Amer. Chem. Soc.*, **76**, 6305 (1954).
73. Левашов А. В., Мартинек К., Березин И. В. *Мол. биол.*, **5**, 198 (1971).
74. Foster R. J., Coahran D. R. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **22**, 245 (1963).
75. Wallace R., Kurtz A. N., Niemann C. *Biochemistry*, **2**, 824 (1963).
76. Miles J. L., Robinson D. A., Canady W. J. *J. Biol. Chem.*, **238**, 2932 (1963).
77. Bernhard S. A., Lee V. F., Tashjian Z. H. *J. Mol. Biol.*, **18**, 405 (1966).
78. Glazer A. N. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **54**, 171 (1965).
79. Варфоломеев С. Д., Мартинек К., Березин И. В. *Мол. биол.*, **6**, 148 (1972); **7**, 115 (1973).
80. Kallos J., Avatis K. *Biochemistry*, **5**, 1979 (1966).
81. Самокиш В. А., Ануфриева Е. В., Волькенштейн М. В. *Мол. биол.*, **5**, 711 (1971).
82. Березин И. В., Мартинек К., Яцимирский А. К. *Усп. хим.*, **42**, 1729 (1973).
83. Berezin I. V., Levashov A. V., Martinek K. *FEBS Letters*, **7**, 20 (1970).
84. Мартинек К., Левашов А. В., Березин И. В. *Мол. биол.*, **4**, 339 (1970).
85. Мартинек К., Левашов А. В., Березин И. В. *Мол. биол.*, **4**, 517 (1970).
86. Левашов А. В. Исследование гидрофобного взаимодействия активного центра химотрипсина с конкурентными ингибиторами. Канд. дисс., МГУ, 1970.
87. Когановский А. М., Ровинская А. М. В сб.: «Иониты и ионный обмен». М., «Наука», 1966, с. 177.
88. Когановский А. М., Левченко Т. М. *Коллоид. журн.*, **31**, 384 (1969).
89. Bender M. L., Wendler F. C. Jr. *J. Amer. Chem. Soc.*, **89**, 3052 (1967).

90. Agarow R. H., Witten L. J. Phys. Chem., **64**, 1643 (1960).
91. Ребиндер П. А. Ж. прикл. физ., **1**, 153 (1924).
92. Ward A. F. N., Tordai L. Trans. Faraday Soc., **42**, 339, 408, 413 (1946).
93. Wishnia A. J. Phys. Chem., **67**, 2079 (1963).
94. Berezin I. V., Levashov A. V., Martinek K. Eur. J. Biochem., **16**, 472 (1970).
95. Мартинек К., Левашов А. В., Березин И. В. Биохимия, **36**, 167 (1971).
96. Aveyard R., Lawrence A. S. Trans. Faraday Soc., **60**, 2265 (1964).
97. Benjamin L. J. Phys. Chem., **68**, 3577 (1964).
98. Мартинек К., Яцимирский А. К., Березин И. В. Мол. биол., **5**, 96 (1971).
99. Мартинек К., Левашов А. В., Березин И. В. Биохимия, **35**, 1207 (1970).
100. Курганов Б. И. В Сб.: «Итоги науки», сер. «Биол. химия». М., Изд-во ВИНТИ, 1970.
101. Мартинек К., Варфоломеев С. Д., Березин И. В. Мол. биол., **5**, 351 (1971).
102. Березин И. В., Мартинек К. Мол. биол., **1**, 488 (1967).
103. Тафт Р. В. В кн.: «Пространственные эффекты в органической химии». М., ИЛ, 1960.
104. Duraix A., Bchet J. J. Roucoux C. Biochem. Biophys. Res. Commun., **41**, 464 (1970).
105. Leo A., Hansch C., Elkins D. Chem. Rev., **71**, 525 (1971).
106. Hansch C. J. Org. Chem., **37**, 92 (1972).
107. Evans D. P., Gordon J. J., Watson H. B. J. Chem. Soc., **1938**, 1439.
108. Davies G., Evans D. P. J. Chem. Soc., **1940**, 339.
109. Smith H. A., Levenson H. S. J. Amer. Chem. Soc., **61**, 1172 (1939).
110. Marshall T. H., Akgün A. J. Biol. Chem., **246**, 6019 (1971).
111. Malhotra O. P., Philip G. Biochem. Z., **346**, 386 (1966).
112. Ingles D. W., Knowles J. R. Biochem. J., **104**, 369 (1967).
113. Мартинек К. Кинетико-термодинамические закономерности ферментативного катализа. Докт. дисс. МГУ, 1973.
114. Антонов В. К., Иванина Т. И., Berezin I. V., Martinek K. FEBS Lett., **7**, 23 (1970).
115. Антонов В. К., Иванина Т. И., Berezin I. V., Martinek K. FEBS Lett., **20**, 37 (1972).
116. Martinek K., Klyosov A. A., Berezin I. V. Int. J. Chem. Kinetics, **6**, 801 (1974).
117. Rajender S., Han M., Lumty R. J. Amer. Chem. Soc., **92**, 1378 (1970).
118. Березин И. В., Казанская Н. Ф., Клёсов А. А. Биохимия, **36**, 227 (1971).
119. Phillip M., Pollack R. M., Bender M. L. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **70**, 517 (1973).
120. Gerstein J., Jencks W. P. J. Amer. Chem. Soc., **86**, 4655 (1964).
121. Jencks W. P., Cordes S., Carriuolo J. J. Biol. Chem., **235**, 3608 (1960).
122. Berezin I. V., Martinek K. FEBS Lett., **8**, 261 (1970).
123. Birktoft J. J., Blow D. M. J. Mol. Biol., **68**, 187 (1972).
124. Neet E., Koshland D., Jr., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., **56**, 1606 (1966).
125. Wang J. H. Science, **161**, 328 (1968).
126. Valenzuela P., Bender M. L. Biochim. Biophys. Acta, **235**, 411 (1971).
127. Fersht A. R. J. Mol. Biol., **64**, 497 (1972).
128. Brot F. E., Bender M. L. J. Amer. Chem. Soc., **91**, 7187 (1969).

129. Березин И. В., Мартинек К. Биоорг. химия, **1**, 520 (1975).
130. Cohen S. G., Vaidaya V. M., Schultz R. M. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **66**, 249 (1970).
131. Knowles J. R. Phil. Trans. Roy. Soc. London **B257**, 135 (1970).
132. Holmquist B., Bruice T. C. J. Amer. Chem. Soc., **91**, 2982, 2985 (1969).
133. Bruice T. C., Hegarty A. F., Felton S. M. J. Amer. Chem. Soc., **91**, 2875 (1969).
134. Caplow M., Jencks W. Biochemistry, **1**, 883 (1962).
135. Williams A., Salvadori G. J. Chem. Soc., (B) **12**, 2401 (1971).



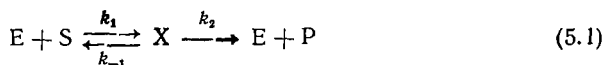
Материал, собранный во второй части книги, ни в коей мере не следует считать систематическим изложением многогранного кинетического метода в приложении его к ферментативному катализу. Это скорее всего попытка рационального отбора наиболее распространенных и оправдавших себя подходов к изучению структуры активного центра и механизма действия ферментов. Они изложены в весьма сжатой форме, которую, однако, легко раскрыть в ходе семинарских занятий. Все примеры, иллюстрирующие отдельные теоретические положения, отобраны из непосредственных экспериментальных данных для широкого круга ферментов.

ГЛАВА V

КИНЕТИЧЕСКИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ В НЕСТАЦИОНАРНОМ РЕЖИМЕ

§ 1. Введение

Исследования кинетики ферментативных реакций в стационарном режиме — один из наиболее распространенных способов изучения механизма действия ферментов. Это определяется рядом особенностей ферментативных реакций и прежде всего тем, что для ферментативных реакций стационарное состояние устанавливается весьма быстро. Для простейшей схемы ферментативного процесса с участием одного промежуточного соединения (схема Михаэлиса — Ментен):



кинетику реакции описывает система уравнений, включающая два дифференциальных уравнения (5.2), (5.3) и уравнения материального баланса (5.4) и (5.5):

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2 [X]; \quad (5.2)$$

$$\frac{d[X]}{dt} = k_1 [E][S] - (k_{-1} + k_2) [X]; \quad (5.3)$$

$$[E]_0 = [E] + [X]; \quad (5.4)$$

$$[S]_0 = [S] + [P] + [X]. \quad (5.5)$$

Принцип стационарности (более подробно см. литературу к «Предисловию») в применении к этой реакции означает, что после некоторого, определенного промежутка времени от начала реакции концентрация промежуточного продукта X достигает максимального значения и в течение некоторого (как правило, более продолжительного) промежутка времени практически не изменяется. Иными словами, в условиях стационарного режима реакции имеем

$$\frac{d[X]}{dt} = 0; \quad \frac{d^2[X]}{dt^2} < 0. \quad (5.6)$$

Такое состояние реакционной системы действительно возможно, поскольку из уравнения (5.3) следует, что существует набор концентраций фермента, субстрата и промежуточного соединения X, при котором выполняется условие (5.6). В этом стационарном состоянии концентрации субстрата, фермента и промежуточного соединения взаимосвязаны соотношением

$$[X] = \frac{k_1 [E] [S]}{k_{-1} + k_2}. \quad (5.7)$$

Вторая производная концентрации промежуточного соединения по времени определяется уравнением

$$\frac{d^2[X]}{dt^2} = k_1 [E] \frac{d[S]}{dt} < 0 \quad (5.8)$$

и в условиях расходования субстрата меньше нуля.

При использовании принципа стационарности для практических целей правую сторону уравнения (5.3) приравнивают к нулю и тем самым система уравнений (5.3)—(5.5) существенно упрощается, поскольку становится системой из трех алгебраических уравнений с тремя неизвестными: [E], [S] и [X]. Решение этой системы уравнений позволяет определить стационарные концентрации свободного фермента, субстрата и промежуточного соединения и при последующем использовании уравнения (5.2) найти значение наблюдаемой на опыте стационарной скорости реакции как функции исходных концентраций фермента, субстрата и констант скоростей элементарных стадий.

При исследовании реальных ферментативных систем условие стационарности (5.6) выполняется лишь приблизительно. Для применения принципа стационарности на практике достаточно, чтобы скорость изменения концентрации промежуточного соединения была много меньше скорости изменения в растворе концентрации продукта. Действительно, предположим, что скорость изменения концентрации промежуточного соединения отлична от нуля и в определенном интервале времени в первом приближении не зависит от времени:

$$\frac{d[X]}{dt} = k_1 [E]_0 [S] - (k_{-1} + k_2 + k_1 [S]) [X] = \epsilon. \quad (5.9)$$

В этих условиях концентрация промежуточного соединения дается уравнением

$$[X] = \frac{k_1 [E]_0 [S] - \varepsilon}{k_1 [S] + k_2 + k_{-1}}, \quad (5.10)$$

а выражение для наблюдаемой скорости можно записать в следующем виде:

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2 [X] = v_{\text{стац}} - \frac{k_2 \varepsilon}{k_1 [S] + k_2 + k_{-1}}, \quad (5.11)$$

где $v_{\text{стац}}$ — скорость реакции при строгом выполнении условия стационарности (5.6). Из уравнения (5.11) следует:

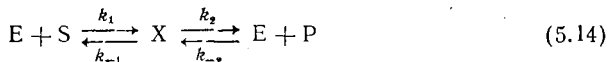
$$v_{\text{стац}} = \frac{d[P]}{dt} + \frac{\varepsilon}{1 + \frac{k_{-1}}{k_2} + \frac{k_1 [S]}{k_2}} \quad (5.12)$$

и поэтому при

$$\frac{d[P]}{dt} \gg \varepsilon \quad (5.13)$$

регистрируемая скорость ($d[P]/dt$) равна $v_{\text{стац}}$.

Для реакций, протекающих по более сложным механизмам (по сравнению с механизмом Михаэлиса—Ментен), стационарное состояние существует лишь при некоторых дополнительных условиях, определяемых соотношением констант скоростей индивидуальных стадий. Так, например, для обратимой ферментативной реакции с участием одного промежуточного соединения



стационарное состояние в строгом смысле [т. е. при точном соблюдении условий (5.6)] возможно только при следующем соотношении констант:

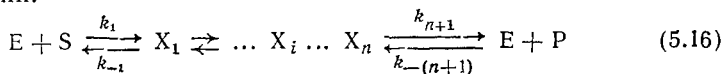
$$k_1 > k_{-2}. \quad (5.15)$$

Это соотношение является следствием одного из критериев существования максимума:

$$\frac{d^2[X]}{dt^2} = (k_{-2} - k_1) [E] \frac{d[P]}{dt} < 0.$$

Поскольку в реакции происходит накопление продукта реакции и, следовательно, $\frac{d[P]}{dt} > 0$, условие (5.6) может иметь место лишь при соотношении (5.15).

В случае, если механизм реакции включает несколько промежуточных соединений:



кинетика реакции в строгом смысле не может быть стационарной, т. е. ни в какой момент времени не может быть достигнуто условие

$$\frac{d[X_i]}{dt} = 0 \quad \text{для всех } i = 1 \dots n. \quad (5.17)$$

Причины этого подробно анализируются в монографии Ч. Уолтера [1].

Однако для многих ферментативных реакций условие стационарности может выполняться приближенно. Для этого достаточно, чтобы абсолютные значения производных по времени для концентраций промежуточных соединений были одновременно малы (но не обязательно равны нулю) по сравнению с абсолютными значениями производных концентраций субстрата и продукта, т. е.

$$\frac{d[S]}{dt} \gg \frac{d[X_i]}{dt}; \quad \frac{d[P]}{dt} \gg \frac{d[X_i]}{dt} \quad \text{для } i = 1 \dots n. \quad (5.18)$$

Поскольку на практике соотношения (5.18) соблюдаются довольно часто, стационарная кинетика находит широкое применение при исследовании механизмов ферментативных реакций.

Другой важный фактор, способствующий развитию стационарной кинетики ферментативных реакций, — простота экспериментальных методов исследования этих реакций в стационарном режиме. Существенную роль играет также и то, что формально-кинетический анализ уравнений стационарной кинетики, основанный на решении систем линейных алгебраических уравнений, достаточно прост и хорошо разработан (см. [2—4]), а также гл. VI).

С другой стороны изучение ферментативных реакций в стационарном режиме имеет ряд существенных недостатков. Наиболее важным из них является то, что стационарная кинетика дает весьма ограниченную информацию о детальном кинетическом механизме ферментативной реакции. Стационарная кинетика, отражая лишь лимитирующие стадии процесса, практически не дает информации о «быстрых», нелIMITирующих стадиях превращения субстрата в активном центре фермента. Определение элементарных констант скорости многостадийной ферментативной реакции из данных стационарной кинетики не представляется возможным. Действительно, кинетика каталитической реакции, включающей n промежуточных соединений (схема 5.16), описывается $2(n + 1)$ константами скорости. Стационарная же скорость этой обратимой реакции независимо от числа промежуточных соединений, принимающих участие в механизме реакции, дается уравнением (см. гл. VI)

$$v_{\text{стан}} = \frac{\left(\frac{k_{\text{кат}}(S)}{K_S} [S]_0 - \frac{k_{\text{кат}}(P)}{K_P} [P]_0 \right) [E]_0}{1 + [S]_0/K_S + [P]_0/K_P}. \quad (5.19)$$

Из зависимости стационарной скорости реакции от концентраций фермента, субстрата и продукта могут быть найдены лишь 4 параметра $k_{\text{кат}}(S)$, $k_{\text{кат}}(P)$, $K_{(S)}$, $K_{(P)}$ — сложные функции элементарных констант. Видно, что при $n > 1$ определение всех элементарных констант скорости из данных по стационарной кинетике невозможно.

Более детальную информацию о механизме ферментативной реакции с участием ряда промежуточных соединений дает изучение процесса в нестационарном режиме. Именно поэтому теоретические и экспериментальные методы исследования нестационарной кинетики ферментативных реакций получили в последнее время существенное развитие.

Кинетическое описание ферментативных реакций в нестационарном режиме связано с определенными математическими трудностями. Например, для анализа реакции, протекающей по схеме Михаэлиса — Ментен (схема 5.1), необходимо решить систему дифференциальных и алгебраических уравнений (5.2)—(5.5). Формально-кинетический анализ ферментативных реакций развивается как по пути использования численных методов интегрирования систем дифференциальных уравнений, так и по пути использования аналитических методов. Аналитическое решение имеет определенные преимущества. Поэтому важно указать, что аналитическое решение системы дифференциальных и алгебраических уравнений может быть существенно упрощено, если при использовании определенных условий систему можно трансформировать в линейную систему уравнений. Развитие методов нестационарной кинетики ферментативных реакций идет именно по этому пути.

§ 2. Нестационарная кинетика ферментативных реакций при переменной концентрации субстрата

Кинетические закономерности реакции с участием одного промежуточного соединения. Для механизма реакции с участием одного промежуточного соединения (5.1) система уравнений (5.2)—(5.5), описывающая изменение во времени всех компонентов реакции, нелинейна, поскольку содержит член с произведением переменных $k_1 [S][E]$, и, следовательно, решение этой системы уравнений в большинстве случаев сопряжено с приближенным численным интегрированием. Решение можно упростить, если проводить реакцию в условиях избытка одного из компонентов:

$$[S]_0 \gg [E]_0 \quad (5.20)$$

или

$$[E]_0 \gg [S]_0. \quad (5.21)$$

Тогда система уравнений трансформируется в линейную систему. Кинетические закономерности реакции, протекающей при условии (5.20), будут рассмотрены в § 3 этой главы. Сейчас проанализируем случай, когда концентрация субстрата — переменная величина и в процессе реакции происходит полное расходование субстрата.

Случай при избытке концентрации фермента. При условии (5.21) естественно положить

$$[E] = [E]_0 \quad (5.22)$$

и тогда уравнение (5.3) можно записать в линейном виде:

$$\frac{d[X]}{dt} = k_1 [E]_0 [S] - (k_{-1} + k_2) [X]. \quad (5.23)$$

Для того чтобы (5.23) свести к одной функциональной зависимости $[X]$ от t , подставим значение $[S]$ из (5.5):

$$\frac{d[X]}{dt} = k_1 [E]_0 ([S]_0 - [P] - [X]) - (k_{-1} + k_2) [X], \quad (5.24)$$

продифференцируем:

$$\frac{d^2[X]}{dt^2} = -k_1 [E]_0 \left(\frac{d[P]}{dt} + \frac{d[X]}{dt} \right) - (k_{-1} + k_2) \frac{d[X]}{dt}. \quad (5.25)$$

Если заменить $d[P]/dt$ из (5.2), получим линейное дифференциальное уравнение второго порядка:

$$\frac{d^2[X]}{dt^2} + (k_2 + k_{-1} + k_1 [E]_0) \frac{d[X]}{dt} + k_1 k_2 [E]_0 [X] = 0. \quad (5.26)$$

Соответствующее характеристическое уравнение

$$\lambda^2 + (k_1 [E]_0 + k_{-1} + k_2) \lambda + k_2 k_1 [E]_0 = 0 \quad (5.27)$$

имеет два действительных корня:

$$\lambda_{1,2} = -\frac{k_2 + k_{-1} + k_1 [E]_0}{2} \pm \sqrt{\frac{(k_2 + k_{-1} + k_1 [E]_0)^2}{4} - k_2 k_1 [E]_0} \quad (5.28)$$

поскольку

$$(k_1 [E]_0 + k_{-1} + k_2)^2 > 4k_1 k_2 [E]_0. \quad (5.29)$$

В соответствии с теорией линейных дифференциальных уравнений решение уравнения (5.26) в этом случае имеет вид

$$[X] = C_1 e^{\lambda_1 t} + C_2 e^{\lambda_2 t}, \quad (5.30)$$

где λ_1, λ_2 — корни характеристического уравнения; C_1, C_2 — постоянные интегрирования, определяемые из начальных условий. Для нахождения постоянных C_1 и C_2 используем условия:

$$t = 0; \quad [X] = 0; \quad d[X]/dt = k_1 [E]_0 [S]_0. \quad (5.31)$$

Подстановка этих условий в уравнение (5.30) приводит к системе алгебраических уравнений:

$$C_1 + C_2 = 0; \quad (5.32)$$

$$\lambda_1 C_1 + \lambda_2 C_2 = k_1 [E]_0 [S]_0, \quad (5.33)$$

решение которой дает постоянные интегрирования:

$$C_1 = \frac{k_1 [E]_0 [S]_0}{\lambda_1 - \lambda_2}; \quad (5.34)$$

$$C_2 = \frac{k_1 [E]_0 [S]_0}{\lambda_2 - \lambda_1}. \quad (5.35)$$

Таким образом, изменение во времени концентрации промежуточного соединения описывает функция

$$[X] = k_1 [E]_0 [S]_0 \left\{ \frac{1}{\lambda_1 - \lambda_2} e^{\lambda_1 t} + \frac{1}{\lambda_2 - \lambda_1} e^{\lambda_2 t} \right\}. \quad (5.36)$$

Изменение во времени концентрации субстрата можно найти из (5.23) при подстановке $[X]$ и $d[X]/dt$:

$$[S] = [S]_0 \left\{ \frac{\lambda_1 + k_{-1} + k_2}{\lambda_1 - \lambda_2} e^{\lambda_1 t} + \frac{\lambda_2 + k_{-1} + k_2}{\lambda_2 - \lambda_1} e^{\lambda_2 t} \right\}. \quad (5.37)$$

Соответственно функция $[P](t)$ определяется подстановкой уравнения (5.36) в уравнение (5.2) и интегрированием полученного дифференциального уравнения с разделяющимися переменными:

$$[P] = k_2 \int_0^t [X] dt = k_1 k_2 [E]_0 [S]_0 \left\{ \frac{1}{\lambda_1 (\lambda_1 - \lambda_2)} (e^{\lambda_1 t} - 1) + \frac{1}{\lambda_2 (\lambda_2 - \lambda_1)} (e^{\lambda_2 t} - 1) \right\}. \quad (5.38)$$

График зависимостей $[S](t)$, $[X](t)$ и $[P](t)$ представлен на рис. 47. Характерной особенностью этих функций является то, что они представляют собой суммы одних и тех же экспоненциальных членов $e^{\lambda_1 t}$ и $e^{\lambda_2 t}$, различающиеся лишь предэкспонентами. Величины λ_1 и λ_2 имеют размерность обратного времени и связаны с характеристическими временами регистрируемых кинетических процессов соотношениями:

$$\lambda_1 = -\frac{1}{\tau_1}; \quad (5.39)$$

$$\lambda_2 = -\frac{1}{\tau_2}. \quad (5.40)$$

Величины τ_1 и τ_2 могут быть найдены из любой экспериментальной зависимости $[S](t)$, $[X](t)$ или $[P](t)$. В свою очередь из анализа найденных на опыте величин τ_1 и τ_2 (или λ_1 и λ_2) определяются все константы скорости, описывающие механизм реакции (5.1).

Для определения констант скорости учтем, что с точностью до постоянных уравнения (5.36) и (5.37) могут быть представлены в виде:

$$y = ae^{\lambda_1 t} + be^{\lambda_2 t}, \quad (5.41)$$

а уравнение (5.38) можно записать следующим образом:

$$y = ae^{\lambda_1 t} + be^{\lambda_2 t} + c, \quad (5.42)$$

где $c = [S]_0$. На рис. 48,а представлен общий вид функции (5.41). Из линейной части кривой в полулогарифмических координатах (рис. 48,б), когда первым (более «быстрым») экспоненциальным членом уже можно пренебречь, по тангенсу угла наклона определяется величина λ_2 , а по отрезку, отсекаемому на оси ординат, — величина b . Показатель первой экспоненты можно найти по тангенсу угла наклона зависимости $\ln(y - be^{\lambda_2 t})$ в соответствии с уравнением

$$\ln(y - be^{\lambda_2 t}) = \ln a + \lambda_1 t, \quad (5.43)$$

как это показано на рис. 48, в. Аналогичным образом можно графически проанализировать функцию (5.42) в виде

$$y - [S]_0 = ae^{\lambda_1 t} + be^{\lambda_2 t} \quad (5.44)$$

для определения λ_2 и, соответственно, в виде $\ln([S]_0 + y - be^{\lambda_2 t}) = ae^{\lambda_1 t}$ для определения λ_1 .

Величины λ_1 и λ_2 связаны с элементарными константами скорости реакции (5.1) достаточно сложным соотношением (5.28) и поэтому непосредственное определение констант скоростей из величин λ_1 и λ_2 затруднено [за исключением одного частного случая, рассмотренного ниже, см. уравнение (5.47)]. Однако функции $(\lambda_1 \cdot \lambda_2)$ и $(\lambda_1 + \lambda_2)$ связаны как корни характеристического уравнения (5.27) с константами скоростей k_1 , k_{-1} и k_2 следующими отношениями:

$$\lambda_1 \lambda_2 = k_2 k_1 [E]_0; \quad (5.45)$$

$$-(\lambda_1 + \lambda_2) = k_1 [E]_0 + k_{-1} + k_2. \quad (5.46)$$

При условии, что величины λ_1 и λ_2 (или τ_1 и τ_2) найдены из эксперимента при различных концентрациях фермента (т. е. найдены зависимости λ_1 и λ_2 от $[E]_0$), используя уравнения (5.45) и (5.46), можно найти все константы скорости реакции (5.1), как это показано на рис. 49. Из зависимости функции $\left(\frac{1}{\tau_1} + \frac{1}{\tau_2}\right)$ от концентрации фермента по тангенсу угла наклона и отрезку, отсекаемому на оси ординат, определя-

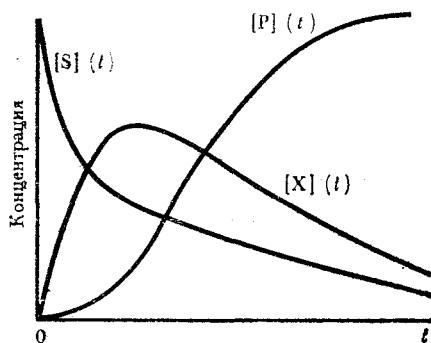


Рис. 47. Зависимость от времени концентраций субстрата (S), промежуточного соединения (X) и продукта (P) в нестационарном режиме протекания реакции (5.1) при переменной концентрации субстрата [уравнения (5.36)–(5.38)]

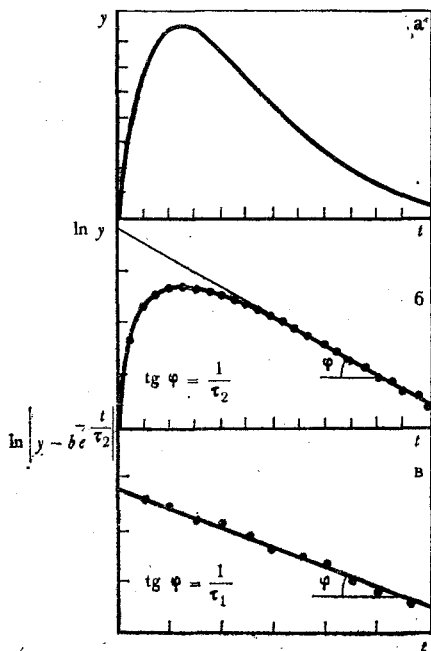


Рис. 48. График функции (5.41) (а); вид функции (5.41) в полулогарифмических координатах; определение параметров $1/\tau_2$ и b (б); определение параметров $1/\tau_1$ и a из уравнения (5.43) (в)

ются величины k_1 и $k_2 + k_{-1}$. По тангенсу угла наклона зависимости $(\tau_1\tau_2)^{-1}$ определяется величина k_1k_2 , из которой, используя найденное значение k_1 , следует константа скорости k_2 . Значение k_{-1} находится из суммы $k_2 + k_{-1}$.

Случай с дополнительным ограничением, наложенным на соотношение констант скоростей. Формально-кинетический анализ реакции (5.1) при переменной концентрации субстрата и при условии $[E]_0 \gg \gg [S]_0$ существенно упрощается, если

$$k_{-1} \ll k_2 + k_1[E]_0. \quad (5.47)$$

В этом частном случае (см. уравнение 5.28) показатели экспонент связаны с элементарными константами скоростей простыми соотношениями:

$$\lambda_1 = -k_1[E]_0; \quad (5.48)$$

$$\lambda_2 = -k_2. \quad (5.49)$$

В итоге концентрации субстрата, промежуточного соединения и продукта реакции даны уравнениями:

$$[S] = [S]_0 \left\{ \frac{k_{-1}}{k_1[E]_0 - k_2} e^{-k_2 t} + \left(1 + \frac{k_{-1}}{k_2 - k_1[E]_0} \right) e^{-k_1[E]_0 t} \right\}; \quad (5.50)$$

$$[X] = k_1[E]_0[S]_0 \left\{ \frac{1}{k_1[E]_0 - k_2} e^{-k_2 t} + \frac{1}{k_2 - k_1[E]_0} e^{-k_1[E]_0 t} \right\}; \quad (5.51)$$

$$[P] = [S]_0 \left\{ \frac{k_1[E]_0}{k_2 - k_1[E]_0} (e^{-k_2 t} - 1) + \frac{k_2}{k_1[E]_0 - k_2} (e^{-k_1[E]_0 t} - 1) \right\}. \quad (5.52)$$

Определение констант скоростей проводится аналогично методу, рассмотренному для предыдущего случая.

Случай с соизмеримыми концентрациями фермента и субстрата. Если экспериментальные данные получены при соизмеримых концентрациях фермента и субстрата, система уравнений (5.2)—(5.5) нелинейна и при решении ее необходимо применить численное интегрирование.

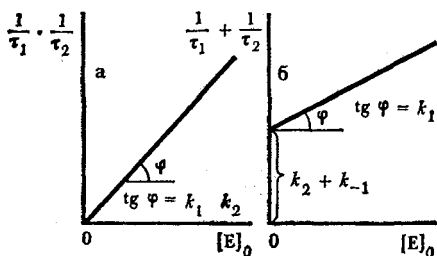


Рис. 49. Определение кинетических констант k_1 , k_2 и k_{-1} механизма (5.1) из данных по нестационарной кинетике реакции при переменной концентрации субстрата:

а — для (5.45); б — для (5.46)

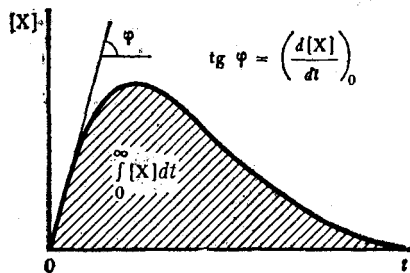


Рис. 50. Определение кинетических констант k_1 и k_2 из данных по кинетике образования и расходования промежуточного соединения реакции (5.1) в условиях переменной концентрации субстрата [см. уравнения (5.56) и (5.57)]

Тем не менее численные значения констант скоростей реакции (5.1) и в этих условиях могут быть определены достаточно просто.

Если продифференцировать уравнение (5.5) и подставить в него (5.2), то

$$\frac{d[S]}{dt} + \frac{d[X]}{dt} = -k_2[X]. \quad (5.53)$$

Интегрирование этого уравнения по времени до полного расходования субстрата

$$\int_{S_0}^0 d[S] + \int_0^0 d[X] = -k_2 \int_0^{\infty} [X] dt \quad (5.54)$$

с учетом условий $t = 0$, $[S] = [S]_0$, $[X] = 0$ и $t \rightarrow \infty$, $[S] \rightarrow 0$, $[X] \rightarrow 0$ приводит к уравнению

$$[S]_0 = k_2 \int_0^{\infty} [X] dt. \quad (5.55)$$

При условии, что исследование кинетики реакции проводится по концентрации промежуточного соединения, интеграл $\int_0^{\infty} [X] dt$ достаточно точно может быть найден по площади, ограниченной кривой $[X](t)$ (рис. 50). Это позволяет определить величину k_2 :

$$k_2 = \frac{[S]_0}{\int_0^{\infty} [X] dt}. \quad (5.56)$$

Величина k_1 следует из начальной скорости образования промежуточного соединения (см. рис. 50):

$$k_1 = \left(\frac{d[X]}{dt} \right)_0 / [E]_0 [S]_0. \quad (5.57)$$

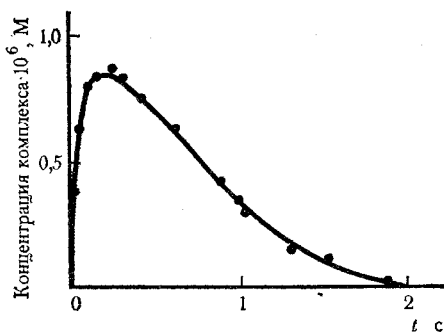


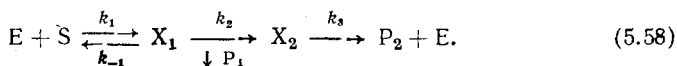
Рис. 51. Изменение концентрации комплекса каталаза — перекись водорода при смешивании $1 \cdot 10^{-6}$ М фермента и $4.1 \cdot 10^{-6}$ М перекиси водорода (рН 4,0) [7]

И, наконец, значение k_{-1} можно вычислить, если из данных по стационарной скорости реакции известна константа Михаэлиса $K_m = (k_2 + k_{-1})/k_1$, поскольку значения констант k_1 и k_2 найдены.

Именно этот подход к исследованию механизма ферментативной реакции при переменной концентрации субстрата, основанный на изучении кинетики образования и расходования промежуточного соеди-

нения, был использован Б. Чансом при изучении механизма катализа окислительными ферментами каталазой и пероксидазой [5—7]. Спектры поглощения в видимой области комплексов гемсодержащих ферментов каталазы и пероксидазы с перекисью водорода и органическими перекисями существенно отличаются от спектров поглощения исходных ферментов. Это позволило Чансу провести непосредственное кинетическое изучение промежуточных соединений с использованием высокочувствительной спектрофотометрической аппаратуры. При быстром смешивании растворов каталазы с перекисью водорода была зарегистрирована кинетика образования комплексов каталаза — перекись водорода, каталаза — органические перекиси и более медленная кинетика исчезновения промежуточного комплекса в результате расщепления перекисного соединения (рис. 51).

Нестационарная кинетика трехстадийной реакции. В качестве примера рассмотрим кинетику реакции с участием двух промежуточных соединений и образованием двух продуктов на разных стадиях процесса. Эта схема реакции в литературе была детально проанализирована в связи с механизмом катализа реакции гидролиза сложных эфиров, пептидов и амидов протеолитическими ферментами [8, 9]:



Изменение во времени концентраций 6 компонентов реакции полностью описывается 6 алгебраическими и дифференциальными уравнениями:

$$\frac{d[X_1]}{dt} = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[X_1]; \quad (5.59)$$

$$\frac{d[X_2]}{dt} = k_2[X_1] - k_3[X_2]; \quad (5.60)$$

$$\frac{d[P_1]}{dt} = k_2[X_1]; \quad (5.61)$$

$$\frac{d[P_2]}{dt} = k_3[X_2]; \quad (5.62)$$

$$[S]_0 = [S] + [X_1] + [X_2] + [P_2]; \quad (5.63)$$

$$[E]_0 = [E] + [X_1] + [X_2]. \quad (5.64)$$

Формально-кинетический анализ схемы реакций (5.58) можно существенно упростить при условии (5.21) (т. е. при $[E]_0 \gg [S]_0$), которое позволяет уравнение (5.59) привести к линейному виду. Еще более простое решение соответствует условиям, когда равновесие на первой стадии реакции устанавливается быстро. В этом случае дифференциальное уравнение (5.59) можно заменить следующим алгебраическим уравнением:

$$K_s = \frac{[E][S]}{[X_1]}, \quad (5.65)$$

где $K_s = k_{-1}/k_1$ — константа диссоциации. Принимая во внимание (5.21), уравнения (5.64) и (5.65) можно записать в виде

$$[E]_0 = [E]; \quad (5.66)$$

$$K_s = \frac{[E]_0 [S]}{[X_1]} \quad (5.67)$$

и тогда конечную систему уравнений (5.60)—(5.63) совместно с (5.66)—(5.67) можно свести к системе двух дифференциальных уравнений, включающих переменные $[X_2]$ и $[S]$:

$$\frac{d[X_2]}{dt} = \frac{k_2 [E]_0}{K_s} [S] - k_3 [X_2]; \quad (5.68)$$

$$\frac{d[S]}{dt} + \frac{[E]_0}{K_s} \cdot \frac{d[S]}{dt} + \frac{d[X_2]}{dt} + k_3 [X_2] = 0. \quad (5.69)$$

Последнее уравнение является прямым следствием уравнения материального баланса (5.63).

Дифференцируя уравнение (5.68) и подставляя в него производную концентрации субстрата, найденную из уравнения (5.69), получим дифференциальное уравнение второго порядка, описывающее изменение во времени концентрации промежуточного соединения X_2 :

$$\frac{d^2 [X_2]}{dt^2} + \left(k_3 + \frac{k_2 [E]_0}{K_s + [E]_0} \right) \frac{d[X_2]}{dt} + \frac{k_3 k_2 [E]_0}{K_s + [E]_0} [X_2] = 0. \quad (5.70)$$

Решение этого дифференциального уравнения имеет вид

$$[X_2] = C_1 e^{\lambda_1 t} + C_2 e^{\lambda_2 t}, \quad (5.71)$$

где λ_1 и λ_2 корни характеристического уравнения

$$\lambda^2 + \left(k_3 + \frac{k_2 [E]_0}{K_s + [E]_0} \right) \lambda + \frac{k_3 k_2 [E]_0}{K_s + [E]_0} = 0. \quad (5.72)$$

Из решения характеристического уравнения следует, что

$$\lambda_1 = -k_3; \quad (5.73)$$

$$\lambda_2 = -\frac{k_2 [E]_0}{K_s + [E]_0}. \quad (5.74)$$

Значения констант C_1 и C_2 находим из (5.71), используя два начальных условия: при $t = 0$, $[X_2] = 0$ и

$$\frac{d[X_2]}{dt} = k_2 \frac{[E]_0 [S]_0}{K_s + [E]_0}. \quad (5.75)$$

Решение системы двух алгебраических уравнений приводит к соотношениям:

$$C_1 = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0}{K_s \left(\frac{k_2 [E]_0}{K_s + [E]_0} - k_3 \right)}; \quad (5.76)$$

$$C_2 = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0}{K_s \left(k_3 - \frac{k_2 [E]_0}{K_s + [E]_0} \right)} \quad (5.77)$$

В результате концентрацию промежуточного продукта X_2 как функцию времени можно представить уравнением

$$[X_2] = k_2 [E]_0 [S]_0 \left(\frac{e^{-k_3 t}}{k_2 [E]_0 - k_3 (K_s + [E]_0)} + \frac{e^{-\frac{k_2 [E]_0}{K_s + [E]_0} t}}{k_3 (K_s + [E]_0) - k_2 [E]_0} \right) \quad (5.78)$$

Концентрация этого промежуточного соединения проходит через максимум в момент времени:

$$t_{\text{онт}} = \frac{\ln \frac{k_3 (K_s + [E]_0)}{k_2 [E]_0}}{k_2 - \frac{k_2 [E]_0}{K_s + [E]_0}} \quad (5.79)$$

Сложение уравнений (5.68) и (5.69) приводит к уравнению

$$\frac{d[S]}{dt} = - \frac{k_2 [E]_0}{K_s + [E]_0} [S], \quad (5.80)$$

решение которого дает концентрацию субстрата как функцию времени

$$[S] = \frac{[S]_0 e^{-\frac{k_2 [E]_0}{K_s + [E]_0} t}}{1 + \frac{[E]_0}{K_s}} \quad (5.81)$$

Принимая во внимание (5.67), концентрацию промежуточного соединения X_1 можно представить уравнением

$$[X_1] = \frac{[E]_0 [S]_0}{K_s + [E]_0} e^{-\frac{k_2 [E]_0}{K_s + [E]_0} t} \quad (5.82)$$

Изменение во времени концентраций продуктов реакции находим, подставляя функции $[X_1](t)$ и $[X_2](t)$ в уравнения (5.61), (5.62) и интегрируя полученные дифференциальные уравнения с разделяющимися переменными:

$$[P_1] = k_2 \int_0^t [X_1] dt = [S]_0 \left(1 - e^{-\frac{k_2 [E]_0}{K_s + [E]_0} t} \right); \quad (5.83)$$

$$[P_2] = k_3 \int_0^t [X_2] dt = k_2 k_3 [E]_0 [S]_0 \left\{ \frac{1 - e^{-k_3 t}}{k_3 [k_2 [E]_0 - k_3 (K_s + [E]_0)]} + \frac{1 - e^{-\frac{k_2 [E]_0}{K_s + [E]_0} t}}{k_3 [k_2 [E]_0 - k_3 (K_s + [E]_0)]} \right\} \quad (5.84)$$

Графический вид функций $[S](t)$, $[X_1](t)$, $[X_2](t)$, $[P_1](t)$; $[P_2](t)$ приведен на рис. 52. Изучая кинетику реакции по субстрату или продукту P_1 (или же, если это возможно, по промежуточному соединению X_1), можно найти параметры k_2 и K_s ; регистрируя продукт реакции P_2 (или промежуточное соединение X_2), определить константы скорости k_2 , k_3 и константу равновесия K_s .

Кинетические закономерности реакции (5.58) в условиях $[E]_0 \gg \gg [S]_0$ наиболее просты. При соизмеримых концентрациях фермента и субстрата кинетику реакции описывает нелинейная система уравнений, решение которой сопряжено с математическими трудностями. Однако кинетические кривые имеют качественно тот же вид (рис. 52).

На рис. 53 приведена кинетическая кривая изменения оптической плотности при гидролизе метилового эфира коричной кислоты, катализируемого α -химотрипсином в условиях избытка фермента [10]. Как видно из рисунка, гидролиз эфира сопровождается быстрым увеличением поглощения при 310 нм, достигающим максимума примерно через 100 с, затем происходит уменьшение оптической плотности до полного гидролиза эфира. Это указывает на участие в механизме реакции промежуточного соединения. Приведенное в качестве примера исследование гидролиза метилового эфира *транс*-коричной кислоты под действием α -химотрипсина позволило установить участие в механизме катализа α -химотрипсином ацилферментного промежуточного соединения X_2 (см. гл. IV).

* * *

Как видно из анализа, проведенного в этом параграфе, в ферментативных реакциях, протекающих при избытке концентрации фермента по сравнению с субстратом [см. условие (5.21)], стационарное состоя-

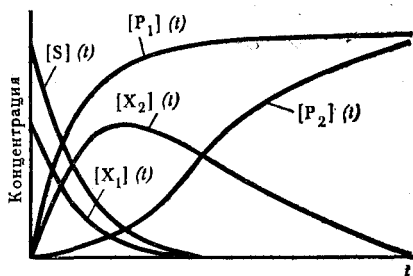


Рис. 52. Зависимость от времени концентраций субстрата S (5.81), продукта P_1 (5.83), промежуточного соединения X_1 (5.82), продукта реакции P_2 (5.84), промежуточного соединения X_2 (5.78) для трехстадийной реакции (5.58), протекающей в нестационарном режиме при $[E]_0 \gg [S]_0$

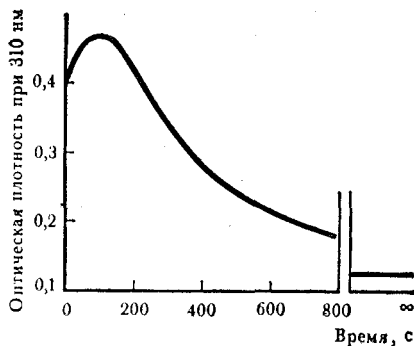


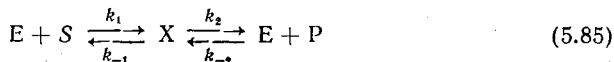
Рис. 53. Изменение во времени оптической плотности при гидролизе метилового эфира коричной кислоты, катализируемого α -химотрипсином [10]:

$[E]_0 = 1,33 \cdot 10^{-3}$ М; $[S]_0 = 1,20 \cdot 10^{-4}$ М;
pH 7,8; 25°C

ние фактически (т. е. при $t < \infty$) не устанавливается. По-другому обстоит дело в процессе, протекающем при обратном соотношении концентраций реагентов, т. е. в условиях (5.20). Здесь нестационарное протекание реакции выходит, как будет показано в § 3 этой главы, на стационарный режим, продолжительность которого зависит от исходной концентрации субстрата. Именно поэтому нестационарную кинетику в этом случае принято называть *предстационарной*.

§ 3. Предстационарная кинетика ферментативных реакций при постоянной концентрации субстрата

Кинетика реакций с участием одного промежуточного соединения. Изменение во времени концентраций всех 4 компонентов полностью равновесной двухстадийной реакции



описывает система четырех дифференциальных и алгебраических уравнений:

$$\frac{d[X]}{dt} = k_1[E][S] + k_{-2}[E][P] - (k_2 + k_{-1})[X]; \quad (5.86)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[X] - k_{-2}[E][P]; \quad (5.87)$$

$$[E]_0 = [E] + [X]; \quad (5.88)$$

$$[S]_0 = [S] + [P] + [X]. \quad (5.89)$$

Решение этой нелинейной системы уравнений можно существенно упростить, если использовать некоторые условия экспериментального характера, позволяющие привести уравнения (5.86) и (5.87) к линейному виду, например:

$$[S]_0 \gg [E]_0; \quad (5.90)$$

$$[P] \cong 0.$$

В соответствии с условиями (5.90), т. е. при большом избытке субстрата по сравнению с ферментом и небольшой глубине реакции, систему уравнений (5.86)—(5.89) можно представить в виде линейной системы дифференциальных и алгебраических уравнений с постоянными коэффициентами*:

$$\frac{d[X]}{dt} = k_1[E][S]_0 - (k_{-1} + k_2)[X]; \quad (5.91)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[X]; \quad (5.92)$$

* В случае если вторая стадия механизма реакции (5.85) практически необратима, достаточным условием перехода уравнений (5.86) — (5.87) в линейную форму является соотношение $[S]_0 \gg [E]_0$, поскольку в этом случае $k_{-2} = 0$.

$$[E]_0 = [E] + [X]. \quad (5.93)$$

Эта система уравнений достаточно просто может быть решена в аналитическом виде [11—13].

Исключением переменной $[E]$ уравнение (5.91) может быть преобразовано в следующую форму:

$$\frac{d[X]}{dt} + (k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2)[X] = k_1[E]_0[S]_0. \quad (5.94)$$

Решение соответствующего уравнения без правой части имеет вид

$$[X] = C' e^{-(k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2)t}. \quad (5.95)$$

Для того чтобы найти решение уравнения (5.94) с правой частью, дифференцируем уравнение (5.95) и подставляем полученное значение $\frac{d[X]}{dt}$ в уравнение (5.94):

$$\frac{dC'}{dt} e^{-(k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2)t} = k_1[E]_0[S]_0. \quad (5.96)$$

Постоянную C' находим, интегрируя уравнение (5.96):

$$\begin{aligned} C' &= k_1[E]_0[S]_0 \int e^{(k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2)t} dt + C = \\ &= \frac{k_1[E]_0[S]_0}{k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2} e^{(k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2)t} + C. \end{aligned} \quad (5.97)$$

Таким образом,

$$[X] = \frac{k_1[E]_0[S]_0}{k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2} + C e^{-(k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2)t}. \quad (5.98)$$

При использовании начальных условий $t = 0$, $[X] = 0$, имеем

$$C = - \frac{k_1[E]_0[S]_0}{k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2} \quad (5.99)$$

и тогда концентрация промежуточного соединения как функция времени примет вид

$$[X] = \frac{[E]_0[S]_0}{K_m + [S]_0} (1 - e^{-(k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2)t}), \quad (5.100)$$

где K_m — константа Михаэлиса,

$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}. \quad (5.101)$$

Как видно из этого уравнения, концентрация промежуточного соединения возрастает во времени и стремится к пределу:

$$[X]_{\text{lim}} = [X]_{\text{стан}} = \frac{[E]_0[S]_0}{K_m + [S]_0}. \quad (5.102)$$

В случае, если $[S]_0 \gg K_m$, уравнение (5.100) можно существенно упростить:

$$[X] = [E]_0 (1 - e^{-k_1 [S]_0 t}), \quad (5.103)$$

в то время как при $[S]_0 \ll K_m$ имеем

$$[X] = \frac{[E]_0 [S]_0}{K_m} (1 - e^{-k_1 K_m t}). \quad (5.104)$$

На рис. 54 приведен графический вид функции $[X](t)$ (рис. 54,а), а также вид функции $[X](t)$ при различных концентрациях субстрата в двух предельных случаях: $[S]_0 \gg K_m$ (рис. 54,б) и $[S]_0 \ll K_m$ (рис. 54,в).

Из кинетики накопления промежуточного соединения X может быть найдена константа скорости k_1 и сумма констант скоростей $k_{-1} + k_2$. Для этого в соответствии с уравнением (5.105) из анаморфозы уравнения (5.100) в полулוגарифмических координатах определяется величина τ^{-1} по тангенсу угла наклона параметра $\ln \left(1 - \frac{[X]}{[X]_{\text{стау}}} \right)$ от t :

$$\ln \left(1 - \frac{[X]}{[X]_{\text{стау}}} \right) = - \frac{t}{\tau}, \quad (5.105)$$

где

$$\tau^{-1} = k_1 [S]_0 + k_{-1} + k_2. \quad (5.106)$$

Если экспериментальное определение τ проводить при различных начальных концентрациях субстрата, то по тангенсу угла наклона и отрезку, отсекаемому на оси ординат зависимости τ^{-1} от концентрации субстрата, можно найти константу k_1 и сумму констант $k_{-1} + k_2$ (рис. 55).

При использовании найденной зависимости от времени для концентрации промежуточного соединения $[X]$ (уравнение 5.100) можно записать функцию, описывающую изменение во времени концентрации продукта реакции. Для этого надо подставить уравнение (5.100) в уравнение (5.92) и полученное дифференциальное уравнение с разделяющимися переменными проинтегрировать:

$$[P] = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0}{[S]_0 + K_m} \int_0^t (1 - e^{-(k_1 [S]_0 + k_2 + k_{-1}) t}) dt = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0}{[S]_0 + K_m} t + \frac{k_2 [E]_0 [S]_0}{([S]_0 + K_m)(k_1 [S]_0 + k_2 + k_{-1})} (e^{-(k_1 [S]_0 + k_2 + k_{-1}) t} - 1). \quad (5.107)$$

Как видно из (5.107), концентрация продукта в системе непрерывно увеличивается и кривая $[P](t)$ асимптотически приближается к прямой с тангенсом угла наклона, равным стационарной скорости процесса (рис. 56):

$$v_{\text{стау}} = \left(\frac{d[P]}{dt} \right)_{\text{макс}} = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0}{[S]_0 + K_m}. \quad (5.108)$$

Эта асимптота (пунктир) отсекает на оси абсцисс отрезок, равный

$$\tau^{-1} = k_1 [S]_0 + k_{-1} + k_2 = k_1 ([S]_0 + K_m). \quad (5.109)$$

В двух предельных случаях, охарактеризованных определенными соотношениями концентрации субстрата и K_m , уравнение (5.107) упрощается:

$$[P] = k_2 [E]_0 t + \frac{k_2 [E]_0}{k_1 [S]_0} (e^{-k_1 [S]_0 t} - 1), \quad (5.110)$$

если $[S]_0 \gg K_m$, и

$$[P] = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0}{K_m} t + \frac{k_2 [E]_0 [S]_0}{k_1 K_m^2} (e^{-(k_2 + k_{-1})t} - 1), \quad (5.111)$$

если $[S]_0 \ll K_m$.

Эти зависимости при различных концентрациях субстрата графически представлены на рис. 56,б и 56,в.

Исследуя в предстационарных условиях кинетику образования продукта, также можно определить все константы скорости, описывающие механизм реакции (5.1). Время τ на кинетической кривой образования продукта связано с константами скорости соотношением (5.109). Из линейной зависимости τ^{-1} от концентрации субстрата (см. рис. 55)

следуют величины k_1 и $k_2 + k_{-1}$. Константа k_2 может быть найдена из стационарной скорости реакции [см. уравнение (5.108)] при условии, что известна концентрация активных центров фермента. И, наконец, величина k_{-1} определяется из суммы констант $k_2 + k_{-1}$.

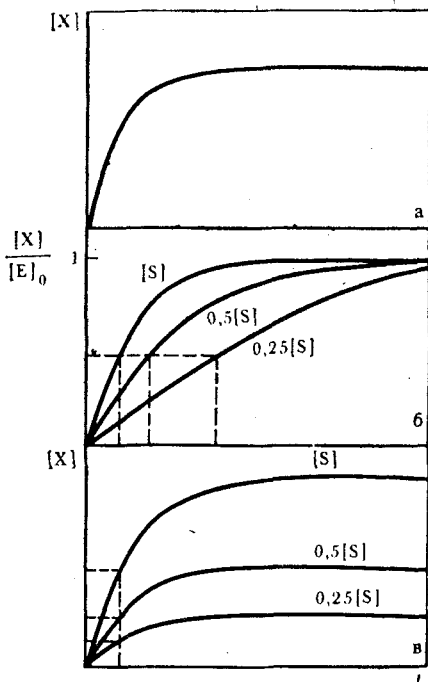


Рис. 54. Зависимость концентрации промежуточного соединения от времени для реакции (5.1) в предстационарном режиме в соответствии с уравнениями:

а — (5.100); б — (5.103); в — (5.104)

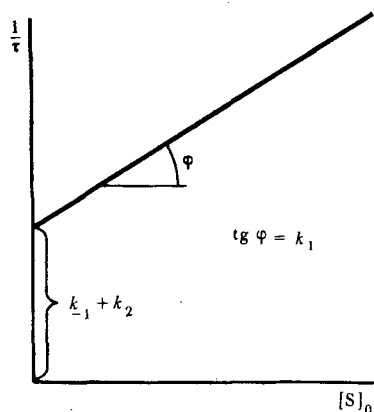
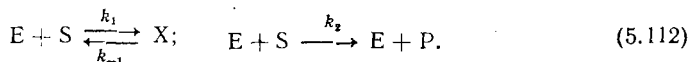


Рис. 55. Определение элементарных констант механизма (5.1) из данных по предстационарной кинетике реакции [уравнение (5.106)]

Проблема последовательного и параллельного образования фермент-субстратного комплекса. Одна из наиболее старых проблем ферментативной кинетики — это разграничение механизмов последовательного (5.1) (схема Михаэлиса) и параллельного (5.112) (схема Анри) образования фермент-субстратного комплекса:



Дело в том, что оба механизма приводят к одинаковому выражению для зависимости стационарной скорости образования продукта P от концентраций фермента и субстрата [14]. При условии (5.90) в том и другом случае имеем

$$\left(\frac{d[P]}{dt} \right)_{\text{стац}} = \frac{k_{\text{кат}} [E]_0 [S]_0}{K_{m, \text{ каж}} + [S]_0}. \quad (5.113)$$

Для механизма Михаэлиса в соответствии с уравнением (5.108)

$$k_{\text{кат}} = k_2 \text{ и } K_{m, \text{ каж}} = K_m = (k_{-1} + k_2)/k_1.$$

Для механизма Анри

$$k_{\text{кат}} = k_2 k_{-1}/(k_1 + k_2); \quad K_{m, \text{ каж}} = k_{-1}/(k_1 + k_2). \quad (5.114)$$

Однако механизмы (5.1) и (5.112) можно различить, исследуя кинетику реакции в предстационарном режиме. Кинетические закономерности схемы Михаэлиса описывают функции (5.100) и (5.107). Для схемы Анри следует решить [при условии (5.90)] систему уравнений:

$$-\frac{d[E]}{dt} = k_1 [E] [S]_0 - k_{-1} [X] + k_2 [E] [S]_0; \quad (5.115)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2 [E] [S]_0; \quad (5.116)$$

$$[E]_0 = [E] + [X]. \quad (5.117)$$

При использовании уравнения материального баланса дифференциальное уравнение (5.115) преобразуется в уравнение, содержащее лишь одну переменную величину [E], и при начальном условии $t = 0$, $[E] = [E]_0$ имеет решение

$$[E] = \frac{k_{-1} [E]_0}{(k_1 + k_2) [S]_0 + k_{-1}} + [E]_0 \left(\frac{(k_1 + k_2) [S]_0}{(k_1 + k_2) [S]_0 + k_{-1}} \right) e^{-[(k_1 + k_2) [S]_0 + k_{-1}]t}. \quad (5.118)$$

После подстановки этого уравнения в дифференциальное уравнение (5.116) и решения полученного уравнения с разделяющимися переменными имеем

$$[P] = \frac{k_2 k_{-1} [E]_0 [S]_0}{(k_1 + k_2) [S]_0 + k_{-1}} t - \frac{k_2 [E]_0 [S]_0 (k_2 + k_1) [S]_0}{[(k_1 + k_2) [S]_0 + k_{-1}]^2} (e^{-[(k_1 + k_2) [S]_0 + k_{-1}]t} - 1). \quad (5.119)$$

Видно, что функция (5.119) существенно отличается от зависимости концентрации продукта от времени для механизма Михаэлиса [см. уравнение (5.107)] (рис. 57). В случае механизма Михаэлиса скорость реакции ($d[P]/dt$) растет со временем, в то время как в случае механизма Анри скорость реакции падает во времени, пока не достигнет уровня, соответствующего стационарной скорости, которая описывается уравнениями (5.113) и (5.114). Период времени, отсекаемый асимптотической прямой 2 (ее тангенс угла наклона равен стационарной скорости процесса), лежит в области отрицательных значений:

$$\tau' = - \frac{[S]_0}{(k_1 + k_2) K_m (K_m + [S]_0)} \quad (5.120)$$

Это позволяет отличить механизм Анри от механизма Михаэлиса (рис. 57), для которого τ [см. уравнение (5.109)] имеет положительные значения.

Кинетические закономерности ферментативных реакций с участием двух промежуточных соединений. Кинетика трехстадийной реакции с равновесной первой стадией. Детальный кинетический анализ действия ряда ферментов обнаруживает участие в механизме катализа по крайней мере двух промежуточных соединений.

1. Один из простейших кинетических механизмов реакции с участием двух промежуточных соединений можно представить

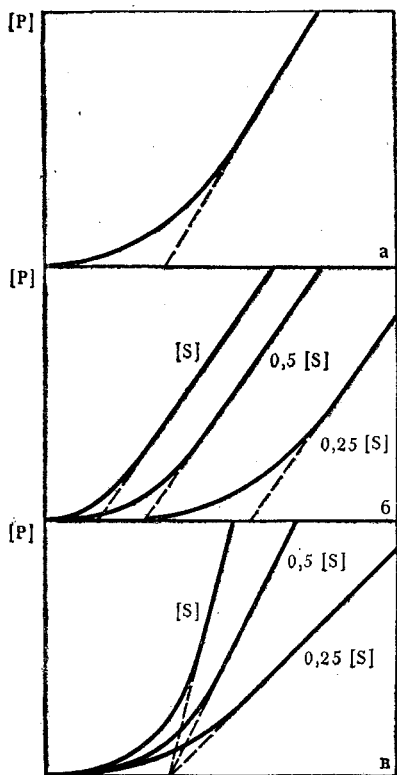


Рис. 56. Зависимость концентрации продукта от времени для реакции (5.1) в предстационарном режиме в соответствии с уравнениями:

а — (5.107); б — (5.110); в — (5.111)

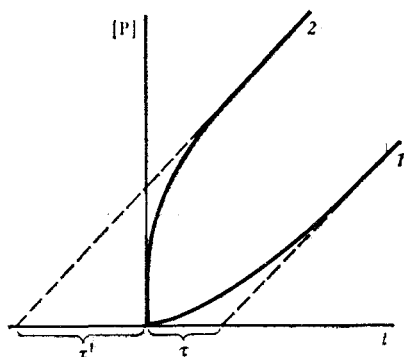
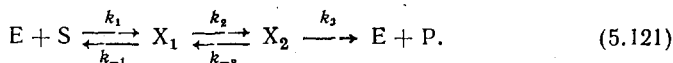


Рис. 57. Кинетические кривые продукт — время для реакции, протекающей по механизму Михаэлиса (5.1) (кривая 1) [уравнение (5.107)] и по механизму Анри (5.112) (кривая 2) [уравнение (5.119)]

схемой



Если равновесие на первой стадии реакции устанавливается много быстрее последующих химических процессов (этот случай довольно часто реализуется на практике), концентрация промежуточного соединения X_1 определяется лишь концентрацией свободного фермента, субстрата и величиной константы равновесия. Рассмотрим этот механизм в условиях, когда $[S]_0 \gg [E]_0$, и на небольшой глубине превращения субстрата, т. е. при условии (5.90); тогда кинетику процесса описывает следующая система уравнений:

$$\frac{d[X_2]}{dt} = k_2[X_1] - (k_{-2} + k_3)[X_2]; \quad (5.122)$$

$$[X_1] = \frac{[E][S]_0}{K_s} \quad \left(\text{где } K_s = \frac{k_{-1}}{k_1} \right); \quad (5.123)$$

$$[E]_0 = [E] + [X_1] + [X_2], \quad (5.124)$$

которая включает дифференциальное уравнение превращения промежуточного соединения X_2 , уравнение для константы равновесия на первой стадии реакции и уравнение материального баланса по ферменту (при $[S]_0 \gg [E]_0$ имеем $[S] = [S]_0$).

Используя уравнения (5.123) и (5.124), можно выразить концентрацию свободного фермента E и промежуточного соединения X_1 через $[X_2]$. После подстановки этих величин в уравнение (5.122) приходим к линейному дифференциальному уравнению:

$$\frac{d[X_2]}{dt} + \left(\frac{k_2[S]_0}{K_s + [S]_0} + k_{-2} + k_3 \right) [X_2] = \frac{k_2[E]_0[S]_0}{K_s + [S]_0}. \quad (5.125)$$

Решение этого уравнения полностью аналогично рассмотренному ранее решению уравнения (5.94). С учетом начального условия $t = 0$, $[X_2] = 0$ концентрация X_2 как функция времени принимает вид

$$[X_2] = \frac{k_2[E]_0[S]_0}{(K_s + [S]_0)(k_{-2} + k_3) + k_2[S]_0} \left\{ 1 - e^{-\left(k_3 + k_{-2} + \frac{k_2[S]_0}{K_s + [S]_0} \right) t} \right\}. \quad (5.126)$$

Изменение во времени концентрации свободного фермента и промежуточного соединения X_1 можно найти, используя уравнения (5.123) и (5.124):

$$[E] = \frac{[E]_0 - [X_2]}{1 + \frac{[S]_0}{K_s}} = \frac{[E]_0}{1 + \frac{[S]_0}{K_s}} \left\{ 1 - \frac{k_2[S]_0}{k_2[S]_0 + (K_s + [S]_0)(k_3 + k_{-2})} \times \right. \\ \left. \times \left(1 - e^{-\left(k_3 + k_{-2} + \frac{k_2[S]_0}{K_s + [S]_0} \right) t} \right) \right\} \quad (5.127)$$

$$[X_1] = \frac{[E][S]_0}{K_s} = \frac{[E]_0[S]_0}{K_s + [S]_0} \left\{ 1 - \frac{k_2[S]_0}{k_2[S]_0 + (K_s + [S]_0)(k_3 + k_{-2})} \left(1 - e^{-\left(k_3 + k_{-2} + \frac{k_2[S]_0}{K_s + [S]_0}\right)t} \right) \right\}. \quad (5.128)$$

Функция изменения во времени концентрации продукта реакции находится интегрированием дифференциального уравнения:

$$\frac{d[P]}{dt} = k_3[X_2], \quad (5.129)$$

если предварительно подставить в него выражение для $[X_2]$ из уравнения (5.126):

$$[P] = k_3 \int_0^t [X_2] dt = \frac{k_2 k_3 [E]_0 [S]_0 t}{(K_s + [S]_0) \left(k_3 + k_{-2} + \frac{k_2 [S]_0}{K_s + [S]_0} \right)} + \frac{k_2 k_3 [E]_0 [S]_0}{(K_s + [S]_0) \left(k_3 + k_{-2} + \frac{k_2 [S]_0}{K_s + [S]_0} \right)^2} \left(e^{-\left(k_{-2} + k_3 + \frac{k_2 [S]_0}{K_s + [S]_0}\right)t} - 1 \right). \quad (5.130)$$

Как видно из уравнений (5.126)—(5.130), концентрации промежуточных соединений, свободного фермента и продукта реакции описываются одноэкспоненциальными уравнениями, показатель экспоненты в которых связан с элементарными константами скорости механизма (5.121) уравнением

$$\frac{1}{\tau} = k_3 + k_{-2} + \frac{k_2 [S]_0}{K_s + [S]_0}. \quad (5.131)$$

Из уравнений (5.126)—(5.128) следует, что концентрация свободного фермента и промежуточных соединений в процессе реакции стремится (при $t \gg \tau$) к стационарным значениям:

$$[X_1]_{\text{стац}} = \frac{\frac{k_3 + k_{-2}}{k_3 + k_2 + k_{-2}} [E]_0 [S]_0}{[S]_0 + K_s \frac{k_3 + k_{-2}}{k_2 + k_2 + k_{-2}}}; \quad (5.132)$$

$$[X_2]_{\text{стац}} = \frac{\frac{k_2}{k_2 + k_3 + k_{-2}} [E]_0 [S]_0}{[S]_0 + K_s \frac{k_3 + k_{-2}}{k_3 + k_2 + k_{-2}}}; \quad (5.133)$$

$$[E]_{\text{стац}} = \frac{[E]_0 \frac{K_s (k_3 + k_{-2})}{k_2 + k_3 + k_{-2}}}{[S]_0 + \frac{K_s (k_3 + k_{-2})}{k_2 + k_3 + k_{-2}}}, \quad (5.134)$$

как это схематически показано на рис. 58.

Концентрация продукта реакции непрерывно возрастает, асимптотически приближаясь к прямой, уравнение которой имеет вид

$$[P]_{t \rightarrow \infty} = \frac{k_2 k_3 [E]_0 [S]_0}{(K_s + [S]_0) \left(k_3 + k_{-2} + \frac{k_2 [S]_0}{K_s + [S]_0} \right)} t - \frac{k_2 k_3 [E]_0 [S]_0}{(K_s + [S]_0) \left(k_3 + k_{-2} + \frac{k_2 [S]_0}{K_s + [S]_0} \right)^2} \quad (5.135)$$

Тангенс угла наклона этой прямой равен стационарной скорости процесса:

$$\left(\frac{d[P]}{dt} \right)_{\text{стан}} = \frac{k_{\text{кат}} [E]_0 [S]_0}{[S]_0 + K_{m, \text{ каж}}}, \quad (5.136)$$

где $k_{\text{кат}} = k_2 k_3 / (k_{-2} + k_3 + k_2)$ и $K_{m, \text{ каж}} = K_s (k_3 + k_{-2}) / (k_2 + k_3 + k_{-2})$. Асимптотическая прямая, согласно уравнению (5.135), отсекает на оси абсцисс отрезок τ (рис. 59), который связан с константами скорости реакции уравнением (5.131). Следовательно, как и в случае реакции с участием одного промежуточного соединения (см. рис. 56), на кинетической кривой продукт — время наблюдается период медленного протекания. Однако, согласно уравнению (5.131), величина τ^{-1} имеет сложную зависимость от концентрации субстрата. Это позволяет по экспериментальным данным отличить механизм реакции, протекающей через два промежуточных соединения, от механизма реакции с одним промежуточным соединением [ср. с (5.109)].

Из зависимости величины τ от концентрации субстрата можно определить константы скорости k_2 , k_{-2} и k_3 , а также найти константу равновесия K_s . Так, при двух предельных концентрациях субстрата (при

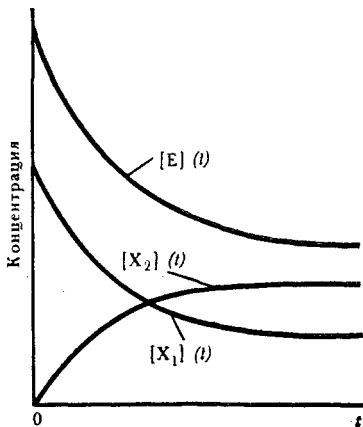


Рис. 58. Зависимость концентраций промежуточных соединений X_1 (5.128), X_2 (5.126) и свободного фермента E (5.127) от времени при предстационарном протекании реакции (5.121)

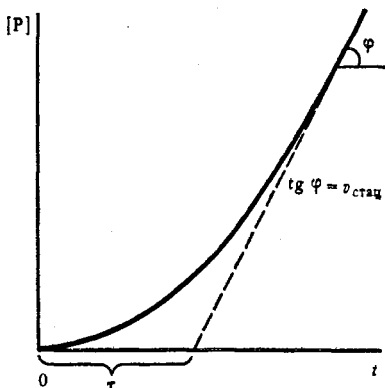


Рис. 59. Зависимость концентрации продукта от времени при предстационарном протекании реакции (5.121)

$[S]_0 = 0$ и $[S]_0 \gg K_s$ уравнение (5.131) можно существенно упростить:

$$(\tau^{-1})_{[S]_0=0} = k_{-2} + k_3; \quad (5.137)$$

$$(\tau^{-1})_{[S]_0 > K_s} = k_{-2} + k_3 + k_2. \quad (5.138)$$

Таким образом, из экстраполяции зависимости τ^{-1} от концентрации субстрата к нулевому значению $[S]_0$ можно найти сумму констант $k_{-2} + k_3$. Из предельного значения τ^{-1} , наблюдаемого при достаточно больших значениях $[S]_0$ [см. уравнение (5.138)], следует значение k_2 . Используя данные стационарной кинетики реакции [см. уравнение (5.136)], из величины $k_{\text{кат}}$ можно найти k_3 (и затем k_{-2}), а из величины $K_{m, \text{ каж}}$ значение K_s . Для этой цели уравнение (5.136) удобно преобразовать к линейному виду:

$$\frac{1}{(d[P]/dt)_{\text{стац}}} = \frac{1}{k_{\text{кат}}[E]_0} + \frac{K_{m, \text{ каж}}}{k_{\text{кат}}[E]_0} \cdot \frac{1}{[S]_0} \quad (5.139)$$

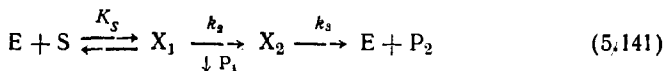
и анализировать экспериментальные данные в координатах $1/(d[P]/dt)_{\text{стац}}$ и $1/[S]_0$, как это обычно принято в методах стационарной кинетики (см. гл. VI). Искомые значения $k_{\text{кат}}$ и $K_{m, \text{ каж}}$ следуют из отрезка на оси ординат и тангенса угла наклона полученной прямой.

Величины k_2 и K_s могут быть также найдены из уравнения (5.131) при условии, что сумма констант $k_{-2} + k_3$ известна. Для этого уравнение (5.131) удобно преобразовать к линейному виду:

$$[\tau^{-1} - (k_{-2} + k_3)]^{-1} = \frac{1}{k_2} + \frac{K_s}{k_2} [S]_0 \quad (5.140)$$

и анализировать экспериментальные данные в координатах τ^{-1} и $[S]_0$.

2. Детальному анализу в литературе подвергнута также и трехстадийная схема с участием двух промежуточных соединений и образованием двух продуктов реакции на различных стадиях:



Это связано с тем, что такая трехстадийная схема описывает механизм катализа многих ферментов [15—17].

Формально-кинетический анализ этого механизма аналогичен анализу схемы (5.121) при условии, что $k_{-2} = 0$. Система уравнений, которая описывает кинетику процесса в предстационарном режиме, имеет вид:

$$[X_1] = \frac{[E][S]_0}{K_s}; \quad (5.142)$$

$$\frac{d[X_2]}{dt} = k_2[X_1] - k_3[X_2]; \quad (5.143)$$

$$\frac{d[P_1]}{dt} = k_2[X_1]; \quad (5.144)$$

$$\frac{d[P_2]}{dt} = k_3[X_2]; \quad (5.145)$$

$$[E]_0 = [E] + [X_1] + [X_2], \quad (5.146)$$

если принять, как и для схемы (5.121), что равновесие на первой стадии устанавливается мгновенно и $[S]_0 \gg [E]_0$. Аналогично решению уравнений (5.122)—(5.124) в этом случае находим:

$$[X_2] = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0}{(K_s + [S]_0) \left(k_3 + \frac{k_2 [S]_0}{K_s + [S]_0} \right)} \left\{ 1 - e^{-\left(k_3 + \frac{k_2 [S]_0}{K_s + [S]_0} \right) t} \right\}; \quad (5.147)$$

$$[E] = \frac{[E]_0}{1 + \frac{[S]_0}{K_s}} \left\{ 1 - \frac{k_2 [S]_0}{(K_s + [S]_0) \left(k_3 + \frac{k_2 [S]_0}{K_s + [S]_0} \right)} \left(1 - e^{-\left(k_3 + \frac{k_2 [S]_0}{K_s + [S]_0} \right) t} \right) \right\}; \quad (5.148)$$

$$[X_1] = \frac{[E]_0 [S]_0}{K_s + [S]_0} \left\{ 1 - \frac{k_2 [S]_0}{(K_s + [S]_0) \left(k_3 + \frac{k_2 [S]_0}{K_s + [S]_0} \right)} \left(1 - e^{-\left(k_3 + \frac{k_2 [S]_0}{K_s + [S]_0} \right) t} \right) \right\}. \quad (5.149)$$

Так же, как и в случае механизма (5.121), концентрации промежуточных соединений и свободного фермента описываются одноэкспоненциальным уравнением, причем показатель экспоненты одинаков для всех компонентов реакции. Уравнения (5.147)—(5.149) аналогичны уравнениям (5.126)—(5.128) при условии $k_{-2} = 0$.

Стационарные концентрации промежуточных соединений равны:

$$[X_1]_{\text{стац}} = \lim_{t \rightarrow \infty} [X_1] = \frac{\frac{k_3}{k_2 + k_3} [E]_0 [S]_0}{[S]_0 + \frac{k_3}{k_2 + k_3} K_s}; \quad (5.150)$$

$$[X_2]_{\text{стац}} = \lim_{t \rightarrow \infty} [X_2] = \frac{\frac{k_2}{k_2 + k_3} [E]_0 [S]_0}{[S]_0 + \frac{k_3}{k_2 + k_3} K_s}. \quad (5.151)$$

Видно, что в стационарном состоянии уровень концентраций промежуточных соединений определяет соотношение

$$\frac{[X_1]_{\text{стац}}}{[X_2]_{\text{стац}}} = \frac{k_3}{k_2}. \quad (5.152)$$

Соответственно, если $k_2 \gg k_3$, в стационарном состоянии преобладает соединение X_2 , если $k_2 \ll k_3$ — соединение X_1 .

Функции $[P_1](t)$ и $[P_2](t)$ находим, подставляя уравнения (5.147), (5.149) в уравнения (5.144) и (5.145) и интегрируя полученные диффе-

ренциальные уравнения с разделяющимися переменными:

$$[P_1] = k_2 \int_0^t [X_1] dt = \frac{k_2 k_3 [E]_0 [S]_0}{k_2 [S]_0 + k_3 (K_s + [S]_0)} t + \\ + [E]_0 \frac{(k_2 [S]_0)^2}{[k_2 [S]_0 + k_3 (K_s + [S]_0)]^2} \left(1 - e^{-\left(\frac{k_2 [S]_0}{K_s + [S]_0} + k_3\right) t} \right); \quad (5.153)$$

$$[P_2] = k_3 \int_0^t [X_2] dt = \frac{k_2 k_3 [E]_0 [S]_0}{k_2 [S]_0 + k_3 (K_s + [S]_0)} t + \\ + \frac{k_2 k_3 [E]_0 [S]_0 (K_s + [S]_0)}{[k_2 [S]_0 + k_3 (K_s + [S]_0)]^2} \left(e^{-\left(\frac{k_2 [S]_0}{K_s + [S]_0} + k_3\right) t} - 1 \right). \quad (5.154)$$

На рис. 60 приведен графический вид функций $[X_1](t)$, $[X_2](t)$, $[P_1](t)$ и $[P_2](t)$. Изменение во времени этих компонентов реакции описывается одноэкспоненциальной функцией, показатель которой связан с элементарными константами скорости соотношением

$$\tau^{-1} = k_3 + \frac{k_2 [S]_0}{K_s + [S]_0}. \quad (5.155)$$

При достаточно больших временах реакции (при $t \gg \tau$) процесс переходит в стационарный режим, где скорость образования продуктов

$$\left(\frac{d[P_1]}{dt}\right)_{\text{стаи}} = \left(\frac{d[P_2]}{dt}\right)_{\text{стаи}} = \frac{\frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3} [E]_0 [S]_0}{K_s \frac{k_3}{k_2 + k_3} + [S]_0}. \quad (5.156)$$

В зависимости от соотношения констант k_2 и k_3 кинетические уравнения (5.153) и (5.154) можно преобразовать к более простому виду. Например, при «насыщении» фермента субстратом ($[S]_0 \gg K_s$) и $k_3 \gg k_2$ имеем:

$$[P_1] = k_2 [E]_0 t + [E]_0 \left(\frac{k_2}{k_3}\right)^2 (1 - e^{-k_3 t}); \quad (5.157)$$

$$[P_2] = k_2 [E]_0 t + [E]_0 \frac{k_2}{k_3} (1 - e^{-k_3 t}). \quad (5.158)$$

В другом предельном случае, когда $k_2 \gg k_3$ (при $[S]_0 \gg K_s$), зависимости $[P_1](t)$ и $[P_2](t)$ также даются весьма простыми уравнениями:

$$[P_1] = k_3 [E]_0 t + [E]_0 (1 - e^{-k_2 t}); \quad (5.159)$$

$$[P_2] = k_3 [E]_0 t + \frac{k_3}{k_2} [E]_0 (1 - e^{-k_2 t}). \quad (5.160)$$

Последний частный случай особенно важен, поскольку на кинетических особенностях протекания трехстадийной реакции в условиях $[S]_0 \gg K_s$, $k_2 \gg k_3$ основан метод определения концентрации

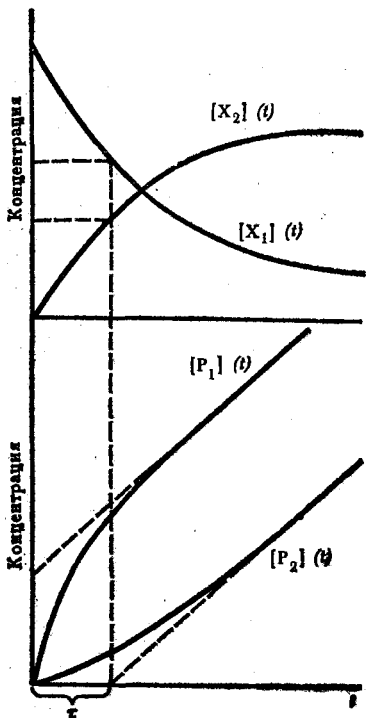


Рис. 60. Зависимости концентраций промежуточных соединений X_1 (5.149) и X_2 (5.147) и продуктов реакции P_1 (5.153) и P_2 (5.154) от времени в случае механизма реакции (5.141) в стационарном режиме

целого ряда ферментов [18]. Действительно, согласно уравнению (5.159), начальный быстрый «выброс» продукта P_1 в точности равен концентрации вводимого в реакцию фермента (рис. 61).

Из данных по предстационарной кинетике трехстадийной реакции

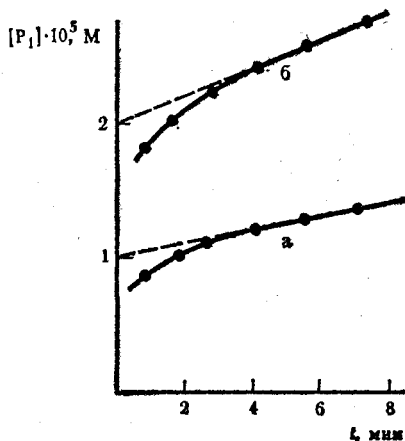


Рис. 61. Кинетика образования *p*-нитрофенола в реакции гидролиза *p*-нитрофенилацетата, катализируемой α -химотрипсином [20]. (Концентрация фермента в случае *а* в два раза меньше, чем в случае *б*)

можно определить константы скорости и равновесия, характеризующие каждую стадию. Эта задача связана прежде всего с изучением зависимости величины τ [уравнение (5.155)] от концентрации субстрата. Величина τ^{-1} может быть найдена, например, из зависимости концентрации продукта реакции P_2 (см. рис. 60), а также и P_1 от времени. В последнем случае уравнение (5.153) с точностью до постоянных следует записать в виде

$$[P_1] = At + B \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau}} \right) \quad (5.161)$$

и найти A и B как тангенс угла наклона и отрезок, который отсекает на оси ординат асимптотическая прямая (пунктир) к кривой $[P_1]—t$ (рис. 62, а). Это позволит уравнение (5.161) преобразовать:

$$\ln \left(\frac{1}{1 - \frac{[P_1] - At}{B}} \right) = \frac{t}{\tau} \quad (5.162)$$

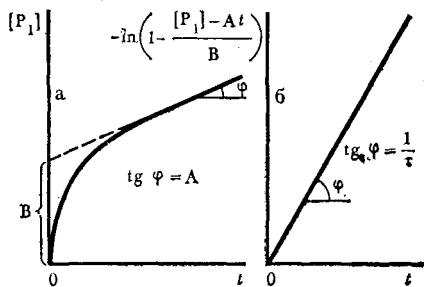


Рис. 62. Определение параметров A , B и τ , характеризующих реакцию (5.141) в предстационарном режиме, из кинетики накопления продукта P_1 :

a — уравнение (5.161); b — (5.162)

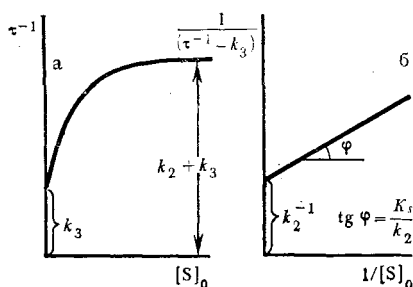


Рис. 63. Графический анализ экспериментальных данных по предстационарной кинетике реакции (5.141) с использованием уравнения (5.155).

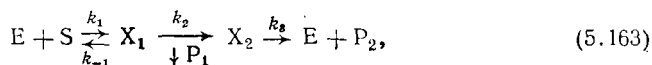
и тогда величина τ^{-1} определится как тангенс угла наклона линейной функции (5.162) от времени (рис. 62,б).

Анализируя зависимость τ^{-1} от концентрации субстрата, можно найти все константы схемы (5.141). Согласно уравнению (5.155), значение k_3 следует из экстраполяции экспериментально наблюдаемой функции к нулевому значению концентрации субстрата (рис. 63,а). Значения k_2 и K_s определяются из зависимости параметра ($\tau^{-1} - k_3$) от концентрации субстрата в обратных координатах аналогично анализу уравнения (5.139) (рис. 63,б).

По трехстадийному механизму с равновесной первой стадией протекают реакции, катализируемые протеолитическими ферментами, в частности α -химотрипсином [8, 16—21] (см. гл. IV).

Прямое кинетическое подтверждение образования промежуточных соединений X_1 и X_2 в катализе гидролиза эфиров N -ацилированных- L -аминокислот получено из анализа кинетики реакции на длинах волн поглощения промежуточных соединений (~ 290 нм) [9]. Так, при смешивании раствора α -химотрипсина с метиловым эфиром N -ацетил- L -фенилаланина наблюдается быстрое (кинетически неразрешенное) спектральное изменение (по-видимому, образование первичного фермент-субстратного комплекса X_1), за которым следует медленная кинетика образования ацилфермента (рис. 64,а). В стационарной фазе реакции в условиях, когда расходом субстрата можно пренебречь, концентрация ацилфермента сохраняется постоянной; последующий расход субстрата приводит к исчезновению в растворе промежуточных соединений (рис. 64,б) [9].

Реакция с участием двух промежуточных соединений в кинетическом режиме. Если же первая стадия реакции (5.141) протекает во времени, т. е. кинетика процесса на этой стадии соизмерима с кинетикой последующих превращений промежуточных соединений



то в этом случае в отличие от (5.142)—(5.146) система алгебраических и дифференциальных уравнений, описывающая кинетику реакции (5.163), дана уравнениями (при $[S]_0 \gg [E]_0$):

$$\frac{d[X_1]}{dt} = k_1[E][S]_0 - (k_2 + k_{-1})[X_1]; \quad (5.164)$$

$$\frac{d[X_2]}{dt} = k_2[X_1] - k_3[X_2]; \quad (5.165)$$

$$\frac{d[P_1]}{dt} = k_2[X_1]; \quad (5.166)$$

$$\frac{d[P_2]}{dt} = k_3[X_2]; \quad (5.167)$$

$$[E]_0 = [E] + [X_1] + [X_2]. \quad (5.168)$$

Уравнения (5.164), (5.165) и (5.168) образуют систему трех уравнений с тремя переменными и она может быть решена отдельно [15]. Из уравнения (5.165) следует:

$$[X_1] = \frac{1}{k_2} \left\{ \frac{d[X_2]}{dt} + k_3[X_2] \right\}. \quad (5.169)$$

Если продифференцировать (5.169) и подставить в (5.164) соответствующие функции $[X_1]$, $d[X_1]/dt$ и $[E]$ [из уравнения (5.168)], то получится линейное дифференциальное уравнение второго порядка относительно переменной $[X_2]$:

$$\frac{d^2[X_2]}{dt^2} + \frac{d[X_2]}{dt} \{k_1[S]_0 + k_2 + k_{-1} + k_3\} + \{k_3(k_2 + k_{-1} + k_1[S]_0) + k_1[S]_0 k_2\} [X_2] = k_2 k_1 [S]_0 [E]_0. \quad (5.170)$$

Общее решение этого уравнения складывается из общего решения уравнения без правой части и какого-либо частного решения уравнения с правой частью:

$$[X_2] = C_1 e^{\lambda_1 t} + C_2 e^{\lambda_2 t} + a, \quad (5.171)$$

где λ_1 , λ_2 — корни характеристического уравнения:

$$\lambda^2 + (k_1[S]_0 + k_2 + k_{-1} + k_3)\lambda + \{k_3(k_2 + k_{-1} + k_1[S]_0) + k_1[S]_0 k_2\} = 0; \quad (5.172)$$

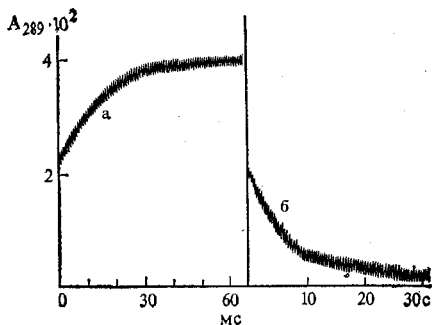


Рис. 64. Предстадионарная кинетика гидролиза метилового эфира N-ацетил L-фенилаланина, исследованная методом «остановленной струи» [9]:

a — изменение оптической плотности при смешивании $3,7 \cdot 10^{-5}$ М α -химотрипсина и $1,7 \cdot 10^{-2}$ М субстрата при pH 3,2; б — pH раствора, полученного в опыте a, поднимают от 3,2 до 5,7

a — частное решение уравнения с правой частью; C_1, C_2 — постоянные интегрирования. Частное решение уравнения (5.170) имеет вид

$$a = \frac{k_1 k_2 [E]_0 [S]_0}{k_3 (k_2 + k_{-1} + k_1 [S]_0) + k_1 [S]_0 k_2} \quad (5.173)$$

Корни характеристического уравнения (5.172) равны:

$$\lambda_{1,2} = -\frac{(k_1 [S]_0 + k_2 + k_{-1} + k_3)}{2} \pm \sqrt{\left(\frac{k_1 [S]_0 + k_{-1} + k_2 + k_3}{2}\right)^2 - [k_3 (k_2 + k_{-1} + k_1 [S]_0) + k_1 k_2 [S]_0]} \quad (5.174)$$

Учитывая начальные условия

$$t = 0; [X_2] = 0; \frac{d[X_2]}{dt} = 0, \quad (5.175)$$

приходим к системе алгебраических уравнений:

$$\left. \begin{aligned} C_1 + C_2 + a &= 0, \\ \lambda_1 C_1 + \lambda_2 C_2 &= 0, \end{aligned} \right\} \quad (5.176)$$

решение которой имеет вид

$$C_1 = \frac{\lambda_2 a}{\lambda_1 - \lambda_2}; \quad (5.177)$$

$$C_2 = \frac{\lambda_1 a}{\lambda_2 - \lambda_1}. \quad (5.178)$$

В общем случае корни λ_1 и λ_2 — иррациональные выражения, каждое из которых включает элементарные константы всех трех стадий. Однако в одном частном случае функции λ_1 и λ_2 существенно упрощаются и характеризуют первую и вторую стадии (λ_1) и третью стадию (λ_2). Действительно, при

$$k_2 k_1 [S]_0 \ll k_3 (k_2 + k_{-1} + k_1 [S]_0) \quad (5.179)$$

(эквивалентным является условие

$$\frac{k_2}{k_3} \ll 1 + \frac{K_m}{[S]_0}) \quad (5.180)$$

корни характеристического уравнения (5.172) равны:

$$\lambda_1 = k_1 [S]_0 + k_2 + k_{-1}; \quad (5.181)$$

$$\lambda_2 = k_3. \quad (5.182)$$

Таким образом, с учетом уравнений (5.171), (5.177) и (5.178) концентрация промежуточного соединения $[X_2]$ дается уравнением

$$[X_2] = \frac{\lambda_2 a}{\lambda_1 - \lambda_2} e^{\lambda_1 t} + \frac{\lambda_1 a}{\lambda_2 - \lambda_1} e^{\lambda_2 t} + a, \quad (5.183)$$

в котором величина a как функция элементарных констант представлена уравнением (5.173).

Изменение во времени концентрации промежуточного соединения X_1 может быть найдено в результате подстановки функции $[X_2](t)$ и $d[X_2]/dt$ в уравнение (5.169):

$$[X_1] = \frac{k_3}{k_2} a + \frac{\lambda_2 a (\lambda_1 + k_3)}{k_2 (\lambda_1 - \lambda_2)} e^{\lambda_1 t} + \frac{\lambda_1 a (\lambda_2 + k_3)}{k_2 (\lambda_2 - \lambda_1)} e^{\lambda_2 t}. \quad (5.184)$$

Соответственно функции $[P_1](t)$ и $[P_2](t)$ находим, подставляя найденные функции $[X_1](t)$ и $[X_2](t)$ в уравнения (5.166) и (5.167) и проводя интегрирование:

$$[P_1] = k_2 \int_0^t [X_1] dt = k_3 a t + \frac{\lambda_2 a (\lambda_1 + k_3)}{\lambda_1 (\lambda_1 - \lambda_2)} (e^{\lambda_1 t} - 1) + \frac{\lambda_1 a (\lambda_2 + k_3)}{\lambda_2 (\lambda_2 - \lambda_1)} (e^{\lambda_2 t} - 1); \quad (5.185)$$

$$[P_2] = k_3 \int_0^t [X_2] dt = k_3 a t + \frac{k_3 \lambda_2 a}{\lambda_1 (\lambda_1 - \lambda_2)} (e^{\lambda_1 t} - 1) + \frac{k_3 \lambda_1 a}{\lambda_2 (\lambda_2 - \lambda_1)} (e^{\lambda_2 t} - 1). \quad (5.186)$$

Как следует из уравнений (5.183) и (5.184), концентрации промежуточных соединений с течением времени стремятся к постоянным значениям, причем соотношение стационарных концентраций $[X_1]$ и $[X_2]$ определяется соотношением констант скоростей k_2 и k_3 . Концентрации продуктов реакции непрерывно возрастают, а скорости реакции по $[P_1]$ и $[P_2]$ стремятся к стационарному значению, равному

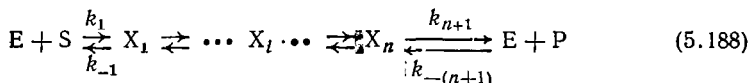
$$\text{стат} = k_3 a = \frac{\frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3} [E]_0 [S]_0}{K_m \frac{k_3}{k_2 + k_3} + [S]_0}. \quad (5.187)$$

Важно подчеркнуть, что изменение во времени всех участников реакции с точностью до постоянных дается суммой двух экспоненциальных членов с показателями λ_1 и λ_2 , значения которых даны уравнением (5.174), в частном случае — уравнениями (5.181) и (5.182).

Графический вид функций $[X_1](t)$, $[X_2](t)$, $[P_1](t)$ и $[P_2](t)$ представлен на рис. 65.

Предстацонарная кинетика ферментативной реакции с участием n промежуточных соединений. Формально-кинетический анализ кинетики каталитических реакций с участием промежуточных соединений может быть проведен и в общем виде — для реакции с участием произвольного числа n промежуточных соединений [22].

Сущность «предстацонарного подхода» к исследованию ферментативных реакций заключается в том, что бимолекулярные стадии реакции переводят в псевдомономолекулярные при большом избытке одного из реагентов и тем самым систему дифференциальных и алгебраических уравнений, описывающих кинетику реакции, превращают в линейную систему. Для реакции с участием n промежуточных сое-



в условиях $[S]_0 \gg [E]_0$ и небольшой глубине реакции ($[P] \approx 0$), когда расходом субстрата можно пренебречь ($[S] = [S]_0$), система уравнений, описывающая изменение во времени всех компонентов реакции, имеет вид:

$$\left. \begin{aligned} \frac{d[X_1]}{dt} &= k_1 [S]_0 [E] + k_{-2} [X_2] - (k_{-1} + k_2) [X_1]; \\ &\vdots \\ \frac{d[X_i]}{dt} &= k_i [X_{i-1}] + k_{-(i+1)} [X_{i+1}] - (k_{-i} + k_{i+1}) [X_i]; \\ &\vdots \\ \frac{d[X_n]}{dt} &= k_n [X_{n-1}] - (k_{-n} + k_{n+1}) [X_n]; \\ [E]_0 &= [E] + \sum_{i=1}^n [X_i]. \end{aligned} \right\} \quad (5.189)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_{n+1} [X_n]. \quad (5.190)$$

Система уравнений (5.189) представляет собой линейную систему $n + 1$ уравнений с $n + 1$ переменными и ее можно решить отдельно. Исключением переменной $[E]$ с помощью уравнения материального баланса эта система сводится к системе линейных дифференциальных уравнений.

Рассмотрим решение этой системы методом приведения к одному линейному дифференциальному уравнению более высокого порядка. Несложными преобразованиями и исключением переменных (что последовательно приводит к увеличению порядка дифференциального уравнения) система уравнений может быть приведена к уравнению n -го порядка относительно любой переменной $[X_i]$. В силу свойств системы линейных дифференциальных уравнений с постоянными коэффициентами полученное уравнение также будет линейным уравнением с посто-

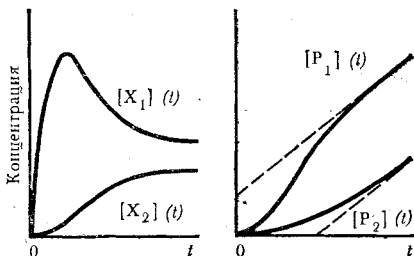


Рис. 65. Предстадионарная кинетика образования промежуточных соединений X_1 (5.184), X_2 (5.183), продуктов реакции P_1 (5.185) и P_2 (5.186) для трехстадийного механизма (5.163).

янными коэффициентами вида

$$\frac{d^n [X_n]}{dt^n} + a_1 \cdot \frac{d^{n-1} [X_n]}{dt^{n-1}} + \dots + a_n [X_n] = b. \quad (5.191)$$

Общее решение уравнения типа (5.191) представляет собой сумму общего решения соответствующего однородного уравнения (уравнения без правой части) и одного частного решения уравнения с правой частью. Общее решение однородного уравнения дается суммой экспоненциальных членов:

$$[X_n] = \sum_{i=1}^n A_i e^{\lambda_i t}, \quad (5.192)$$

где λ_i — однократные корни характеристического уравнения:

$$\lambda^n + a_1 \lambda^{n-1} + \dots + a_n = 0. \quad (5.193)$$

Частным решением уравнения с правой частью (в случае, если b — константа) является постоянная b/a_n . Таким образом, общее решение уравнения (5.191) имеет вид

$$[X_n] = \sum_{i=1}^n A_i e^{\lambda_i t} + \frac{b}{a_n}. \quad (5.194)$$

Величина $\tau_i = -\frac{1}{\lambda_i}$ имеет размерность времени и представляет собой сложную функцию элементарных констант скоростей реакции (5.188).

Зависимость концентрации продукта реакции от времени следует из дифференциального уравнения (5.190), если подставить в него уравнение (5.194) и проинтегрировать:

$$[P] = \sum_{i=1}^n k_{n+1} \int_0^t A_i e^{\lambda_i t} dt + \frac{k_{n+1} b}{a_n} t = \sum_{i=1}^n k_{n+1} \frac{A_i}{\lambda_i} (e^{\lambda_i t} - 1) + \frac{k_{n+1} b}{a_n} t. \quad (5.195)$$

Рассмотрим две особенности функции, описывающей изменение во времени концентрации продукта реакции.

1. После протекания реакции в предстационарном режиме, т. е. по истечении времени $t \gg \tau_i (i = 1 \dots n)$, реакция переходит в стационарный процесс, протекающий со скоростью

$$v_{\text{стац}} = \frac{k_{n+1} b}{a_n}. \quad (5.196)$$

Величины b и a_n — функции элементарных констант и начальных концентраций фермента и субстрата и в каждом конкретном случае определяются как коэффициенты уравнения (5.191).

2. Как видно из уравнений (5.194) и (5.195), зависимость концентрации промежуточных соединений описывается суммой экспоненциальных членов, а концентрация конечного продукта дана суммой экспонент и линейным членом, причем число экспонент в функциональной зависимости соответствует числу промежуточных соединений в механизме реакции. Таким образом, для реакции, протекающей через n

промежуточных соединений, в идеальном случае можно получить набор n характеристических времен. В качестве конкретного примера укажем на реакции с участием одного и двух промежуточных соединений [сравните уравнения (5.100), (5.171), (5.107), (5.186)]. Следовательно, кинетический метод позволяет определить на опыте число промежуточных соединений в реакции [22].

Реально (в эксперименте) может наблюдаться меньшее число экспоненциальных членов. Это прежде всего связано с методическими особенностями регистрации кинетической кривой. Так, при использовании наиболее распространенного спектрофотометрического метода необходимы заметные спектральные различия компонентов реакции. Кроме того, существенные ограничения накладывает временная разрешающая способность установки. Экспериментально определить характеристическое время можно лишь при условии, что оно превышает «мертвое» время используемой аппаратуры. Эти ограничения приводят к тому, что наблюдаемое на опыте число экспоненциальных членов позволяет оценить лишь минимальное число промежуточных соединений, принимающих участие в реакции.

§ 4. Экспериментальные методы исследования предстационарной кинетики

Исследование ферментативных реакций в предстационарном режиме нуждается в специальной экспериментальной технике, поскольку используемые методы должны иметь достаточно высокую временную разрешающую способность. «Мертвое» время экспериментальной методики должно быть существенно меньше времени протекания реакции в предстационарном режиме. В качестве примера рассмотрим случай реакции с участием одного промежуточного соединения. Экспериментальную методику можно считать удовлетворительной, если ее «мертвое» время будет меньше величины τ [см. уравнение (5.109)]. Используя наиболее характерные для ферментативного катализа значения констант скоростей, можно оценить величину τ . Величина константы скорости образования фермент-субстратного комплекса (k_1) для большинства ферментативных реакций лежит в диапазоне 10^6 — $10^{10} \text{ M}^{-1} \times \text{c}^{-1}$ (см. гл. VII). Типичное значение K_m , характерное для многих ферментативных реакций, равно 10^{-5} M . Если положить минимальную концентрацию субстрата равной 10^{-5} M (эту концентрацию еще можно определить чувствительным спектрофотометрическим методом), значение τ будет лежать в диапазоне 10^{-6} — 10^{-2} c . Это показывает, что для исследования предстационарной кинетики ферментативных реакций необходима специальная экспериментальная техника, позволяющая регистрировать кинетические процессы в микро- и миллисекундном временном диапазоне.

Кинетика предстационарного протекания ферментативных реакций в том приближении, в котором она была изложена (условие избытка одного из реагентов и небольшая глубина превращения субстрата), изучалась в основном «струевыми» методами. Струевые методы для измере-

ния кинетики быстрых реакций в растворе впервые были использованы Хартриджем и Роутоном [23—25] и позднее получили развитие благодаря работам Б. Чанса [26—31]. Сущность струевых методик заключается в том, что реакция инициируется быстрым смешиванием реагентов в проточных условиях. Различают три струевых метода, известных как методы непрерывной струи, ускоренной струи и остановленной струи [32]. По методу *непрерывной струи* два раствора реагирующих веществ вводят в смесительную камеру и раствор после смешивания поступает в трубку для наблюдения (рис. 66). Время t в этой методике при постоянной скорости потока u определяется расстоянием l от смесительной камеры и равно l/u .

По методу *ускоренной струи* растворы реагирующих веществ помещают в шприцы, поршни которых приводят в движение резким толчком в течение примерно 0,1 с. Наблюдение проводят в фиксированной точке вблизи смесительной камеры; при этом скорость течения жидкости (и, следовательно, время протекания реакции) постоянно меняется. Методика ускоренной струи позволяет использовать весьма малые объемы реагирующих веществ (до 0,1 мл), что является важным преимуществом при исследовании ферментативных реакций [32].

Наиболее широкое распространение нашел метод *остановленной струи* [32—37]. Принципиальная схема используемой установки представлена на рис. 67. Для остановки струи используется простое устройство, которое позволяет остановить поток за 1—2 миллисекунды. Это устройство представляет собой поршень, помещенный в конце трубки для наблюдения; реакционная смесь толкает этот поршень и он резко останавливается, дойдя до внешнего ограничителя.

Принципиальная особенность всех «струевых» методов — быстрое смешивание растворов реагирующих веществ в специально сконструированной смесительной камере. Эффективное смешивание в современных «струевых» установках обеспечивает «мертвое время» не более 0,1—0,3 миллисекунды. Следовательно, «струевые» методики не позволяют изучать нестационарную кинетику в микросекундном режиме. Для этого необходимо применять другие методы (см. следующий параграф).

Дальнейшее увеличение временной разрешающей способности аппаратуры для исследования нестационарной кинетики дает использование в энзимологии метода *импульсного фотоллиза* (флеш-метод). Этот метод применим для реакций,

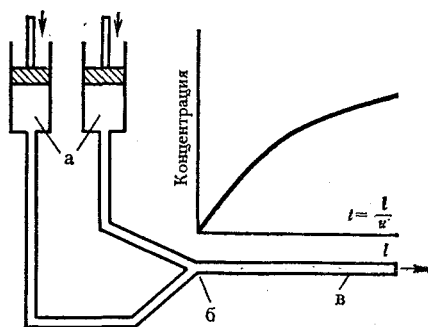


Рис. 66. Принципиальная схема установки «непрерывной струи»: а — растворы реагирующих веществ; б — камера; в — трубка для наблюдений [32]

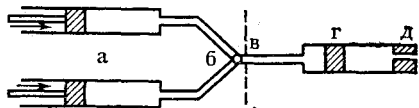


Рис. 67. Принципиальная схема установки «остановленной струи»:

а — растворы реагирующих веществ; *б* — смешивательная камера; *в* — точка наблюдения; *г* — останавливающий поршень; *д* — ограничитель [32]

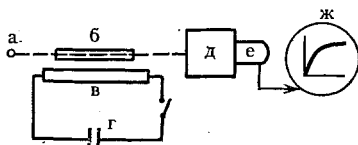


Рис. 68. Принципиальная схема установки импульсного фотоллиза:

а — источник света; *б* — кювета с исследуемым раствором; *в* — импульсная лампа; *г* — высоковольтный конденсатор; *д* — монокроматор; *е* — фотоумножитель; *ж* — осциллограф [22]

которые могут инициироваться действием света за счет протекающей в системе фотохимической реакции [22, 38]. В отличие от «струевых» методов флеш-метод не требует быстрого смешивания реагентов. Принципиальная схема метода импульсного фотоллиза представлена на рис. 68. Реакция в этом случае инициируется действием мощного светового импульса на раствор фермента с веществом, которое под действием света превращается в субстрат или ингибитор (в общем случае в эффектор ферментативного процесса). Могут быть реализованы системы, в которых фотохимическая реакция происходит непосредственно в активном центре фермента и продуктом фотохимической реакции является активный фермент [22].

«Мертвое» время метода определяется двумя параметрами: 1) временем импульсной вспышки и 2) временем фотохимического образования соответствующего компонента ферментативной реакции. Ксеононовая импульсная техника позволяет получить мощные импульсы света продолжительностью 10—100 микросекунд. Время вспышки может быть уменьшено без уменьшения мощности при использовании лазерной техники. Время фотохимической реакции может быть достаточно коротким (особенно в случае внутримолекулярных фотохимических процессов или же фотохимических реакций, протекающих с участием растворителя).

§ 5. Исследование механизма ферментативных реакций методами релаксационной кинетики

Релаксационные методы исследования кинетики химических реакций основаны на том принципе, что при быстром внешнем воздействии на систему (изменение температуры, давления, электрического поля) время, которое нужно системе для достижения нового равновесного (или стационарного) состояния, зависит от скорости химической реакции (или, иногда от скорости диффузии реагентов). Переход системы к новым равновесным (или стационарным) концентрациям реагентов называют «химической релаксацией» [39, 40]. Если отклонение от равновесия, вызванное внешним воздействием, невелико, кинетика релаксации будет весьма простой (ее удастся описать с помощью линейных дифференциальных уравнений с постоянными коэффициентами).

«Химическая релаксация» при комплексообразовании фермента с лигандом. Рассмотрим принципы релаксационной кинетики на примере простейшей реакции комплексообразования активного центра фермента с каким-либо лигандом А (субстратом, ингибитором, эффектором):



В начальном состоянии система находится в равновесии, которое характеризуется константой равновесия и, соответственно, равновесными концентрациями \bar{E} , \bar{A} , \bar{EA} . Предположим, что в системе резко изменяется температура ($T \rightarrow T + \Delta T$). Это приводит к изменению константы равновесия ($K \rightarrow K + \Delta K$), которое определяется термодинамическим соотношением:

$$\frac{\Delta K}{K} \cong \Delta \ln K \cong \frac{\Delta H}{RT^2} \Delta T, \quad (5.198)$$

где ΔH — стандартное изменение энтальпии; R — газовая постоянная. После быстрого изменения температуры исходные концентрации компонентов не соответствуют новому равновесию, характеризующемуся константой равновесия $K + \Delta K$, и, следовательно, система должна перейти в новое равновесное состояние. При этом кинетика реакции описывается дифференциальным уравнением

$$\frac{d[EA]}{dt} = k_{12}[E][A] - k_{21}[EA], \quad (5.199)$$

в котором текущие концентрации связаны с равновесными концентрациями уравнениями:

$$\left. \begin{aligned} [EA] &= [\bar{EA}] + \Delta [EA], \\ [E] &= [\bar{E}] + \Delta [E], \\ [A] &= [\bar{A}] + \Delta [A]. \end{aligned} \right\} \quad (5.200)$$

Уравнение (5.199) нелинейно, поскольку содержит произведение переменных $[E]$ и $[A]$. Анализ кинетики существенно упрощается, если отклонение от равновесия, вызываемое внешним возмущаемым фактором, невелико, т. е. если справедливы неравенства

$$[\bar{E}] \gg \Delta [E] \quad (5.201)$$

и, соответственно,

$$[\bar{A}] \gg \Delta [A]. \quad (5.202)$$

В этом случае можно пренебречь произведением $\Delta[A]\Delta[E]$ и бимолекулярный член в уравнении (5.199) принимает вид

$$k_{12}([\bar{E}] + \Delta[E])([\bar{A}] + \Delta[A]) \cong k_{12}[\bar{E}][\bar{A}] + k_{12}[\bar{E}]\Delta[A] + k_{12}[\bar{A}]\Delta[E]. \quad (5.203)$$

В результате уравнение (5.199) становится линейным дифференциальным уравнением с постоянными коэффициентами. С учетом равенства

$$\Delta[A] = \Delta[E] = -\Delta[EA], \quad (5.204)$$

которое следует из уравнений материального баланса по $[E]$ и $[A]$, ис-

ходное уравнение (5.199) принимает вид

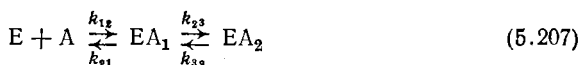
$$\frac{d\Delta[EA]}{dt} + \{k_{12}([\bar{E}] + [\bar{A}]) + k_{21}\} \Delta[EA] = k_{12}[\bar{A}][\bar{E}] - k_{21}[E\bar{A}]. \quad (5.205)$$

Решение этого дифференциального уравнения представляет собой экспоненциальную функцию $\Delta[EA]$ от времени, в которой показатель экспоненты связан с элементарными константами скорости реакции (5.197) уравнением

$$\tau^{-1} = k_{12}([\bar{E}] + [\bar{A}]) + k_{21}. \quad (5.206)$$

Величина τ называется временем релаксации. При анализе зависимости времени релаксации от равновесных концентраций E и A могут быть найдены элементарные константы скорости реакции (5.197). В качестве примера на рис. 69 приведены кинетические данные реакции комплексообразования активного центра α -химотрипсина с красителем акрифлавином [41]. Представленные экспериментальные данные хорошо описываются уравнением (5.206). По тангенсу угла наклона и отрезку, отсекаемому на оси ординат, найдены, соответственно, константы скорости процесса комплексообразования $k_{12} = 2,4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$, $k_{21} = 2,7 \cdot 10^3 \text{ c}^{-1}$.

Кинетика реакции комплексообразования с одним промежуточным соединением. Методы определения элементарных констант усложняются с усложнением механизма реакции [39, 42]. Тем не менее для обратимой двухстадийной реакции комплексообразования лиганда A с активным центром фермента



данные релаксационной кинетики позволяют определить все четыре константы скорости. Кинетика процесса (5.207) описывается системой уравнений:

$$\left. \begin{aligned} \frac{d[E]}{dt} &= -k_{12}[E][A] + k_{21}[EA_1]; \\ \frac{d[EA_1]}{dt} &= k_{12}[E][A] - (k_{21} + k_{23})[EA_1] + k_{32}[EA_2]; \\ [E]_0 &= [E] + [EA_1] + [EA_2]; \quad [A]_0 = [A] + [EA_1] + [EA_2]. \end{aligned} \right\} \quad (5.208)$$

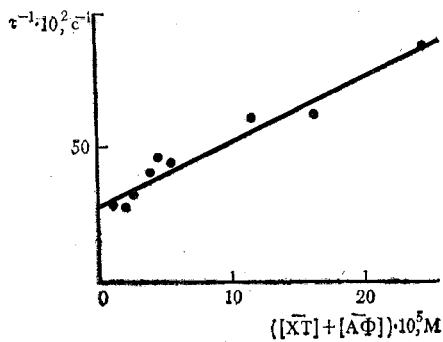


Рис. 69. Зависимость (5.206) обратного времени релаксации комплексообразования (5.197) α -химотрипсина (ХТ) с красителем акрифлавином (АФ) от суммы равновесных концентраций фермента и красителя [41]

Перейдем к новым переменным $\Delta [E]$ и $\Delta [EA]$, полагая, что быстрое воздействие на систему приводит лишь к небольшому сдвигу равновесного состояния и, следовательно, значения $\Delta [E]$ и $\Delta [EA]$ невелики. В этом случае уравнения (5.208) можно свести к системе линейных дифференциальных уравнений с постоянными коэффициентами:

$$\left. \begin{aligned} \frac{d\Delta [E]}{dt} &= a_{11}\Delta [E] + a_{12}\Delta [EA_1]; \\ \frac{d\Delta [EA_1]}{dt} &= a_{21}\Delta [E] + a_{22}\Delta [EA_1], \end{aligned} \right\} \quad (5.209)$$

где

$$\left. \begin{aligned} a_{11} &= -k_{12} ([\bar{E}] + [\bar{A}]); \\ a_{12} &= k_{21}; \\ a_{21} &= k_{12} ([\bar{E}] + [\bar{A}]); \\ a_{22} &= k_{32} - k_{21} - k_{23}. \end{aligned} \right\} \quad (5.210)$$

Решение системы уравнений (5.209) представляет собой сумму двух экспоненциальных членов, показатели экспонент которых — корни соответствующего характеристического уравнения. Характеристическое уравнение в форме определителя имеет вид

$$\begin{vmatrix} a_{11} - \lambda & a_{12} \\ a_{21} & a_{22} - \lambda \end{vmatrix} = 0. \quad (5.211)$$

Корни характеристического уравнения, найденные при решении квадратного уравнения (5.211), даны следующей иррациональной функцией:

$$\lambda_{1,2} = \frac{a_{11} + a_{22}}{2} \pm \sqrt{\left(\frac{a_{11} + a_{22}}{2}\right)^2 - (a_{11}a_{22} - a_{21}a_{12})}. \quad (5.212)$$

Из экспериментальных данных на опыте определяются два времени релаксации τ_1 и τ_2 , которые связаны с $\lambda_{1,2}$ соотношением

$$\tau_{1,2} = -\frac{1}{\lambda_{1,2}}. \quad (5.213)$$

Как видно, времена релаксации связаны с элементарными константами уравнениями (5.210), (5.212), (5.213) и непосредственное определение элементарных констант по времени релаксации невозможно. Однако некоторые функции времен релаксации связаны с элементарными константами скорости процесса простыми соотношениями:

$$-(\lambda_1 + \lambda_2) = \frac{1}{\tau_1} + \frac{1}{\tau_2} = a_{11} + a_{22} = k_{12} ([\bar{E}] + [\bar{A}]) + k_{21} + k_{23} + k_{32}. \quad (5.214)$$

$$\lambda_1 \lambda_2 = \frac{1}{\tau_1} \cdot \frac{1}{\tau_2} = -a_{12} a_{21} + a_{11} a_{22} = k_{12} (k_{23} + k_{32}) ([\bar{E}] + [\bar{A}]) + k_{21} k_{32}. \quad (5.215)$$

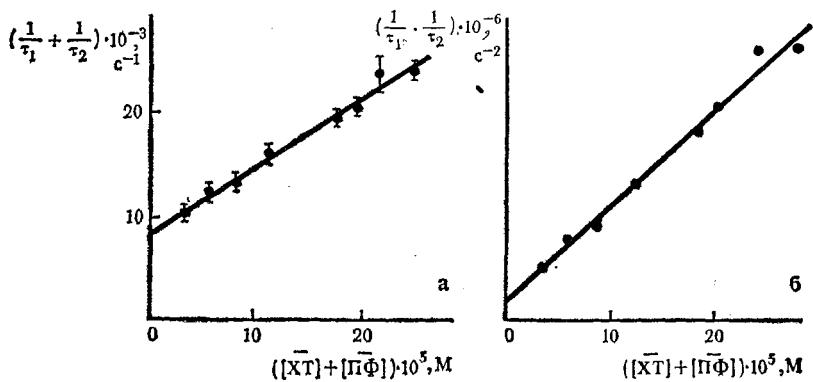
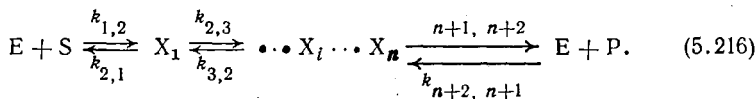


Рис. 70. Зависимости (5.214) и (5.215) как функции времен релаксаций (а) $1/\tau_1 + 1/\tau_2$ и (б) $1/\tau_1 \cdot 1/\tau_2$ от суммы равновесных концентраций α -химотрипсина (ХТ) и красителя профлавина (ПФ) в реакции (5.207) образования комплекса [41]

С их помощью из экспериментальных данных τ_1 и τ_2 могут быть найдены все 4 константы скорости отдельных стадий механизма (5.207).

В качестве примера рассмотрим механизм комплексообразования с активным центром α -химотрипсина красителя профлавина [41]. Кинетическая кривая комплексообразования описывается суммой двух экспоненциальных членов. Из их показателей были найдены два времени релаксации τ_1 и τ_2 . На рис. 70 представлена зависимость функции $\tau^{-1}_1 + \tau^{-1}_2$ от суммы равновесных концентраций фермента и красителя. В соответствии с уравнением (5.214) по тангенсу угла наклона этой зависимости определяется константа скорости k_{12} . Отрезок, отсекаемый на оси ординат, дает сумму констант $k_{21} + k_{23} + k_{32}$. Соответственно из зависимости функции $\tau^{-1}_1 \tau^{-1}_2$ от равновесных концентраций фермента и красителя [см. уравнение (5.215)] определяются параметры $k_{12}(k_{23} + k_{32})$ (по тангенсу угла наклона) и $k_{21}k_{32}$ (по отрезку, отсекаемому на оси ординат). Решение полученной системы четырех уравнений с четырьмя неизвестными константами скорости позволяет найти все четыре элементарные константы скорости механизма (5.207).

Релаксационная кинетика многостадийной фермент-субстратной реакции. Проанализируем кинетику реакции с участием n промежуточных соединений [39, 42]:



Для системы, находящейся в равновесии, концентрации компонентов реакции соответственно равны $[E], [S], [X_1], \dots, [X_n], [P]$. При быстром внешнем воздействии концентрации реагентов начнут изменяться и

стремиться к новому равновесному состоянию. Текущую концентрацию каждого из компонентов можно записать в виде

$$(\bar{[E]} + \Delta [E]), (\bar{[S]} + \Delta [S]), (\bar{[X_i]} + \Delta [X_i]), (\bar{[P]} + \Delta [P]).$$

Для того чтобы найти функциональную зависимость концентрации каждого из компонентов реакции от времени, необходимо решить систему уравнений типа (5.189). Эта система уравнений будет линейной, если смещение от равновесия невелико. При этом условии бимолекулярные члены $k_{1,2}[E][S]$ и $k_{n+2,n+1}[E][P]$ (которые и приводят к нелинейности системы) можно представить в виде $k_{1,2}(\bar{[E]} + \Delta [E])(\bar{[S]} + \Delta [S]) \approx \approx k_{1,2}(\bar{[E]}\bar{[S]} + \bar{[S]}\Delta [E] + \bar{[E]}\Delta [S])$ и, соответственно, $k_{n+2,n+1}(\bar{[E]}\bar{[P]} + \bar{[E]}\Delta [P] + \bar{[P]}\Delta [E])$, поскольку при малом смещении равновесия в записанных суммах можно пренебречь произведением переменных. В результате приходим к следующей системе уравнений, описывающей кинетику процесса:

$$\left. \begin{aligned} \frac{d\Delta [S]}{dt} &= a_{1,1} \Delta [S] + \sum_{j=1}^n a_{1,j+1} \Delta [X_j]; \\ \frac{d\Delta [X_j]}{dt} &= a_{j+1,1} \Delta [S] + \sum_{i=1}^n a_{i,j+1} \Delta [X_i], \end{aligned} \right\} \quad (5.217)$$

где a_{ij} — функции констант скоростей и равновесных концентраций компонентов. Общее решение системы линейных дифференциальных уравнений с постоянными коэффициентами можно записать следующим образом:

$$\Delta [S] = \sum_{j=1}^{n+1} A_j e^{\lambda_j t}; \quad \Delta [X_i] = \sum_{j=1}^{n+1} B_{i,j} e^{\lambda_j t}, \quad (5.218)$$

где λ_j — корни характеристического уравнения $n + 1$ степени, которое в форме определителя имеет вид

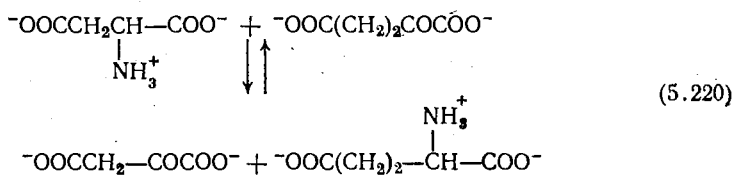
$$\begin{vmatrix} a_{1,1} - \lambda & a_{1,2} \cdots a_{1,n+1} \\ a_{2,1} & a_{2,2} - \lambda \cdots a_{2,n+1} \\ \cdots & \cdots \cdots \cdots \\ a_{n+1,1} & a_{n+1,2} \cdots a_{n+1,n+1} - \lambda \end{vmatrix} = 0. \quad (5.219)$$

Важный вывод, который следует из всего изложенного, заключается в том, что в случае n промежуточных соединений число экспоненциальных членов, описывающих кинетику реакции, равно $n + 1$. Таким образом, наблюдаемое число экспонент является критерием минимального числа промежуточных соединений, принимающих участие в реакции. Так, для реакции с участием одного промежуточного соединения число экспоненциальных членов равно двум [см. уравнения (5.211)—(5.213)].

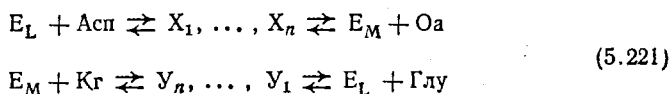
Экспериментально определяемые величины времен релаксаций ($-1/\lambda_j$) являются функциями всех констант скоростей элементарных реакций и равновесных концентраций реагентов. В математическом смысле аналогичная ситуация возникает при анализе колебательных спектров молекул, где вместо колебаний отдельных связей измеряют нормальные колебания, представляющие собой сложные функции отдельных частот. Анализ математических зависимостей, возникающих при решении систем уравнений, описывающих эти процессы, детально разработан М. Эйгеном [39].

Использование релаксационного подхода к изучению механизмов ферментативных реакций привело к выяснению детального постадийного механизма катализа ряда ферментов. В качестве примера рассмотрим проведенное Г. Хаммесом исследование механизма катализа аспаратаминотрансферазой.

Аспаратаминотрансфераза катализирует обратимую реакцию переноса аминогруппы между аспарагиновой и кетоглутаровой кислотами с образованием щавелевоуксусной и глутаминовой кислот:



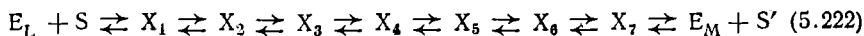
Коферментом в этой реакции является пиридоксальфосфат, который в процессе реакции претерпевает существенные спектральные изменения, что позволяет проследить за кинетикой реакции. В общих чертах механизм реакции заключается в переносе аминогруппы с аминокислоты на пиридоксальфосфат с образованием пиридоксаминфосфата и кетокислоты, после чего аминогруппа переносится к другой кетокислоте с образованием новой аминокислоты:



где E_L — фермент в форме пиридоксаля; E_M — фермент в форме пиридоксамина; Асп — аспарагиновая кислота; Оа — щавелевоуксусная кислота; Кг — кетоглутаровая кислота; Глу — глутаминовая кислота; X_i, Y_i — промежуточные соединения реакции.

Изучение этой системы методом температурного скачка позволило обнаружить в каждой из реакций (превращение аспарагиновой кислоты в щавелевоуксусную и, соответственно, кетоглутаровой в глутаминовую), по крайней мере, два промежуточных соединения (при исследовании каждой реакции были обнаружены три времени релаксации, лежащие в интервале 50 микросекунд—20 миллисекунд) [43]. Были изучены зависимости времен релаксаций от концентраций субстратов и фермента и определены (или оценены) константы скорости характеризующие отдельные стадии.

Более детализированная картина фермент-субстратного взаимодействия была получена при исследовании реакций аспаратаминотрансферазы с модифицированными субстратами [44, 45]. Так, реакция трансаминирования эритроизомера β -L-оксиаспарагиновой кислоты протекает медленно и поэтому удалось обнаружить восемь времен релаксаций. В соответствии с этим простейший механизм релаксации должен включать семь промежуточных соединений и имеет вид



где S' — кетоформа субстрата. Анализ зависимости времен релаксаций от концентраций позволил вычислить 14 из 16 кинетических констант, описывающих механизм (5.222). Кроме того, были определены спектральные характеристики промежуточных соединений. Эти данные позволили постулировать детальный механизм катализа ферментом.

§ 6. Экспериментальные методы исследования релаксационной кинетики

При анализе механизмов ферментативных реакций наибольшее применение нашел метод температурного скачка. Это объясняется тем, что разработана достаточно простая и надежная аппаратура, позволяющая осуществить изменение температуры за несколько микросекунд, а также тем, что данный метод позволяет работать с небольшим объемом исследуемого раствора (до 0,1 мл), что весьма важно при исследовании реакций с ферментами. Метод температурного скачка использует чувствительную спектрофотометрическую аппаратуру и, следовательно, можно регистрировать весьма незначительные концентрации промежуточных соединений [39, 41, 42]. Принципиальная схема установки «температурный скачок» приведена на рис. 71. Обычно температурный скачок осуществляется за счет разряда высоковольтного конденсатора через раствор электролита в реакционной ячейке.

Изменение температуры связано с теплоемкостью раствора, напряжением на конденсаторе и его емкостью соотношением

$$\Delta t = \frac{\gamma C U^2}{2\rho C_p} \quad (5.223)$$

где C — емкость конденсатора; U — напряжение; ρ — плотность раствора; C_p — удельная теплоемкость при постоянном давлении; γ — постоянная ячейки. Обычно при использовании этого метода температуру раствора поднимают на 2—10°C.

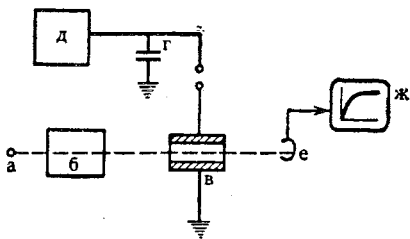


Рис. 71. Принципиальная схема установки «температурный скачок»: а — источник света; б — монохроматор; в — ячейка с исследуемым раствором; г — высоковольтный конденсатор; д — блок питания разрядного устройства; е — фотоумножитель; ж — осциллограф

Время, в течение которого происходит изменение температуры, определяется по уравнению

$$\tau_{\text{нагр}} = \frac{RC}{2}, \quad (5.224)$$

где R —сопротивление раствора в реакционной ячейке. Именно поэтому в реакционную ячейку добавляют высокую концентрацию электролита, чтобы понизить энергетическое сопротивление раствора. Лучшие приборы позволяют получить необходимое изменение температуры за несколько микросекунд.

Для изучения реакций, имеющих необратимые стадии, применяется метод, использующий комбинированную установку «остановленная струя» — «температурный скачок». Это позволяет изучать релаксационную кинетику стадий, предшествующих скоростьопределяющей стадии. В установках этого типа после смешивания реагентов и остановки струи происходит температурный скачок за счет разряда высоковольтного конденсатора. Температурный скачок можно осуществить в течение нескольких миллисекунд после остановки струи [39].

Другие возможности быстрого разогрева реакционной ячейки связаны с использованием микроволновой лазерной техники [42]. С использованием микроволнового импульсного генератора за 0,5—3 микросекунды ячейка объемом 25 микролитра может быть нагрета на 3—10°. Импульсный лазерный нагрев может существенно уменьшить «мертвое время» методики.

Изменение температуры в реакционной ячейке можно осуществить также за счет простого обмена тепла с разогретым элементом [42].

Внешнее влияние, возмущающее систему, может иметь разную физическую природу. В общем случае константа равновесия является функцией не только температуры, но и давления, электрического поля. Поэтому помимо рассмотренного метода (температурного скачка) внешнее воздействие на систему можно осуществить, изменяя давление (скачок давления, поглощение ультразвука) или электрическое поле (метод электрического импульса). Детальное описание методик, их возможностей, особенностей и недостатков проведено Е. Колдиным [32].

Релаксационные методы, используемые для исследования быстрых химических реакций в растворе, имеют весьма высокую разрешающую способность. Так, например, метод поглощения ультразвука обнаруживает время разрешения вплоть до наносекундного диапазона [42]. Именно поэтому релаксационная кинетика широко используется при исследовании механизмов ферментативных реакций.

ЛИТЕРАТУРА К ГЛ. V

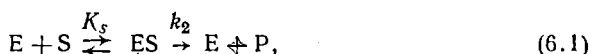
1. У о л т е р Ч. Кинетика ферментативных реакций, открытые и замкнутые системы. М., «Мир», 1969.
2. Д и к с о н М., У э б б Э. Ферменты. М., «Мир», 1966.
3. У э б б Л. Ингибиторы ферментов и метаболизма, общие принципы торможения. М., «Мир», 1966.
4. Я к о в л е в В. А. Кинетика ферментативного катализа. М., «Наука», 1966.

5. Chance B. In «Currents in Biochemical Research» (D. E. Green ed.). New York, Interscience, 1956, p. 308.
6. Roughton F. Y. W., Chance B. In «Technique of Organic Chemistry» (S. L. Triess, A. Lewis, A. Weisberger, eds.). Vol. 2. New York, Interscience, 1963, p. 22.
7. Chance B., *J. Biol. Chem.*, **151**, 533 (1943).
8. Cunningham L. *Comprehensive Biochemistry*, **16**, 85 (1965).
9. Hess G. P., McConn J., Ku E., McConkey G. *Phil. Trans. Roy. Soc.*, **B257**, 89 (1970).
10. Bender M. L., Zerner B. *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 2391 (1961).
11. Roughton F. Y. W. *Disc. Faraday Soc.*, **17**, 116 (1955).
12. Gutfreund H. *Disc. Faraday Soc.*, **20**, 107 (1955).
13. Laidler K. J. *Can. J. Chem.*, **33**, 1614 (1955).
14. Viale R. O. *J. Theoret. Biol.*, **27**, 377 (1970).
15. Quellet L., Stewart J. A. *Can. J. Chem.*, **37**, 737 (1959).
16. Gutfreund H., Sturtevant J. M. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **42**, 719 (1956).
17. Gutfreund H., Sturtevant J. M. *Biochem. J.*, **63**, 656 (1956).
18. Bender M. L., Baque-Canton M. L., Blakeley R. L., Brubacher L. J., Feder J., Gunter C. R., Kezdy F. J., Killhafer I. V., Marshall T. H., Miller G. G., Stoops J. K., *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 5890 (1966).
19. Hartley B. S., Kilby B. A. *Biochem. J.*, **50**, 672 (1952).
20. Hartley B. S., Kilby B. A. *Biochem. J.*, **56**, 288 (1954).
21. Kezdy F. J., Bender M. L. *Biochemistry*, **1**, 1097 (1962).
22. Березин И. В., Варфоломеев С. Д., Мартинек К. *Усп. хим.*, **43**, 835 (1974).
23. Hartridge H., Roughton F. J. W. *Proc. Roy. Soc. (London)*, **104A**, 376 (1923).
24. Hartridge H., Roughton F. J. W. *Proc. Roy. Soc. (London)*, **104A**, 395 (1923).
25. Hartridge H., Roughton F. J. W. *Proc. Roy. Soc. (London)*, **107A**, 654 (1925).
26. Chance B. *J. Franklin Inst.*, **229**, 455 (1940).
27. Chance B. *J. Franklin Inst.*, **229**, 613 (1940).
28. Chance B. *J. Franklin Inst.*, **229**, 737 (1940).
29. Chance B. *Rev. Sci. Instr.*, **22**, 619 (1951).
30. Chance B. *Rev. Sci. Instr.*, **22**, 634 (1951).
31. Chance B., Legallais L. *Rev. Sci. Instr.*, **22**, 627 (1951).
32. Колдин Е. Быстрые реакции в растворе. М., «Мир», 1966.
33. Gibson Q. H., Milnes L. *Biochem. J.*, **91**, 161 (1964).
34. Berger R. L., Balko B., Bocherdt W., Train W. *Rev. Sci. Instr.*, **39**, 489 (1968).
35. Hiromi K., Ono S., Iton S., Nakamura T. *J. Biochem.*, **64**, 897, (1968).
36. Nakamura T. *J. Biochem.*, **70**, 961 (1971).
37. Kustin K. *Methods in Enzymology*. Vol. XVI, New York, Acad. Press, 1969.
38. Berezin I. V., Varfolomeyev S. D., Martinek K. *FEBS Letters*, **8**, 173 (1970).
39. Eigen M., Hammes G. G. *Adv. Enzymology*, **25**, 1 (1963).
40. Czerlinski G. H. *Chemical Relaxation*. New York, Marcel Dekker, 1966.
41. Havsteen B. *Conformational Changes in Enzymes, accompanying Catalysis*. Aarhus, University Press, 1968.
42. Chock P. B. *Biochimie*, **13**, 151 (1971).
43. Fasella P., Hammes G. G. *Biochemistry*, **6**, 1789 (1967).
44. Hammes G. G., Haslam J. L. *Biochemistry*, **7**, 1519 (1968).
45. Hammes G. G. Application and Significance of Modern Methods for the Investigation of Fast Reaction Kinetics, 8th Intern. Congress in Chemistry of Natural Products, Riga, 1970.

**ВАЖНЕЙШИЕ МЕТОДЫ СТАЦИОНАРНОЙ КИНЕТИКИ,
ПРИМЕНЯЕМЫЕ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ АКТИВНЫХ ЦЕНТРОВ
И МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ**

§ 1. Уравнение Михаэлиса — Ментен

Основная идея о принципах биокатализа возникла еще в начале нашего века благодаря трудам Брауна и Анри и позднее была развита Михаэлисом и Ментен, а также Бриггсом и Холденом. Идея заключается в том, что механизм каталитического действия ферментов состоит в общем случае в образовании комплексов ферментом и субстратом промежуточных соединений, претерпевающих в ходе реакции последовательные превращения вплоть до образования конечных продуктов и регенерации фермента. Действительно, в простейшем случае описание кинетики ферментативной реакции укладывается в рамки так называемой двухстадийной схемы:



в которой E — фермент; S — субстрат; K_s — константа диссоциации фермент-субстратного комплекса ES:

$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]}; \quad (6.2)$$

k_2 — константа скорости первого порядка для реакции распада фермент-субстратного комплекса, протекающей с образованием продуктов реакции P и регенерацией фермента. Рассмотрим кинетику реакции (6.1) в условиях, когда начальная концентрация субстрата намного превышает исходную концентрацию фермента ($[S]_0 \gg [E]_0$), что является обычным условием изучения кинетики ферментативных реакций, и полагая, что равновесие (6.2) устанавливается намного быстрее, чем протекает сама реакция. Тогда скорость реакции, равную $v = d[P]/dt = k_2[ES]$, можно записать в следующем виде:

$$v = \frac{k_2[E]_0[S]}{K_s + [S]},$$

если наряду с (6.2) принять во внимание уравнение материального баланса

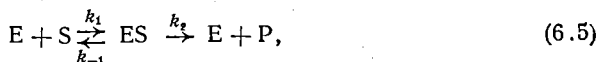
$$[E]_0 = [E] + [ES]. \quad (6.3)$$

При изучении начальных скоростей реакции, когда расходом субстрата можно пренебречь, и, следовательно, $[S] = [S]_0$, имеем

$$v = \frac{k_2[E]_0[S]_0}{K_s + [S]_0}. \quad (6.4)$$

Формально к такому же выражению можно прийти, считая, что реакция (6.1) протекает в стационарном режиме (см. гл. V). Применяя

принцип стационарных концентраций [1] к схеме двухстадийной ферментативной реакции



т. е. полагая $d[ES]/dt = 0$, запишем:

$$k_1 [E] [S]_0 - (k_{-1} + k_2) [ES] = 0. \quad (6.6)$$

На основании (6.3) и (6.6) выражение для начальной стационарной скорости реакции (6.1) примет следующий вид:

$$v = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0}{K_m + [S]_0}, \quad (6.7)$$

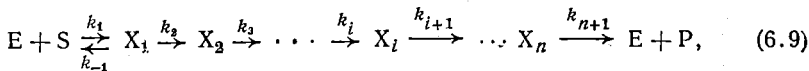
где $K_m = (k_{-1} + k_2)/k_1$ — константа Михаэлиса. Видно, что уравнение (6.4) представляет собой частный случай уравнения Михаэлиса—Ментен (6.7), когда $k_{-1} \gg k_2$ и, следовательно, $K_m \approx K_s = k_{-1}/k_1$.

Произведение $k_2[E]_0$, имеющее размерность скорости реакции, обычно называют максимальной скоростью ферментативной реакции и обозначают V (при избытке субстрата по сравнению с константой Михаэлиса начальная скорость ферментативной реакции максимальна, $v = V$).

Из проведенного анализа следует, что стационарная скорость реакции (6.1) при $[S]_0 \gg [E]_0$ должна гиперболически зависеть от начальной концентрации субстрата и линейно от начальной концентрации фермента. Эти закономерности действительно характеризуют кинетику большинства ферментативных реакций. Дело в том, что уравнение Михаэлиса — Ментен

$$v = \frac{V [S]_0}{K_{m(\text{каж})} + [S]_0} \quad (6.8)$$

формально описывает начальную стационарную скорость также и более сложных ферментативных процессов, например многостадийной реакции



для которой при $[S]_0 \gg [E]_0$ имеем:

$$V = k_{\text{кат}} [E]_0,$$

$$1/k_{\text{кат}} = 1/k_2 + 1/k_3 + 1/k_4 + \dots + 1/k_{n+1}, \quad (6.10)$$

$$K_{m(\text{каж})} = (k_{-1} + k_2)/k_1 k_2 \left(\frac{1}{k_2} + \frac{1}{k_3} + \dots + \frac{1}{k_{n+1}} \right).$$

формально тем же выражением (6.8) можно представить также и начальную стационарную скорость многостадийной реакции, в которой все стадии обратимы (схема 5.16, см. гл. V). В этом случае, однако,

V и K_m (каж) окажутся весьма сложными функциями констант скоростей элементарных стадий (более подробно см. в [2]).

Определение кинетических параметров ферментативных реакций из экспериментальных данных. Наиболее распространенный способ определения кинетических параметров уравнения (6.8) состоит в том что экспериментальные данные представляют в координатах $(1/v, 1/[S]_0)$. Эти координаты называют координатами Лайнуивера—Бёрка или координатами «двойных обратных величин». Как следует из выражения

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{K_m \text{ (каж)}}{V} \cdot \frac{1}{[S]_0}, \quad (6.11)$$

график зависимости (6.8) в координатах Лайнуивера — Бёрка имеет вид прямой линии, пересекающей ось абсцисс и ординат в точках $-1/K_m$ (каж) и $1/V$ соответственно (рис. 72).

Довольно часто для обработки кинетических данных ферментативных реакций используют так называемое уравнение Иди, которое также легко получить преобразованием уравнения (6.8):

$$v = V - K_m \text{ (каж)} \frac{v}{[S]_0}. \quad (6.12)$$

При графическом построении экспериментальных данных в координатах Иди $(v, v/[S]_0)$ полученная прямая линия пересекает ось координат в точке V и имеет тангенс угла наклона, равный $-K_m$ (каж). Следует отметить, что этот метод линеаризации иногда называют также методом Хофсти (см. [3]).

В ряде случаев при обработке кинетических данных ферментативных реакций удобно использовать координаты $([S]_0/v, [S]_0)$, которые называют координатами Вульфа [3] или Хейнса [4]. В этом случае, как следует из выражения

$$\frac{[S]_0}{v} = \frac{K_m \text{ (каж)}}{V} + \frac{[S]_0}{V}, \quad (6.13)$$

отрезки, отсекаемые полученной прямой на оси абсцисс и ординат, равны $-K_m$ (каж) и K_m (каж)/ V соответственно. Существуют и другие способы трансформации уравнения Михаэлиса в линейную функцию [5], однако они не имеют широкого применения.

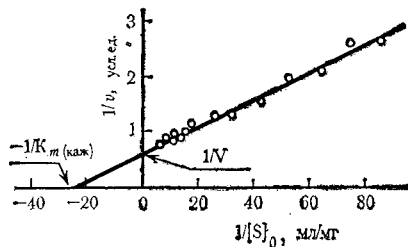
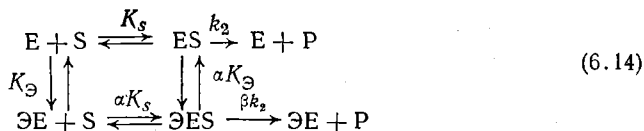


Рис. 72. Определение максимальной скорости и кажущейся константы Михаэлиса для гидролиза бактериальных клеток *Micrococcus lysodeikticus*, катализируемого лизоцимом (по данным А. А. Клёсова, М. Л. Рабиновича)

§ 2. Влияние обратимых эффекторов (ингибиторов и активаторов) на кинетику действия ферментов

Влияние обратимо действующего эффектора (\mathcal{E}) на двухстадийную ферментативную реакцию может быть передано следующей схемой, если полагать, что эффектор комплексуется с ферментом (или с фермент-субстратным комплексом) в соотношении 1 : 1:



Для начальной скорости ферментативной реакции (при $[S]_0, [\mathcal{E}]_0 \gg \gg [E]_0$) при установившихся равновесиях справедливо:

$$v = \frac{k_2 \frac{\alpha K_{\mathcal{E}} + \beta [\mathcal{E}]}{\alpha K_{\mathcal{E}} + [\mathcal{E}]} [E]_0 [S]_0}{\alpha K_s \frac{K_{\mathcal{E}} + [\mathcal{E}]}{\alpha K_{\mathcal{E}} + [\mathcal{E}]} + [S]_0} \quad (6.15)$$

В зависимости от численных значений множителей α и β эффектор \mathcal{E} может выступать в роли либо ингибитора (I), либо активатора (A, промотора) ферментативной реакции. Полный кинетический анализ и сводная таблица возможных частных случаев ингибирования и активации фермента в рамках схемы (6.14) даны в работе [6]. Некоторые частные случаи имеют особое значение и широко применяются для описания кинетики ферментативных процессов. К их числу относится полное конкурентное ингибирование, полное неконкурентное ингибирование, бесконкурентное ингибирование, простая активация и некоторые типы смешанного ингибирования и активации.

Полное конкурентное ингибирование ($\alpha \rightarrow \infty$, β не имеет определенного смысла). В случае полного конкурентного ингибирования начальная скорость ферментативной реакции определяется выражением

$$v = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0}{K_s \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + [S]_0} \quad (6.16)$$

и зависимость в координатах Лайнуивера — Бёрка имеет вид пучка прямых, пересекающихся на оси ординат (рис. 73). Константу конкурентного ингибирования K_i можно определить, зная величину

$$K_{m(\text{каж})} = K_s \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right), \quad (6.17)$$

если отложить экспериментальные данные в координатах ($K_{m(\text{каж})}$, [I]). Распространенным методом определения константы ингибирования является также так называемый метод Диксона, согласно которому

экспериментальные данные откладывают в координатах $(1/v, [I])$ (рис. 74).

Полное неконкурентное ингибирование ($\alpha = 1, \beta = 0$). В случае полного неконкурентного ингибирования выражение для начальной скорости ферментативной реакции имеет вид

$$v = \frac{\frac{k_2}{K_s + [S]_0} [E]_0 [S]_0}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \quad (6.18)$$

и зависимость в координатах Лайнуивера — Бёрка представляет собой пучок прямых, пересекающихся на оси абсцисс (рис. 75). Константу неконкурентного ингибирования можно определить, зная величину

$$k_{\text{кат}} = \frac{v_0 k_2}{K_s} \quad (6.19)$$

если представить экспериментальные данные в координатах $(1/k_{\text{кат}}, [I])$, или с помощью метода Диксона (аналогично как на рис. 74).

Бесконкурентное ингибирование ($\alpha = \beta < 1$). В случае бесконкурентного ингибирования значения констант $k_{\text{кат}}$ и $K_m(\text{каж})$ ферментативной реакции при увеличении концентрации эффектора уменьшаются,

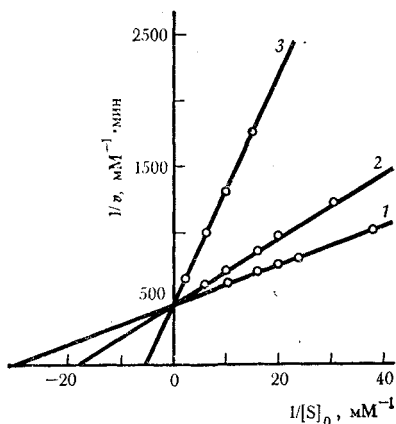


Рис. 73. Конкурентное ингибирование α -кетоглутаратом реакции окисления *N*-метил-*L*-глутамата, катализируемой *N*-метилглутаматдегидрогеназой [30], если концентрация ингибитора, *M*:

1 — 0; 2 — $6 \cdot 10^{-4}$; 3 — $3 \cdot 10^{-3}$

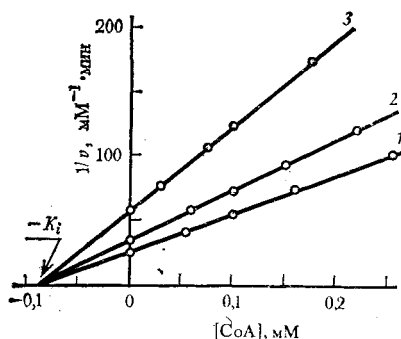


Рис. 74. Применение метода Диксона для определения константы конкурентного ингибирования коферментом А реакции фосфотрансацилирования, катализируемой фосфатацетилтрансферазой [31], если концентрация неорганического субстрата (фосфата), *мм*:

1 — 60; 2 — 40; 3 — 20

в одинаковой степени:

$$v = \frac{\alpha k_2 \frac{K_i + [I]}{\alpha K_i + [I]} [E]_0 [S]_0}{\alpha K_s \frac{K_i + [I]}{\alpha K_i + [I]} + [S]_0}, \quad (6.20)$$

так что график соответствующей зависимости в координатах Лайнуивера — Бёрка имеет вид семейства параллельных прямых. Для анализа уравнения (6.20) выражение для каталитической константы

$$k_{\text{кат}} = \alpha k_2 \frac{K_i + [I]}{\alpha K_i + [I]} \quad (6.21)$$

удобно преобразовать к следующему виду:

$$\frac{1}{\frac{k_{\text{кат}}}{k_2} - 1} = \frac{1}{\alpha - 1} + \frac{\alpha K_i}{\alpha - 1} \cdot \frac{1}{[I]}. \quad (6.22)$$

Из (6.22) видно, что с помощью графика, построенного в координатах $(1 / (\frac{k_{\text{кат}}}{k_2} - 1), 1/[I])$, можно отдельно найти значения α и K_i .

Неконкурентная активация ($\alpha = 1, \beta > 1$). В случае неконкурентной активации субстрат и активатор связываются независимо с активным центром, образуя тройной комплекс (фермент — субстрат — активатор), что приводит к увеличению скорости образования продукта. При этом начальная

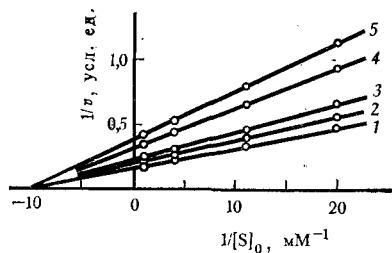


Рис. 75. Неконкурентное ингибирование бензоатом 1,2,5-триметилпептидола-4 реакции гидролиза бутирилхолина, катализируемой холинэстеразой [32], если концентрация ингибитора, М:
 1 — 0; 2 — $5 \cdot 10^{-6}$; 3 — $1 \cdot 10^{-5}$; 4 — $2 \cdot 10^{-5}$; 5 — $3 \cdot 10^{-5}$

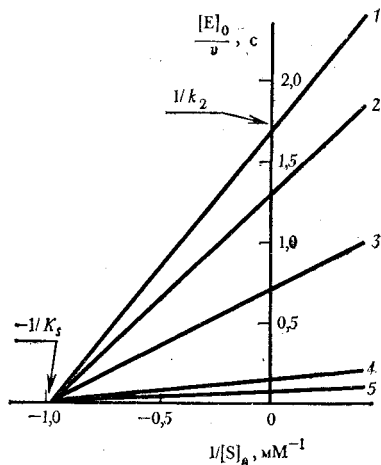


Рис. 76. Неконкурентная активация ионами Mg^{2+} гидролиза *n*-нитроанилида *L*-лейцина, катализируемого лейцинаминопептидазой [33], если концентрация активатора, М:
 1 — 0; 2 — $1 \cdot 10^{-4}$; 3 — $5 \cdot 10^{-4}$; 4 — $1 \cdot 10^{-2}$; 5 — $1 \cdot 10^{-1}$

скорость ферментативной реакции определяется следующим образом:

$$v = \frac{k_2 \frac{K_A + \beta [A]}{K_A + [A]} [E]_0 [S]}{K_S + [S]_0} \quad (6.23)$$

Зависимость (6.23) в координатах Лайнуивера — Бёрка имеет вид пучка прямых, пересекающихся на оси абсцисс (рис. 76). Константы β и K_A можно раздельно определить, если анализировать значения

$$k_{\text{кат}} = k_2 \frac{K_A + \beta [A]}{K_A + [A]} \quad (6.24)$$

в виде зависимости

$$\frac{1}{\frac{k_{\text{кат}}}{k_2} - 1} = \frac{1}{\beta - 1} + \frac{K_A}{\beta - 1} \cdot \frac{1}{[A]} \quad (6.25)$$

Для этого необходимо построить линейный график в координатах

$$\left[1 / \left(\frac{k_{\text{кат}}}{k_2} - 1 \right); 1/[A] \right].$$

Синергистическая активация ($\alpha < 1, \beta = 1$). В некоторых случаях добавление активатора не влияет на величину каталитической константы, но приводит к уменьшению кажущейся константы Михаэлиса ферментативной реакции (рис. 77). В применении к общему уравне-

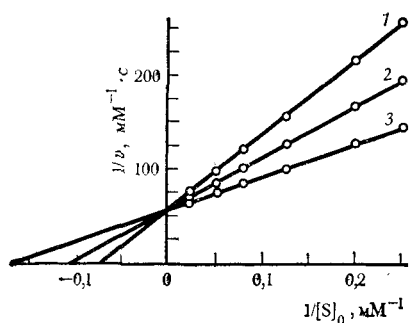


Рис. 77. Синергистическая активация профлавином гидролиза этилового эфира *N*-бензоил-*L*-аргинина, катализируемого папаином [34], если концентрация активатора, М:

1 — 0; 2 — $5 \cdot 10^{-3}$; 3 — $3 \cdot 10^{-4}$

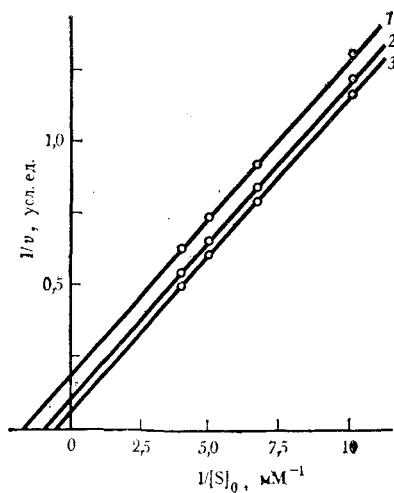
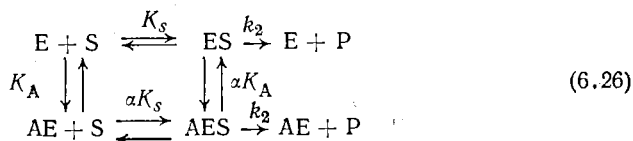


Рис. 78. Бесконкурентная активация мегирапоном ферментативной активности эпюксидгидразы в реакции со стирилоксидом [35], если концентрация активатора, М:

1 — 0; 2 — $2,5 \cdot 10^{-4}$; 3 — $2 \cdot 10^{-3}$

нию (6.15) это соответствует случаю активации, которую можно назвать синергистической, так как связывание активатора с активным центром фермента увеличивает сродство фермента к субстрату, и, наоборот, фермент-субстратный комплекс связывает активатор более эффективно по сравнению со свободным ферментом ($\alpha < 1$, $\beta = 1$). Таким образом, схему (6.14) в применении к данному случаю можно записать в виде



а уравнение скорости реакции

$$v = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0}{\alpha K_S \frac{K_A + [A]}{\alpha K_A + [A]} + [S]_0} \quad (6.27)$$

Для определения кинетических и равновесных параметров уравнения (6.27) выражение для кажущейся константы Михаэлиса

$$K_{m(\text{каж})} = \alpha K_S \frac{K_A + [A]}{\alpha K_A + [A]} \quad (6.28)$$

можно преобразовать к следующему виду:

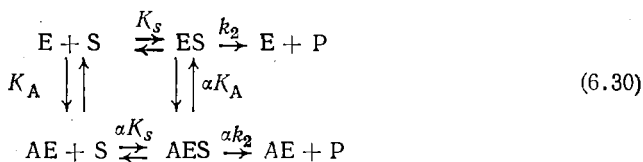
$$\frac{1}{1 - \frac{K_{m(\text{каж})}}{K_S}} = \frac{1}{1 - \alpha} + \frac{\alpha K_A}{1 - \alpha} \cdot \frac{1}{[A]} \quad (6.29)$$

Откладывая значения констант Михаэлиса, найденные экспериментально, в координатах уравнения (6.29), т. е.

$$\left[1 / \left(1 - \frac{K_{m(\text{каж})}}{K_S} \right), \quad 1/[A] \right],$$

можно найти значения констант α и K_A .

Бесконкурентная активация ($\alpha = \beta > 1$). В литературе описаны случаи, когда активатор увеличивает в одинаковой степени значения $k_{\text{кат}}$ и $K_{m(\text{каж})}$ (рис. 78). Подобный характер влияния фактора соответствует бесконкурентному типу активации, и ферментативная реакция в этом случае описывается следующей схемой:



где $\alpha > 1$. Уравнение скорости реакции (6.30) можно записать в виде

$$v = \frac{\alpha k_2 \frac{K_A + [A]}{\alpha K_A + [A]} [E]_0 [S]_0}{\alpha K_S \frac{K_A + [A]}{\alpha K_A + [A]} + [S]_0} \quad (6.31)$$

Для определения значений констант α и K_A выражение для каталитической константы в уравнении (6.31) можно преобразовать к виду

$$\frac{1}{\frac{k_{кат}}{k_2} - 1} = \frac{1}{\alpha - 1} + \frac{\alpha K_A}{\alpha - 1} \cdot \frac{1}{[A]} \quad (6.32)$$

и анализировать его в координатах $\left[1 / \left(\frac{k_{кат}}{k_2} - 1 \right), 1/[A] \right]$.

Смешанные типы ингибирования и активации ($\alpha \neq 1$, $\beta \neq 1$).

В случае смешанных типов ингибирования или активации графики в координатах Лайнуивера — Бёрка имеют вид пучка прямых, соответствующих различным концентрациям эффектора, и пересекающихся в общей точке в правом верхнем, левом верхнем или левом нижнем квадранте (в зависимости от численных значений α и β и соотношения между ними). Как следует из уравнения (6.15), координаты точки пересечения всегда следующие:

$$\frac{1}{[S]_0} = \frac{1}{K_S} \cdot \frac{\beta - 1}{\alpha - \beta}; \quad (6.33)$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha - \beta}. \quad (6.34)$$

Из выражений (6.33) и (6.34) видно, что положение точки, в которой происходит пересечение пучка прямых, соответствующих зависимости $1/v$ от $1/[S]_0$ при различных концентрациях эффектора, определяется лишь значениями констант α и β и не зависит от величины K_S (схема 6.14). Таким образом, вид графика в координатах Лайнуивера — Бёрка может быть использован для определения типа влияния эффектора на ферментативную реакцию и для оценки интервалов значений α и β (более подробно см. в [6]).

В качестве иллюстрации смешанных типов ингибирования и активации ферментативных реакций можно привести данные по влиянию добавок *n*-бутанола на скорость реакций гидролиза сложноэфирного (рис. 79, $\alpha = 0,27$, $\beta = 0$) и пептидного (рис. 80, $\alpha = 0,2$, $\beta = 2,3$) субстратов карбоксипептидазой В, а также так называемое антиконкурентное ($\beta = 0$, $K_i = \infty$, $\alpha K_i \neq \infty$) влияние эффектора на катализ ацетилхолинэстеразой (рис. 81).

Резюмируя, отметим, что наиболее рациональный, по мнению авторов, подход к анализу влияния эффекторов на кинетику ферментативного действия заключается в следующем. Уравнение (6.15) удобно записать в виде (6.8) с тем, чтобы эффективные величины V и K_m (каж) най-

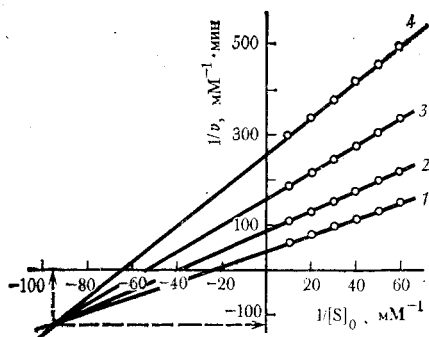


Рис. 79. Смешанный тип ингибирования *n*-бутанолом гидролиза гиппурового эфира *L*-аргинина, катализируемого карбоксипептидазой В [7], если концентрация ингибитора, М:

1 — 0; 2 — 0,05; 3 — 0,15; 4 — 0,30

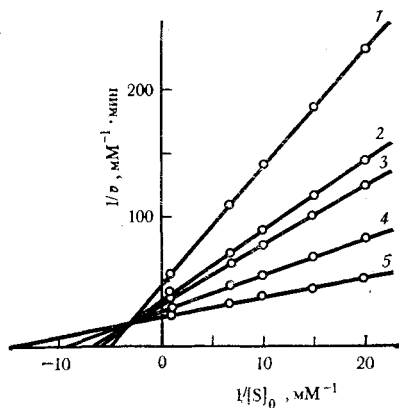
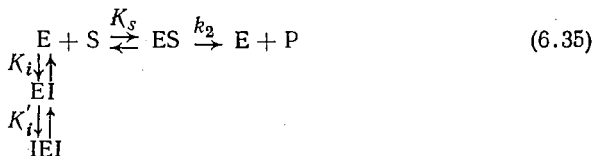


Рис. 80. Смешанная активация *n*-бутанолом гидролиза гиппурил-*L*-аргинина, катализируемого карбоксипептидазой В [7], если концентрация активатора, М:

1 — 0; 2 — 0,025; 3 — 0,04; 4 — 0,1; 5 — 0,33

ти по методу Лайнуивера — Бёрка, а затем **раздельно** анализировать функциональную зависимость этих параметров от концентрации эффектора (см. вышеприведенные случаи). С помощью такого подхода легко обнаружить и анализировать и более сложные случаи, когда, например, фермент и эффектор комплексуются в более высоких стехиометрических соотношениях, чем 1 : 1.

Связывание двух молекул конкурентного ингибитора с активным центром фермента. При связывании двух молекул конкурентного ингибитора с активным центром фермента (схема 6.35) зависимость $K_m(\text{каж})$ от $[I]$ нелинейна (квадратична) в отличие от простого конкурентного типа ингибирования (уравнение 6.17). Уравнение для скорости реакции



при установившихся равновесиях и $[S]_0, [I]_0 \gg [E]_0$ можно записать в следующем виде:

$$v = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0}{K_S \left(1 + \frac{[I]}{K_i} + \frac{[I]^2}{K_i K'_i} \right) + [S]_0} \quad (6.36)$$

если принять во внимание уравнение материального баланса по ферменту

$$[E]_0 = [E] + [ES] + [EI] + [IEI] \quad (6.37)$$

и выражения для констант диссоциации соответствующих комплексов:

$$\left. \begin{aligned} K_s &= \frac{[E][S]}{[ES]} ; \\ K_i &= \frac{[E][I]}{[EI]} ; \\ K'_i &= \frac{[EI][I]}{[IEI]} . \end{aligned} \right\} \quad (6.38)$$

Преобразуя выражение для кажущейся константы Михаэлиса, получим

$$\frac{1}{[I]} \left(\frac{K_m(\text{каж})}{K_s} - 1 \right) = \frac{1}{K_i} + \frac{[I]}{K_i K'_i} . \quad (6.39)$$

Откладывая экспериментальные данные в координатах

$$\left[\frac{1}{[I]} \left(\frac{K_m(\text{каж})}{K_s} - 1 \right), [I] \right],$$

приходим к прямолинейной зависимости, которая отсекает на оси ординат и абсцисс отрезки, равные $1/K_i$ и $-K'_i$ соответственно (рис. 82,а).

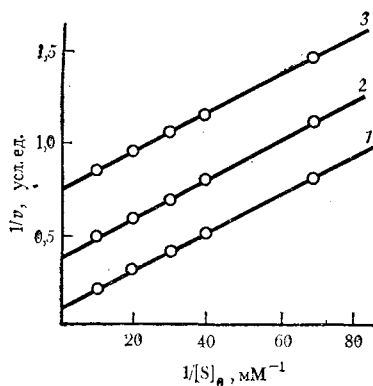


Рис. 81. Антиккурентное влияние метионида-2-пиридинкарбальдоксима на кинетику гидролиза 1-нафтилацетата, катализируемого ацетилхолинэстеразой [34], если концентрация ингибитора, М:
1 — 0; 2 — $1,04 \cdot 10^{-7}$; 3 — $2,56 \cdot 10^{-7}$

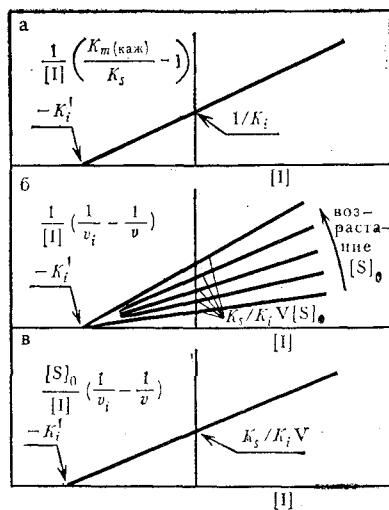


Рис. 82. Графические способы определения констант ингибирования ферментативной реакции в случае связывания с активным центром фермента двух молекул конкурентного ингибитора (схема 6.35)

Анализ кинетики ферментативной реакции (6.35) может быть проведен также следующим образом. Из уравнения (6.36) следует выражение

$$\frac{1}{v_i} - \frac{1}{v} = \frac{K_s}{V[S]_0} \left(\frac{[I]}{K_i} + \frac{[I]^2}{K_i K_i'} \right) \quad (6.40)$$

и далее

$$\frac{1}{[I]} \left(\frac{1}{v_i} - \frac{1}{v} \right) = \frac{K_s}{K_i V[S]_0} \left(1 + \frac{[I]}{K_i'} \right), \quad (6.41)$$

где v_i, v — скорости, измеренные на опыте в присутствии и, соответственно, в отсутствие ингибитора. В случае справедливости схемы (6.35) построение экспериментальных данных в координатах

$$\left[\frac{1}{[I]} \left(\frac{1}{v_i} - \frac{1}{v} \right), [I] \right]$$

должно приводить к пучку прямых, соответствующих различным начальным концентрациям субстрата, пересекающихся на оси абсцисс в точке $-K_i'$ и имеющих тангенс угла наклона, равный $K_s/K_i V[S]_0$ (рис. 82,б).

Наконец, выражение (6.41) можно записать в виде

$$\frac{[S]_0}{[I]} \left(\frac{1}{v_i} - \frac{1}{v} \right) = \frac{K_s}{K_i V} \left(1 + \frac{[I]}{K_i'} \right). \quad (6.42)$$

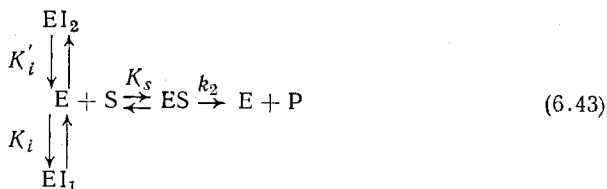
Из (6.42) видно, что построение экспериментальных данных в координатах $\left[\frac{[S]_0}{[I]} \left(\frac{1}{v_i} - \frac{1}{v} \right), [I] \right]$ приводит к единственной прямой, пересекающей ось абсцисс в точке $-K_i'$, и ось ординат — в точке $K_s/K_i V$ (рис. 82,в).

§ 3. Кинетический метод двухкомпонентного обратимого ингибирования ферментативных реакций

Важную информацию о строении активного центра фермента можно получить с помощью метода двухкомпонентного обратимого ингибирования [8]. Для этого необходимо ввести понятие о взаимонезависимых и взаимозависимых ингибиторах. По определению, взаимонезависимые ингибиторы могут одновременно (и независимо) связываться с активным центром фермента, в то время как для взаимозависимых ингибиторов это исключено.

Влияние взаимозависимых конкурентных ингибиторов на кинетические параметры ферментативной реакции. Схема двухстадийной

ферментативной реакции в присутствии двух взаимозависимых конкурентных ингибиторов (I_1 и I_2) выглядит следующим образом:



Анализ схемы (6.43), если проводить его обычным способом [по методу установившегося равновесия или по методу стационарных концентраций при $[S]_0, [I_1]_0, [I_2]_0 \gg [E]_0$ (см. § 1 этой главы)], приводит к выражению (6.8) для начальной скорости ферментативной реакции, где

$$k_{\text{кат}} = k_2, \quad (6.44)$$

$$K_m(\text{каж}) = K_s \left(1 + \frac{[I_1]}{K_i} + \frac{[I_2]}{K'_i} \right). \quad (6.45)$$

Графически зависимость (6.45) можно представить в координатах ($K_m(\text{каж}), [I_1]$) прямой линией (при $[I_2] = \text{const}$), тангенс угла наклона которой равен отношению K_s/K_i , а отрезок, отсекаемый на оси ординат, равен $K_s \left(1 + \frac{[I_2]}{K'_i} \right)$ (рис. 83). Таким образом, зная K_s из опытов, проведенных в отсутствие ингибиторов, можно определить величины констант K_i и K'_i .

Влияние взаимонезависимых конкурентных ингибиторов на кинетические параметры ферментативной реакции. Влияние двух взаимонезависимых конкурентных ингибиторов на двухстадийную ферментатив-

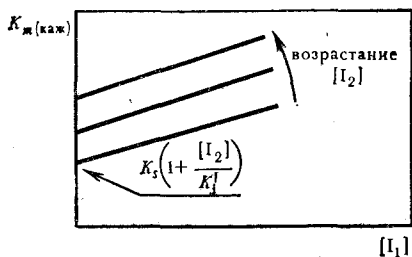


Рис. 83. Зависимость кажущейся константы Михаэлиса от концентрации ингибитора I_1 (при $[I_2] = \text{const}$) в присутствии двух взаимозависимых конкурентных ингибиторов

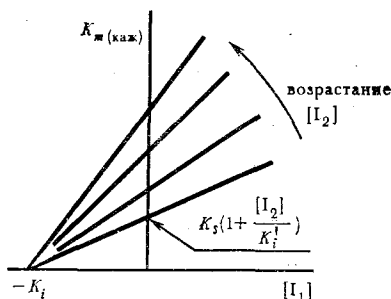
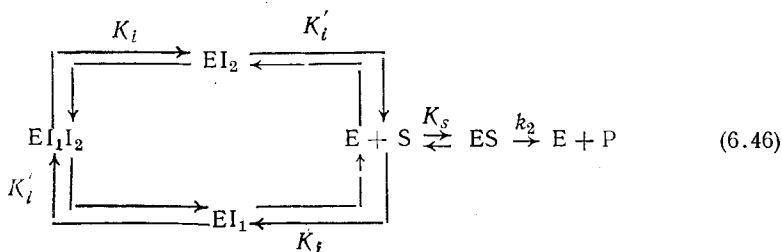


Рис. 84. Зависимость кажущейся константы Михаэлиса от концентрации ингибитора I_1 (при $[I_2] = \text{const}$) в присутствии двух взаимонезависимых конкурентных ингибиторов

нью реакцию можно записать в виде следующей схемы:



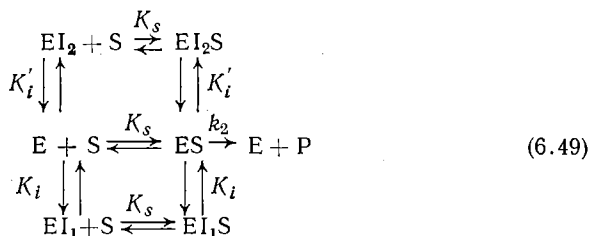
Анализ (6.46) приводит к выражениям для кинетических параметров ферментативной реакции:

$$k_{\text{кат}} = k_2; \quad (6.47)$$

$$K_m (\text{каж}) = K_s \left(1 + \frac{[I_1]}{K_i} \right) \left(1 + \frac{[I_2]}{K_i'} \right). \quad (6.48)$$

Значения констант K_i и K_i' можно определить с помощью построения зависимости (6.48) в координатах $(K_m (\text{каж}), [I_1])$, как и в случае анализа действия взаимозависимых конкурентных ингибиторов (рис. 84). Однако в данном случае не только отрезок, отсекаемый на оси ординат, но и тангенс угла наклона, равный $\frac{K_s}{K_i} \left(1 + \frac{[I_2]}{K_i'} \right)$, зависят от концентрации второго ингибитора $[I_2]$. Значение K_s может быть найдено из опытов, проведенных в отсутствие ингибиторов, и тогда величины K_i и K_i' могут быть найдены из отрезков, отсекаемых на координатных осях (рис. 84).

Влияние взаимозависимых неконкурентных ингибиторов на кинетические параметры ферментативной реакции. Кинетические параметры, характеризующие скорость реакции



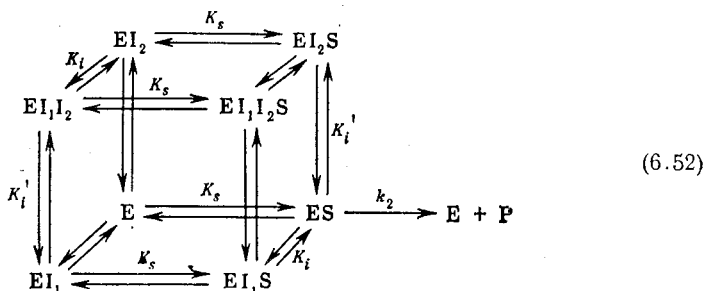
при установившихся равновесиях и $[S]_0, [I_1]_0, [I_2]_0 \gg [E]_0$, следует записать так:

$$k_{\text{кат}} = \frac{k_2}{1 + \frac{[I_1]}{K_i} + \frac{[I_2]}{K_i'}}; \quad (6.50)$$

$$K_m (\text{каж}) = K_s. \quad (6.51)$$

Графический анализ (6.50) удобно проводить в координатах $(1/k_{\text{кат}}, [I_1])$, как это было сделано для (6.45). В этом случае из графика, аналогичного рис. 83, можно найти численные значения констант K_i и K_i' .

Влияние взаимонезависимых неконкурентных ингибиторов на кинетические параметры ферментативной реакции. В присутствии двух взаимонезависимых неконкурентных ингибиторов схема двухстадийной ферментативной реакции принимает вид



Проводя кинетический анализ (6.52) обычным способом (методом установившихся равновесий при $[S]_0, [I_1]_0, [I_2]_0 \gg [E]_0$), кинетические параметры ферментативной реакции можно записать следующим образом:

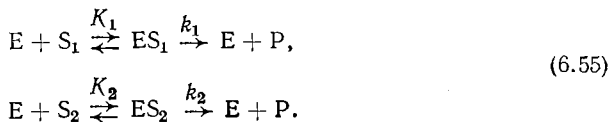
$$k_{\text{кат}} = \frac{k_2}{\left(1 + \frac{[I_1]}{K_i}\right) \left(1 + \frac{[I_2]}{K_i'}\right)}; \quad (6.53)$$

$$K_m (\text{каж}) = K_s. \quad (6.54)$$

Значения K_i и K_i' в этом случае можно вычислить, анализируя (6.53) в координатах $(1/k_{\text{кат}}, [I_1])$ подобно анализу зависимости (6.48) (рис. 84).

§ 4. Реакция двух субстратов с одним ферментом

Реакцию двух конкурирующих субстратов с одним ферментом (не образующих смешанный тройной комплекс) можно записать в следующем виде:



Если регистрировать общий продукт, образующийся при одновременном протекании реакций (6.55), начальная общая скорость ферментативной реакции при установившихся равновесиях и $[S_1]_0, [S_2]_0 \gg \gg [E]_0$ дана уравнением

$$v_{\text{общ}} = \frac{\frac{V_1}{K_1} [S_1]_0 + \frac{V_2}{K_2} [S_2]_0}{1 + \frac{[S_1]_0}{K_1} + \frac{[S_2]_0}{K_2}}, \quad (6.56)$$

где $V_1 = k_1[E]_0$ и $V_2 = k_2[E]_0$. При постоянном отношении начальных концентраций обоих субстратов $[S_2]_0/[S_1]_0 = \alpha$ уравнение (6.56) принимает вид уравнения Михаэлиса — Ментен (6.8), где:

$$V = \frac{K_2 V_1 + K_1 V_2 \alpha}{\alpha K_1 + K_2}; \quad (6.57)$$

$$K_{m(\text{каж})} = \frac{K_1 K_2}{\alpha K_1 + K_2}, \quad (6.58)$$

и, следовательно, его можно преобразовать к линейному виду в координатах Лайнуивера — Бёрка. Прямые, соответствующие разным значениям α , образуют пучок с общей точкой пересечения. Иными словами, положение точки пересечения в координатах $(1/v_{\text{общ}}, 1/[S_1]_0)$ не зависит от величины α и определяется следующими значениями абсциссы и ординаты (рис. 85):

$$\frac{1}{[S_1]_0} = \frac{V_1 - V_2}{K_1 V_2}; \quad (6.59)$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_2} \quad (6.60)$$

Таким образом, значение V_2 равно обратному значению ординаты точки пересечения. Константы равновесия K_1 и K_2 можно найти, анализируя зависимость $K_{m(\text{каж})}$ от α в рамках линейного уравнения

$$\frac{1}{K_{m(\text{каж})}} = \frac{\alpha}{K_2} + \frac{1}{K_1}, \quad (6.61)$$

и, наконец, V_1 можно вычислить из абсциссы точки пересечения (уравнение 6.59) или из величины V (уравнение 6.57). На справедливость схемы (6.55) в условиях опыта указывает совпадение найденных значений с данными, полученными для реакции в отсутствие второго субстрата.

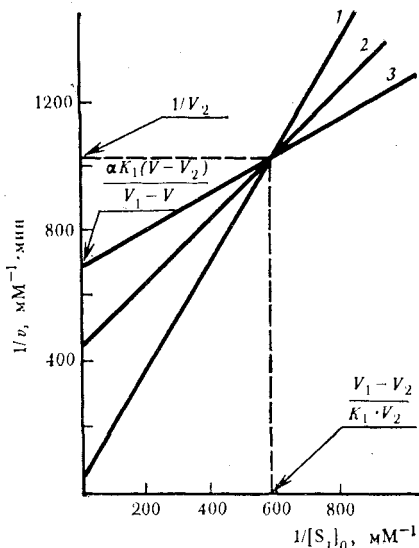
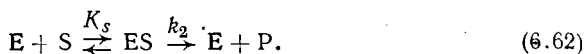


Рис. 85. График в координатах Лайнуивера — Бёрка для реакции двух конкурирующих субстратов (5 α -андростан-3,16-дион и 5 α -андростан-3-он) с одним ферментом — кортизонредуктазой (схема 6.55) [41], если отношение концентраций второго субстрата к первому равно:

1 — 0; 2 — 10; 3 — 30

§ 5. Кинетика ферментативных реакций при условии $[E]_0 \geq [S]_0$

Определение абсолютной концентрации активных центров фермента из кинетических данных. В предыдущих разделах была рассмотрена кинетика ферментативных реакций в условиях избытка субстрата по сравнению с ферментом ($[S]_0 \gg [E]_0$). Рассмотрим теперь случай, когда концентрация субстрата сравнима по величине с концентрацией фермента ($[S]_0 \sim [E]_0$), и выведем уравнение для скорости ферментативной реакции, протекающей по двухстадийному механизму при условии быстрого установления равновесия на стадии образования фермент-субстратного комплекса:



Особенность кинетического анализа схемы (6.62) в случае $[E]_0 \sim [S]_0$ заключается в том, что необходимо учесть уравнение материального баланса как по ферменту (6.63), так и по субстрату (6.64), отчего подобные системы называют иногда «системами со взаимным истощением» [12]:

$$[E]_0 = [E] + [ES], \quad (6.63)$$

$$[S]_0 = [S] + [ES]. \quad (6.64)$$

В условиях установившегося равновесия, когда

$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]}, \quad (6.65)$$

из уравнений (6.63)—(6.65) следует

$$[E] = \frac{K_s [E]_0}{K_s + [S]} \quad (6.66)$$

и, соответственно,

$$[S]_0 = [S] + \frac{[E]_0 [S]}{K_s + [S]}. \quad (6.67)$$

Выражение (6.67) можно записать в виде квадратного уравнения

$$[S]^2 + \alpha [S] - K_s [S]_0 = 0, \quad (6.68)$$

где

$$\alpha = K_s + [E]_0 - [S]_0. \quad (6.69)$$

Решая уравнение (6.68), получим

$$[S] = \frac{-\alpha + \sqrt{\alpha^2 + 4K_s [S]_0}}{2}. \quad (6.70)$$

Подставляя значение равновесной концентрации $[S]$ в выражение (6.66), найдем значение равновесной концентрации $[E]$:

$$[E] = \frac{K_s [E]_0}{K_s + \frac{\sqrt{\alpha^2 + 4K_s [S]_0} - \alpha}{2}} \quad (6.71)$$

и тогда общее выражение для скорости ферментативной реакции

$$v = k_2 [ES] = \frac{k_2}{K_s} [E] [S]$$

можно записать так:

$$v = \frac{V (\sqrt{\alpha^2 + 4K_s [S]_0} - \alpha)}{2K_s - \alpha + \sqrt{\alpha^2 + 4K_s [S]_0}}, \quad (6.72)$$

где $V = k_2 [E]_0$. Приводя далее выражение (6.72) к виду

$$\frac{1}{v} = \frac{2K_s}{V (\sqrt{\alpha^2 + 4K_s [S]_0} - \alpha)} + \frac{1}{V} \quad (6.73)$$

и вводя равенство

$$\frac{\sqrt{\alpha^2 + 4K_s [S]_0} - \alpha}{2K_s} = \lambda, \quad (6.74)$$

получим соотношение

$$\frac{1}{\frac{V}{v} - 1} = \lambda. \quad (6.75)$$

Из последней формулы видно, что каждому значению скорости реакции v соответствует определенное значение λ . Таким образом, ряд значений λ , соответствующих ряду значений $[S]_0$, может быть вычислен непосредственно из кинетических данных, если предварительно на опыте будет найдено значение максимальной скорости реакции. Тогда, записав равенство (6.74) в виде

$$2\lambda K_s + \alpha = \sqrt{\alpha^2 + 4K_s [S]_0}, \quad (6.76)$$

возведя обе части его в квадрат и подставив значение α из (6.69), получим выражение

$$\lambda^2 K_s + \lambda (K_s + [E]_0 - [S]_0) - [S]_0 = 0. \quad (6.77)$$

Преобразуя уравнение (6.77):

$$\lambda K_s (1 + \lambda) + \lambda [E]_0 = [S]_0 (1 + \lambda) \quad (6.78)$$

и разделив обе части уравнения (6.78) на $\lambda [E]_0 (1 + \lambda)$, придем к окончательному выражению:

$$\frac{1}{1 + \lambda} = \frac{[S]_0}{\lambda [E]_0} - \frac{K_s}{[E]_0}. \quad (6.79)$$

Зависимость (6.79) в координатах $\left(\frac{1}{1 + \lambda}, \frac{[S]_0}{\lambda}\right)$ — прямая линия с

абсциссой точки пересечения, равной K_s , и тангенсом угла наклона, равным $1/[E]_0$. Таким образом, изучение зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата в условиях $[E]_0 \sim [S]_0$ позволяет определить абсолютную концентрацию активных центров фермента. Так как выражения (6.63)—(6.79) симметричны относительно концентраций фермента и субстрата, можно определить также и абсолютную концентрацию субстрата, если анализировать экспериментальные данные в координатах $\left(\frac{1}{1+\lambda}, \frac{[E]_0}{\lambda}\right)$ при фиксированной концентрации субстрата, пользуясь уравнением

$$\frac{1}{1+\lambda} = \frac{[E]_0}{\lambda[S]_0} - \frac{K_s}{[S]_0}, \quad (6.80)$$

где величина V , входящая в величину λ (уравнение 6.75), равна $k_2[S]_0$. Независимое от навески определение абсолютной концентрации субстрата, вводимой в реакцию, может оказаться необходимым при использовании природных гетерогенных субстратов, таких как целлюлоза, клеточные стенки и т. п.

Графические построения экспериментальных данных в координатах уравнения (6.80) представлены на рис. 86.

Кинетика ферментативных реакций при избытке фермента $[E]_0 \gg [S]_0$. В отдельных случаях кинетические исследования ферментативных реакций удобно проводить в условиях избытка фермента по сравнению с субстратом (например, при малой растворимости субстрата в воде или при высокой молекулярной массе субстрата). В условиях $[E]_0 \gg [S]_0$ выражение для начальной скорости ферментативной реакции, протекающей в режиме установившегося равновесия, является

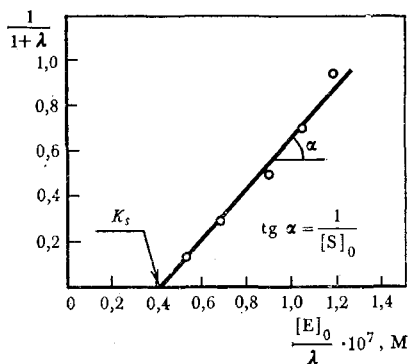


Рис. 86. Определение абсолютной концентрации субстрата с помощью уравнения (6.80) в реакции гидролиза бактериальных клеток *Micrococcus lysodeikticus* под действием лизоцима в условиях $[E]_0 \sim [S]_0$ (по данным А. А. Клёсова и М. Л. Рабиновича)

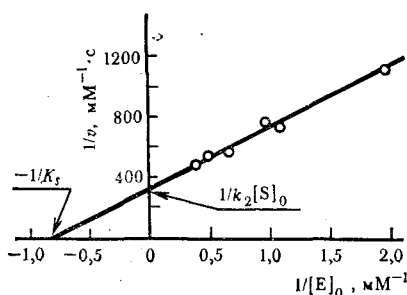


Рис. 87. Определение кинетических параметров гидролиза *n*-нитроанилида *N*-ацетил-*L*-тирозина, катализируемого α -химотрипсином в условиях избытка фермента [42]

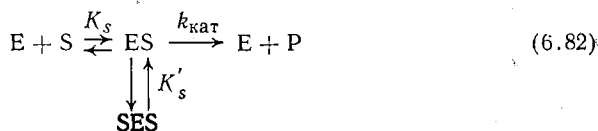
ся симметричным классическому уравнению Михаэлиса—Ментен (6.4) относительно концентраций реагентов. Так, при избытке фермента скорость реакции имеет первый порядок по концентрации субстрата, и смешанный — по концентрации фермента:

$$v = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0}{K_s + [E]_0} \quad (6.81)$$

В качестве иллюстрации приведем в координатах Лайнуивера — Бёрка данные для гидролиза *n*-нитроанилида *N*-ацетил-*L*-тирозина, катализируемого α -химотрипсином (рис. 87).

§ 6. Кинетический анализ ферментативных реакций, не подчиняющихся уравнению Михаэлиса — Ментен

Ингибирование субстратом. Согласно уравнению Михаэлиса — Ментен (6.8), при увеличении концентрации субстрата начальная скорость ферментативной реакции гиперболически возрастает, стремясь к своему предельному значению. Однако в ряде случаев при увеличении концентрации субстрата начальная скорость ферментативной реакции проходит через максимум и затем уменьшается (рис. 88). Обычно подобный тип зависимости v от $[S]_0$ можно количественно описать исходя из предположения об образовании тройного комплекса SES, не обладающего ферментативной активностью:



Анализ (6.82) при установившихся равновесиях и $[S]_0 \gg [E]_0$ приводит к следующему уравнению для начальной скорости ферментативной реакции:

$$v = \frac{k_{кат} [E]_0 [S]_0}{K_s + [S]_0 + \frac{[S]_0^2}{K'_s}} \quad (6.83)$$

Анализ данного уравнения целесообразно проводить отдельно при низких ($[S]_0^2 \ll K'_s$) и высоких ($[S]_0 \gg K'_s$) концентрациях субстрата. В первом случае уравнение (6.83) принимает вид классического уравнения Михаэлиса — Ментен:

$$v = \frac{k_{кат} [E]_0 [S]_0}{K_s + [S]_0} \quad (6.84)$$

Значения $k_{кат}$ и K_s можно найти, если представить эксперименталь-

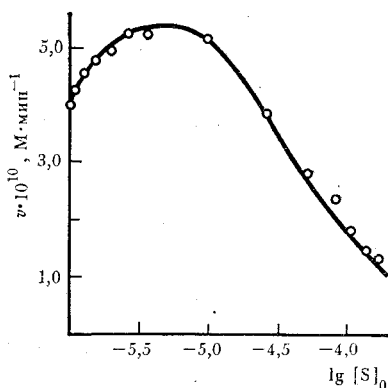


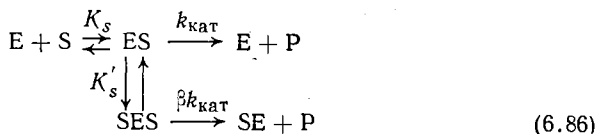
Рис. 88. Ингибирование субстратом в реакции трансметилирования, катализируемой фенилэтанолами-*N*-метилтрансферазой [37]

ные данные, например, в координатах Лайнуивера — Бёрка (см. § 1 этой главы). При высоких концентрациях субстрата уравнение (6.83) также упрощается:

$$v = \frac{k_{\text{кат}} [E]_0}{1 + \frac{[S]_0}{K_s'}} \quad (6.85)$$

и позволяет найти из экспериментальных данных в координатах $(1/v, [S]_0)$ значения $k_{\text{кат}}$ и K_s' (рис. 89). Совпадение значений $k_{\text{кат}}$, найденных при низких (уравнение 6.84) и высоких (уравнение 6.85) концентрациях субстрата, является доказательством применимости схемы (6.82) для формального описания кинетики изучаемой ферментативной реакции.

Ингибирование субстратом при высоких его концентрациях также будет наблюдаться, если тройной комплекс SES сохраняет активность, но меньшую по сравнению с фермент-субстратным комплексом ($\beta < 1$):



В этом случае начальную скорость ферментативной реакции при установившихся равновесиях и $[S]_0 \gg [E]_0$ описывает уравнение

$$v = \frac{\left(k_{\text{кат}} + \frac{\beta k_{\text{кат}} [S]_0}{K_s'}\right) [E]_0 [S]_0}{K_s + [S]_0 + \frac{[S]_0^2}{K_s'}} \quad (6.87)$$

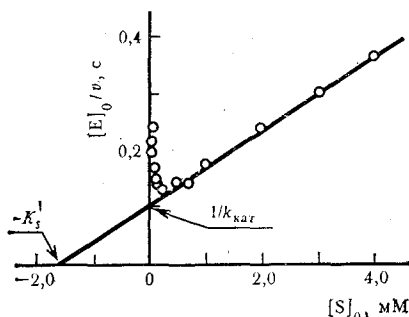


Рис. 89. Определение константы диссоциации неактивного тройного комплекса SES (схема 6.82) в реакции гидролиза *n*-нитроанилида *N*-бензоил-*L*-аргинина, катализируемой ферментом микробного происхождения [38]

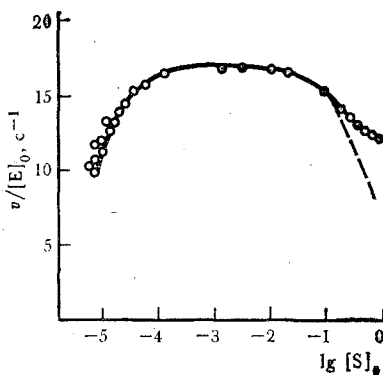


Рис. 90. Ингибирование субстратом в реакции гидролиза бензилпенициллина, катализируемой пенициллинамидазой:

пунктирная линия — правая ветвь теоретической кривой зависимости скорости ферментативной реакции (6.86) от концентрации субстрата при условии $\beta = 0$ (по данным А. А. Клёсова и В. К. Швадаса)

Для того чтобы определить на опыте, обладает ли ферментативной активностью тройной комплекс SES, следует построить зависимость экспериментально найденных значений скорости в координатах (v , $\lg[S]_0$). Симметричный вид полученной колоколообразной кривой указывает на отсутствие ферментативной активности комплекса SES. Если же правая ветвь графика (при больших концентрациях субстрата) более пологая по сравнению с левой ветвью (рис. 90), это указывает на величину β , отличную от нуля ($0 < \beta < 1$).

Для более подробного анализа этого случая уравнение (6.87) при высоких концентрациях субстрата удобно записать в следующем виде:

$$k_{эфф} = k_{кат} \frac{1 + \frac{\beta [S]_0}{K'_s}}{1 + \frac{[S]_0}{K'_s}}, \quad (6.88)$$

где $k_{эфф} = v/[E]_0$. Преобразованием выражения (6.88) получим

$$\frac{1}{1 - \frac{k_{эфф}}{k_{кат}}} = \frac{1}{1 - \beta} + \frac{K'_s}{1 - \beta} \cdot \frac{1}{[S]_0}. \quad (6.89)$$

Из последнего уравнения видно, что зависимость в координатах $\left[1 / \left(1 - \frac{k_{эфф}}{k_{кат}} \right), 1/[S]_0 \right]$ при высоких концентрациях субстрата должна иметь вид прямой, из тангенса угла наклона которой и ординаты точки пересечения можно найти значения β и K'_s (рис.91).

Существуют виды ингибирования, наблюдаемого при высоких концентрациях субстрата, когда в результате присоединения к фермент-

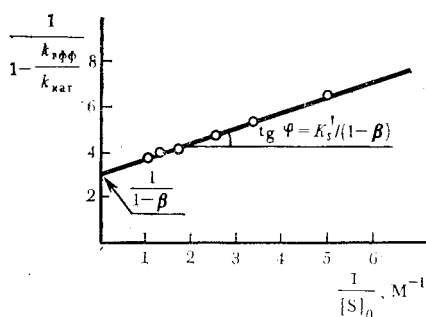


Рис. 91. Анализ с помощью уравнения (6.89) кинетических данных по неполному ингибированию субстратом в реакции гидролиза бензилпенициллина, катализируемой пенициллинамидазой (по данным А. А. Клёсова и В. К. Швадаса)

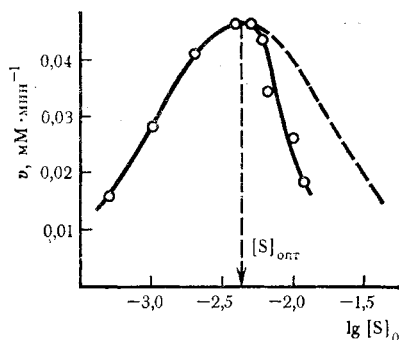
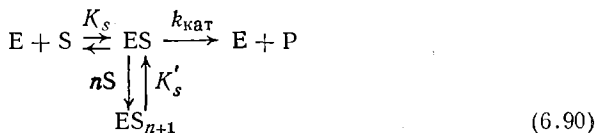


Рис. 92. Ингибирование субстратом гидролиза монофенилфосфата, катализируемого щелочной фосфатазой: пунктирная кривая соответствует теоретической при условии образования неактивного фермент-субстратного комплекса состава ES_2 (построено по данным [9])

субстратному комплексу нескольких молекул субстрата происходит его инактивация. Указанием на это является несимметричный вид кривой в координатах ($v, \lg[S]_0$), правая часть которой (соответствующая более высоким концентрациям субстрата) более крутая по сравнению с левой ветвью (рис. 92). Для анализа подобных случаев разработан графический способ [9], позволяющий определить число молекул субстрата в неактивном фермент-субстратном комплексе (схема 6.90):



Предположим, что присоединение **дополнительных** молекул субстрата к фермент-субстратному комплексу происходит независимо друг от друга и что связывание всех n дополнительных молекул субстрата характеризуется одинаковыми константами равновесия K'_s . В этом случае уравнение для начальной скорости ферментативной реакции, протекающей в режиме установившегося равновесия, при $[S]_0 \gg [E]_0$ имеет следующий вид:

$$v = \frac{V[S]_0}{K_s + [S]_0 + \frac{[S]_0^{n+1}}{K'_s}} \quad (6.91)$$

Дифференцируя уравнение (6.91) по начальной концентрации субстрата и приравнявая полученное выражение нулю, получим соотношение, связывающее величину оптимальной концентрации субстрата (соответствующей максимуму кривой в координатах $v, \lg[S]_0$) с параметрами схемы (6.90):

$$[S]_{\text{опт}} = \sqrt[n+1]{\frac{K_s K'_s}{n}} \quad (6.92)$$

Преобразуя далее уравнение (6.91):

$$\frac{1}{v} = \frac{K_s}{V[S]_0} + \frac{1}{V} + \frac{[S]_0^n}{VK'_s} \quad (6.93)$$

получим

$$\frac{1}{[S]_0} + \frac{[S]_0^n}{K_s K'_s} = \frac{V}{K_s} \cdot \frac{1}{v} - \frac{1}{K_s} \quad (6.94)$$

Находя с помощью графика в координатах ($v, \lg[S]_0$) и соотношения (6.92) ряд произведений $K_s K'_s$, соответствующих различным значениям n , и анализируя экспериментальные данные в координатах

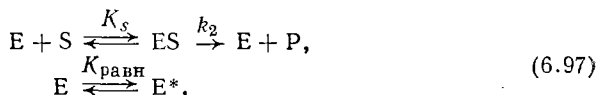
$\left(\frac{1}{[S]_0} + \frac{[S]_0^n}{K_s K'_s}, \frac{1}{v} \right)$, следует подобрать значение n так, чтобы получить прямую (см. выражение 6.94).

$\beta > 1$ (схема 6.95) кинетические данные, соответствующие высоким концентрациям субстрата, удобно анализировать в координатах $\left[1 / \left(\frac{k_{\text{эфф}}}{k_{\text{кат}}} - 1 \right), 1/[S]_0 \right]$. Полученная при этом прямая

$$\frac{1}{\frac{k_{\text{эфф}}}{k_{\text{кат}}} - 1} = \frac{1}{\beta - 1} + \frac{K'_s}{\beta - 1} \cdot \frac{1}{[S]_0} \quad (6.96)$$

отсекает на оси ординат отрезок, равный $1/(\beta - 1)$, и образует тангенс угла наклона, равный $K'_s/(\beta - 1)$ (рис. 94).

Изомеризация фермента в ходе реакции. Отклонения от зависимости Михаэлиса могут быть обусловлены также и тем, что фермент обратимо изомеризуется с образованием неактивного конформера (E^*):



а субстрат, комплексуюсь с ферментом, хотя бы частично препятствует изомеризации. Рассмотрим случай (6.97), когда изомеризация в фермент-субстратном комплексе отсутствует полностью. Начальная скорость ферментативной реакции (6.97) при установившихся равновесиях и $[S]_0 \gg [E]_0$ дается следующим уравнением:

$$v = \frac{V [S]_0}{K_s + [S]_0} \cdot \frac{1 + \frac{[S]_0}{K_s}}{1 + \frac{[S]_0}{K_s} + K_{\text{равн}}}, \quad (6.98)$$

где $V = k_2[E]_0$. При высоких концентрациях субстрата, когда выполняется неравенство $1 + [S]_0/K_s \gg K_{\text{равн}}$, уравнение (6.98) упрощается и принимает вид обычного уравнения Михаэлиса — Ментен. В области низких концентраций субстрата ($[S]_0 \ll K_s$) скорость ферментативной реакции линейно зависит от $[S]_0$:

$$v = \frac{1}{1 + K_{\text{равн}}} \cdot \frac{V [S]_0}{K_s} \quad (6.99)$$

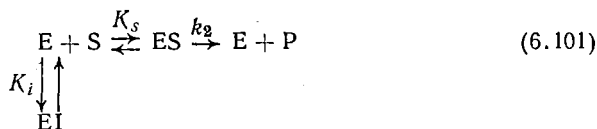
или

$$\frac{1}{v} = (1 + K_{\text{равн}}) \frac{K_s}{V [S]_0}. \quad (6.100)$$

Из последнего выражения видно, что график в координатах $(1/v, 1/[S]_0)$ позволяет найти значение константы равновесия обратимой изомеризации фермента $K_{\text{равн}}$, если в опытах при высокой концентрации субстрата предварительно найти величины V и K_s .

В качестве примера можно указать, что схемой (6.97) и соответствующим уравнением скорости (6.98) можно описать кинетику гидролиза *n*-нитроанилида *L*-аланина, катализируемого аминопептидазой М [10].

Влияние примеси конкурентного ингибитора в препарате фермента.
 Если в препарате фермента содержится примесь конкурентного ингибитора, то схему ферментативной реакции при равновесных условиях образования комплексов фермент — субстрат и фермент — ингибитор следует записать в виде



Особенность кинетического анализа данного случая заключается в том, что при сравнимых по величине значениях молярных концентраций фермента и ингибитора необходимо использовать соответствующие уравнения материального баланса:

$$[I]_0 = [I] + [EI] \quad (6.102)$$

$$[E]_0 = [E] + [ES] + [EI] \quad (6.103)$$

где отношение исходных концентраций $[I]_0/[E]_0 = R$ — постоянная величина в условиях эксперимента. Последнее уравнение удобно записать в другом виде, полагая, что в условиях опыта $[S]_0 \gg [E]_0$, и используя для подстановки уравнение (6.102) и два уравнения для констант диссоциации фермент-субстратного ($K_s = [E][S]_0/[ES]$) и фермент-ингибиторного ($K_i = [E][I]/[EI]$) комплексов:

$$[E]_0 = [E] + \frac{[E][S]_0}{K_s} + \frac{R[E][E]_0}{K_i + [E]} \quad (6.104)$$

Подстановка $[E]$ из выражения для скорости реакции ($v = k_2[ES] = (k_2/K_s)[E][S]_0$) в (6.104) приводит к уравнению

$$\begin{aligned}
 K_s(K_s + [S]_0)v_2 + k_2[S]_0\{K_i(K_s + [S]_0) + K_s[E]_0(R-1)\}v - \\
 - k_2^2 K_i [S]_0^2 [E]_0 = 0,
 \end{aligned} \quad (6.105)$$

которое при постоянной величине $[S]_0$ характеризует зависимость между скоростью ферментативной реакции и начальной концентрацией фермента, содержащего примесь конкурентного ингибитора [11]. Произведя разложение левой части полученного уравнения на множители, запишем его в виде

$$\begin{aligned}
 \left\{v - \frac{K_i k_2 [S]_0}{K_s (R-1)}\right\} \left\{v + \frac{k_2 [S]_0 [E]_0 (R-1)}{K_s + [S]_0} + \frac{k_2 [S]_0 K_i R}{K_s (R-1)}\right\} = \\
 = \frac{k_2^2 [S]_0^2 K_i^2 R}{K_s^2 (R-1)^2}.
 \end{aligned} \quad (6.106)$$

График зависимости (6.106) в координатах ($v, [E]_0$) представляет собой гиперболу (при $R \neq 1$), асимптоты которой равны:

$$v = \frac{K_i k_2 [S]_0}{K_s (R-1)} \quad (6.107)$$

и

$$v = - \frac{k_2 [S]_0 [E]_0 (R - 1)}{K_s + [S]_0} - \frac{k_2 [S]_0 K_i R}{K_s (R - 1)}. \quad (6.108)$$

Приравнивая друг другу правые части уравнений (6.107) и (6.108), находим значения координат центра гиперболы:

$$\text{ордината} = \frac{K_i k_2 [S]_0}{K_s (R - 1)}, \quad (6.109)$$

$$\text{абсцисса} = - \frac{K_i (K_s + [S]_0) (R + 1)}{K_s (R - 1)^2}. \quad (6.110)$$

Известно, что в случае равносторонней гиперболы, проходящей через начало координат

$$v = \frac{a [E]_0}{b + [E]_0} \quad (6.111)$$

и имеющей асимптоты, параллельные координатным осям, координаты центра гиперболы определяются соотношениями: ордината = a ; абсцисса = $-b$. На этом основании, используя (6.109)—(6.110), зависимость начальной скорости ферментативной реакции от концентрации фермента, содержащего примесь конкурентного ингибитора, можно записать по аналогии с (6.111) в виде

$$v = \frac{\frac{k_2 K_i}{K_s (R - 1)} [E]_0 [S]_0}{\frac{K_i (K_s + [S]_0) (R + 1)}{K_s (R - 1)^2} + [E]_0}. \quad (6.112)$$

Приводя уравнение (6.112) к виду, удобному для анализа в координатах двойных обратных величин, получим

$$\frac{1}{v} = \frac{(K_s + [S]_0) (R + 1)}{k_2 [S]_0 (R - 1)} \cdot \frac{1}{[E]_0} + \frac{K_s (R - 1)}{k_2 [S]_0 K_i}. \quad (6.113)$$

Из последнего выражения видно, что при наличии примеси конкурентного ингибитора в препарате фермента тангенс угла наклона зависимости в координатах $(1/v, 1/[E]_0)$ равен

$$\text{tg } \varphi_i = \frac{(K_s + [S]_0) (R + 1)}{k_2 [S]_0 (R - 1)}. \quad (6.114)$$

При отсутствии ингибитора в препарате фермента тангенс угла наклона зависимости в координатах $(1/v, 1/[E]_0)$ равен

$$\text{tg } \varphi_0 = \frac{K_s + [S]_0}{k_2 [S]_0}. \quad (6.115)$$

Следовательно,

$$\frac{\operatorname{tg} \varphi_i}{\operatorname{tg} \varphi_0} = \frac{R + 1}{R - 1},$$

откуда искомая величина R равна

$$R = \frac{\frac{\operatorname{tg} \varphi_i}{\operatorname{tg} \varphi_0} + 1}{\frac{\operatorname{tg} \varphi_i}{\operatorname{tg} \varphi_0} - 1}. \quad (6.116)$$

В качестве иллюстрации приведем кинетические данные для гидролиза *n*-нитрофенилсульфата, катализируемого очищенным и неочищенным препаратами арилсульфатазы (рис. 95). Анализ данных, приведенных на рисунке в рамках схемы (6.101), дает отношение концентраций $R = [I]_0/[E]_0$, равное 8,3.

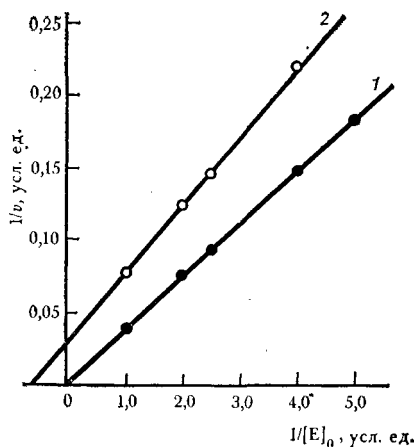
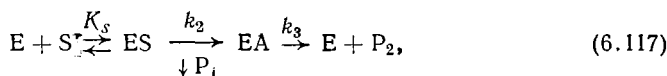


Рис. 95. Зависимость обратной скорости ферментативной реакции от обратной концентрации фермента для неочищенного (1) и очищенного (2) препарата арилсульфатазы [40]

§ 7. Стационарная кинетика трехстадийных ферментативных реакций

Большое число ферментативных реакций (в особенности реакций гидролитического типа) протекают по трехстадийному механизму:



где EA — ацилферментное промежуточное соединение, образованное в результате ацилирования активного центра фермента молекулой субстрата; P_1 и P_2 — продукты реакции на стадиях ацилирования и деацилирования соответственно; k_2 и k_3 — индивидуальные константы скоростей этих стадий. Определяемые на опыте параметры ферментативной реакции (каталитическая константа $k_{\text{кат}}$ и кажущаяся константа Михаэлиса $K_{m(\text{каж})}$) связаны со значениями индивидуальных констант схемы (6.117) следующими соотношениями:

$$k_{\text{кат}} = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3}; \quad (6.118)$$

$$K_{m(\text{каж})} = K_s \frac{k_3}{k_2 + k_3}, \quad (6.119)$$

как это вытекает из уравнений (6.10).

Определение индивидуальных констант k_2 , k_3 и K_s — довольно сложная задача, которую нельзя решить исследованием зависимости стационарной скорости от концентрации субстрата (см. уравнение

6.8). Для этой цели оказался полезным метод селективного воздействия каких-либо эффекторов на отдельные стадии (ацилирования или деацилирования) стационарной ферментативной реакции [14]. В этой сложной проблеме рассмотрим лишь несколько наиболее ярких примеров.

Селективное влияние эффекторов (ингибиторов или активаторов) на стадию ацилирования. Допустим, что в среду ферментативной реакции ввели эффектор, который селективно влияет на стадию ацилирования, что приводит к изменению эффективного значения константы скорости этой стадии. Наблюдаемую в этом случае начальную стационарную скорость реакции (6.117), протекающей при $[S]_0 \gg [E]_0$, запишем в виде:

$$v^* = \frac{k_{\text{кат}}^* [E]_0 [S]_0}{K_{m(\text{каж})}^* + [S]_0}; \quad (6.120)$$

$$k_{\text{кат}}^* = \frac{k_2^* k_3}{k_2 + k_3}; \quad (6.121)$$

$$K_{m(\text{каж})}^* = K_s \frac{k_3}{k_2^* + k_3}, \quad (6.122)$$

если считать, что равновесие при образовании ES устанавливается достаточно быстро и концентрация EA поддерживается стационарной. Индекс (*) указывает на кинетическую константу, величина которой изменяется под действием эффектора. Решая совместно уравнения (6.8) (для реакции в отсутствие эффектора) и (6.120), нетрудно показать, что в координатах Лайнуивера — Бёрка семейство прямых ($1/v$, $1/[S]_0$), полученных при различных концентрациях эффектора, пересекаются в общей точке, расположенной в левом верхнем квадранте с координатами:

$$\frac{1}{[S]_0} = -\frac{1}{K_s}; \quad (6.123)$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{k_3 [E]_0}. \quad (6.124)$$

Определив таким образом значения индивидуальных констант k_3 и K_s , из соотношения

$$\frac{k_2}{k_3} = \frac{K_s}{K_{m(\text{каж})}} - 1, \quad (6.125)$$

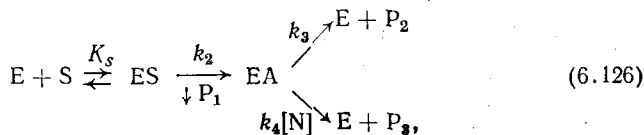
которое следует из (6.119), можно найти значение k_2 . Следует отметить, что положение точки пересечения в данной координатной системе не зависит от характера функциональной зависимости k^*_{2} от концентрации эффектора. Таким образом, применение ингибитора, избирательно влияющего на скорость стадии ацилирования, позволяет проводить раздельное определение индивидуальных констант k_2 , k_3 и K_s независимо от конкретного механизма действия эффектора [14].

В качестве примера можно указать на определение индивидуальных констант схемы (6.117) в катализе химотрипсином, где катионы тяжелых металлов (Cu^{2+} , Ag^+) избирательно ингибируют стадию образования ацилфермента [13, 14].

В реакциях, катализируемых α -химотрипсином, изменение ионной силы раствора также оказывает влияние лишь на эффективную константу скорости ацилирования фермента (k_2^*) [14]. Это было использовано для отдельного определения индивидуальных констант в реакциях гидролиза ряда сложноэфирных субстратов с помощью соотношений (6.123)—(6.125) [15], как это показано на рис. 96.

Влияние дополнительных нуклеофильных агентов на стадию деацилирования. В случае гидролитических ферментативных реакций, протекающих по

трехстадийному механизму, нуклеофильные агенты, добавленные в реакцию систему, могут конкурировать с водой на стадии деацилирования промежуточного ацилфермента:



где N — дополнительный нуклеофильный агент; P_3 — продукт реакции переноса ацильной части субстрата на нуклеофил, происходящей с константой скорости второго порядка k_4 ; $k_3 = k_3'[\text{H}_2\text{O}]$. Для вывода уравнения, описывающего начальную стационарную скорость образования продукта P_2 в присутствии дополнительного нуклеофильного агента (при $[\text{S}]_0 \gg [\text{E}]_0$), запишем уравнение материального баланса по ферменту, выражение для константы диссоциации фермент-субстратного комплекса и условие для стационарной концентрации ацилфермента, установившейся в ходе ферментативной реакции:

$$[\text{E}]_0 = [\text{E}] + [\text{ES}] + [\text{EA}]; \quad (6.127)$$

$$K_s = \frac{[\text{E}][\text{S}]_0}{[\text{ES}]}; \quad (6.128)$$

$$\frac{d[\text{EA}]}{dt} = k_2[\text{ES}] - (k_3 + k_4[\text{N}])[\text{EA}] = 0. \quad (6.129)$$

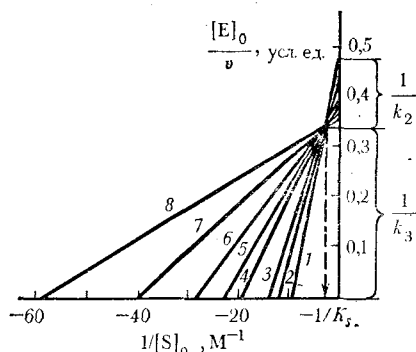


Рис. 96. Определение индивидуальных констант реакции (6.117) при гидролизе метилового эфира N-ацетил-L-валина, катализируемом α -химотрипсином, используя селективное влияние ионной силы раствора на константу скорости ацилирования фермента [15], если концентрация KCl, M:

1 — 0,1; 2 — 0,3; 3 — 0,5; 4 — 0,8; 5 — 1,0; 6 — 1,5; 7 — 2,0; 8 — 2,7

Подставив решение этих уравнений в выражение для скорости образования продукта P_2

$$\frac{d[P_2]}{dt} = k_3[EA],$$

получаем уравнение для начальной стационарной скорости ферментативной реакции:

$$v = \frac{d[P_2]}{dt} = \frac{\frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3 + k_4} [N] [E]_0 [S]_0}{K_s \frac{k_3 + k_4 [N]}{k_2 + k_3 + k_4 [N]} + [S]_0}. \quad (6.130)$$

Анализ экспериментальных данных удобно проводить с помощью соотношений

$$\frac{1}{k_{\text{кат}}} = \frac{1}{k_2} + \frac{1}{k_3} + \frac{k_4}{k_2 k_3} [N]; \quad (6.131)$$

$$\frac{K_m(\text{каж})}{k_{\text{кат}}} = \frac{K_s}{k_2} + \frac{K_s k_4}{k_2 k_3} [N], \quad (6.132)$$

вытекающих из (6.130). При рассмотрении функций (6.131) и (6.132) видно, что в координатах $(1/k_{\text{кат}}, [N])$ и $(K_m(\text{каж})/k_{\text{кат}}, [N])$ можно раздельно определить все индивидуальные константы схемы (6.126), как это показано на рис. 97.

Экспериментальные данные можно анализировать по-другому [16]. Для этой цели следует обратить внимание, что в координатах Лайнуивера — Бёрка семейство прямых $(1/v, 1/[S]_0)$, соответствующих различным концентрациям нуклеофила, пересекаются в общей точке. Это следует из совместного решения уравнений (6.8) и (6.130) с учетом соотношений (6.118) — (6.119). Точка пересечения расположена в левом верхнем квадранте с координатами, значения которых определены соотношениями (6.123) и (6.124) (рис. 98).

При необходимости отношения констант скоростей сольволиза ацилфермента добавленным нуклеофильным агентом и водой (k_4/k_3) можно также определить построением экспериментальных данных в координатах $(1/v, [N])$. В этом случае прямые, соответствующие различным начальным концентрациям субстрата, пересекаются в левом верхнем квадранте в общей точке, абсцисса которой

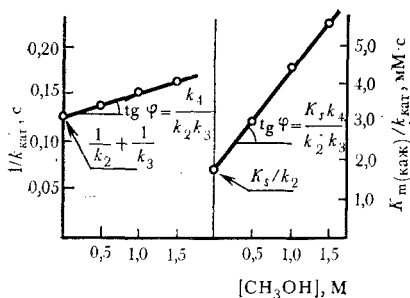


Рис. 97. Определение индивидуальных констант реакции (6.126) гидролиза и метанолиза метилового эфира *N*-ацетил-*L*-норвалина под действием α -химотрипсина (по данным А. А. Клёсова)

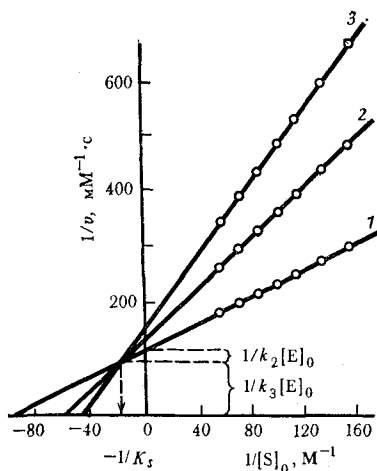


Рис. 98. Определение индивидуальных констант скоростей гидролиза этилового эфира *L*-тирозина, катализируемого α -химотрипсином, в присутствии дополнительного нуклеофильного агента (1,4-бутандиола) (по данным А. А. Клёсова), если концентрация 1,4-бутандиола, М:
 1 — 0; 2 — 0,11; 3 — 0,22

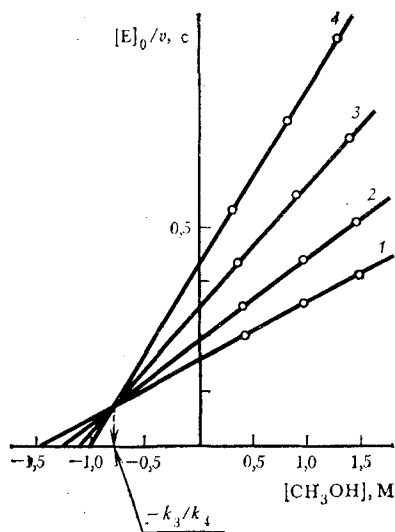


Рис. 99. Определение отношения k_3/k_4 в реакции (6.126) сольволиза *N*-ацетил-*L*-норвалилхимотрипсина метанолом (N) и водой [36] при концентрации субстрата этилового эфира *N*-ацетил-*L*-норвалина (ММ):
 1 — 0; 2 — 25; 3 — 17; 4 — 10

равна $-k_3/k_4$. Это следует из анализа зависимости (6.130) и графически показано на рис. 99.

§ 8. Применение интегральной формы уравнения скорости ферментативных реакций

Анализ кинетических данных ферментативных реакций можно проводить как с использованием начальных скоростей (по зависимости начальной скорости ферментативной реакции от начальной концентрации субстрата или эффектора, как это было показано в предыдущих параграфах), так и с использованием временного хода реакции, применяя интегральную форму кинетического уравнения скорости.

Как уже известно, уравнение Михаэлиса — Ментен в своей дифференциальной форме справедливо для случаев как двух-, так и многостадийных стационарных ферментативных процессов и может быть записано при условии $[S] \gg [E]_0$ в виде

$$-\frac{d[S]}{dt} = \frac{V[S]}{K_m(\text{каж}) + [S]}, \quad (6.133)$$

где кинетические параметры V и $K_m(\text{каж})$ в общем случае являются

функциями констант скоростей индивидуальных стадий ферментативной реакции. Интегрирование уравнения (6.133) при начальных условиях $[S] = [S]_0$ при $t = 0$ приводит к уравнению, определяющему зависимость концентрации продукта реакции P от времени:

$$[P] = Vt - K_m(\text{каж}) \ln \frac{[S]_0}{[S]_0 - [P]} \quad (6.134)$$

Для практических целей уравнение (6.134) необходимо привести к линейному виду. Некоторые способы указаны в табл. 32. Например, широко известен метод Уокера — Шмидта [17], согласно которому обработка экспериментальных данных проводится в координатах $\left([P]/t, 1/t \ln \frac{[S]_0}{[S]_0 - [P]} \right)$. Из выражения

$$\frac{[P]}{t} = V - \frac{K_m(\text{каж})}{t} \ln \frac{[S]_0}{[S]_0 - [P]} \quad (6.135)$$

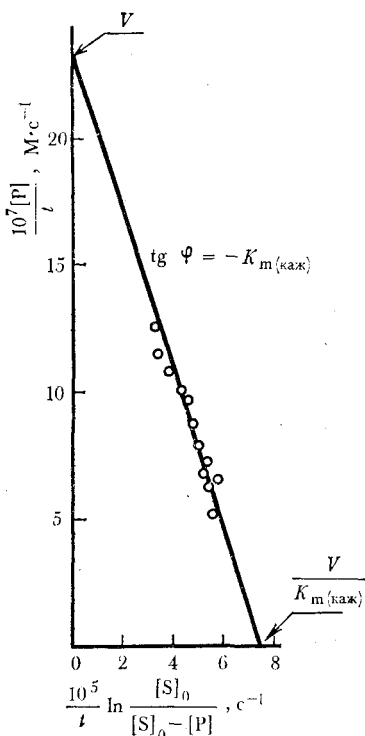


Рис. 100. Определение кинетических параметров гидролиза амидов N-ацетил-L-гексагидрофенилаланина, катализируемого α-химотрипсином, с помощью интегральной формы уравнения Михаэлиса [43]

видно, что прямая в координатах Уокера — Шмидта (рис. 100) имеет тангенс угла наклона, равный $-K_m(\text{каж})$, и отсекает на оси ординат отрезок, равный V .

В том случае, когда в распоряжении экспериментатора имеется полная кинетическая кривая (рис. 101), более удобным представляется метод обработки, в котором вместо абсолютных значений параметров реакции (начальной концентрации субстрата, начального времени реакции, абсолютной концентрации продукта реакции и т. д.) используются относительные величины [23]. Это значительно повышает точность результатов эксперимента. Рассмотрим в качестве примера кинетическую кривую накопления продукта ферментативной реакции, удовлетворяющую уравнению (6.134). Откладываемая на оси ординат величина D может соответствовать различным характеристикам системы, которые удобны для прямого измерения (величина оптической плотности; количество щелочи, идущей на титрование продукта реакции; проводимость раствора и т. д.). В общем случае $[P]_0 = \alpha(D - D_0)$, где α — коэффициент пересчета; D_0 и D — значения, соответствующие началь-

ному и текущему моментам реакции. Для двух любых моментов времени, различающихся на величину Δ , в соответствии с (6.134) будут справедливы следующие уравнения:

$$t_1 = \frac{\alpha(D_1 - D_0)}{V} + \frac{K_m(\text{каж})}{V} \ln \frac{D_\infty - D_0}{D_\infty - D_1}; \quad (6.136)$$

$$t'_1 = t_1 + \Delta = \frac{\alpha(D'_1 - D_0)}{V} + \frac{K_m(\text{каж})}{V} \ln \frac{D_\infty - D_0}{D_\infty - D'_1}. \quad (6.137)$$

Подобные уравнения должны быть верны для t_2 и t'_2 и т. д. Вычитая (6.136) и (6.137), имеем

$$\Delta = \frac{\alpha(D'_1 - D_1)}{V} + \frac{K_m(\text{каж})}{V} \ln \frac{D_\infty - D_1}{D_\infty - D'_1}, \quad (6.138)$$

или в более общем виде

$$D'_i - D_i = \frac{V\Delta}{\alpha} - \frac{K_m(\text{каж})}{\alpha} \ln \frac{D_\infty - D_i}{D_\infty - D'_i}. \quad (6.139)$$

При построении результатов эксперимента в координатах $(D'_i - D_i, \ln \frac{D_\infty - D_i}{D_\infty - D'_i})$ получаем прямую с тангенсом угла наклона $-K_m(\text{каж})/\alpha$ и точкой пересечения на оси ординат $V\Delta/\alpha$.

Бэнфилд [21] предложил оригинальный метод определения кинетических параметров ферментативных реакций, основанный на определении площади под кинетической кривой в координатах $([S], t)$. Повторное интегрирование интегральной формы уравнения скорости ферментативной реакции (6.134) в пределах $(0, [S]_0)$ приводит к уравнению

$$\int_0^{[S]_0} Vtd[S] = \int_0^{[S]_0} ([S]_0 - [S]) d[S] + \int_0^{[S]_0} K_m(\text{каж}) \ln \frac{[S]_0}{[S]} d[S]. \quad (6.140)$$

Интегрируя правую часть выражения (6.140), получим

$$\int_0^{[S]_0} Vtd[S] = \frac{[S]_0^2}{2} + [S]_0 K_m(\text{каж}). \quad (6.141)$$

Так как интеграл в левой части (6.141) — площадь под кинетической кривой в координатах $([S], t)$, то, обозначая его через A , приходим к выражению

$$\frac{2A}{[S]_0} = \frac{2K_m(\text{каж})}{V} + \frac{[S]_0}{V}. \quad (6.142)$$

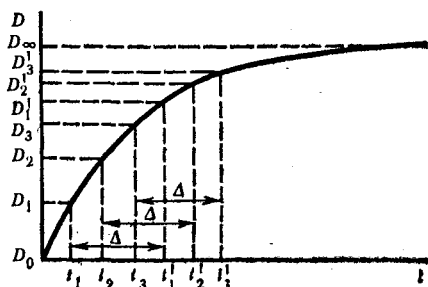


Рис. 101. Кинетическая кривая накопления продукта реакции:
 D — некоторый физический параметр системы, удобный для регистрации кинетики

Графические методы, применяемые для анализа кинетических данных с помощью уравнения (6.134)

Ордината	Абсцисса	Отрезок, отсекаемый на оси ординат	Тангенс угла наклона	Литература
$\frac{[P]}{t}$	$\frac{1}{t} \lg \frac{[S]_0}{[S]_0 - [P]}$	V	$-K_m$	[17]
$\frac{t}{[P]}$	$\frac{1}{[P]} \lg \frac{[S]_0}{[S]_0 - [P]}$	$\frac{1}{V}$	$\frac{K_m}{V}$	[18]
$\frac{t}{\ln \frac{[S]_0}{[S]_0 - [P]}}$	$\frac{[P]}{\ln \frac{[S]_0}{[S]_0 - [P]}}$	$\frac{K_m}{V}$	$\frac{1}{V}$	[18]
$\frac{1}{r+1} \left[\ln \frac{1}{1-p} + rp \right]^*$	t	0	r	[19]
$\frac{A^{**}}{[P]}$	$[S]_0 - [P]$	$\frac{2K_m + [S]_0}{2V}$	$\frac{1}{2V}$	[20]
$\frac{2A^{***}}{[S]_0}$	$[S]_0$	$\frac{2K_m}{V}$	$\frac{1}{V}$	[21]

Ордината	Абсцисса	Отрезок, отсекаемый на оси ординат	Тангенс угла наклона	Литература
Δt^{****}	$\left[\ln \frac{[S]_0^n}{[S]_0^n - [P]} - \ln \frac{[S]_0^i}{[S]_0^i - [P]} \right]$	0	$\frac{K_m}{V}$	[22]
$D_i' - D_i^{*****}$	$\ln \frac{D_\infty - D_i}{D_\infty - D_i'}$	$V \Delta$	$-K_m$	[23]

* $r = [S]_0 / K_m$, $p = [P]_0 / [S]_0$. Прямая проводится с углом наклона, равным начальной скорости реакции, и по значениям ординаты, соответствующим различным концентрациям продукта, находят величину r (соответственно K_m) по одной кинетической кривой.

$$**A = \int_0^t [S]_0 dt \text{ (площадь под кинетической кривой).}$$

$$***A = \int_0^{[S]_0} t d[S] \text{ (площадь под кинетической кривой). В работе [21] интегральное уравнение}$$

нение

$$\frac{[S]_0}{2 \int_0^{[S]_0} t d[S]} - 2t_0 = \frac{2K_m}{V} + \frac{[S]_0}{V}$$

было получено двойным интегрированием уравнения Михаэлиса — Ментен. В таблице для простоты положено $t_0 = 0$.

**** $\Delta t = t_2 - t_1$, где t_1 , t_2 — времена, за которые выделится одно и то же количество продукта при начальных концентрациях $[S]_0^i$ и $[S]_0^n$, соответственно ($[S]_0^i > [S]_0^n$). При подстановке полученного таким образом значения K_m/V в формулу

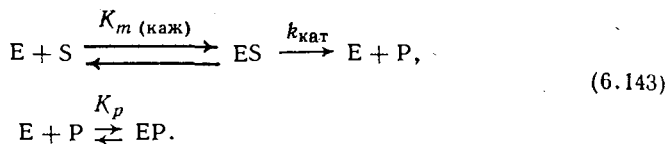
$$t_i = \frac{[P]}{V} + \frac{K_m}{V} \ln \frac{[S]_0^i}{[S]_0^i - [P]}$$

при известных t_1 , $[P]$ и $[S]_0^i$ раздельно находят K_m и V .

***** См. рис. 101; $\Delta = t_i - t_j$,

В координатах $(2A/[S]_0, [S]_0)$ зависимость (6.142) должна иметь вид прямой линии с тангенсом угла наклона $1/V$ и пересекающей ось ординат в точке $2K_m(\text{каж})/V$.

Ингибирование продуктом реакции. При интегральном анализе кинетики ферментативных реакций особый интерес приобретает случай конкурентного ингибирования продуктом реакции:



Кинетический анализ (6.143) приводит к следующей зависимости концентрации продукта ферментативной реакции от времени:

$$\frac{[P]}{t} = \frac{V}{1 - \frac{K_m(\text{каж})}{K_p}} - \frac{K_m(\text{каж}) \left(1 + \frac{[S]_0}{K_p}\right)}{t \left(1 - \frac{K_m(\text{каж})}{K_p}\right)} \ln \frac{[S]_0}{[S]_0 - [P]}.
 \tag{6.144}$$

Из рассмотрения выражения (6.144) видно, что в том случае, когда продукт реакции имеет большее сродство к ферменту по сравнению с исходным субстратом ($K_p \ll K_m(\text{каж})$), эффективные кинетические параметры — максимальная скорость и константа Михаэлиса ферментативной реакции — имеют отрицательные значения:

$$V^{\text{эфф}} = \frac{V}{1 - \frac{K_m(\text{каж})}{K_p}};
 \tag{6.145}$$

$$K_m^{\text{эфф}}(\text{каж}) = K_m(\text{каж}) \frac{1 + \frac{[S]_0}{K_p}}{1 - \frac{K_m(\text{каж})}{K_p}}.
 \tag{6.146}$$

Именно этим можно объяснить, например, то, что при анализе кинетических данных для реакций гидролиза гиппурилфенилглицина и бромцетил-DL-фениллактиата, катализируемых карбоксипептидазой, авторы [24] получили отрицательные значения $k_{\text{кат}}$ и $K_m(\text{каж})$. Это видно из данных, приведенных на рис. 102, если анализировать их с помощью уравнения (6.135).

Для определения константы ингибирования продуктом ферментативной реакции был предложен метод Фостера — Ниманна [25]. Согласно этому методу прямая, проведенная из начала координат $\left([P]/t, \frac{1}{t} \ln \frac{[S]_0}{[S]_0 - [P]}\right)$ с тангенсом угла наклона, численно равным начальной концентрации субстрата $[S]_0$, пересекает прямую, описываемую уравнениями (6.135) или (6.144) в точке, соответствующей начальному времени реакции, $t = 0$ (в которой, разумеется, ингибирование продуктом реакции отсутствует). Для доказательства рассмотрим выражение для тангенса угла наклона данной прямой:

$$\text{tg } \varphi = \frac{[P]/t}{\frac{1}{t} \ln \frac{[S]_0}{[S]_0 - [P]}}.
 \tag{6.147}$$

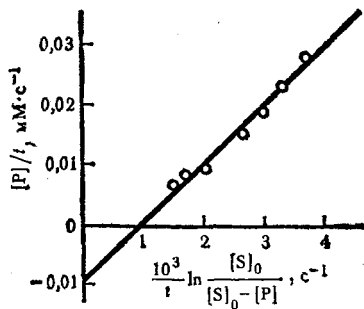


Рис. 102. Анализ кинетических данных гидролиза бромацетил-D, L-фениллактата, катализируемому карбоксипептидазой [24], с помощью интегральной формы уравнения скорости (6.135)

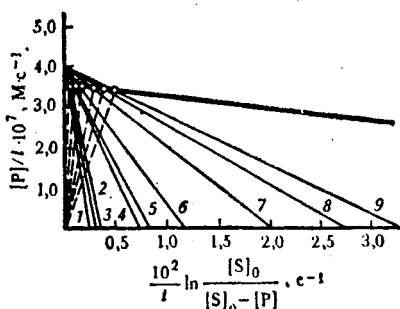


Рис. 103. Применение метода Фостера — Ниманна для определения константы конкурентного ингибирования пенициллинамидазы продуктами ферментативного гидролиза бензилпенициллина (по данным А. А. Клёсова и В. К. Швядаса), если начальные концентрации субстрата (мМ):

1 — 1,17; 2 — 0,94; 3 — 0,70; 4 — 0,47;
5 — 0,35; 6 — 0,23; 7 — 0,12; 8 — 0,09;
9 — 0,07; жирной линией проведена расчетная прямая, для которой ингибирование продуктами реакции отсутствует

В начальный момент времени (при $t \rightarrow 0$) имеем $[P] \rightarrow 0$ и $\ln \frac{[S]_0}{[S]_0 - [P]} \rightarrow 0$. Таким образом,

при рассмотрении предела, к которому стремится выражение (6.147) при $t \rightarrow 0$, имеем случай неопределенности типа $0/0$. Пользуясь правилом Лопиталья, для числителя (6.147) получим значение

$$\lim_{t \rightarrow 0} \frac{[P]}{t} = \frac{d[P]}{dt} = - \frac{d[S]}{dt}, \quad (6.148)$$

и для знаменателя

$$\lim_{t \rightarrow 0} \frac{\ln \frac{[S]_0}{[S]}}{t} = - \frac{1}{[S]_0} \cdot \frac{d[S]}{dt}. \quad (6.149)$$

Разделив (6.148) на (6.149), окончательно имеем

$$\lim_{t \rightarrow 0} \text{tg } \varphi = [S]_0. \quad (6.150)$$

Таким образом, точка пересечения прямой в координатах $([P]/t, 1/t \ln \frac{[S]_0}{[S]_0 - [P]})$ и прямой (6.150), проведенной из начала координат, соответствует начальному моменту ферментативной реакции. Имея ряд подобным образом полученных точек при различных концентрациях субстрата и проводя через них прямую, для которой ингибирование продуктом реакции отсутствует (рис. 103), можно определить все кинетические и равновесные параметры схемы (6.143).

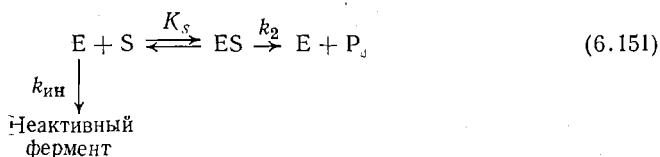
Величину константы конкурентного ингибирования продуктом (K_p) также можно определить, откладывая в зависимости от $[S]_0$ обратные значения отрезков, отсекаемых на оси абсцисс прямыми в координатах Уокера — Шмидта [см. (6.144)]. В случае ингибирования продуктом реакции подобная зависимость будет прямолинейной, отсекая на осях абсцисс и ординат отрезки, равные $-K_p$ и $K_{m(\text{каж})}/V$ соответственно.

Наконец, величину K_p можно определить, если из независимого эксперимента (при использовании начальных скоростей реакции) найти значения V и $K_{m(\text{каж})}$ ферментативной реакции и сопоставить их со значениями эффективных кинетических параметров, найденных из полной кинетической кривой при ингибирующем действии продукта реакции [см. (6.145) — (6.146)].

§ 9. Инактивация фермента в ходе реакции

При изучении кинетики ферментативных реакций, протекающих до высоких степеней превращения субстрата, необходимо учитывать возможную инактивацию фермента в ходе реакции. В ряде случаев было найдено, что связывание субстрата с ферментом ускоряет инактивацию последнего; в некоторых случаях субстрат не оказывает влияние на инактивацию фермента. Однако чаще всего связывание субстрата предохраняет фермент от инактивации, т. е. ферментсубстратный комплекс инактивируется медленнее, чем свободный фермент.

Рассмотрим в качестве примера реакцию, в которой субстрат полностью предохраняет фермент от инактивации, в то время как свободный фермент денатурирует с константой скорости инактивации первого порядка $k_{\text{ин}}$:



Если $[E^*]_0$ — общая текущая концентрация активного фермента в системе

$$[E^*]_0 = [E] + [ES], \quad (6.152)$$

то можно записать:

$$-\frac{d[E^*]_0}{dt} = k_{\text{ин}}([E^*]_0 - [ES]). \quad (6.153)$$

Из (6.151) следует, что скорость расходования субстрата определяется выражением

$$-\frac{d[S]}{dt} = k_2[ES], \quad (6.154)$$

или, учитывая соотношение (6.152) и

$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]}, \quad (6.155)$$

имеем

$$-\frac{d[S]}{dt} = \frac{k_2}{K_s} ([E^*]_0 - [ES])[S]. \quad (6.156)$$

Разделив уравнение (6.153) на (6.156), получим

$$\frac{d[E^*]_0}{d[S]} = \frac{K_s k_{ин}}{k_2 [S]},$$

или

$$d[E^*]_0 = \frac{K_s k_{ин}}{k_2} \cdot \frac{d[S]}{[S]}. \quad (6.157)$$

Интегрируя последнее уравнение при начальных условиях $[E^*]_0 = [E]_0$ и $[S] = [S]_0$

$$\int_{[E]_0}^{[E^*]_0} d[E^*]_0 = \frac{K_s k_{ин}}{k_2} \int_{[S]_0}^{[S]} \frac{d[S]}{[S]},$$

получим

$$[E^*]_0 = [E]_0 - \frac{K_s k_{ин}}{k_2} \ln \frac{[S]_0}{[S]}. \quad (6.158)$$

Из полученного выражения следует, что количество непрореагировавшего субстрата $[S]_{неп}$ в системе после прекращения реакции (вследствие полной инактивации фермента, при $[E^*]_0 = 0$) равно

$$[S]_{неп} = [S]_0 e^{-\frac{k_2 [E]_0}{k_{ин} K_s}}. \quad (6.159)$$

Если из независимого эксперимента (при использовании начальных скоростей ферментативной реакции) определить значения k_2 и K_s , то, зная начальные концентрации субстрата и фермента и долю субстрата, прореагировавшего до прекращения реакции, из соотношения (6.159) можно рассчитать константу скорости инактивации фермента в условиях опыта.

Из (6.154), если учесть (6.152) и (6.155), следует дифференциальное уравнение скорости ферментативной реакции

$$-\frac{d[S]}{dt} = \frac{k_2 [E^*]_0 [S]}{K_s + [S]}. \quad (6.160)$$

Подставляя выражение (6.158) в (6.160), получим

$$-\frac{d[S]}{dt} = \frac{k_2 [E]_0 [S]}{K_s + [S]} - \frac{K_s [S] k_{ин}}{K_s + [S]} \ln \frac{[S]_0}{[S]}. \quad (6.161)$$

Вводя вспомогательную переменную Z , связанную с $[S]$ зависимостью

$$Z = \frac{[S]}{[S]_0} e^q,$$

где

$$q = \frac{k_2 [E]_0}{k_{ин} K_s},$$

преобразуем уравнение (6.161) к более простому виду:

$$- \frac{dZ}{dt} = \frac{K_s k_{ин} Z \ln Z}{K_s + [S]_0 e^{-q} Z}. \quad (6.162)$$

Интегрирование уравнения (6.162) при начальных условиях: $Z = e^q$ при $t = 0$ приводит к выражению

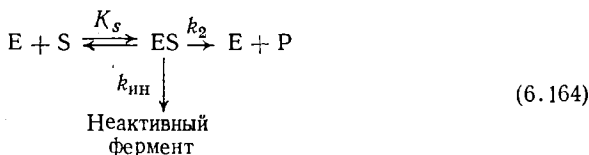
$$t = \frac{1}{k_{ин}} \ln \frac{1}{1 - \frac{1}{q} \ln \frac{[S]}{[S]_0}} - \frac{[S]_0 e^{-q}}{K_s k_{ин}} \int_{e^q}^Z \frac{dZ}{\ln Z}, \quad (6.163)$$

где $\int \frac{dZ}{\ln Z}$ — табличный интеграл, равный

$$\int \frac{dZ}{\ln Z} = \ln \ln Z + \ln Z + \frac{(\ln Z)^2}{2 \cdot 2!} + \frac{(\ln Z)^3}{3 \cdot 3!} + \dots$$

Подставляя в выражение (6.163) известные значения констант k_2 , $k_{ин}$ и K_s и начальные концентрации $[E]_0$ и $[S]_0$, можно рассчитать, какое количество субстрата превратится в продукт под действием фермента за определенное время t . Или же, наоборот, из выражения (6.163) можно рассчитать время, за которое ферментативная реакция пройдет до заданной степени превращения субстрата.

В том случае, когда инактивация фермента происходит только в фермент-субстратном комплексе, т. е. когда субстрат вызывает денатурацию фермента, схему реакции следует записать в другом виде:



Если $[E^*]_0$ — общая текущая концентрация активного фермента, то из (6.164) следует

$$- \frac{d[E^*]_0}{dt} = k_{ин} [ES]. \quad (6.165)$$

Так как скорость превращения субстрата определяется выражением

$$- \frac{d[S]}{dt} = k_2 [ES], \quad (6.166)$$

то, разделив (6.165) на (6.166), получим

$$\frac{d[E^*]_0}{d[S]} = \frac{k_{ин}}{k_2},$$

или

$$d[E^*]_0 = \frac{k_{ин}}{k_2} d[S]. \quad (6.167)$$

Интегрируя выражение (6.167) при начальных условиях: $[S] = [S]_0$ при $[E^*]_0 = [E]_0$, будем иметь

$$[E]_0 - [E^*]_0 = \frac{k_{ин}}{k_2} ([S]_0 - [S]).$$

При полной инактивации фермента $[E^*]_0 = 0$ и, следовательно,

$$k_{ин} = \frac{k_2 [E]_0}{[S]_0 - [S]_{неп}}, \quad (6.168)$$

где $[S]_{неп}$ — концентрация непрореагировавшего субстрата. Таким образом, определяя степень ферментативного превращения субстрата вплоть до полной инактивации фермента и используя формулу (6.168), можно найти величину константы скорости инактивации фермента в фермент-субстратном комплексе. Для этого в независимом опыте (при использовании начальной скорости ферментативной реакции) нужно определить значение каталитической константы k_2 .

Если проводить изучение инактивации фермента в фермент-субстратном комплексе в условиях избытка субстрата ($[S] \gg K_s$), то анализ, всего лишь одной кинетической кривой ферментативной реакции (6.164) позволяет в ряде случаев найти значения как каталитической константы k_2 , так и константы скорости инактивации фермента $k_{ин}$ [26]. Пусть $k_{ин} = \alpha k_2$. Тогда из (6.164) следует, что скорость инактивации фермент-субстратного комплекса равна

$$-\frac{d[ES]}{dt} = \alpha k_2 [ES]. \quad (6.169)$$

Интегрируя выражение (6.169) при начальных условиях: $[ES] = [E]_0$ при $t = 0$ (так как $[S] \gg K_s$), получим

$$[ES] = [E]_0 e^{-\alpha k_2 t}. \quad (6.170)$$

Исходя из (6.164) и (6.170) скорость образования продукта реакции может быть определена из уравнения

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2 [E]_0 e^{-\alpha k_2 t}. \quad (6.171)$$

Интегрирование (6.171) приводит к зависимости концентрации продукта реакции от времени:

$$[P] = \frac{[E]_0}{\alpha} (1 - e^{-\alpha k_2 t}). \quad (6.172)$$

Преобразуем выражение (6.172) к виду

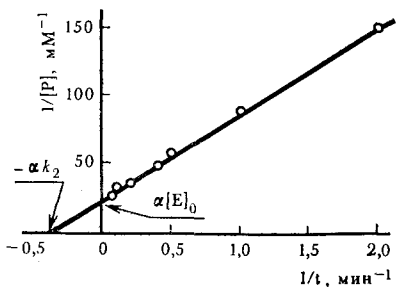


Рис. 104. Определение кинетических параметров ферментативной реакции при быстрой инактивации фермент-субстратного комплекса (на примере гидролиза нитрокатехолсульфата, катализируемого арилсульфатазой А) [26]

и отрезком, отсекаемым на оси ординат, равным $\alpha/[E]_0$ (рис. 104).

Наконец, если в ходе ферментативной реакции фермент денатурирует по первому порядку с константой скорости инактивации $k_{ин}$, причем субстрат не оказывает влияние на кинетику инактивации, то дифференциальное уравнение скорости ферментативной реакции можно записать в виде (при $[S] \gg [E]_0$)

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{k_{кат}[E]_0[S]}{K_m(каж) + [S]} e^{-k_{ин}t},$$

или

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{V([S]_0 - [P])}{K_m(каж) + [S]_0 - [P]} e^{-k_{ин}t} \quad (6.175)$$

Интеграл уравнения (6.175) равен

$$[P] = \frac{V(1 - e^{-k_{ин}t})}{k_{ин}} - K_m(каж) \ln \frac{[S]_0}{[S]_0 - [P]}. \quad (6.176)$$

Полученное выражение можно привести к линейному виду в координатах интегрального уравнения Михаэлиса (6.135) $\left(\frac{[P]}{t}, \frac{1}{t} \ln \frac{[S]_0}{[S]_0 - [P]}\right)$ лишь при условии $t = \text{const}$. Поэтому эксперимент следует поставить так, чтобы варьировать начальную концентрацию субстрата и определять концентрацию продукта, образовавшегося через данное постоянное время после начала реакции.

§ 10. Влияние pH на скорость ферментативных реакций

В активных центрах ферментов обнаружены функциональные группы, способные присоединять или отщеплять ион водорода в области pH, оптимальной для проявления ферментативной активности (см.

$$\frac{1}{[P]} = \frac{\alpha}{[E]_0(1 - e^{-\alpha k_2 t})}$$

и далее

$$\frac{1}{[P]} = \frac{\alpha}{[E]_0} \left(1 + \frac{e^{-\alpha k_2 t}}{1 - e^{-\alpha k_2 t}}\right). \quad (6.173)$$

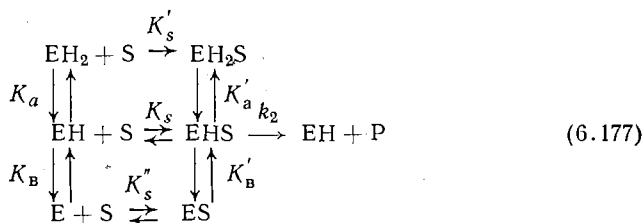
Если $\alpha \ll 1$, то, разлагая экспоненциальный член в уравнении (6.173) в ряд Маклорена, получим

$$\frac{1}{[P]} = \frac{\alpha}{[E]_0} + \frac{1}{k_2[E]_0 t}. \quad (6.174)$$

Зависимость (6.174) в координатах $(1/[P], 1/t)$ прямолинейна с тангенсом угла наклона, равным $1/k_2[E]_0$,

гл. I). Возможность участия данной группы в механизме катализа существенно зависит от ее ионного состояния (см. гл. II). Именно это обуславливает наблюдаемую на опыте зависимость скорости ферментативной реакции от pH. В свою очередь кинетические pH-эффекты широко используются для выявления каталитически важных ионогенных групп фермента и, более того, для выяснения pH-зависимых черт самого механизма ферментативного катализа [40].

Зависимость скорости двухстадийной ферментативной реакции от pH. Рассмотрим реакцию фермента, активный центр которого содержит две ионогенные группы:



Символы E, EH, EH₂ и т. д. описывают состояния ионизации групп фермента, которые участвуют в ферментативной реакции. Ионизация остальных групп белковой глобулы здесь вообще не рассматривается. Будем полагать, что константы диссоциации ионогенных групп в свободном ферменте (K_a , K_b) и в фермент-субстратном комплексе (K'_a , K'_b) различны [в принципе схема (6.177) может описывать и реакцию фермента, активный центр которого содержит четыре ионогенные группы, две из которых функционируют в свободной форме фермента, и две — в фермент-субстратном комплексе].

Анализ кинетической схемы ферментативной реакции типа (6.177) формально сводится к подсчету концентрации активной формы фермента исходя из выражений для констант диссоциации ионогенных групп его активного центра (или ионогенных групп фермента, контролирующих состояние активного центра). Для этой цели запишем, как обычно, уравнение скорости:

$$v = k_2 [\text{EHS}], \quad (6.178)$$

уравнение материального баланса по ферменту (при $[\text{S}]_0 \gg [\text{E}]_0$):

$$[\text{E}]_0 = [\text{E}] + [\text{EH}] + [\text{EH}_2] + [\text{ES}] + [\text{EHS}] + [\text{EH}_2\text{S}] \quad (6.179)$$

и выражения для констант равновесия:

$$\left. \begin{array}{l}
 K_a = \frac{[\text{EH}][\text{H}^+]}{[\text{EH}_2]}, \quad K'_a = \frac{[\text{EHS}][\text{H}^+]}{[\text{EH}_2\text{S}]} ; \\
 K_b = \frac{[\text{E}][\text{H}^+]}{[\text{EH}]}, \quad K'_b = \frac{[\text{ES}][\text{H}^+]}{[\text{EHS}]} ; \\
 K_s = \frac{[\text{EH}][\text{S}]}{[\text{EHS}]} ,
 \end{array} \right\} \quad (6.180)$$

полагая, что все равновесные процессы в реакции (6.177) протекают значительно быстрее самого химического превращения субстрата. Такое допущение о равновесных условиях протекания реакции представляется вполне приемлемым, поскольку скорость обмена ионом водорода достаточно высокая (см. гл. VII).

В результате подстановки из (6.179)—(6.180) в (6.178) получим общее уравнение для начальной скорости ферментативной реакции при установившихся равновесиях:

$$v = \frac{k_{\text{кат}} [E]_0 [S]_0}{K_{m(\text{каж})} + [S]_0},$$

где

$$k_{\text{кат}} = \frac{k_2}{1 + \frac{[H^+]}{K'_a} + \frac{K'_b}{[H^+]}}; \quad (6.181)$$

$$K_{m(\text{каж})} = K_s \frac{1 + \frac{[H^+]}{K_a} + \frac{K_b}{[H^+]}}{1 + \frac{[H^+]}{K'_a} + \frac{K'_b}{[H^+]}}. \quad (6.182)$$

Анализ зависимости $k_{\text{кат}}$ от рН позволяет найти значения констант диссоциации ионогенных групп фермент-субстратного комплекса (K'_a и K'_b), в то время как анализ рН-зависимости эффективной константы скорости второго порядка $k_{\text{кат}}/K_{m(\text{каж})}$ приводит к значениям констант диссоциации ионогенных групп свободного фермента (K_a и K_b):

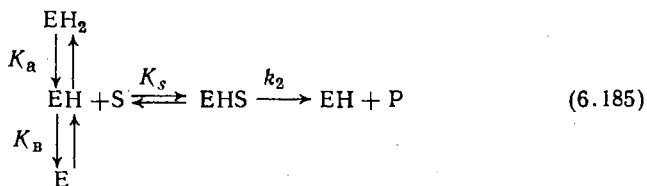
$$\frac{k_{\text{кат}}}{K_{m(\text{каж})}} = \frac{k_2/K_s}{1 + \frac{[H^+]}{K_a} + \frac{K_b}{[H^+]}}. \quad (6.183)$$

В целом функциональный характер рН-зависимых кинетических параметров уравнения Михаэлиса обнаруживает глубокое сходство с закономерностями рассмотренного обратимого влияния эффекторов (см. § 2 этой главы). Так, например, если при связывании субстрата ферментом константы диссоциации ионогенных групп не претерпевают изменений (т. е. $K_a = K'_a$, $K_b = K'_b$ или, что то же самое, ионогенный процесс не оказывает влияния на сорбцию субстрата и, следовательно, $K_s = K'_s = K_s'$), то величина наблюдаемой константы Михаэлиса ферментативной реакции не зависит от рН ($K_{m(\text{каж})} = K_s$):

$$v = \frac{\frac{k_2}{1 + \frac{[H^+]}{K_a} + \frac{K_b}{[H^+]}} [E]_0 [S]_0}{K_s + [S]_0}. \quad (6.184)$$

В данном случае можно провести аналогию ионогенного процесса с неконкурентным ингибированием (член $[H^+]/K_a$) и, соответственно, неконкурентной активацией (член $K_b/[H^+]$).

Если, наоборот, активный центр свободного фермента содержит ионогенные группы, ионизация которых переводит фермент в неактивную форму, не способную связывать субстрат ($K'_a \rightarrow \infty$, $K'_b \rightarrow \infty$):



то уравнение скорости ферментативной реакции приобретает следующий вид:

$$v = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0}{K_s \left(1 + \frac{[H^+]}{K_a} + \frac{K_b}{[H^+]} \right) + [S]_0} \quad (6.186)$$

В данном случае можно провести аналогию ионогенного процесса с конкурентным влиянием эффектора на кинетику ферментативной реакции, поскольку зависимость от pH обнаруживает лишь эффективное значение $K_{m(\text{каж})}$.

К более сложным зависимостям приводит анализ pH-зависимостей кинетики трехстадийной ферментативной реакции [27, 28]. К осложнениям также может привести необходимость учитывать ионизацию субстрата или эффектора [10].

Определение pK_a ионогенных групп по кинетическим данным. Проанализируем в качестве примера pH-зависимость эффективной константы скорости деацилирования *транс*-циннамоилхимотрипсина (схема 6.117). Экспериментальные данные [44] описывает функция

$$k_3 = k_{3(\text{lim})} / (1 + [H^+] / K_a), \quad (6.187)$$

согласно которой при $[H^+] = K_a$ (или $pH = pK_a$) значение эффективной (pH-зависимой) константы скорости k_3 равно половине предельной величины $k_{3(\text{lim})}$, соответствующей истинной (pH-независимой) константе скорости ферментативной реакции. Этот метод, графически представленный на рис. 105, широко используют при первичной обработке данных ферментативной кинетики (для приближенной оценки значений pK_a).

Более точным, однако, представляется другой подход, основанный на том, что функцию (6.187) приводят к линейному виду, например, в координатах

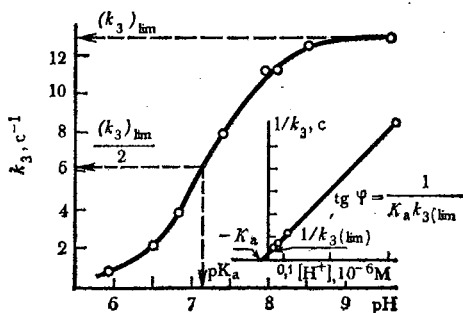


Рис. 105. Определение значения pK_a ионогенной группы активного центра фермента из кривой pH-зависимости деацилирования *транс*-циннамоилхимотрипсина [44]

$(1/k_3, [H^+])$. В этом случае экспериментальные данные должны укладываться на прямую, которая согласно уравнению

$$\frac{1}{k_3} = \frac{1}{k_{3(\text{lim})}} + \frac{[H^+]}{k_{3(\text{lim})}K_a} \quad (6.188)$$

отсекает на осях ординат и абсцисс отрезки, равные соответственно $1/k_{3(\text{lim})}$ и $-K_a$, как это показано на рис. 105.

Большое распространение в ферментативной кинетике нашел метод, который рассмотрим на примере рН-зависимой кинетики реакций, катализируемых клострипанном [45]. Экспериментальные данные по $k_{\text{кат}}$ описывает в этом случае функция

$$k_{\text{кат}} = (k_{\text{кат}})_{\text{lim}} / (1 + K'_B / [H^+]), \quad (6.189)$$

которая представляет собой частный случай зависимости (6.181). Логарифмируя левую и правую части этого уравнения, получим

$$\lg k_{\text{кат}} = \lg (k_{\text{кат}})_{\text{lim}} - \lg (1 + K'_B / [H^+]).$$

При $[H^+] \gg K'_B$ ($\text{pH} \ll \text{p}K'_B$) величина $k_{\text{кат}}$ практически не зависит от рН и равна предельному (рН-независимому) значению:

$$\lg k_{\text{кат}} \cong \lg (k_{\text{кат}})_{\text{lim}}.$$

Если же $[H^+] \ll K'_B$ ($\text{pH} \gg \text{p}K'_B$), то

$$\lg k_{\text{кат}} \cong \lg (k_{\text{кат}})_{\text{lim}} + \text{p}K'_B - \text{pH}, \quad (6.190)$$

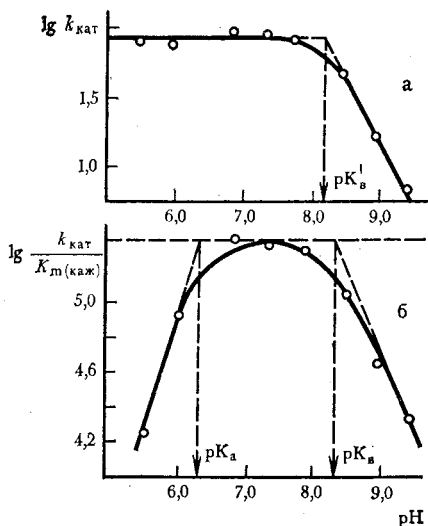


Рис. 106. Определение констант ионизации ионогенных групп активного центра клострипана, контролирующих реакцию гидролиза этилового эфира *N*-бензоил-*L*-аргинина [45]

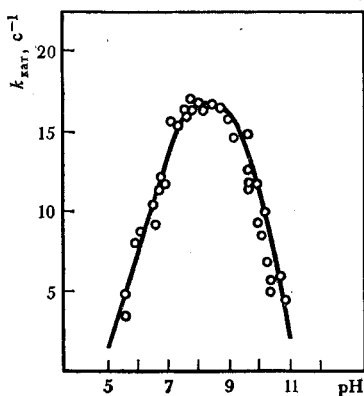


Рис. 107. рН-Зависимость каталитической константы гидролиза бензилпенициллина, катализируемого пенициллинамидазой (по данным А. А. Клёсова и В. К. Швядаса) (кривая — теоретически рассчитанная для значений $\text{p}K_A = 6,1$, $\text{p}K_B = 10,2$)

т. е. логарифм эффективной константы скорости изменяется (падает) пропорционально рН. Фактически функции (6.189) и (6.190) — уравнения прямолинейных касательных к кривой, представляющей рН-профиль константы скорости в логарифмических координатах. Как это следует из (6.189) и (6.190), точка пересечения касательных имеет абсциссу, равную pK'_b (рис. 106, а).

Аналогичным образом можно анализировать экспериментальные данные, подчиняющиеся более сложным рН-зависимым функциям. Для зависимости (6.183), описывающей влияние на кинетику реакции (6.177) двух ионогенных групп, графический анализ дан на рис. 106, б.

В ряде случаев колоколообразная зависимость эффективных кинетических параметров от рН имеет острый максимум (без плато) (рис. 107). Это означает (см. уравнение 6.183), что численные значения констант диссоциации ионогенных групп, контролирующей ферментативную реакцию (K_a и K_b на схеме 6.177), близки, так что раздельное определение этих констант каким-либо из перечисленных графических методов не представляется возможным. В этом случае для определения значений констант диссоциации (а также истинных, не зависящих от рН значений кинетических или равновесных параметров ферментативной реакции) анализ экспериментальных данных следует проводить следующим методом (на примере выражения 6.183):

- 1) приблизительно определить значения K_a и k_2/K_s из левой ветви кривой рН-зависимости с помощью рассмотренных методов;
- 2) приблизительно определить значения K_b и k_2/K_s из правой ветви рН-зависимости;
- 3) провести теоретическую кривую рН-зависимости с использованием найденных значений K_a , K_b и k_2/K_s согласно выражению (6.183);
- 4) варьируя значения K_a , K_b и k_2/K_s , подобрать теоретическую кривую, оптимально удовлетворяющую экспериментальным данным.

В принципе, основным способом проверки и уточнения найденных значений pK (в случае кривых рН-зависимости любой формы) является проведение теоретической кривой рН-зависимости и коррекция ее вплоть до оптимального согласования с результатами эксперимента.

§ 11. Влияние температуры на кинетику действия ферментов

Методы анализа температурных зависимостей кинетических и равновесных параметров ферментативных реакций основываются на классических принципах термодинамики и кинетики [1].

Согласно закону Вант-Гоффа, влияние температуры на константу равновесия химической реакции (K) выражается уравнением

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{\Delta H}{RT} \quad (6.191)$$

или

$$\frac{d \ln K}{d \left(\frac{1}{T} \right)} = - \frac{\Delta H}{R}, \quad (6.192)$$

где ΔH — энтальпия равновесного процесса; R — универсальная газовая постоянная; T — абсолютная температура. Из (6.192) видно, что график зависимости в координатах $(\ln K, 1/T)$ должен иметь вид прямой с тангенсом угла наклона, равным $-\Delta H/R$ (рис. 108). Зная величину энтальпии ΔH и свободную энергию данного равновесного процесса ΔG при данной температуре, найденную из известного соотношения

$$\Delta G = -RT \ln K, \quad (6.193)$$

можно найти величину энтропии процесса

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T}. \quad (6.194)$$

Подобным образом можно анализировать температурные зависимости констант ингибирования или констант диссоциации ионогенных групп активного центра фермента. Однако при анализе зависимостей констант равновесия ферментативной реакции от температуры следует принимать во внимание, что они могут быть эффективными величинами. Так, например, константы Михаэлиса в общем случае не являются истинными константами равновесия даже при наличии двухстадийного механизма ферментативной реакции [см. уравнение (6.7)]. Более того, даже если изучаемый процесс равновесный, его константа равновесия может оказаться эффективной величиной, зависящей, например от pH среды [см. уравнение (6.182)]. В этом случае при корректном анализе температурной зависимости реакции необходимо учитывать теплоты ионизации ионогенных групп субстрата или активного центра фермента.

Все эти рассуждения в равной мере можно отнести и к анализу температурных зависимостей кинетических параметров ферментативных реакций (например, $k_{кат}$), которые зачастую представляют собой комбинации констант скоростей «индивидуальных» процессов [см. уравнение (6.10)], в свою очередь обычно зависящих от pH среды [см., например, (6.181)]. Поэтому изучение температурных зависимостей может представить интерес лишь в том случае, когда известен механизм протекания реакции и установлена его лимитирующая стадия.

Зависимость константы скорости химической реакции от температуры в простейшем виде определяется полуэмпирическим уравнением Аррениуса

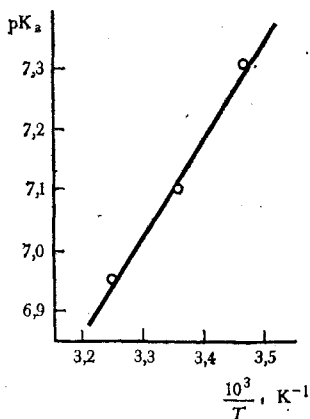


Рис. 108. Определение ΔH ионизации ионогенной группы активного центра трипсина, контролирующей реакцию гидролиза *n*-нитроанилида *N*-бензоил-*L*-аргинина (по данным А. А. Клёсова и В. К. Шведаса)

$$k = k_0 e^{-\frac{E}{RT}}, \quad (6.195)$$

где k_0 — предэкспоненциальный множитель; E — энергия активации. Логарифмируя уравнение (6.195), получим

$$\ln k = \ln k_0 - \frac{E}{RT}. \quad (6.196)$$

Из последнего уравнения видно, что графически зависимость в координатах $(\ln k, 1/T)$ должна выражаться прямой линией, тангенс угла наклона которой равен $-E/R$. Уравнение Аррениуса применяют иногда формально и к температурным зависимостям сложных многостадийных ферментативных процессов. Однако в этих случаях энергия активации является обычно эффективной величиной, не имеющей определенного физического смысла.

Зависимость константы скорости реакции от температуры следует также из теории абсолютных скоростей реакций:

$$k = \kappa \frac{kT}{h} e^{-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}} \quad (6.197)$$

или

$$k = \kappa \frac{kT}{h} e^{\frac{\Delta S^\ddagger}{R}} e^{-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}}, \quad (6.198)$$

где κ — трансмиссионный коэффициент, обычно принимаемый, равным единице (за исключением некоторых специальных случаев); ΔG^\ddagger — стандартная свободная энергия активации (характеризующая изменение свободной энергии системы в стандартных условиях при переходе ее из исходного состояния в активированное); ΔS^\ddagger и ΔH^\ddagger — стандартная энтропия и стандартная энтальпия активации; k — постоянная Больцмана ($1.38 \cdot 10^{16}$ эрг/град); h — постоянная Планка ($6,625 \times 10^{-27}$ эрг/с).

Для вычисления термодинамических активационных параметров ферментативной реакции экспериментальные данные удобно анализировать в координатах $\left(\ln \frac{k}{T}, \frac{1}{T}\right)$.

Как видно из выражения:

$$\ln \frac{k}{T} = \ln \left[\frac{\kappa k}{h} \right] + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT}, \quad (6.199)$$

полученного преобразованием (6.198), тангенс угла наклона прямой в данных координатах равен $-\Delta H^\ddagger/R$. Далее, зная величину свободной энергии активации реакции при 25°C по формуле

$$\Delta G^\ddagger = 0,593(29,4 - \ln k), \quad (6.200)$$

полученной подстановкой численных значений универсальных постоян-

ных в выражение (6.197), приходим к величине стандартной энтропии активации из выражения

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger \quad (6.201)$$

или

$$\Delta S^\ddagger = \frac{\Delta H^\ddagger - \Delta G^\ddagger}{T} \quad (6.202)$$

Следует отметить, что при использовании формулы (6.200) для вычисления ΔG^\ddagger размерность константы скорости реакции должна быть с^{-1} или $\text{М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ для реакций первого или второго порядка соответственно, так как при расчетах числовых коэффициентов в этой формуле постоянная Планка использовалась в размерности эрг·с.

Графики в координатах $(\ln k, 1/T)$ или $(\ln \frac{k}{T}, 1/T)$ для ферментативных реакций зачастую имеют вид линии с изломами. Наличие подобных изломов на аррениусовской зависимости можно объяснить как сменой лимитирующей стадии реакции при изменении температуры, так и переходом активного центра молекулы фермента в узком температурном интервале в другое конформационное состояние, обладающее другой каталитической активностью.

Ферментативные реакции характеризуются также наличием колоколообразной зависимости скорости реакции от температуры в достаточно широком температурном интервале (что приводит к температурному оптимуму реакции). Эта особенность влияния температуры на кинетику ферментативных реакций объясняется наложением двух эффектов — возрастанием скорости реакции при увеличении температуры и ускорением тепловой денатурации белковой молекулы, приводящей к инактивации фермента при высоких температурах. Ясно, что при достаточно корректной постановке эксперимента оба эти явления можно изучать раздельно (см., например, § 9 этой главы).

ЛИТЕРАТУРА К ГЛ. VI

1. Эмануэль Н. М., Кнорре Д. Г. Курс химической кинетики. М., «Высшая школа», 1974.
2. Peller L., Alberty R. A. J. Am. Chem. Soc., **81**, 5907 (1959).
3. Huribut J. A., Ball T. N., Round H. C., Graves J. L. J. Chem. Educ., **50**, 149 (1973).
4. Femfert U., Cichoski P. FEBS Letters, **27**, 219 (1972).
5. Яковлев В. А. Кинетика ферментативного катализа. М., «Наука», 1965, с. 42.
6. Березин И. В., Мартинек К. Мол. биол., **5**, 347 (1971).
7. Folk J. E., Wolff E. C., Schirmer E. W., Cornfield J. J. Biol. Chem., **237**, 3105 (1962).
8. Березин И. В., Мартинек К. Теор. эксп. химия, **3**, 458 (1967).
9. Бресткин А. П., Новикова Н. В., Прокофьева Е. Г., Ржегина Н. И. Биохимия, **26**, 266 (1961).
10. Березин И. В., Клёсов А. А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. Изд-во МГУ, 1976.
11. Katsumata M. J. Theor. Biol., **24**, 294 (1969).

12. Узбб Л. Ингибиторы ферментов и метаболизма. М., «Мир», 1966.
13. Березин И. В., Вилль Х., Мартинек К., Яцимирский А. К. Докл. АН СССР, **179**, 214 (1968).
14. Березин И. В., Мартинек К. Структура и функция ферментов. Вып. I. Изд-во МГУ, 1972, с. 20.
15. Мартинек К., Яцимирский А. К., Березин И. В. Мол. биол., **5**, 96 (1971).
16. Berezin I. V., Kazanskaya N. F., Klyosov A. A. FEBS Letters, **15**, 121 (1971).
17. Walker A. C., Schmidt C. L. A. Arch. Biochem., **5**, 445 (1944).
18. Jennings R. R., Niemann C. J. Amer. Chem. Soc., **77**, 5432 (1955).
19. Fleisher G. A., J. Amer. Chem. Soc., **75**, 4487 (1953).
20. Booman K. A., Niemann C. J. Amer. Chem. Soc., **77**, 5733 (1955).
21. Banfield J. E. J. Chem. Soc., **1964**, 383.
22. Schwert G. W. J. Biol. Chem., **244**, 1278 (1969).
23. Клёсов А. А., Березин И. В. Биохимия, **37**, 170 (1972).
24. Spoke J. E., Neurath H. J. Biol. Chem., **181**, 789 (1949).
25. Foster R. J., Niemann C. Proc. Natl. Acad. Sci. US., **39**, 999 (1953).
26. Roy A. B. Biochim. Biophys. Acta, **276**, 488 (1972).
27. Kaplan H., Laidler K. J. Can. J. Chem., **45**, 539 (1967).
28. Kasserra H. P., Laidler K. J. Can. J. Chem., **47**, 4021 (1969).
29. Koehler K. A., Lienhard G. E. Biochemistry, **10**, 2477 (1971).
30. Hersh J. B., Stark M. J., Worthen S., Fiero M. K. Arch. Biochem. Biophys., **150**, 219 (1972).
31. Kyrtopoulos S. A., Satchell D. P. N. Biochim. Biophys. Acta, **276**, 383 (1972).
32. Унковский Б. В., Черкасова Е. М., Луцык А. И., Богатков С. В., Соколова Т. Д., Малина Ю. Ф. Биохимия, **37**, 1156 (1972).
33. Lasch J., Kudernatsch W., Hanson H. Eur. J. Biochem., **34**, 53 (1973).
34. Rosenberg T. L., Bernhard S. A. Biochemistry, **11**, 4308 (1972).
35. Oesch F., Kaubisch N., Jerina D. M., Daly J. W. Biochemistry, **10**, 4858 (1971).
36. Martinek K., Klyosov A. A., Berezin I. V. Int. J. Chem. Kin., **6**, 801 (1974).
37. Fuller R. W., Marsh M. M. J. Med. Chem., **15**, 1068 (1972).
38. Nakata H., Yoshida N., Narahashi Y., Ishii S. J. Biochem., **71**, 1085 (1972).
39. Seydoux F. Eur. J. Biochem., **17**, 209 (1970).
40. Диксон М., Узбб Э. Ферменты. М., «Мир», 1966, с. 58.
41. Rocklington T., Jeffery J. Biochem. J., **112**, 331 (1969).
42. Inagami T., Sturtevant J. M. Biochemistry, **4**, 1330 (1965).
43. Jennings R. R., Niemann C. J. Amer. Chem. Soc., **75**, 4687 (1953).
44. Bender M. L., Schonbaum G. R., Zerner B. J. Amer. Chem. Soc., **84**, 2562 (1962).
45. Cole P. W., Mukarami K., Inagami T. Biochemistry, **10**, 4246 (1971).

Наиболее полную информацию о кинетике ферментативных реакций дает изучение их протекания в нестационарном режиме (см. гл. V). Исследование стационарной кинетики ферментативных процессов имеет ограниченное значение для понимания многостадийного механизма действия ферментов. Это связано прежде всего с тем, что в общем случае невозможно однозначно приписать экспериментально определяемые значения констант скоростей индивидуальным химическим стадиям (см. § 1 гл. V и VI). Тем не менее кинетические параметры типа $k_{\text{кат}} = V/[E]_0$ и $K_{m, \text{ каж}}$, которые, следуют из основного уравнения стационарной кинетики — из уравнения Михаэлиса (6.8), как показал Альберти с сотр. [1], позволяют оценить **нижний предел** константы скорости любой индивидуальной стадии ферментативной реакции [типа (6.9) или даже более сложного обратимого процесса (5.16)].

Так, из уравнений (6.10) следует, что эффективная константа скорости второго порядка, характеризующая общую скорость процесса при $[S]_0 \ll K_{m, \text{ каж}}$ [см. уравнение (6.8)], определяется простым выражением

$$\frac{k_{\text{кат}}}{K_{m, \text{ каж}}} = k_1 \frac{k_2}{k_{-1} + k_2} \quad (7.1)$$

независимо от числа n промежуточных соединений в реакции (6.9). Поскольку дробь в правой части уравнения (7.1) всегда меньше единицы (или приблизительно ей равна при $k_{-1} \ll k_2$), то можно заключить, что

$$k_1 \geq \frac{k_{\text{кат}}}{K_{m, \text{ каж}}} \quad (7.2)$$

Иными словами, отношение $k_{\text{кат}}/K_{m, \text{ каж}}$, которое можно найти из стационарной кинетики (см. гл. VI), — это нижний предел константы скорости k_1 бимолекулярной стадии ферментативного процесса.

Аналогичным образом на основании уравнения (6.10) можно заключить, что

$$k_i \geq k_{\text{кат}}, \quad i \neq 1, \quad (7.3)$$

т. е. константа скорости k_i любой стадии первого порядка в реакции (6.9) не может быть меньше наблюдаемого на опыте параметра $k_{\text{кат}}$. Рассмотрим соотношения (7.2) и (7.3) по отдельности с привлечением экспериментальных данных.

§ 1. Реакции второго порядка (бимолекулярные стадии)

В табл. 33 приведены эффективные константы скорости второго порядка $k_{\text{кат}}/K_{\text{т, каж}}$, найденные из стационарной кинетики ряда ферментативных процессов. Несмотря на большие различия в химическом механизме катализируемых реакций (гидролиз, элиминирование или присоединение воды, окислительно-восстановительные процессы), наблюдаемые константы скорости обнаруживают удивительное единообразие, приближаясь для лучших (наиболее реакционных) субстратов того или другого фермента к одному и тому же пределу порядка 10^6 — 10^8 $\text{M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Это наводит на мысль, что скоростьюлимитирующая стадия всех этих разнообразных химических механизмов одна и та же.

Таблица 33

Эффективные константы скорости второго порядка ферментативной реакции

Фермент	Субстрат	$k_{\text{кат}}/K_{\text{т, каж}}$ $\text{M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$	Литература
α -Амилаза	Амилоза	$5,8 \cdot 10^7$	[1]
Уреаза	Мочевина	$5,0 \cdot 10^8$	[1]
АТФ-аза	АТФ	$8 \cdot 10^8$	[1]
Ацетилхолинэстераза	Ацетилхолин	$6,5 \cdot 10^8$	[1]
α -Химотрипсин	Амид N-бензоил-L-тирози- на	15	См. табл. 2
»	Этиловый эфир N-аце- тил-L-фенилаланина	10^5	См. табл. 28
»	<i>n</i> -Нитрофениловый эфир N-карбобензокси-L-тиро- зина	$2 \cdot 10^7$	[2]
Фумаратгидратаза	L-малат	$1,6 \cdot 10^8$	[1]
»	Фумарат в отсутствие соли	$3 \cdot 10^{10}$	[1]
Цитохром С редуктаза	Цитохром С	$9 \cdot 10^7$	[1]
Цитохром С оксидаза	Цитохром С	$4 \cdot 10^7$	[3]
Каталаза · H_2O_2	Перекись водорода	$5,6 \cdot 10^8$	[4]
»	»	$1,5 \cdot 10^7$	[5]
»	Этиловый спирт	10^3	[6]
Пероксидаза · H_2O_2	Гидрохинон	$2,5 \cdot 10^8$	[7]
»	Цитохром С	$1,2 \cdot 10^8$	[8]
»	Аскорбиновая кислота	$2,8 \cdot 10^3$	[6]

Другой важный результат был получен методами нестационарной кинетики — это константы скоростей весьма быстрой бимолекулярной стадии образования промежуточного фермент-субстратного комплекса (табл. 34). Можно было бы думать, согласно (7.2), что эти значения гораздо больше величины, которую дает оценка их нижнего предела. Однако из табл. 34 видно, что наиболее распространенные значения $k_1 = 10^6$ — 10^8 $\text{M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ и, следовательно, они того же порядка, что и величины $k_{\text{кат}}/K_{\text{т, каж}}$, определяющие общую скорость ферментативной реакции (см. табл. 33).

На этом основании следует заключить, что скорость многих химических реакций, катализируемых ферментами, настолько велика, что ее лимитирует физический процесс сорбции (образование фермент-субстратного комплекса). В связи с этим рассмотрим, какой предел скорости предсказывает теория реакций, контролируемых диффузией реагентов.

Скорости диффузионно-контролируемых реакций. Теоретическое рассмотрение скорости бимолекулярной реакции, каждое столкновение реагентов в которой приводит к образованию продукта, дает [26—28] следующее выражение для константы скорости реакции:

$$k = \frac{4\pi N}{10^3} R_{1,2} D_{1,2}, \quad (7.4)$$

где k — константа скорости, $M^{-1} \cdot c^{-1}$, N — число Авогадро; $R_{1,2}$ — «радиус реакции», т. е. сумма радиусов реагирующих веществ; $D_{1,2}$ — сумма коэффициентов диффузии реагирующих веществ. При анализе скоростей ферментативных реакций [29] сделаны необходимые поправки к уравнению (7.4), связанные с ограниченными размерами активного центра на поверхности белковой глобулы. Кроме того, в случае, если фермент и субстрат несут на себе электростатические заряды, константа скорости принимает другой вид:

$$k = \frac{4\pi D_{1,2}}{10^3} \cdot \frac{N}{\int_{R_{1,2}}^{\infty} e^{\frac{U(r)}{kT} \cdot \frac{dr}{r^2}}, \quad (7.5)$$

где $U(r)$ — потенциальная энергия взаимодействия зарядов, расположенных на расстоянии r . Функцию $U(r)$ можно записать как для случая, когда заряд локализован в активном центре фермента [29], так и с учетом общего заряда глобулы [30].

Рассмотрим в качестве примера реакцию фумарата на активном центре фумарат-гидратазы [1]. Коэффициент диффузии фермента и субстрата, соответственно, равен $4,5 \cdot 10^{-7} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ и $9,3 \cdot 10^{-6} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$. Принимая $(R_1 + R_2)$ равным примерно 5 \AA и полагая, что фумарат-ион взаимодействует с 2—3 положительными зарядами на активном центре фермента, можно вычислить предельную константу скорости $(0,8—1,5) \cdot 10^{10} M^{-1} \cdot c^{-1}$. С учетом того, что в одной молекуле фумаратгидратазы имеется, по крайней мере, шесть активных центров, теория диффузионно-контролируемых реакций удовлетворительно описывает экспериментальное значение константы скорости (см. табл. 33).

В случае высокомолекулярных субстратов существенное уменьшение константы скорости бимолекулярных реакций определяется уменьшением коэффициентов диффузии. Для ферментативного окисления ферроцитохрома С перекисью водорода с помощью цитохрома С пероксидазы теория реакций, контролируемых диффузией, при использовании параметров $D_{1,2} = 10^{-6} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ и $R_{1,2} = 5 \text{ \AA}$ удовлетворительно описывает экспериментальные данные ($k_{\text{эксп}} = 1,2 \cdot 10^8 M^{-1} \cdot c^{-1}$, $k_{\text{теор}} = 2 \cdot 10^8 M^{-1} \cdot c^{-1}$) [29].

Константы скоростей комплексообразования субстратов (или их аналогов) с различными ферментами [см. схему (6.9)]

Фермент	Субстрат	$k_1, M^{-1} \cdot c^{-1}$	k_{-1}, c^{-1}	Литература
Аспаратаминотрансфераза	Глутаминовая, аспарагиновая кислоты	10^7-10^8	10^5-10^6	[9]
	Щавелевоуксусная, кетоглутаровая кислоты	$1 \cdot 10^8$	10^4	[9]
	α -Метиласпарагиновая кислота	$1,2 \cdot 10^4$	130	[10]
	Эритро- β -оксиаспарагиновая кислота	$3,1 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^4$	[11]
Аспараттранскарбамоилаза	Гидроксиламин	$3,7 \cdot 10^6$	62	[12]
	Бромцитидинфосфат	$1,2 \cdot 10^7$	510	[13]
	Бромцитидинтрифосфат	$6,9 \cdot 10^6$	450	[13]
	Карбамоилфосфат	$2,4 \cdot 10^8$	$9,5 \cdot 10^3$	[13]
Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	НАД	$1,9 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^3$	[14]
	НАДН	$1,37 \cdot 10^6$	210	[14]
Креатинкиназа	АДФ	$2,2 \cdot 10^7$	$1,8 \cdot 10^4$	[15]
Каталаза	Перекись водорода	$5 \cdot 10^6$	—	[5]
		$3 \cdot 10^6$	—	[4]
Лактатдегидрогеназы	НАДН	10^9	10^4	[16]
		$2 \cdot 10^7$	10^2	[17]
«Желтый» фермент	Флавинмоноклеотид	$1,5 \cdot 10^6$	10^4	[18]
Пируваткарбоксилаза	Пируват	$4,5 \cdot 10^6$	$2,1 \cdot 10^4$	[19]
Пируваткиназа	Фторфосфат	$1,3 \cdot 10^7$	$3,4 \cdot 10^4$	[20]
Рибонуклеаза	Цитидин-3'-фосфат	$4,6 \cdot 10^7$	$4,2 \cdot 10^3$	[21]
	Уридин-3'-фосфат	$7,8 \cdot 10^7$	$1,1 \cdot 10^4$	[21]
	Цитидин-2', 3'-циклофосфат	$2 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^4$	[22]
	Уридин-2', 3'-циклофосфат	$1 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^4$	[22]
	Цитидинил-3', 5'-цитидин	$1,4 \cdot 10^7$	$7 \cdot 10^3$	[23]
Пероксидаза	Перекись водорода	$9 \cdot 10^6$	—	[24]
	Химотрипсин	Фурилакритоил- <i>L</i> -триптофанамид	$6,2 \cdot 10^6$	$2,7 \cdot 10^3$

Таким образом, бимолекулярные стадии ферментативных реакций, для которых величины констант скоростей лежат в диапазоне $10^8 M^{-1} \cdot c^{-1} - 10^{10} M^{-1} \cdot c^{-1}$, должны быть отнесены к реакциям, контролируемым диффузией реагентов в растворе. Как видно из табл. 34, в большинстве случаев константы скорости образования фермент-субстратных комплексов (k_1) ниже этого предела. Это связано, как правило, со стерическими затруднениями, которые накладывает структура активного центра на скорость процесса комплексообразования (см. § 7 гл. I). На это указывает, в частности, высокая чувствительность этой константы скорости к структуре органического лиганда. Например, введение в аспарагиновую кислоту α -метильной группы почти в 10^4 раз уменьшает константу скорости комплексообразования этого субстрата с активным центром аспаратаминотрансферазы (см. табл. 34).

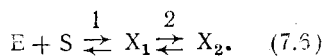
§ 2. Реакции первого порядка (псевдомолекулярные стадии)

Проанализируем в рамках соотношения (7.3) имеющиеся в литературе [31—35] данные по максимальным скоростям ферментативных реакций. Для различных ферментов значения $k_{\text{кат}}$ изменяются от 1 до 10^7 с^{-1} . Если провести статистический анализ констант скоростей, наблюдаемых в реакциях около 50 ферментов, приведенных в обзор [34, 35], то окажется, что наиболее часто встречаются ферменты с лимитирующей константой скорости $1 \cdot 10^{-2}—5 \cdot 10^{-2} \text{ с}^{-1}$. Это иллюстрирует рис. 109.

Какова природа псевдомолекулярных («внутримолекулярных») процессов, ограничивающих (лимитирующих) общую скорость ферментативной реакции? Это могут быть как физические процессы медленных конформационных изменений в белковой глобуле [36], так и химические стадии переноса протона (или, соответственно, электрона) между реагирующими группами [37, 38].

Кинетика конформационных изменений в ферментативных реакциях. Как известно, белковые молекулы обладают набором конформационных степеней свободы [36]. Фактически речь идет о том, что белковая глобула может существовать в нескольких конформационных состояниях, равновесие между которыми устанавливается во времени. Соответствующие конформационные состояния активного центра могут отличаться как по сорбционной, так и реакционной способности в отношении субстрата или эффектора. Следовательно, кинетика конформационных изменений может отражаться в общей скорости ферментативной реакции.

Рассмотрим простейший случай, когда связывание субстрата (или эффектора) с ферментом протекает по двухстадийному механизму:



Первая стадия реакции (7.6) это диффузионно контролируемый процесс, а стадия 2 — конформационное изменение первично образовавшегося комплекса X_1 . Для ряда ферментов конформационное изменение $X_1 \rightleftharpoons X_2$ (в данном случае индуцированное субстратом или эффектором) — необходимое условие для проявления каталитической активности.

Для некоторых ферментативных реакций времена полупре-

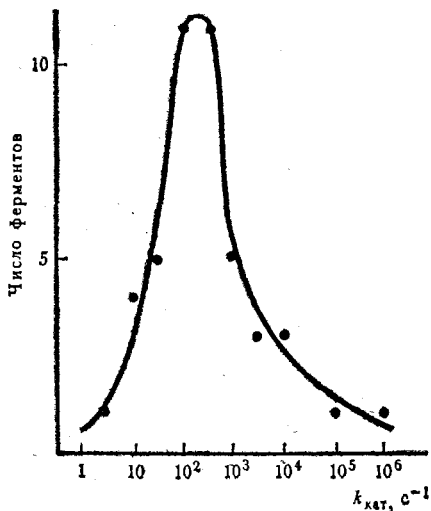


Рис. 109. Статистический анализ значений $k_{\text{кат}}$ [22, 49] для примерно 50 ферментов

вращения, характеризующие вторую стадию реакции (7.6), приведены в табл. 35. Из этих данных видно, что конформационные изменения во многих случаях протекают достаточно быстро (быстрее, чем лимитирующая стадия катализа). Однако в некоторых случаях это достаточно медленные процессы, которые в принципе могут лимитировать общую скорость ферментативной реакции.

Стадии переноса протона в ферментативном катализе. Характерная особенность ферментативных реакций — участие в активных центрах многих ферментов в качестве каталитически активных групп сильных кислот и оснований. Основные закономерности кислотно-основного катализа в ферментативном действии рассмотрены в гл. II. Здесь остановимся на кинетике элементарной стадии переноса протона.

Для обычных O, S, N кислот реакции обмена протона с основаниями и иона гидроксила с кислотой не зависят от основности или кислотности реагентов и представляют собой исключительно быстрые процессы, контролируемые диффузией ($k \cong 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$) [38]. Следует, однако, учесть, что каталитически активная группа претерпевает в реакции не только протонирование, но и депротонирование [37]:



Константы скорости прямых стадий можно найти из pK_a соответствующей функциональной группы и константы скорости обратной (диффузионно-контролируемой) реакции в виде $10^{10} K_a \cdot \text{c}^{-1}$ и $(10^{10} \cdot K_w)/K_a \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ соответственно, где K_a — константа кислотной диссоциации BH^+ ; K_w — константа ионизации воды. Константа скорости всего процесса имеет максимальное значение, равное $\sim 10^3 \text{ c}^{-1}$, при условии $K_a = 10^{-7} \text{ M}$. Действительно, при $K_a < 10^{-7} \text{ M}$ меньше, чем 10^3 c^{-1} , становится константа скорости диссоциации кислоты BH^+ (реакция а); с другой стороны, если $K_a > 10^{-7} \text{ M}$, меньше, чем предельное значение 10^3 c^{-1} , становится константа скорости гидролиза основания (реакция б). Таким образом, максимальная константа скорости кислотно-основного катализа с участием воды равна 10^3 c^{-1} .

Значение 10^3 c^{-1} характерно для величины $k_{\text{кат}}$ многих ферментов (см. рис. 109). Кроме того, укажем, что оптимальное значение $pK_a \sim 7$, необходимое для эффективного катализа, соответствует pK_a имидазольной группы остатка гистидина (который входит, как известно, в активный центр многих ферментов) [34, 44]. На этом основании Эйген и Хаммес полагают, что максимальная скорость ферментативного катализа ограничена скоростью элементарной стадии переноса протона (в кислотно-основных механизмах катализа) [37].

* * *

В гл. I мы указывали, что реакции, катализируемые ферментами, достигают **относительно** высоких скоростей, поскольку превосходят каталитические неферментативные реакции по скорости более чем в 10^{10} раз. Кинетический анализ ферментативных механизмов позволяет при-

ти к выводу, что и по абсолютным скоростям ферменты представляют собой непревзойденные катализаторы: 1) скорости реакций второго порядка (протекающих при достаточно малых концентрациях субстрата) достигают предела, предсказанного теорией процессов, катализируемых диффузией; 2) скорость химической реакции первого порядка (при насыщении фермента субстратом) лимитируют либо физические процессы типа конформационных переходов в структуре активного центра, либо элементарные процессы типа депротонирования функциональных групп, принимающих участие в общем кислотно-основном катализе.

Таблица 35

Кинетика конформационных переходов в некоторых ферментативных системах

Фермент	Субстрат или эффектор	Обратное значение времени конформационного изменения, с ⁻¹	Литература
Алкогольдегидрогеназа	НАДН	10 ³	[41]
Аспаратаминотрансфераза	α -Метиласпарагиновая кислота	10 ²	[10]
	Эритро- β -оксиспарагиновая кислота	10—10 ³	[12]
Аспараттранскарбамоилаза	Сукцинат, L-малеиновая кислота, карбамоилфосфат	10 ² —10 ⁴	[13]
Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	НАД	1	[14]
Креатинкиназа	АДФ, Mg—АДФ, Ca—АДФ, Mn—АДФ, АТФ	10 ⁴	[15]
Лактатдегидрогеназа	НАДН	10 ³	[16]
Лизоцим	(N-ацетил- β -глюкозамин) ₂	10 ⁴	[42]
Малатдегидрогеназа	НАДН, D-малат	10 ³ , 10	[13]
Пероксидаза	H ₂ O ₂ , метил- или этилгидроперекиси	10	[24]
Пируваткиназа	Mg ²⁺ , Mn ²⁺	10 ⁴	[13]
Рибонуклеаза	Цитидин-3'-фосфат, уридин-3'-фосфат, цитидин-2'-3'-циклофосфат, уридин-2'-3'-циклофосфат, цитидил-3'-5'-цитидин	10 ³ —10 ⁴	[13]
Химотрипсин	Профлавин, фурилакрилоилтриптофанамид	10 ⁴ , 10 ²	[25, 39, 40]
Щелочная фосфатаза	2-окси-5-нитробензилфосфат	10 ²	[43]

ЛИТЕРАТУРА К ГЛ. VII

1. Peller L., Alberty R. A. J. Amer. Chem. Soc., **81**, 5907 (1959).
2. Phillip M., Bender M. L. Nature — New Biology, **241**, 44 (1973).
3. Wood P. M. Biochem. Biophys. Acta, **357**, 370 (1974).
4. Zidoni E., Kremer M. L. Arch. Biochem. Biophys., **161**, 658 (1974).
5. Chance B. In «Currents in Biochemical Research» (D. E. Green, ed.). New York, Interscience Publ., 1956, p. 308.
6. Roughton F. Y. W., Chance B. In «Technique of Organic Chemistry» (S. Triess, A. Lewis, A. Weisberger, eds.). V. 2, New York, Interscience, 1969.

7. Chance B. Arch. Biochem., 24, 410 (1949).
8. Chance B. In «Enzymes and Enzymology Systems» (J. T. Edsal, ed.), Cambridge, Harvard University Press, 1951.
9. Fasella P., Hammes G. G. Biochemistry, 6, 1789 (1967).
10. Hammes G. G., Haslam J. L. Biochemistry, 7, 1519 (1968).
11. Hammes G. G., Haslam J. L. Biochemistry, 8, 1591 (1969).
12. Hammes G. G., Fasella P. J. Amer. Chem. Soc., 85, 3929 (1964).
13. Hammes G. G. Application and Significance of Modern Methods for the Investigation of Fast Reaction Kinetics. 8th International Congress in Chemistry of Natural Products, Riga, 1970.
14. Kirschner K., Eigen M., Bittman R., Voigt B. Proc. Nat. Acad. Sci. US, 56, 1661 (1966).
15. Hammes G. G., Hurst J. K. Biochemistry, 8, 1083 (1969).
16. Czerlinski G. H., Schreck G. J. Biol. Chem., 259, 913 (1964).
17. Schwert G. W., Millar B. R., Peanasky C. J. Biol. Chem., 242, 3245 (1967).
18. Theorell H., Nygaard A. Acta Chem. Scand., 8, 1649 (1954).
19. Mildvan A. S., Scrutton M. C. Biochemistry, 6, 2978 (1967).
20. Mildvan A. S., Leigh J. C., Cohn M. Biochemistry, 6, 1805 (1967).
21. Hammes G. G., Walz F. G. J. Am. Chem. Soc., 91, 7179 (1970).
22. Erman J. E., Hammes G. G. J. Am. Chem. Soc., 88, 5607 (1966).
23. Erman J. E., Hammes G. G. J. Am. Chem. Soc., 88, 5614 (1966).
24. Chance B. Arch. Biochem., 22, 424 (1949).
25. Hess G. P., McConny Y., Kue, McConkey G. Phil. Trans. Roy. Soc., B 257, 89 (1970).
26. Smoluchowski M. V. Z. Physic. Chem., 92, 129 (1917).
27. Debye P. Trans. Electrochem. Soc., 82, 269 (1941).
28. Collins F. C. J. Colloid Sci., 5, 499 (1950).
29. Alberty R. A., Hammes G. G. J. Phys. Chem., 62, 154 (1959).
30. Hammes G. G., Alberty R. A. J. Phys. Chem., 63, 274 (1959).
31. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты, М., «Мир», 1966.
32. Dickens F. In «The Enzymes» (eds. J. B. Sumner, K. Myrbäck). V. 2, New York, Academic Press, 1951.
33. Racker E. Adv. Enzymol., 15, 141 (1954).
34. Полторако О. М., Чухрай Е. С. Физико-химические основы ферментативного катализа. М., «Высшая школа», 1971.
35. Березин И. В., Варфоломеев С. Д., Мартинек К. Усп. хим., 43, 835 (1974).
36. Блюменфельд Л. А. Биофизика, 17, 954 (1972).
37. Eigen M., Hammes G. G. Adv. Enzymol., 25, 1 (1963).
38. Колдин Е. Быстрые реакции в растворе. М., «Мир», 1966.
39. Nysteen B. Conformational Changes in Enzymes, Accompanying Catalysis. Aarhus, University Press, 1968.
40. Nysteen B. H. J. Biol. Chem., 242, 769 (1967).
41. Czerlinski G. H. Biochim. Biophys. Acta., 64, 199 (1967).
42. Haller E., Rupley J. R., Hess G. P. Biochem. Biophys. Res. Commun., 37, 42 (1969).
43. Halford S. E., Bennet N. G., Frentham D. R., Gutfreund H. Biochem. J., 114, 243 (1969).
44. Дженкс В. Катализ в химии и энзимологии. М., «Мир», 1972.

УКАЗАТЕЛЬ ИСПОЛЪЗУЕМЫХ НАИМЕНОВАНИЙ ФЕРМЕНТОВ

(в скобках даны шифры ферментов согласно классификации)

- | | |
|--|--|
| <p>Алкогольдегидрогеназа (1.1.1.1.)
6, 24, 274</p> <p>Альдолаза (4.1.2.7.) 22</p> <p>α-Амилаза (3.2.1.1.) 269, 271, 274</p> <p>Арилсульфатаза (3.1.6.1.) 243, 258</p> <p>Аспартаминотрансфераза (2.6.1.1.)
29, 30, 212, 213, 271, 274</p> <p>Аспараттранскарбамоилаза (2.1.3.2.)
24, 30, 271, 274</p> <p>АТФ-аза (3.6.1.4.) 269</p> <p>Ацетилхолинэстераза (3.1.1.7.) 45,
226, 269</p> <p>Бутандиолдегидрогеназа (1.1.) 7</p> <p>β-Галактозидаза (3.2.1.23.) 43</p> <p>Гексокиназа (2.7.1.1.) 6</p> <p>Глицеральдегид-3-фосфатдегидро-
геназа (1.2.1.9.) 271, 274</p> <p>Глутаматдегидрогеназа (1.4.1.2.) 220</p> <p>Дегидрогеназы (1.1.1.) 22</p> <p>Карбоангидраза (4.2.1.1.) 68</p> <p>Карбоксипептидаза А (3.4.2.1.) 6,
17, 18, 19, 20, 24, 46, 61, 65, 68,
1253</p> <p>Карбоксипептидаза В (3.4.2.2.) 225</p> <p>Каталаза (1.11.1.6.) 180, 269, 271</p> <p>Кластрицин (3.4.4.) 262</p> <p>Кортизонредуктаза (1.3.1.3.) 231</p> <p>Коэнзим А синтетаза (6.2.) 45</p> <p>Креатинкиназа (2.7.3.2.) 6, 271, 274</p> <p>Лактатдегидрогеназы (1.1.1.27.) 29
271, 274</p> <p>Лейцинаминопептидаза (3.4.1.1.) 221</p> <p>Лизоцим (3.2.1.17.) 9, 10, 22, 47,
68, 218, 234, 274</p> <p>Липоксигеназа (1.99.2.1.) 27, 45</p> <p>Малатдегидрогеназа (1.1.1.37.) 274</p> <p>N-метилтрансфераза (2.1.1.) 235</p> | <p>Миозин (3.6.1.3.) 6</p> <p>Папаин (3.4.4.10.) 18, 19, 23, 49,
65, 68, 223</p> <p>Пенициллин-амидаза (3.5.1.11.) 253,
262</p> <p>Пепсин (3.4.4.1.) 6, 7, 45, 59, 60</p> <p>Пероксидаза (1.11.1.7.) 271</p> <p>Пируваткарбоксилаза (6.4.1.1.) 271</p> <p>Пируваткиназа (2.7.1.40.) 32, 271,
274</p> <p>Протеазы сериновые (3.4.4.) 35, 47</p> <p>Рибонуклеаза (2.7.7.16.) 22, 68, 271,
274</p> <p>Субтилизин (3.4.4.16.) 48, 79</p> <p>Трипсин (3.4.4.4.) 22, 35, 44, 45,
46, 239, 264</p> <p>Уреаза (3.5.1.5.) 6, 7, 269</p> <p>Фосфатацетилтрансфераза (2.3.1.8.)
220</p> <p>Фосфоорилаза (2.4.) 6</p> <p>Фумаратгидратаза (4.2.1.2.) 269, 270</p> <p>α-Химотрипсин (3.4.4.5.) 6, 12,
13, 20, 21, 22, 23, 30, 35, 45,
48, 102, 120, 126, 184, 197,
198, 210, 234, 245, 246, 247,
248, 261, 269, 271, 274</p> <p>Холинэстераза (3.1.1.8.) 221</p> <p>Цитохром P-450 (1.99.) 45</p> <p>Цитохром С оксидаза (1.9.3.1.) 270</p> <p>Цитохром С пероксидаза (1.11.1.5.)
270</p> <p>Цитохром С редуктаза (1.6.2.1.) 270</p> <p>Щелочная фосфатаза (3.1.3.1.) 239,
274</p> <p>Эластаза (3.4.4.7.) 35</p> <p>Эпоксидгидраза (4.2.) 223</p> |
|--|--|

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- | | |
|---|--|
| <p>Аденозиндифосфат (АДФ) 16; 271,
274</p> <p>Аденозинтрифосфат (АТФ) 16, 269</p> <p>Активация</p> <p>— бесконкурентная 223</p> <p>— неконкурентная 221</p> <p>— синергистическая 222</p> <p>— смешанная 224</p> <p>— субстратом 239</p> <p>Активный центр</p> <p>— — включение молекул воды 21</p> <p>— — диэлектрическая проницае-
мость 21</p> <p>— — ионы металлов 17</p> | <p>— — механизм действия 34</p> <p>— — механизм связывания 23</p> <p>— — микровязкость 22</p> <p>— — микрогетерогенность 20</p> <p>— — микросреда 20</p> <p>— — напряженность поля 21</p> <p>— — подвижность связанных моле-
кул 22</p> <p>— — полярность 21</p> <p>— — пространственная разделен-
ность функциональных обла-
стей 36, 147</p> <p>— — строение 17</p> <p>— — титрование 196, 232</p> |
|---|--|

Активный центр
— — функциональные участки 35
— — электростатический потенциал 21
Альбумин 22, 24
Альфа-спираль 11
Аминокислоты 8
Анри, схема реакции 189, 190
Аскорбиновая кислота 17
Аспирин 85
Ацилфермент 129, 131, 136
Белки
— молекулярная масса 8
— структура 7
— — первичная 9
— — вторичная 9
— — третичная 11
— — четвертичная 12
Бета-структура 11, 14
Водородная связь
— — в молекулах белков 12
— — в переходном состоянии реакции 46, 136
— — в α -спирали 11
— — при сорбции лиганда на ферменте 29
Внутримолекулярные реакции 52, 54, 64, 78
Вульфа координаты 218
Гем 14
Гидрофобное взаимодействие
— — в молекулах белков 12
— — в переходном состоянии реакции 43, 75, 158
— — при сорбции лиганда на ферменте 26, 138
— — экстракционная модель 27
Глобула 11, 12
Дикарбоновых кислот моноэфиры 82, 84, 85
Дисульфидная связь 9, 13
Диффузия реагентов 29, 31, 37, 89, 270—271, 273
Иди координаты 218
Имидазол
— ацилирование 73, 75, 96, 101, 107, 108, 109, 117, 119, 120
— в активном центре химотрипсина 130
— внутримолекулярные реакции 92
— гидролиз ацилимидазола 62
— скорость ионизации 273
Инактивация фермента 254
Ингибирование
— бесконкурентное 220
— двухкомпонентное 227
— конкурентное 219, 225
— неконкурентное 220
— продуктом реакции 251
— смешанное 224
— субстратом 235

Катализ
— амидной группой 90
— аминогруппой 91
— внутримолекулярный 82
— гидроксильной группой 93
— имидазольной группой 92
— карбоксильной группой 82
— ковалентный 66
— мицеллами 114
— общекислотный 61, 62, 86, 95, 273
— основоосновной 61—63, 86, 95, 273
— оксианионами 100
— полимерами 103
— полифункциональный 61, 94, 121
— полиэлектролитами 106
— циклоамилозами 110
Комплекс Михаэлиса 34, 40, 50
Комплекс с переносом заряда в переходном состоянии реакции 77
Комплекс фермент — лиганд
— — — водородная связь 29
— — — гидрофобное взаимодействие 26
— — — механизм образования 23, 30
— — — многоточечный 23
— — — подвижность лиганда 24
— — — прочность 24
— — — рентгеноструктурный анализ 19
— — — свободная энергия образования 24
— — — скорость образования 29
— — — электростатическое взаимодействие 28
— — — энтропия образования 25, 26, 52
Конформационные переходы в ферментах 24, 59—61, 240, 272—274
Кофакторы 13
Коферменты 16
Коэффициент распределения 115, 139
Лактонизация оксикислот 79—81
Лайнувера—Бёрка координаты 218
Малеиновой кислоты моноамид, производные 87
Металлопротеиды 17
Метод
— непрерывной струи 205
— остановленной струи 205
— релаксационный 214
— температурного скачка 213
— ускоренной струи 205
— Хофсти 218

- Механизм
 — «дыбы» 60
 — индуцированного соответствия 59
 — напряжения 59, 81, 89 113
 — «пуш-пульный» 65
 — сближения 50
 — сорбции 23
 Миоглобин 14
 Михаэлиса—Ментен уравнение 171, 216, 217
 Мутаротация тетраметилглюкозы 98
 Нестационарная кинетика 175
 Никотинамидадениндинуклеотид (НАД) 16, 271, 274
 Никотинамидадениндинуклеотид-фосфат (НАДФ) 16
 Оксипирановое кольцо, образование 82
 Орбитальное управление 53, 79
 Пептидная связь 9
 Пиридоксальфосфат 15
 Полиаминокислоты 109
 Поливинилбензимидазол 109
 Поливинилимидазол 109
 Поливинилпиридин 106
 Поливинилсульфат 106
 Полипептидная цепь 9
 Полиэтиленимин 105, 107
 Предстационарная кинетика 185
 Простетическая группа 14
 Релаксации время 208, 209
 Релаксационная кинетика 206
 Релаксация химическая 206
 Рибофлавин 15
 Сближение реагентов 25, 50, 56
 — — механизм 50
 — — свободная энергия 25, 51
 — — статистическая модель 53
 — — энтропия 25, 51
 Свободная энергия
 — — активации 38
 — — ассоциации 27, 52
 — — сближения 25, 51
 — — сорбции субстрата на ферменте 27, 34
 Спираль 11
 Стационарное состояние 172—174
 Стационарное условие 172—174
 Схема Анри 189
 Схема Михаэлиса 189
 Тиаминпирозофосфат 15
 Титрование активных центров фермента 196, 232
 Убихиноны 16
 Ферменты
 — избирательность действия 5
 — каталитическая эффективность 5, 274
 — кинетика действия 171
 — классификация 5
 — механизм катализа 34
 — модели действия 71
 — строение 7
 Фотолиз импульсный 205
 Фталевой кислоты моноамид 87
 Хейнса координаты 218
 Химотрипсиноген 22
 Холофермент 14
 Цепь переноса заряда 65
 Цепь переноса связи 65
 Циклизации реакции 79
 Циклические ангидриды 81
 Циклоамилозы
 Щелевой эффект 60
 Экстракционная модель 27, 115, 139
 Электростатическое взаимодействие
 — — в молекулах белков 12
 — — в переходном состоянии реакции 45, 73
 — — при сорбции лиганда на ферменте 28
 Энтропия
 — ассоциации 25, 26, 52
 — разбавления 51
 — сближения 36
 Эстафетная передача заряда
 — — — модели 100
 — — — в активном центре химотрипсина 129—131, 157, 158
 Эффект
 — гем-диалкильный 82
 — концентрирования 105, 107, 109 118
 — микросреды 66, 83, 105, 107, 109, 114
 — полифункциональности 61, 94, 121

Оглавление

Предисловие	3
-----------------------	---

Ч А С Т Ь I

МЕХАНИЗМ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА

Г л а в а I. Строение и важнейшие свойства ферментов и их активных центров	5
§ 1. Введение	5
§ 2. Строение белков (ферментов)	7
§ 3. Строение активных центров ферментов	17
§ 4. Микросреда активного центра	20
§ 5. Механизм сорбции органических молекул и ионов на активном центре	23
§ 6. Прочность комплексов фермент — лиганд (оценка свободной энергии сорбции)	24
§ 7. Скорость образования комплекса фермент — лиганд	29
Г л а в а II. Физико-химические механизмы ферментативного катализа	34
§ 1. Свободная энергия сорбции субстрата на ферменте как источник ускорения реакции	34
§ 2. Механизмы стабилизации переходного состояния химической реакции второго порядка за счет дополнительных сорбционных взаимодействий	42
§ 3. Механизм сближения и ориентации при «внутримолекулярном» превращении комплекса между реагентами	50
§ 4. Механизмы напряжения и индуцированного соответствия	60
§ 5. Полифункциональный характер химических механизмов ферментативного катализа	61
§ 6. Эффекты микросреды. Внутренняя реакционная способность функциональных групп белка	66
§ 7. Заключение	68
Г л а в а III. Модели ферментативного катализа	71
§ 1. Стабилизация переходного состояния реакции за счет дополнительных нековалентных взаимодействий между реагентами	72
§ 2. Внутримолекулярные реакции	78
§ 3. Эффекты полифункциональности	94
§ 4. Полимерные модели	103
§ 5. Катализ циклоамилозами	110
§ 6. Реакции в присутствии мицелл поверхностно-активных веществ	114
Г л а в а IV. Физико-химические основы специфичности α -химотрипсина	126
§ 1. Введение	126
§ 2. Общие сведения о механизме действия химотрипсина и его субстратной специфичности	127
§ 3. Кинетическая роль в химотрипсиновом катализе комплексобразования с активным центром α -ацетиламидной субстратной группы	136
§ 4. Гидрофобная область активного центра химотрипсина	138
§ 5. Пространственное взаимоотношение сорбционной гидрофобной области в активном центре и каталитически активных групп	147
§ 6. Кинетическая роль в химотрипсиновом катализе комплексобразования гидрофобного субстратного фрагмента с активным центром	150
§ 7. Собственная реакционная способность составного нуклеофила, входящего в активный центр химотрипсина	157

Ч А С Т Ь II

КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Глава V. Кинетические закономерности ферментативных реакций в нестационарном режиме		171
§ 1. Введение		171
§ 2. Нестационарная кинетика ферментативных реакций при переменной концентрации субстрата		175
§ 3. Предстационарная кинетика ферментативных реакций при постоянной концентрации субстрата		185
§ 4. Экспериментальные методы исследования предстационарной кинетики		204
§ 5. Исследование механизма ферментативных реакций методами релаксационной кинетики		206
§ 6. Экспериментальные методы исследования релаксационной кинетики		213
Глава VI. Важнейшие методы стационарной кинетики, применяемые для исследования структуры активных центров и механизма действия ферментов		216
§ 1. Уравнение Михаэлиса — Ментен		216
§ 2. Влияние обратимых эффекторов (ингибиторов и активаторов) на кинетику действия ферментов		219
§ 3. Кинетический метод двухкомпонентного обратимого ингибирования ферментативных реакций		227
§ 4. Реакции двух субстратов с одним ферментом		230
§ 5. Кинетика ферментативных реакций при условии $[E]_0 \gg [S]_0$		232
§ 6. Кинетический анализ ферментативных реакций, не подчиняющихся уравнению Михаэлиса — Ментен		235
§ 7. Стационарная кинетика трехстадийных ферментативных реакций		243
§ 8. Применение интегральной формы уравнения скорости ферментативных реакций		247
§ 9. Инактивация фермента в ходе реакции		254
§ 10. Влияние pH на скорость ферментативных реакций		258
§ 11. Влияние температуры на кинетику действия ферментов		263
Глава VII. Скорости реакций в ферментативном катализе		268
§ 1. Реакции второго порядка (бимолекулярные стадии)		269
§ 2. Реакции первого порядка (псевдомомолекулярные стадии)		272
Указатель используемых наименований ферментов		276
Предметный указатель		276

Илья Васильевич Березин
Карел Мартишек

ОСНОВЫ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА

Редактор М. М. Поплавская. Художник В. В. Гарбузов. Художественный редактор Т. М. Скворцова. Технический редактор Р. С. Родичева. Корректор С. К. Марченко

ИБ № 634

Сдано в набор 16/XII-76 г. Подп. к печати 12/V-77 г. Формат 60×90¹/₁₆. Бум. тип. № 3. Объем 17,5 печ. л. Усл. п. л. 17,5. Уч.-изд. л. 18,65. Изд. № Хим—563. Тираж 9000 экз. Цена 1 р. 01 к. Зак. 958

План выпуска литературы издательства
«Высшая школа» (вузы и техникумы) на 1977 г. Позиция № 48.
Издательство «Высшая школа»,
Москва, К-51, Неглинная ул., д. 29/14.

Ярославский полиграфкомбинат Союзполиграфпрома при Государственном комитете Совета Министров СССР по делам издательства, полиграфии и книжной торговли. 150014, Ярославль, ул. Свободы, 97.