

Лекція 5. Кінетика ферментативних реакцій: основні кінетичні константи

- 1) Задачі які вирішує кінетика ферментативних реакцій.
- 2) Вплив концентрації реагуючих речовин на швидкість реакції.
- 3) Порядок ферментативної реакції.
- 4) Константи швидкостей ферментативних реакцій.
- 5) Поняття про одиницю ферменту, способи виразу одиниці ферменту.
- 6) Рівняння швидкості реакції

Основи кінетики ферментативних реакцій

Кінетика ферментативних реакцій - розділ ензимології, що вивчає залежність швидкості хімічних реакцій, каталізуються ферментами, від хімічної природи реагуючих речовин, а також від факторів навколишнього середовища.

Для вимірювання каталітичної активності ферментів використовують такі показники, як швидкість реакції або активність ферменту. Швидкість ферментативної реакції визначається зміною кількості молекул субстрату або продукту за одиницю часу. Швидкість ферментативної реакції - міра каталітичної активності ферменту, її позначають як активність ферменту.

Математично швидкість ферментативної реакції виражається в зміні концентрації субстрату (зменшення) або продукту (збільшення) за одиницю часу :

$$V = \Delta[S] / t = \Delta[P] / t$$

На початковому етапі [0 - t₀] швидкість реакції прямо пропорційна часу і має лінійну залежність. Графічно зміна швидкості ферментативної реакції визначається тангенсом кута нахилу дотичної до кривої профілю реакції. Чим більше кут нахилу, тим більше зміна швидкості реакції (рис. 1).

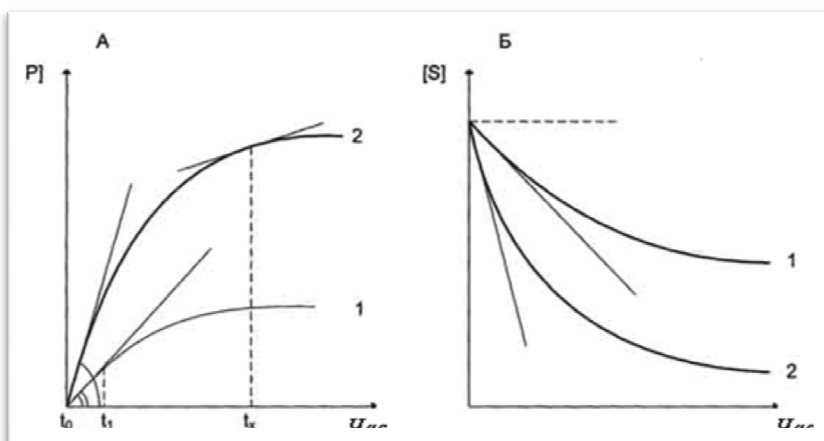


Рис. 1 – Залежність накопичення продукту (А) і убутку субстрату (Б) від часу (тривалості) протікання реакції. Швидкість ферментативної реакції визначається зміною концентрації продукту або субстрату за одиницю часу. У

реакціях, що каталізуються ферментами 1 і 2, початкова швидкість реакції, що каталізується ферментом 1, нижче, ніж швидкість реакції, що каталізується ферментом 2, так як тангенс кута нахилу дотичної до кривої профілю реакції, проведеної з "0" точки у другого ферменту вище, як у разі накопичення продукту (А), так і убутку субстрату (Б). Швидкість в будь-який момент часу t визначається тангенсом кута нахилу дотичної до профілю

реакції в момент часу t . Період часу ферментативної реакції ($t_0 - t_1$) характеризується лінійним накопиченням продукту (або спадом субстрату) залежно від тривалості реакції. Період ферментативної реакції ($t_1 - t_x$) характеризується нелінійним накопиченням продукту (або спадом субстрату) залежно від часу реакції.

З плином часу зміна швидкості ферментативної реакції в експериментальних умовах зменшується, про це свідчить зменшення кута нахилу дотичної в момент часу t . Зниження швидкості ферментативної реакції може відбуватися за рахунок ряду факторів: зменшення концентрації субстрату, збільшення концентрації продукту, який може надавати інгібуючу дію, можуть відбуватися зміни рН розчину, інактивація ферменту і т.п.

На етапі ($t_1 - t_x$) швидкість реакції змінюється нелінійно залежно від часу. Тому для визначення швидкості ферментативної реакції найчастіше досліджують зміну швидкості на початковому етапі ($t_0 - t_1$), де спостерігають лінійну зміну концентрації продукту (або субстрату).

Швидкість ферментативної реакції залежить від ряду факторів, таких як кількість і активність ферментів, концентрація субстрату, температура середовища, рН розчину, присутність регуляторних молекул (активаторів та інгібіторів). Розглянемо вплив цих факторів на швидкість ферментативної реакції.

Залежність швидкості ферментативної реакції від кількості субстрату/

Якщо концентрацію ферментів залишити постійною, змінюючи тільки кількість субстрату, то графік швидкості ферментативної реакції описують гіперболою (рис. 4).

При збільшенні кількості субстрату початкова швидкість зростає. Коли фермент стає повністю насиченим субстратом, тобто відбувається максимально можливе при даній концентрації ферменту формування фермент-субстратного комплексу, спостерігають найбільшу швидкість утворення продукту. Подальше підвищення концентрації субстрату не призводить до збільшення утворення продукту, тобто швидкість реакції не зростає. Даний стан відповідає максимальній швидкості реакції V_{max} .

Таким чином, концентрація ферменту – лімітуючий фактор в освіті продукту. Це спостереження лягло в основу ферментативної кінетики, розробленої вченими Л. Міхаелісом і М. Ментен в 1913 р.

Залежність швидкості ферментативної реакції від кількості ферментів



При проведенні ферментативної реакції в умовах надлишку субстрату швидкість реакції залежатиме від концентрації ферменту. Графічна залежність такої реакції має вигляд прямої лінії (2).

Рис. 2 – Вплив концентрації ферменту на початкову швидкість реакції

Однак кількість ферменту часто неможливо визначити в абсолютних величинах, тому на практиці користуються умовними величинами, що характеризують активність ферменту: одна міжнародна одиниця активності (МО) відповідає такій кількості ферменту, яке каталізує перетворення 1 мкмоль субстрату за 1 хв. при оптимальних умовах проведення ферментативної реакції. Оптимальні умови індивідуальні для кожного ферменту і залежать від температури середовища, рН розчину, при відсутності активаторів та інгібіторів.

$$1MO = \frac{1 \text{ мкмоль перетвореного субстрату}}{1 \text{ хвилина}}$$

Кількість одиниць активності nMO визначають за формулою:

$$nMO = \frac{\text{Кількість перетвореного субстрату (мкмоль)}}{\text{Час (хв.)}}$$

У 1973 р. була прийнята нова одиниця активності ферментів: 1 катал (кат), відповідний такій кількості каталізатора, яке перетворює 1 моль субстрату за 1 с. Кількість каталів визначають за формулою:

$$n\text{катал} = \frac{\text{Кількість перетвореного субстрату (моль)}}{\text{Час (с)}}$$

Міжнародна одиниця ферментативної активності МО пов'язана з каталом наступними рівностями:

$$1 \text{ кат} = 1 \text{ моль S/c} = 60 \text{ моль S/хв} = 60 \times 10^6 \text{ мкмоль/хв} = 6 \times 10^7 \text{ МО};$$

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

У медичній і фармацевтичній практиці для оцінки активності ферментів часто використовують міжнародні одиниці активності - МО. Для оцінки кількості молекул ферменту серед інших білків даної тканини визначають питому активність (пит.акт) ферменту, чисельно рівну кількості одиниць активності ферменту (nMO) у зразку тканини, поділеній на масу (мг) білка в цій тканині:

$$\text{Пит.акт.} = \frac{\text{Кількість перетвореного субстрату (мкмоль)}}{\text{Час (хв) x кількість білка (мг)}}$$

За питомою активністю судять про очищення ферменту: чим менше сторонніх білків, тим вище питома активність.

Залежність швидкості ферментативної реакції від температури середовища

Підвищення температури до певних меж впливає на швидкість ферментативної реакції подібний до впливу температури на будь-яку хімічну реакцію. З підвищенням температури прискорюється рух молекул, що призводить до підвищення ймовірності взаємодії реагуючих речовин. Крім того, температура може підвищувати енергію реагуючих молекул, що також призводить до прискорення реакції. Однак швидкість хімічної реакції, що каталізується ферментами, має свій температурний оптимум, перевищення

якого супроводжується зниженням ферментативної активності, що виникають через термічну денатурацію білкової молекули (рис. 3).



Рис. 3 - Залежність швидкості ферментативної реакції (V) від температури.

Для більшості ферментів людини оптимальна температура 37-38 ° C. Проте в природі існують і термостабільні ферменти. Наприклад, Таq-полімераза, виділена з мікроорганізмів, що живуть у гарячих джерелах, що не інактивується при підвищенні температури до 95 ° C. Цей фермент використовують у науково-практичній медицині для молекулярної діагностики захворювань з використанням методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Залежність швидкості ферментативної реакції від рН середовища

Активність ферментів залежить від рН розчину, в якому протікає ферментативна реакція. Для кожного ферменту існує значення рН, при якому спостерігається його максимальна активність. Відхилення від оптимального значення рН призводить до зниження ферментативної активності.

Вплив рН на активність ферментів пов'язано з іонізацією функціональних груп амінокислотних залишків даного білка, що забезпечують оптимальну конформацію активного центру ферменту. При зміні рН від оптимальних значень відбувається зміна іонізації функціональних груп молекули білка. Наприклад, при закислення середовища відбувається протонирование вільних аміногруп (NH_3^+), а при защелачиванні відбувається відщеплення протона від карбоксильних груп (COO^-). Це призводить до зміни конформації молекули ферменту і конформації активного центру ; отже, порушується приєднання субстрату, кофакторів і коферментів до активного центру. Крім того, рН середовища може впливати на ступінь іонізації або просторову організацію субстрату, що також впливає на спорідненість субстрату до активного центру. При значному відхиленні від оптимального значення рН може відбуватися денатурація білкової молекули з повною втратою ферментативної активності.

Оптимум значення рН у різних ферментів різний (рис. 4).

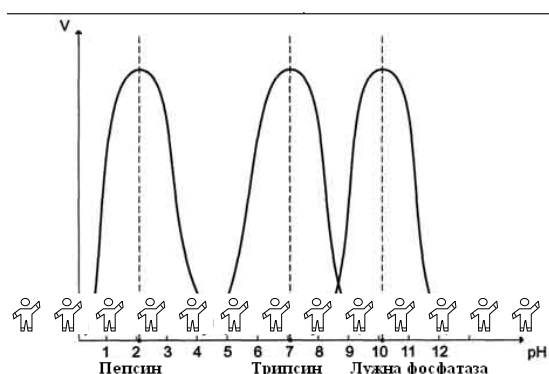


Рис. 4 – Вплив рН на активність ферментів

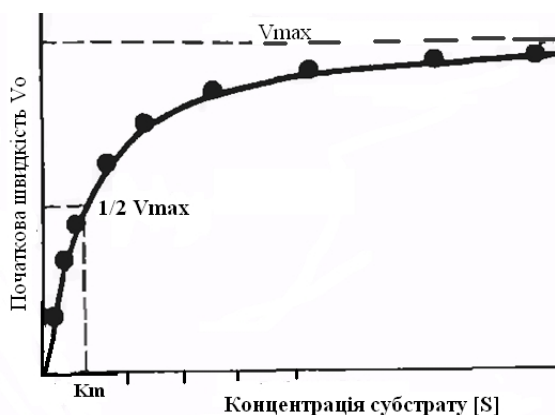
Ферменти, що працюють в кислих умовах середовища (наприклад, пепсин у шлунку або лізосомальні ферменти), еволюційно набувають конформацію, що забезпечує роботу ферменту при кислих значеннях рН. Однак більша частина ферментів організму людини має оптимум рН, близький до нейтрального, що співпадає з фізіологічним значенням рН.

Залежність швидкості ферментативної реакції від кількості субстрату

Якщо концентрацію ферментів залишити постійною, змінюючи тільки кількість субстрату, то графік швидкості ферментативної реакції описують гіперболою (рис. 4).

Рис. 4 – Вплив концентрації субстрату на швидкість реакції. V_{max} – максимальна швидкість реакції при даній концентрації ферменту в оптимальних умовах проведення реакції. K_m – константа Міхаеліса.

При збільшенні кількості субстрату початкова швидкість зростає. Коли фермент стає повністю насиченим субстратом, тобто відбувається

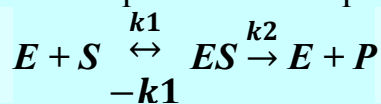


максимально можливе при даній концентрації ферменту формування фермент-субстратного комплексу, спостерігають найбільшу швидкість утворення продукту. Подальше підвищення концентрації субстрату не призводить до збільшення утворення продукту, тобто швидкість реакції не зростає. Даний стан відповідає максимальній швидкості реакції V_{max} .

Таким чином, концентрація ферменту –

лімітуючий фактор в утворенні продукту. Це спостереження лягло в основу ферментативної кінетики, розробленої вченими Л. Міхаелісом і М. Ментен в 1913 р.

Ферментативний процес можна виразити таким рівнянням:



де k_1 – константа швидкості утворення фермент-субстратного комплексу; k_{-1} – константа швидкості зворотної реакції, розпаду фермент-субстратного комплексу; k_2 – константа швидкості утворення продукту реакції.

Наступне співвідношення констант швидкостей називають константою Міхаеліса і позначають K_m :

$$K_m = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1}$$

Швидкість реакції пропорційна концентрації фермент-субстратного комплексу ES , швидкість утворення ES залежить від концентрації субстрату і

концентрації вільного ферменту. На концентрацію ES впливає швидкість формування і розпаду ES.

Найбільша швидкість реакції спостерігається в тому випадку, коли всі молекули ферменту знаходяться в комплексі з субстратом, тобто в фермент - субстратном комплексі ES, тобто $[E] = [ES]$.

Залежність швидкості ферментативної реакції від концентрації субстрату виражається наступним рівнянням.

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

Це рівняння отримало назву рівняння Міхаеліса-Ментен.

У разі, коли швидкість реакції дорівнює половині максимальної, $K_m = [S]$ (рис. 4). Таким чином, константа Міхаеліса чисельно дорівнює концентрації субстрату, при якій досягається половина максимальної швидкості.

Рівняння Міхаеліса-Ментен – основне рівняння ферментативної кінетики, що описує залежність швидкості ферментативної реакції від концентрації субстрату.

Якщо концентрація субстрату значно більше K_m ($S \gg K_m$), то збільшення концентрації субстрату на величину K_m практично не впливає на суму ($K_m + S$) і її можна вважати рівною концентрації субстрату. Отже, швидкість реакції стає рівною максимальній швидкості: $V = V_{max}$. У цих умовах реакція має нульовий порядок, тобто не залежить від концентрації субстрату. Можна зробити висновок, що V_{max} – величина постійна для даної концентрації ферменту, яка не залежить від концентрації субстрату.

Якщо концентрація субстрату значно менше K_m ($S \ll K_m$), то сума ($K_m + S$) приблизно дорівнює K_m , отже, $V = V_{max} [S] / K_m$, тобто в даному випадку швидкість реакції прямо пропорційна концентрації субстрату (реакція має перший порядок).

V_{max} і K_m - кінетичні характеристики ефективності ферменту.

V_{max} дає характеристику каталітичної активності ферменту і має розмірність швидкості ферментативної реакції моль/л, тобто визначає максимальну можливість утворення продукту при даній концентрації ферменту і в умовах надлишку субстрату. K_m характеризує спорідненість даного ферменту до даного субстрату і є величиною постійною, що не залежить від концентрації ферменту. Чим менше K_m , тим більше спорідненість ферменту до даного субстрату, тим вище початкова швидкість реакції і навпаки, чим більше K_m , тим менше початкова швидкість реакції, тим менше спорідненість ферменту до субстрату.