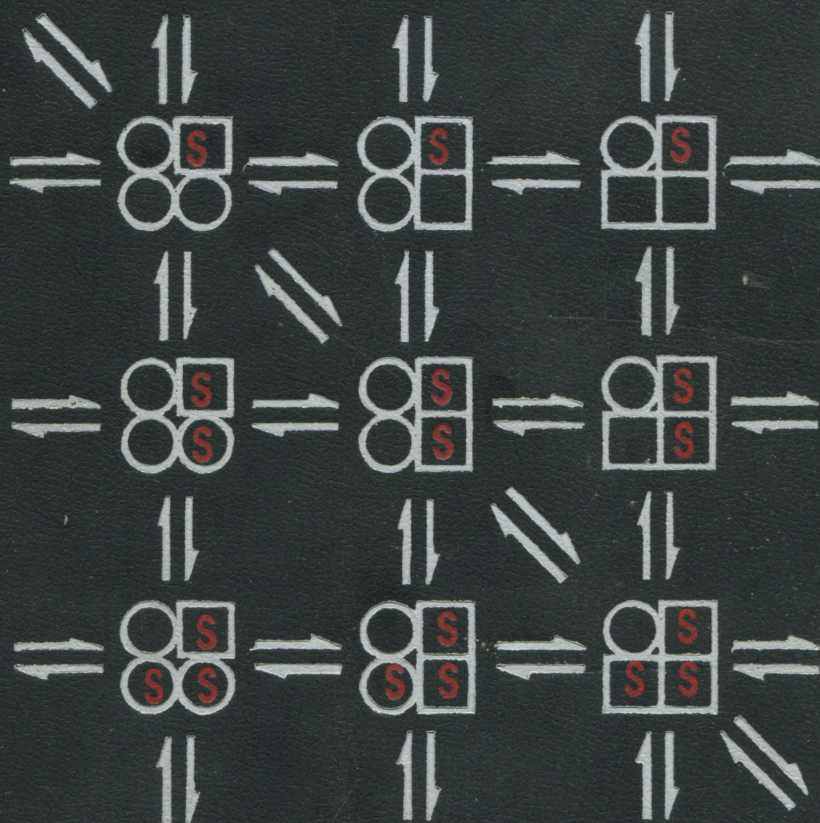


Т. Келети

ОСНОВЫ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ КИНЕТИКИ



Издательство <<Мир>>



BASIC ENZYME KINETICS

T. KELETI

**Institute of Enzymology
Biological Research Center
Hungarian Academy of Sciences
Budapest, Hungary**

AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST

Т. Келети

ОСНОВЫ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ КИНЕТИКИ

Перевод с английского

канд. хим. наук Л. Ю. Бровко,
канд. хим. наук Е. И. Дементьевой
и О. А. Гандельман

под редакцией

д-ра хим. наук Б. И. Курганова



МОСКВА «МИР» 1990

ББК 24.5
К34
УДК 541 + 547.9

Келети Т.

К34 Основы ферментативной кинетики: Пер. с англ. — М.: Мир, 1990. — 350 с., ил.

ISBN 5-03-001037-8

В книге дается достаточно полное изложение основ ферментативной кинетики, широко применяемой во всех областях биохимии. Автор ее венгерский ученый Т. Келети в течение многих лет работает в данной области, и его научные работы получили мировое признание. Книга написана в таком практическом ключе, чтобы любой биохимик мог использовать ее в своей повседневной работе.

Для научных работников — биохимиков и энзимологов, а также для студентов биологических и медицинских вузов.

К $\frac{1903010000-277}{041(01)-90}$ 97—89

ББК 24.5

Редакция литературы по химии

ISBN 5-03-001037-8 (русск.)

ISBN 963-05-4090-8 (англ.)

© Akadémiai Kiadó, 1986

© перевод на русский язык, Бровко Л. Ю., Дементьева Е. И., Гандельман О. А., 1990

ПРЕДИСЛОВИЕ РЕДАКТОРА ПЕРЕВОДА

Ферментативная кинетика является одной из динамично развивающихся областей современной биологической химии. Автор книги поставил перед собой задачу обобщить достижения ферментативной кинетики и изложить в систематизированном виде методологию исследования временных характеристик ферментов и основные представления о кинетических механизмах действия ферментов. Т. Келети — признанный авторитет в области физико-химической энзимологии — при написании книги использовал собственный богатый опыт в исследованиях кинетики ферментативных реакций.

Описывая принципы термодинамики, автор излагает прежде всего термодинамические закономерности обратимых процессов. Несмотря на то что живые системы являются открытыми (т. е. системами, обменивающимися с окружающей средой массой и энергией), в них можно выделить подсистемы, к которым достаточно обоснованно могут быть применены принципы классической термодинамики (см. обсуждение этого вопроса в монографии Г. П. Гладышева, цитированной в списке дополнительной литературы к гл. 1). Появившаяся в последние годы термодинамика неравновесных процессов дает возможность количественно описать сопряжение протекающих в клетке различных физико-химических процессов (например, химических реакций и процессов диффузии) и структурную организацию в эволюционирующих биологических системах.

После краткого изложения основ термодинамики автор приводит общие сведения по химической кинетике, которые необходимы для анализа кинетических результатов, получаемых при исследовании ферментативных реакций. Хотелось бы особо подчеркнуть важность определения порядка скорости реакции по отдельным компонентам системы. В случае ферментативных реакций можно говорить о порядке скорости реакции по ферменту, субстрату и модификатору (ингибитору, активатору, аллостерическому эффекто-

ру). Порядок скорости реакции (n_A) по веществу А находят из наклона зависимостей логарифма начальной скорости реакции (v) от логарифма начальной концентрации вещества А. Автор ограничивается демонстрацией графика линейной зависимости $\lg v$ от $\lg[A]$ (см. рис. 7, б), наклон которой дает величину n_A , и в дальнейшем изложении к определению порядка скорости ферментативной реакции по отдельным компонентам не возвращается (если не считать коэффициентов эластичности в разд. 3.7). По-видимому, причиной этого служит то обстоятельство, что порядок скорости ферментативной реакции по субстрату или модификатору (а в случае диссоциирующих ферментных систем и по ферменту) является непостоянным и меняется при варьировании начальной концентрации компонента реакции. Например, для михаэлисовой зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата порядок скорости реакции по субстрату уменьшается от 1 до 0 с ростом концентрации субстрата. Чем могут быть полезны переменные порядки скорости ферментативной реакции по отдельным компонентам реакции? Прежде всего, порядок характеризует чувствительность скорости ферментативной реакции к изменению концентрации компонента реакции, что важно для оценки вклада данной реакции в регуляцию метаболического пути. Далее, вторичный график зависимости n_A от v может служить характеристикой формы кривой зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации компонента А. Наконец, если говорить о диссоциирующих ферментных системах, то определение порядка скорости ферментативной реакции по ферменту в ряде случаев позволяет классифицировать тип диссоциирующей ферментной системы (*Kurganav B. I. Allosteric enzymes. Kinetic behaviour. John Wiley & Sons, Chichester, 1982*).

Отдельный раздел в гл. 2 посвящен кинетике обмена веществ между компартментами. Задачи подобного рода возникают при создании моделей, пригодных для описания данных фармакокинетики. Мы сочли необходимым в списке дополнительной литературы привести ссылки на монографии советских авторов по фармакокинетики.

Если говорить о разделе, посвященном колебательным химическим реакциям, то следует отметить, что упомянутая в этом разделе колебательная реакция окисления малоновой кислоты открыта советскими исследователями и известна как реакция Белоусова — Жаботинского (см. дополнительную литературу к гл. 2).

Основная часть изложенного материала дает систематическое представление о кинетических механизмах ферментативных реакций, методах определения кинетических констант, механизмах ингибирования действия ферментов и молекулярных механизмах регуляции ферментативной активности. В случае олигомерных ферментов кинетическая информация должна дополняться изучением связывания специфических лигандов в равновесных условиях. Автор обсуждает графические методы определения числа лигандсвязывающих центров в молекуле фермента и микроскопических констант диссоциации лиганд-ферментных комплексов. Эти подходы могут использоваться также фармакологами, исследующими связывание специфических лигандов рецепторами. Рассмотрен случай связывания лиганда двухвалентным рецептором с учетом возможного взаимодействия молекул лиганда в связанном состоянии. Подобная ситуация представляет интерес в связи с тем, что рецепторы, встроенные в мембрану, имеют, как правило, олигомерную природу. Мы сочли целесообразным привести дополнительную ссылку на работу, в которой теоретический анализ связывания лиганда двухвалентным рецептором дается с привлечением экспериментальных данных (Курганов Б. И. Биологические мембраны.— М.: Наука, 1984). Новые статистические подходы к анализу связывания лигандов набором рецепторов с различным сродством разработаны С. Д. Варфоломеевым с сотр. (см. дополнительную литературу к гл. 3). Эти подходы позволяют более надежно доказать существование гетерогенности в рецепторах определенных классов.

В разделе, касающемся регуляции активности ферментов, для приводимых в тексте аллостерических ферментов мы дали их классификационные номера согласно рекомендациям *Enzyme Nomenclature*, Academic Press, Orlando, 1984.

Поскольку при составлении кинетических уравнений для многоцентровых ферментов возникают определенные трудности, то в этих целях была использована теория графов. Важную роль в разработке подходов к анализу ферментативной кинетики на основе теории графов сыграли работы советских исследователей — М. В. Волькенштейна и Б. Н. Гольдштейна. Систематическое изложение этих вопросов дано в монографии Б. И. Гольдштейна (см. дополнительную литературу к разд. 3.13).

Книга Т. Келети, несомненно, послужит ценным учебным пособием для студентов и аспирантов биологических и медицинских вузов, специализирующихся в области физико-химической и

медицинской энзимологии и биотехнологии. Думаю, что эта книга будет полезна биохимикам, исследующим механизмы ферментативных реакций и механизмы регуляции клеточного метаболизма, фармакологам, изучающим фармакокинетические и фармакодинамические аспекты применения лекарственных средств, и специалистам, использующим ферменты для решения прикладных задач.

Б. И. Курганов

•

ПРЕДИСЛОВИЕ АВТОРА К РУССКОМУ ИЗДАНИЮ

Замысел этой книги состоял в том, чтобы представить методы, предназначенные для анализа механизма действия ферментов. Задача установления механизмов ферментативных реакций требует досконального знания приемов химической кинетики.

Уравнение скорости, описывающее поведение ферментативных реакций, обычно выражается системой нелинейных дифференциальных уравнений, и получить аналитическое решение в общем случае невозможно. Поэтому для того, чтобы анализировать данные ферментативной кинетики, приходится использовать некоторые приближения. Например, мы обычно применяем линейную аппроксимацию для начальной скорости, стационарное приближение и приближение по типу быстро устанавливающегося равновесия. Однако для ферментативных реакций *in vivo* или даже для полиферментных систем *in vitro* часто нарушаются условия выполнимости этих приближений.

Для современной биологии характерна растущая тенденция интерпретировать биологические явления в терминах молекулярных механизмов, и многие биологи стремятся понять принципы энергетики, управляющие изменениями биохимических характеристик. Принципы термодинамики, включая экспериментальные приложения, на протяжении многих лет имели существенное значение для развития биохимии, физиологии и биофизики и их важность постоянно растет. Я надеюсь, что главы, касающиеся термодинамики и ее приложения к анализу ферментативных реакций, будут способствовать более широкому использованию энзимологами термодинамической аргументации и позволят им осознать ценность термодинамического подхода для более глубокого понимания многих биохимических проблем.

Узнавание играет исключительно важную роль в живых системах. Оно контролируется межмолекулярными силами. Энергия связывания, реализующаяся за счет взаимного насыщения этих сил, ответственна в конечном счете за катализ и специфичность реакций, катализируемых ферментами.

Из сказанного становится ясным, почему таким вопросам, как термодинамика, связывание лигандов и кинетика полиферментных систем, а также контроль метаболических путей, уделено больше внимания, чем это обычно делается в учебниках по ферментативной кинетике.

Для меня большая радость и честь то, что благодаря моим советским коллегам эта книга на русском языке попадает к советским энзимологам, биохимикам, биофизикам. Я надеюсь, что книга поможет им в теоретической и экспериментальной работе.

Будапешт, 14 июня 1988 г.

Т. Келети

Посвящается Мати, неизменно поощрявшей, вдохновлявшей меня и самоотверженно помогавшей в моем труде, который без этого никогда бы не был завершен. (Так что все претензии следует предъявлять ей.)

ПРЕДИСЛОВИЕ

За последние полтора десятилетия появился целый ряд блестящих монографий и учебников по кинетике. Но лишь немногие из них могут быть полезны биохимику в лаборатории.

Цель данной книги — осветить вопросы ферментативной кинетики в широком ее понимании и помочь тем, кто хочет пользоваться кинетическими методами. В наши намерения не входит анализ кинетического поведения каждого отдельного фермента.

За последние двадцать лет наблюдалось бурное развитие ферментативной кинетики. Ее стали широко применять во всех областях биохимии. Более того, она необходима в фармакологии и многих других областях биологии. Это связано с тем, что современная энзимология стала комплексной наукой. Ферментативная кинетика изучает кинетику ферментативных реакций, их механизм, энергетику, проблемы регуляции, стерическую структуру, ответственную за активность, процессы ассоциации — диссоциации субъединиц. Она рассматривает химическую модификацию групп, локализованных в активном центре. В настоящее время кинетика функционирования рецепторов, кинетика транспорта и кинетическое поведение иммобилизованных ферментов также изучаются ферментативной кинетикой.

Современные энзимологические исследования используют весь арсенал математики, физики, физической, коллоидной и органической химии. Можно с уверенностью сказать, что новейшие исследования в энзимологии немыслимы без кинетического подхода. Поэтому совершенно необходимо понимание теории ферментативной кинетики.

В этой книге изложены основы термодинамики и химической кинетики, без значения которых невозможно понимание и использование ферментативной кинетики. Глубина рассмотрения этих вопросов определяется их практической значимостью в биохимии и энзимологии. Подробно обсуждаются методы определения порядка простых, последовательных, параллельных и автокаталитических

реакций, измерения констант скорости релаксационными методами, температурная зависимость констант скорости. В книге также рассмотрены кинетика реакций в воде, основы теории количественных соотношений между структурой и активностью, кинетический изотопный метод, компартментный анализ и основы колебательных химических реакций.

В главе, посвященной ферментативной кинетике, ввиду важности проблемы подробно разбирается кинетика односубстратных реакций, включая методы определения параметров реакции на основе измерения начальной скорости и анализа кривой протекания реакции. Помимо определения параметров фермент-субстратного комплекса в этой главе также обсуждаются характеристики комплекса рецептор-лиганд, методы остановленной струи, одиночного цикла превращений и релаксации, равновесный диализ, теория и недостатки традиционного графического представления. Читатель найдет разделы, посвященные кинетике последовательных (сопряженных) реакций и обнаружению эффекта туннелирования.

Раздел, посвященный кинетическому анализу действия специфических ингибиторов, включает графические оценки интегральных уравнений различных типов ингибирования, определение констант ингибирования, псевдонеобратимое ингибирование и его кинетику, описание ферментов-самоубийц и двойного ингибирования. Помимо ингибирования избытком субстрата и продукта обсуждается действие активаторов и либераторов, а также влияние температуры и pH на ферментативные реакции.

Специальный раздел посвящен кинетике транспорта и кинетическому поведению иммобилизованных ферментов.

После процессов регуляции метаболизма и кинетики регуляторных ферментов обсуждается кинетическое поведение двух- и трехсубстратных ферментов, применение следовых методов и наконец использование теории графов для определения кинетических уравнений. В приложении читатель знакомится с применением метода наименьших квадратов, определением начальной скорости и методом «складного ножа».

Эта книга написана с надеждой, что она поможет исследователям понять узловые вопросы теории и практики ферментативной кинетики и послужит руководством по применению кинетических методов для биохимиков, фармакологов и биоинженеров.

Тамаш Келети

1. ЗАКОНЫ И ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ ТЕРМОДИНАМИКИ

1.1. ОСНОВНЫЕ ТЕОРИИ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Химическая термодинамика использует законы термодинамики применительно к химическим и физико-химическим явлениям. Она рассматривает тепловой и энергетический балансы процессов, а также химические и фазовые равновесия. Так как вопросы теплообразования и энергетики играют важную роль в химической и ферментативной кинетике, являющейся предметом данной книги, то они будут рассмотрены в первой главе.

В термодинамике совокупность исследуемых тел называется *системой*, а тела, не входящие в нее, — *внешним окружением*.

Рассматриваемые ниже законы термодинамики применимы только к закрытым системам. Закрытые системы обмениваются с окружающей средой только энергией, но не массой. Живые организмы представляют собой открытые системы, способные обмениваться с окружающей средой массой и при определенных условиях достигать *динамического равновесия (стационарного состояния)*, но не *термодинамического* (с максимумом энтропии, см. второй закон термодинамики)*. Все открытые системы вместе с их окружением образуют закрытую систему.

При наличии теплообмена и возможности хотя бы частичной диффузии между телами, составляющими систему, образуется *термодинамическая система*. Термодинамическая система может взаимодействовать со своим окружением, и это взаимодействие можно обнаружить по переносу тепла или совершению работы. В том случае, когда взаимодействие системы со средой полностью отсутствует, система называется *изолированной*.

Если состояние термодинамической системы остается неизменным и причиной этого не является какой-либо внешний стационар-

* В термодинамически равновесных системах нельзя наблюдать макроскопических изменений; их внутренняя энергия минимальна, и они находятся в состоянии полной беспорядочности. Живые системы достигают термодинамического равновесия только после смерти, т. е. после полного разложения всего организма.

ный процесс, говорят, что система находится *в равновесии*.

Если система состоит из одной фазы, то она *гомогенная*, в противном случае — *гетерогенная*.

Термодинамические системы можно классифицировать по совокупности их свойств. *Экстенсивные* свойства, такие, как вес и объем, пропорциональны массе; *интенсивные* свойства, такие, как температура, давление и удельные и молярные значения экстенсивных величин, не зависят от массы. Состояние системы, находящейся в равновесии, можно описать совокупностью ее интенсивных свойств. Они называются *термодинамическими параметрами состояния*.

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

Масса и объем — это общепринятые термины. Давление характеризует взаимодействие с внешним окружением, измеряемое как сила, приходящаяся на единицу площади поверхности.

Температура, которая определяется интенсивностью теплового движения молекул, образующих систему, не простое понятие, оно включает понятие разности теплот. Между телами различной температуры происходит теплоперенос, приводящий к выравниванию температуры. Абсолютная шкала температур основана на втором законе термодинамики; ее начало находится при абсолютном нуле, т. е. при $-273,16$ К. При абсолютном нуле часть энергии любого вещества, которая зависит от температуры (тепловая энергия), равна нулю, хотя энергия частиц, составляющих вещество, при нулевой температуре, естественно, не исчезает.

Любое изменение термодинамической системы, приводящее к изменению хотя бы одного термодинамического параметра, называется *термодинамическим процессом*.

Если при протекании термодинамического процесса система проходит равновесные состояния, то при данных условиях работа, совершаемая самой системой, будет максимальной, а работа, совершаемая над системой, — минимальной. В таком случае говорят о *равновесном процессе*. И наоборот, процесс, протекающий при некотором ограниченном воздействии на систему, определяется как *неравновесный*. Работа, совершенная такой системой, меньше, чем максимальная работа в равновесном процессе.

Если единственным результатом обратного процесса в изолированной системе является возвращение системы из конечного состоя-

ния в исходное, то такой процесс называют *обратимым*. Если в результате прямой или обратной реакции в системе или в ее окружении имеют место длительные изменения, то процесс называют *необратимым*. Причина необратимости в том, что процессы протекают через неравновесные состояния.

Термодинамические параметры однозначны только для обратимых процессов, когда система находится в равновесии в любой момент времени и в каждой ее части.

Если вывести систему из состояния устойчивого равновесия, то возникнет термодинамический процесс, препятствующий внешнему воздействию (*принцип Ле Шателье — Брауна*).

1.2. НУЛЕВОЙ ЗАКОН ТЕРМОДИНАМИКИ

Как уже упоминалось выше, разность теплот тел разной температуры стремится к нулю в результате теплопереноса. Экспериментально установлено, что если каждое из двух тел находится в равновесии с третьим, то они равновесны по отношению друг к другу; это составляет содержание нулевого закона термодинамики. В более общем виде этот закон можно сформулировать так: в случае равновесия между двумя взаимодействующими системами существует свойство, имеющее одинаковое количественное выражение для обеих систем. При тепловом равновесии это температура.

Иными словами, каждому термодинамическому взаимодействию соответствует определенный параметр термодинамических систем, и равенство этих параметров является *необходимым и достаточным условием* термодинамического равновесия взаимодействующих систем (статистико-механическая формулировка нулевого закона).

1.3. ПЕРВЫЙ ЗАКОН ТЕРМОДИНАМИКИ

Первый закон термодинамики гласит, что энергия не может быть получена из ничего, не может быть уничтожена, а может только превращаться из одного вида энергии в другой.

Содержание энергии (U) в данной системе увеличивается при совершении работы (A) или передаче тепла (Q)

$$\Delta U = A + Q \quad (1)$$

В случае цикла, когда $\Delta U = 0$,

$$A = -Q \quad (2)$$

Отсюда проистекает невозможность создания вечного двигателя первого рода.

Если над системой не совершается никакой работы, т. е. $dU = \delta Q$, то при равновесном давлении $P = 0$ для объема V можно определить новую функцию, первоначально введенную Гиббсом

$$H = U + PV \quad (3)$$

где H — энтальпия (или, менее точно, теплосодержание, или тепловая функция Гиббса).

U и H — однозначные функции состояния, так как их значения не зависят от того, каким образом система попала в рассматриваемое состояние. В принципе это и есть закон Гесса: теплота превращения не зависит от пути протекания процесса.

Процесс называется *экзотермическим*, если тепло выделяется, т. е. энтальпия уменьшается. Теплота превращения в экзотермическом процессе — это отрицательная величина, так как положительным условно считается тепло, полученное системой. Процесс, сопровождающийся поглощением тепла, называется *эндотермическим*, в этом случае теплота превращения положительна. Протекающие в живых организмах анаболические процессы представляют собой эндотермические реакции, а катаболические (участвующие в расщеплении) процессы — экзотермические.

Количество теплоты, необходимое для увеличения температуры тела единичной массы на один градус, называется *средней удельной теплотой*:

$$c = Q/m\Delta T \quad (4)$$

Поскольку средняя удельная теплота зависит и от абсолютного значения теплоты, и от разности теплот, то было введено понятие *истинной удельной теплоты*, определяемое в масштабе бесконечно малого количества теплоты:

$$c = \delta Q/mdT \quad (5)$$

Произведение удельной теплоты на массу (mc) называется *теплоемкостью*.

При использовании в качестве единицы массы моля или грамма атома получается соответственно *молярная* или *атомная теплота* (C). Удельная теплота воды при 288,16 К и 0,981 бар (1 атм) произвольно принята за единицу. Следовательно, единица теплоты — это такое количество теплоты, которое необходимо, чтобы поднять температуру воды единичной массы при давлении 0,981 бар с 287,66 К до 288,66 К. Размерность удельной теплоты — Дж/(кг · К).

В случае бесконечного малого приращения теплоты и совершения в системе только работы по изменению объема выражение (1) принимает следующий вид:

$$dU = \delta Q - PdV \quad (6)$$

Из уравнения (3) для бесконечно малого приращения

$$dH = dU + PdV + VdP \quad (7)$$

получаем полный дифференциал, а подставляя уравнение (6) в (7), получаем

$$\delta Q = dH - VdP \quad (8)$$

При постоянном давлении ($dP = 0$)

$$\delta Q = dH \quad (9)$$

На основании этих уравнений, объединив (5) и (9), получаем следующее выражение для теплоемкости при постоянном давлении:

$$C_P \equiv \delta Q_P/dT = (dH/dT)_P \quad (10)$$

где подстрочный индекс указывает на внешнее условие, которое поддерживается постоянным.

Аналогичным образом можно вывести уравнение для теплоемкости при постоянном объеме

$$C_V \equiv \delta Q_V/dT = (dU/dT)_V \quad (11)$$

Теплоемкость $C = \delta Q/dT$ имеет размерность скорости — Дж/К. Следовательно, теплоемкость представляет собой скорость изменения энергии (теплосодержания) в зависимости от температуры.

Закон Лавуазье гласит, что изменение теплоты пропорционально глубине протекания реакции

$$dT = k\Delta\xi \quad (12)$$

где ξ — величина, отражающая глубину протекания реакции, k — коэффициент пропорциональности. Из уравнений (10) и (12) следует

$$C = \delta Q/k\Delta\xi \quad (13)$$

Согласно *закону Кирхгофа*, изменение теплоемкости при постоянном давлении имеет вид:

$$\Delta C_P = \delta\Delta Q/dT = d\Delta H/dT \quad (\text{см. уравнение (9)}) \quad (14)$$

Поскольку из (12) и (14) следует, что

$$\Delta C = \delta \Delta Q / k \Delta \xi \quad (15)$$

т. е. изменения теплоемкости имеют размерность скорости, то, следовательно,

$$\Delta C \neq C_{\text{конечное состояние}} - C_{\text{исходное состояние}} \quad (16)$$

так как Δ в термодинамике обычно обозначает разность. ΔC обозначает изменение скорости C в зависимости от изменения ξ , т. е. это изменение скорости изменения энергии в зависимости от глубины протекания реакции. Поэтому для большей точности вместо величины Δ следует использовать оператор $\partial/\partial\xi$ и тогда

$$\delta C / \delta \xi = \delta \Delta Q / k \Delta \xi \quad (17)$$

1.4. ВТОРОЙ ЗАКОН ТЕРМОДИНАМИКИ

Первый закон термодинамики не выдвигает никаких требований к направлению процессов, происходящих в природе. Однако экспериментально показано, что все процессы в природе протекают в одном направлении, т. е. они необратимы. Необратимость в термодинамике означает, что процесс не может идти в обратном направлении без постоянного изменения энергии в окружающей среде.

Следствием второго закона является увеличение *энтропии* в природных процессах. Энтропия выражается следующим уравнением:

$$dS = \delta Q / T \quad (18)$$

означающим, что дифференциальное изменение энтропии равняется отношению элементарного количества теплоты к абсолютной температуре.

Основываясь на втором законе термодинамики, все природные процессы, не противоречащие первому закону, можно разделить на две группы: 1) самопроизвольные при данных условиях и 2) несамопроизвольные.

Невозможна реакция, дающая только перенос тепла от тела с более низкой температурой к телу с более высокой температурой. Это означает, что работа не может быть выполнена исключительно за счет тепловой энергии окружающей среды, другими словами, невозможно создание вечного двигателя второго рода.

Дифференциальное изменение энтропии равняется отношению количества обратимо поглощенного тепла к абсолютной темпера-

туре. При протекании обратимых реакций в изолированной системе энтропия остается неизменной, в необратимых процессах она возрастает. Если в результате необратимого процесса изолированная система приходит в равновесие, то ее энтропия достигает максимума. Следовательно, изменение энтропии определяет направление процесса и одновременно условия равновесия.

Принцип постоянства или увеличения энтропии справедлив только для целостной изолированной системы. Реакции, сопровождающиеся понижением энтропии, могут протекать в отдельных частях системы, тем самым доказывая возможность протекания реакций с понижением энтропии также и в неизолированных системах. В изолированной системе увеличение энтропии служит мерой необратимости процесса.

1.4.1. Статистическая формулировка второго закона. Число микросостояний, посредством которых может быть достигнуто данное макросостояние, называется *термодинамической вероятностью*. В то время как математическая вероятность варьирует между 1 и 0, термодинамическая вероятность может быть очень большой. Математическая вероятность состояния равна отношению его термодинамической вероятности к числу всех возможных микросостояний. Все микросостояния равновероятны. Это означает, что для системы, находящейся в постоянных макроскопических условиях, частота попадания в определенные микросостояния за достаточно длительный промежуток времени одинакова для всех возможных микросостояний. Состояние любой молекулы, рассматриваемой как безразмерная точка, можно описать тремя координатами состояний и тремя импульсными компонентами (*фазовое поле*). Такое поле координат и импульсов может иметь множество измерений независимо от реального пространства в соответствии с внутренними степенями свободы реальных молекул. Согласно значениям координат, все молекулы системы можно поместить в соответствующие клетки фазового поля. Распределение молекул по клеткам определяет число микросостояний, т. е. термодинамическую вероятность.

Процессы, протекающие в изолированных системах, сопровождаются увеличением энтропии. Это соответствует увеличению термодинамической вероятности. Для отдельных функций справедливы следующие уравнения:

$$dU = TdS - PdV \quad (19)$$

$$dH = TdS + VdP \quad (20)$$

В действительности эти уравнения можно рассматривать как

суммарное математическое выражение двух первых законов (см. (1) и (3)). Однако они верны только тогда, когда функции состояния являются равновесными величинами и при этом еще учитывается только работа по изменению объема (т. е. в системе не протекают никакие химические реакции).

1.4.2. Функции термодинамического потенциала. *Функция свободной энергии Гельмгольца* определяется как

$$F = U - TS \quad (21)$$

и при абсолютном нуле

$$F_0 = U_0 \quad (22)$$

Если с помощью теплообмена обеспечить изотермическое протекание реакции, то

$$\Delta F = \Delta U - T\Delta S \quad (23)$$

Это означает, что изменение свободной энергии равно работе, совершенной над системой при изотермическом обратимом процессе.

Изобарный потенциал (или *термодинамический потенциал*, *свободная энергия Гиббса*, *свободная энтальпия*) определяется выражением

$$G = H - TS = U + PV - TS = F + PV \quad (24)$$

Если с помощью теплообмена сделать процесс изотермическим и поддерживать постоянным давление, то

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (25)$$

т. е. уменьшение свободной энтальпии (свободной энергии Гиббса) равно работе, совершенной системой в обратимом изобарно-изотермическом процессе.

Для однокомпонентной гомогенной системы свободная энтальпия одного моля вещества (*молярная свободная энергия*) является химическим потенциалом:

$$\mu = (\partial G / \partial n)_{T,P} = (\partial U / \partial n)_{S,V} = (\partial H / \partial n)_{P,S} = (\partial F / \partial n)_{V,T} \quad (26)$$

где n — число молей вещества.

Для многокомпонентной системы химический потенциал i -го компонента определяется как

$$\mu_i = (\partial G / \partial n_i)_{T,P,n_j} \quad (27)$$

где $j = 1, \dots, k, j \neq i$.

Изменение свободной энтальпии в системе может быть представлено в виде суммы произведений химических потенциалов составляющих ее компонентов на изменение числа их молей:

$$dG = \sum_{i=1}^k \mu_i dn_i \quad (28)$$

В состоянии равновесия химические потенциалы компонентов данной системы равны.

Термодинамическую функцию называют *характеристической*, если она сама или ее частная производная по соответствующим независимым переменным описывает произвольно выбранное термодинамическое свойство данной системы. Наиболее часто в термодинамике используют характеристические функции U , H , S , F и G .

1.5. ТРЕТИЙ ЗАКОН ТЕРМОДИНАМИКИ

Третий закон известен также как *тепловой закон* (*тепловая теорема Нернста*). Он гласит, что зависимости теплоты реакций и изменений свободной энтальпии для переходов между чистыми конденсированными фазами от абсолютной температуры представляют собой кривые, выходящие обе из одной и той же точки при $T = 0$ с начальными касательными, параллельными оси температур.

Учитывая соотношение между температурным коэффициентом и изменением энтропии, основанное на втором законе, третий закон можно сформулировать еще и так: при $T = 0$ существует предел изменений энтропии, вызванных превращениями чистых конденсированных фаз

$$\Delta S_0^0 = 0 \quad (29)$$

т. е. согласно Планку, для идеального кристалла

$$S_0^0 = 0 \quad (30)$$

где S^0 обозначает стандартную энтропию (т. е. при давлении 0,981 бар, как и все другие термодинамические функции с надстрочным индексом 0); подстрочный индекс 0 обозначает нулевую абсолютную температуру.

Следовательно, для одного класса соединений энтропии должно быть приписано абсолютное значение, иными словами, для вычисления энтропий существует определенная, объективная нулевая точка отсчета. Поскольку критерием равновесного состояния является

максимум энтропии при данных условиях, то становится возможным рассчитать положения абсолютных равновесий.

Согласно *статистической концепции энтропии, предложенной Больцманом*,

$$S = k_B \ln W \quad (31)$$

где k_B — константа Больцмана, W — термодинамическая вероятность состояния для рассматриваемого вещества. *Соотношение Планка*

$$W_0 = 1 \quad (32)$$

означает, что в статистической трактовке состояние идеального кристалла при абсолютном нуле температур может осуществляться единственным образом, соответствующим идеальному порядку.

Поскольку идеальный порядок в реальных системах недостижим, то третий закон можно сформулировать еще и так: ни одна система не может быть приведена к абсолютному нулю температур за конечное число шагов.

1.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ

Наиболее часто используются *калориметрические методы* определения термодинамических параметров. Для изучения биологических систем были сконструированы различные *микрокалориметры*. Калориметры периодического действия (batch microcalorimeters) измеряют количество тепла, выделившегося или поглощенного между начальными и конечными (равновесными) состояниями при смешении веществ А и В и протекании реакции между ними в заданном объеме и при постоянной температуре в термостате большой емкости. Это количество тепла складывается из теплот реакции и теплот смешения и разведения. Две последние величины можно определить из самостоятельных экспериментов и таким образом *теплота реакции* (Q^*) может быть рассчитана из уравнения:

$$Q^* = K_{\text{равн}}[A]\Delta H^0 / (1 + K_{\text{равн}}[A]) \quad (33)$$

где $K_{\text{равн}}$ — константа равновесия реакции, $[A]$ — варьируемая концентрация одного из реагирующих веществ. Из уравнения (33) имеем

$$1/Q^* = 1/\Delta H^0 + 1/K_{\text{равн}}[A]\Delta H^0 \quad (34)$$

$$[A] = [A]_0 - Q^*[B]_0/\Delta H^0 \quad (35)$$

Таблица I. Численные значения наиболее часто используемых констант и размерность функций

Название	Обозначение	Численное значение	Размерность
Постоянная Больцмана	k_B	$1,38054 \cdot 10^{-23}$	$\text{Дж} \cdot \text{К}^{-1}$
Постоянная Планка	h	$6,6256 \cdot 10^{-34}$	$\text{Дж} \cdot \text{с}$
Число Авогадро	N	$6,02252 \cdot 10^{23}$	моль^{-1}
Универсальная газовая постоянная	R	8,3143	$\text{Дж} \cdot \text{К}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$
Изменение энтальпии	ΔH		$\text{Дж} \cdot \text{моль}^{-1}$
Изменение энтропии	ΔS		$\text{Дж} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{К}^{-1}$
Изменение свободной энтальпии	ΔG		$\text{Дж} \cdot \text{моль}^{-1}$
Молярная теплоемкость при постоянном давлении	C_p		$\text{Дж} \cdot \text{К}^{-1}$
Теплоемкость при постоянном давлении	c_p		$\text{Дж} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{К}^{-1}$
Теплота	Q		Дж
Теплота реакции	Q^*		$\text{Дж} \cdot \text{моль}^{-1}$

где $[A]_0$ — начальная концентрация A, $[B]_0$ — начальная концентрация другого исходного вещества реакции, поддерживаемая постоянной. Если Q_{\max}^* — наибольшая измеряемая теплота реакции при самой высокой концентрации $[A]$ (при насыщении), то поскольку

$$Q_{\max}^*/[B_0] = \Delta H^0 \quad (36)$$

уравнение (35) можно использовать для определения $[A]$; отсюда и из уравнения (34) можно с помощью уравнения

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_{\text{равн}}$$

рассчитать $K_{\text{равн}}$ (см. ниже разд. 2.13, уравнение (294)).

Зная ΔG^0 и ΔH^0 , из уравнения (25) получаем ΔS^0 . Определяя ΔH^0 при различных температурах, можно также рассчитать молярные теплоты на основании уравнения (10).

Изменяя температуру с постоянной скоростью, с помощью *сканирующих микрокалориметров* измеряют изменение теплоемкости исследуемого вещества. Так как теплоемкость тесно связана с температурными изменениями энтальпии (см. уравнение (10)), то при известной в интервале температур от T_0 до T теплоемкости (молярной теплоте) системы можно рассчитать все термодинамические па-

раметры:

$$H(T) = H(T_0) + \int_{T_0}^T C_p dT \quad (37)$$

$$S(T) = S(T_0) + \int_{T_0}^T \frac{C_p(T)}{T} dT \quad (38)$$

$$G(T) = H(T) - TS(T) \quad (39)$$

В биохимической практике калориметры периодического действия (batch microcalorimeters) используются в основном для определения термодинамических параметров ферментативных реакций и процессов связывания лигандов; для характеристики стабильности и изменений белковой структуры применяются сканирующие микрокалориметры.

Наиболее часто используемые в термодинамике константы и функции приведены в табл. I.

1.7. НЕРАВНОВЕСНАЯ ТЕРМОДИНАМИКА

Все вышесказанное применимо только к равновесным состояниям закрытых систем (термостатике). Однако в действительности мы сталкиваемся в основном с неравновесными (необратимыми) открытыми термодинамическими системами.

Фактически неравновесная термодинамика описывает энергетику реальных и, следовательно, необратимых изменений, происходящих в открытых системах во времени. В этом случае система обменивается со своим окружением не только энергией, но и веществом. Поэтому если мы хотим описать систему, то нужно также рассматривать процессы транспорта и химические реакции, включающие перенос вещества.

Термодинамические *градиенты* (X) приводят к возрастанию *потоков* (J). Согласно *линейному закону Онзагера*, вблизи состояния равновесия поток линейно пропорционален силе ($J = LX$)*. В этом случае, если между системой и окружающей ее средой происходит обмен не только энергией, но и веществом, энтропия увеличивается и, следовательно, система достигает термодинамически наиболее вероятного и наименее упорядоченного состояния.

*Коэффициент проводимости L является экстенсивной величиной, а термодинамическая сила X — интенсивной.

В неравновесной термодинамике, например, изменение элементарной энтропии можно описать следующим уравнением:

$$dS = d_oS + d_nS \quad (40)$$

где dS — общее изменение энтропии системы, d_oS — внешнее изменение энтропии, определяемое уравнением

$$d_oS = d_oQ/T \quad (41)$$

(где d_oQ — обратимый теплоперенос), и d_nS — положительное изменение энтропии (для обратимых процессов и для состояния равновесия оно равно нулю), соответствующее необратимым процессам, протекающим внутри системы:

$$d_nS \geq 0 \quad (42)$$

Если в уравнении (42) выполняется знак равенства, то (40) и (41) действительны для обратимых процессов.

Для всех необратимых процессов справедливо, что в состоянии равновесия $J_\alpha = 0$ и $X_\alpha = 0$, где J_α — скорости, а X_α — термодинамические (или обобщенные) силы. Вблизи состояния равновесия можно использовать линейные, так называемые *феноменологические соотношения*:

$$J_\alpha = \sum_{\beta} L_{\alpha\beta} X_\beta \quad (43)$$

где α, β, \dots, n — порядковые номера для n скоростей и сил, $L_{\alpha\beta}$ — *феноменологический коэффициент*. Диагональные коэффициенты матрицы $\|L_{\alpha\beta}\|$ называются *латентными* или *согласующимися коэффициентами*.

Другие коэффициенты $L_{\alpha\beta} (\alpha \neq \beta)$ представляют собой *коэффициенты взаимодействия*. Они описывают взаимодействие необратимых процессов α и β . Для двух необратимых процессов

$$J_1 = L_{11}X_1 + L_{12}X_2 \quad (44)$$

$$J_2 = L_{21}X_1 + L_{22}X_2 \quad (45)$$

$$\sigma[S] = L_{11}X_1^2 + (L_{12} + L_{21})X_1X_2 + L_{22}X_2^2 > 0 \quad (46)$$

где $\sigma[S]$ — производство энтропии, отнесенное к единице времени и объема. Величина $\sigma(S)$ должна быть положительной для всех положительных и отрицательных значений X_1 и X_2 , кроме $X_1 = X_2 = 0$, когда производство энтропии равняется нулю. Это условие обязательно подразумевает, что

$$L_{11} > 0, L_{22} > 0 \quad (47)$$

$$(L_{12} + L_{21})^2 > 4L_{11}L_{22} \quad (48)$$

Отсюда следует, что *латентные* коэффициенты (L_{11} и L_{22}) больше нуля, а коэффициенты взаимодействия могут быть как положительными, так и отрицательными, причем их величина полностью определяется уравнением (48).

Согласно уравнению (46),

$$\sigma[S] = \sum_{\alpha\beta} L_{\alpha\beta} X_{\alpha} X_{\beta} \geq 0 \quad (49)$$

Обратное соотношение Онзагера, являющееся дополнением ко второму закону термодинамики, также выражает важную зависимость:

$$L_{\alpha\beta} = L_{\beta\alpha} \quad (\alpha \neq \beta) \quad (50)$$

означающую, что если на скорость J_{α} , связанную с необратимым процессом α , воздействует сила X_{β} , относящаяся к необратимой реакции β , то воздействие X_{α} на скорость J_{β} будет характеризоваться точно таким же коэффициентом взаимодействия $L_{\alpha\beta}$.

Подставляя выражение (50) в уравнение (46), дифференцируя по X_2 при постоянном X_1 и используя (45), получаем

$$(\partial/\partial X_2)\sigma[S] = 2(L_{21}X_1 + L_{22}X_2) = 2J_2 = 0 \quad (51)$$

Это означает, что оба утверждения $J_2 = 0$ и $(\partial/\partial X_2)\sigma[S] = 0$ полностью эквивалентны. Производство энтропии прекращается, и возникает состояние равновесия как частный случай устойчивого состояния (*принцип минимального производства энтропии, принцип Пригожина*) (см. разд. 3.1.2).

Для живых систем, строго говоря, всегда применима неравновесная, необратимая термодинамика. Тем не менее все соотношения термостатики справедливы и для клетки малого объема, входящей в неравновесную систему. Это положение верно не только для реакций, протекающих вблизи равновесия, но и для всех процессов, за исключением турбулентных явлений, ударных волн и сверхбыстрых реакций в плазме, что подтверждает возможность использования в большинстве случаев уравнений термодинамики как достоверных аппроксимаций при изучении химических процессов и биологических систем.

ЛИТЕРАТУРА

Обзоры

Beezer A. E. Biological Microcalorimetry, Academic Press, London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco, 1980.

Brown H. D. Biochemical Microcalorimetry, Academic Press, New York, London, 1969.

Erdey-Grüz T., Schlay. Theoretical Physical Chemistry, v. 1, 2nd ed. Tankönyvkiado, Budapest, 1955 (in Hung).

Glandsdorff P., Prigogine I. Thermodynamic Theory of Structure, Stability and Fluctuations. Wiley Intersci. London, New York, Sydney, Toronto, 1971.

Gyarmati I. Non-equilibrium Thermodynamics, Műszaki Kiado, Budapest, 1967 (in Hung).

Horváth J. Thermodynamics and Statistical Mechanics. Tankönyvkiadó, Budapest, 1960 (in Hung).

Каранетьянц М. Г. Химическая термодинамика. — М. — Л.: Госхимиздат, 1953.

Katchalsky H., Curran P. F. Nonequilibrium Thermodynamics in Biophysics. Harvard University Press, Cambridge, Mass., 1965.

Klotz I. M. Chemical Thermodynamics, W. A. Benjamin, Inc. New York, Amsterdam, 1964.

Другие работы

Bent H. A. The first law. For scientists, citizens, poets and philosophers. J. Chem. Educ., **50**, 323—328 (1973).

Дополнительная литература*

Гладышев Г. П. Термодинамика и макрокинетика природных нерархических процессов. — М.: Наука, 1988.

Рубин А. Б. Термодинамика биологических процессов. — Издательство Московского университета, Москва, 1984.

Термодинамика и регуляция биологических процессов/Под ред. А. И. Зотина. — М.: Наука, 1984.

Edsall J. T., Gutfreund H. Biothermodynamics. The study of biochemical processes at equilibrium. John Wiley & Sons, Chichester, 1983. [Есть русский перевод: Эдсэлл Дж., Гартфренд Х. Биотермодинамика. — М.: Мир, 1988.]

Ross J., Schell M. Thermodynamic efficiency in nonlinear biochemical reactions. — Annu. Rev. Biophys. and Biophys. Chem. **16**, 401—422 (1987).

*Список составлен редактором перевода Б. И. Кургановым.

2. ХИМИЧЕСКАЯ КИНЕТИКА

2.1. КЛАССИФИКАЦИЯ ХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ

Химические реакции можно разделить на две группы: *гомогенные* и *гетерогенные*.

В гомогенной фазе (по крайней мере в *покоящейся* гомогенной фазе и для сравнительно медленных реакций, т. е. за исключением тех, которые протекают в непрерывном проточном реакторе, и взрывающихся смесей) реакция протекает с одинаковой скоростью в любом элементарном объеме данной фазы в любое время и в любой момент времени с одинаковой скоростью. Гетерогенные реакции, наоборот, протекают, как правило, на границе фаз. Следовательно, во многих случаях скорость гетерогенных реакций определяется скоростью подачи реагирующих веществ на границу или же скоростью удаления с границы продуктов реакции.

Обычно реакции, протекающие в присутствии контактных катализаторов, также считаются гетерогенными. Однако в тех случаях, когда для протекания реакции необходимо присутствие катализатора, реакцию можно рассматривать как гетерогенную только при условии, что слой абсорбированного вещества считается отдельной фазой.

Катализатор может и не быть гетерогенной фазой по отношению к реакционной смеси. Известны также гомогенные катализаторы, не образующие границы раздела фаз с реакционной смесью. Ферменты, растворенные в реакционной смеси, также считаются гомогенными. Тем не менее ферменты часто ведут себя как гетерогенные катализаторы, так как из-за большого размера их белковых молекул они склонны к образованию коллоидных, а не истинных растворов. Гетерогенность их подтверждается еще и тем, что для целого ряда ферментативных реакций скорость образования фермент-субстратного комплекса, определяющая максимально возможную суммарную скорость реакции, зависит только от скорости диффузии субстратов к поверхности фермента.

2.2. СКОРОСТЬ РЕАКЦИИ

Скорость реакции определяется как количество вещества, превращенного (образовавшегося или распавшегося) в единицу времени. Она является функцией концентраций участвующих в реакции веществ; эти концентрации непрерывно изменяются по мере протекания реакции. Следовательно, однозначное определение скорости реакции может быть дано только в том случае, если конечное изменение количества вещества в единицу времени заменить на дифференциальную разность, отнесенную к бесконечно малому времени dt . Количество превращенных веществ обычно выражают в виде изменения объемной концентрации c .

Скорость реакции не может быть измерена непосредственно; можно только определять концентрации c , относящиеся к разным моментам времени t . Зная пары значений $c — t$, определенные с достаточной частотой, можно построить функцию

$$|c_0 - c_t| = \int_0^t v dt \quad (52)$$

где c_0 — концентрация в момент $t = 0$. Наклон кривых дает скорость v в момент времени t (графическое дифференцирование). При этом, естественно, наблюдаются строго определенные условия реакции (температура, рН, давление в газовых реакциях).

2.3. ВЕЩЕСТВА, ВЛИЯЮЩИЕ НА СКОРОСТЬ РЕАКЦИИ

Катализаторы (гомогенные или гетерогенные) являются веществами, которые повышают скорость спонтанно протекающих реакций, а сами могут оставаться в системе неизменными к концу реакции. В обратимых реакциях катализаторы ускоряют реакцию в обоих направлениях в одинаковой степени, не нарушая равновесия.

В некоторых случаях один из продуктов реакции ведет себя как катализатор, ускоряя реакцию. Такие реакции называют автокаталитическими, несмотря на то что ведущий себя как катализатор промежуточный продукт не является истинным катализатором. Будучи промежуточным продуктом, он потребляется в ходе реакции, не сохраняясь в системе до конца реакции.

Если вещество инициирует реакцию, оно называется *инициатором*; если оно ускоряет каталитическую реакцию, оно называется *ускорителем* или *активатором*. Соединения, понижающие скорость каталитической реакции и полностью подавляющие ее, назы-

ваются *ингибиторами*. Вещества, препятствующие ускоряющему действию катализатора или постепенно снимающие его, называются *каталитическими ядами*. И, наконец, вещество, непосредственно не влияющее на катализатор, но приостанавливающее активационное или ингибирующее каталитическое действие другой молекулы, называется *либератором*.

Это наиболее важные типы веществ, оказывающие положительное или отрицательное влияние на скорость различных каталитических реакций.

2.4. МЕХАНИЗМЫ РЕАКЦИЙ

Перечень факторов, влияющих на скорость реакции (см. выше), уже сам по себе показал, что протекание химических реакций не всегда можно описать стехиометрическим уравнением реакции, содержащим начальные и конечные продукты. Следовательно, чрезвычайно важно знать истинный путь реакции и механизм образования продуктов.

В большинстве химических реакций продукты не образуются в результате простых столкновений между молекулами, стоящими в левой части стехиометрического уравнения, давая за один этап реакции продукты, стоящие в правой части. Эти так называемые простые реакции очень редки. Большинство реакций, в том числе и все каталитические, — это очень сложные процессы, которые можно представить в виде целой системы последовательных или частично параллельных и частично последовательных простых реакций. Эти простые реакции называются стадиями реакции или элементарными стадиями, и в совокупности они составляют механизм реакции.

На сегодняшний день химическая кинетика занимается в основном изучением механизмов реакций.

2.5. МОЛЕКУЛЯРНОСТЬ, СТЕХИОМЕТРИЯ, ПОРЯДОК

Молекулярность реакции обозначает число молекул, реагирующих друг с другом в данной реакции; например, две молекулы в реакции



Стехиометрия реакции выразит количественное соотношение реагентов, обеспечивающее образование одной молекулы продукта,

присутствующего в наименьшем количестве, например, для той же реакции



Порядок реакции — это показатель степени концентрации скоростьопределяющего вещества в математическом уравнении скорости реакции. Порядок реакции совпадает со стехиометрическим коэффициентом только для простых реакций и элементарных процессов. При этом происходит одноквантовый процесс (один квант энергии поглощается или выделяется), т. е. одна химическая связь расщепляется или образуется, другими словами, диссоциация происходит в направлении простого колебания.

Реакция может иметь нулевой, первый, второй, третий, четвертый и в исключительных случаях дробный порядок. В более сложных случаях порядок всей реакции не может быть выражен ни целым, ни дробным числом.

Для реакций первого порядка скорость определяется выражением

$$v = kc_a \quad (55)$$

где c_a — концентрация реагента, k — константа скорости, имеющая размерность

$$k = v/c_a (\text{моль} \cdot \text{дм}^{-3} \cdot \text{с}^{-1}) / (\text{моль} \cdot \text{дм}^{-3}) = \text{с}^{-1}. \quad (56)$$

Скорость реакции второго порядка, если в ней участвуют одинаковые молекулы, равна

$$v = kc_a^2 \quad (57)$$

с константой скорости

$$k = v/c_a^2 (\text{моль} \cdot \text{дм}^{-3} \cdot \text{с}^{-1}) / (\text{моль}^2 \cdot \text{дм}^{-6}) = \text{дм}^3 \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1} \quad (58)$$

Если в реакции принимают участие две различные молекулы, то уравнение примет следующий вид:

$$v = kc_a c_b \quad (59)$$

В данном случае реакция имеет суммарный второй порядок, но по каждому из реагентов в отдельности (а и б) — первый. Размерность константы скорости такая же, как и в случае обычной реакции второго порядка.

Уравнение, описывающее скорость реакции третьего порядка

$$v = kc_a^3 \quad (60)$$

представляет только теоретический интерес, так как не известно ни одной реакции, скорость которой была бы пропорциональна третьему порядку простого вещества. В действительности, в реакции третьего порядка две или три различные молекулы реагируют друг с другом, и поэтому уравнение скорости имеет вид

$$v = kc_a^2c_b \quad (61)$$

или

$$v = kc_ac_bc_c \quad (62)$$

В обоих случаях реакция имеет суммарный порядок, равный трем, но в первом случае порядок реакции по реагенту а второй, а по реагенту в первый, в то время как во втором случае реакция имеет первый порядок по всем трем реагентам (а, b, c).

Порядок химической реакции не обязательно должен быть целым числом. Известны реакции с порядком $\frac{1}{2}$ или $\frac{3}{2}$, когда скорость реакции пропорциональна концентрации реагирующего вещества в степени $\frac{1}{2}$ или $\frac{3}{2}$.

В общем виде скорость реакции может быть записана следующим образом:

$$v = kc_a^\alpha c_b^\beta \dots \quad (63)$$

порядок реакции

$$n = \alpha + \beta + \dots \quad (64)$$

и размерность константы скорости k

$$\text{моль}^{1-n} \cdot \text{дм}^{3(n-1)} \cdot \text{с}^{-1} \quad (65)$$

Порядок реакции не всегда можно точно определить, и, более того, в реакциях со сложным механизмом вообще нельзя говорить о порядке реакции. Например, для реакции



уравнение, описывающее скорость реакции, выглядит так:

$$v = (k[\text{H}_2][\text{Br}_2]^{1/2}) / (1 + k'[\text{HBr}]/[\text{Br}_2]) \quad (67)$$

Очевидно, порядок всей реакции не имеет никакого смысла, можно определять только порядок отдельных элементарных стадий.

2.6. ИНТЕГРАЛЬНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОРЯДКА И КОНСТАНТЫ СКОРОСТИ НЕОБРАТИМЫХ РЕАКЦИЙ

2.6.1. Мономолекулярная реакция первого порядка.



Если при $t = 0$ $[A] = a$ и $[P] = 0$, а в момент времени t $[A] = a - x$ и $[P] = x$, то скорость образования продуктов или расходования исходных веществ запишется так:

$$v = dx/dt = -d(a - x)/dt = k(a - x) \quad (68)$$

На рис. 1 показан общий ход реакции. Разделяя переменные, получим

$$dx/(a - x) = kdt \quad (69)$$

и, проинтегрировав,

$$-\ln(a - x) = kt + C \quad (70)$$

где C — константа интегрирования. Величину C можно определить из начальных условий: если $t = 0$, то $x = 0$ и в этом случае

$$-\ln a = C \quad (71)$$

Подставив это значение в (70), получим

$$\ln(a/(a - x)) = kt \quad (72)$$

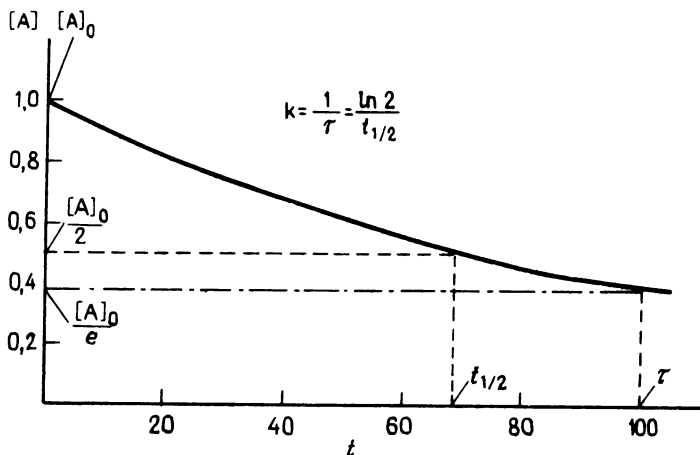


Рис. 1. Кинетическая кривая для реакций первого порядка вплоть до $t = \tau$. $[A_0] = 1,0$, $k = 0,01 \text{ с}^{-1}$.

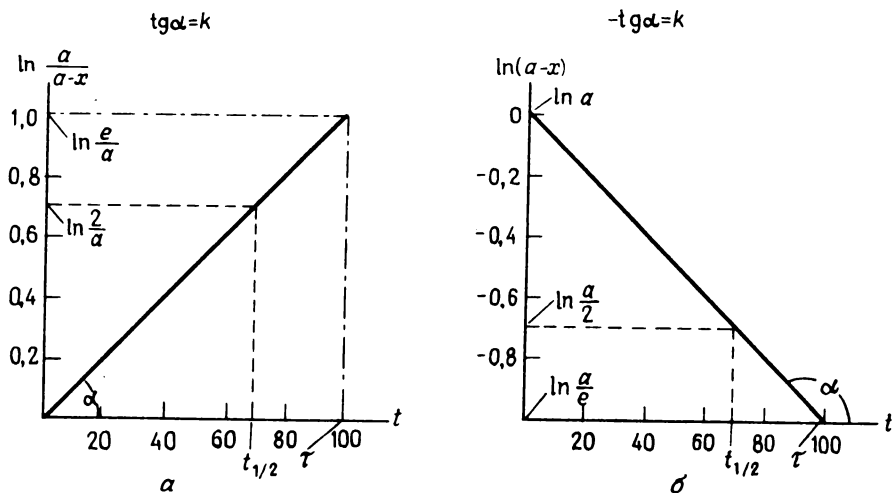


Рис. 2. Кинетические графики для реакции первого порядка в полулогарифмических координатах. $a = 1,0$, $k = 0,01 \text{ с}^{-1}$; график типа б называется *графиком Гугенгейма*.

и

$$\lg(a/[a-x]) = 0,434kt \quad (72a)$$

Значение константы скорости можно определить графически. Например, если построить графики зависимости $\ln(a/[a-x])$ или $\lg(a/[a-x])$ от времени, то получим прямые линии, проходящие через начало координат с наклоном, равным соответственно k и $0,434k$ (рис. 2, а).

Другой способ состоит в преобразовании уравнения в форму

$$\ln(a-x) = \ln a - kt \quad (73)$$

и построении графика в координатах $\{\ln(a-x), t\}$. В этом случае получим прямую линию, отсекающую на оси ординат отрезок $\ln a$ и имеющую наклон $-k$ (рис. 2, б) или $-434k$, если использовать десятичные логарифмы.

Следует заметить, что уравнение скорости мономолекулярной необратимой реакции первого порядка иногда представляют в нелогарифмическом виде, решая его относительно остаточной концентрации реагента

$$a-x = a \exp(-kt) \quad (74)$$

Для количества образовавшегося продукта получаем следующее вы-

ражение:

$$x = a[1 - \exp(-kt)] \quad (75)$$

Запишем x для момента времени $t + \Delta t$:

$$x' = a(1 - \exp[-k(t + \Delta t)]) \quad (76)$$

Умножив обе части уравнения (76) на $\exp(k\Delta t)$, вычтем его из (75), и после окончательного преобразования получим

$$x = a(1 - \exp(k\Delta t)) + x' \exp(k\Delta t) \quad (77)$$

Построив график зависимости x от x' (при постоянном Δt), получим прямую линию (график Кезди — Свинборна), наклон которой равен $\exp(k\Delta t)$, откуда, зная Δt , можно вычислить k . Используя различные значения Δt , получим набор прямых линий, пересекающихся в одной точке. Эта общая точка соответствует x_∞ при $t = \infty$, поскольку в ней $x = x'$. Аналогичным образом для значения, соответствующего x_0 (например, для $\Delta t = 10$ с x' измерено в момент $t = 10$ с), можно определить x_0 и, следовательно, a (рис. 3). Такой графический способ удобен, так как не требует знания x_0 или x_∞ .

Чтобы проверить, действительно ли реакция является мономолекулярной, необратимой и имеет первый порядок, используется несколько методов. Во-первых, необходимо удостовериться в том,

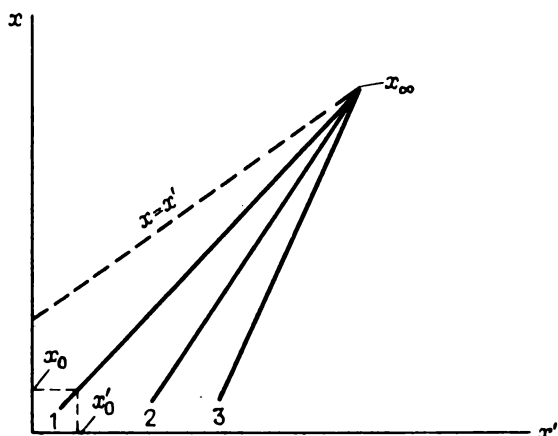


Рис. 3. Схематическое представление реакции первого порядка в виде *графика Кезди — Свинборна*. Штриховой линией обозначена теоретическая кривая с $x = x'$, т. е. кривая, у которой численное значение абсциссы равно значению ординаты ($\Delta t = 0$).

1) $\Delta t = 10$ с; 2) $\Delta t = 30$ с; 3) $\Delta t = 40$ с.

что графики, представленные на рис. 2, а и б, дают прямые линии. Второй метод — это определение периода полупревращения, т. е. времени, требующегося для расходования или превращения половины количества исходного реагента. Для реакций первого порядка период полупревращения не зависит от начальной концентрации:

$$t_{1/2} = (1/k) \{ \ln(a/[a - (a/2)]) \} = \ln 2/k = 0,693k \quad (78)$$

Используя это выражение, можно определить константу скорости реакции первого порядка, измеряя период полупревращения.

Аналогично можно получить время τ , за которое концентрация исходного вещества уменьшается в e раз (т. е. когда количество образовавшегося продукта составит $(e - 1)/e$ часть реакционной смеси. Значение τ непосредственно дает величину, обратную константе скорости:

$$\begin{aligned} \tau &= (1/k) \ln \{ a/[a - a(e - 1)/e] \} = (1/k) \ln \{ ea/[ea - a(e - 1)] \} = \\ &= (1/k) \ln e = 1/k \end{aligned} \quad (79)$$

В дальнейшем мы рассмотрим также дифференциальный метод определения порядка реакции.

Аналогичные результаты получаются для реакций *псевдопервого* порядка, т. е. для таких реакций второго порядка, в которых концентрация одного из реагентов столь высока, что остается практически постоянной на протяжении всей реакции. В этом случае, поскольку скорость реакции зависит только от концентрации одного реагента, получаем зависимости, характерные для реакции первого порядка. Реакции псевдопервого порядка можно отличить от истинных реакций первого порядка, только варьируя концентрацию реагента, взятого в избытке, так как скорость реакции зависит и от концентрации этого реагента. Построив график зависимости константы скорости реакции псевдопервого порядка от концентрации реагента, взятого в избытке, получаем прямую линию, по наклону которой можно рассчитать константу скорости реакции второго порядка.

2.6.2. Бимолекулярная реакция второго порядка при взаимодействии двух молекул одного вещества друг с другом.



Уравнение скорости имеет вид

$$v = dx/dt = k(a - x)^2 \quad (80)$$

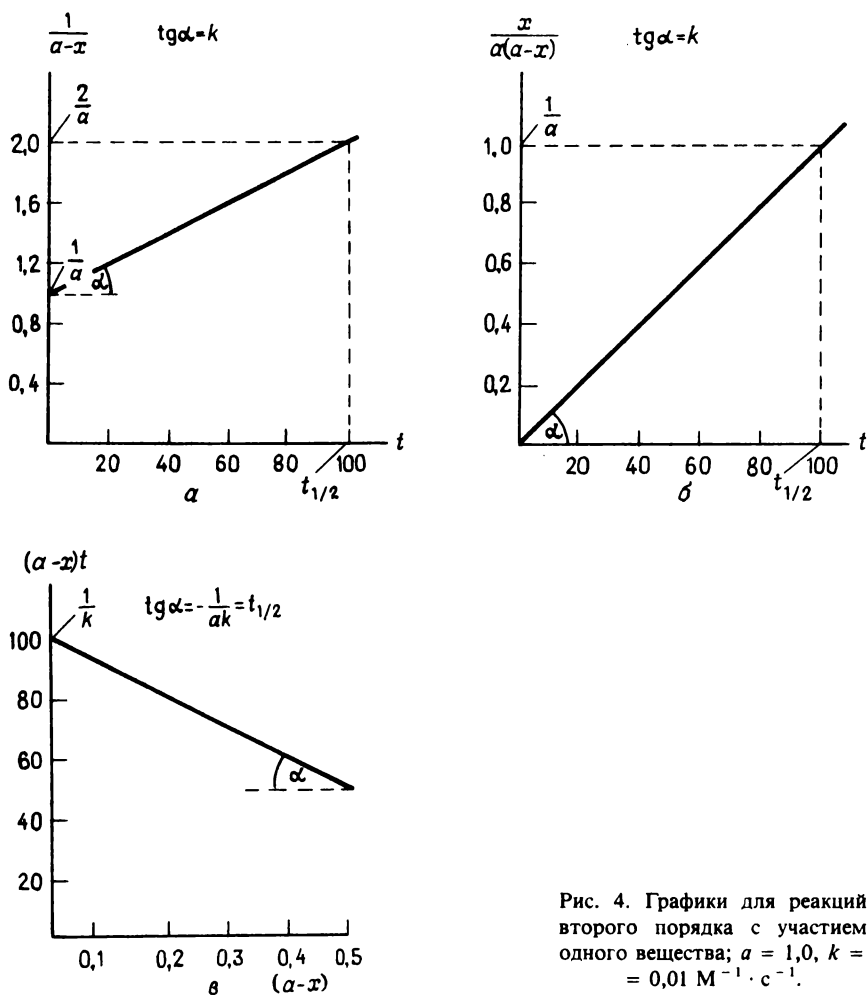


Рис. 4. Графики для реакций второго порядка с участием одного вещества; $a = 1,0$, $k = 0,01 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$.

Разделив переменные

$$dx/(a-x)^2 = kdt \quad (81)$$

и проинтегрировав, получим

$$1/(a-x) = kt + C \quad (82)$$

При $t = 0$ имеем $x = 0$ и, следовательно, $C = 1/a$. Подставляем полученное значение в уравнение (82):

$$1/(a-x) = kt + 1/a \quad (83)$$

Построив график в координатах $1/(a - x)$ от t , получим прямую линию с наклоном k , отсекающую на оси ординат отрезок $1/a$ (рис. 4, а).

Преобразуем (83):

$$x/a(a - x) = kt \quad (84)$$

Графическое представление зависимости $x/a(a - x)$ от времени t даст прямую линию, проходящую через начало координат, с наклоном k (рис. 4, б).

Еще удобнее использовать уравнение (83) в другом виде:

$$(a - x)t = 1/k - (a - x)/ak \quad (85)$$

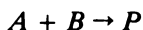
График в координатах $\{(a - x)t; (a - x)\}$ отсекает на оси ординат отрезок $1/k$, а наклон будет равен $-1/ak$ (рис. 4, в).

Можно также использовать метод измерения периода полупревращения:

$$t_{1/2} = (a/2)/ka(a - a/2) = 1/ak \quad (86)$$

который в отличие от $t_{1/2}$ реакции первого порядка зависит от концентрации исходного вещества.

2.6.3. Реакция второго порядка, протекающая между двумя различными веществами.



Уравнение скорости реакции имеет вид

$$v = dx/dt = k(a - x)(b - x) \quad (87)$$

Разделив переменные, получим

$$dx/(a - x)(b - x) = kdt \quad (88)$$

Приведенное выше уравнение можно проинтегрировать только по частям. Примем, что

$$dx[A/(a - x) + B/(b - x)] = kdt \quad (89)$$

где $A = 1/(b - a)$ и $B = 1/(a - b)$, т. е.

$$[1/(b - a)(a - x) + 1/(a - b)(b - x)]dx = kdt \quad (90)$$

Проинтегрируем (90):

$$-\ln[(a - x)/(b - a)] + \ln[(b - x)/(a - b)] = kt + C \quad (91)$$

и

$$[1/(a-b)]\ln[(a-x)/(b-x)] = kt + C \quad (92)$$

При $t = 0$ имеем

$$x = 0 \text{ и } C = [1/(a-b)]\ln(a/b) \quad (93)$$

Подставим полученное выражение для C в уравнение (91):

$$[1/(a-b)]\ln[(a-x)/(b-x)] = kt + [1/(a-b)]\ln(a/b) \quad (94)$$

и после преобразования получим

$$[1/(a-b)]\ln[b(a-x)/a(b-x)] = kt \quad (95)$$

Таким образом, построив график зависимости $[1/(a-b)]\ln[b(a-x)/a(b-x)]$ от t , получим прямую линию, проходящую через начало координат с наклоном k (рис. 5, а).

Преобразуем (95) в уравнение

$$\ln[(a-x)/(b-x)] = (a-b)kt + \ln(a/b) \quad (96)$$

из которого видно, что график зависимости $\ln[(a-x)/(b-x)]$ от t имеет вид прямой линии с наклоном $k(a-b)$, пересекающей ось ординат в точке $\ln(a/b)$ (рис. 5, б).

В этом случае выражение для периода полупревращения нельзя использовать для установления порядка реакции, так как концент-

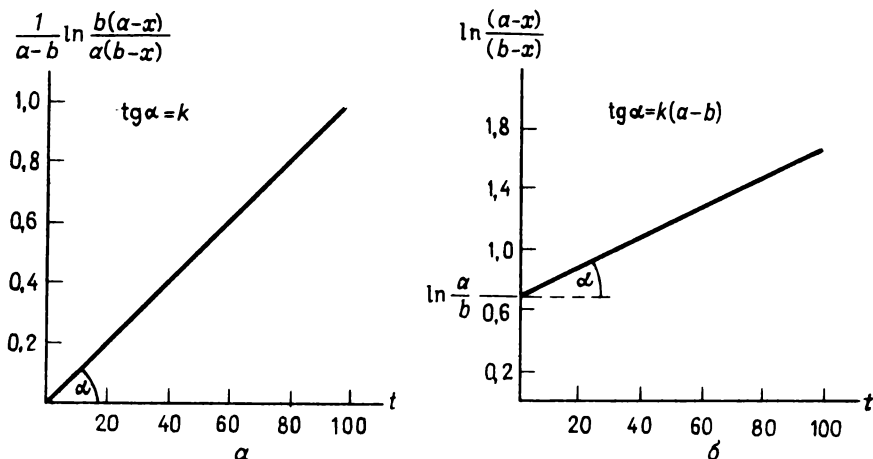


Рис. 5. Графики для реакций второго порядка с участием различных реагирующих веществ; $a = 2,0$, $b = 1,0$, $k = 0,01 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$.

рации исходных реагентов различны в нулевой момент времени.

Однако период полупревращения того или иного исходного реагента можно рассчитать, заменив в уравнении (96) $a/2$ и $b/2$ на x . Например, период полупревращения по А имеет вид

$$t_{1/2}(A) = [1/(a - b)k] \ln[b/(2b - a)] \quad (97)$$

2.6.4. Реакции нулевого и некоторых дробных порядков. Для полноты картины приведем уравнения для реакций нулевого и некоторых дробных порядков.

Для реакции нулевого порядка

$$dx/dt = k, \text{ т. е. } dx = kdt \quad (98)$$

Проинтегрировав, получаем

$$x = kt, \quad t_{1/2} = a/2k \quad (99, 100)$$

Следует заметить, что, хотя простые реакции, протекающие по нулевому порядку, практически невозможны, начальная скорость реакций с участием контактных катализаторов в некоторых случаях может быть близка к нулевому порядку. Это можно объяснить, предположив, что скорость реакции пропорциональна поверхностной концентрации адсорбированных на катализаторе молекул реагента. Эта концентрация в свою очередь практически равна или приближается к насыщению при избытке реагента и достаточно сильной адсорбции его (в период времени, отвечающий начальной скорости реакции). Это объясняет, почему максимальная скорость ферментативных реакций, найденная методом экстраполяции начальной скорости к бесконечно высоким концентрациям субстрата, имеет нулевой порядок по отношению к субстрату.

Для реакций с порядком $\frac{1}{2}$

$$dx/dt = k(a - x)^{1/2} \quad (101)$$

Разделим переменные и проинтегрируем

$$2(a - x)^{1/2} = C - kt \quad (102)$$

При $t = 0$, полагая $x = 0$, вычислим константу интегрирования и, подставив ее, получим

$$2[a^{1/2} - (a - x)^{1/2}] = kt \quad (103)$$

$$t_{1/2} = (a^{1/2}/k)\sqrt{2}(\sqrt{2} - 1) \quad (104)$$

Для реакций с порядком $\frac{3}{2}$

$$dx/dt = k(a - x)^{3/2} \quad (105)$$

Разделим переменные и проинтегрируем

$$2/(a - x)^{1/2} = kt + C \quad (106)$$

Полагая, что при $t = 0$ $x = 0$, вычислим константу интегрирования и, подставив ее в уравнение, получим

$$2[1/(a - x)^{1/2} - 1/a^{1/2}] = kt \quad (107)$$

$$t_{1/2} = 2(\sqrt{2} - 1)/ka^{1/2} \quad (108)$$

2.6.5. Реакция n -го порядка. В общем случае, когда одно вещество вступает в n -молекулярную реакцию n -го порядка с $n \neq 1$



уравнение скорости имеет вид

$$v = dx/dt = k(a - x)^n \quad (109)$$

Разделим переменные

$$dx/(a - x)^n = kdt \quad (110)$$

и проинтегрируем

$$1/(n - 1)(a - x)^{n-1} = kt + C \quad (111)$$

При $t = 0$ имеем

$$x = 0 \text{ и } C = 1/(n - 1)a^{n-1} \quad (112)$$

Подставив выражение для C в уравнение (111), получим

$$[1/(n - 1)][1/(a - x)^{n-1} - 1/a^{n-1}] = kt \quad (113)$$

$$t_{1/2} = (2^{n-1} - 1)/(n - 1)ka^{n-1} \quad (114)$$

2.6.6. Общие соотношения. Наиболее важные соотношения приведены в табл. II.

Ясно, что можно рассчитать или измерить не только период полупревращения, но и времена, соответствующие частичному превращению субстрата на $\frac{1}{3}$, $\frac{2}{3}$, и, уже исходя из них или их соотношений, определить порядок реакции. Эти данные приведены в табл. III.

Правильность определения порядка зависит от точности измерения константы скорости (или времени частичного превращения). Поэтому нужно знать величину ошибки при определении константы скорости. Для расчета ошибки используют *гауссов закон распределения ошибок*.

Таблица II. Характеристические функции кинетики необратимых химических реакций

Порядок	Дифференциальное уравнение	k , найденное из интегрального уравнения	$t_{1/2}$
0	$-d(a-x)/dt = k$	x/t	$a/2k$
1	$-d(a-x)/dt = k(a-x)$	$(1/t)\ln[a/(a-x)]$	$(\ln 2)/k$
2 (A + A)	$-d(a-x)/dt = k(a-x)^2$	$(1/t)[1/(a-x) - 1/a]$	$1/ak$
2 (A + B)	$-d(a-x)/dt = k(a-x)(b-x) \ln \{[(a-x)/a][b/(b-x)]\}/t(a-b)$		$\frac{\ln(2 - a/b)^a}{k(b-a)}$
n	$-d(a-x)/dt = k(a-x)^n$	$[1/(n-1)t][1/(a-x)^{n-1} - 1/a^{n-1}]$	$\frac{(2^{n-1} - 1)}{ka^{n-1}(n-1)}$

^a Период полупревращения по A.

Для примера рассмотрим простую реакцию второго порядка

$$k = [1/(t_2 - t_1)][(a_1 - a_2)/a_1 a_2] \quad (\text{см. табл. II}) \quad (115)$$

где a_1 и a_2 — концентрация вещества A в моменты времени t_1 и t_2 .

Пусть ошибки, сделанные при определении a_1 , a_2 и t_1 , t_2 случайны и не зависят друг от друга, тогда Δk , предполагаемая суммарная ошибка в определении k , будет равна

$$(\Delta k)^2 = (\partial k / \partial t_1)^2 (\Delta t_1)^2 + (\partial k / \partial t_2)^2 (\Delta t_2)^2 + (\partial k / \partial a_1)^2 (\Delta a_1)^2 + (\partial k / \partial a_2)^2 (\Delta a_2)^2 \quad (116)$$

Таблица III. Связь между порядком реакции и временами частичных превращений

Время частичного превращения	Порядок реакции		
	0	1	2
$t_{1/3}$	$a/3k$	$(1/k)\ln(3/2)$	$1/2ak$
$t_{1/2}$	$a/2k$	$(1/k)\ln 2$	$1/ak$
$t_{2/3}$	$2a/3k$	$(1/k)\ln 3$	$2/ak$
$t_{3/4}$	$3a/4k$	$(1/k)\ln 4$	$3/ak$
$t_{1/2}/t_{1/3}$	1,5	1,7	2,0
$(t_{3/4} - t_{1/2})/t_{1/2}$	0,5	1,0	2,0

Более удобно рассчитать *относительную ошибку*

$$\begin{aligned} (\Delta k/k)^2 = & (t_1 \partial k / k \partial t_1)^2 (\Delta t_1/t_1)^2 + \\ & + (t_2 \partial k / k \partial t_2)^2 (\Delta t_2/t_2)^2 + (a_1 \partial k / k \partial a_1)^2 (\Delta a_1/a_1)^2 + \\ & + (a_2 \partial k / k \partial a_2)^2 (\Delta a_2/a_2)^2 \end{aligned} \quad (117)$$

Это выражение можно преобразовать:

$$\begin{aligned} (\Delta k/k)^2 = & (\partial \ln k / \partial \ln t_1)^2 (\Delta t_1/t_1)^2 + (\partial \ln k / \partial \ln t_2)^2 (\Delta t_2/t_2)^2 + \\ & + (\partial \ln k / \partial \ln a_1)^2 (\Delta a_1/a_1)^2 + (\partial \ln k / \partial \ln a_2)^2 (\Delta a_2/a_2)^2 \end{aligned} \quad (118)$$

Подставляем выражение (115):

$$\begin{aligned} (\Delta k/k)^2 = & [t_1/(t_2 - t_1)]^2 (\Delta t_1/t_1)^2 + \\ & + [t_2/(t_2 - t_1)]^2 (\Delta t_2/t_2)^2 + [a_2/(a_2 - a_1)]^2 (\Delta a_1/a_1)^2 + \\ & + [a_1/(a_2 - a_1)]^2 (\Delta a_2/a_2)^2 \end{aligned} \quad (119)$$

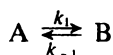
Из выражения (119) легко рассчитать суммарную *относительную ошибку определения константы скорости*.

Для того чтобы определить k с ошибкой $\pm x\%$, нужно соответственно измерить концентрации и время с точностью $\pm (\Delta c/c_{\max}) \times (x/1,4)\%$ (где c — концентрация) и $\pm (\Delta t/t_{\max})(x/1,4)\%$.

Значения констант желательно рассчитывать по измерениям со взвешиванием, поскольку отдельные измерения выполняются с различной точностью. Взвешивание удобно проводить на основании рассчитанной ошибки так, чтобы относительный вес равнялся обратному значению полученной относительной ошибки. Относительные веса нормируются на число определений.

2.7. ИНТЕГРАЛЬНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОРЯДКА РЕАКЦИИ И КОНСТАНТ СКОРОСТЕЙ ОБРАТИМЫХ РЕАКЦИЙ

2.7.1. Мономолекулярные реакции первого порядка.



Если $t = 0$, то $[A] = a$, $[B] = 0$, а в момент времени t $[A] = a - x$, $[B] = x$. Уравнение, описывающее скорость реакции, имеет вид

$$\begin{aligned} v &= v_1 - v_{-1} = \\ &= dx/dt = k_1(a - x) - k_{-1}x = k_1a - k_1x(k_{-1}/k_1 + 1) \end{aligned} \quad (120)$$

При достижении равновесия, т. е. при $v_1 = v_{-1}$, x равно $x_{\text{равн}}$,

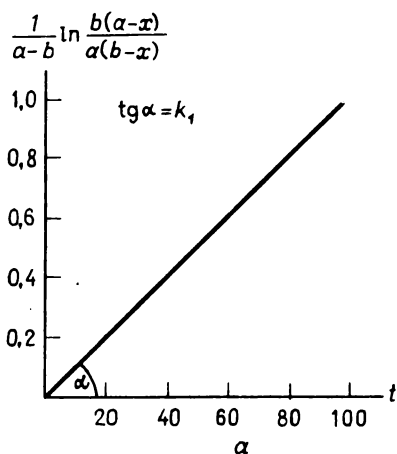


Рис. 6. График обратимой реакции первого порядка;
 $a = 1,0$, $k_1 = 0,01 \text{ с}^{-1}$.

тогда

$$k_1(a - x_{\text{равн}}) = k_{-1}x_{\text{равн}} \quad (121)$$

Следовательно,

$$a - x_{\text{равн}} = (k_{-1}/k_1)x_{\text{равн}}, \quad a/x_{\text{равн}} = k_{-1}/k_1 + 1 \quad (122, 123)$$

Подставив выражение (123) в уравнение (120), получаем

$$k_1a - k_1xa/x_{\text{равн}} = (k_1a/x_{\text{равн}})(x_{\text{равн}} - x) \quad (124)$$

Из выражений (120), (121) и (124) следует, что

$$dx/dt = (k_1a/x_{\text{равн}})(x_{\text{равн}} - x) \quad (125)$$

Проинтегрируем

$$(x_{\text{равн}}/a)\ln(x_{\text{равн}}/[x_{\text{равн}} - x]) = k_1t \quad (126)$$

Если дождаться установления окончательного равновесия в обратимой реакции, то можно определить концентрацию $x_{\text{равн}}$ и зависимость x от времени t . В этом случае графиком зависимости $(x_{\text{равн}}/a)\ln(x_{\text{равн}}/[x_{\text{равн}} - x])$ от t будет прямая, проходящая через начало координат с наклоном k_1 (рис. 6).

Другая константа скорости, k_{-1} , в свою очередь может быть вычислена из константы равновесия реакции по известной k_1 , так как константа равновесия равна

$$K = k_1/k_{-1} = x_{\text{равн}}/(a - x_{\text{равн}}) \quad (127)$$

Следует заметить, что формула справедлива только тогда, когда коэффициенты активности А и В одинаковы для всех концентраций. В общем случае при точных вычислениях вместо концентраций следует использовать активности.

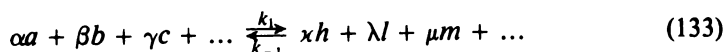
2.7.2. Реакции разных порядков. Методом интегрирования можно аналогично определять константы скорости обратимых реакций разного порядка. Соответствующие выражения для констант скоростей приведены в табл. IV. Во всех случаях, измерив константу равновесия реакции, можно определить константу скорости обратной реакции.

Таблица IV. Константы скорости обратимых химических реакций

Тип реакции	Интегральное уравнение скорости
$A \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} B$	$k_1 = (x_{\text{равн}}/at) \ln [x_{\text{равн}}/(x_{\text{равн}} - x)]$ (128)
$A \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} B + C$	$k_1 = [x_{\text{равн}}/t(2a - x_{\text{равн}})] \ln \{ [ax_{\text{равн}} + x(a - x_{\text{равн}})] / a(x_{\text{равн}} - x) \}$ (129)
$A + B \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} C$	$k_1 = [x_{\text{равн}}/t(a^2 - x_{\text{равн}}^2)] \ln \{ [x_{\text{равн}}(a^2 - xx_{\text{равн}})] / a^2(x_{\text{равн}} - x) \}^a$ (130)
	$k_1 = [x_{\text{равн}}/t(ab - x_{\text{равн}}^2)] \ln \{ [x_{\text{равн}}(ab - xx_{\text{равн}})] / ab(x_{\text{равн}} - x) \}^b$ (131)
$A + B \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} C + D$	$k_1 = [x_{\text{равн}}/2ta(a - x_{\text{равн}})] \ln \{ [x(a - 2x_{\text{равн}}) + ax_{\text{равн}}] / a(x_{\text{равн}} - x) \}^a$ (132)
	k_1 имеет сложный вид; практически не используется ^б

^а При условии, что $[A] = [B]$. ^б При условии, что $[A] \neq [B]$.

2.7.3. Реакция n -го порядка. Для состояния равновесия различных обратимых реакций, в общем случае для n -молекулярной обратимой реакции n -го порядка, можно записать



$$v_1 = k_1 a^\alpha b^\beta c^\gamma \dots \quad v_{-1} = k_{-1} h^\lambda l^\mu t^\nu \dots \quad (134)$$

в состоянии равновесия $v_1 = v_{-1}$, т. е.

$$k_1 a^\alpha b^\beta c^\gamma \dots = k_{-1} h^\lambda l^\mu t^\nu \dots \quad (135)$$

$$k_1/k_{-1} = (h^\lambda l^\mu t^\nu \dots) / (a^\alpha b^\beta c^\gamma \dots) = K \text{ (константа равновесия)} \quad (136)$$

Эта зависимость известна как *закон действующих масс Гильдберга — Вааге*.

2.8. ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОРЯДКА РЕАКЦИЙ

В общем случае для *необратимой реакции n -го порядка с участием одного вещества*, взятого в концентрации c , скорость реакции задается выражением

$$v = kc^n \quad (137)$$

Преобразуем уравнение (по Вант-Гоффу)

$$\lg v = \lg k + n \lg c \quad (138)$$

Можно измерить изменение концентрации реагента от времени при различных начальных концентрациях (c_1, c_2, \dots) и по начальному наклону кривых $c = f(t)$ графически определить начальные скорости (рис. 7, а).

Построив график зависимости логарифма начальных скоростей от логарифма начальных концентраций, получим прямую линию, пересекающую ось ординат в точке $\lg k$ и имеющую наклон n , равный порядку реакции (рис. 7, б).

Определенный таким способом порядок называют *порядком по концентрации* или «истинным» порядком.

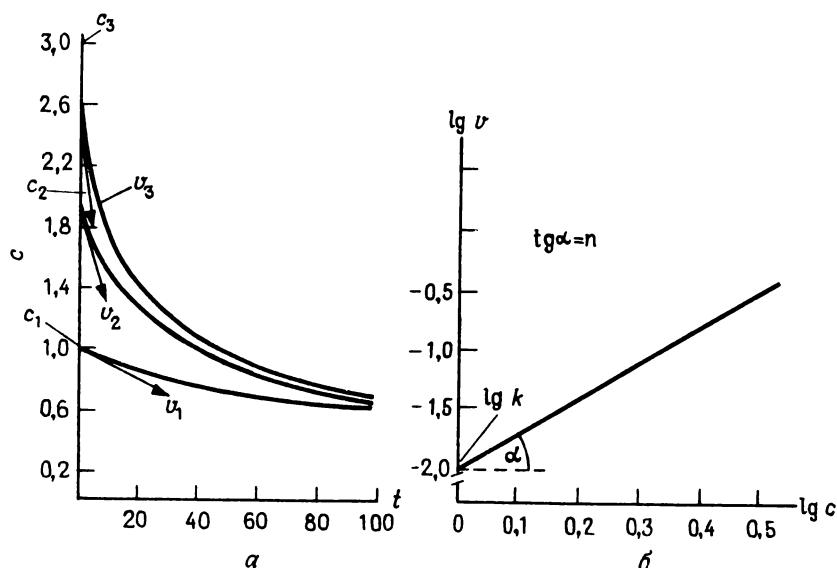


Рис. 7. Определение порядка по концентрации дифференциальным методом.
 $c_1 = 1,0$, $c_2 = 2,0$, $c_3 = 3,0$, $k = 0,01 \text{ M}^{1-n} \cdot \text{с}^{-1}$, $n = 3$.

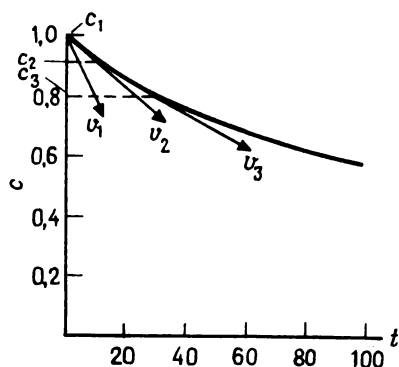


Рис. 8. Определение порядка по времени дифференциальным методом.
 $c_1 = 1,0$, $k = 0,01 \text{ М}^{1-n} \cdot \text{с}^{-1}$, $n = 3$.

Однако порядок реакции можно определить с помощью другого варианта дифференциального метода. Для этого при заданной концентрации исходного вещества измеряют ее уменьшение во времени. Каждому значению времени соответствует экспериментально измеренное значение концентрации, и по ним можно графически определить истинные скорости реакции (рис. 8).

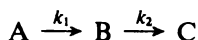
Построив график зависимости логарифмов этих скоростей от логарифмов графически определенных концентраций, получим график, аналогичный изображенному на рис. 7, б. Порядок реакции (значение n), определенный этим способом, называется *порядком во времени*.

Если порядок по концентрации равен «порядку во времени», то реакция протекает в соответствии с обычным стехиометрическим уравнением. Если порядок по концентрации выше «порядка во времени», то одно из промежуточных соединений или продуктов активирует реакцию, т. е. процесс является *автокаталитическим*. Интегральный метод всегда дает значение «порядка во времени».

Дифференциальный метод применим только в том случае, когда в реакции участвует одно вещество, и для определения частного порядка, когда изменяется концентрация только одного вещества, а концентрации остальных остаются неизменными. Частный порядок можно также определить так называемым *сегрегационным методом*, при котором концентрации всех веществ, кроме того вещества, которое будет варьироваться, берутся в столь большом избытке, что они существенно не меняются на всем протяжении реакции. Ясно, что этот метод применим только в том случае, когда взятые в избытке вещества не ингибируют и не активируют реакцию.

2.9. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ

Сложные реакции состоят из последовательных стадий. Отдельные стадии всегда имеют простой порядок. *Простейшая последовательная реакция состоит из двух необратимых стадий первого порядка:*



Временная зависимость концентраций компонентов задается уравнениями

$$-d[A]/dt = k_1[A] \quad (139)$$

$$d[B]/dt = k_1[A] - k_2[B] \quad (140)$$

$$d[C]/dt = k_2[B] \quad (141)$$

Следовательно,

$$d[A]/dt + d[B]/dt + d[C]/dt = 0 \quad (142)$$

В уравнение, описывающее расходование вещества А, входит только одна переменная, следовательно, его можно непосредственно интегрировать (см. формулу (74), разд. 2.6.1):

$$[A] = [A]_0 \exp(-k_1 t) \quad (143)$$

Уравнение, описывающее образование вещества В, нельзя сразу интегрировать, так как помимо изменяющегося времени оно содержит также две переменные концентрации. Но можно подставить интегральное выражение для [А]:

$$d[B]/dt = k_1 [A]_0 \exp(-k_1 t) - k_2 [B] \quad (144)$$

В этом случае останется только одна переменная концентрация и можно провести интегрирование

$$[B] = [A]_0 [k_1 / (k_2 - k_1)] (\exp(-k_1 t) - \exp(-k_2 t)) \quad (145)$$

Так как начальная концентрация вещества А равна $[A]_0$, то в любой момент времени

$$[A] + [B] + [C] = [A]_0 \quad (146)$$

т. е.

$$[C] = [A]_0 - [A] - [B] \quad (147)$$

Подставляя в формулу (147) ранее полученные интегральные выражения (143) и (145), получаем

$$[C] = [A]_0 [1 - (k_2 e^{-k_1 t} - k_1 e^{-k_2 t}) / (k_2 - k_1)] \quad (148)$$

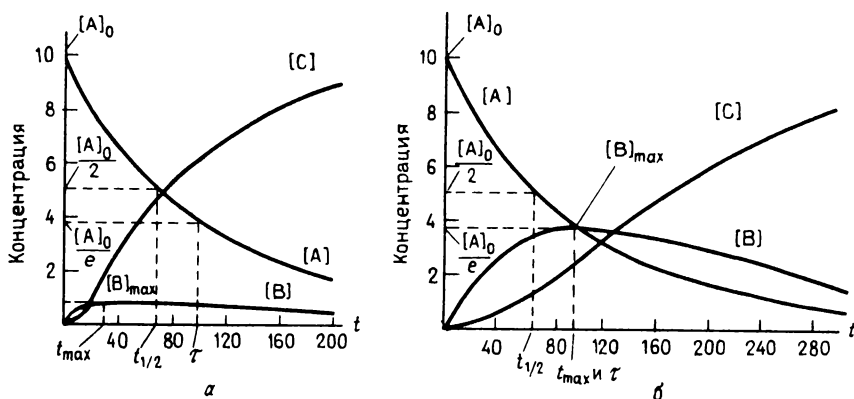


Рис. 9. Кинетические кривые для двух последовательных реакций первого порядка.
 а — $[A]_0 = 10$, $k_1 = 0,01 \text{ с}^{-1}$, $k_2 = 0,1 \text{ с}^{-1}$; б — $[A]_0 = 10$, $k_1 = k_2 = 0,01 \text{ с}^{-1}$.

Временной ход концентрационных кривых отдельных компонентов рассмотренной выше последовательной реакции показан на рис. 9.

Из этого рисунка видно, что скорость образования продукта описывается сигмоидной кривой. Сигмоидная временная зависимость накопления одного вещества может указывать на наличие индукционного периода (например, в случае каталитических реакций). Однако для последовательных реакций сигмоидная кривая накопления данного вещества указывает на наличие промежуточного продукта.

Выделение или по крайней мере обнаружение промежуточных продуктов связано обычно с определенными трудностями. Промежуточный продукт можно обнаружить, когда концентрация В достигает максимума, т. е. когда $[B]/dt = 0$. Время, когда [B] достигает своего максимума, обозначается через $t_{\max} \cdot d[B]/dt = 0$, если

$$t_{\max} = \ln(k_2/k_1)/(k_2 - k_1) \quad (149)$$

Относительная максимальная концентрация промежуточного соединения (отнесенная к начальной концентрации исходного реагента) задается следующим выражением:

$$[B]_{\max}/[A]_0 = (k_1/k_2)^{k_2/(k_2 - k_1)} \quad (150)$$

Точка перегиба кривой [C] находится из условия $d^2[C]/dt^2 = 0$.

Так как $d[C]/dt = k_2[B]$, согласно выражению (141), то

$$d^2[C]/dt^2 = k_2(d[B]/dt) \quad (151)$$

Это означает, что точка перегиба кривой $[C]$ совпадает с максимумом кривой $[B]$, так как вторая производная $[C]$ равна нулю только в той точке, где первая производная $[B]$ принимает нулевое значение.

Однако все приведенные выше соотношения верны только тогда, когда $k_1 \neq k_2$. Если же $k_1 = k_2 = k$, то

$$[A] = [A]_0 e^{(-kt)}, \quad [B] = [A]_0 k t e^{(-kt)} \quad (152, 153)$$

$$[C] = [A]_0 [1 - (1 + kt)e^{(-kt)}] \quad (154)$$

Эти уравнения справедливы только в том случае, когда обе стадии реакции строго необратимы и вещество C никаким образом не может быть получено непосредственно из A . Более того, вычисления значительно усложнились бы, если бы стадии реакции имели не первый порядок.

Весьма часто одна из констант скоростей реакции намного больше всех остальных. При этом скорость сложной многостадийной последовательной реакции определяется главным образом наименьшей константой скорости, если различие в величинах констант составляет несколько порядков. Промежуточный продукт может накапливаться в достаточно высокой концентрации только в том случае, если он сам является исходным веществом медленной стадии реакции (по сравнению с предыдущими). Если же промежуточный продукт, образующийся в сравнительно медленной стадии, очень быстро расходуется в последующей, то его концентрация будет очень низкой и квазистационарной на протяжении всей реакции.

Таким образом, если $k_1 \gg k_2$, то вместо соотношений (145) и (148) получаем

$$[B] = [A]_0 e^{(-k_2 t)}, \quad [C] = [A]_0 (1 - e^{(-k_2 t)}) \quad (155, 156)$$

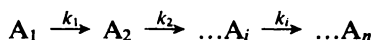
поскольку величина k_2 пренебрежимо мала по сравнению с k_1 , а $e^{-k_1 t}$ — по сравнению с $e^{-k_2 t}$.

Если $k_1 \ll k_2$, то

$$[B] = (k_1/k_2)[A]_0 e^{(-k_1 t)}, \quad [C] = [A]_0 (1 - e^{(-k_1 t)}) \quad (157, 158)$$

Если серия последовательных реакций включает n необрати-

мых реакций первого порядка



то скорость реакции имеет вид

$$d[A_i]/dt = k_{i-1}[A_{i-1}] - k_i[A_i] \quad (159)$$

где $i = 1, \dots, n$ и $k_0 = k_n = 0$.

$$[A_i] = \sum_{a=1}^i \sum_{b=1}^i [(k_a k_{a+1} \dots k_{i-1}) e^{-k_b t} \times \\ \times [A_a^0] / (k_i - k_b)(k_{i-1} - k_b) \dots (k_a - k_b)] \quad (160)$$

где $b \geq a$. Если $b = a$, то $(k_a - k_b) = 1$.

Скорость расходования исходного вещества описывается уравнением (68), выведенным для мономолекулярных необратимых реакций первого порядка. Уравнение накопления продукта представлено ниже:

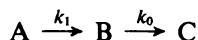
$$d[A_n]/dt = k_{n-1}[A_{n-1}] \quad (161)$$

Если $k_1 = k_2 = \dots = k_i = k_{n-1}$, то

$$[A]_i = \sum_{n=0}^{i-1} [A_{i-1}^0] [(k_1 t)^n / n!] e^{-k_1 t} \quad (162)$$

Например, денатурация белковой молекулы обычно представляет собой мономолекулярную необратимую реакцию первого порядка. Если молекула состоит из ряда субъединиц, одна за другой разрушающихся в последовательной реакции в процессе денатурации, то также можно применять уравнения (159)—(162). Если даже эти равенства не выполняются, то механизм оказывается более сложным, с возможными параллельными реакциями или рекомбинацией неденатуированных субъединиц.

Если в последовательной реакции первая стадия имеет первый порядок, а вторая — нулевой



то

$$-da/dt = k_1 a \quad (163)$$

(В дальнейшем концентрации веществ будем обозначать соответствующими строчными буквами.)

$$db/dt = k_1 a - k_0, \quad dc/dt = k_0 \quad (164, 165)$$

Проинтегрировав выражения (163)—(165), получим

$$a = a_0 e^{-k_1 t}, \quad b = a_0(1 - e^{-k_1 t}) - k_0 t \quad (166, 167)$$

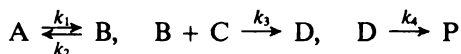
$$c = k_0 t \quad (168)$$

Очевидно, что скоростьюлимитирующей является реакция нулевого порядка.

У некоторых организмов отдельные *процессы детоксикации* имеют похожую кинетику.

Если *последовательная реакция состоит не из двух, а из большего числа элементарных стадий* и константа скорости одной намного меньше констант всех последующих стадий, приводящих к образованию продукта, то скорость образования продукта зависит как от константы скорости самой медленной стадии, так и констант скорости предшествующих стадий и не зависит от констант скорости последующих элементарных стадий. В этом случае стадия с наименьшей константой скорости называется тоже *скоростьюлимитирующей*, хотя такое название ошибочно, потому что скорость всей реакции определяется не только наименьшей константой, но и константами всех предшествующих стадий.

Для примера рассмотрим элементарные стадии процесса $A + C \rightarrow P$:



Предположим, что концентрации промежуточных продуктов В и D намного меньше концентраций А и С в любой момент времени, тогда для *квазистационарного состояния*, обозначенного индексом «ss» (стационарное состояние, см. разд. 3.1.2) получаем

$$b_{ss} = k_1 a / (k_2 + k_3 c) \quad (169)$$

$$d_{ss} = k_3 b c / k_4 = k_1 k_3 a c / (k_4 (k_2 + k_3 c)) \quad (170)$$

Из этих выражений следует, что $k_2 + k_3 c \gg k_1$ и $k_4 \gg k_3 c^*$. Для скорости образования продукта можно записать

$$dP/dt = k_4 d = k_1 k_3 a c / (k_2 + k_3 c) \quad (171)$$

Если $k_2 \gg k_3 c$, то скоростьюлимитирующей становится третья эле-

* $k_3 c$ — кажущаяся константа скорости первого порядка, так как она имеет размерность c^{-1} .

ментарная стадия:

$$dP/dt = k_1 k_3 a c / k_2 \quad (172)$$

Если $k_2 \ll k_3 c$, то самой медленной будет первая элементарная стадия, и

$$dP/dt = k_1 a \quad (173)$$

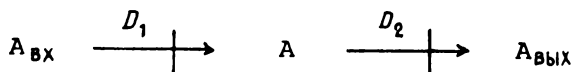
Время образования одной молекулы продукта представляет собой просто сумму значений времен протекания элементарных актов отдельных элементарных стадий:

$$t_p = t_1 + t_2 + \dots + t_n \quad (174)$$

Суммарная скорость реакции является величиной, обратной этой сумме:

$$v_p = 1/t_p \quad (175)$$

Последовательные реакции могут протекать и в открытых системах. Рассмотрим сосуд, содержащий вещество А, соединенный с двумя резервуарами; из одного резервуара вещество ($A_{\text{вх}}$) входит в сосуд с А, в другой резервуар вещество ($A_{\text{вых}}$) выходит из сосуда с А:



$a_{\text{вх}}$ — концентрация входящего вещества $A_{\text{вх}}$, a — концентрация А, $a_{\text{вых}}$ — концентрация выходящего вещества $A_{\text{вых}}$, D_1 и D_2 — коэффициенты диффузии. Тогда

$$da/dt = D_1(a_{\text{вх}} - a) - D_2(a - a_{\text{вых}}) = D_1 a_{\text{вх}} + D_2 a_{\text{вых}} - (D_1 + D_2)a \quad (176)$$

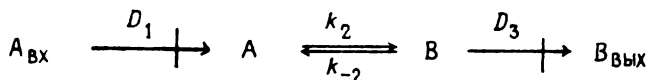
Проинтегрируем:

$$a = (D_1 a_{\text{вх}} + D_2 a_{\text{вых}}) / (D_1 + D_2) + [a_0 - (D_1 a_{\text{вх}} + D_2 a_{\text{вых}}) / (D_1 + D_2)] e^{-(D_1 + D_2)t} \quad (177)$$

где a_0 — концентрация вещества А в момент времени $t = 0$.

После достаточно длительного промежутка времени экспоненциальный член стремится к нулю и, следовательно, a стремится к постоянному значению.

Если в сосуде протекает реакция



то, применяя введенные выше обозначения, получаем следующие дифференциальные уравнения:

$$da/dt = D_1(a_{\text{вх}} - a) + k_{-2}b - k_2a \quad (178)$$

$$db/dt = k_2a - k_{-2}b - D_3(b - b_{\text{вых}}) \quad (179)$$

Решаем эти уравнения для случая *стационарного состояния*, когда $da/dt = 0$ и $db/dt = 0$, т. е. когда выход, вход и превращение вещества уравнивают друг друга:

$$a_{ss} = (D_1k_{-2}a_{\text{вх}} + D_1D_3a_{\text{вх}} + k_{-2}D_3b_{\text{вых}})/(D_1k_{-2} + D_1D_3 + k_2D_3) \quad (180)$$

$$b_{ss} = (D_1k_2a_{\text{вх}} + D_1D_3b_{\text{вых}} + k_2D_3b_{\text{вых}})/(D_1k_{-2} + D_1D_3 + k_2D_3) \quad (181)$$

Исследование полного решения уравнений (178) и (179) приводит к следующим соотношениям:

$$a' = c_1e^{\lambda_1 t} + c_2e^{\lambda_2 t}, \quad b' = c_3e^{\lambda_1 t} + c_4e^{\lambda_2 t} \quad (182, 183)$$

где $a' = a - a_{ss}$ и $b' = b - b_{ss}$, λ_1 и λ_2 — корни *характеристического уравнения* * (184)

$$\lambda^2 + \lambda(D_1 + k_2 + k_{-2} + D_3) + (D_1D_3 + D_1k_{-2} + k_2D_3) = 0 \quad (184)$$

Очевидно, что установление равновесия определяется константами скорости всех процессов, протекающих в системе.

Коэффициенты $c_1 - c_4$ в уравнениях (182)—(184) можно оценить, варьируя условия системы, находящейся в стационарном состоянии, и переводя ее таким образом в другое стационарное состояние. Обозначим изменение концентраций, наблюдавшееся при переходе системы в новое стационарное состояние Δa и Δb . В этом случае

$$c_1 = [-(\lambda_2 + D_1 + k_2)\Delta a + k_{-2}\Delta b]/(\lambda_1 - \lambda_2) \quad (185)$$

$$c_2 = [(\lambda_1 + D_1 + k_2)\Delta a - k_{-2}\Delta b]/(\lambda_1 - \lambda_2) \quad (186)$$

$$c_3 = [k_2\Delta a - (\lambda_2 + k_{-2} + D_3)\Delta b]/(\lambda_1 - \lambda_2) \quad (187)$$

$$c_4 = [-k_2\Delta a + (\lambda_1 + k_{-2} + D_3)\Delta b]/(\lambda_1 - \lambda_2) \quad (188)$$

Различные возможные пути перехода из одного стационарного состояния в другое представлены на рис. 10.

Как правило, система асимптотически приближается к стационарному состоянию (рис. 10, кривая *A*). В отдельных случаях наблюдается *единичное колебание* («переброс», рис. 10, кривая *B*) или так называемый *фальш-старт* (рис. 10, кривая *C*).

* См. «Приложение» в конце книги, разд. 3.14.1.

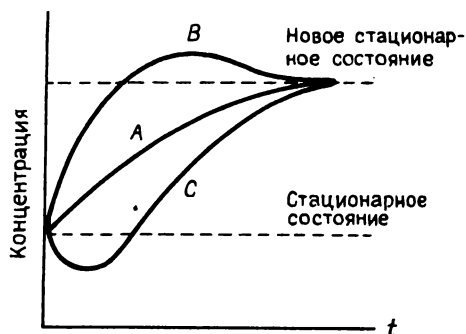


Рис. 10. Возможные способы приближения открытой системы к стационарному состоянию.

«Переброс» наблюдается в случае, когда a' или b' равняется нулю и в конечный момент времени t и при t_{∞} . Пусть a' равно нулю, подставляем его в выражение (182):

$$\exp(\lambda_2 - \lambda_1)t_1 = -c_1/c_2 \quad (189)$$

Для того чтобы t_1 принимало положительное и конечное значение, должно выполняться одно из неравенств: либо $\lambda_2 > \lambda_1$, т. е.

$$-(c_1/c_2) > 1 \quad (190)$$

либо $\lambda_2 < \lambda_1$, т. е.

$$0 < -(c_1/c_2) < 1 \quad (191)$$

Подставляя c_1/c_2 из (184)—(186), получаем

$$\begin{aligned} [(D_1 + k_2 - k_{-2} - D_3)^2 + 4k_2k_{-2}]^{1/2} < \\ < [(D_1 + k_2 - k_{-2} - D_3) - 2k_{-2}\Delta b/\Delta a] \end{aligned} \quad (192)$$

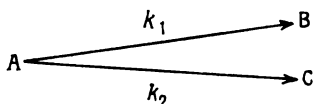
из предшествующих рассуждений следует, что переброс по a возможен только при условии, что $D_1 > D_3$, а по b — если $D_1 < D_3$. Если реакция $A \rightarrow B$ необратима, то переброс возможен только по b .

2.10. СКОРОСТЬ ПАРАЛЛЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ

При некоторых условиях вещество может реагировать не единственным, а различными путями с соизмеримыми скоростями. Такие процессы называются *параллельными* реакциями. Они могут приводить к образованию как одинаковых, так и различных продуктов. В первом случае реакция идет по разным механизмам. (Очевидно, что проследить механизм такой реакции — чрезвычайно сложная задача.) Если параллельная реакция приводит к образова-

нию различных продуктов, то превращение реагентов имеет непростую стехиометрию. Если одна из реакций преобладает над остальными, то она называется *основной*, а остальные — *побочными*. Некоторые авторы в соответствии со своим произвольным выбором ошибочно называют реакцию основной, даже если она подавляется другими реакциями. Мы будем использовать название «основная реакция» в его первоначальном (количественном) значении.

Уравнение для скорости параллельных реакций, приводящих к образованию различных конечных продуктов, может быть получено простейшим образом для случая *двух параллельных необратимых реакций первого порядка*.



В принятых обозначениях

$$-da/dt = (k_1 + k_2)a = db/dt + dc/dt \quad (193)$$

т. е.

$$a = a_0 \exp[-(k_1 + k_2)t] \quad (194)$$

$$db/dt = k_1 a_0 \exp[-(k_1 + k_2)t] \quad (195)$$

$$b = (k_1/[k_1 + k_2])a_0(1 - \exp[-(k_1 + k_2)t]) \quad (196)$$

$$c = (k_2/[k_1 + k_2])a_0(1 - \exp[-(k_1 + k_2)t]) \quad (197)$$

или

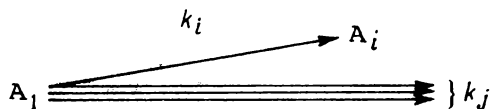
$$b/c = k_1/k_2 \quad (198)$$

Следовательно, отношение количеств образовавшихся продуктов определяется отношением констант скорости.

Измеряемая константа скорости определяется как сумма $k = k_1 + k_2$ при условии, что параллельные реакции имеют одинаковый порядок. Если известно соотношение количеств продуктов и суммарная константа скорости, то можно рассчитать индивидуальные константы скорости, так как

$$k_1 = (b/[b + c])k, \quad k_2 = (c/[b + c])k \quad (199, 200)$$

В общем случае пусть вещество расходуется в результате n параллельных реакций первого порядка:



Скорость расходования исходного вещества задается уравнением

$$-da_1/dt = \left(\sum_j k_j \right) a_1 \quad (201)$$

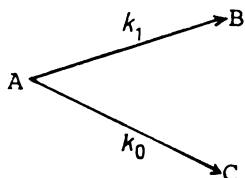
Концентрацию одного из конечных продуктов в любой момент времени можно задать уравнением

$$a_i = a_{i0} + \left(k_i / \sum_j k_j \right) a_{1,0} \left(1 - \exp \left[- \sum_j k_j t \right] \right) \quad (202)$$

По аналогии с (198) получаем

$$(a_i - a_{i0}) / (a_j - a_{j0}) = k_i / k_j \quad (203)$$

Если одна из двух параллельных реакций имеет нулевой порядок



$$-da/dt = db/dt + dc/dt = k_1 a + k_0 \quad (204)$$

$$a = a_0 \exp(-k_1 t) + (k_0/k_1)(\exp(-k_1 t) - 1) \quad (205)$$

Так как $a_0 = a + b + c$ и $c = k_0 t$, а $b_0 = 0$ и $c_0 = 0$, то

$$\begin{aligned} b &= a_0 - k_0 t - a_0 \exp(-k_1 t) - (k_0/k_1)(\exp(-k_1 t) - 1) = \\ &= (a_0 + k_0/k_1)[(1 - \exp(-k_1 t))] - k_0 t \end{aligned} \quad (206)$$

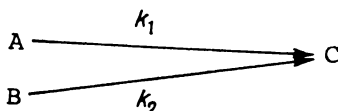
Пусть $a = 0$ в момент времени $t = t_{\text{кон}}$ (в конце реакции), тогда $a_0 = b + c$ и

$$a_0 = (a_0 + k_0/k_1)(1 - \exp[-k_1 t_{\text{кон}}]) \quad (207)$$

$$t_{\text{кон}} = -(1/k_1) \ln[k_0/(k_0 + k_1 a_0)] \quad (208)$$

Уравнение (208) задает время окончания реакции.

Пусть исходные реагенты для двух отдельных реакций первого порядка различны



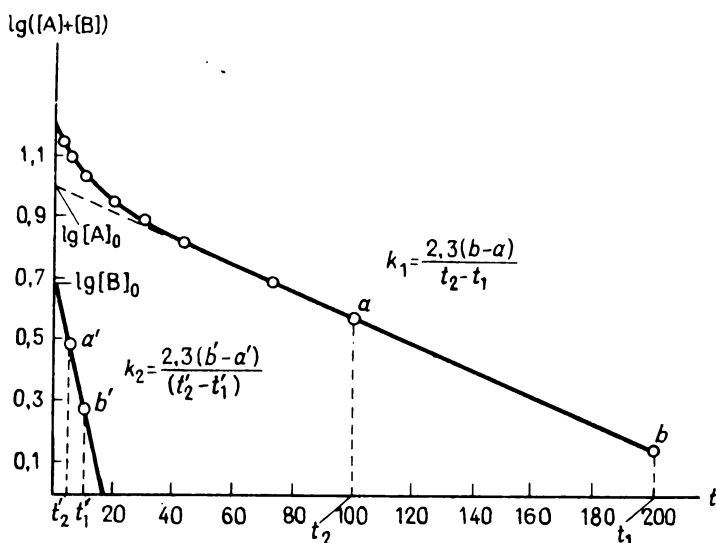


Рис. 11. Графическая оценка параметров двух параллельных реакций первого порядка, протекающих с образованием одинаковых продуктов. $[A]_0 = 10$, $[B]_0 = 5$, $k_1 = 0,01 \text{ с}^{-1}$, $k_2 = 0,1 \text{ с}^{-1}$.

тогда $a = a_0 \exp(-k_1 t)$ и $b = b_0 \exp(-k_2 t)$ и при условии, что $c_0 = 0$,

$$dc/dt = k_1 a + k_2 b = k_1 a_0 \exp(-k_1 t) + k_2 b_0 \exp(-k_2 t) \quad (209)$$

$$c = a_0 + b_0 - (a_0 \exp(-k_1 t) + b_0 \exp(-k_2 t)) \quad (210)$$

Если порядки величин двух констант скорости различны, то возможно их одновременное определение. После весьма длительного времени быстрый процесс практически прекратится, а медленный еще можно регистрировать. В этом случае скорость всей реакции задается лишь одной экспонентой и поэтому константу скорости, стоящую в экспоненте, можно будет определить обычным способом. Вычитанием медленного процесса из суммарной реакции можно рассчитать далее быстрый процесс (рис. 11). На практике последнюю часть кривой, полученную из графика в полулогарифмических координатах, обычно экстраполируют к $t = 0$ прямой линией. Точки этой экстраполированной прямой линии нужно вычесть из экспериментально полученных точек, и при этом в полулогарифмических координатах должна получиться вторая прямая линия (если мы имеем только две параллельные реакции). Наклоны двух прямых линий дадут константы скорости медленного и быстрого

процессов. Отрезки, отсекаемые прямыми на оси ординат, равны исходным концентрациям медленно (a_0) и быстро (b_0) реагирующих веществ.

Аналогично проводится графический анализ трех или большего числа параллельных реакций. Однако ошибка метода при числе реакций больше трех настолько велика, что им нельзя пользоваться.

Применение этого метода может дать очень точную информацию при проведении ферментативных исследований. Модифицируя боковые аминокислотные цепи белка, можно вызывать параллельные реакции при условии, что часть боковых цепей, которые нужно промодифицировать, находится на поверхности белка, а часть внутри молекулы. Обычно группы, расположенные на поверхности, реагируют быстрее находящихся в глубине молекулы. Очевидно, что это и есть тот самый случай, когда из двух различных исходных веществ (т. е. из поверхностных и внутренних боковых цепей) путем параллельных реакций образуется один и тот же продукт (модифицированная боковая цепь). Следовательно, мы можем определить часть боковых цепей как на поверхности, так и в глубине молекулы. Если константы скорости более быстрой реакции и процесса инактивации фермента равны, то можно предположить, что реагирующие группы участвуют в каталитическом процессе. Если константа скорости медленной реакции равна константе скорости процесса денатурации белка, то скоростью лимитирующей стадией в серии реакций, приводящих к выводу на поверхность и реакции функциональных групп, является разворачивание полипептидной цепи.

2.11. СКОРОСТЬ АВТОКАТАЛИТИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ

Простейшая автокаталитическая реакция — это *мономолекулярная, необратимая реакция первого порядка*, в которой образующийся продукт катализирует данную реакцию. В реакции



$[A] = a$ и $[B] = 0$ в момент $t = 0$ и $[A] = a - b$ и $[B] = b$ в момент времени t . Так как в момент времени $t = 0$ концентрация $[B]$ равна нулю, то до $t = \varepsilon$ реакция имеет кинетику, характерную для мономолекулярных, необратимых реакций первого порядка. Однако при $t = \varepsilon$ $[B] = \delta$ и в дальнейшем скорость реакции задается уравнением

$$db/dt = kb(a - b) \quad (211)$$

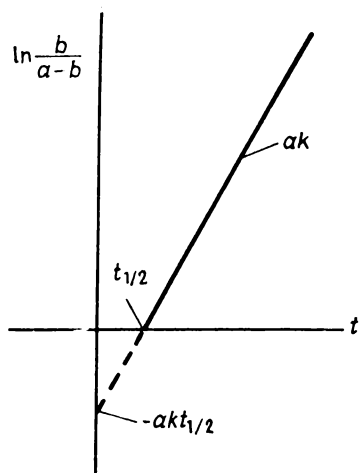


Рис. 12. Схематическое графическое представление параметров автокаталитической реакции. Согласно уравнению (211), k — константа скорости второго порядка.

Проинтегрируем

$$\ln[b/(a-b)] = akt + C \quad (t = t_{1/2}, \text{ если } b = a/2) \quad (212)$$

Подстановка в уравнение (212) дает

$$\ln 1 = akt_{1/2} + C, \quad C = -akt_{1/2} \quad (213, 214)$$

Подставляем выражение (214) вновь в уравнение (212):

$$\ln[b/(a-b)] = ak(t - t_{1/2}) \quad (215)$$

$$\exp[ak(t - t_{1/2})] = b/(a-b) \quad (216)$$

Для данной реакции a и $t_{1/2}$ — постоянные величины, следовательно, $\exp(-akt_{1/2})$ — также величина постоянная и равная C' , т. е.

$$C' \exp(akt) = b/(a-b) \quad (217)$$

Построив график зависимости $\ln[b/(a-b)]$ от t , получим прямую линию с наклоном ak , отсекающую на оси абсцисс отрезок $t_{1/2}$, а на оси ординат $-akt_{1/2}$ (рис. 12).

Автокаталитические реакции имеют колоссальное значение для живых организмов. Например, активация почти всех *протеолитических ферментов* из их проферментных форм (зимогенов) является автокаталитическим процессом. Исключение составляют белковые компоненты каскада свертывания крови (см. разд. 3.2.5).

2.12. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНСТАНТ СКОРОСТИ РЕЛАКСАЦИОННЫМ МЕТОДОМ

Константы скорости быстрых реакций нельзя измерить обычными способами. В некоторых случаях бывает трудно определить константы скорости даже не очень быстрых реакций. Для определения констант скорости удобен *релаксационный метод Эйгена* с измерением времени релаксации. Он по своей сути отличается от рассмотренных выше методов, так как основан не на определении начальных скоростей или суммарной скорости реакции. Систему внезапно выводят из равновесного состояния. *Возмущение* (так называется этот процесс) может быть вызван резким изменением температуры, давления, pH и других параметров реакционной смеси. Время возмущения колеблется в интервале $10^{-6} - 10^{-9}$ с. С помощью соответствующего электронного оборудования измеряют время установления в системе нового равновесия. Временем релаксации называют время, необходимое для уменьшения отклонения от этого нового равновесия в e раз.

Если внезапное нарушение равновесия в системе происходит вследствие резкого изменения температуры (*T*-скачка), то используется устройство, в котором помещена кювета между электродами конденсатора. При разрядке конденсатора достигается следующее изменение температуры:

$$\Delta T = CE_0^2/8,36 v \rho C_p \quad (218)$$

где C — емкость конденсатора (в фарадах), E_0 — напряжение заряжающего тока (в вольтах), v — объем раствора, находящегося между электродами (в мл), ρ — плотность и C_p — удельная теплоемкость раствора. Для водных растворов $C_p \approx \rho \approx 1$, следовательно,

$$\Delta T = CE_0^2/8,36 v \quad (219)$$

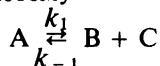
Зависимость температуры от времени (порядок временных величин используемого оборудования должен укладываться в микросекундный диапазон) имеет вид

$$\Delta T(t) = \Delta T' [(1 - \exp(-2t/RC))] \quad (220)$$

где R обозначает сопротивление цепи в омах и $\Delta T'$ — полное изменение температуры.

Рассмотрим, что происходит с химической системой во время *T*-скачка.

К примеру, возьмем систему



Пусть $[A] = a$, $[B] = [C] = x$ (и в состоянии равновесия $x = x_{\text{равн}}$). Скорость реакции равна

$$dx/dt = k_1(a - x) - k_{-1}x^2 \quad (221)$$

В состоянии равновесия

$$k_1(a - x_{\text{равн}}) = k_{-1}x_{\text{равн}}^2 \quad (222)$$

Отклонение от равновесного значения после возмущения равно

$$\Delta x = x - x_{\text{равн}} \quad (223)$$

Поскольку

$$d\Delta x/dt = dx/dt = k_1(a - x) - k_{-1}x^2 \quad (224)$$

подставив $\Delta x + x_{\text{равн}}$ вместо x , получим

$$\begin{aligned} d\Delta x/dt = & k_1a - k_1\Delta x - k_1x_{\text{равн}} - k_{-1}(\Delta x)^2 - \\ & - 2k_{-1}\Delta x x_{\text{равн}} - k_{-1}x_{\text{равн}}^2 \end{aligned} \quad (225)$$

но $k_1a - k_1x_{\text{равн}} - k_{-1}x_{\text{равн}}^2 = 0$ согласно равенству (222), и, следовательно,

$$d\Delta x/dt = -k_1\Delta x - k_{-1}(\Delta x)^2 - 2k_{-1}\Delta x x_{\text{равн}} \quad (226)$$

Так как значение Δx очень мало, то членом $(\Delta x)^2$ можно пренебречь. Тогда

$$d\Delta x/dt = -(k_1 + 2k_{-1}x_{\text{равн}})\Delta x \quad (227)$$

$$d\Delta x/\Delta x = -(k_1 + 2k_{-1}x_{\text{равн}})dt \quad (228)$$

$$\ln \Delta x = -(k_1 + 2k_{-1}x_{\text{равн}})t + C \quad (229)$$

$$C = \ln(\Delta x)_0 \text{ (т. е. } \ln \Delta x \text{ при } t = 0)$$

$$\ln[(\Delta x)_0/\Delta x] = (k_1 + 2k_{-1}x_{\text{равн}})t \quad (230)$$

По определению время релаксации τ — это время, за которое

$$(\Delta x)_0/\Delta x = e \quad (231)$$

где e — основание натурального логарифма. Так как $\ln e = 1$, то

$$\tau = 1/(k_1 + 2k_{-1}x_{\text{равн}}) \quad (232)$$

Объединив выражения (230) и (232), получаем

$$(\Delta x)/(\Delta x)_0 = \exp(-t/\tau) \quad (233)$$

Это основное уравнение релаксации. Уравнение, задающее наклон

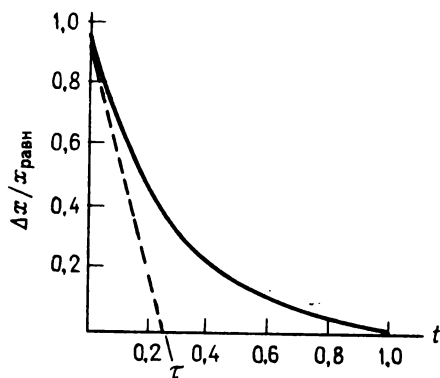


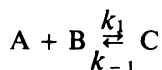
Рис. 13. Процесс релаксации (нормированный); $\tau = 0,25 \text{ с}^{-1}$.

кривой, описываемой выражением (233), при $t = 0$, можно получить, продифференцировав уравнение (233):

$$(\Delta x)_{tg} = (\Delta x)_0(1 - t/\tau) \quad (234)$$

При $t = 0$ касательная пересекает ось абсцисс в точке $t = \tau$ (рис. 13).

Следовательно, измерив время релаксации и зная $x_{\text{равн}}$, получаем соотношение между k_1 и k_{-1} . Определив константу равновесия, найдем второе соотношение, не зависящее от первого (так как $K = k_1/k_{-1}$). Таким образом, получаются два независимых друг от друга уравнения для вычисления двух неизвестных констант скорости. В случае реакции, протекающей по механизму



справедливо соотношение

$$\Delta a = \Delta b = -\Delta c \equiv \Delta x \quad (235)$$

Обозначим индексом «равн» равновесные концентрации веществ, соответствующие новой (после T -скачка) температуре. Тогда

$$a = a_{\text{равн}} - \Delta x, \quad b = b_{\text{равн}} - \Delta x, \quad c = c_{\text{равн}} + \Delta x, \quad (236)$$

$$-da/dt = -db/dt = dc/dt = k_1 ab - k_{-1} c \quad (237)$$

Из уравнений (235) — (237) получаем

$$d\Delta x/dt = k_1(a_{\text{равн}} - \Delta x)(b_{\text{равн}} - \Delta x) - k_{-1}(c_{\text{равн}} + \Delta x) = k_1(a_{\text{равн}}b_{\text{равн}} - k_{-1}c_{\text{равн}}) - [k_1(a_{\text{равн}} + b_{\text{равн}}) + k_{-1}]\Delta x + k_1(\Delta x)^2 \quad (238)$$

В состоянии равновесия

$$k_1 a_{\text{равн}} b_{\text{равн}} = k_{-1} c_{\text{равн}} \quad (239)$$

Следовательно, из уравнения (238) после подстановки в него выражения (239), получится

$$-d\Delta x/dt = [k_1(a_{\text{равн}} + b_{\text{равн}}) + k_{-1}]\Delta x + k_1(\Delta x)^2 \quad (240)$$

Поскольку Δx намного меньше, чем $a_{\text{равн}}$, $b_{\text{равн}}$, $c_{\text{равн}}$, то членом $(\Delta x)^2$ можно пренебречь:

$$-d\Delta x/dt = [k_1(a_{\text{равн}} + b_{\text{равн}}) + k_{-1}]\Delta x \equiv \Delta x/\tau \quad (241)$$

$$1/\tau = k_1(a_{\text{равн}} + b_{\text{равн}}) + k_{-1} \quad (242)$$

Уравнение (241) имеет первый порядок по Δx , так как, несмотря на то что реакция бимолекулярная, возмущение невелико. Проинтегрировав уравнение, получим

$$\Delta x = c_{\text{равн}} \exp(-t/\tau) \quad (243)$$

Возьмем логарифм

$$\ln(c_{\text{равн}}/\Delta x) = t/\tau \quad (244)$$

τ легко определяется графически из уравнения (244) (рис. 14).

Из уравнения (242) видно, что τ содержит константы скорости обоих направлений. Поэтому возможно определение обоих параметров при измерении τ (рис. 15).

В действительности расчет не так прост, потому что $a_{\text{равн}}$ и $b_{\text{равн}}$, как правило, не совпадают с их аналитическими и полными концентрациями (a_0 и b_0). Предположим, что мы смешали равные объемы веществ А и В с концентрациями $2a_0$ и $2b_0$. Подождем, пока установится равновесие. Пусть K_1 — константа диссоциации

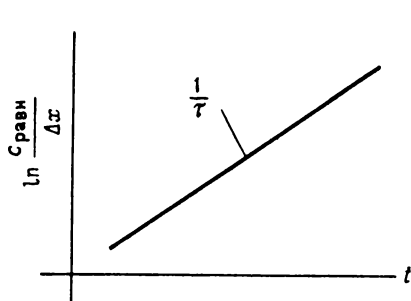


Рис. 14. Определение времени релаксации бимолекулярных обратимых реакций, протекающих с образованием одного продукта.

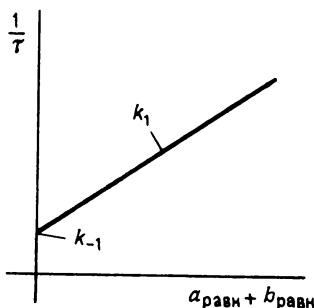


Рис. 15. Определение констант скорости по времени релаксации для обратимой бимолекулярной реакции.

вещества С

$$K_1 = k_{-1}/k_1 = a_{\text{равн}} b_{\text{равн}} / c_{\text{равн}} \quad (245)$$

Поскольку

$$a_0 = a_{\text{равн}} + c_{\text{равн}}, \quad b_0 = b_{\text{равн}} + c_{\text{равн}} \quad (246)$$

то

$$c_{\text{равн}} = a_0 - a_{\text{равн}} = b_0 - b_{\text{равн}} \quad (247)$$

Отсюда следует, что

$$a_{\text{равн}} + b_{\text{равн}} = (a_0 + b_0) - 2c_{\text{равн}} \quad (248)$$

Из уравнений (245) и (246) получаем

$$c_{\text{равн}} = a_{\text{равн}} b_{\text{равн}} / K_1 = (a_0 - c_{\text{равн}})(b_0 - c_{\text{равн}}) / K_1 \quad (249)$$

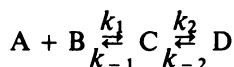
а из (248) и (249)

$$a_{\text{равн}} + b_{\text{равн}} = \sqrt{(a_0 + b_0 + K_1)^2 - 4a_0 b_0} - K_1 \quad (250)$$

Выражение (250) нужно подставить в (242), чтобы по известным значениям a_0 и b_0 и отдельно определенному K_1 найти значения $a_{\text{равн}} + b_{\text{равн}}$, необходимые для построения рис. 15.

Значения времени релаксации реакций с различными механизмами приведены в табл. V.

Для случая сложной последовательной реакции, включающей бимолекулярную и мономолекулярную стадии



суммарное время релаксации ($\tau_{1,2}$) выражается следующим образом:

$$\tau_{1,2} = 2 / \{ k_1(a_{\text{равн}} + b_{\text{равн}}) + k_{-1} + k_2 + k_{-2} \pm \sqrt{[k_1(a_{\text{равн}} + b_{\text{равн}}) + k_{-1} + k_2 + k_{-2}]^2 - 4[k_1(k_2 + k_{-2})(a_{\text{равн}} + b_{\text{равн}}) + k_{-1}k_{-2}]} \} \quad (257)$$

Отсюда следует, что

$$1/\tau_1 + 1/\tau_2 = k_1(a_{\text{равн}} + b_{\text{равн}}) + k_{-1} + k_2 + k_{-2} \quad (258)$$

$$(1/\tau_1)(1/\tau_2) = k_1(k_2 + k_{-2})(a_{\text{равн}} + b_{\text{равн}}) + k_{-1}k_{-2} \quad (259)$$

Следовательно, константы скорости могут быть определены графически (рис. 16). Обозначим через i_1 наклон прямой линии, а через

Таблица V. Время релаксации некоторых простых реакций

Механизм ^a	τ	
$A \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} B$	$1/(k_1 + k_{-1})$	(251)
$A + B \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} C$	$1/[k_1(a_{\text{равн}} + b_{\text{равн}}) + k_{-1}]$	(252)
$A \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} B + C$	$1/(k_1 + 2k_{-1}b_{\text{равн}})$	см. уравнение (232)
$A + B \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} C + D$	$1/[k_1(a_{\text{равн}} + b_{\text{равн}}) + k_{-1}(c_{\text{равн}} + d_{\text{равн}})]$	(253)
$2A \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} B$	$1/(4k_1a_{\text{равн}} + k_{-1})$	(254)
$A \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} B \xrightleftharpoons[k_{-2}]{k_2} C$	$\tau_1 = 1/\{[(k_1 + k_{-1} + k_2 + k_{-2})/2][1 + (1 -$ $- \sqrt{4(k_1 + k_{-1})(k_2 + k_{-2}) - k_{-1}k_2}/(k_1 + k_{-1} + k_2 + k_{-2})^2] \}$ $\tau_2 = 1/\{[(k_1 + k_{-1} + k_2 + k_{-2})/2][1 - (1 -$ $- \sqrt{4(k_1 + k_{-1})(k_2 + k_{-2}) - k_{-1}k_2}/(k_1 + k_{-1} + k_2 + k_{-2})^2] \}$	(255) (256)

^a $a_{\text{равн}}$, $b_{\text{равн}}$, $c_{\text{равн}}$ и $d_{\text{равн}}$ соответствуют равновесным концентрациям веществ А, В, С и D. Для последовательных реакций τ_1 и τ_2 — времена релаксации соответственно первой и второй стадий.

m_1 отрезок, отсекаемый ею на оси ординат на рис. 16,а, и через i_2 и m_2 — на рис. 16,б. Тогда

$$k_1 = i_1, \quad k_{-1} = m_1 - (i_2/i_1)$$

$$k_2 = (i_2/i_1) - k_{-2}, \quad k_{-2} = m_2/k_{-1} \quad (260)$$

Если $A + B \rightleftharpoons C$ (бимолекулярная стадия) быстрее, чем $C \rightleftharpoons D$ (мономолекулярная стадия), т. е. $k_1(a_{\text{равн}} + b_{\text{равн}}) + k_{-1} \gg k_2 + k_{-2}$, то

$$\tau_1 = 1/[k_1(a_{\text{равн}} + b_{\text{равн}}) + k_{-1}] \quad (261)$$

$$\tau_2 = (K_1 + a_{\text{равн}} + b_{\text{равн}})/[(a_{\text{равн}} + b_{\text{равн}})(k_2 + k_{-2}) + k_{-2}K_1] \quad (262)$$

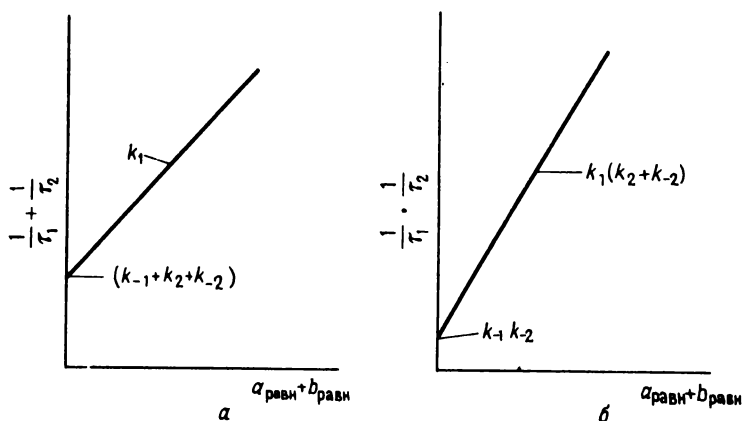


Рис. 16. Определение констант скорости бимолекулярных и мономолекулярных реакций по времени релаксации. Ни одна из последовательных реакций не протекает медленнее других.

где τ_1 и τ_2 — соответственно время релаксации быстрой и медленной стадии.

Таким образом, время релаксации быстрой реакции τ_1 и простой реакции, т. е. не имеющей второй мономолекулярной стадии, одинаково. На медленную стадию, напротив, влияют константы скорости (т. е. k_{-1}/k_1) предыдущей быстрой реакции.

Если бимолекулярная стадия намного медленнее мономолекулярной, т. е. $k_1(a_{\text{равн}} + b_{\text{равн}}) + k_{-1} \ll k_2 + k_{-2}$, то

$$\tau_1 = 1/(k_2 + k_{-2}) \quad (263)$$

$$\tau_2 = (k_2 + k_{-2}) / [(k_2 + k_{-2})k_1(a_{\text{равн}} + b_{\text{равн}}) + k_{-1}k_{-2}] \quad (264)$$

Аналогичным образом время релаксации быстрой (мономолекулярной) стадии равно времени релаксации простой мономолекулярной реакции и не зависит от медленной стадии, в то время как на время релаксации медленной стадии влияют константы скорости быстрой.

Для обоих крайних случаев константы скорости могут быть определены графически (рис. 17).

Надежность таких экспериментов ограничена амплитудами измеряемых изменений: для проведения точных определений они должны быть достаточно большими. В мономолекулярной обратимой реакции $A \rightleftharpoons B$ обозначим через α оставшуюся, непрореагировавшую часть вещества A и через $(1 - \alpha)$ степень превращения в реак-

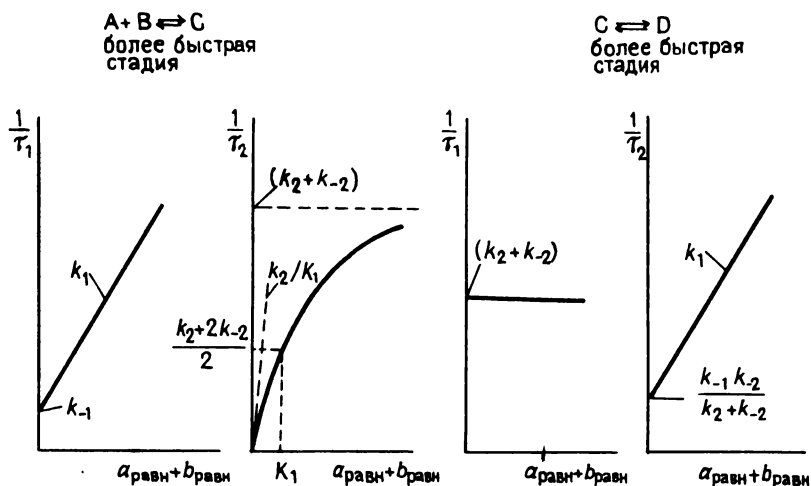


Рис. 17. Определение констант скорости обратимых последовательных реакций при условии, что одна из стадий является скоростьдимирующей.

ции, тогда

$$a = \alpha a_0, \quad b = (1 - \alpha) a_0 \quad (265)$$

и константа равновесия

$$K = a/b = \alpha/(1 - \alpha) \quad (266)$$

Продифференцируем уравнение (266)

$$\Delta K/K = \Delta\alpha/\alpha(1 - \alpha) \quad (267)$$

Изменение концентрации Δc при изменении температуры ΔT имеет вид

$$\Delta c = c_0 \Delta\alpha = c_0 \alpha/(1 - \alpha) (\Delta K/K) = c_0 F (\Delta K/K) \quad (268)$$

где коэффициент F равен

$$F = (\Delta c/c_0) (\Delta K/K) = \partial(c/c_0)/\partial \ln K \quad (269)$$

В рассмотренном мономолекулярном процессе

$$F = \alpha(1 - \alpha) \quad (270)$$

Fc_0 называют *амплитудным множителем*. Для равновесия в бимолекулярной реакции ассоциации ($A + B \rightleftharpoons C$), где $a_0 = b_0$, можно

аналогичным образом вывести следующее уравнение:

$$F = \alpha(1 - \alpha)/(2 - \alpha) \quad (271)$$

При регистрации измерения спектрофотометрическими методами применимы следующие уравнения:

$$\begin{aligned} \Delta c/c_0 &= F(\Delta K/K) \\ \Delta A &= \Delta \varepsilon \Delta c, \quad -\Delta I/I \approx 2,3 \Delta A \end{aligned} \quad (272)$$

Следовательно,

$$-\Delta I \approx 2,3 I \Delta \varepsilon c_0 F(\Delta K/K) \quad (273)$$

где ΔA — изменение поглощения, $\Delta \varepsilon$ — изменение молярного коэффициента поглощения в результате реакции, I и ΔI — соответственно интенсивность света, попадающего на фотоумножитель прибора, и ее изменение.

2.13. ИЗМЕНЕНИЕ КОНСТАНТЫ СКОРОСТИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ

До настоящего момента мы считали (явно или неявно), что исследуемые реакции протекают при постоянной температуре. Однако при изменении температуры изменяется значение константы скорости. Ее изменение в зависимости от температуры можно описать эмпирическим уравнением Аррениуса:

$$k = A \exp(-E/RT) \quad (274)$$

где A — *предэкспоненциальный множитель* (константа действия, частотная константа или частотный множитель. Последнее название неудачное, так как A имеет размерность константы скорости, которая совпадает с размерностью частоты только для реакций первого порядка). E — энергия активации или величина *потенциального барьера*, который нужно преодолеть, чтобы началась реакция, R — газовая постоянная и T — абсолютная температура (в К).

Изменение константы скорости в зависимости от температуры важно знать, так как оно позволяет определить потенциальный барьер, который нужно преодолеть, чтобы провести реакцию. Другими словами, таким способом можно определить количество энергии, необходимой для протекания данной химической реакции. Энергия также необходима для нарушения равновесного состояния в процессе, ведущем к равновесию.

Температурная зависимость константы равновесия химической реакции описывается *уравнением Вант-Гоффа*:

$$d \ln K / dt = \Delta H^0 / RT^2 \quad (275)$$

где ΔH^0 — стандартная энтальпия реакции (ее определение см. в разд. 1.5), K — константа равновесия (безразмерная, так как она выражается относительными концентрациями).

Поскольку

$$d(1/T) = -dT/T^2 \quad (276)$$

уравнение (275) можно записать в другом виде:

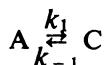
$$d \ln K / d(1/T) = -\Delta H^0 / R \quad (277)$$

Известно, что для идеальных газов

$$\Delta H^0 = \Delta U^0 + RT \Delta r_r \quad (278)$$

где ΔU^0 — изменение стандартной энергии, Δr_r — избыток числа молей (см. уравнение (3)). Это означает, что если реакция протекает без изменения числа молей, то константа равновесия зависит только от изменения нормальной энергии реакции. Если число молей изменяется в процессе реакции, то константа равновесия будет выражаться относительными концентрациями (т. е. концентрациями, отнесенными к 1 молю стандартного вещества). Следовательно, величина K становится безразмерной (так это и должно быть), но ее связь с изменением нормальной энергии не проста.

Для реакции



поскольку $K = k_1 / k_{-1}$, из уравнений (275) и (278) следует, что

$$d \ln(k_1 / k_{-1}) / dT = \Delta U^0 / RT^2 \quad (279)$$

Из соотношения (274) получаем

$$d \ln(k_1 / A_1) / dT = E_1 / RT^2 \quad (280)$$

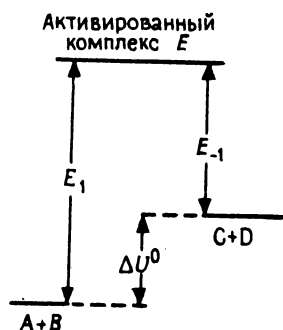
$$d \ln(k_{-1} / A_1) / dT = E_{-1} / RT^2 \quad (281)$$

где

$$E_1 - E_{-1} = \Delta U^0 \quad (282)$$

Последнее равенство проиллюстрировано рис. 18.

Рис. 18. Схема баланса энергии активации и изменение внутренней энергии в двухсубстратной обратимой реакции.



Проинтегрировав последние дифференциальные уравнения, снова получаем логарифмическую форму соотношения (274):

$$\ln(k_1/A_1) = -E_1/RT \quad (283)$$

При построении графика зависимости $\lg k$ от $1/T$ (рис. 19, а) получается прямая линия, пересекающая ось ординат в точке $\lg A$ с наклоном $-E/19,15$. Экспериментально определенную энергию активации E можно записать следующим образом:

$$E = \Delta H^\ddagger + RT \quad (284)$$

где ΔH^\ddagger — изменение энтальпии активации, $RT \approx 2,48$ кДж/моль при 298 К. Нужно заметить, что этот график не дает линейной за-

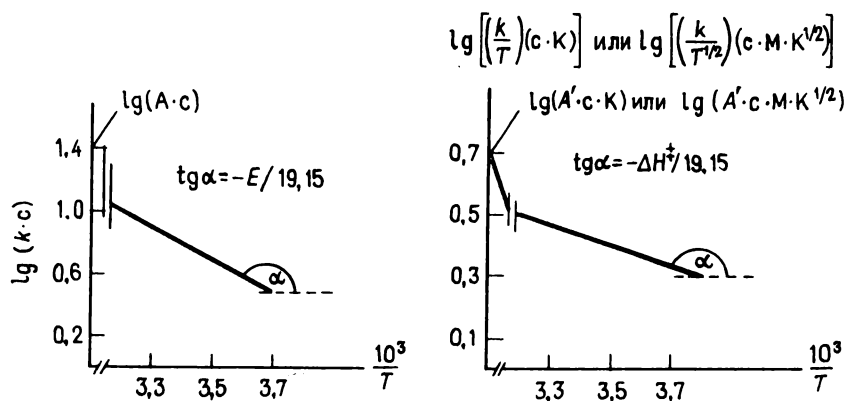


Рис. 19. Графическое определение энергии, энтропии и энтальпии активации по температурной зависимости константы скорости (график Аррениуса).

висимости, так как отрезок, отсекаемый на оси ординат, зависит от температуры (см. уравнения (285) и (287)). Однако эта температурная зависимость незначительна по сравнению с зависимостью энергии активации, поэтому в пределах ошибки это соотношение можно считать линейным.

Как показано в главе о статистической механике равновесия (см. разд. 2.15 и уравнения (325)—(328)), константу скорости можно также записать следующим образом:

$$k = \kappa(RT/Nh)\exp(\Delta S^*/R)\exp(-\Delta H^*/RT) \quad (285)$$

где κ — трансмиссионный коэффициент (≈ 1), N — число Авогадро, h — постоянная Планка и ΔS^* — изменение энтропии активации. Построив график зависимости $\lg[(k/T)(K \cdot c)]$ от $1/T$, получаем прямую линию (рис. 19,б), по углу наклона которой можно рассчитать энтальпию активации, а графической экстраполяцией отрезка, отсекаемого ею на оси ординат, к $1/T = 0$ определить энтропию активации. Такой график даже теоретически дает прямую линию, так как положение отрезка не зависит от T .

Из-за большого расстояния графическая экстраполяция имеет очень низкую точность. Поэтому удобнее рассчитывать изменение энтропии активации по уравнению, получающемуся из уравнения (285) после перестановки

$$\Delta S^* = \Delta H^*/T - 19,15 \{ \lg[(k_B T/h)/k] \} \quad (286)$$

где k_B — константа Больцмана и при 298,5 К $\lg(k_B T/h) = 12,8 \text{ с}^{-1}$. Запишем константу скорости в том же виде, что и в уравнении (285); тогда предэкспоненциальный множитель в уравнении Аррениуса (274) примет вид

$$A' = A/e = \kappa(RT/Nh)\exp(\Delta S^*/R) \quad (287)$$

где A — предэкспоненциальный множитель исходного уравнения (274), A' , согласно уравнению (284), равняется e -й доле этого множителя. Все приведенные выше равенства верны только в том случае, если k — константа скорости первого порядка, а также для реакций второго и более высоких порядков, описываемых в рамках теории абсолютных скоростей (см. разд. 2.15), т. е. она должна иметь размерность (время) $^{-1}$. Так как для графика Аррениуса величина $\kappa(RT/Nh)$ имеет размерность с^{-1} , то k должна обязательно выражаться в мин $^{-1}$ или ч $^{-1}$, а не в с^{-1} , если константа в правой части равенства также умножается соответственно на 60 или 3600.

Если константа скорости имеет размерность $\text{М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, т. е. ее

рассматривают не с точки зрения теории абсолютных скоростей, а в рамках теории столкновений (см. разд. 2.14), то размерность предэкспоненциального множителя также должна быть $M^{-1} \cdot c^{-1}$. Следовательно,

$$A_2' = 10^3 N d_{AB}^2 [8 \pi k_B T (m_A + m_B) / m_A m_B]^{1/2} (\exp \Delta S^\ddagger / R) \quad (288)$$

(см. уравнения (314) и (316)). В этом случае строят график зависимости $\lg[(k/T^{1/2})(K^{1/2} \cdot c \cdot M)]$ от $1/T \cdot \Delta S^\ddagger$ можно рассчитать по отрезку, отсекаемому на оси ординат, зная средние диаметры (d_{AB}) и массы (m_A и m_B) реагирующих молекул А и В.

В интегральной форме уравнение Аррениуса имеет вид

$$\ln(k_2/k_1) = E(T_2 - T_1)/RT_1 T_2 \quad (289)$$

где k_1 и k_2 — константы скорости, измеренные соответственно при температурах T_1 и T_2 . Так как уравнение содержит отношение этих констант, то не имеет значения, имеют они первый порядок или второй и можно ли их описать теорией абсолютных скоростей или теорией столкновений. Следовательно, это уравнение можно смело применять для определения величин E , но не ΔS^\ddagger .

Из уравнения (289) следует:

$$E = - [RT_1 T_2 / (T_1 - T_2)] \ln(k_2/k_1) \quad (290)$$

Относительную ошибку определения таким способом энергии активации можно записать следующим образом:

$$\begin{aligned} (\Delta E/E)^2 = & [T_2/(T_1 - T_2)]^2 (\Delta T_1/T_1)^2 + [T_1/(T_1 - T_2)]^2 (\Delta T_2/T_2)^2 + \\ & + [1/\ln(k_2/k_1)]^2 [(\Delta k_1/k_1)^2 + (\Delta k_2/k_2)^2] \end{aligned} \quad (291)$$

Наиболее точное определение удастся провести, если в каждой паре измерений для сравнения берется одна и та же константа скорости k_1 , измеренная при температуре T_1 .

На основании равенства (25) изменение свободной энтальпии можно записать в виде

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \Delta S^\ddagger \quad (292)$$

Закон Аррениуса строго выполняется только для элементарных стадий тепловых реакций, т. е. для таких реакций, в которых источником энергии для преодоления энергетического барьера, служит тепловая энергия молекул. Это означает, что в системе, согласно статистическому распределению Больцмана, содержатся высокоэнергетические молекулы.

Зная отношение констант скорости, прямой и обратной реакций,

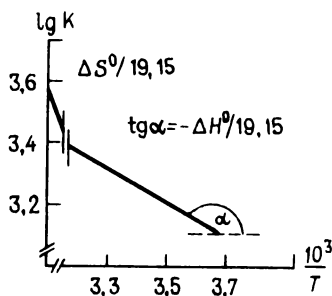


Рис. 20. Графическое определение нормальной энтальпии и нормальной энтропии по температурной зависимости константы равновесия (график Вант-Гоффа).

объединив уравнения (279), (282), (284) и (285), найдем константу равновесия данной элементарной стадии. По температурной зависимости константы равновесия (293), используя *график Вант-Гоффа* (рис. 20), можно графически определить термодинамические параметры равновесия:

$$\lg K = -\Delta H^0/19,15 T + \Delta D^0/19,15 \quad (293)$$

где $K = k_1/k_{-1}$ — константа равновесия*, H^0 — стандартная энтальпия, S^0 — стандартная энтропия.

Зная константу равновесия, можно рассчитать стандартную энтальпию. По изменению энтальпии и стандартной энтропии можно определить константу равновесия для любой температуры (при условии, что в координатах Вант-Гоффа во всем исследуемом интервале температур наблюдается линейная зависимость), используя соотношения

$$\Delta G^0 = -RT \ln K \quad (294)$$

и

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \Delta S^0 \quad (295)$$

Из равенства (294) можно снова получить уравнение (275), так как

$$\ln K = -(\Delta G^0/T)(1/R) \quad (294a)$$

а из равенств (24) и (20) следует, что

$$dG = VdP - SdT \quad (296)$$

* Принято считать, что константа равновесия определяется отношением концентраций продуктов к концентрациям исходных реагентов.

Таким образом получаем

$$(\partial G / \partial T)_P = -S \quad (297)$$

Подставляя уравнение (297) в равенство (24), имеем

$$G = H + T(\partial G / \partial T)_P \quad (298)$$

Следовательно,

$$\Delta G = \Delta H + T(\partial \Delta G / \partial T)_P \quad (299)$$

и

$$(\delta / \delta T)(\Delta G / T)_P = -\Delta H / T^2 \quad (300)$$

Подставляя выражение (300) в равенство (294), получаем уравнение (275).

Использование закона Вант-Гоффа может привести к тем же ошибкам, что и уравнение Аррениуса. Если прямая и обратная реакции имеют первый порядок, то и просто описать, согласно приведенному выше уравнению (293) и рис. 20, так как

$$K = k_{-1} / k_1 = (A'_{-1} \exp \Delta G^*_{-1} / RT) / (A'_1 \exp - \Delta G^*_1 / RT) = \exp - \Delta G^0 / RT \quad (301)$$

и из уравнения (287) следует, что

$$R \ln (A'_{-1} / A'_1) = \Delta S^{\ddagger}_{-1} - \Delta S^{\ddagger}_1 = \Delta S^0 \quad (302)$$

Если обе реакции, прямая и обратная, имеют второй порядок и могут быть описаны теорией столкновений (см. разд. 2.14), т. е. константы скорости имеют размерность $M^{-1} \cdot c^{-1}$, то уравнение (302) справедливо только в том случае, если $d_{AB}^2 \approx d_{CD}^2$ и $(m_A + m_B) / m_A m_B \approx (m_C + m_D) / m_C m_D$, где А и В, а также С и D обозначают соответственно реагирующие и образующиеся вещества. Если оба направления бимолекулярной реакции можно описать в рамках теории абсолютных скоростей (см. разд. 2.15), то константа скорости имеет размерность c^{-1} и ее смысловое значение также соответствует прямой и обратной реакциям первого порядка.

Если реакция протекает с изменением числа молей (т. е. имеет первый порядок в одном направлении в второй — в другом, например, $A \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} C + D$, то справедливо

$$K = k_2 / k_1 = (A'_2 \exp(-\Delta G^*_2 / RT) / (A'_1 \exp - \Delta G^*_1 / RT) \quad (303)$$

где $A'_2 = A_2 / e$ (см. уравнение (315)) и A'_1 — предэкспоненциальные

множители, полученные соответственно из уравнений (288) и (287). В этом случае

$$\Delta G^0 = -RT \ln(A'_1 K / A'_2) \quad (304)$$

так как только $A'_1 K / A'_2$ — безразмерная величина и $A'_1 \neq A'_2$.

При графическом представлении в координатах $\lg[(KT^{1/2}) (M \cdot K^{-1/2})]$ от $1/T$ точка пересечения с осью ординат не дает точного значения ΔS^0 , так как в величину отсекаемого отрезка входит также значение логарифма отношения предэкспоненциальных множителей.

Если реакция второго порядка, протекающая с изменением числа молей, поддается описанию в рамках теории абсолютных скоростей, то

$$K = k_2/k_1 = \exp - \Delta G^0 / RT \text{ (ср. уравнение (301))}$$

но $K = [A](1M)/[C][D]$, где $(1M)$ — концентрация вещества сравнения. Таким образом, уравнение (301) справедливо только в том случае, если вычисления проводятся с концентрациями, отнесенными к 1 молю вещества сравнения.

Очевидно, что если нас не интересует точное значение ΔS^0 , которое в любом случае не удастся точно определить (см. изложенное выше), то можно использовать интегральную форму уравнения Вант-Гоффа:

$$\lg(K_2/K_1) = (\Delta H^0 / 2,303 R) [(T_2 - T_1) / T_1 T_2] \quad (305)$$

где K_1 и K_2 — константы равновесия, определенные соответственно при температурах T_1 и T_2 . Наиболее точное определение удастся провести, если для сравнения для всех значений брать K_1 , измеренное при температуре T_1 .

Согласно общепринятым обозначениям, используемым и в этой книге, символы ΔG , ΔH , ΔC_p и другие соответствуют изменению свободной энергии, энтальпии и теплоемкости при переходе из начального в конечное состояние. Эти величины имеют размерность Дж/моль или Дж/К (см. разд. 1.6), характерную для скорости, и, следовательно, знак Δ указывает не только на разницу между начальным и конечным состояниями. Скорость связана либо с изменением свободной энтальпии одного моля вещества вследствие пересечения границ реакций, либо с изменением теплоемкости в результате изменения температуры. Поэтому правильнее использовать оператор $\partial/\partial \xi$ вместо Δ , указывающий на глубину протекания реакции (в молях). Отсюда вытекает, что $\partial G/\partial \xi$ — изменение сво-

бодной энтальпии между реагентами и образующимися веществами в данной точке координаты реакции. Фактически уравнение (295) можно правильно записать в следующем виде:

$$\partial G / \partial \xi = \partial H / \partial \xi - T \partial S / \partial \xi \quad (306)$$

2.14. КИНЕТИЧЕСКАЯ ТЕОРИЯ СТОЛКНОВЕНИЙ

Согласно Льюису, а также Герцфельду и Поляни, скорость бимолекулярной реакции пропорциональна вероятности столкновений между молекулами

$$v = 2z_{AA} \exp(-\Delta H^* / RT) \text{ молекула} \cdot \text{см}^{-3} \cdot \text{с}^{-1} \quad (307)$$

где z_{AA} — число столкновений между двумя молекулами вещества А в 1 см^3 газа в одну секунду.

Если диаметр молекул равен d , то столкновение между ними происходит при условии, что расстояние между ними меньше, чем d . Если средняя скорость движения молекул равна c , то каждая молекула в среднем в течение секунды занимает объем $\pi d^2 c$. Если 1 см^3 содержит n молекул, то в нем за одну секунду происходит $\pi d^2 cn$ столкновений.

Более точный результат получается, если взять вместо абсолютных относительные скорости. В этом случае каждая молекула претерпевает $\sqrt{2} \pi d^2 cn$ столкновений в секунду. Полное число столкновений для всех n молекул равно

$$z_{AA} = (1/2) \sqrt{2} \pi d^2 cn^2 \quad (308)$$

Коэффициент $1/2$ необходимо ввести, так как в противном случае каждое столкновение будет учтено дважды: первый раз, когда молекула А сталкивается с А', и второй, когда А' сталкивается с А.

Согласно кинетической теории, средняя скорость равна

$$c = \sqrt{8k_B T / \pi m} \quad (309)$$

где m — масса молекулы и $k_B = R/N$.

$$z_{AA} = (1/2) \sqrt{2} \pi n^2 d^2 \sqrt{8k_B T / \pi m} = 2n^2 d^2 \sqrt{\pi k_B T / m} \quad (310)$$

Если n_A и n_B (молекул/см³) различных молекул А и В с диаметрами d_A и d_B и массами m_A и m_B соответственно сталкиваются друг с другом, то частота столкновений равна

$$z_{AB} = n_A n_B d_{AB}^2 \{8\pi k_B T [(m_A + m_B) / m_A m_B]\}^{1/2} \quad (311)$$

где средний диаметр $d_{AB} = (d_A + d_B)/2$ и d_{AB}^2 = поперечное сечение столкновения.

Исходя из приведенных выше соотношений, можно записать уравнение скорости реакции

$$v = n_A n_B d_{AB}^2 \{8 \pi k_B T [(m_A + m_B)/m_A m_B]\}^{1/2} \exp(-E/RT) \quad (312)$$

из которого следует, что $v/n_A n_B = k'$, т. е. константа скорости в этом случае имеет размерность $\text{см}^3 \cdot \text{молекула}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Эту размерность можно преобразовать в $\text{см}^3 \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, умножив ее на число Авогадро, при этом получается

$$k = N d_{AB}^2 \{8 \pi k_B T [(m_A + m_B)/m_A m_B]\}^{1/2} \exp(-E/RT) \text{ см}^3 \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1} \quad (313)$$

Из уравнения (313) следует, что предэкспоненциальный множитель имеет вид

$$A_2 = N d_{AB}^2 \{8 \pi k_B T [(m_A + m_B)/m_A m_B]\}^{1/2} \text{ см}^3 \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1} \quad (314)$$

Для случая столкновения двух одинаковых молекул

$$A_2 = 2 N d^2 \sqrt{\pi k_B T / m} \quad (315)$$

Если предэкспоненциальный множитель рассматривают как *число столкновений*, то он обозначается буквой z .

Экспериментально получаемые результаты очень редко совпадают с приведенными выше теоретическими выкладками. Так получается, потому что нужно учитывать не все столкновения, а только эффективные, приводящие к реакции. В этом случае

$$k = P z \exp(-E/RT) \quad (316)$$

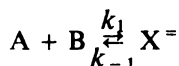
где P — *вероятность* или *стерический множитель*. Появление P может быть связано с изменением энтропии, давая таким образом истинный предэкспоненциальный множитель, приведенный в уравнении (288).

Эта кинетическая теория рассматривает молекулы как сферы, описываемые одним диаметром, и не учитывает их истинной формы, внутренних степеней свободы, а также взаимодействий между молекулами и их структурными элементами. Ошибку, возникающую в результате всех этих приближений, нельзя исключить даже введением вероятности множителя. Более надежные результаты получаются при использовании теории абсолютных скоростей реакции, основанной на методе статистической механики.

2.15. РАВНОВЕСНАЯ СТАТИСТИЧЕСКАЯ МЕХАНИКА

Теория абсолютных скоростей реакции была практически одновременно разработана Эйрингом и Поляни. Она базировалась на предположении о том, что в начале реакции молекулы отделены от продуктов потенциальным барьером, соответствующим энергии активации. Конфигурация и энергия активированного комплекса определяются максимумом этого барьера. Скорость реакции — это частота, с которой активированный комплекс переходит с одной стороны потенциального барьера на другую.

Рассмотрим реакцию



где $X^=$ — активированный комплекс, находящийся в равновесии с исходными веществами.

$$K^= = k_1/k_{-1} = [X^=]/[A][B] = (Q^=/Q_A Q_B) \exp(-\Delta U_0^\ddagger/RT) \quad (317)$$

где надстрочный индекс $=$ всегда относится к активированному комплексу. Q обозначают *суммы по состоянию* относительно точки с нулевой энергией для каждого вида молекул. ΔU_0^\ddagger — приращение нулевой энергии, т. е. энергия активации реакции, протекающей слева направо при температуре $T = 0$, затрачиваемое на образование 1 моля активированного комплекса:

$$Q = \sum_i g_i \exp(-E_i/k_B T) \quad (318)$$

где E_i — энергия относительно нулевого уровня энергии, g_i — число состояний, соответствующее этой энергии. Суммирование проводится по всем состояниям, включая электрическую, поступательную, вращательную и колебательную составляющие энергии, и полная сумма по состояниям может быть записана в виде произведения сумм по состояниям, соответствующих отдельным видам энергии:

$$Q = q_{\text{эл}} q_{\text{пост}} q_{\text{вр}} q_{\text{кол}} \quad (319)$$

Подробные выражения для отдельных q состояний представляют собой очень сложные функции, и поэтому здесь рассматриваться не будут.

При равновесии концентрация активированного комплекса, как следует из уравнения (317), равна

$$[X^=] = [A][B](Q^=/Q_A Q_B) \exp(-\Delta U_0^\ddagger/RT) \quad (320)$$

Из уравнения суммирования для Q^\ddagger можно выделить колебательную составляющую, которая приводит к диссоциации активированного комплекса на продукты реакции. В соответствии с теорией она равняется $k_B T / h \nu$, и, следовательно, Q^\ddagger можно записать как

$$Q^\ddagger = (k_B T / h \nu) Q_- \quad (321)$$

Подставляем это выражение в уравнение (320):

$$[X^\ddagger] = [A][B](k_B T / h \nu)(Q_- / Q_A Q_B) \exp(-\Delta U_0^\ddagger / RT) \quad (322)$$

Если умножить обе части последнего равенства на ν , то полученное произведение $\nu[X^\ddagger]$ будет равно скорости реакции, так как это частота колебаний активированного комплекса, приводящих к его диссоциации на продукты реакции

$$\nu = [A][B](k_B T / h)(Q_- / Q_A Q_B) \exp(-\Delta U_0^\ddagger / RT) \quad (323)$$

и

$$\nu = k[A][B] \quad (324)$$

Следовательно,

$$k = (k_B T / h)(Q_- / Q_A Q_B) \exp(-\Delta U_0^\ddagger / RT) \quad (325)$$

где k — константа скорости второго порядка, $k_B T / h$ (при 300 K) = $6,25 \cdot 10^{12} \text{ с}^{-1}$.

Поскольку в обратимых реакциях не все образующиеся активированные комплексы распадаются на продукты (часть из них в результате колебаний возвращается в исходное состояние (см. уравнение (317)), нужно ввести новый множитель χ , так называемый *трансмиссионный коэффициент*, т. е.

$$k = \chi(k_B T / h)(Q_- / Q_A Q_B) \exp(-\Delta U_0^\ddagger / RT) \quad (326)$$

Уравнение (326) с помощью уравнения (317) можно привести к следующему виду:

$$k = \chi(k_B T / h) K_- \quad (327)$$

Отсюда K_- можно выразить в нелогарифмической форме уравнения Вант-Гоффа; в результате получаем

$$\begin{aligned} k &= \chi(k_B T / h) \exp(-\Delta G_- / RT) = \\ &= \chi(k_B T / h) \exp(\Delta S_- / R) \exp(-\Delta H_- / RT) \end{aligned} \quad (328)$$

Так как $k_B = R / N$, то приходим к уравнению (285).

Статистическая теория имеет перед теорией простых столкнове-

ний то преимущество, что она учитывает внутренние степени свободы обеих сталкивающихся молекул, а также образующегося при этом активированного комплекса.

Тем не менее теорию абсолютных скоростей реакции очень трудно привести в соответствие с уравнением Аррениуса (хотя на практике именно так и делают), потому что энергию активации при абсолютном нуле ΔU_0^\ddagger можно лишь очень грубо приравнять к ΔH^\ddagger , энтальпии активации при определенной температуре. Зато ΔH^\ddagger может быть непосредственно получена из определений скорости.

Важным преимуществом статистической теории является то, что, используя уравнения (327) и (328), ее можно применять к любому типу реакций, в которых образованию активированного комплекса препятствует только потенциальный барьер, а скорость реакции полностью определяется концентрацией активированного комплекса. Отсюда следует, что вычисляя K_\ddagger в относительных концентрациях, независимо от молекулярности реакции мы будем получать константу скорости первого порядка с размерностью (время)⁻¹.

2.16. КАТАЛИТИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ

Вещество, не входящее в стехиометрическое уравнение реакции, может образовывать с исходными веществами переходные комплексы с меньшими свободными энтальпиями активации, чем при непосредственном взаимодействии исходных реагентов. Если образующиеся переходные комплексы распадаются с образованием продуктов и полной регенерацией инородного вещества, то говорят, что протекает *каталитическая реакция*, а участвующее инородное вещество называют *катализатором*. Так как катализатор регенерируется, то стадия реакции с меньшей энергией активации периодически повторяется. Если катализатор находится в одной фазе с реакционной смесью, то процесс называется *гомогенным*, а если — в разных фазах, то *гетерогенным*.

Изменение конфигурации и соотношений энергий активированного комплекса при вхождении в него катализатора может привести к другому пути расщепления (другому виду продуктов), отличному от некаталитической реакции, если последняя вообще возможна при этих условиях. Но это не обязательно, могут образовываться и те же самые продукты. Сказанное объясняет направляющую роль катализаторов: из одних и тех же веществ в одинаковых условиях эксперимента под действием различных катализаторов получают раз-

личные конечные продукты. Это явно противоречит принципам термодинамики, гласящим, что состав равновесной смеси конечных продуктов реакции однозначно определяется составом исходной реакционной смеси и условиями эксперимента. Катализаторы не обязательно ускоряют именно ту стадию, которая приводит к образованию определенной термодинамически равновесной смеси. Они промотируют какую-нибудь одну из последовательности элементарных реакций, приводящих к равновесию. Другой катализатор может селективно ускорять другую элементарную реакцию из иной последовательности, приводящей к той же равновесной смеси. Таким образом, каталитическая реакция может остановиться на некоторой промежуточной ступени, если она не может протекать дальше по термическому пути, приводящему к конечному равновесному состоянию, из-за увеличения потребности в энергии активации при этих условиях. Все сложные молекулы, встречающиеся в живых организмах, представляют собой термодинамически лабильные промежуточные продукты, синтезируемые при помощи специфических биокатализаторов — ферментов. Например, термодинамическое равновесие требует, чтобы при сжигании глюкозы образовывались диоксид углерода и вода. Однако ферменты, ускоряя отдельные элементарные стадии этой реакции, могут останавливать ее на определенных стадиях, приводя таким образом к накоплению различных промежуточных продуктов (например, глюконовой кислоты, глюкуроновой кислоты, ацетата, пирувата и др.).

2.17. ГОМОГЕННЫЙ ГАЗОВЫЙ КАТАЛИЗ

Присутствие инородных молекул в реагирующем газе может вызвать каталитическое увеличение скорости реакции двумя путями.

2.17.1. Физический катализ. При физическом катализе электромагнитное поле инородной молекулы облегчает превращение. Процесс, при котором катализатор участвует в качестве третьей частицы в слиянии атомов в результате тройных столкновений, также можно рассматривать как физический катализ.

2.17.2. Химический катализ. При химическом катализе катализатор непосредственно участвует в процессе. Фактически он претерпевает превращения в процессе реакции, но регенерируется в своей первоначальной форме к концу реакции. В цепных реакциях катализатор, дающий начало цепям, в ряде случаев вызывает новый цепной механизм и регенерируется после нескольких быстрых стадий. Как

правило, в процессах химического катализа количество катализатора постепенно, хотя и очень медленно, уменьшается; он либо расходуется, либо отравляется. Это явление, противоречащее классическому определению катализатора, можно объяснить активным участием катализатора в реакции с образованием химических связей. Так как такие реакции не обязательно являются побочными, то термины «катализатор» и «каталитическая реакция» применимы и в этих случаях.

2.18. ГЕТЕРОГЕННЫЙ КАТАЛИЗ (РЕАКЦИИ НА ГРАНИЦЕ РАЗДЕЛА ФАЗ)

Реакциями на границе раздела фаз считаются химические процессы, протекающие в непосредственной близости от границы двух соседних фаз в слое толщиной максимум несколько молекул. Из поверхностных реакций рассмотрим только реакции гетерогенного катализа. Глубина протекания поверхностной реакции тесно связана с активированной адсорбцией реагирующего вещества, проходящей в основном на различных дефектах решетки катализатора. Для образования такого типа дефектов особенно благоприятны внутренние поверхности пористых структур. Эффективность катализатора не увеличивается постоянно по мере роста его удельной поверхности, а достигает некоторого оптимума при определенной величине поверхности. Это объясняется тем, что большая удельная внутренняя поверхность возможна только при наличии узких пор, но чем уже поры, тем больше сопротивление диффузии.

Процесс адсорбции также играет важную роль в *контактных реакциях*. В этом случае помимо скорости самой химической реакции и диффузии, адсорбции исходного вещества (веществ), десорбции продукта (продуктов), следует также учитывать эффект вытеснения, сопровождающий адсорбцию смеси веществ. Сложность поверхностных реакций объясняется взаимодействием множества частных реакций, с одной стороны, и *высокой термодинамической нестабильностью катализаторов с большой удельной поверхностью* — с другой.

В гетерогенных реакциях большое влияние на скорость оказывает диффузия. *Средняя скорость диффузии* определяется уравнением:

$$d \approx (D/c)(\partial c / \partial x) \quad (329)$$

где D — коэффициент диффузии, c — концентрация диффундирующего вещества; диффузия протекает вдоль оси x . Из *первого закона*

Фика следует, что

$$D = k_B T / f \quad (330)$$

где f — коэффициент трения, или величина, обратная подвижности:

$$f = 6 \pi r \eta \quad (331)$$

r — радиус диффундирующих частиц, η — внутреннее трение среды.

Для гетерогенных реакций, у которых диффузия является скоростьюлимитирующей стадией,

$$-d[A]/dt = (D/\delta)F[A] \quad (332)$$

где $[A]$ — концентрация растворенного вещества в объеме перемешиваемого раствора, F — поверхность реагирующего твердого вещества, δ — толщина адгезионного слоя. Это уравнение можно вывести из первого закона Фика при условии, что $[A]/\delta$ — постоянный градиент концентрации. Это соотношение описывает реакцию первого порядка, если в качестве «константы скорости» выбрать DF/δ .

Следовательно, гетерогенные реакции, скорость которых полностью определяется скоростью диффузии молекул одного из исходных веществ или продуктов реакции, протекают по законам реакций первого порядка. Зависимость их скорости от температуры такая же, как и скорости диффузии (скорость изменяется на 2% при увеличении температуры на один градус), поэтому их температурные коэффициенты очень малы по сравнению с другими химическими реакциями.

Скорость диффузии далеко не всегда определяет скорость всей реакции. Химическая стадия становится скоростьюлимитирующей, если она требует высокой энергии активации. Это объясняет и тот факт, что повышение температуры приводит, согласно закону Аррениуса, к значительно большему ускорению реакции, чем в случае, когда диффузия является самым медленным процессом.

Катализаторы могут входить в качестве доноров или акцепторов электронов в состав переходных комплексов, определяющих скорость реакции. Донорно-акцепторные взаимодействия между контактными катализатором и субстратом аналогичны химической адсорбции. Они должны быть не слишком сильны, так как в противном случае препятствовали бы непрерывной десорбции продуктов. Вообще действие контактного катализатора можно объяснить

следующим образом: внедрение катализатора в переходный комплекс дестабилизирует существенные для данной реакции связи и таким образом облегчает перестройку или даже просто «открывает ворота» для необходимого в этом процессе переноса электрона.

Фундаментальная роль химической адсорбции в контактном катализе была впервые установлена Ленгмюром. В каталитических контактных реакциях следует различать следующие стадии: 1) диффузия реагирующих молекул к поверхности; 2) химическая адсорбция молекул на поверхности; 3) сама поверхностная реакция; 4) десорбция продуктов; 5) диффузия продуктов от поверхности.

Скорость таких реакций пропорциональна количеству вещества, адсорбированного на поверхности катализатора. *Изотерма Ленгмюра* имеет вид

$$a = a_{\infty} p / (1/b + p) \quad (333)$$

где a — относительное количество адсорбированного вещества, a_{∞} — максимальное количество адсорбированного вещества при насыщающем давлении, p — постоянная величина, характерная для данного адсорбированного вещества.

Уравнение Михаэлиса — Ментен, описывающее скорость ферментативных реакций, формально представляет собой ту же изотерму Ленгмюра, у которой a соответствует начальной скорости (V_0), a_{∞} — максимальной скорости (V_{\max}), p — концентрации субстрата $[S]$, $1/b$ — константа Михаэлиса (K_m), т. е. $v_0 = V_{\max} [S] / (K_m + [S])$ (см. уравнение (433)).

Другой подход к химической адсорбции предлагает *изотерма Фрейндлиха*: описывающая в основном процесс для негетерогенных адсорбентов. Изотерма Фрейндлиха имеет вид

$$\lg a = \lg k + (1/n) \lg p \quad (334)$$

где n и k — постоянные, характерные для данной пары адсорбент—адсорбированное вещество. Изотерма Фрейндлиха напоминает уравнение Хилла, описывающее активность фермента с несколькими участками связывания. В этом случае a — относительная активность фермента, $(v_0/[V_{\max} - v_0])$, k соответствует обратному значению константы Михаэлиса ($1/K_m$), $1/n$ — число молекул субстрата, связанных с одной молекулой фермента (n), т. е. $\lg [V_0 / (V_{\max} - v_0)] = -\lg K_m + n \lg [S]$ (см. уравнение (493)).

Несомненно, влияние контактного катализатора осуществляется посредством химической адсорбции (электронный перенос между катализатором и субстратом). Если электронный перенос представляет собой длительный процесс, то образуется «поверхностное со-

единение», а если это быстрый процесс и среднее время пребывания молекулы субстрата на поверхности невелико, то это истинная «хемосорбция». Она также представляет собой химическую связь, которая в отдельных случаях может быть ионной или неполярной, но, как правило, носит временный характер. Следует подчеркнуть, что контактные катализаторы — это вещества с непрерывной структурой, в которых электроны либо вообще делокализованы, либо, как в полупроводниках, ведут себя как более или менее подвижные дефектные участки. Таким образом, хемосорбция не обязательно протекает на поверхности, но изменения потенциального поля поверхности благоприятствуют ее протеканию на одних участках по сравнению с другими.

В катализе помимо энергетического фактора важную роль играют геометрические факторы. Некоторые авторы, рассматривая многоточечную адсорбцию, считают, что центры адсорбции атакуют разрушающиеся или образующиеся связи, т. е. что катализатор поляризует связь, перпендикулярную к их первоначальной ориентации.

2.18.1. Полупроводниковые катализаторы. По Волькенштейну, химически адсорбированные частицы, рассматриваемые с точки зрения квантовой механики как примеси на поверхности, образуют единую систему с решеткой, похожую на дефекты «запоминания». В отличие от дефектов в структуре полупроводников, не способных перейти в другую фазу, хемосорбированные частицы могут покинуть поверхность при десорбции. В свою очередь дефекты могут выходить из глубины полупроводника на поверхность, создавая таким образом резерв дефектов.

Связывание субстрата может осуществляться двумя способами:

1. При так называемой «слабой» хемосорбции частица и центр связывания на поверхности электрически нейтральны. В этом случае субстрат сам образует дефект в кристаллической решетке, забирая или отдавая электроны при реакции с неповрежденным участком решетки.

2. При так называемой «сильной» хемосорбции уже имеющийся положительно или отрицательно заряженный дефект поверхности образует донорную или акцепторную связь. В зависимости от природы связывающей частицы это может быть либо *n*-связь, в случае принятия электрона, либо *p*-связь, когда частица взаимодействует с положительной дыркой. Названия «слабая» и «сильная» условны, так как в первом случае адсорбированная частица должна освободить валентности на поверхности, а во втором положительные и

отрицательные дефекты сами предоставляют в общее пользование имеющиеся в наличии свободные валентности. Следовательно, реакцию решетки можно рассматривать как радикальную реакцию, в которой хемосорбированная частица превращается в радикал, реагируя с дефектом такого типа.

Оба типа адсорбции могут переходить друг в друга, так как пары положительно-отрицательных дефектов, образовавшихся в процессе «слабой» адсорбции, мигрируют в соответствии с широко известным для полупроводников дырочным механизмом. Такой переход особенно ощутим, если один из атомов молекулы после приближения к поверхности ведет себя как акцептор, а другой — как донор. Следовательно, образовавшиеся в результате слабого взаимодействия две части дефектных пар соединяются с различными атомами, и если одна из этих связей разрушится, а освободившийся дефект удалится, то адсорбированная молекула превратится в *n*- или *p*-связанный свободный радикал. В каталитической реакции радикал или ион-радикал, участвующий в образовании «сильной» связи, реагирует таким образом, что контактные реакции можно рассматривать как цепные процессы. В этом случае свободная валентность катализатора принимается за один из «радикалов». Образование таких свободных валентностей можно экспериментально доказать с помощью характеристического электронного парамагнитного резонанса.

Двухцентрированная адсорбция становится возможной при определенной топографии и характеристиках поверхности. Если сорбция, приводящая к диссоциации, протекает на уже существующем дефекте поверхности (свободная валентность), то для одной части фрагментов будет наблюдаться «слабое» связывание (т. е. насыщенное по отношению к валентностям), для другой — «сильное». В последнем случае образуется свободный поверхностный радикал. Полярность такого связывания (ионный характер связанных частиц) определяется различием в электроотрицательности элемента поверхности и фрагмента субстрата.

Следовательно, хемосорбция реагента изменяет концентрацию дефектов в катализаторе. В связи с этим изменяется и электропроводность (она увеличивается, если в результате адсорбции возникают новые участки связывания, и уменьшается, если блокируются уже имеющиеся). Таким образом, регистрация измерений электропроводности служит важным инструментом при изучении механизма действия полупроводниковых катализаторов. Абсолютное значение электропроводности и ее изменение при заданной температуре служат соответственно мерой концентрации дефектов и изменения

этой концентрации. Температурная зависимость электропроводности определяется энергией активации, необходимой для перехода электронов в зону проводимости.

Связывание, возникающее при хемосорбции, дестабилизирует или разрушает связанную молекулу, превращая ее при этом либо в радикал, либо в ион-радикал. Дальнейшее взаимодействие радикала требует меньшей энергии, чем в случае неdestабилизированной формы. Как правило, энергия активации реакций с участием радикала и ион-радикала очень низка. Для поверхностных радикалов можно ожидать больших значений энергии активации, так как нужно еще разрушить хемосорбционные связи. В ряде случаев решающую роль в величине кажущейся энергии активации играет теплота хемосорбции.

Энергия активации и теплота реакции, выделившаяся в экзотермической стадии реакции, возможно, не рассеиваются мгновенно, а частично запасаются и затем расходуются в процессе десорбции. В этом случае нельзя наблюдать ингибирование продуктом, даже если десорбция продукта требует самой высокой энергии активации.

Широко распространено представление, что ферменты можно рассматривать как полупроводниковые контактные катализаторы, действующие по описанному выше механизму. Опыты Блюменфельда наглядно продемонстрировали узость линий, а также отсутствие тонкой структуры в спектрах ЭПР и позволили сделать вывод, что в структуре белковых молекул неспаренные электроны в значительной степени делокализованы. Предполагается, что «проводящие каналы» расположены вдоль цепочек водородных связей и проходят через основные полипептидные цепи. Временно образующийся в процессе ферментативного катализа комплекс субстрата с ферментом (а в ряде случаев только с небелковыми простетическими группами последнего) играет роль примеси. Собственные электронные уровни комплекса опускаются до зон проводимости и валентных зон белков. В отличие от полупроводников ширина зоны очень мала (несколько десятых электронвольта). Следовательно, субстрат-ферментный комплекс можно рассматривать как загрязненный полупроводник с электронной или дефектно-электронной проводимостью. Электрон, расположенный в зоне проводимости, не может достичь полностью занятую валентную зону и будет двигаться вдоль цепочки водородно-пептидных связей до тех пор, пока не попадет в ловушку акцептора (т. е. ферментного комплекса). Таким образом, окислительно-восстановительная реакция может протекать при отсутствии непосредственного контакта между реагента-

ми. Другие авторы, однако, заявляют, что такой механизм действия белков невозможен; согласно проведенным ими расчетам энергия, необходимая для достижения уровня Ферми в белках, так высока, что нативный фермент не может абсорбировать ее при обычных условиях.

2.18.2. Ферментативный катализ. В обычных химических реакциях концентрации реагентов намного выше, чем в ферментативных реакциях. Однако ферментативные реакции протекают в 10^{11-13} раз быстрее некаталитических. Для объяснения того, что, несмотря на низкие концентрации, т. е. малое число столкновений, число эффективных столкновений может так существенно возрасти, было введено понятие эффекта ориентации, характерного только для ферментов, помимо уже известного *эффекта сближения*, наблюдающегося и в неферментативном катализе. Так как уже доказано, что фермент образует комплекс с субстратами, то очевидно, что белок фиксирует два реагирующих субстрата в непосредственной близости друг к другу, тем самым увеличивая вероятность взаимодействия. Следовательно, понятие *эффекта сближения* отражает свойство фермента (и других катализаторов) селективно увеличивать локальную концентрацию реагентов. Более того, связывание субстратов на поверхности фермента осуществляется таким образом, что они принимают ориентацию, оптимальную для облегчения взаимодействия. Этот процесс и называется *эффектом ориентации*.

Следует рассмотреть еще один фактор, так называемый *эффект напряжения*. Он отражает возможность прикрепления субстрата к ферменту в двух или нескольких местах. В результате такого связывания разрушаемая связь ослабляется благодаря поляризации электронных оболочек и изменению углов связей, и энергия активации, требующаяся для непосредственного разрушения этой связи, понижается.

В присутствии «теоретического фермента», взятого в концентрации 10^{-6} М и осуществляющего только эффекты сближения и ориентации, скорость реакции с участием субстратов, взятых в концентрациях 1 М, будет на три порядка ниже скорости некатализируемой реакции. Если концентрации субстратов уменьшить до 10^{-3} М, то скорость реакции, катализируемой этим ферментом, будет еще только в 550 раз превышать скорость некатализируемой реакции.

Поэтому возникает предположение о наличии трех различных соседних кооперативных каталитических участков вместо одного.

Следовательно, эффект напряжения также присутствует. В этом случае при концентрациях фермента 10^{-5} М и субстрата 10^{-3} М эти три эффекта должны дать увеличение скорости в 10^{18} раз. Но даже для гидролитических реакций, в которых вода имеет максимальную концентрацию 55,6 М, скорость увеличивается только в 10^{13} раз. Таким образом, сближение и ориентация, а также эффект напряжения, возникающий при связывании субстрата, являются причинами ускорения ферментативных реакций, если предположить, что на поверхности фермента находятся три действующие каталитические группы.

2.19. КИНЕТИКА ХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

До настоящего момента мы обсудили, за некоторыми исключениями, кинетику химических реакций в газовой фазе. Ферментативные реакции протекают в растворах, содержащих воду. Поэтому нужно рассмотреть различия в кинетике химических реакций, протекающих в газовой и водной фазах.

Рассмотрим реакцию между двумя ионами. Пусть радиусы ионов равны r_A и r_B , e — единичный электрический заряд, z_A и z_B — электрические заряды этих ионов. Сначала ионы бесконечно удалены друг от друга, в активированном состоянии расстояние между ними уменьшается до величины d_{AB} . Когда они находятся на расстоянии x друг от друга, сила взаимодействия между ними задается следующим уравнением:

$$F = z_A z_B e^2 / \epsilon x^2 \quad (335)$$

где ϵ — диэлектрическая проницаемость.

Работа по сближению этих ионов на расстояние dx равна

$$dw = - (z_A z_B e^2 / \epsilon x^2) dx \quad (336)$$

Следовательно, выражение для работы, которую нужно совершить, чтобы сблизить два иона из бесконечно большого расстояния до d_{AB} (расстояния, требующегося для образования активированного комплекса), примет следующий вид:

$$w = - \int_{\infty}^{d_{AB}} (z_A z_B e^2 / \epsilon x^2) dx = z_A z_B e^2 / \epsilon d_{AB} \quad (337)$$

Если заряды ионов имеют одинаковый знак, то совершаемая работа положительна, если разный — отрицательна.

Свободная энтальпия активации этого процесса представляет собой сумму приведенных выше электростатической и неэлектростатической (н. э. с.) составляющих. Для каждой молекулы

$$\Delta G^{\circ}/N = \Delta G_{\text{н.э.с.}}^{\circ}/N + z_A z_B e^2 / \varepsilon d_{AB} \quad (338)$$

Подставляя выражение (317) в уравнение (325), получаем

$$k = (k_B T/h) K^{\circ} \quad [\text{ср. уравнение (327)}]$$

откуда

$$k = (k_B T/h) \exp(-\Delta G^{\circ}/RT) \quad [\text{ср. уравнение (328)}]$$

Объединив уравнения (328) и (338), получаем

$$k = (k_B T/h) \exp(-\Delta G_{\text{н.э.с.}}^{\circ}/RT) \exp[-(z_A z_B e^2 / \varepsilon d_{AB} k_B T)] \quad (339)$$

Умножим обе части на 1 с и возьмем логарифмы безразмерных величин:

$$\ln k = \ln[(k_B T/h) \exp(-\Delta G_{\text{н.э.с.}}^{\circ}/RT)] - (z_A z_B e^2 / \varepsilon d_{AB} k_B T) \quad (340)$$

$$\ln k = \ln k_0 - (z_A z_B e^2 / \varepsilon d_{AB} k_B T) \quad (341)$$

где k_0 — константа скорости k в среде с диэлектрической проницаемостью, равной ∞ , в чем нетрудно убедиться, приравняв второе слагаемое в уравнении (341) нулю.

Таким образом, для реакций между ионами логарифм константы скорости линейно изменяется в зависимости от обратной величины диэлектрической проницаемости. Наклон этой прямой линии равен $-(z_A z_B e^2 / d_{AB} k_B T)$. Так как в этом уравнении известны все величины кроме одной, то можно рассчитать неизвестное расстояние d_{AB} (рис. 21).

Рассмотрим влияние ионной силы на реакцию

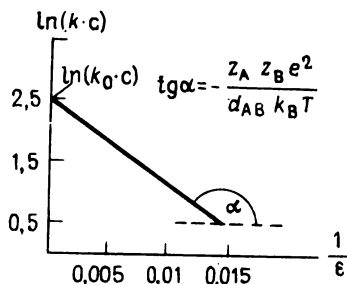
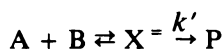


Рис. 21. Зависимость константы скорости от диэлектрической проницаемости.

Уравнение, описывающее скорость реакции, имеет вид

$$v = k' [X^=] \quad (342)$$

В состоянии равновесия между активированным комплексом и реагентами

$$K = a^= / a_A a_B = ([X^=] / [A][B])(f^= / f_A f_B) \quad (343)$$

где a — активности, f — коэффициенты активности. (*Активность* ионов равняется концентрации при бесконечном разбавлении, а в более концентрированных растворах отличается от нее настолько, насколько поведение данного раствора отклоняется от идеального. *Коэффициент активности* указывает на степень отклонения для данной концентрации данного вещества от бесконечно разбавленного раствора.)

Из уравнения (343) следует

$$[X^=] = K[A][B](f_A f_B / f^=) \quad (344)$$

и, используя выражение (342), получаем

$$v = k' K[A][B](f_A f_B / f^=) \quad (345)$$

но $v = k[A][B]$ также верно. Если $k_0 = k' K$, то, подставляя это равенство в уравнение (345), умножаем обе части на $M \cdot c$, берем логарифм и получаем

$$\lg k = \lg k_0 + \lg(f_A f_B / f^=) \quad (346)$$

Согласно теории Дебая—Хюккеля,

$$\lg f = - Q z^2 \sqrt{I} \quad (347)$$

где z — валентность

$$Q = N^2 e^3 (2\pi)^{3/2} / 2,303 (\epsilon k_B T)^{3/2} (1000)^{1/2} \quad (348)$$

и ионная сила I определяется выражением

$$I = \frac{1}{2} \sum_i z_i^2 c_i \quad (349)$$

(e — элементарный заряд, z_i — валентность, c_i — концентрация i -го иона). Суммирование проводится по всем ионам, присутствующим в растворе.

Подставляя выражение (347) в уравнение (346), получаем

$$\begin{aligned} \lg k &= \lg k_0 - Q \sqrt{I} [z_A^2 + z_B^2 - (z_A + z_B)^2] = \\ &= \lg k_0 + 2 Q z_A z_B \sqrt{I} \end{aligned} \quad (350)$$

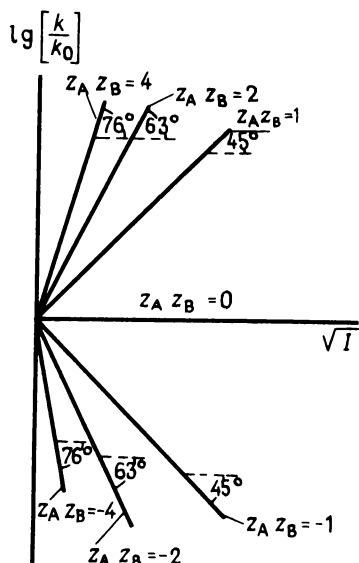


Рис. 22. Зависимость константы скорости от ионной силы.

Численное значение Q при 25°C для водных растворов равно приблизительно 0,51, следовательно,

$$\lg k = \lg k_0 + 1,02 z_A z_B \sqrt{I} \quad (351)$$

Построив график зависимости $\lg(k/k_0)$ от \sqrt{I} , получаем прямую линию, наклон которой зависит от произведения $z_A z_B$ (рис. 22).

Если реагирующие в растворе вещества представляют собой диполи, то, согласно Кирквуду,

$$\begin{aligned} \ln k = \ln k_0 + (e^2/2\epsilon k_B T) [(z_A^2/r_A) + (z_B^2/r_B) - \\ - (z_A + z_B)^2/r] + [(3/4)\epsilon k_B T] [\mu_A^2/r_A^3 + \mu_B^2/r_B^3 - \mu^2/r^3] \end{aligned} \quad (352)$$

где r — радиус диполя, μ — дипольный момент.

2.20. ВЛИЯНИЕ ЗАМЕСТИТЕЛЕЙ НА РЕАКЦИОННУЮ СПОСОБНОСТЬ СОЕДИНЕНИЯ (КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ СООТНОШЕНИЯ МЕЖДУ СТРУКТУРОЙ И АКТИВНОСТЬЮ, КССА)

Чтобы исследовать изменение реакционной способности соединения при введении в его молекулу заместителей, можно использовать эмпирическое соотношение Гаммета:

$$\lg(k/k_0) = \sigma \rho \quad (353)$$

где k_0 — константа скорости для незамещенного соединения, k — для замещенного, σ — константа, характеризующая заместитель, ρ — константа, зависящая от типа реакции. Аналогичное уравнение справедливо для констант равновесия:

$$\lg(K/K_0) = \sigma \rho \quad (354)$$

Константы Гаммета (σ) для *мета*- (σ_m) и *пара*- (σ_p) заместителей в ароматических соединениях различны.

В некоторых случаях, когда уравнение Гаммета не может быть использовано, применяют *соотношение Тафта*

$$\lg(k/k_0) = \sigma^* \rho \quad (355)$$

где все обозначения те же, что и в уравнении Гаммета, за исключением σ^* — *константы полярного заместителя*, которая служит мерой способности заместителя притягивать электроны.

Например, если гидролизуются алифатический эфир, содержащий заместитель в α -положении по отношению к карбоксильной группе, то

$$\sigma^* = (1/2,5) [\lg(k/k_0)_{\text{осн}} - \lg(k/k_0)_{\text{кисл}}] \quad (356)$$

где нижние индексы указывают на значения, измеренные для основной и кислотной составляющих; $\lg(k/k_0)_{\text{кисл}}$ называют стерической константой (E_s).

С момента появления первоначальных соотношений были разработаны другие параметры, позволяющие проводить исследования широко распространенных количественных соотношений между структурой и активностью (КССА) с большей точностью и для большего числа случаев.

Прежде всего константу Гаммета (σ), характеризующую заместитель, представили в виде суммы двух компонент: индуктивной (полярной) и резонансной (σ_I и σ_R).

$$\sigma = \sigma_I + \sigma_R \quad (357)$$

Была введена *константа полярности*

$$F = a\sigma_m + b\sigma_p + \varepsilon \quad (358)$$

где a и b — постоянные, характеризующие данную группу соединений, ε — очень малая величина, так называемая *ошибка*.

$$\sigma \rho = cF + R \quad (359)$$

где c — постоянная, характеризующая данную группу соединений, R — *резонансная постоянная*.

Широко применяются *параметры гидрофобности*. Одним из наиболее широко распространенных параметров является *коэффициент распределения (P)* между масляной и водной средами, и на сегодняшний день известны сотни соединений, биологическое действие которых можно описать следующей формулой:

$$\lg(1/c) = a \lg P + b \quad (360)$$

где c — относительная концентрация активного компонента, a и b — постоянные, характеризующие вещества. По аналогии с константой Гаммета можно определить новую постоянную π :

$$\pi = \lg P - \lg P_0 \quad (361)$$

где P_0 — коэффициент распределения для незамещенного соединения, P — для замещенного в той же системе при тех же условиях.

Согласно *соотношению Ганша*,

$$\text{биологическое действие} = a\pi + b\pi^2 + c\sigma + dE_s + e \quad (362)$$

где a, b, c, d, e — постоянные, различные для разных групп соединений.

Уравнение (362) можно также записать, используя множество других известных постоянных помимо π, σ и E_s . Такого типа уравнения могут быть использованы при теоретической разработке методом «компьютерного предсказания» улучшенных фармацевтических препаратов, лекарств, ингибиторов ферментов и субстратов.

2.21. КИСЛОТНО-ОСНОВНЫЙ КАТАЛИЗ

В реакциях, протекающих в водных растворах, очень часто имеет место кислотно-основный катализ. При этом роль кислоты играет молекула, способная отдавать протон, а роль основания — вещество, связывающее протон(ы). Сама по себе вода является наиболее широко распространенным кислотно-основным катализатором, который в результате диссоциации дает ионы H_3O^+ и OH^- . Если эти ионы являются катализаторами, то, обозначив реагирующее вещество через S , константы скорости реакции второго порядка k_{H^+} и k_{OH^-} соответственно через k_{H} и k_{OH} , получаем следующее выражение для скорости реакции:

$$\text{в кислой среде} \quad v = k_{\text{H}}[\text{H}_3\text{O}^+][S] \quad (363)$$

$$\text{в щелочной среде} \quad v = k_{\text{OH}}[\text{OH}^-][S] \quad (364)$$

В общем виде

$$v = k_0[S] + k_H[H_3O^+][S] + k_{OH}[OH^-][S] \quad (365)$$

где k_0 — константа скорости некатализируемой реакции первого порядка.

Если константу скорости первого порядка всей реакции обозначить через k , то

$$k = v/[S] = k_0 + k_H[H_3O^+] + k_{OH}[OH^-] \quad (366)$$

Так как $[H_3O^+][OH^-] = K_b$, то

$$k = k_0 + k_H[H_3O^+] + k_{OH}K_b/[H_3O^+] \quad (367)$$

В 0,1 М кислоте второе слагаемое равно $k_H \cdot 10^{-1}$, а третье — $k_{OH} \cdot 10^{-13}$, так как $K_b = 10^{-14}$ М². Поскольку k_{OH} не может быть больше k_H в 10^9 раз, то третьим слагаемым можно пренебречь. В достаточно кислой среде второе слагаемое намного больше первого, поэтому

$$k = k_H[H_3O^+] \quad (368)$$

Поделив обе части на $[H_3O^+]$, умножив на М·с и прологарифмировав, получаем

$$\lg k = \lg k_H + \lg[H_3O^+] = \lg k_H - \text{pH} \quad (369)$$

так как $[H_3O^+]^0 = 1$ М и благодаря проделанным математическим операциям логарифмы стали безразмерными. Следовательно, pH равен отрицательному логарифму *относительной* концентрации ионов водорода (отнесенной к 1 М концентрации ионов водорода).

Для достаточно кислого раствора графиком зависимости $\lg k$ от pH является прямая линия с наклоном -1 .

Аналогично для щелочных растворов

$$k = k_{OH}K_b/[H_3O^+] \quad (370)$$

и после соответствующих преобразований получаем

$$\lg k = \lg k_{OH}K_b - \lg[H_3O^+] = \lg k_{OH}K_b + \text{pH} \quad (371)$$

Следовательно, в щелочной среде график зависимости $\lg k$ от pH имеет вид прямой линии с наклоном $+1$.

В отдельных случаях кислотно-основного катализа существует промежуточная область, в которой доминирующей оказывается константа скорости некатализируемой реакции k_0 . В этой области k не изменяется с изменением pH, т. е. наклон равен нулю (рис. 23).



Рис. 23. Зависимость константы скорости от pH.

В кислотно-основном катализе, так же как и в большинстве каталитических реакций, катализатор ускоряет обратимую реакцию в обоих направлениях, не влияя на константу равновесия. Как и в других реакциях, если скорость распада активированного комплекса, образовавшегося при участии кислотно-основного катализатора, достаточно мала для того, чтобы лимитировать скорость всей реакции, то такой комплекс называют *аррениусовым*. Если же в реакции нет такой скоростилимитирующей стадии, то комплекс называют *комплексом Вант-Гоффа*.

2.22. КИНЕТИЧЕСКИЙ ИЗОТОПНЫЙ МЕТОД

В отдельных случаях могут возникнуть трудности при определении константы скорости образования и распада промежуточного продукта с помощью описанных выше методов. Иногда эти методы оказываются неподходящими для определения порядка реакции (или частичной реакции) или для того, чтобы понять, является ли данный продукт результатом простой реакции или цепи последовательных реакций. Эти трудности можно преодолеть с помощью кинетического изотопного метода. В биохимических исследованиях еще более широко используется метод, сочетающий в себе кинетику и изотопное разбавление. Проиллюстрируем это простой последовательностью реакций.

Предположим, что исходное вещество А превращается в Е в закрытой системе путем ряда последовательных реакций:



Скорость образования промежуточного продукта С равна v_2 , а его

распада — v_3 . Если экспериментально удастся определить концентрацию вещества C в различные моменты времени, то получится соотношение

$$d[C]/dt = v_2 - v_3 \quad (372)$$

Если в систему ввести небольшое количество изотопно меченного C (т. е. C^*), то можно параллельно с химической концентрацией вещества C определять радиоактивность R и удельную радиоактивность r :

$$r = R/[C] \quad (373)$$

Изменение удельной радиоактивности зависит от v_2 , r и $[C]$, и явно не зависит от v_3 (если можно пренебречь изотопным эффектом), так как C и C^* распадаются с одинаковой скоростью. Из уравнения (373) следует, что

$$dR/dt = (d[C]/dt)r + (dr/dt)[C] \quad (374)$$

Обозначив скорость образования и распада изотопного соединения звездочкой, получим

$$dR/dt = v_2^* - v_3^* \quad [\text{ср. уравнение (372)}]$$

Так как вещество B не имеет метки (только C^* радиоактивно), то очевидно, что $v_2^* = 0$ и

$$v_3^* = rv_3 \quad (375)$$

следовательно,

$$dR/dt = -rv_3 \quad (376)$$

Из уравнений (376) и (374) вытекает, что

$$-rv_3 = (d[C]/dt)r + (dr/dt)[C] \quad (377)$$

и из (377) и (372) имеем

$$dr/dt = -rv_2/[C], \quad v_2 = -[C](d \ln r/dt) \quad (378, 379)$$

Подставим последнее выражение снова в уравнение (372), получим

$$v_3 = -[C](d \ln r/dt) - d[C]/dt \quad (380)$$

Следовательно, путем параллельного определения концентрации и радиоактивности вещества C можно рассчитать скорость его образования и распада.

Если нужно определить количество вещества C , образовавшегося за определенный промежуток времени, то для начала использу-

ют соотношение

$$[C] = \int_0^t v_2 dt \quad (381)$$

Подставив выражение (379), получим

$$[C] = - \int_{r_0}^{r_1} [C] d \ln r = 2,303 \int_{r_1}^{r_0} [C] d \lg r \quad (382)$$

Если можно одновременно определять концентрации и радиоактивности веществ С и D в различные моменты времени и в реакционную смесь добавлено радиоактивное вещество C^* , то изменение удельной радиоактивности (см. уравнение (378)) имеет вид $dr_1/dt = -r_1 v_2/[C]$ и

$$R_2 = r_2[D] \quad (383)$$

где R_1 и R_2 и r_1 и r_2 — соответственно полные и удельные значения радиоактивности веществ С и D.

Продифференцировав равенство (383), получим уравнение, соответствующее уравнению (374):

$$dR_2/dt = r_2(d[D]/dt) + [D](dr_2/dt) \quad (384)$$

и из уравнения (372) следует, что

$$dR_2/dt = v_3^* - v_4^* = r_1 v_3 - r_2 v_4 \quad (385)$$

Из уравнений (384) и (385)

$$r_2(v_3 - v_4) + [D](dr_2/dt) = r_1 v_3 - r_2 v_4 \quad (386)$$

Следовательно,

$$dr_2/dt = (r_1 - r_2)v_3/[D] \quad (387)$$

Если наряду с C^* в реакционную смесь ввести небольшое количество нерадиоактивного вещества D, то в момент времени $t = 0$ сохранится $r_2 = 0$ при условии, что промежуточный продукт в процессе превращения $C \rightarrow D$ нестабилен. С течением времени r_2 будет увеличиваться и пройдет через максимум, в котором $dr_2/dt = 0$. Если $r_{2\max}$ — точка на кривой $r_1 = f(t)$ (рис. 24), то в этой точке

$$r_1 = r_2 \quad (388)$$

Согласно уравнению (387), это означает, что вещество D образуется непосредственно из С. Если $r_{2\max}'$ лежит ниже кривой $r_1 = f(t)$

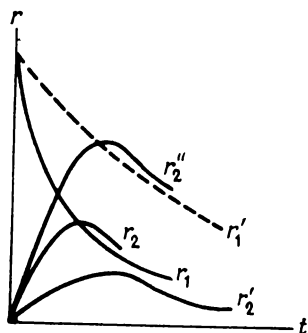


Рис. 24. Изменение удельной радиоактивности в зависимости от времени. r_1 — для исходного вещества; r_2 — для промежуточного продукта, образующегося непосредственно из исходного вещества; r_2' — для промежуточного продукта, образующегося частично из исходного вещества, а частично из нерадиоактивного предшественника.

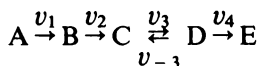
(рис. 24), то это означает, что вещество D лишь частично образуется из C, а частично — из другого нерадиоактивного предшественника.

Если скорость образования вещества D из нерадиоактивного предшественника равна v' , то в точке $r_2'_{\max}$

$$r_1/r_2' = (v_3 + v')/v_3 \quad (389)$$

Если максимум функции r_2' , представляющей временную зависимость удельной активности вещества D, лежит выше кривой r_1 (рис. 24), то разумно предположить, что между C и D образуется промежуточный продукт. На основании приведенных выше математических выкладок такой временной ход кривой r_2' указывает на существование промежуточного комплекса, удельная активность которого изменяется в соответствии с r_1' .

Если в последовательности реакций присутствует *обратимая стадия*, то нужно рассматривать такую последовательность реакций:



Как и раньше, предположим, что удельная активность вещества C равняется r_1 , вещества D после добавления C^* — r_2 . Изменения значений $[C]$, $[D]$, r_1 и r_2 в зависимости от времени можно определить способом, аналогичным изложенному выше. Принимая во внимание уравнения (378) и (387), получаем

$$\begin{aligned} dr_1/dt &= -v_2 r_1/[C] + v_{-3}(r_2 - r_1)/[C] = \\ &= [v_{-3}r_2 - (v_2 + v_{-3})r_1]/[C] \end{aligned} \quad (390)$$

$$dr_2/dt = v_3(r_1 - r_2)/[D] \quad (391)$$

$$d[C]/dt = v_2 + v_{-3} - v_4 \quad (392)$$

$$d[D]/dt = v_3 - v_{-3} - v_4 \quad (393)$$

Таким образом, для определения четырех неизвестных величин (v_2 , v_3 , v_{-3} , v_4) имеется четыре независимых уравнения.

Кинетический изотопный метод можно также использовать для определения порядка реакции 1) по исходным веществам, 2) по промежуточному продукту, если его можно радиоактивно пометить, и 3) если метку имеет предшественник.

2.22.1. Определение порядка реакции по уменьшению концентрации исходного вещества. Порядок расходования вещества А, т. е. частный порядок по А, согласно уравнению (109), записывается следующим образом:

$$-d[A]/dt = k[A]^n \quad (394)$$

Рассмотрим уравнение (373)

$$R_a = r_a[A] \quad (395)$$

Если в систему ввести A^* , то временная зависимость r останется неизменной (если можно пренебречь изотопным эффектом), так как А — исходное вещество. Умножим обе части равенства (394) на r_a

$$-r_a(d[A]/dt) = kr_a[A]^n = kr_a[A][A]^{n-1} \quad (396)$$

Продифференцируем уравнение (395) (r_a — величина постоянная!):

$$dR_a/dt = r_a(d[A]/dt) \quad (397)$$

Объединим уравнения (395) — (397):

$$-dR_a/dt = kR_a[A]^{n-1} \quad (398)$$

Отсюда

$$-d\ln R_a/dt = k[A]^{n-1} \quad (399)$$

Если $-d\ln R_a/dt = \text{const}$, то $[A]^{n-1} = [A]^0$, т. е. $n = 1$. Приведенный в этой главе метод можно использовать только в том случае, когда А является исходным веществом, т. е. его концентрация может только уменьшаться.

2.22.2. Определение порядка уменьшения концентрации промежуточного продукта путем введения в него радиоактивной метки. Если порядок уменьшения концентрации вещества С равен n , то по

аналогии с уравнением (380) можно записать

$$v_3 = - [C](d \ln r_1 / dt) - d[C] / dt = k[C]^n \quad (400)$$

Умножим обе части на r_1 :

$$- [C](dr_1 / dt) - r_1(d[C] / dt) = kr_1[C]^n \quad (401)$$

Приняв во внимание равенства (395) — (397), получим

$$- dR_1 / dt = kR_1[C]^{n-1} \quad (402)$$

и

$$- d \ln R_1 / dt = k[C]^{n-1} \quad (403)$$

Уравнение (403) по форме аналогично уравнению (399) и не может быть применено к стационарному состоянию, т. е. когда $v_2 = v_3$.

2.22.3. Определение порядка реакции путем введения меченого предшественника. Введя в систему C^* и рассмотрев уравнение (387), получим

$$v_4 = [[D] / (r_1 - r_2)](dr_2 / dt) - d[D] / dt \quad (404)$$

Если частный порядок уменьшения концентрации вещества D равен n , то

$$[[D] / (r_1 - r_2)](dr_2 / dt) - d[D] / dt = k[D]^n \quad (405)$$

Перегруппировав, получим

$$[1 / (r_1 - r_2)] [(dr_2 / dt)[D] + (d[D] / dt)r_2 - (d[D] / dt)r_1] = k[D]^n \quad (406)$$

Умножим последнее равенство на r_2 с учетом уравнений (373) и (374)

$$[r_2 / (r_1 - r_2)] [dR_2 / dt - (d[D] / dt)r_1] = kR_2[D]^{n-1} \quad (407)$$

и перегруппируем

$$[1 / (r_1 - r_2)] [d \ln R_2 / dt] r_2 - (d \ln [D] / dt) r_1 = k[D]^{n-1} \quad (408)$$

Таким образом, если возможно определить концентрацию и радиоактивность данного вещества в различные моменты времени, то, используя соответствующие соотношения, можно определить скорость образования и распада, полное количество вещества, образовавшегося к данному моменту времени, частный порядок превращения как исходного, так и промежуточных веществ и т. д. Эти преимущества и лежат в основе возрастающего интереса к кинетическому изотопному методу в биохимических исследованиях.

2.23. КОМПАРТМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ

Биохимические системы, клеточные органеллы (ядро, митохондрия и др.), сама клетка, различные ткани и органы нельзя считать гомогенными системами. Они разнородны и по морфологии, и по динамике. *Компартменты* играют важную роль в разграничении метаболических процессов в пространстве и обеспечении относительно безотходного промежуточного метаболизма. Эти факты указывают на возможность использования метода определения числа компартментов, входящих в состав одной морфологической или функциональной единицы, относительно вещества или процесса и определения скорости переноса или превращения вещества между компартментами или внутри них. Такого рода информация может быть получена с помощью компартментного анализа, в основе которого лежит кинетический изотопный метод для компартментных систем в состоянии устойчивого динамического равновесия.

В общем виде компартментный анализ применим только для систем в стационарном состоянии.

Рассмотрим два случая, когда компартментная структура системы 1) известна, 2) неизвестна.

В первом случае мы знаем число компартментов системы, их относительные объемы, поток вещества и соответствующие химические реакции, протекающие между компартментами и внутри них. При этом нужно определить скорость и константы скорости потока и химической реакции.

Условие устойчивого динамического равновесия системы означает, что количество вещества остается неизменным во всех компартментах во всем рассматриваемом промежутке времени. На основании этого можно записать

$$dc_i/dt = \sum_{j=0}^n v_{ji} - \sum_{j=0}^n v_{ij} \quad (409)$$

$$dR_i/dt = \sum_{j=0}^n v_{ji}r_j - \sum_{j=0}^n v_{ij}r_i \quad (410)$$

где $i = 1, 2, \dots, n$, c_i — концентрация в i -м компартменте, R_i — радиоактивность i -го компартмента, v_{ij} — скорость переноса вещества из i -го в j -й компартмент (независимо от того, осуществляется ли он за счет процессов транспорта или путем химических реакций), r_j и r_i — удельные радиоактивности i -го и j -го компартментов.

Записав уравнения, аналогичные (409) и (410), для всех компартментов и решив их относительно v для стационарного состояния

($dc_i/dt = 0$), можно определить скорости процессов, протекающих в компартментных системах. При $dc_i/dt = 0$ из уравнения (409) следует, что

$$\sum_{j=0}^n v_{ji} = \sum_{j=0}^n v_{ij} \quad (i = 1, 2, \dots, n) \quad (411)$$

и, так как $R_i = c_i r_i$, то

$$c_i (dr_i/dt) = \sum_{j=0}^n v_{ji} r_j - \sum_{j=0}^n v_{ij} r_i \quad (412)$$

Сравнение исходного предположения о стационарном состоянии с уравнениями (409)—(411) показывает, что для всех i, j $v_{ij} = v_{ji}$ и $v_{ij} = \text{const}$, и, следовательно, уравнение (412) — это линейное дифференциальное уравнение с известным решением:

$$r_i(t) = \sum_{j=1}^k a_{ij}(t) \exp(b_j t) \quad (413)$$

где $a_{ij}(t)$ — постоянная величина (или полином от t), b_j — собственное значение коэффициента матрицы (см. приложение, разд. 3.14.1).

Во втором случае, когда компартментная структура неизвестна, уравнение, наилучшим образом описывающее экспериментально измеренные концентрацию и радиоактивность данного вещества, можно получить методом компьютерного моделирования. Это уравнение представляет собой сумму экспонент. Число экспоненциальных членов равняется числу компартментов. Размеры компартментов, а также константы скорости внутри- и межкомпарментных реакций входят в предэкспоненциальные множители и в показатели степени.

Полученное таким способом число компартментов является минимальным числом, которое может коррелировать с результатами эксперимента. Каждый компартмент может содержать в себе один или большее число субкомпарментов, но их невозможно разделить при данных условиях эксперимента.

При анализе компартментных систем, находящихся в неустойчивом состоянии, можно получить лишь незначительную информацию. Можно определить скорости для двух или трех компартментов при условии, что в системе протекает не более $2n$ реакций (n — число компартментов) со скоростями больше нуля. В общем случае при анализе компартментных систем, находящихся в неустойчивом состоянии имеется $n - 1$ независимых уравнений для

нахождения $\binom{n}{2} = n(n - 1)/2$ неизвестных.

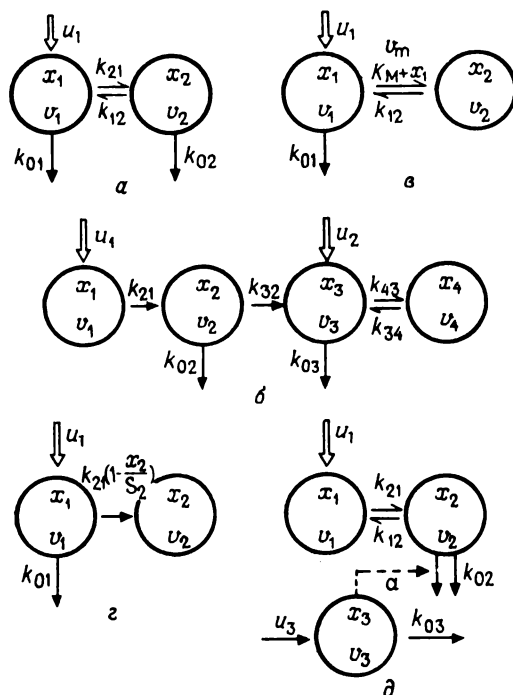


Рис. 25. Линейная, насыщаемая и регулируемая компартментные системы. а — линейная двухкомпаратментная система; б — линейная четырехкомпаратментная система; в и г — нелинейные двухкомпаратментные системы; д — регулируемая трехкомпаратментная система.

Наиболее широко известны *линейные системы, состоящие из двух или более компартментов* (рис. 25, а, б), *нелинейные насыщаемые компартментные системы* (рис. 25, в, г) и *регулируемые компартменты* (рис. 25, д). Анализ таких систем и определение их кинетических параметров важны не только для энзимологии и вообще биохимии, но они играют большую роль в фармакокинетических исследованиях, а также при их практическом использовании.

Рассмотрим линейную трехкомпаратментную систему (рис. 26). Добавим к первому компартменту известное количество вещества и измерим его концентрацию y_1 в том же месте. Тогда

$$\begin{aligned} dx_1(t)/dt = & -(k_{21} + k_{31} + k_{01})x_1(t) + k_{12}x_2(t) + \\ & + k_{13}x_3(t) + u_1(t) \end{aligned} \quad (414)$$

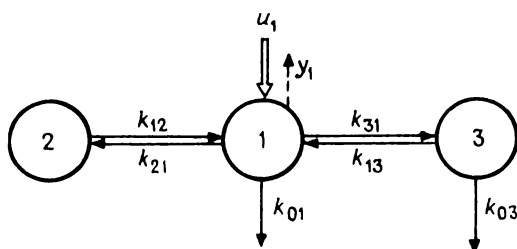


Рис. 26. Трехкомпарментная система.

$$dx_2(t)/dt = k_{21}x_1(t) - k_{12}x_2(t) \quad (415)$$

$$dx_3(t)/dt = k_{31}x_1(t) - (k_{13} + k_{03})x_3(t) \quad (416)$$

$$y_1(t) = x_1(t)/V_1 \quad (417)$$

$$x_1(0) = 0, x_2(0) = 0, x_3(0) = 0, k_{21}, k_{31}, k_{01}, k_{12}, k_{13}, k_{03}, V_1 \geq 0$$

где $x_i(t)$ — количество D в i -м компартменте, $u_1(t)$ пропорционально $D\delta(t)$, где $\delta(t)$ — дельта-функция Дирака (см. приложение, разд. 3.14.5), V_1 — относительный объем первого компартмента, k_{ij} — параметры скоростей транспорта (в приведенном выше примере для транспорта вещества из j -го в i -й компартмент).

Для насыщаемой компартментной системы, изображенной на рис. 25, в

$$dx_1(t)/dt = -[k_{01} + V_m/(K_M + x_1(t))]x_1(t) + k_{12}x_2(t) + u_1(t) \quad (418)$$

$$dx_2(t)/dt = [V_m/(K_M + x_1(t))]x_1(t) - k_{12}x_2(t) \quad (419)$$

$$y_1(t) = x_1(t)/V_1 \quad (420)$$

$$x_1(0) = 0, x_2(0) = 0, k_{01}, V_m, K_M, k_{12}, V_1 \geq 0$$

где V_m — максимальная скорость, K_M — константа Михаэлиса (см. разд. 3.1.2).

Система дифференциальных уравнений, описывающая любую из таких компартментных систем, может быть получена аналогичным образом.

Как уже говорилось выше, эти случаи можно классифицировать как случаи, позволяющие идентифицировать тип системы, но не ее параметры. Это означает, что сравнивая экспериментальные данные с теоретической моделью, можно получить наиболее вероятную компартментную систему, но из-за слишком большого числа неизвестных и недостаточного количества независимых уравнений нельзя определить значения индивидуальных констант.

2.24. КОЛЕБАТЕЛЬНЫЕ ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ

Термодинамика необратимых реакций делает возможным возникновение колебательных реакций в открытых системах, находящихся в стационарном состоянии. Это — случай, когда концентрации веществ не претерпевают монотонного уменьшения или увеличения с течением времени. Концентрации (или любой другой параметр, пропорциональный концентрации и измеренный любым методом), попеременно то уменьшаются, то увеличиваются. Если амплитуда увеличения и уменьшения в течение определенного времени остается практически неизменной, то колебания называются *незатухающими*, а если амплитуда уменьшается, то колебания *затухающие*. Непременным условием колебательных реакций служит наличие множества обратных связей в системе, причем стехиометрия определенных обратных связей должна быть больше единицы.

Для существования колебаний в таком случае система должна быть неустойчивой. Рассмотрим критерии стабильности системы.

Пусть химическая или физическая система описывается следующей системой дифференциальных уравнений:

$$\dot{x}_i = F_i(x_1, x_2, \dots, x_n), \quad i = 1, \dots, n \quad (421)$$

Согласно Ляпунову, состояние x_i^0 стабильно (когда все $F_i = 0$), если любое решение $U(t)$ уравнения (421) (т. е. каждая функция $x_i = U_i(t)$, удовлетворяющая уравнению (421) при данных начальных и граничных условиях), которое близко к значению x_i^0 в момент времени t_0 , остается таким же при $t \geq t_0$. Точнее говоря, если для данного $\varepsilon > 0$ и t_0 существует такая окрестность $\eta(\varepsilon, t_0)$, что для каждого $U_i(t)$, где $|U_i(t_0) - x_i^0| < \eta$, выполняется неравенство $|U_i(t) - x_i^0| < \varepsilon$ при $t \geq t_0$, то x_i^0 *стабильно*. x_i^0 *асимптотически стабильно*, если $\lim_{t \rightarrow \infty} |U_i(t) - x_i^0| = 0$.

Если имеется положительная определенная функция x^2 , удовлетворяющая неравенству

$$\dot{x}^2 \leq 0 \quad (422)$$

для всех значений t , то уравнение (421) либо стабильно (≤ 0), либо асимптотически стабильно (< 0). Выполнение неравенства (422), или *функции Ляпунова*, является необходимым, но не достаточным условием стабильности.

Если имеется независимое дифференциальное уравнение (т. е. уравнение, в правой части которого время не является явной переменной); то возможно стационарное состояние по $\{x_i^0\}$, причем

условие линейной стабильности формулируется следующим образом: для любого малого (∂x_i) изменения переменной x_i величина ($|\partial x_i|/x_i^0 \leq 1$) будет уменьшаться при $t \rightarrow \infty$ по сравнению со стационарным состоянием. Вблизи x_i^0 отклик на произвольное отклонение $\{\partial x_i^0\}$ равен

$$d\partial x_i/dt = \sum_{j=1}^n \alpha_{ij} \partial x_j \quad (423)$$

где $\alpha_{ij} = (\partial F_i/\partial x_j)_0$ относится к стационарному состоянию. Решение уравнения (423) дает

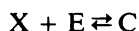
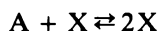
$$\partial x_j = \partial x_j^0 \exp(\omega t) \quad (424)$$

называемое нормальным решением. Собственное значение $\omega = \omega_d + i\omega_n$ содержит отрицательный действительный член ω_d . Это решение справедливо, если инвариантное относительно времени уравнение

$$|\omega \partial_{ij} - \alpha_{ij}| = 0, \quad \partial_{ij} \begin{cases} 0 & (i \neq j) \\ 1 & (i = j) \end{cases} \quad (425)$$

соответствует условию $\omega_d < 0$. Явная форма данного уравнения является необходимым и достаточным условием (*условием Гурвица—Раута*) стабильности стационарного состояния по $\{x_i^0\}$ в определении Ляпунова.

Такой метод линейного анализа не дает никакой информации об амплитуде колебаний. Рассмотрим химическую реакцию



где A и B — начальное и конечное вещества; их концентрации остаются неизменными (в открытой системе), следовательно, $E + C = \text{const}$. Построив график зависимости стационарного значения концентраций X от A при постоянном B, находим, что существует такое значение A, которому можно приписать три устойчивых состояния (рис. 27). Анализ линейной стабильности показывает, что от $A = 0$ до P и от P' до $A \rightarrow \infty$ наблюдается область стабильности, а между P и P' система нестабильна.

Наиболее хорошо исследована колебательная химическая система, включающая малооновую кислоту, $\text{Ce}^{4+}/\text{Ce}^{3+}$ и борат-ион. Протекающая в ней реакция и колебания представлены на рис. 28.

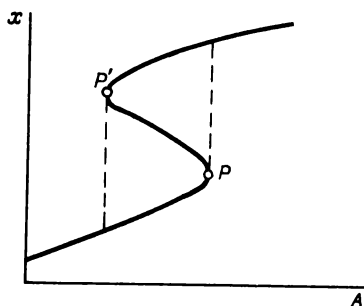


Рис. 27. Стационарная концентрация компонентов химической реакции для нестабильных систем.

$\text{Ce}^{4+}/\text{Ce}^{3+}$ представляет собой окислительно-восстановительную систему, потенциал которой периодически изменяется с изменениями концентраций окисленной и восстановленной форм. Согласно уравнению Нернста, этот редокс-потенциал зависит от стандартного потенциала, а также от соотношения концентраций окисленной и восстановленной форм данного соединения.

$$E_h = E'_0 + (2,303 RT/nF) \lg ([\text{акцептор электронов}]/[\text{донор электронов}]) \quad (426)$$

где E'_0 — стандартный редокс-потенциал, E_h — действительный электродный потенциал, n — число переносимых электронов, F — число Фарадея (96406 Дж/В).

Если $[\text{акцептор электронов}] = [\text{донор электронов}]$, то $E_h = E'_0$

E'_0 также называют *средним потенциалом*, так как от соответствующей точки перегиба на сигмоидной кривой зависимости изменения потенциала от концентрации окисленной (или восстановленной) формы вещества. Исходя из значений стандартных редокс-потенциалов различных окислительно-восстановительных систем, можно предсказывать направление переноса электронов между двумя окислительно-восстановительными парами. Следовательно, существует

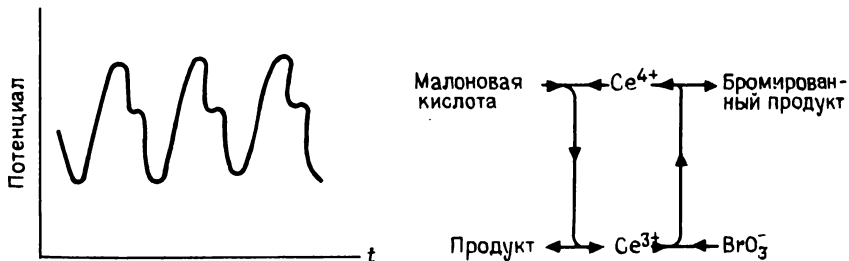


Рис. 28. Колебательная химическая реакция.

прямая связь между изменениями стандартного редокс-потенциала и свободной энергией

$$\Delta E_0' = \Delta G^0 / nF \quad (427)$$

Колебательные реакции в живых клетках и их экстрактах всегда включают окислительно-восстановительную компоненту.

В живых клетках процессы метаболизма (будучи намного более сложными, чем уже описанные химические системы) имеют колебательный характер. Один из примеров может служить гликолиз со множеством отрицательных и положительных обратных связей, протекающий по колебательному механизму *in vivo* и *in vitro*.

Колебательные реакции, возможно, играют важную роль в регуляции концентраций промежуточных продуктов метаболизма, а также в управлении периодическими процессами в живых организмах («биологических часах»).

ЛИТЕРАТУРА

Обзоры

Banford C. H., Tipper C. F. H. (eds.): Chemical Kinetics, v. 2. The Theory of Kinetics. Elsevier Publ. Comp., Amsterdam, New York, London, 1969.

Benson S. W. The Foundation of Chemical Kinetics. McGraw-Hill Book Comp. Inc., New York, Toronto, London, 1960.

Benson S. W. Thermochemical Kinetics. J. Wiley and Sons, Inc. New York, London, Sidney, 1968.

Bray H. G., White K. Kinetics and Thermodynamics in Biochemistry. J. and A. Churchill Ltd., London, 1957.

Capellos C., Bielski B. H. J. Kinetic Systems. Mathematical Description of Chemical Kinetics in Solution. Wiley Interscience, New York, London, Sydney, Toronto, 1972.

Chance B., Pye E. K., Gosh A. K., Hess B. (eds): Biological and Biochemical Oscillators. Academic Press, New York, London, 1973.

Cornish-Bowden A. Basic Mathematics for Biochemists. Chapman and Hall, London, New York, 1981.

Czerlinski G. H. Chemical Relaxation. M. Dekker Inc. New York, 1966.

Erdey-Gruz T., Schay G. Theoretical Physical Chemistry, v. II. Tankönyvkiadó, Budapest, 1954 (in Hung.).

Hansch C., Leo A. Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology. J. Wiley and Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, 1979.

Jencks W. P. Catalysis in Chemistry and Enzymology. McGraw-Hill Book Comp. New York, St. Louis, San Francisco, London, Sydney, Toronto, Mexico, Panama, 1969.

Laidler K. J. Reaction Kinetics, v. 1 and 2. Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris, 1963.

Laidler K. J. Theories of Chemical Reaction Rates. McGraw-Hill Book Comp., New York, St. Louis, San Francisco, London, Sydney, Toronto, Mexico, Panama, 1969.

Nejman M. B., Gal D. Kinetic Isotope Method and its Applications. Akadémiai Kiadó, Budapest, 1967 (in Hung.).

Nicolis G., Lefever R. (eds.): Membranes, Dissipative Structures, and Evolution. Adv. Chem. Phys. XXIX. J. Wiley and Sons, New York, London, Sidney, Toronto, 1975.

Rodiquin N. M., Rodiquina E. N. Consecutive Chemical Reactions. Mathematical Analysis and Development. Van Nostrand Co., Inc., New Jersey, 1969.

Szabó Z. Kinetic Characterization of Complex Reaction Systems. In: C. H. Bamford, C. F. H. Tipper (eds): Comprehensive Chemical Kinetics, v. 2. The Theory of Kinetics, p. 1. Elsevier Publ. Comp. Amsterdam, London, New York, 1969.

Szemjonov N. N. Some Problems of Chemical Kinetics and Reactivity. Akademiai Kiadó, Budapest, 1961 (in Hung).

Другие работы

Keleti T. Errors in the Evaluation of Arrhenius and van't Hoff plots. Biochem. J., 277—280, 1983.

Spencer J. N. ΔG and $\partial G / \partial \xi$. J. Chem. Educ., 51, 577—579 (1974).

Дополнительная литература*

Жаботинский А. М. Концентрационные автоколебания. — М.: Наука, 1974.

Кринский В. И., Михайлов А. С. Автоволны. — М.: Знание, 1984.

Соловьев В. Н., Фирсов А. А., Филов В. А. Фармакокинетика. — М.: Медицина, 1980.

Холодов Л. Е., Яковлев В. П. Клиническая фармакокинетика, — М.: Медицина, 1985.

Krinsky V. I. (ed.) Self-organization. Autowaves and structures far from equilibrium. Springer-Verlag, Berlin, 1984.

Tyson J. J. The Belousov-Zhabotinskii reaction. Springer-Verlag, Berlin, 1976.

* Список составлен редактором перевода Б. И. Кургановым.

3. ФЕРМЕНТАТИВНАЯ КИНЕТИКА

Берцелиус в 1835 г. впервые предположил, что реакции живого организма осуществляются благодаря новой силе, которую он назвал «каталитической». Эту идею он обосновал главным образом экспериментальным наблюдением: диастаза из картофеля гидролизует крахмал быстрее, чем серная кислота. Уже в 1878 г. Куне назвал вещество, обладающее каталитической силой в живом организме, ферментом.

Предварительные эксперименты по изучению кинетики ферментативных реакций показали, что скорость реакции $E + S \rightarrow E + P$, вопреки теоретическим ожиданиям, не зависит от концентрации фермента (E) и субстрата (S) таким образом, как в случае обычной реакции второго порядка.

Самая ранняя попытка математически описать ферментативные реакции была предпринята Дюкло в 1898 г. Браун и независимо от него Анри впервые выдвинули гипотезу об образовании в ходе реакции фермент-субстратного комплекса. Затем это предположение подтвердили три экспериментальных факта: а) папаин образовывал нерастворимое соединение с фибрином (Вюртц, 1880); б) субстрат инвертазы сахароза могла защищать фермент от тепловой денатурации (О'Салливан и Томпсон, 1890); в) было показано, что ферменты являются стереохимически специфическими катализаторами (Фишер, 1898—1899).

В 1913 г. Михаэлис и Ментен опубликовали свою теорию *общего механизма* ферментативных реакций: $E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E + P$

Они ввели понятие максимальной скорости и показали, что *кривая насыщения* (т. е. зависимость скорости реакции от концентрации субстрата) является равнобочной гиперболой. Они доказали, что максимально наблюдаемая скорость есть одна из асимптот к кривой, а отрезок, отсекаемый на оси абсцисс (в области ее отрицательных значений) второй асимптотой, т. е. константа в уравнении скорости, равен по абсолютному значению концентрации субстрата, необходимой для достижения половины максимальной скорости.

3.1. КИНЕТИКА МИХАЭЛИСА — МЕНТЕН

Михаэлис и Ментен предположили, что скорость реакции определяется распадом комплекса ES, т. е. константой k_2 . Это возможно только при условии, что k_2 — наименьшая из констант скорости. В этом случае равновесие между фермент-субстратным комплексом, свободным ферментом и субстратом устанавливается быстро по сравнению со скоростью реакции (*быстро устанавливающееся равновесие*).

Начальную скорость реакции можно выразить следующей формулой:

$$v_0 = k_2[ES] \quad (428)$$

Поскольку константа диссоциации фермент-субстратного комплекса равна

$$K_S = [E][S]/[ES] = k_{-1}/k_1 \quad (429)$$

то концентрацию свободного фермента можно выразить как

$$[E] = K_S[ES]/[S] \quad (430)$$

Общая концентрация фермента в реакционной смеси определяется формулой

$$[E]_T = [E] + [ES] = K_S[ES]/[S] + [ES] \quad (431)$$

Реакция достигает максимальной скорости, когда концентрация субстрата достаточно высока, чтобы все молекулы фермента находились в виде комплекса ES (бесконечно большой избыток субстрата). Отношение начальной скорости к теоретически возможной максимальной скорости равно отношению $[ES]$ к $[E]_T$:

$$v_0/V_{\max} = [ES]/[E]_T = [ES]/(K_S[ES]/[S] + [ES]) = 1/(K_S + [S] + 1) \quad (432)$$

$$v_0 = V_{\max}[S]/(K_S + [S]) \quad (433)$$

Это классическое уравнение *Михаэлиса и Ментен*, которое со времени его публикации в 1913 г. стало фундаментальным принципом всех кинетических исследований ферментов в течение десятилетий и с некоторыми ограничениями осталось таким до сих пор. Формально оно соответствует изотерме Ленгмюра (333), показывая, что фермент действует как гетерогенный катализатор.

Позднее было показано, что оригинальное уравнение Михаэлиса — Ментен предполагало наличие нескольких ограничений. Оно справедливо, т. е. правильно описывает кинетику реакции, катализируемой данным ферментом, только при условии выполнения всех

следующих ограничительных условий: а) образуется кинетически устойчивый фермент-субстратный комплекс; б) определяемая с помощью уравнения (433) константа K_s является константой диссоциации фермент-субстратного комплекса: это справедливо, только если $k_2 \ll k_{-1}$; в) концентрация субстрата не меняется в ходе реакции, т. е. концентрация свободного субстрата равна его начальной концентрации; г) продукт реакции быстро отщепляется от фермента, т. е. не образуется кинетически значимого количества ЕР-комплекса; д) вторая стадия реакции необратима; точнее говоря, мы принимаем во внимание только начальную скорость, когда обратной реакцией (из-за фактического отсутствия продукта) еще можно пренебречь*; е) с каждым активным центром фермента связывается только одна молекула субстрата; ж) для всех реагирующих веществ вместо активностей можно использовать их концентрации.

Проанализируем все ограничения одно за другим, чтобы убедиться в справедливости первоначального уравнения Михаэлиса — Ментен, а также тех кинетических соотношений, которые возникают, когда некоторые из этих ограничений не выполняются.

3.1.1. Образование кинетически устойчивого фермент-субстратного комплекса. К настоящему времени имеются сотни экспериментально проверенных примеров, демонстрирующих образование кинетически устойчивых фермент-субстратных комплексов в ходе ферментативной реакции.

Однако следует отметить, что выдвигались также теории, не включающие образование в реакции фермент-субстратного комплекса. Одна из них предполагает, что фермент увеличивает энергию молекул субстрата с помощью каких-либо телекинетических взаимодействий (электростатическое притяжение или отталкивание, электромагнитное излучение и т. д.). Если молекула субстрата достигает энергии выше определенного уровня, она может вступать в реакцию или разрушаться с образованием продуктов. Скорость реакции пропорциональна количеству таких высокоэнергетических молекул. Считается, что фермент передает энергию субстрату при упругих, а с точки зрения других авторов, при неупругих столкновениях. Эти телекинетические теории с научной точки зрения были убедительно опровергнуты многими исследователями. Несмотря на то что были составлены кинетические уравнения для реакций, когда фермент отделен от субстрата растворителем (т. е. может происхо-

* Определение начальной скорости см. в приложении, разд. 3.14.3.

доть телекинез), такие теоретические построения до сих пор не нашли экспериментального подтверждения. Это означает, что образование устойчивого фермент-субстратного комплекса обязательно происходит во всех известных ферментативных реакциях. Поэтому первое условие, определяющее справедливость кинетики Михаэлиса — Ментен, можно считать обязательным для всех известных случаев.

Что касается механизма образования фермент-субстратного комплекса, то для него можно рассмотреть несколько теоретических моделей и, действительно, механизмы образования могут быть различными для разных ферментов. Известны многочисленные реакции, в которых образование фермент-субстратного комплекса регулируется только скоростью диффузии субстрата (субстратов) к поверхности фермента. В этих случаях связывание фермента с субстратом можно в основном объяснить простой адсорбцией.

Однако на основе термодинамических расчетов можно доказать, что в других случаях, например при образовании комплекса фермент-ингибитор, связывание описывается законами, справедливыми для процессов экстракции. Образование комплекса происходит благодаря создаваемому ферментом для ингибитора гидрофобному окружению, в котором ингибитор может существовать на более низком уровне энергии. В этих случаях можно установить количественное соотношение между скоростью образования комплекса и растворимостью.

Во всяком случае одна или несколько боковых цепей фермента, как правило, активно участвуют в образовании комплекса с субстратом за счет ионных, гидрофобных или ковалентных связей.

Независимо от типа и способа образования связи при появлении фермент-субстратного комплекса скорость уменьшения концентрации субстрата в процессе реакции увеличивается. Увеличение скорости может быть просто следствием роста числа эффективных столкновений фермента и субстрата из-за большей плотности субстрата на поверхности молекулы фермента. В других случаях образование комплекса, возможно, приводит к уменьшению энергии активации, если дипольный момент фермент-субстратного комплекса увеличивается по сравнению с дипольным моментом смеси свободного фермента и свободного субстрата. Уменьшение энергии активации может также быть следствием смещения электронов, вызванного образованием комплекса с переносом заряда, либо изменением электронной плотности субстрата, либо электронной проводимости из-за проявления белками гипотетических полупроводниковых свойств.

Однако независимо от механизма образования фермент-субстратного комплекса и способа активации субстрата в комплексе, первое условие, определяющее правильность кинетики Михаэлиса — Ментен, следует считать во всех случаях безусловно верным. Это утверждение означает, что в ходе ферментативной реакции образуется тот или иной тип фермент-субстратного комплекса и скорость реакции в этом простом случае зависит от концентрации этого комплекса.

3.1.2. Природа константы K в уравнении. Второй постулат формулирует, что константа K_S в уравнении (433) является константой диссоциации фермент-субстратного комплекса.

Бриггс и Холдейн в 1925 г. доказали, что исходное уравнение Михаэлиса — Ментен справедливо только при $k_2 \ll k_{-1}$, т. е. когда равновесие элементарной стадии $E + S \rightleftharpoons ES$ устанавливается очень быстро по сравнению со скоростью следующей стадии. Поэтому такие кинетические механизмы (подчиняющиеся начальному условию Михаэлиса — Ментен и имеющие одну медленную элементарную стадию, относительно которой равновесия во всех других элементарных стадиях устанавливаются быстро) называются удовлетворяющими предположению о «быстром равновесии». Если, однако, k_2 по порядку величины сравнима с k_{-1} , изменение концентрации фермент-субстратного комплекса во времени можно выразить следующим дифференциальным уравнением:

$$d[ES]/dt = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \quad (434)$$

Так как мы рассматриваем начальную скорость реакции, т. е. момент, когда обратная реакция еще не происходит, а предстационарная стадия (см. разд. 3.1.5) уже прошла, то вследствие избытка субстрата количество образовавшегося фермент-субстратного комплекса равно количеству распавшегося (*принцип стационарности, или кинетика Бриггса и Холдейна, или принцип Боденштейна* в химической кинетике) и справедливо, что

$$d[ES]/dt = 0 \quad (435)$$

Подставив это в дифференциальное уравнение (434), получим выражение для концентрации свободного фермента:

$$[E] = (k_{-1} + k_2)[ES]/k_1[S] \quad (436)$$

$v_0 = k_2[ES]$ (по уравнению (428))

$$\begin{aligned} [E]_T &= [E] + [ES] = [(k_{-1} + k_2)/k_1[S] + 1][ES] = \\ &= (k_{-1} + k_2 + k_1[S])/k_1[S][ES] \end{aligned} \quad (437)$$

$$[ES] = k_1[S][E]_T / (k_{-1} + k_2 + k_1[S]) \quad (438)$$

Подставив (438) в (428), получим

$$\begin{aligned} v_0 &= k_1 k_2 [S][E]_T / (k_{-1} + k_2 + k_1[S]) = \\ &= k_2 [S][E]_T / [(k_{-1} + k_2) / k_1 + [S]] \end{aligned} \quad (439)$$

В этом случае

$$V_{\max} = k_2 [E]_T \quad (428a)$$

и равняется максимальной скорости, полученной по уравнению Михаэлиса — Ментен. Тем не менее константа в знаменателе уравнения Михаэлиса — Ментен (439)—не K_S , т. е. не константа диссоциации фермент-субстратного комплекса, а так называемая *константа Михаэлиса*:

$$K_M = (k_{-1} + k_2) / k_1 \quad (429a)$$

K_M равно K_S только, если $k_2 \ll k_{-1}$.

В случае $k_{-1} \ll k_2$ константа в знаменателе уравнения скорости выражается формулой

$$K_k = k_2 / k_1 \quad (429b)$$

и называется, согласно Ван Слайку, *кинетической константой*.

Уравнение (438) можно также получить из (434) без предположения (435). Подставив значение $[E] = [E]_T - [ES]$ из (431) в (434), после преобразования получим

$$[ES] = (k_1[S][E]_T - d[ES]/dt) / (k_1[S] + k_{-1} + k_2) \quad (438a)$$

Для того чтобы из этого уравнения получить уравнение стационарного состояния (438), не обязательно должно быть $d[ES]/dt = 0$. Достаточно, чтобы выполнялось неравенство $d[ES]/dt \ll k_1[S][E]_T$. Этим объясняется, почему можно достичь хорошего приближения в течение длительного времени при использовании принципа стационарности.

Дифференцируем (438):

$$d[ES]/dt = [k_1(k_{-1} + k_2)[E]_T / (k_1[S] + k_{-1} + k_2)^2] (d[S]/dt) \quad (438b)$$

Это выражение, очевидно, не равно 0.

Природа компонентов реакции не определяет целиком смысла константы K в уравнении. При изменении условий реакции значение K также может измениться. Так, например, в случае пероксидазы при высокой концентрации донора протонов эта константа является кинетической константой K_k . При уменьшении концентрации доно-

ра протонов константа превращается в константу Михаэлиса K_M , а при очень низких уровнях донора протонов получаем константу диссоциации K_S .

Так, при таком простом механизме реакции уравнения, описывающие скорость реакции, формально одинаковы как для исходной кинетики Михаэлиса — Ментен (быстрое равновесие), так и для кинетики Бриггса — Холдейна (стационарное состояние). То есть

$$v_0 = V_{\max}[S]/(K + [S]) \quad (440)$$

и только значение константы K различно в зависимости от механизма.

Следует также отметить, что первоначальное предположение $d[ES]/dt = 0$ на самом деле может быть справедливым только в течение очень короткого времени, когда зависимость $[ES]$ от времени достигает максимума. Если, однако, значение $d[ES]/dt$ достаточно мало, его можно считать равным 0 в течение некоторого ограниченного периода времени. Ошибка такого приближения различна в зависимости от того, измеряем мы расход субстрата или образование продукта, но во всех случаях его верхний предел составляет $[E]_T/K_M$. При использовании относительно низких концентраций фермента (порядка мкМ) ошибка обычно не превышает нескольких процентов. Если, однако, кривая зависимости $[ES]$ от времени не проходит через максимум, предположение о стационарном состоянии не выполняется ни в какой момент времени. Тем не менее предположение стационарности можно применить в качестве *приближения* и в этом случае, даже для относительно длительного периода времени, если $d[ES]/dt$ пренебрежимо мало по сравнению с абсолютными значениями $d[P]/dt$ и $d[S]/dt$. Здесь мы анализируем уже полностью обратимую реакцию, т. е. принимаем во внимание стадию $ES \xrightleftharpoons[k_{-2}]{} E + P$. В точке максимума $d[ES]/dt = 0$ и $d^2[ES]/dt^2 < 0$.

$$d[ES]/dt = (k_1[S] + k_{-2}[P])[E] - (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (441)$$

$$d^2[ES]/dt^2 = -(k_1[S] + k_{-2}[P] + k_{-1} + k_2)(d[ES]/dt) + \\ + [k_1(d[S]/dt) + k_{-2}(d[P]/dt)][E] \quad (442)$$

Дифференцируя уравнение $[S]_0 = [S] + [ES] + [P]$ по времени, мы получаем, что при $d[ES]/dt = 0$ $d[S]/dt = -d[P]/dt$. При подстановке этих значений оказывается, что условием максимума $[ES]$ является

$$d^2[ES]/dt^2 = (k_{-2} + k_1)(d[P]/dt)[E] < 0 \quad (443)$$

Так как $[E]$ — положительная величина и предполагается, что $d[P]/dt$ — положительная величина, то указанное выше уравнение выполняется, только если $k_1 > k_{-2}$. Это неравенство также исключает, что $[ES]$ может достигать максимума при обратной реакции, т. е. что кинетика стационарного состояния не будет преобладать даже на мгновение. Кроме того, в реакции, идущей справа налево $k_1 < k_{-2}$, и условие появления максимума $[ES]$ в то же время исключает возможность образования максимума $[ES]$ для реакции, идущей слева направо. Таким образом, для обратимых реакций действительно стационарное состояние теоретически невозможно даже на мгновение при любом направлении реакции, его можно только аппроксимировать. Однако предположение о стационарности нельзя использовать даже в качестве приближения, если $k_{-2}/k_1 > 1$, и реакция необратима, так как $k_{-1} \approx 0$.

3.1.3. Влияние концентрации субстрата на кинетику реакции. Предыдущие выводы справедливы только при выполнении условия (в) в разд. 3.1, т. е. для случая, когда концентрация субстрата не изменяется. Другими словами, концентрация субстрата в любой момент времени равна начальной общей концентрации субстрата, что означает наличие достаточно большого избытка субстрата. Однако во многих случаях это условие не выполняется. С одной стороны, избыток субстрата не используется в реакции *in vitro* с некоторыми ферментами из-за часто происходящего ингибирования ферментативной активности субстрата. В этом случае можно применять только оптимальную его концентрацию, и это не всегда обеспечивает избыток субстрата, необходимый для выполнения кинетических уравнений обсуждаемых выше механизмов. Более того, в клетке *in vivo* избыток субстрата, необходимый для осуществления этого условия, обычно не достигается.

В ферментативных реакциях, где субстрат не находится в избытке и, следовательно, его концентрация меняется в ходе реакции, константа диссоциации фермент-субстратного комплекса равна

$$K_S = ([S]_0 - [ES] - [P])[E]_T - [ES])/[ES] \quad (444)$$

($[S]_0$ — концентрация субстрата при $t = 0$). В этом случае начальная скорость реакции (в стационарном состоянии) определяется формулой

$$v_0 = V_{\max}[S_t]/(K_M + [S_t]) \quad (445)$$

где $[S_t]$ — концентрация субстрата в момент времени t . Полное решение уравнения получают интегрированием уравнения Михаэли-

са — Ментен с учетом изменения концентрации субстрата как функции времени (см. уравнение (462)).

Тем не менее можно написать приближительное решение для двух случаев, когда $[S]_0 \neq [S]_t$: 1) если это неравенство выполняется из-за больших значений t , т. е. когда более 5% от начальной концентрации субстрата израсходовалось за время реакции; 2) если концентрацией фермента нельзя пренебречь по сравнению с концентрацией субстрата и, таким образом, нужно принимать во внимание концентрацию фермент-субстратного комплекса.

Если t велико, а концентрация $[ES]$ пренебрежимо мала по сравнению с $[S]_0$, уравнение (444) переходит в следующее:

$$K_S = ([S]_0 - [P])([E]_T - [ES])/[ES] \quad (444a)$$

Для значения концентрации $[\bar{S}_t]$, которая меняется в ходе реакции, удовлетворительным приближением служит значение $([S]_0 + [S]_t)/2$. Так как $[S]_t = [S]_0 - [P]$, среднюю скорость \bar{v} можно выразить как

$$\bar{v} = ([S]_0 - [S]_t)/t \quad (446)$$

Подставив (446) и приближительное значение $[\bar{S}_t]$ в (445), получим:

$$\bar{v} = [P]/t = V_{\max}([S]_0 + [S]_t)/[2K_M + ([S]_0 + [S]_t)] \quad (447)$$

При сравнении значений, рассчитанных на основе этого приближения, со значениями, полученными из точного, проинтегрированного уравнения Михаэлиса — Ментен (462), оказывается, что ошибка в определении K_M составляет 1 и 4% при расходовании 30 и 50% субстрата соответственно. Следовательно, ошибка при данном приближении незначительна по сравнению с ошибкой измерения.

Когда расход субстрата не превышает 5% начальной концентрации, но концентрация фермента так велика, что $[ES]$ по сравнению с $[S]_0$ нельзя не учитывать, уравнение (444) принимает следующий вид:

$$K_S = ([S]_0 - [ES])([E]_T - [ES])/[ES] \quad (444b)$$

Решение (444b) относительно $[ES]$ дает

$$[ES] = \frac{1}{2}([E]_T + [S]_0 + K_S - \sqrt{([E]_T + [S]_0 + K_S)^2 - 4[E]_T[S]_0}) \quad (448)$$

Из двух возможных решений может быть выбрано только отрицательное, так как только оно удовлетворяет начальным условиям: $[ES] = 0$ при $[S]_0 = 0$ или $[E]_T = 0$. По аналогии с (432) мы получили

уравнение начальной скорости. Квадратное уравнение, полученное из (444б) с помощью (428) и (428а), можно привести к следующему виду:

$$[S]_0 V_{\max}/v_0 = K_S V_{\max}/(V_{\max} - v_0) + [E]_T \quad (449)$$

Если известно V_{\max} можно рассчитать K_S .

Следует учесть два предельных случая. В первом случае $[S] \ll K_M$, т. е. в уравнении (445) значением $[S]$ можно пренебречь по сравнению с K_M .

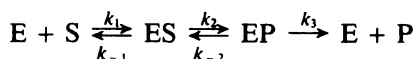
$$v_0 = (V_{\max}/K_M)[S] = k[S] \quad (445a)$$

Таким образом, мы получили кажущуюся реакцию первого порядка и $k = V_{\max}/K_M$ — кажущуюся кинетическую константу первого порядка. Ее фактическая размерность — время⁻¹, но она является комбинацией констант скорости первого и второго порядков нескольких элементарных стадий, т. е. $k_2 k_1 [E]_T / (k_{-1} + k_2)$. При условиях кажущегося первого порядка k является мерой прохождения реакции. Например, значение $k = 0,0383 \text{ с}^{-1}$ означает, что 3,83% $[S]_0$ расходуется за одну секунду протекания реакции.

Другой предельный случай: $[S] \gg K_M$. Здесь константа K_M ничтожно мала по сравнению с $[S]$, и, таким образом, получаем

$$v_0 = V_{\max} \quad (445b)$$

3.1.4. В ходе реакции происходит образование кинетически устойчивого комплекса фермент — продукт. Если в ходе реакции происходит образование кинетически устойчивого комплекса фермент — продукт, механизм реакции выглядит следующим образом:



Применив предположение о стационарном состоянии, можно написать дифференциальные уравнения:

$$d[ES]/dt = k_1[E][S] + k_{-2}[EP] - (k_{-1} + k_2)[ES] = 0 \quad (450)$$

$$d[EP]/dt = k_2[ES] - (k_{-2} + k_3)[EP] = 0 \quad (451)$$

Из этих уравнений следует, что

$$[ES] = [(k_{-2} + k_3)/k_2][EP] \quad (452)$$

$$[E] = [(k_{-1}k_{-2} + k_{-1}k_3 + k_2k_3)/k_1k_2[S]][EP] \quad (453)$$

Так как
$$v_0 = k_3[EP] \quad (454)$$

и
$$[E]_T = [E] + [ES] + [EP] =$$

$$= [(k_{-1}k_{-2} + k_{-1}k_3 + k_2k_3)/k_1k_2[S] + (k_{-2} + k_3)/k_2 + 1][EP] =$$

$$= \{ [k_{-1}k_{-2} + k_{-1}k_3 + k_2k_3 + k_1[S](k_{-2} + k_3) + k_1k_2[S]]/k_1k_2[S] \} [EP] \quad (455)$$

получаем

$$[EP] = k_1k_2[S][E]_T/[k_{-1}k_{-2} + k_{-1}k_3 + k_2k_3 + k_1[S](k_{-2} + k_3 + k_2)] \quad (456)$$

$$v_0 = k_1k_2k_3[S][E]_T/[k_{-1}k_{-2} + k_{-1}k_3 + k_2k_3 + k_1[S](k_{-2} + k_3 + k_2)] =$$

$$= [k_2k_3/(k_{-2} + k_3 + k_2)][E]_T[S]/[(k_{-1}k_{-2} + k_{-1}k_3 + k_2k_3)/k_1(k_{-2} + k_3 + k_2) + [S]] \quad (457)$$

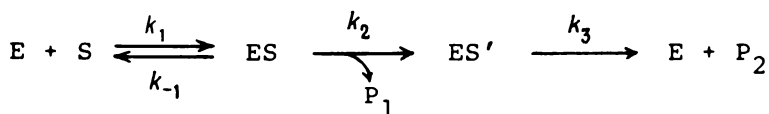
То есть

$$V_{\max} = [k_2k_3/(k_{-2} + k_3 + k_2)][E]_T \quad (458)$$

$$K_M = (k_{-1}k_{-2} + k_{-1}k_3 + k_2k_3)/k_1(k_{-2} + k_3 + k_2) \quad (459)$$

В этом случае уже очень сложно вычислить конкретные значения индивидуальных констант скорости, так как прямо измерить можно только их отношение. Ситуация еще более затрудняется при усложнении механизма ферментативной реакции, когда в реакции участвуют больше двух комплексов, потому что количество констант скорости в уравнении, естественно, гораздо больше, и их соотношения также сложнее.

Однако ситуация упрощается, если после обратимой реакции образования первого комплекса последующие элементарные стадии необратимы. Важными представителями ферментов, подчиняющихся этому механизму, являются протеолитические ферменты и эстеразы. Механизм их реакции можно записать следующим образом:



где ES' — ацилферментное промежуточное соединение, которое разлагается под действием воды. Мы можем написать

$$d[P_2]/dt = d[P_1]/dt = v = k_1k_2k_3[S][E]_0/[k_3(k_{-1} + k_2) + [S](k_2 + k_3)] \quad (459a)$$

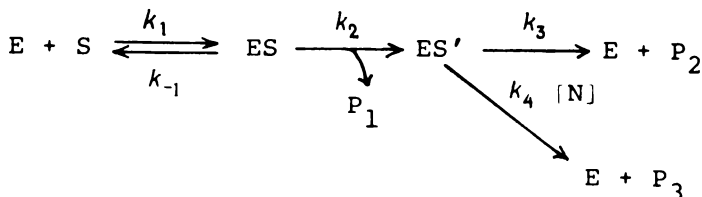
$$V_{\max} = k_2k_3[E]_0/(k_2 + k_3) = k_{\text{кат}}[E]_0 \quad (459б)$$

$$K_M = k_3(k_{-1} + k_2)/(k_2 + k_3)k_1 \quad (459в)$$

$$k_{\text{кат}}/K_M = k_2k_1/(k_{-1} + k_2) = k_2/K'_M \quad (459г)$$

Константа Михаэлиса стадии ацилирования — $K'_M \approx K_S$. Чем больше отношение $k_{\text{кат}}/K_M$, тем выше специфичность субстрата.

Определение констант значительно упрощается, если эксперимент проводят в присутствии нуклеофильного агента (N), способного конкурировать с водой. Тогда



$k_3 = k'_3[\text{H}_2\text{O}]$ и P_i ($i = 1, 2, 3$) — продукты.

$$v_i = k_{\text{кат},i}[\text{E}_0][\text{S}]/(K_M + [\text{S}]) \quad (459\text{д})$$

$$k_{\text{кат},1} = k_2(k_3 + k_4[\text{N}])/(k_2 + k_3 + k_4[\text{N}]) \quad (459\text{е})$$

$$k_{\text{кат},2} = k_2k_3/(k_2 + k_3 + k_4[\text{N}]) \quad (459\text{ж})$$

$$k_{\text{кат},3} = k_2k_4[\text{N}]/(k_2 + k_3 + k_4[\text{N}]) \quad (459\text{з})$$

$$K_M = K_S(k_3 + k_4[\text{N}])/(k_2 + k_3 + k_4[\text{N}]) \quad (459\text{и})$$

$$1/v_N = K_S(k_3 + k_4[\text{N}])/k_2k_3[\text{S}][\text{E}_0] + (k_2 + k_3 + k_4[\text{N}])/k_2k_3[\text{E}_0] \quad (459\text{к})$$

Так как известно, что $K_S/k_2 = K_M/k_{\text{кат}}$, и если нуклеофил отсутствует, то

$$1/v = K_S/k_2[\text{S}][\text{E}_0] + (k_2 + k_3)/k_2k_3[\text{E}_0] \quad (459\text{л})$$

и для определения констант можно использовать точку пересечения прямых в координатах $1/v_N$ (и $1/v$) — $1/[\text{S}]$. Две прямые линии в двойных обратных координатах пересекаются во втором квадранте. В отсутствие нуклеофила точка пересечения прямой с вертикальной осью определяется как $1/V_{\text{max}} = 1/k_{\text{кат}}[\text{E}_0]$, а с горизонтальной осью — как $-1/K_M$. Координаты точки пересечения двух прямых: $-1/K_S$ и $1/k_3[\text{E}_0]$. Расстояние между $1/V_{\text{max}}$ и $1/k_3[\text{E}_0]$ равно $1/k_2[\text{E}_0]$.

3.1.5. Анализ полной кинетической кривой реакции. Уравнение Михаэлиса — Ментен в исходном виде относится только к необратимым реакциям, т. е. к реакциям, где рассматривается только начальная скорость, а обратная реакция не проявляется из-за недостаточного количества продукта и не влияет на скорость реакции.

В случае необратимой реакции полную кинетическую кривую можно легко анализировать (для произвольного интервала времени t), интегрируя исходное уравнение Михаэлиса — Ментен. В этом

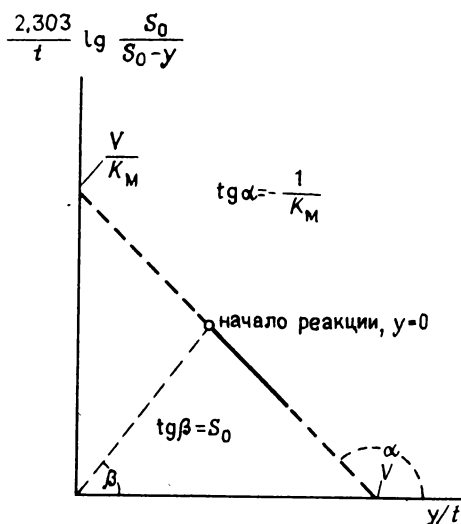


Рис. 29. Интегральное уравнение Михаэлиса — Ментен в координатах Фостера — Ниманна.

случае, следовательно, сохраняется предположение, что в ходе реакции образуется только один промежуточный фермент-субстратный комплекс. Так как для интервала времени t не ставится никаких ограничений, концентрация субстрата в момент анализа не может быть равной первоначально введенной его концентрации. Таким образом, также необходимо принимать во внимание изменение $[S]$ в ходе реакции.

Пусть S_0 — начальная концентрация субстрата, $(S_0 - y)$ — концентрация в момент времени t . Тогда, на основе исходного уравнения Михаэлиса — Ментен (если y — количество превращенного субстрата), мы можем написать

$$dy/dt = V_{\max}(S_0 - y)/(K_M + S_0 - y) \quad (\text{ср. с уравнением (445)}) \quad (460)$$

Взяв обратные величины и разделив переменные, интегрируем по y в пределах от 0 до y (V_{\max} обозначена как V):

$$Vt = \int_0^y [(K_M + S_0 - y)/(S_0 - y)] dy = y + K_M \ln[S_0/(S_0 - y)] \quad (461)$$

$$(2,303/t) \lg[S_0/(S_0 - y)] = V/K_M - (1/K_M)(y/t) \quad (462)$$

Таким образом, построив график зависимости левой части уравнения от y/t (координаты Фостера — Ниманна), получим прямую линию с наклоном $(-1/K_M)$, отсекающую на оси ординат отрезок (V/K_M) , а на оси абсцисс — отрезок V (рис. 29).

Уравнение (462) соответствует уравнению (504) (см. разд. 3.2.1.1). Однако интегральное уравнение можно также линеаризовать по-другому согласно (503):

$$t/2,303 \lg[S_0/(S_0 - y)] = y/2,303 V \lg[S_0/(S_0 - y)] + K_M/V \quad (462a)$$

или, согласно (502),

$$t/y = 2,303 K_M \lg[S_0/(S_0 - y)]/Vy + 1/V \quad (462b)$$

Если мы изучаем обратимую реакцию, необходимо обращать внимание на то, с каким временным интервалом мы имеем дело. В момент смешения фермента с субстратом начинается так называемая предстационарная фаза продолжительностью несколько микро- или миллисекунд, в течение которой образуются фермент-субстратные комплексы (один или несколько в зависимости от механизма реакции), соответствующие стационарному состоянию. Эту стадию мы обсудим ниже. Сейчас мы только отметим, что при изучении обратимых реакций на достаточно протяженных отрезках времени эта фаза не играет значительной роли, так как в этой фазе реакция не протекает с полной скоростью ни в одном из направлений.

Для реакции, идущей слева направо, фермент-субстратные комплексы, принимающие участие в реакции, достигают скоростьюлимитирующей концентрации только в конце предстационарной фазы. *Квазистационарное состояние*, в котором концентрации скоростьопределяющих фермент-субстратных комплексов приближаются к максимальным значениям концентраций в стационарном состоянии, длится несколько десятых долей секунды или секунды. Во время этой фазы скорость образования продукта (или расходования субстрата) практически линейная во времени. Теоретически здесь образования продукта еще не произошло, а практически его концентрация настолько мала, что скорость обратной реакции не влияет на скорость прямой. Эта линейная фаза называется начальной скоростью реакции, до сих пор мы только ее и принимали во внимание.

Реакция справа налево в следующей фазе также ускоряется из-за постепенного увеличения концентрации продукта (*переходное состояние*; наблюдаемая до сих пор линейность во времени исчезает). Эта фаза продолжается до тех пор, пока скорость реакции слева направо не становится равной скорости реакции справа налево. Это — состояние равновесия, а более точно, *динамического равновесия*, так как реакция непрерывно продолжается в обоих направлениях с одинаковой скоростью (рис. 30).

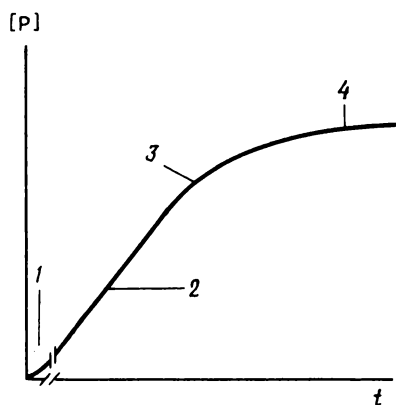
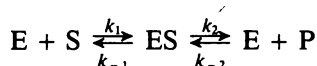


Рис. 30. Кривая накопления продукта в ходе реакции. 1 — предстационарное состояние, 2 — стационарное состояние, 3 — переходная фаза, 4 — динамическое равновесие.

Если механизм обратимой реакции представить реакцией



то общая скорость реакции в квазистационарном состоянии выражается как

$$v = (k_1 k_2 [S] - k_{-1} k_{-2} [P])[E]_T / [(k_{-1} + k_2) + k_1 [S] + k_{-2} [P]] \quad (463)$$

и

$$[ES] = (k_1 [S] + k_{-2} [P])[E]_T / (k_1 [S] + k_{-2} [P] + k_{-1} + k_2) \quad (464)$$

$$[E] = (k_{-1} + k_2)[E]_T / (k_1 [S] + k_{-2} [P] + k_{-1} + k_2) \quad (465)$$

Очевидно, что уравнения для начальной скорости реакций типа Михаэлиса, протекающих слева направо и справа налево, можно прямо получить из уравнения (463), подставляя значения $[P] = 0$ и $[S] = 0$.

Согласно международному соглашению, обозначим реакции слева направо и справа налево соответственно индексом f(forward) для прямой реакции и r(reverse) для обратной, константу Михаэлиса для субстрата — $K_{(S)}$, для продукта — $K_{(P)}$. Тогда

$$k_2 = V_f [E]_T, \quad k_{-1} = V_r [E]_T \quad (466, 467)$$

$$k_1 = (k_{-1} + k_2) / K_{(S)} \quad (468)$$

Подставив (466) и (467) в (468), получим

$$k_1 = (V_f + V_r) / K_{(S)} [E]_T \quad (469)$$

Аналогично можно получить

$$k_{-2} = (V_f + V_r) / K_{(P)} [E]_T \quad (470)$$

При динамическом равновесии общая скорость реакции равна 0, и из уравнения (463) прямо следует, что $k_1 k_2 [S] = k_{-1} k_{-2} [P]$. Так как константа равновесия общей реакции по определению равна $K_{\text{равн}} = [P]/[S]$, то

$$K_{\text{равн}} = k_1 k_2 / k_{-1} k_{-2} \quad (471)$$

В общем случае уравнение (463) можно записать как

$$v = [(\text{множитель}_1) [S] - (\text{множитель}_2) [P]] / [(\text{константа}) + (\text{коэф.}_S) [S] + (\text{коэф.}_P) [P]] \quad (472)$$

Отсюда

$$V_f = (\text{множитель}_1) / (\text{коэф.}_S) \quad (473)$$

$$V_r = (\text{множитель}_2) / (\text{коэф.}_P) \quad (474)$$

$$K_{(S)} = (\text{константа}) / (\text{коэф.}_S) \quad (475)$$

$$K_{(P)} = (\text{константа}) / (\text{коэф.}_P) \quad (476)$$

$$K_{\text{равн}} = (\text{множитель}_1) / (\text{множитель}_2) \quad (477)$$

Эти соотношения не особенно важны при выводе уравнений скорости для простых реакций, таких, как двусторонняя односубстратная реакция Михаэлиса — Ментен. Однако обобщенные соотношения могут оказать большую помощь при выводе уравнений скорости, а также соотношений между константами для более сложных (многосубстратных) реакций. Эти обобщенные соотношения следующие:

- 1) $K_{\text{равн}}$ всегда равна отношению двух множителей (ср. 477));
- 2) V_{max} в любом направлении равна отношению множителя для исследуемого направления к коэффициенту при концентрации субстрата в этом же направлении (ср. (473), (474)). В случае многосубстратных реакций последний член уравнения заменяют на другой, содержащий коэффициент при произведении концентраций всех субстратов (т. е. для трех субстратов А, В, С $V_f = (\text{множитель}_1) / (\text{коэф.}_{ABC})$);

3) Константа Михаэлиса равна коэффициенту при произведении концентраций всех субстратов (кроме субстрата, концентрация которого меняется), деленному на коэффициент при произведении концентраций всех субстратов реакции в данном направлении (ср. (475), (476)), или для трехсубстратной реакции:

$$K_{(A)} = (\text{коэф.}_{BC}) / (\text{коэф.}_{ABC})$$

$$K_{(B)} = (\text{коэф.}_{AC}) / (\text{коэф.}_{ABC})$$

$$K_{(C)} = (\text{коэф.}_{AB}) / (\text{коэф.}_{ABC})$$

При динамическом равновесии выполняется так называемое *соотношение Холдейна*, определяющее связь между общей константой равновесия ферментативной реакции и равновесными константами (константами диссоциации) и максимальными скоростями реакций в прямом и обратном направлении.

$$v_{0f} = V_f[S]/(K_S + [S]), \quad v_{0r} = V_r[P]/(K_P + [P]) \quad (478, 479)$$

При установлении динамического равновесия

$$v_{0f} = v_{0r} \quad (480)$$

$$\text{т. е. } V_f[S]/(K_S + [S]) = V_r[P]/(K_P + [P]) \quad (481)$$

После преобразования получим

$$V_f(K_P + [P])/V_r(K_S + [S]) = [P]/[S] = K_{\text{равн}} \quad (482)$$

$$\text{Так как } K_S = [E][S]/[ES], \text{ то } [S] = K_S[ES]/[E] \quad (483)$$

$$K_P = [E][P]/[EP] \text{ и } [P] = K_P[EP]/[E] \quad (484)$$

Подставляя (483) и (484) в (482) и вынося за скобку одинаковые множители, получаем

$$\begin{aligned} & V_f K_P (1 + [EP]/[E]) / V_r K_S (1 + [ES]/[E]) = \\ & = V_f K_P ([E] + [EP])/[E] / V_r K_S ([E] + [ES])/[E] = K_{\text{равн}} \end{aligned} \quad (485)$$

Если в реакции имеется только один комплекс, т. е. ES для реакции слева направо и EP для обратной реакции, то

$$[E]_T = [E] + [ES] = [E] + [EP] \quad (486)$$

Подставляя эти выражения, имеем

$$V_f K_P ([E]_T/[E]) / V_r K_S ([E]_T/[E]) = V_f K_P / V_r K_S = K_{\text{равн}} \quad (487)$$

Последнее уравнение называется *соотношением Холдейна* и выполняется только при динамическом равновесии.

Такая форма соотношения Холдейна называется *термодинамическим уравнением Холдейна* в отличие от *кинетического уравнения Холдейна*:

$$K_{\text{равн}} = V_f K_{(P)} / V_r K_{(S)} \quad (487a)$$

в котором константы диссоциации заменены на константы Михаэлиса.

Если реакция подчиняется кинетике Михаэлиса — Ментен и в прямом, и в обратном направлении, уравнение Холдейна имеет вид, аналогичный уравнениям (487) и (487a). В противном случае наблюдается другое соотношение между константами Михаэлиса (или

константами диссоциации), максимальной скоростью и общей константой равновесия в уравнении Холдейна. В некоторых случаях, как будет показано ниже, именно форма уравнения Холдейна позволяет выбрать возможный механизм реакции, так как различным механизмам реакции соответствуют различные виды соотношений.

3.1.6. С каждым активным центром фермента связывается более одной молекулы субстрата. Первоначальная форма уравнения Михаэлиса — Ментен (или Бриггса — Холдейна) справедлива только в том случае, если с каждым активным центром фермента связывается только одна молекула субстрата. Если это условие не выполняется, следует рассмотреть несколько возможных вариантов.

3.1.6.1. Молекулы субстрата не влияют на связывание друг друга. Связывание всех молекул субстрата с ферментом происходит одинаково эффективно, и связывание одной молекулы не влияет на связывание других. В этом случае опять возможны два варианта.

3.1.6.1.1. Одновременное связывание (уравнение Хилла). Субстраты одновременно связываются с активным центром фермента. Тогда



и скорость реакции подчиняется так называемому уравнению Хилла

$$v_0 = V[S]^n / (K_M + [S]^n) \quad (488)$$

При скорости, равной половине максимальной, концентрация субстрата равна $K_M^{1/n}$. Если построить зависимость $1/v$ от $1/[S]$, мы не получим прямой линии как в случае уравнения Михаэлиса — Ментен (подробно см. ниже в разд. 3.2.1.1). До сих пор экспериментально не обнаружено ферментативной реакции с $n > 2$. Если $n = 2$, то, построив график в координатах $\{1/v; 1/[S]^2\}$, получим прямую. Если n не целое число, а дробное (см. разд. 2.7.2), это означает либо то, что молекулы субстрата одновременно не связываются с молекулой фермента (см. разд. 3.1.6.1.2), либо то, что связывания одной молекулы субстрата влияет на эффективность связывания другой (см. аллостерические ферменты, разд. 3.8).

Чтобы получить значение n , уравнение (488) обычно трансформируют следующим образом:

$$v_0[S]^n + v_0K_M = V[S]^n \quad (489)$$

$$v_0 K_M = V[S]^n - v_0[S]^n = [S]^n(V - v_0) \quad (490)$$

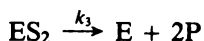
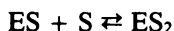
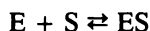
$$[S]^n(V - v_0) = v_0 K_M \quad (491)$$

$$v_0/(V - v_0) = [S]^n/K_M \quad (492)$$

$$\lg[v_0/(V - v_0)] = n \lg[[S]/K_M] \quad (493)$$

Построив зависимость $\lg[v_0/(V - v_0)]$ от $\lg[S]$, получают прямую линию с наклоном, равным n . Размерность константы K_M есть M^n , так как k_1 — константа скорости реакции $(n + 1)$ -го порядка. Подробнее см. в разд. 3.8.3.

3.1.6.1.2. Последовательное связывание. Молекулы субстрата последовательно связываются с активным центром. В этом случае кинетика реакции такая же, как в случае двухсубстратной реакции, так как характер кинетических уравнений не зависит от того, одинаковы ли два последовательно связывающихся субстрата или нет. Рассмотрим следующий механизм:



Пусть

$$K_S = [E][S]/[ES], \quad K_{S'} = [ES][S]/[ES_2] \quad (494, 495)$$

Обозначим константу скорости скоростьлимитирующей стадии k_3 , тогда

$$v_0 = k_3[ES_2] \quad (496)$$

Решая обычным способом, получаем

$$[E]_T = [E] + [ES] + [ES_2] = K_S K_{S'} [ES_2]/[S]^2 + \\ + K_{S'} [ES_2]/[S] + [ES_2] \quad (497)$$

$$\text{т. е. } v_0 = V[S]^2/(K_S K_{S'} + K_{S'}[S] + [S]^2) \quad (498)$$

Так как молекулы субстрата не влияют на связывание друг друга с ферментом, то $K_S = K_{S'}$, поэтому

$$v_0 = V[S]^2/(K_S^2 + K_S[S] + [S]^2) \quad (498a)$$

3.1.6.2. Связывание одной молекулы субстрата влияет на связывание другой. Возможен вариант, когда молекулы субстрата взаимно влияют на связывание их с ферментом ($K_S \neq K_{S'}$). Тогда снова возникают два случая.

3.1.6.2.1. Кажущееся ингибирование избытком субстрата. Связывание первой молекулы субстрата ингибирует связывание вто-

рой. В этом случае наблюдается кажущееся ингибирование избытком субстрата, кинетика которого будет детально рассмотрена в разд. 3.13.

3.1.6.2.2. Кажущаяся активация избытком субстрата. Связывание первой молекулы субстрата улучшает связывание второй. В этом случае наблюдается активация избытком субстрата (ср. разд. 3.13).

3.1.6.3. Аллостерия (коэффициент Хилла). С активным центром фермента связывается только одна молекула субстрата, но эффективность связывания субстрата на одном активном центре зависит от связывания субстрата на другом активном центре фермента. При наличии нескольких активных центров число n в уравнении Хилла (493) является дробным (оно называется *коэффициентом Хилла* n_H ; при наличии взаимодействия между активными центрами $n_H \neq n$, т. е. коэффициент Хилла отличается от стехиометрического). Это характерно для ферментов, построенных из субъединиц (подробнее см. в разд. 3.8.3).

3.2. ОДНОСУБСТРАТНЫЕ РЕАКЦИИ

При анализе ферментативных реакций, механизм которых известен, необходимо определить следующие константы: 1) входящие в уравнение скорости (V_{\max} и K_M); 2) диссоциации фермент-субстратного комплекса (K_S); 3) скорости отдельных стадий (k_1 , k_{-1} , k_2); 4) стехиометрический коэффициент n .

3.2.1. Определение константы Михаэлиса и максимальной скорости. Существует несколько методов определения констант, входящих в уравнение скорости для односубстратной реакции. Наиболее обычный способ — это линейаризация уравнения Михаэлиса — Ментен.

3.2.1.1. Линейаризация уравнения Михаэлиса — Ментен. Исходное уравнение Михаэлиса — Ментен является уравнением гиперболы, где одна из констант (V_{\max}) — асимптота к кривой. Другая константа (K_M), отрицательное значение которой определяется второй асимптотой, равна концентрации субстрата, необходимой для достижения $V_{\max}/2$. В этом легко убедиться, так как если $v_o = V_{\max}/2$, то

$$V_{\max}/2 = V_{\max}[S]/(K_M + [S]) \quad (499)$$

$$V_{\max}/V_{\max} = 1 = 2[S]/(K_M + [S]) \quad (500)$$

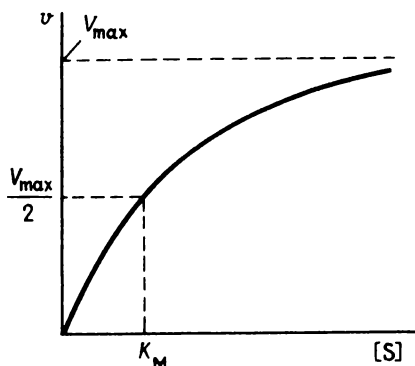


Рис. 31. «Кривая насыщения» в форме равнобочной гиперболы для одно-субстратной реакции типа Михаэлиса — Ментен.

$$K_M + [S] = 2[S], \text{ т. е. } [S] = K_M \text{ при } v_0 = V_{\max}/2 \quad (501)$$

(см. рис. 31)

Из кривой, построенной на основе исходного уравнения, графическим методом неудобно определять значения констант, потому что асимптоту к гиперболе невозможно провести с хорошей точностью. Единственная возможность графически определить константы — линейаризация исходного уравнения. Первую попытку линейаризации обычно относят к Лайнуиверу и Берку (*график Лайнуивера — Берка*), часто не считаясь с фактом, что метод впервые был предложен Вулфом и впервые описан Холдейном и Штерном в их учебнике по энзимологии. Эта линейаризация основана на простой обратной трансформации исходного уравнения

$$1/v_0 = (K_M + [S])/V_{\max}[S] = K_M/V_{\max}[S] + 1/V_{\max} \quad (502)$$

Это уравнение прямой. Построив график зависимости $1/v_0$ от $1/[S]$, получаем прямую линию с наклоном K_M/V_{\max} и пересекающую ось ординат в точке $(1/V_{\max})$, а ось абсцисс в точке $(-1/K_M)$ (рис. 32).

Уравнение можно также лианеаризовать в другой форме

$$[S]/v_0 = K_M/V_{\max} + [S]/V_{\max} \quad (503)$$

В этом случае следует строить зависимость $[S]/v_0$ от $[S]$. Наклон полученной прямой равен $1/V_{\max}$; отрезки, отсекаемые на осях ординат и абсцисс, равны (K_M/V_{\max}) и $(-K_M)$ соответственно (рис. 32). По имени автора этот график называют *графиком Хейнса*.

Третий возможный способ линейаризации — *метод Иди — Хофсти*, основанный на следующем уравнении:

$$v_0 = -(K_M v_0/[S]) + V_{\max} \quad (504)$$

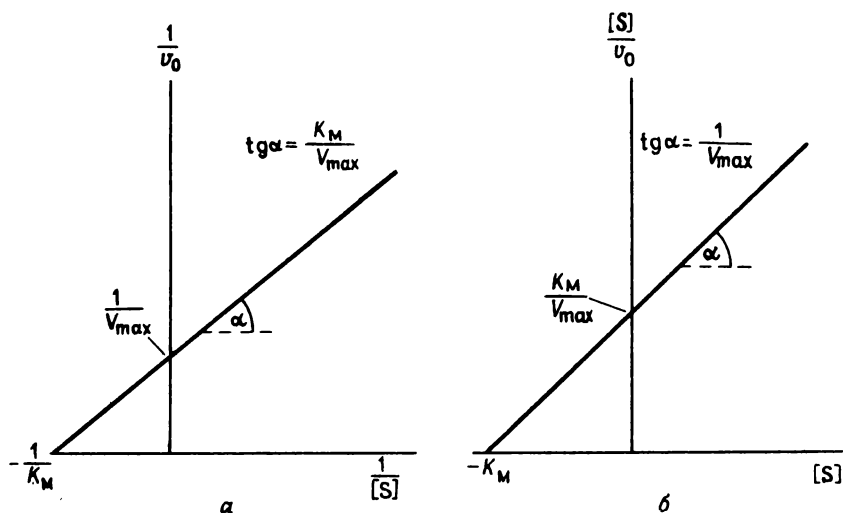


Рис. 32. Линеаризация уравнения Михаэлиса — Ментен. *а* — график Лайнуивера — Берка; *б* — график Хейнса.

Здесь строят зависимость v_0 от $v_0/[S]$. В результате получают прямую с наклоном $(-K_M)$; отрезок, отсекаемый на оси y , равен V_{\max} , а отрезок, отсекаемый на оси x равен V_{\max}/K_M (рис. 33)*.

Статистический анализ показал, что методы Иди — Хофсти и Хейнса дают более точные результаты, чем метод Лайнуивера — Берка. Причиной этого является то, что в графиках Иди — Хофсти и Хейнса и зависимые, и независимые переменные входят в величины, откладываемые на *обеих* осях координат.

Очень точный графический метод — «*прямой график*» *Эйзенталя и Корниш-Бовудена*. Каждой концентрации субстрата на кинетической кривой $[S_i]$ соответствует значение начальной скорости v_i ($i = 1, \dots, n$). Значения $[S_i]$ с обратным знаком откладывают на оси абсцисс, на оси ординат — значения v_i ; через полученные пары точек проводят прямые, пересекающие оси координат в точках $(-[S_i], 0)$ и $(0, v_i)$. Проекция общей точки пересечения прямых на горизонтальную ось равна K_M , на вертикальную ось равна V_{\max} (рис. 34, *а*);

* В каждом случае построение прямых по экспериментальным точкам проводят с использованием метода наименьших квадратов (см. приложение 3.14.2).

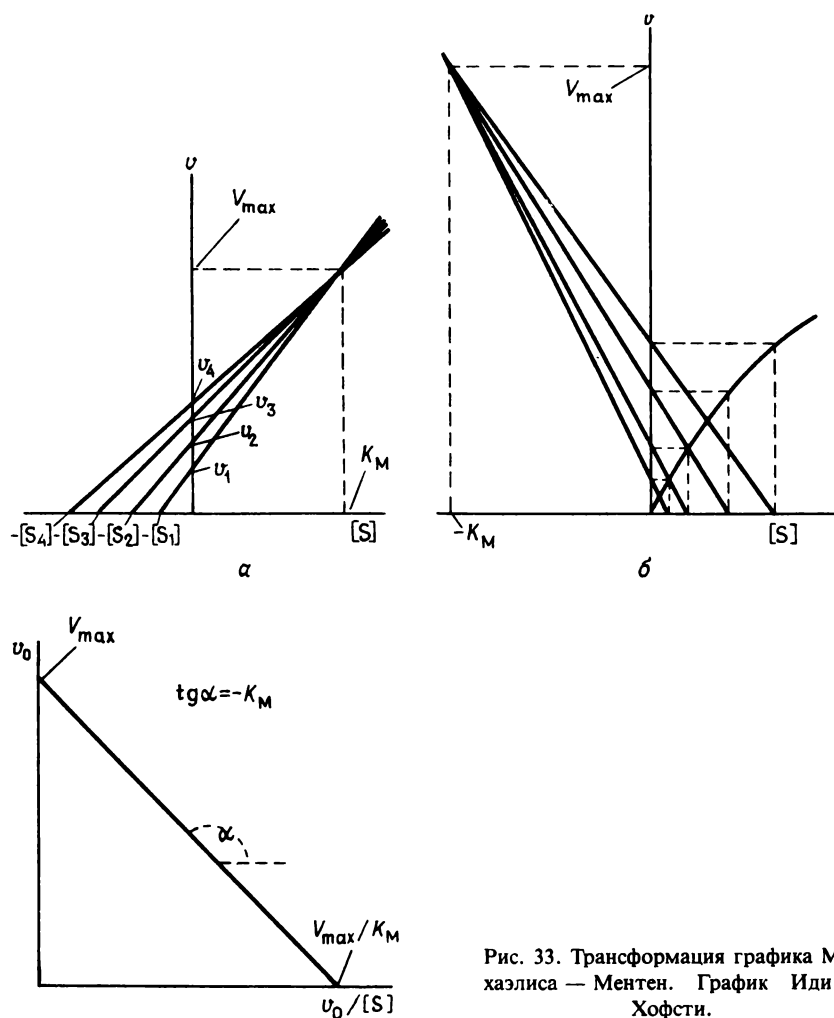


Рис. 33. Трансформация графика Михаэлиса — Ментен. График Иди — Хофсти.

при этом методе разброс экспериментальных данных учитывают с помощью нахождения медианы*.

Метод, в основном аналогичный описанному выше, — *метод де Мигуэл Марино и Тамари*, в котором прямые линии проводят через точки с координатами $([S_i], 0)$ и $(0, v_i)$, соответствующие каждой

* В случае непрерывных распределений медианой является место, ниже и выше которого находятся по 50% экспериментальных значений. Другими словами, значения, лежащие ниже и выше медианы, встречаются с вероятностью 0,5.

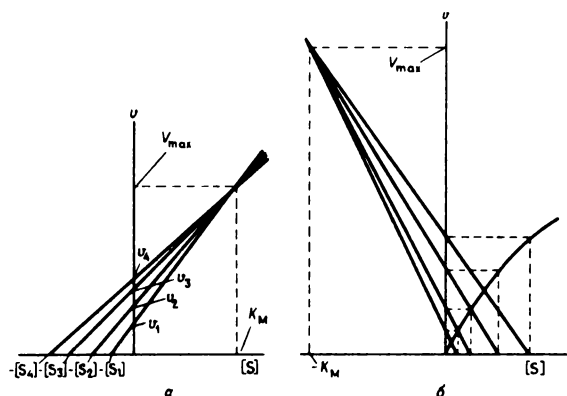


Рис. 34. Определение констант уравнения Михаэлиса — Ментен. *а* — метод Эйденталя и Корниш-Бодена; *б* — метод де Мигуэл Марино и Тамари.

паре значений $[S]_i$, v_i кинетической кривой. Прямые пересекаются во втором квадранте, точка их пересечения дает значения V_{\max} и $(-K_M)$ (рис. 34, б).

Для определения констант применяется также *метод Диксона*, согласно которому точку начала координат соединяют прямыми линиями с точками на кинетической кривой соответствующими значениям $V_{\max}/2$, $2V_{\max}/3$, $3V_{\max}/4$... Прямые отсекают на горизонтальной линии $v = V_{\max}$ одинаковые отрезки, равные K_M (рис. 35, а). Метод, конечно, предполагает, что величина V_{\max} точно известна или рассчитана с хорошим приближением, но в то же время он характеризует и точность определения V_{\max} . Отрезки, отсекаемые на горизонтальной линии, одинаковы по величине только в случае, если рассчитанное значение V_{\max} равняется его истинному значению. Если рассчитанное значение меньше истинного, то с увеличением $[S]$ получаемые значения K_M монотонно убывают, если больше истинного — возрастают. Если $[S]_0 \gg [E]_T$, расстояние между касательной к кинетической кривой при $[S] \rightarrow 0$ и осью ординат (на уровне V_{\max}) также равно K_M . Если это расстояние больше K_M , значит, концентрацией ES нельзя пренебречь, и тогда можно графически определить значения $[ES]$, $[E]$ и $[S]$, соответствующие любой точке на кинетической кривой, как видно из рис. 35, б.

Отрезок, отсекаемый касательной при $[S] = 0$ на уровне V_{\max} , равен $[E]_T$, поэтому, если известно значение $[E]_T$, можно проверить правильность проведения касательной. Расстояние между осью ординат и касательной дает значение $[ES]$, соответствующее значению $[S]$ в данной системе. Известно также, что $[E]_T - [ES] = [E]$.

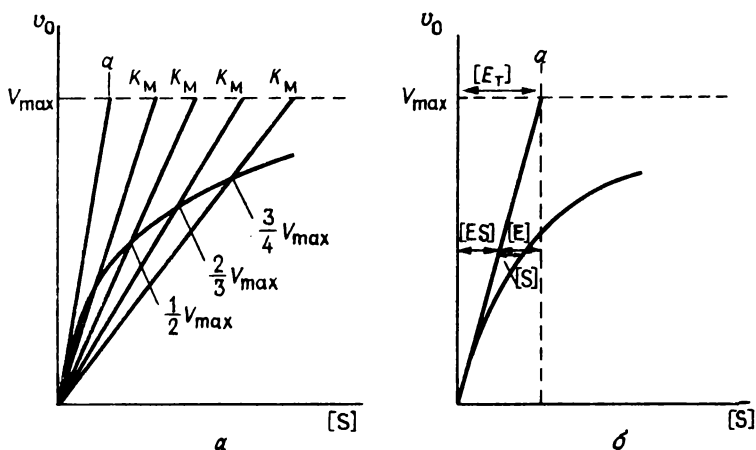


Рис. 35. Определение V_{\max} и K_M методом Диксона. (На левом рисунке буквой a обозначен отрезок, отсекаемый на уровне V_{\max} касательной, проведенной к зависимости v_0 от $[S]$ при $[S] \rightarrow 0$).

Концентрация свободного субстрата $[S]$ равна расстоянию между кривой насыщения и касательной.

Однако, каким бы методом ни определяли или рассчитывали значения K_M и V_{\max} , существует фундаментальная ошибка определения, вытекающая из самого характера этих методов. При уменьшении концентрации субстрата длительность стационарного участка, т. е. стадии, во время которой рост концентрации продукта происходит линейно во времени, также уменьшается. Следовательно, чем меньше концентрация субстрата, тем труднее определить начальную скорость реакции. Это видно из рис. 36, a , показывающего, что с уменьшением начальной концентрации субстрата зависимость концентрации продукта от времени постепенно отклоняется от прямой.

Если для всех концентраций субстрата удастся рассчитать стационарные значения v скорости ферментативной реакции, то, очевидно, мы получим теоретическую гиперболическую кривую (рис. 36, b , кривая 1). Если, однако, участок стационарности, соответствующий большим (насыщающим) концентрациям субстрата, используется для определения скорости реакции при всех концентрациях субстрата (что, к сожалению, общепринято), то могут получиться неверные результаты. Кинетическая кривая может искажаться, в некоторых случаях может получиться даже сигмоидная кривая (рис. 36, b , кривая 2).

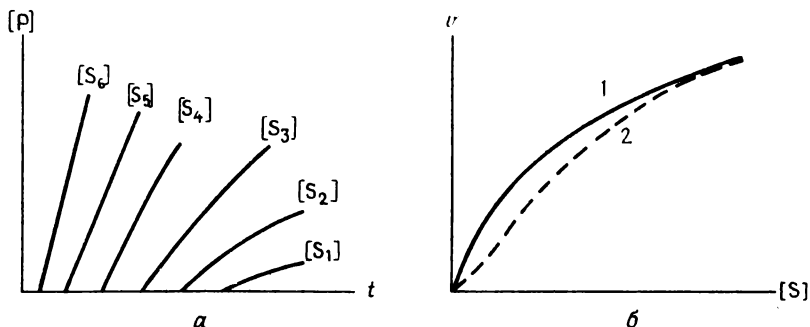


Рис. 36. Построение «кривой насыщения субстратом». *а* — скорости реакции при различных начальных концентрациях субстрата. Каждая кривая начинается с момента времени, равного 0; для наглядности кривые сдвинуты по оси *x* друг относительно друга; *б* — «кривая насыщения»: 1 — рассчитана из значений скорости в стационарном состоянии; 2 — рассчитана из значений скорости, полученных в момент времени, соответствующий стационарному состоянию только для насыщающих концентраций субстрата.

3.2.1.2. Нелинейная регрессия. Достаточно хорошую аппроксимацию можно получить только с помощью нелинейной регрессии, при которой параметры функции, являющейся наилучшим приближением к нашим экспериментальным результатам, вычисляются методом итераций с помощью компьютера. Дифференциальное уравнение, описывающее изменение во времени концентраций субстрата, свободного фермента, фермент-субстратного комплекса, следует представить в виде ряда посредством арифметических преобразований. Функцию $v = f([S])$ вычисляют, используя начальные значения K_M и V_{max} , оцененные на основе уравнения равнобочной гиперболы. Отклонение этой теоретической кривой от экспериментальных данных может быть определено с помощью метода наименьших квадратов*. Таким образом, значения K_M и V_{max} будут варьироваться до тех пор, пока отклонение теоретической кривой от экспериментальных точек не достигнет минимума. Наиболее точные значения для указанных параметров могут быть определены методом «складного ножа»**. Последовательность итераций приведена на рис. 37.

* См. приложение 3.14.2.

** См. приложение 3.14.4.

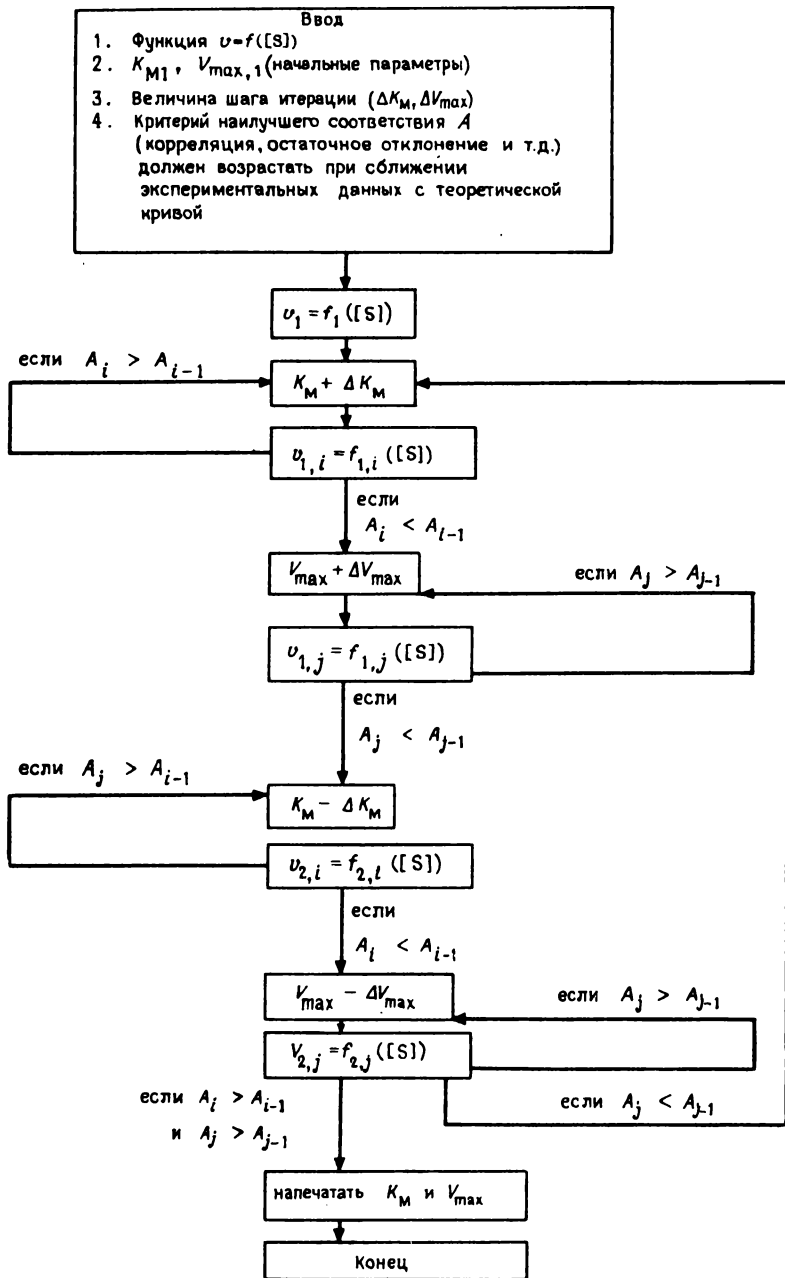


Рис. 37. Диаграмма итерационной аппроксимации констант уравнения Михаэлиса — Ментен.

3.2.1.3. Определение индивидуальных параметров. С помощью методов, описанных выше, одновременно определяются две константы: K_M и V_{\max} . Однако, если эти величины рассчитать независимо, то точность линейной регрессии может достичь точности нелинейной регрессии.

Мы уже увидели, что уравнение Михаэлиса — Ментен может быть линеаризовано различными способами.

Пусть $\Delta([S]/v) = [S_2]/v_2 - [S_1]/v_1$ и $\Delta[S] = [S_2] - [S_1]$, $\Delta v = v_2 - v_1$ и $\Delta(v/[S]) = v_2/[S_2] - v_1/[S_1]$, где v_1 и v_2 — начальные скорости реакции при $[S_1]$ и $[S_2]$ соответственно. Используя эти соотношения, линеаризованные уравнения Михаэлиса — Ментен (502)—(504) можно преобразовать к виду

$$y = Bx \quad (505)$$

В табл. VI приведены все возможные варианты раздельного определения K_M и V_{\max} .

Таблица VI. Определение параметров уравнения Михаэлиса — Ментен методом Фейси и Эндрени

Определение K_M			Определение V_{\max}		
y	B	x	y	B	x
$\Delta v \Delta(v/[S])$	$-K_M$	1	$\Delta[S]/\Delta([S]/v)$	V_{\max}	1
$\Delta(v/[S])/\Delta v$	$-1/K_M$	1	$\Delta([S]/v)/\Delta[S]$	$1/V_{\max}$	1
Δv	$-K_M$	$\Delta(v/[S])$	$\Delta[S]$	V_{\max}	$\Delta([S]/v)$
$\Delta(v/[S])$	$-1/K_M$	Δv	$\Delta([S]/v)$	$1/V_{\max}$	$\Delta[S]$
$[S_1][S_2]\Delta v$	$-K_M$	$[S_1][S_2]\Delta\left(\frac{v}{[S]}\right)$	$v_1v_2\Delta[S]$	V_{\max}	$v_1v_2\Delta\left(\frac{[S]}{v}\right)$
$[S_1][S_2]\Delta\left(\frac{v}{[S]}\right)$	$-1/K_M$	$[S_1][S_2]\Delta v$	$v_1v_2\Delta\left(\frac{[S]}{v}\right)$	$1/V_{\max}$	$v_1v_2\Delta[S]$

3.2.1.4. Анализ полной кривой накопления продукта. Для определения констант уравнения скорости можно также использовать полную кривую накопления продукта (т. е. зависимость концентрации продукта от времени от начала реакции до полного расходования субстрата). Похожий пример нам уже встречался при обсуждении интегрального уравнения Михаэлиса — Ментен. Тем не менее можно и прямо анализировать кривую накопления продукта, не прово-

для с ней никаких преобразований. Если механизм изучаемой ферментативной реакции нам не известен, уравнение данной кривой, согласно теореме Тейлора*, можно представить в виде ряда

$$[P] = b_0t + b_1t^2 + b_2t^3 + \dots \quad (506)$$

Дифференцируем по t

$$d[P]/dt = v = b_0 + 2b_1t + 3b_2t^2 + \dots \quad (507)$$

где b_0 — значение параметра b при $t = t_0$. Здесь константы b не имеют физического смысла, их нельзя прямо соотносить с кинетическими константами. Если, однако, реакция протекает по механизму Михаэлиса — Ментен, константы в уравнениях можно численно определить, аппроксимируя кривую с помощью нелинейной регрессии.

Кривые накопления продукта используют и для построения касательных и определения концентрации субстрата в какой-либо точке кривой (это лучше делать с помощью компьютера, так как только в таком случае достигается требуемая точность). Получив пары точек v , $[S]$ из одной кривой накопления продукта, можно построить кинетическую кривую и определить значения K_M и V_{\max} обычным методом.

Этот метод анализа можно использовать в качестве диагностического для определения причины несоответствия механизма реакции механизму Михаэлиса — Ментен; такими причинами могут являться ингибирование или активация избытком субстрата или ингибирование продуктом. Значения K_M и V_{\max} , определенные обычными методами (т. е. из начальных скоростей реакции, измеренных при различных концентрациях субстрата), и значения K_M и V_{\max} , рассчитанные из кинетических кривых, построенных на основе кривой накопления продукта, идентичны, только если ферментативная реакция следует простому механизму Михаэлиса — Ментен. В противном случае (т. е. если происходит ингибирование или активация субстратом или ингибирование продуктом) значения констант, определенных этими двумя методами, могут различаться на несколько порядков.

При отсутствии компьютера, снабженного цифровым преобразователем, который обеспечивает точное построение касательных к кривой, наклон касательной можно определить путем построения хорд, соединяющих точки S_1 и S_2 , соответствующие временам t_1 и

* См. приложение 3.14.7.

t_2 на кривой расходования субстрата. Наклон полученной прямой $(S_1 - S_2)/(t_1 - t_2)$ равен скорости реакции при некоторой «средней концентрации» субстрата S_3 , равной

$$S_3 = (S_1 - S_2)/\ln(S_1/S_2) \quad (508)$$

С использованием *метода двух хорд* можно вычислить начальную скорость реакции v_0 при $S = S_0$:

$$v_0 = S_0(S - S')/[SS'(1/v' - 1/v) + S_0(S/v - S'/v')] \quad (509)$$

где v и v' — скорости реакции, рассчитанные для S и S' с помощью построения хорд.

Если вместо расхода субстрата измерять накопление продукта в ходе реакции, то концентрация продукта, соответствующая хорде, пересекающей точки P_1, t_1 и P_2, t_2 , равна

$$P_3 = S_0(P_2 - P_1)/\ln[(S_0 - P_1)/(S_0 - P_2)] \quad (510)$$

График зависимости $\Delta P/t$ от ΔP представляет собой прямую. Константы можно графически определить по формулам $\Delta P/t = a - ab\Delta P$ (ср. с уравнением (504)), или $1/\Delta P = b + 1/at$ (ср. с (502)), или $t/\Delta P = 1/a + bt$ (ср. с (503)), где $a = dP/dt_0$ и $b = 1/V_{\max}$.

С использованием кривой расходования субстрата (или кривой накопления продукта) можно рассчитать *время полупревращения* для ферментативной реакции

$$V_{\max}t = ([S_0] - [S]) + K_M \ln([S_0]/[S]) \quad (\text{ср. с (461)})$$

откуда

$$t_{1/2} = K_M \ln 2 / V_{\max} + [S_0] / 2V_{\max} \quad (511)$$

Построив зависимость $t_{1/2}$ от $[S_0]$, получим прямую с наклоном $(1/2V_{\max})$, пересекающую ось ординат в точке $0,693 K_M / V_{\max}$. Если провести прямые через точки $(-[S_0]/2)$ на оси абсцисс и $([S_0]/2t_{1/2})$ на оси ординат, то они пересекутся в одной точке, имеющей координаты V_{\max} и $0,693 K_M$ (см. рис. 34, а).

3.2.1.5. Определение K_M и V_{\max} при низких концентрациях субстрата. Определение K_M и V_{\max} затрудняется для ферментов, которые подчиняются механизму Михаэлиса — Ментен, в тех случаях, когда измерения скорости реакции могут проводиться только при низких концентрациях субстрата (при $[S] < K_M$). Такая ситуация возникает при плохой растворимости, высокой стоимости, труднодоступности субстрата или в случае, если мы хотим проводить измерения при концентрациях субстрата, имеющихся в живой клетке.

Трудность заключается в том, что при $[S] \ll K_M$ кинетика реакции подчиняется кинетике первого порядка, и можно определить только соотношение V_{\max}/K_M , но не индивидуальные константы. Однако при некоторых условиях эту трудность можно преодолеть. Преобразуем уравнение (503):

$$[S] = v_0 K_M / (V_{\max} - v_0) \quad (512)$$

Дифференцируем по v_0

$$d[S]/dv_0 = V_{\max} K_M / (V_{\max} - v_0)^2 \quad (513)$$

Взяв обратные величины (что допустимо, так как v_0 — монотонная функция концентрации $[S]$), получим

$$dv_0/d[S] = (V_{\max} - v_0)^2 / V_{\max} K_M \quad (514)$$

$$\sqrt{dv_0/d[S]} = \sqrt{V_{\max}/K_M} - v_0/\sqrt{V_{\max} K_M} \quad (515)$$

Построив прямую в координатах $\sqrt{dv_0/d[S]} - v_0$, из наклона и отрезков, отсекаемых на осях координат, определим V_{\max} и K_M .

Уравнение (514) можно преобразовать следующим образом:

$$dv_0/d[S] = V_{\max} K_M - (v_0/K_M)(2 - v_0/V_{\max}) \quad (516)$$

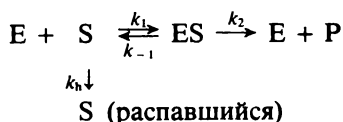
Если $v_0/V_{\max} \ll 2$, то уравнение (516) упрощается:

$$dv_0/d[S] = V_{\max} K_M - 2v_0/K_M \quad (517)$$

Построив зависимость величины $dv_0/d[S]$ (которую с помощью компьютера можно получить из единственной кривой расходования субстрата в ходе реакции) от v_0 , получим прямую с наклоном $(-2/K_M)$, отрезком, отсекаемым на вертикальной оси, равным V_{\max}/K_M , и отрезком, отсекаемым на горизонтальной оси, равным $V_{\max}/2$. Точность таких расчетов достаточно высока, и линейность наблюдается только в том случае, если значения v_0 лежат между $V_{\max}/3$ и $V_{\max}/5$.

3.2.1.6. Кинетика Михаэлиса — Ментен при условии инактивации субстрата в ходе реакции. В некоторых случаях субстрат обладает низкой устойчивостью и гидролизуется со скоростью, сравнимой со скоростью ферментативной реакции. Хотя скорость гидролиза может быть определена независимо, остается неизвестным, влияет ли на нее присутствие фермента. Поэтому лучше выбрать метод, позволяющий одновременно определить параметры ферментативной реакции и константу скорости разложения субстрата. Механизм

этой реакции представим следующим образом:



где k_h — константа скорости гидролиза субстрата первого порядка. Концентрация субстрата в момент времени t равна

$$[\text{S}]_t = [\text{S}_0] \exp(-k_h t) \quad (518)$$

и скорость ферментативной реакции определяется выражением

$$v_0 = V_{\max} [\text{S}_0] \exp(-k_h t) / (K_M + [\text{S}_0] \exp(-k_h t)) \quad (519)$$

Взяв обратные величины в обеих частях уравнения, получим

$$1/v_0 = K_M/V_{\max} [\text{S}_0] \exp(-k_h t) + 1/V_{\max} \quad (520)$$

Если зависимость скорости реакции от концентрации субстрата строят на основании экспериментальных данных, полученных для фиксированного интервала времени после растворения субстрата (т. е. $t = \text{const}$), то в координатах $\{1/v_0; 1/[\text{S}_0]\}$ получают прямую, отсекающую на оси ординат отрезок, равный $1/V_{\max}$.

Уравнение (519) можно привести к виду

$$v_0/(V_{\max} - v_0) = ([\text{S}_0]/K_M) \exp(-k_h t) \quad (521)$$

Логарифмируем:

$$\ln[v_0/(V_{\max} - v_0)] = \ln([\text{S}_0]/K_M) - k_h t \quad (522)$$

Если V_{\max} известно, то для определения K_M и k_h можно использовать линейный график в координатах $\{\ln[v_0/(V_{\max} - v_0)], t\}$. Таким образом, мы получили метод для одновременного определения констант ферментативной реакции и константы скорости гидролиза субстрата.

3.2.1.7. Характеристика эффективности действия фермента. Какой бы метод мы не использовали для расчета констант уравнения, описывающего активность фермента, действие которого подчиняется кинетике Михаэлиса — Ментен, эти константы характеризуют только данный фермент и определяются только природой фермента. Однако V_{\max} (или k_2) и K_M сами по себе однозначно не характеризуют эффективность действия фермента, гораздо большую информацию об этом дает их отношение k_2/K_M . Если данный фер-

мент — плохой катализатор, то V_{\max} (и k_2) очень мала, таким образом, k_2 пренебрежимо мала по сравнению с k_{-1} , и $k_2/K_M = k_2k_1/k_{-1} = k_2/K_S$, и это отношение является нижним пределом эффективности действия фермента. Если V_{\max} (и k_2) очень велика, то можно пренебречь значением k_{-1} , и $k_2/K_M = k_2k_1/k_2 = k_1$. Таким образом, значение k_1 представляет собой верхний предел эффективности действия фермента, в общем случае k_1 равняется скорости диффузии (10^9 — 10^{10} моль $^{-1}$ ·с $^{-1}$). Оба предела эффективности являются кажущимися константами второго порядка.

Аналогично, так называемый «фактор увеличения чувствительности» (S_f) также является мерой эффективности фермента, отражающей относительное изменение активности фермента при изменении концентрации субстрата.

Если $v_0/V_{\max} = F$, то

$$S_f = [(F_f - F_i)/F_i]/([S]_f - [S]_i)/[S]_i = (\Delta F/F)/(\Delta[S]/[S]) \quad (523)$$

(индексы i и f обозначают начальные и конечные значения величин).

Если изменение концентрации субстрата (ΔS) бесконечно мало, мы можем записать

$$S_f, \Delta S \rightarrow 0 = d \ln F / d \ln [S] \quad (524)$$

Для ферментативной реакции, подчиняющейся кинетике Михаэлиса — Ментен, справедливо

$$S_f = 1/(1 + [S]_f/K_M) \quad (525)$$

т. е. S_f зависит только от константы Михаэлиса.

Если с каждой молекулой фермента связывается больше одной молекулы субстрата, т. е. коэффициента Хилла $n_H > 1$ (см. разд. 3.1.6.3), то

$$S_f = n_H/[1 + ([S]/[S]_{0,5})^{n_H}] \quad (526)$$

где $[S]_{0,5}$ — концентрация субстрата, необходимая для достижения $V_{\max}/2$.

3.2.1.8. Определение количества аминокислотных остатков, необходимых для проявления активности фермента. В проявлении каталитической активности фермента участвуют многие аминокислотные остатки, которые либо связывают, либо трансформируют субстрат. Поэтому, для того чтобы охарактеризовать фермента-

тивную реакцию кроме определения кинетических констант уравнения скорости, часто необходимо измерять количество боковых цепей аминокислотных остатков, непосредственно принимающих участие в реакции.

Предположим, что имеется специфический реагент, который направленно взаимодействует только с остатками определенного типа и может модифицировать n аминокислотных остатков исследуемого белка. Из этих n остатков p реагируют с одинаковой скоростью, но отличающейся от скорости реакции остальных $(n - p)$ остатков. Из p остатков для проявления активности фермента необходимы i остатков. Пусть X_1 и X_2 — доли остатков с различной реакционной способностью, которые остались непрореагировавшими с момента времени t от начала реакции. Число модифицированных остатков равно

$$m_0 = n - pX_1 - (n - p)X_2 \quad (527)$$

В присутствии субстрата с момента времени t из i боковых цепей остается j остатков (субстрат предохраняет их от модификации реагентом), и $j \leq i$, $X_S \neq X_1$. В присутствии субстрата

$$m_S = n - jX_S - (p - j)X_1 - (n - p)X_2 \quad (528)$$

и в момент времени t

$$\Delta m = m_0 - m_S = j(X_S - X_1) \quad (529)$$

Если предположить, что при модификации i необходимых для катализа групп фермент теряет активность, то остаточные активности в момент времени t (a_0 и a_S) равны

$$a_0 = X_1^i, \quad a_S = X_S^j X_1^{i-1} \quad (530, 531)$$

$$\Delta m = j[a_S^{1/j} a_0^{(1/i) - (1/j)} - a_0^{1/i}] \quad (532)$$

На основе этих уравнений имеем, например,

$$\begin{aligned} \Delta m &= a_S - a_0, & \text{если } i &= j = 1 \\ \Delta m &= 2(\sqrt{a_S} - \sqrt{a_0}), & \text{если } i &= j = 2 \\ \Delta m &= (a_S - a_0)\sqrt{a_0}, & \text{если } i &= 2 \text{ и } j = 1 \end{aligned} \quad (533)$$

Таким образом, Δm является функцией $[S]$ и времени от начала реакции. Изменяя правильным образом $[S]$ и t , можно определить количество аминокислотных остатков, необходимых для катализа.

3.2.2. Определение константы диссоциации и стехиометрического коэффициента фермент-субстратного комплекса. Знание константы

диссоциации фермент-субстратного комплекса дает два важных преимущества. Во-первых, мы можем узнать, одинаковы ли величины K_M и K_S , и отсюда определить наличие в ходе реакции быстро устанавливающегося равновесия или стационарного состояния. Во-вторых, если известно K_S , то мы имеем независимую величину для отношения констант k_{-1} и k_1 , что позволяет определить константы скорости отдельных стадий.

Определение константы диссоциации фермент-субстратного комплекса представляет трудность только в случае односубстратной реакции из-за того, что реакция (разложение субстрата) начинается сразу же после добавления субстрата к ферменту. Поэтому эксперимент следует проводить в условиях, в которых либо фермент неактивен, либо используется аналог субстрата, не разлагаемый ферментом. Однако оба этих метода имеют серьезные недостатки, и ни один из них не дает уверенности, что измеренное значение на самом деле равно константе диссоциации активного фермент-субстратного комплекса.

Задача значительно упрощается в случае реакции с участием двух и более субстратов, где фермент-субстратный комплекс, если он образовался, не разлагается в отсутствие другого субстрата (или субстратов). Измерение константы диссоциации комплекса фермента с лигандом так же просто для ингибиторов, активаторов, аллостерических эффекторов, так как лиганд не разлагается при взаимодействии с ферментом. Проблему определения константы диссоциации комплекса фермент — лиганд рассмотрим в этом разделе, где она впервые возникла.

Существует несколько методов определения константы диссоциации.

3.2.2.1. Кинетический метод. Пусть $[S]_b$ — концентрация связанного лиганда (например, субстрата), которая равна количеству занятых центров связывания, и n — число идентичных независимых центров связывания на молекуле фермента. Отсюда следует, что скорость v пропорциональна $[S]_b$ и V_{\max} пропорциональна $n[E]_T$. Это позволяет преобразовать линеаризованные уравнения Михаэлиса — Ментен к уравнениям, подходящим для исследования связывания лиганда.

Преобразуя соотношение Лайнуивера — Берка (502), получаем уравнение Клотца

$$1/[S]_b = (K_S/n[E]_T)(1/[S]_f) + 1/n[E]_T \quad (534)$$

где $[S]_f$ — концентрация свободного лиганда. Уравнение (534) мож-

но привести к виду

$$[E]_T/[S]_b = K_S/n[S]_f + 1/n \quad (535)$$

Аналогично уравнение Иди — Хофсти (504) превращается в уравнение Скэтчарда, описывающее связывание лиганда:

$$[E]_b/n[E]_f = [S]_T/K_S - [E]_b/K_S \quad (536)$$

где $[E]_b$ — концентрация занятых центров связывания, т. е. связанного субстрата, $n[E]_f$ — концентрация свободных центров связывания, $[S]_T$ — общая концентрация субстрата. Так как $[E]_b$ пропорционально $[S]_b$, из (535) получаем

$$[S]_b/[S]_f = n[E]_T/(K_S + [S]_f) \quad (537)$$

Линеаризованное уравнение Хейнса (503) преобразуется в случае связывания лиганда следующим образом:

$$[S]_f/[E]_b = K_S/n[E]_T + [S]_f/n[E]_T \quad (538)$$

Первое условие, определяющее выбор метода определения K_S , — это вызываемое связыванием субстрата (или любого лиганда) с ферментом изменение, с помощью которого можно следить за концентрациями комплекса, связанного лиганда, свободного лиганда или субстрата.

Если в ходе образования комплекса фермент — лиганд изменяется некоторый оптический параметр (например, поглощение света, флуоресценция, поляризации флуоресценции, оптическая дисперсия света, рассеяние света и т. п.) обычно рекомендуется использовать графики Стокелла или Скэтчарда.

Предположим сначала, что при образовании комплекса ES происходит изменение поглощения света и значение $\Delta\epsilon$ при насыщении — $\Delta\epsilon_{\max}$. Пусть d — молярная концентрация S , n — число молекул S , связанных с ферментом, K — константа диссоциации, p — член $(\Delta\epsilon/\Delta\epsilon_{\max}) [E]$, где $[E]$ — молярная концентрация свободного фермента. Согласно соотношению Стокелла (полученному при дальнейшем преобразовании уравнения Клотца (534)):

$$d/p = K([E] - p) + n \quad (539)$$

Построив график зависимости d/p от $1/([E] - p)$, получим прямую, которая пересекает горизонтальную ось в точке n , с наклоном, равным K (рис. 38,а).

Чтобы воспользоваться графиком Скэтчарда, необходимо каким-либо образом определить \bar{v} , относительное количество связан-

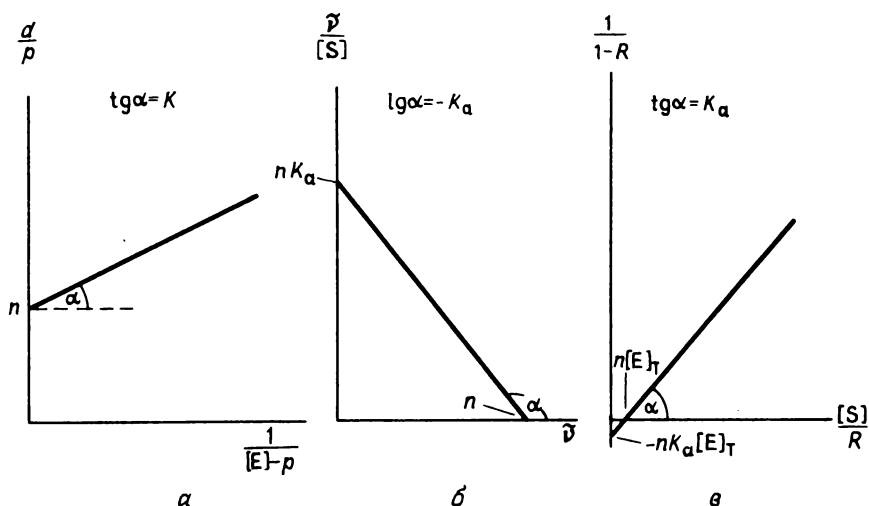


Рис. 38. Определение константы диссоциации и стехиометрического коэффициента. *а* — график Стокелла; *б* — график Скэтчарда (известно относительное количество связанного лиганда); *в* — график Скэтчарда (известна относительная концентрация комплекса фермент — кофермент).

ных молекул ($\bar{\nu}$ изменяется от 0 до 1). Если n — число молекул субстрата, связанных с одной молекулой белка, а K_a — *константа ассоциации* (величина, обратная константе диссоциации), тогда, преобразуя уравнение (537), получим

$$\bar{\nu} = nK_a[S]/(1 + K_a[S]) \quad (540)$$

$$(\bar{\nu} + \bar{\nu} K_a[S])/[S] = nK_a \quad (541)$$

$$\bar{\nu}/[S] = K_a(n - \bar{\nu}) \quad (542)$$

Зависимость $\bar{\nu}/[S]$ от $\bar{\nu}$ представляет собой прямую с наклоном $(-K_a)$, отсекающую на вертикальной оси отрезок, равный (nK_a) , а на горизонтальной оси — отрезок, равный n (рис. 38,б).

Если можно измерить долю фермента, связанного с лигандом (т. е. $R = [ES]/[E]_T$), то, как следует из уравнения

$$1/(1 - R) = K_a[S]/R - nK_a[E]_T \quad (543)$$

зависимость $1/(1 - R)$ от $[S]/R$ — прямая линия с наклоном K_a ; точки пересечения с осями ординат и абсцисс равны $-nK_a[E]_T$ и $n[E]_T$ соответственно (рис. 38,в). В этом случае $[S]$ — общая концентрация субстрата.

Уравнения (542) и (543) представляют собой линейное соотноше-

ние, из которого можно определить константу диссоциации и стехиометрический коэффициент только при выполнении следующих условий: а) у молекулы фермента имеется только один центр связывания, $n = 1$; б) насыщение фермента лигандом определяется с достаточной точностью; в) несмотря на разброс экспериментальных точек, наблюдается прямолинейная зависимость в выбранных координатах; г) существует более одного центра связывания лиганда, но все они эквивалентны и независимы.

а) В случае одного центра связывания применение вышеописанных уравнений не вызывает затруднений, так как константа диссоциации в уравнении для связывания лиганда определяется таким же образом, как и константы уравнения Михаэлиса — Ментен, из параметров линеаризованных форм уравнения Михаэлиса — Ментен.

б) Во многих случаях бывает сложно измерить физический параметр, показывающий насыщение фермента лигандом (например, максимальное поглощение света, флуоресценцию, тушение флуоресценции и т. д.). Даже в присутствии десятикратного избытка лиганда по сравнению с количеством центров связывания разность между полученным значением и максимальным может быть настолько велика, что определение максимального значения экстраполяцией приводит к неточным результатам. При использовании метода Скэтчарда отклонение на 1% от максимального (насыщающего) значения (измеряемого методами поглощения света, флуоресценции и т. д.) может привести к искажению графика, получению выпуклых или вогнутых кривых для белков, содержащих один центр связывания или несколько идентичных и независимых центров. Из-за искажения графика можно ошибочно предположить существование нескольких различных центров связывания или нескольких идентичных, но взаимодействующих центров.

в) Любой экспериментальный метод дает некоторый разброс получаемых данных. В координатах Скэтчарда через экспериментальные точки пытаются провести прямую, если не замечено невооруженным глазом явного отклонения от прямой. Точка пересечения прямой, построенной по данному методу, с осью абсцисс в принципе показывает количество эквивалентных и независимых центров связывания. Однако необходимо тщательно проверять правильность аппроксимации полученных точек с помощью прямой. Если построить зависимость концентрации связанного лиганда от логарифма концентрации свободного лиганда, то получается сигмоидная кривая с перегибом при $n/2$. Если аппроксимация полученных данных с помощью прямой недопустима, то значение n , полученное из отрезка на оси абсцисс, может оказаться

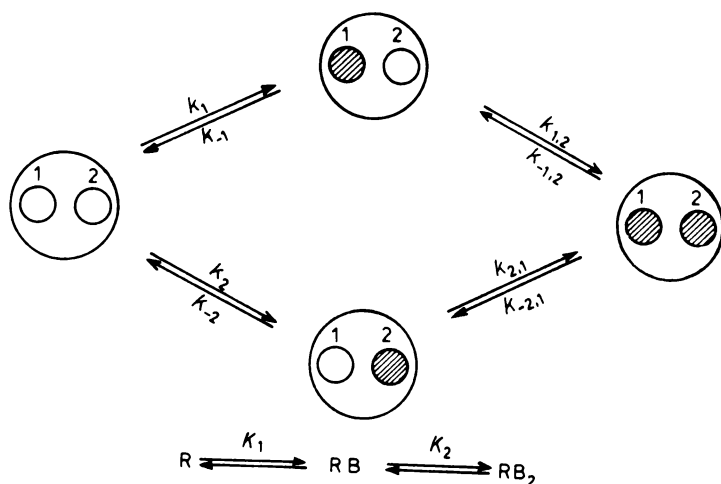


Рис. 39. Модель связывания лигандов с двухвалентным рецептором. R — рецептор, B — лиганд, k_i — константы скорости, K_i — константы равновесия.

на несколько порядков меньше величины, рассчитанной из точки перегиба. В некоторых случаях рассчитанная величина n бывает так высока, что в исследуемом интервале концентраций точка перегиба не достигается. Если через экспериментальные точки нельзя провести прямую, то методом Скэтчарда невозможно определить точку пересечения плавной кривой с осью абсцисс (в принципе кривая асимптотически приближается к оси абсцисс при бесконечном увеличении концентрации свободного лиганда).

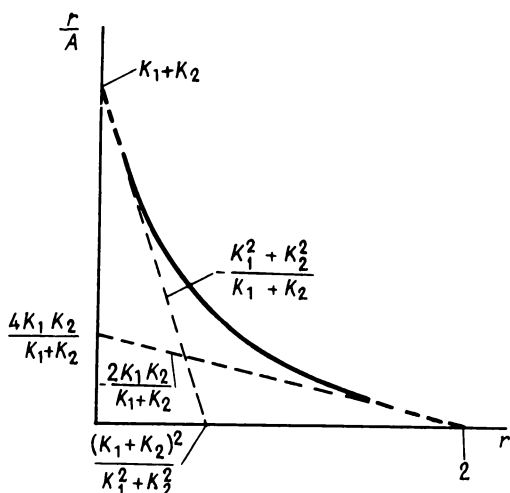
г) Если в молекуле рецептора имеется несколько центров связывания, но они эквивалентны и независимы, то при выполнении условий «б» и «в», точка пересечения прямой в координатах уравнения (542) с осью абсцисс дает число центров связывания на одну молекулу, а из наклона прямой можно рассчитать константу диссоциации.

В общем случае связывание лигандов подчиняется следующему уравнению:

$$[B] = nK_a[F][R]/(1 + K_a[F]) \quad (544)$$

(ср. с уравнениями (333) и (433), где $[B]$ — концентрация молекул лиганда, связанных с белком, $[R]$ — молярная концентрация рецептора, $[F]$ — концентрация свободного лиганда. Однако это уравнение нельзя применять, если у молекулы рецептора имеется

Рис. 40. Графический анализ связывания лиганда с двухвалентным рецептором. Центры связывания эквивалентны и независимы. r — количество молей лиганда, связанного с белком-рецептором, A — молярная концентрация несвязанного лиганда, K_i — индивидуальные константы ассоциации.



несколько центров связывания. В случае двухвалентного рецептора

$$[B] = K_1[F][R]/(1 + K_1[F]) + K_2[F][R]/(1 + K_2[F]) \quad (545)$$

Схема связывания лиганда с двухвалентным рецептором представлена на рис. 39. Здесь мы можем предположить наличие двух типов механизма связывания.

1. Лиганды не влияют на связывание друг друга (т. е. $k_1k_{1,2} = k_2k_{2,1}$). Таким образом, $K_1 = k_1 + k_2$ и $K_2 = k_1k_{1,2}/(k_1 + k_2)$; полученной кривой в координатах Скетчарда соответствуют две прямые с разными наклонами (рис. 40). Из этой кривой можно рассчитать общее количество центров связывания, а также индивидуальные константы диссоциации, характеризующие отдельные центры связывания. В случае если $n > 2$, невозможно определить долю различных центров связывания от общего количества центров.

2. Связывание одной молекулы лиганда влияет на связывание другой (ингибирует или способствует связыванию), т. е. $k_1k_{1,2} \neq k_2k_{2,1}$. Тогда K_1 и K_2 в уравнении (545) нужно заменить на K'_1 и K'_2 , которые, однако, уже являются не константами ассоциации, а, согласно уравнению (546), сложными комбинациями констант:

$$\begin{aligned} K'_{1,2} &= K_1/2 \pm (1/2)\sqrt{K_1^2 - 4K_1K_2} = \\ &= (k_1 + k_2)/2 \pm \sqrt{(k_1 + k_2)^2 - 4k_1k_{1,2}} \end{aligned} \quad (546)$$

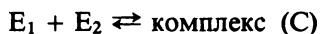
Таким образом, в этом случае гиперболу, как на рис. 40, уже нельзя представить в виде двух прямых линий, из которых рассчитываются константы диссоциации и стехиометрический коэффициент.

Если центры связывания лигандов взаимодействуют друг с другом, даже в случае идентичных центров не получается прямой линии или гиперболы, которую можно представить в виде двух прямых. Причиной этого является то, что, если $k_1 = k_2 = k_I$ и $k_{1,2} = k_{2,1} = k_{II}$ и, кроме того, $K_1 = 2k_I$ и $K_2 = k_{II}/2$, то

$$K'_{1,2} = k_I \pm \sqrt{k_I^2 - k_I k_{II}} \quad (547)$$

Если имеется свыше двух центров связывания, соотношения еще более сложные, и их, естественно, тоже нельзя использовать для определения констант диссоциации и стехиометрических коэффициентов.

Определить константу диссоциации и стехиометрический коэффициент можно по *графику Ву-Хэммеса*. Схема реакции комплексобразования между белками:



Константа диссоциации для этой схемы:

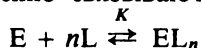
$$K = [E_1]_f [E_2]_f / [C] = [E_1]_f ([E_2]_T - n[C]) / [C] \quad (548)$$

где индекс f соответствует концентрации свободных E_1 и E_2 при равновесии, индекс T — общим концентрациям. Зависимость $[E_2]_T / [C]$ от $1/[E_1]_f$ представляет собой прямую, так как (548) можно преобразовать к виду

$$K/[E_1]_f = [E_2]_T / [C] - n \quad (549)$$

Наклон прямой равен K , а отрезок, отсекаемый на оси ординат, n (рис. 41,а). По существу, это уравнение — преобразованная форма уравнения (539).

Во всех до сих пор рассматриваемых методах необходимо было измерять количество связанного или (и) свободного лиганда или (и) количество образовавшегося комплекса. В некоторых случаях мы не можем измерить эти величины, а можем определить только концентрацию образовавшегося комплекса. Тогда применяют *метод непрерывной вариации Джоба*. Если все лиганды связываются с рецептором по одностадийному механизму или взаимодействие между центрами связывания так велико, что после связывания первой молекулы лиганда мгновенно связываются все остальные, т. е.



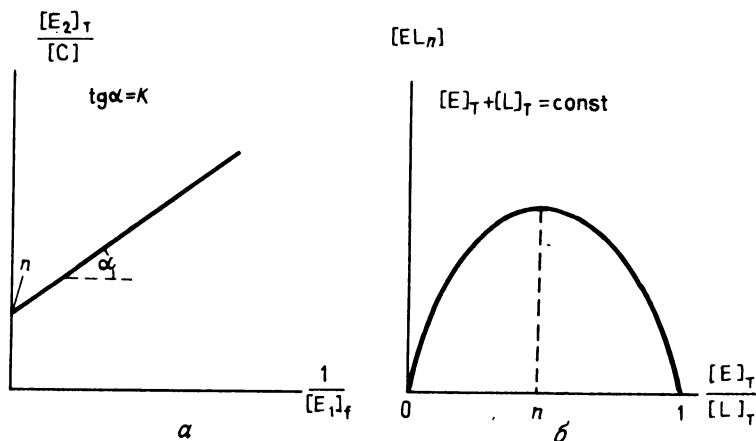


Рис. 41. Определение константы диссоциации и стехиометрического коэффициента. *a* — график Ву — Хэммса; *б* — график Джоба, $V_E + V_L = \text{const}$, где V_E и V_L — объемы раствора фермента и лиганда данной концентрации соответственно.

тогда

$$K = [E][L]^n/[EL_n] = ([E]_T - [EL_n])([L]_T - n[EL_n])^n/[EL_n] \quad (550)$$

$$[E]_T + [L]_T \equiv [C]_T; [E]_T/[C]_T \equiv X; [L]_T/[C]_T \equiv Y; X + Y = 1 \quad (551)$$

$$[E]_T = [C]_T X = [C]_T(1 - Y); [L]_T = [C]_T Y = [C]_T(1 - X) \quad (552)$$

Подставляем (552) в (550):

$$K[EL_n] = ([L]_T X - [EL_n])([C]_T(1 - X) - n[EL_n])^n \quad (553)$$

Дифференцируем (553) по X :

$$\begin{aligned} K(d[EL_n]/dX) &= ([L]_T X - [EL_n])n([C]_T(1 - X) - n[EL_n])^{n-1}(-[C]_T - n(d[EL_n]/dX)) + \\ &+ [[C]_T(1 - X) - n[EL_n]]^n([C]_T - d[EL_n]/dX) \end{aligned} \quad (554)$$

Функция имеет максимум, если $d[EL_n]/dX = 0$, т. е.

$$[C]_T^2 \{1 - (n + 1)/X\} [[C]_T(1 - X) - n[EL_n]]^{n-1} = 0 \quad (555)$$

Мольные доли фермента и лиганда в точке максимума:

$$X_{\max} = 1/(n + 1); Y_{\max} = 1 - X_{\max} = n/(n + 1) \quad (556)$$

Стехиометрический коэффициент равен отношению двух мольных долей

$$Y_{\max}/X_{\max} = n \quad (557)$$

Таким образом, построив график зависимости концентрации комплекса $[EL_n]$ от изменяемой величины $[E]_T/[L]_T$ (при постоянной величине $[E]_T + [L]_T$), получают колоколообразную кривую с максимумом в точке n (рис. 41,б). Если $X \rightarrow 0$, то K можно рассчитать из наклона кривой, так как

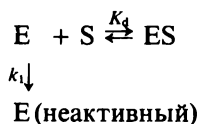
$$(d[EL_n]/dX)_{X \rightarrow 0} = [C]_T^{n+1}/(K + [C]_T^n) \quad (558)$$

Если молекулы лиганда связываются с рецептором последовательно одна за другой, а центры связывания независимы, точка пересечения прямых, построенных при $X \rightarrow 0$ и $Y \rightarrow 0$, даст значение n . Тем не менее этот метод верен только при условии $[C]_T \gg K$. Если при последовательном связывании лиганда центры связывания взаимозависимы, для определения n этот метод применять нельзя.

3.2.2.2. Защитное действие лиганда. Отдельный класс методов определения констант диссоциации составляют методы, в которых лиганд защищает фермент от разрушения. В некоторых (исключительных) случаях лиганд усиливает это разрушение, что также можно использовать для определения констант диссоциации, как и защитный эффект.

С целью определения константы диссоциации следует измерить константу скорости инактивации фермента в отсутствие лиганда и при разных его концентрациях. Если скорость инактивации комплекса ES (EL) отличается от скорости инактивации свободного фермента, константа скорости реакции будет функцией концентрации лиганда и константы диссоциации комплекса. Разрушение фермента может происходить под действием тепла, кислот, при протеолизе или любом другом химическом или физическом воздействии, которое по-разному влияет на скорость инактивации свободного фермента и его комплекса с лигандом. Способом измерения может служить любой оптический или другой физический, а также химический метод, подходящий для определения уменьшения активности с течением времени. Для расчета константы диссоциации используют следующие соотношения:

а) Инактивации подвергается только свободный фермент, лиганд полностью защищает фермент от инактивации.



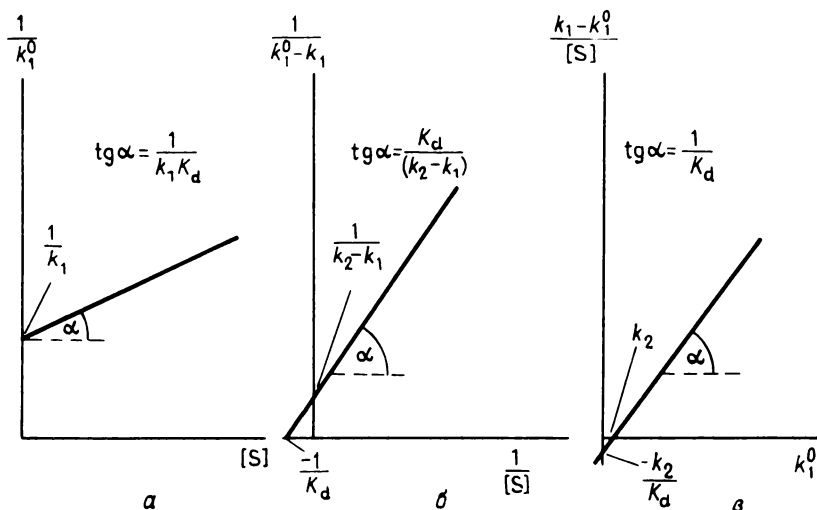


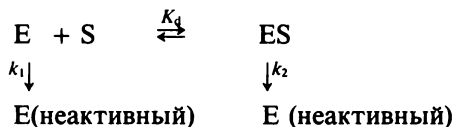
Рис. 42. Определение константы диссоциации и константы скорости денатурации. а — лиганд полностью защищает фермент от инактивации; б и в — лиганд частично защищает фермент от инактивации.

Пусть k_1^0 — наблюдаемая кажущаяся константа скорости первого порядка, k_1 — константа скорости инактивации и K_d — константа диссоциации комплекса. Тогда

$$1/k_1^0 = 1/k_1 + [S]/k_1 K_d \quad (559)$$

Построив график зависимости обратной величины измеренной константы скорости от концентрации лиганда, получают прямую с наклоном $(1/k_1 K_d)$, отсекающую на оси ординат отрезок, равный $(1/k_1)$, откуда можно рассчитать K_d (рис. 42, а).

б) Происходит инактивация как свободного фермента, так и его комплекса с субстратом (с разными скоростями).



Существуют различные способы определения K_d .

1.

$$k_1^0 - k_1 = (k_2 - k_1)[S]/(K_d + [S]) \quad (560)$$

$$1/(k_1^0 - k_1) = K_d/(k_2 - k_1)[S] + 1/(k_2 - k_1) \quad (561)$$

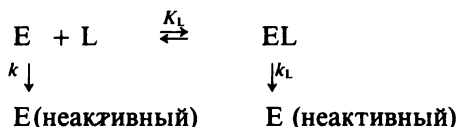
Как следует из этих уравнений, график зависимости обратной величины разности между наблюдаемой константой скорости первого порядка и константой скорости инактивации свободного фермента от обратной величины концентрации лиганда представляет собой прямую. Точки пересечения прямой с осями координат: $-1/K_d$ — с осью абсцисс, $1/(k_2 - k_1)$ — с осью ординат; наклон равен $K_d/(k_2 - k_1)$ (рис. 42,б).

II.

$$(k_1 - k_1^0)/[S] = k_1^0/K_d - k_2/K_d \quad (562)$$

Построив зависимость $(k_1 - k_1^0)/[S]$ от k_1^0 , получают прямую, пересекающую ось X в точке k_2 , ось Y — в точке $-k_2/K_d$, наклон равен $1/K_d$ (рис. 42,в).

в) Лиганд, который не является субстратом, ингибирует или активирует фермент:



Пусть v_0 и v_L — скорости инактивации фермента под действием тепла, кислот и т. п. в отсутствие и в присутствии лиганда соответственно, v_∞ — скорость инактивации при насыщении фермента лигандом (т. е. в случае, когда фермент в системе присутствует только в виде комплекса EL), α — относительное насыщение фермента лигандом в момент времени t_0 . При этом

$$\alpha = (v_0 - v_L)/(v_0 - v_\infty) = ([E]_T + [L]_T + K_L - \sqrt{([E]_T + [L]_T + K_L)^2 - 4([E]_T[L]_T)})/2[E]_T \quad (563)$$

$$\approx [L]_T/\alpha = K_L/(1 - \alpha) + [E]_T \quad (564)$$

$$[(1 - \alpha)/\alpha][L]_T = K_L + [E]_T(1 - \alpha) \quad (565)$$

Строя зависимость $[L]_T/\alpha$ от $1/(1 - \alpha)$ при постоянном $[E]_T$, получают значение K_L .

Если $v_\infty = 0$ (т. е. $k_L = 0$), то лиганд полностью предохраняет фермент от инактивации; если $k > k_L \neq 0$ — частично предохраняет от инактивации; если $k < k_L$, лиганд ускоряет инактивацию фермента (что, в общем, характерно для многих ингибиторов).

г) Лиганд подавляет активность фермента (т. е. является ингибитором), и с молекулой фермента связываются n молекул

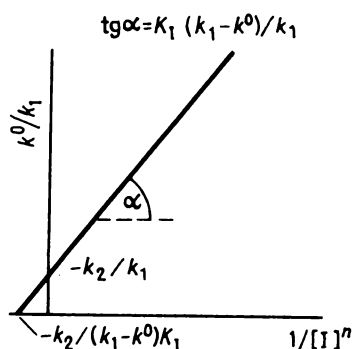
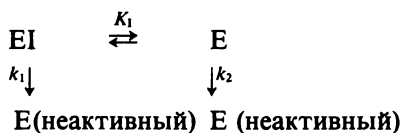


Рис. 43. Определение константы диссоциации комплекса фермент — ингибитор при изучении инактивации фермента.

лиганда.



Для этого случая справедливо следующее уравнение:

$$k^0/k_1 = (K_1/[I]^n)[(k_1 - k^0)/k_1] + k_2/k_1 \quad (566)$$

Так как k_2 можно определить из независимых экспериментов, то, измеряя константу скорости псевдопервого порядка k^0 при различных концентрациях ингибитора и строя график зависимости k^0/k_1 от $1/[I]^n$, получают прямую с наклоном $K_1(k_1 - k^0)/k_1$, пересекающую вертикальную ось в точке k_2/k_1 , ось абсцисс — в точке $-k_2/(k_1 - k^0)K_1$ (рис. 43).

Стехиометрический коэффициент для связывания ингибитора можно определить численным методом с использованием следующего уравнения:

$$n = \{\lg(v_0/v_i - 1) - \lg[K_M/(K_M + [S])K_1]\}/\lg[I] \quad (567)$$

где v_0 — начальная скорость без ингибитора, v_i — начальная скорость при концентрации ингибитора $[I]$.

3.2.2.3. Макроскопические и микроскопические («внутренние») константы. Вышеописанными методами определяются так называемые *макроскопические константы* диссоциации. Если в ферменте существует более одного центра связывания лиганда, эти константы отличаются от *микроскопических («внутренних») констант* диссоциации по статистическим причинам, даже если не существует

кооперативности между центрами. Это можно легко себе представить, рассуждая логически следующим образом.

Предположим, что имеются четыре эквивалентных центра связывания, и первая молекула лиганда может с одинаковой вероятностью связываться со всеми этими центрами. Однако диссоциация может происходить всего лишь с одного центра — того, с которым связался лиганд. Для связывания второй молекулы лиганда выбор существует только среди трех центров, а диссоциация же может происходить с равной вероятностью уже с двух центров. Для третьей молекулы лиганда остаются две возможности связывания, а диссоциация может происходить с трех центров. Наконец, для четвертой молекулы остается только один центр связывания, а диссоциация возможна с любого из четырех центров. Следовательно, макроскопическая константа диссоциации $K_{\text{макр}}$ и четыре независимые и идентичные микроскопические константы диссоциации $K_{\text{микро}} = 1$ связаны друг с другом следующим образом: $K_{1,\text{макр}} = 4K_{\text{микро}}$, $K_{2,\text{макр}} = (3/2)K_{\text{микро}}$, $K_{3,\text{макр}} = (2/3)K_{\text{микро}}$, $K_{4,\text{макр}} = K_{\text{микро}}/4$. Таким образом, процесс диссоциации включает в себя четыре последовательных равновесия, и константа равновесия общей реакции определяется как $K_{\text{равн}} = K_1 K_2 K_3 K_4$.

Вообще говоря, если у молекулы фермента имеется n центров связывания и измеряется K_i (константа диссоциации i -й молекулы лиганда), то микроскопическую константу диссоциации $K_{i,\text{микро}}$ с i -го центра связывания можно рассчитать по уравнению

$$K_{i,\text{макр}} = (n + 1 - i)K_{i,\text{микро}}/i \quad (568)$$

Относительное насыщение рецептора лигандом, т. е. член Y_L , определяется уравнением Эдера

$$Y_L = \sum_{i=1}^n a_i [L]^i / \sum_{i=0}^n b_i [L]^i \quad (569)$$

где a_i и b_i — константы, включающие произведение микроскопических констант диссоциации (от $i = 1$ до n), причем $a_i = (i/n)b_i$.

Вследствие того что макроскопические (измеренные) и микроскопические константы диссоциации связаны статистическими соотношениями, в случае существования n центров связывания наблюдаются также статистические соотношения и между микроскопическими константами скорости ассоциации и диссоциации.

Если $K_1 = k_1/k_{-1}$, $K_2 = k_2/k_{-2}$, $K_3 = k_3/k_{-3}$ и $K_4 = k_4/k_{-4}$, где константы скорости с положительными индексами являются константами второго порядка, с отрицательными индексами — перво-

го порядка, то

$$\begin{aligned} k_{i,\text{макр}} &= (n + 1 - i)k_{i,\text{микр}} \\ k_{-i,\text{макр}} &= ik_{-i,\text{микр}} \end{aligned} \quad (570)$$

Очевидно, эти соотношения справедливы только при условии, что центры связывания независимы и не взаимодействуют друг с другом.

3.2.2.4. Равновесный диализ. В дополнение к кинетическим методам (таким, как измерение активности фермента или степени связывания лиганда как функции концентрации свободного или связанного лиганда) и использованию защитного (либо стимулирующего) действия лиганда, для определения констант диссоциации используются также равновесные методы. *Равновесный диализ* — метод, при котором к раствору фермента добавляют лиганд и измеряют концентрацию лиганда после установления равновесия в диализной смеси. Если взять радиоактивно меченный лиганд, при равновесии изотоп равномерно распределяется в системе:

$$(\text{имп./мин})_{\text{L}}/[\text{L}] = (\text{имп./мин})_{\text{EL}}/[\text{EL}] \quad (571)$$

$$(\text{имп./мин})_{\text{EL}} = (\text{имп./мин})_{\text{т}} - (\text{имп./мин})_{\text{L}} \quad (572)$$

где $(\text{имп./мин})_{\text{т}}$ — общая радиоактивность в данной смеси, включая белок, после установления равновесия, а $(\text{имп./мин})_{\text{L}}$ — радиоактивность в диализном растворе, содержащем только низкомолекулярные вещества.

Пусть

$$(\text{имп./мин})_{\text{L}}/(\text{имп./мин})_{\text{EL}} \equiv r \quad (573)$$

Из уравнения (571) следует, что

$$r[\text{EL}] = [\text{L}]$$

$$[\text{E}][\text{L}]/[\text{EL}] = K_{\text{S}} = r[\text{EL}]/([\text{E}]_{\text{т}} - [\text{EL}]) = r([\text{E}]_{\text{т}} - [\text{EL}]) \quad (574)$$

$$[\text{EL}] = [\text{E}]_{\text{т}} - K_{\text{S}}/r \quad (575)$$

Так как $[\text{E}] = [\text{E}]_{\text{т}} - [\text{EL}]$, подставив это выражение в (575), получим

$$[\text{E}] = K_{\text{S}}/r \quad (576)$$

Далее подставляем (575) и (576) в (574):

$$[\text{L}](K_{\text{S}}/r)/([\text{E}]_{\text{т}} - K_{\text{S}}/r) = K_{\text{S}} \quad (577)$$

и решаем уравнение относительно $[\text{L}]$:

$$[\text{L}] = r[\text{E}]_{\text{т}} - K_{\text{S}} \quad (578)$$

Если оба отделения диализного сосуда имеют одинаковый объем, то

$$[L]_0 = [L] + 0,5 [EL] \quad (579)$$

$$[L]_0 = ([E]_T - K_S/r)(r + 0,5) \quad (580)$$

Пусть

$$R \equiv (\text{имп./мин})_i / (\text{имп./мин})_L \quad (581)$$

Из (572) и (573) следует, что

$$1/r = R - 1 \quad (582)$$

Тогда уравнение (580) представляется в виде

$$[L]_0 = 0,5[[E]_T - K_S(R - 1)] [(R + 1)/(R - 1)] \quad (583)$$

откуда можно определить K_S .

3.2.3. Определение констант скорости. 3.2.3.1. Ферментативные реакции. Линеаризация уравнения Михаэлиса — Ментен позволяет определить максимальную скорость, а также константу Михаэлиса (или константу диссоциации в зависимости от того, является k_2 константой скоростилимитирующей стадии или нет) в случае реакции, протекающей по простому механизму, в котором только один субстрат реагирует с ферментом и образуется только один фермент-субстратный комплекс. Если известна максимальная скорость, то можно рассчитать константу скорости k_2 , так как $V = k_2[E]_T$ согласно кинетике Михаэлиса — Ментен и Бриггса — Холдейна. Однако в случае механизма Михаэлиса — Ментен этим методом можно получить только отношение двух других констант скорости. Для определения каждой из трех констант скорости в случае указанного простого механизма существуют три метода.

3.2.3.1.1. Метод Слэтера. Этот метод полезен лишь в особых случаях, когда мы можем селективно влиять на константу k_2 , а k_1 и k_{-1} остаются неизменными. Экспериментально это достигается для некоторых дегидрогеназ при изменении донора или акцептора протонов.

$$\begin{aligned} K_M &= (k_{-1} + k_2)/k_1 = k_{-1}/k_1 + k_2/k_1 = K_S + k_2/k_1 = \\ &= K_S + k_2[E]_T/k_1[E]_T = K_S + V/k_1[E]_T \end{aligned} \quad (584)$$

Поэтому, если мы можем изменить k_2 , не влияя на k_1 и k_{-1} , то строя зависимость K_M от V , получаем прямую с наклоном $1/k_1[E]_T$

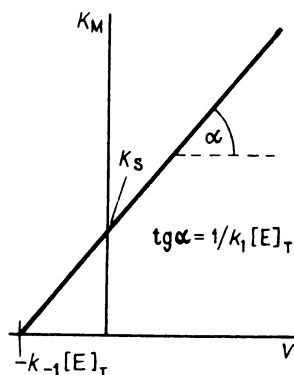


Рис. 44. Определение константы скорости методом Слэтера.

и отрезком, отсекаемым на оси ординат, равным K_S , а на оси абсцисс равным $-k_{-1}[E]_T$ (рис. 44).

3.2.3.1.2. Метод Гутфройнда и Рафтона. Этот метод можно применять только, если имеется специальная аппаратура для измерения быстрой кинетики (например, методом «остановленной струи»), т. е. если можно измерить скорость реакции в предстационарном состоянии при временах реакции, составляющих милли- или микросекунды. Он применим для необратимых реакций (механизм Михаэлиса — Ментен).

На протяжении предстационарного участка, когда концентрация фермент-субстратного комплекса увеличивается от нуля до концентрации, определяющей скорость реакции в стационарном состоянии, предположение о стационарности, т. е. $d[ES]/dt = 0$, неприменимо, поэтому нужно решать дифференциальное уравнение. В предположении $d[S]/dt \approx 0$, т. е. $[S] \approx \text{const}$, получим

$$d[ES]/dt = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES] = k_1([E]_T - [ES])[S] - (k_{-1} + k_2)[ES] = k_1[E]_T[S] - [(k_1[S] + k_{-1} + k_2)[ES] \quad (585)$$

$$[ES] = [k_1[E]_T[S]/(k_1[S] + k_{-1} + k_2)] \{1 - \exp[-t(k_1[S] + k_{-1} + k_2)]\} \quad (586)$$

$$\tau = 1/(k_1[S] + k_2 + k_{-1}) \quad (587)$$

Уравнение (586) справедливо как для предстационарного, так и для стационарного состояния, если $[S]$ не меняется по сравнению с начальной концентрацией свободного субстрата.

Так как $v_0 = k_2[ES] = d[P]/dt$

$$[P] - [P]_0 = \int_0^t k_2[ES] dt \quad (588)$$

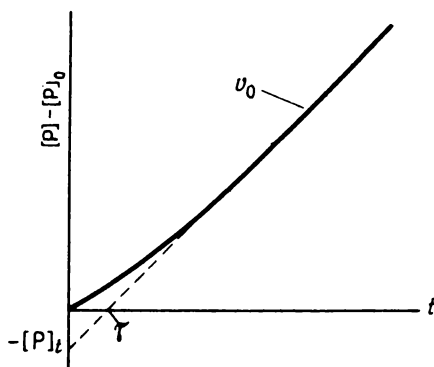


Рис. 45. Определение длительности предстационарного участка.

где $[P]_0$ — начальная концентрация продукта. Обычно $[P]_0$ равняется 0, но, если продуктом является, например, H^+ , то $[P]_0$ соответствует концентрации H^+ при исходном pH среды. В некоторых случаях для того, чтобы лучше понять механизм реакции, в реакционную смесь специально добавляют некоторое количество продукта, и в его присутствии измеряют начальную скорость реакции. Естественно, в этом случае также следует принимать во внимание начальную концентрацию продукта.

Подставляем (586) в (588) и разлагаем экспоненту в ряд; если t мало, то пренебрегая членами с более высокими степенями, для начальной фазы предстационарного состояния получаем

$$[P] - [P]_0 = k_1 k_2 [E]_T [S] t^2 / 2 \quad (589)$$

Таким образом, мы получили формулу, в которой присутствует $k_1 k_2$, а так как $V = k_2 [E]_T$ и $K_M = (k_{-1} + k_2) / k_1$, мы уже имеем три независимых уравнения для определения трех неизвестных констант скорости.

Вышеописанным методом константы также можно определить графически. Если построить зависимость $[P] - [P]_0$ от времени t , то получим кривую, вогнутая часть которой при малых t представляет собой экспоненциальную компоненту первоначального решения дифференциального уравнения. Однако, если t достаточно велико, т. е. реакция находится в стационарном состоянии, экспоненциальным членом уже можно пренебречь, и получается линейное соотношение (рис. 45). Строя зависимость $[P] - [P]_0$ от t и экстраполируя линейный участок кривой, характеризующий стационарное состояние, до пересечения с абсциссой, из координаты точки пересечения получаем длительность предстационарного состояния.

Если $[P]_0 = 0$, то

$$[P] = v_0 t - [P]_t [1 - \exp(-t/\tau)] \quad (590)$$

где v_0 — начальная скорость в стационарном состоянии. Подставляя сюда значение $[ES]$ из (586) и интегрируя, получаем

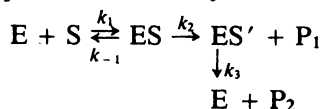
$$[P]_t = v_0 \tau = V_{\max} [S] / k_1 (K_M + [S])^2 \quad (591)$$

Если $[S]$ настолько велико, что величиной K_M по сравнению с ней можно пренебречь, то для достаточно больших t из уравнений (586) и (588) следует

$$[P] - [P]_0 = k_2 [E]_T t - k_2 [E]_T / k_1 [S] \quad (589a)$$

Точка пересечения экстраполированного прямолинейного участка графика, определяемого уравнениями (589a) и (591), с осью абсцисс равна $\tau = 1/k_1 [S]$, т. е. при условии $[S] \gg K_M$ можно прямо получить k_1 .

Схему трехстадийного механизма с образованием двух продуктов (характерного для гидролитических реакций, катализируемых протеазами и экстеразами, такими, как трипсин, химотрипсин, субтилизин, папаин, ацетилхолинэстераза и др.), в котором образуются промежуточный комплекс Михаэлиса ES , ацилферментное промежуточное соединение (ES') и два конечных продукта, спирт и кислота, можно представить следующим образом:



Предполагаем, что $[ES]$ достигает стационарного состояния очень быстро, $[S] \approx [S]_0$, $[E]_T = [E] + [ES] + [ES']$ и

$$[E][S]_0/[ES] = ([E]_T - [ES] - [ES'])[S]_0/[ES] = (k_{-1} + k_2)/k_1 \equiv K'_S \quad (592)$$

$$[ES] = ([E]_T - [ES']) [S]_0 / (K'_S + [S]_0) \quad (593)$$

$$d[ES']/dt = k_2 [ES] - k_3 [ES'] \quad (594)$$

$$[ES'] = [k_2 [E]_T [S]_0 \tau_0 / (K'_S + [S]_0)] [1 - \exp(-t/\tau_0)] \quad (595)$$

$$[ES] = [k_3 [E]_T [S]_0 \tau_0 / (K'_S + [S]_0)] \{1 + ([S]_0 / K'_S + [S]_0) (k_2/k_3) \exp(-t/\tau_0)\} \quad (596)$$

$$1/\tau_0 = k_3 + k_2 [S]_0 / (K'_S + [S]_0) \quad (597)$$

$$d[P]_1/dt = k_2 [ES] \quad (598)$$

$$d[P]_2/dt = k_3 [ES'] \quad (599)$$

$$[P]_1 = v_0 t + a [1 - \exp(-t/\tau_0)] \quad (600)$$

$$[P]_2 = v_0 t - v_0 \tau_0 [1 - \exp(-t/\tau_0)] \quad (601)$$

где $v_0 = k_0[E]_T[S]_0/(K_m + [S]_0)$ и

$$a = [k_2/(k_2 + k_3)]^2 [[S]_0/(K_m + [S]_0)]^2 [E]_T \quad (602)$$

$$K_m = K'_s[k_3/(k_2 + k_3)] \quad (603)$$

$$k_0 = k_{\text{кат}} = k_2 k_3/(k_2 + k_3) \quad (604)$$

Анализируя зависимость $[P]_1$ и $[P]_2$ от t , следует отметить, что в зависимости $[P]_1 = f(t)$ наблюдается начальный «всплеск» концентрации продукта, величина которого определяется уравнением (602). Наличие этого всплеска объясняется тем, что уравнение (600) является суммой линейной функции ($v_0 t$) и функции $a(1 - \exp(-t/\tau))$, возрастающей аналогично гиперболе. Однако всплеск возникает, только если $k_2 \gg k_3$. В начале зависимости $[P]_2 = f(t)$ наблюдается *лаг-период*, из которого можно определить τ_0 . Скорости образования $[P]_1$ и $[P]_2$ в стационарном состоянии одинаковы и равны v_0 . Из зависимости $1/v_0 = f(1/[S]_0)$ можно рассчитать k_0 и K_m , из отношения K_m/k_0 — член K'_s/k_2 , а из зависимости $1/\sqrt{a} = f(1/[S]_0)$ — величину k_3/k_2 . Если $[S]_0 \gg K'_s$, из величины $1/\tau_0$ определяется сумма констант $k_2 + k_3$, таким образом можно рассчитать все неизвестные константы.

3.2.3.1.3. Метод одного оборота. В некоторых случаях важную информацию о механизме действия фермента дает метод изучения одного оборота фермента, когда на активном центре фермента превращается только одна молекула субстрата. Это достигается только в случае, если фермент находится в значительном избытке по сравнению с субстратом. Тогда

$$[E] \approx [E]_T \gg [S], [ES], [ES'], [P]_2 \text{ и}$$

$$[S]_0 = [S] + [ES] + [ES'] + [P]_2.$$

$$d[ES]dt = k_1[E]_T([S]_0 - [ES] - [ES'] - [P]_2) - [ES](k_{-1} + k_2) \quad (605)$$

$$d[ES']/dt = k_2[ES] - k_3[ES'] \quad (606)$$

$$d[P]_1/dt = k_2[ES] \quad [\text{ср. с (598)}]$$

$$d[P]_2/dt = k_3[ES'] \quad [\text{ср. с (599)}]$$

$$d[ES]^2/dt^2 + (k_1[E]_T + k_{-1} + k_2)(d[ES]/dt) + k_1 k_2 [E]_T [ES] = 0 \quad (607)$$

Пусть

$$A \equiv k_1[E]_T + k_{-1} + k_2 \quad (608)$$

$$B \equiv k_1 k_2 [E]_T \quad (609)$$

Тогда уравнение (607) переходит в

$$d[ES]^2/dt^2 + Ad[ES]/dt + B[ES] = 0 \quad (610)$$

Если при $t = 0$ $[ES] = 0$ и $d[ES]/dt = k_1[E]_T[S]_0$

$$[ES] = C[\exp(-dt) - \exp(-ft)] \quad (611)$$

где

$$C = k_1[E]_T[S]_0/(d - f) \quad (612)$$

$$d = (1/2)(A - \sqrt{A^2 - 4B}) \quad (613)$$

$$f = (1/2)(A + \sqrt{A^2 - 4B}) \quad (614)$$

В простом случае, когда $k_1[E]_T \gg k_2$, и поэтому $A^2 \gg 4B$

$$d \approx k_2[E]_T/([E]_T + K'_S) \quad (615)$$

$$f \approx k_1([E]_T + K'_S) \quad (616)$$

где

$$K'_S = (k_{-1} + k_2)/k_1 \quad (617)$$

На основе приведенных выше уравнений можно допустить, что $f \gg d$, и тогда

$$C \approx [E]_T[S]_0/([E]_T + K'_S) \equiv a[S]_0 \quad (618)$$

$$a = [E]_T/([E]_T + K'_S) \quad (619)$$

И так как $\exp(-ft) \ll \exp(-dt)$

$$[ES] = a[S]_0 \exp(-ak_2t) \quad (620)$$

Подставляем в (598):

$$[P]_1 = [S]_0[1 - \exp(-ak_2t)] \quad (621)$$

$$[ES'] = [ak_2[S]_0/(ak_2 - k_3)] [\exp(-k_3t) - \exp(-ak_2t)] \quad (622)$$

$$[P]_2 = [[S]_0/(ak_2 - k_3)] \{ ak_2[1 - \exp(-k_3t)] - k_3[1 - \exp(-ak_2t)] \} \quad (623)$$

При помощи этих уравнений можно определить k_2 , k_3 и K'_S .

3.2.3.1.4. Релаксационный метод Эйгена. Как уже обсуждалось в разд. 2.12, посвященном химической кинетике, для определения констант скорости обратимой реакции можно применять *релаксационный метод*. Обратимую биохимическую реакцию можно вывести из состояния равновесия под действием тепла, давления и т. п. так же, как и химическую реакцию. В случае обратимого механизма Михаэлиса — Ментен две последовательные стадии реакции (образование и распад комплекса с получением продуктов) описываются двумя временами релаксации.

Если $1/\tau_1 \gg 1/\tau_2$, время релаксации для быстрой реакции (первая

стадия, т. е. обратимое образование комплекса) равно

$$\tau_1 = 1/k_1([E]_{\text{равн}} + [S]_{\text{равн}}) + k_{-2}([P]_{\text{равн}} + [E]_{\text{равн}}) + k_{-1} + k_2 \quad (624)$$

Время релаксации для медленной (второй) реакции (скорость-определяющая стадия, обратимый распад комплекса с образованием продуктов) равно

$$\tau_2 = [k_1([S]_{\text{равн}} + [E]_{\text{равн}}) + k_{-2}([P]_{\text{равн}} + [E]_{\text{равн}}) + k_{-1} + k_2]/[E]_{\text{равн}}[k_1k_{-2}([E]_{\text{равн}} + [P]_{\text{равн}} + [S]_{\text{равн}}) + k_1k_2 + k_{-1}k_{-2}] \quad (625)$$

Строя зависимость $1/\tau_1$ от $[S]_{\text{равн}}$ или $[E]_{\text{равн}}$ и экстраполируя ее к значениям $[S]_{\text{равн}} = 0$ и $[E]_{\text{равн}} = 0$, можно определить $k_{-1} + k_2$. Таким образом, если известны V_{max} и K_M , уже можно рассчитать индивидуальные константы скорости.

Если неравенство ($1/\tau_1 \gg 1/\tau_2$) не выполняется, относительно простые уравнения можно получить, только анализируя суммы и произведения времен релаксации (ср. с уравнениями (258) и (259)):

$$1/\tau_1 + 1/\tau_2 = k_1([E]_{\text{равн}} + [S]_{\text{равн}}) + k_{-2}([E]_{\text{равн}} + [P]_{\text{равн}}) + k_{-1} + k_2 \quad (626)$$

$$(1/\tau_1)(1/\tau_2) = [E]_{\text{равн}}(k_1k_{-2}([E]_{\text{равн}} + [S]_{\text{равн}} + [P]_{\text{равн}}) + k_1k_2 + k_{-1}k_{-2}) \quad (627)$$

Очевидно, что в случае более сложных ферментативных реакций зависимость τ от констант скорости также более сложная. Следовательно, определение констант еще более затрудняется.

3.2.3.2. Связывание рецептора. При изучении связывания лиганда может потребоваться измерение не только константы диссоциации комплекса рецептор — лиганд, но и скорости его образования и распада.

Предположим, что на поверхности рецептора имеются два центра связывания (R_1 и R_2) и общие концентрации рецепторов одинаковы, т. е. $[R_1]_T = [R_2]_T$. Соответствующие константы диссоциации равны $K_1 = k_{-1}/k_1$ и $K_2 = k_{-2}/k_2$, где k_{-1} и k_{-2} — константы скорости диссоциации комплексов (первого порядка), а k_1 и k_2 — константы образования комплексов (второго порядка). Тогда общее количество лиганда, связанного за время t , равно

$$B = B_{\text{равн}} + A_1 \exp(-a_1 t) + A_2 \exp(-a_2 t) \quad (628)$$

где $B_{\text{равн}}$ — количество связанного лиганда при равновесии:

$$B_{\text{равн}} = [R_1]_T[L]/(K_1 + [L]) + [R_2]_T[L]/(K_2 + [L]) \quad (629)$$

где $[L]$ — концентрация лиганда и

$$A_1 = -[R_1]_T[L]/(K_1 + [L]), \quad A_2 = -[R_2]_T[L]/(K_2 + [L]) \quad (630)$$

$$a_1 = k_1[L] + k_{-1}, \quad a_2 = k_2[L] + k_{-2} \quad (631)$$

Существенными являются предположения, что оба центра связывания независимы, взаимодействие между ними отсутствует и $[L] \gg [R_1]_T, [R_2]_T$.

Если оптическим методом проследить за скоростью образования комплекса рецептор — лиганд, то при наличии только одного центра связывания изменение поглощения света можно выразить формулой

$$\begin{aligned} \Delta A &= \varepsilon_R[R]_{\text{равн}} + \varepsilon_L[L]_{\text{равн}} - \varepsilon_R[R]_T - \varepsilon_L[L]_T = \\ &= \Delta \varepsilon [R]_T [L]_T / ([L]_T + K_1) \end{aligned} \quad (632)$$

где ε_R и ε_L — молярные коэффициенты экстинкции рецептора и лиганда соответственно и

$$\Delta \varepsilon = \varepsilon_{RL} - \varepsilon_R - \varepsilon_L \quad (633)$$

где ε_{RL} — молярный коэффициент экстинкции комплекса рецептор — лиганд

$$\Delta A_{\text{max}} = \lim_{[L]_T \rightarrow \infty} \Delta A = \Delta \varepsilon [R]_T \quad (634)$$

$$B \equiv \Delta A / \Delta A_{\text{max}} = [L]_T / ([L]_T + K_1) \quad (635)$$

Построив график зависимости $1/B$ от $1/[L]_T$, можно определить K_1 . Измеряя зависимость поглощения света от времени, получаем кажущуюся константу скорости образования комплекса (см. (628) при $[R_2]_T = 0$), поскольку

$$k_{\text{каж}} = k_1[L]_T + k_{-1} \quad [\text{ср. с (631)}]$$

Имея K_1 и $k_{\text{каж}}$, рассчитываем k_1 и k_{-1} .

Для определения $k_{\text{каж}}$ обычно требуется аппаратура, позволяющая анализировать процесс при малых временах реакции (метод «остановленной струи»). Недостатком этого метода с точки зрения возможности регистрации полной реакции является то, что в течение мертвого времени прибора (t_d) реакция частично успевает пройти

$$\ln(\Delta A / \Delta A_{\text{эксп}}) = k_{\text{каж}} t_d \quad (636)$$

Для определения мертвого времени аппаратуры предпочтительно выбрать независимую необратимую реакцию $A + B \xrightarrow{k} C$ и изме-

рять скорость этой реакции при $[A]_T \gg [B]_T$. Тогда

$$k_{\text{каж}} = k_1[A]_T \text{ и } \ln \Delta A_{\text{экс}} = \ln \Delta A - k_1 t_d [A]_T \quad (637)$$

Таким образом, из графиков зависимостей $k_{\text{каж}}$ и $\ln \Delta A_{\text{экс}}$ от $[A]_T$ легко определить t_d .

Численные значения констант, полученные оптическими методами, более надежны, чем рассчитанные, например, из графика Скэтчарда, поскольку значения, полученные в последнем случае, имеют смысл только тогда, когда период взаимодействия лиганда с рецептором значительно больше, чем время полужизни комплекса. В противном случае будет определена лишь кажущаяся константа диссоциации, значение которой зависит от времени инкубации и от взятого избытка лиганда. Так как требуются сравнительно большие времена инкубации фермента с лигандом, а некоторые рецепторы нестабильны, это может вызвать дополнительные ошибки в значениях измеряемых констант. Как показал Арани, в таких случаях нелинейная зависимость может быть ошибочно аппроксимирована линейной, что приводит к неправильной оценке констант диссоциации (с ошибкой на несколько порядков). Кроме того, из кривизны графика может быть сделан ложный вывод о наличии взаимодействия между центрами связывания, хотя причиной кривизны является то, что за время эксперимента не успевает установиться равновесие.

Однако, если образование и распад комплекса рецептор — лиганд протекают так быстро, что их можно изучать только релаксационными методами (температурный скачок), то время релаксации равно

$$1/\tau = k_1([R]_{\text{равн}} + [L]_{\text{равн}}) + k_{-1} \quad (638)$$

или

$$1/\tau = k_1 \sqrt{([R]_T - [L]_T + K_1)^2 + 4K_1[L]_T} \quad (639)$$

где K_1 — константа диссоциации комплекса. При условии, что $[R]_T = [L]_T$, получаем

$$1/\tau^2 = k_1^2 K_1 + 4K_1 k_1^2 [L]_T \quad (640)$$

Из уравнения (640) можно определить k_1 и K_1 , а из них — k_{-1} .

3.2.4. Стохастическое решение уравнения скорости для одностратных реакций. За последнее десятилетие внимание было привлечено к применению вероятностного подхода, так называемого стохастического метода решения вместо обсуждавшегося выше де-

терминистского подхода к расчету уравнений скорости ферментативных реакций. Этот метод позволяет рассчитывать временные зависимости математического ожидания (μ) и дисперсии (σ^2) числа молекул свободного фермента, субстрата, комплексов фермент — субстрат и молекул продукта реакции, рассматриваемых как вероятностные величины. Стохастическое описание учитывает случайные флуктуации числа реагирующих молекул, среднего числа столкновений, необходимых для образования комплекса фермент — субстрат, а также доли уже образовавшихся молекул ES, находящихся в достаточно высокоэнергетическом активированном состоянии, позволяющем им диссоциировать на фермент и конечный продукт.

Из вышесказанного следует, что такое решение более точно описывает реальный процесс, чем обычное детерминистское решение. Однако современные технические средства не позволяют экспериментально реализовать эту возможность. Самое большее, мы можем предположить, что флуктуации при кинетических измерениях не обязательно связаны с ошибками эксперимента, а в некоторых случаях вызываются случайными флуктуациями реагирующих молекул.

В качестве примера можно привести стохастическое решение для односубстратной реакции Михаэлиса — Ментен. Зависимость от времени математического ожидания для свободного фермента описывается выражением

$$\mu_E = [E]_T / (k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2) \{ k_{-1} + k_2 + k_1[S]_0 \exp[-(k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2)t] \} \quad (641)$$

а дисперсии — выражением

$$\sigma_E^2 = [k_1[S]_0[E]_T / (k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2)^2] \{ k_{-1} + k_2 + k_1[S]_0 \exp[-(k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2)t] \} \{ 1 - \exp[-(k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2)t] \} \quad (642)$$

Временная зависимость математического ожидания для комплекса фермент — субстрат определяется как

$$\mu_{ES} = [E]_T - \mu_E = [E]_T k_1[S]_0 / (k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2) \{ 1 - \exp[-(k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2)t] \} = [E]_T [S]_0 / ([S]_0 + K_M) \{ 1 - \exp[-([S]_0 + K_M)t] \} \quad (643)$$

что идентично первоначальному детерминистскому решению Михаэлиса — Ментен, если можно пренебречь экспоненциальным членом по сравнению с 1. Это справедливо, если концентрация $[S]_0$ велика

(что также необходимо для выполнения уравнения Михаэлиса — Ментен), а t не слишком мало. Отсюда следует, что в предстационарном режиме уравнение Михаэлиса — Ментен не выполняется; этот вывод находится в соответствии с детерминистским решением. Если $[S]$ очень велика, то стохастическое и детерминистское решение в предстационарном режиме реакции эквивалентны. Когда в системе присутствует 10^{10} или более молекул, стохастическое и детерминистское решение также совпадают при условии, что концентрация $[S]$ не слишком велика. Однако это справедливо, лишь если система гомогенна. Если данный фермент находится в каком-либо компартменте, и в этом компартменте (или клетке) присутствует только одна или несколько молекул фермента, то следует применять только стохастическое решение, независимо от того, что имеется 10^{10} компартментов (или клеток), поскольку детерминистское решение может дать 20—30%-ную ошибку, зависящую от индивидуальных констант скорости.

3.2.5. Интерпретация уравнения скорости одностратной реакции с точки зрения молекулярнокинетической модели действия фермента. Дамьянович и Шомоги разработали метод интерпретации кинетических параметров, основанный на *молекулярнокинетической модели действия фермента* (МКМФ). Этот подход сочетает теорию столкновений, решеточную теорию жидкостей, вероятностные расчеты и специфические характеристики белков.

В растворе молекулы колеблются и вращаются в данном узле решетки в течение времени τ . Затем за пренебрежимо малое время они переходят в другой узел решетки, находящийся на расстоянии λ от первого:

$$\tau = \lambda^2 / 6D \quad (644)$$

где D — коэффициент диффузии в данной среде (см. (330)).

Пусть V — объем вокруг активного центра фермента; находящийся внутри этого объема субстрат считается связанным. Вероятность нахождения субстрата в этом объеме

$$P = ne^{-n} \quad (645)$$

где $n = [S]V$. Из теории следует, что

$$k_1 = (3/2r_s^2)D_s V(1/2 + r_0/\lambda\sqrt{v})^2 \exp(-E_q/k_B T) \quad (646)$$

где r_s — радиус молекулы субстрата, r_0 — радиус поверхности субстрата, расположенной вокруг группы, ответственной за связыва-

ние, D_S — коэффициент диффузии субстрата, ν — число перемещений молекул субстрата между узлами решетки за среднее время жизни t в объеме связывания V , а E_q — энергия активации (пороговая энергия), которая требуется субстрату, находящемуся в объеме V , для образования комплекса с ферментом.

$$k_2 = L/t', \quad k_{-1} = (1 - L)/t' \quad (647, 648)$$

где t' — среднее время жизни комплекса ES, а L — вероятность прохождения реакции $ES \rightarrow E + P$.

$$t' = P_S^{-1} t_c \exp(E_d/k_B T) \quad (649)$$

где P_S — вероятность стерически благоприятных столкновений, E_d — энергия активации (пороговая энерги) процесса $ES \rightarrow E + S$, а t_c — время между двумя эффективными столкновениями:

$$t_c = \tau_0/k' \quad (650)$$

где τ_0 — среднее время жизни сталкивающихся молекул растворителя в узлах решетки, k' — число таких узлов на внешней поверхности ES, которые должны подвергнуться синхронным соударениям с молекулами среды, чтобы согласно теории туннелирования энергии приобрести достаточную для распада энергию.

$$L = \xi \exp(-\Delta E/k_B T) \quad (651)$$

где $\Delta E = (E_p - E_d)$, E_p — энергия активации (пороговая энергия) процесса $ES \rightarrow E + P$, а ξ — вероятность диссоциации активированного комплекса на продукты.

Из МКМФ следует, что

$$K_M = [(t'/\bar{t})P_1 V \exp(-E_q/k_B T)]^{-1} \quad (652)$$

$$V_{\max} = (P_S k'/\tau_0)[E]_T \exp(-E_p/k_B T) \quad (653)$$

и P_1 — стерический фактор, который является одной из компонент энтропии активации:

$$P_1 = (1/4r_S^2)[(1/2)\lambda\sqrt{\nu} + r_0]^2 \quad (654)$$

и

$$t'/\bar{t} = (D_S/D_0\nu)(1/P_S k') \exp(E_d/k_B T) \quad (655)$$

где D_0 — коэффициент диффузии молекул растворителя.

Значение теории МКМФ состоит в том, что она пытается придать реальный физический смысл формальному кинетическому описанию, проведенному Михаэлисом и Ментен.

3.2.6. Анализ последовательных (сопряженных) реакций. При исследовании регуляции метаболизма, взаимодействия фермент — фермент или образования мультиферментных комплексов необходимо кинетически анализировать последовательные (сопряженные) реакции. Пусть изучается следующая реакция:



в которой превращение A в S катализируется ферментом E_1 , а P образуется из S при участии E_2 . Предполагаем, что обе ферментативные реакции подчиняются механизму Михаэлиса — Ментен. Параметры реакции должны быть выбраны так, чтобы реакция с участием E_1 была нулевого порядка относительно A (это возможно за счет использования большого избытка A), а вторая реакция, катализируемая E_2 , была первого порядка по субстрату S (т. е. $[S] \ll K_M^{E_2}$). Линейному участку образования P (стационарное состояние) предшествует лаг-период (*время перехода*) (рис. 46). Длительность переходного периода (абсцисса пересечения экстраполированного линейного участка с горизонтальной осью) обратно пропорциональна концентрации второго фермента (k'_2 — константа скорости первого порядка для второй реакции):

$$\tau = K_M^{E_2} / k'_2 [E_2] \quad (656)$$

Наклон линейного участка (стационарное состояние) пропорционален скорости реакции, катализируемой первым ферментом:

$$V_1 = k_1 [E_1] \quad (657)$$

k_1 — константа скорости первого порядка для первой реакции,

$$k'_2 = 0,693 / t_{1/2} \quad (658)$$

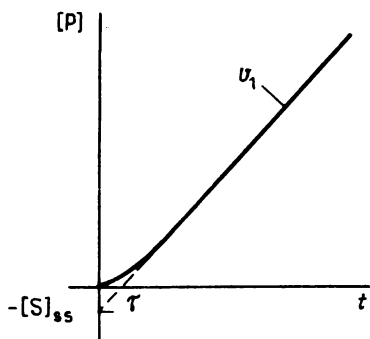


Рис. 46. Кинетический анализ сопряженных реакций.

Если k_2 — кажущаяся константа скорости второго порядка для второй реакции (т. е. $k_2'/K_M^{E_2}$), то

$$[S] = (k_1/k_2)[1 - \exp(-k_2' t)] \quad (659)$$

Из (658)

$$[S] = (k_1/k_2)(1 - 0,5^{t/t_{1/2}}) \quad (660)$$

Если $t \rightarrow \infty$, то $[S] \rightarrow [S]_{ss}$, где индекс ss обозначает величину, характеризующую стационарное состояние. Если $d[S]/dt = 0$, то $v_1 = v_2$ и

$$[S]_{ss} = k_1/k_2 \quad (661)$$

Преобразуем (659)

$$1 - (k_2/k_1)[S] = \exp(-k_2' t) \quad (662)$$

$$2,303 \lg\{1 - (k_2/k_1)[S]\} = 2,303 \lg(1 - [S]/[S]_{ss}) = -k_2' t \quad (663)$$

Для правильной постановки эксперимента необходимо обеспечить такую концентрацию E_2 , которая гарантировала бы достижение 99% $[S]_{ss}$ в течение заданного периода. Пусть F — доля $[S]_{ss}$, которую собираются получить за время t^* . Тогда

$$t^* = -2,303 \lg(1 - F)/k_2' \quad (664)$$

Поскольку

$$v_2 = k_2' [S]_{ss} = V_{\max}^{E_2} [S]_{ss}/K_M^{E_2} \quad (665)$$

то

$$V_{\max}^{E_2}/K_M^{E_2} = k_2' \quad (666)$$

Подставив (666) в (664), получим

$$V_{\max}^{E_2} = -K_M^{E_2}(2,303 \lg(1 - F)/t^*) \quad (667)$$

Из этого уравнения можно рассчитать количество E_2 , необходимое для получения доли F от $[S]_{ss}$. Из (656)

$$K_M^{E_2}/V_{\max}^{E_2} = \tau \quad (668)$$

Подставляем (666) и (668) в (659):

$$[S] = v_1 \tau [1 - \exp(-t/\tau)] \quad (669)$$

Затем подставляем (669) в уравнение $d[P]/dt = k_2' [S]$ и интегрируем

$$[P] = v_1 [t + \tau \exp(-t/\tau) - \tau] \quad (670)$$

Если $t = \tau$, то из (669) следует

$$[S] = v_1 \tau (1 - 1/e) \quad (671)$$

И так как из (657), (661), (666) и (668)

$$[S]_{ss} = v_1 \tau \quad (672)$$

то

$$[S]/[S]_{ss} = 1 - 1/e \approx 0,68 \quad (673)$$

т. е. время перехода — это фактически время, которое требуется, чтобы концентрация промежуточного продукта достигла примерно 68% стационарной концентрации.

Когда стационарное состояние достигнуто

$$[P] = v_1(1 - \tau) \quad (674)$$

Не безразлично, какова именно абсолютная концентрация E_2 в требуемом диапазоне концентраций фермента. (Напомним, что реакция E_1 должна быть нулевого порядка, реакция E_2 — первого порядка по субстрату, и за время t^* необходимо подвергнуть превращению долю F от $[S]_{ss}$.) Закон действующих масс указывает, что если $v_1 = \text{const}$, а $t = 0$, $[P] = [S] = 0$, то

$$[P] = v_1 t - [S]_{ss} - v_2/k'_2 \quad (675)$$

Подставляем (674) в (675):

$$v_1 \tau = [S]_{ss} + v_2/k'_2 \quad (676)$$

Взяв обратные величины в уравнении (676) и подставив в него (657), (665) и (661), после преобразования получим

$$1/\tau = k'_2[E_2]/(K_M^{E_2} + [E_2]) \quad (677)$$

Очевидно, что (656) получается из (677), только если $[E_2] \ll K_M^{E_2}$. Чтобы получить линейную зависимость между $1/\tau$ и $[E_2]$, необходимо брать $[E_2]$ в концентрации, пренебрежимо малой по сравнению с K_M . Конечно, если выполняются и (656), и (677), то график зависимости τ от $1/[E_2]$ является линейным.

Если не предполагать, что вторая реакция имеет первый порядок, то время, необходимое, чтобы вторая реакция со скоростью v_2 достигла заданной величины F , согласно уравнению (680), зависит от t^* и Φ , где

$$t^* = \Phi K_M^{E_2}/v_1 \quad (678)$$

и

$$\Phi = [V_{\max}^{E_2} v_1 / (V_{\max}^{E_2} - v_1)^2] \ln[v_1(V_{\max}^{E_2} - v_2) / V_{\max}^{E_2}(v_1 - v_2)] - \\ - v_1 v_2 / (V_{\max}^{E_2} - v_2)(V_{\max}^{E_2} - v_1) \quad (679)$$

Φ — безразмерная величина, являющаяся функцией только v_2/v_1 и $v_1/V_{\max}^{E_2}$. Требуемая точность зависит только от отношения v_1/v_2 .

$$1/\tau = -(1/t^*) \{ [(V_{\max}^{E_2}/v_1) / (V_{\max}^{E_2}/v_1 - 1)] \ln[(V_{\max}^{E_2}/v_1)(1 - F) / (V_{\max}^{E_2}/v_1 - F)] + F / (V_{\max}^{E_2}/v_1 - F) \} \quad (680)$$

Вообще, если второй фермент подчиняется кинетике Михаэлиса — Ментен, а не кинетике первого порядка, то

$$d[S]/dt = v_1 - V_{\max}^{E_2}[S] / (K_M^{E_2} + [S]) \quad (681)$$

и

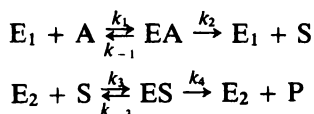
$$\tau = K_M^{E_2} / (V_{\max}^{E_2} - v_1) \quad (682)$$

Суммарную кинетику реакции с двумя последовательными стадиями, катализируемыми двумя ферментами и подчиняющимися механизму Михаэлиса — Ментен, также можно описать с помощью теоремы Мак-Лорена (см. приложение, разд. 3.14.6). Она дает следующее выражение:

$$[P] = V_{\max}^{E_2} V_{\max}^{E_1} [A]_0 t^2 / 2 K_M^{E_2} (K_M^{E_1} + [A]_0) \quad (683)$$

Построив график зависимости $[P]$ от t^2 , получают прямую линию; величина, обратная ее наклону, является линейной функцией от $1/[A]_0$. Из этого графика в двойных обратных координатах получим величину $(-1/K_M^{E_1})$ из точки пересечения графика с осью X и $(2K_M^{E_2}/V_{\max}^{E_2} V_{\max}^{E_1})$ — из точки его пересечения с осью Y . Измерив отдельно $(K_M^{E_2})$ и $(V_{\max}^{E_2})$, можно определить $K_M^{E_1}$ и $V_{\max}^{E_1}$ сопряженной реакции.

Если схему двух последовательных реакций, катализируемых двумя ферментами, подчиняющихся механизму Михаэлиса — Ментен, можно представить как



в предстационарном режиме

$$[P] = v_1 \left\{ t - \sum_{i=1}^3 [(1 - \exp(-\lambda_i t) / \lambda_i^2) [\prod_{j=1}^3 \lambda_j / \prod_{j=1, j \neq i}^3 (\lambda_j - \lambda_i)]] \right\} \quad (684)$$

и в стационарном состоянии

$$[P] = v_1 t - \sum_{i=1}^3 S_i \quad (685)$$

где

$$\begin{aligned} v_1 &= k_2[E_1]_0[A]_0/(K_M^{E_1} + [A]_0), \quad K_M^{E_1} = (k_{-1} + k_2)/k_1, \\ \lambda_1 &= k_1[A]_0 + k_{-1} + k_2 \\ \lambda_{2,3} &= (B \pm \sqrt{B^2 - 4C})/2, \quad B = k_3[E_2]_0 + k_{-3} + k_4, \quad C = k_3k_4[E_2]_0 \\ S_i &= v_1 \prod_{j=1}^3 \lambda_j / [\lambda_i^2 \prod_{j=1, j \neq i}^3 (\lambda_j - \lambda_i)] \end{aligned}$$

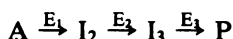
и

$$\tau = \sum_{i=1}^3 S_i / v_1 \quad (686)$$

Если построить график зависимости $[P]$ от t , то ордината пересечения его линейной части с осью Y равна

$$\beta = -v_1 \tau = - \sum_{i=1}^3 S_i \quad (687)$$

Для трех необратимых последовательных ферментативных реакций, каждая из которых подчиняется механизму Михаэлиса — Ментен, при условии, что первая реакция имеет нулевой, а остальные — первый порядок по субстрату, можно записать



Концентрация $[I_3]$ описывается следующим выражением:

$$[I_3] = k_1/k_3 - [k_1/(k_3 - k_2)][\exp(-k_2 t) - (k_2/k_3)\exp(-k_3 t)] \quad (688)$$

где

$$k_1/k_3 = [I_3]_{ss} \quad (689)$$

Время t^* , необходимое для достижения заданной доли F от $[I_3]_{ss}$, при $k_3 \gg k_2$ определяется как

$$t^* = -\ln(1 - F)/k_2 \quad (\text{ср. (664)}) \quad (690)$$

а при $k_2 \gg k_3$:

$$t^* = -\ln(1 - F)/k_3 \quad (691)$$

Если значения обеих констант скорости близки, то величину t^* можно оценить только по номограмме [Biochemistry, 1969, т. 8, с. 2782].

Если реакция состоит из n стадий, то

$$[P] = v_1(t + \sum_{i=2}^n C_i \exp(-t/\tau_i) - \sum_{i=2}^n \tau_i) \quad (\text{ср. (670)}) \quad (692)$$

где

$$C_i = \tau_i^n \prod_{j=2}^n [1/(\tau_i - \tau_j)] \quad (j \neq i) \quad (693)$$

В стационарном состоянии ($t \rightarrow \infty$)

$$[P] = v_1 \left(t - \sum_{i=2}^n \tau_i \right) \quad (\text{ср. (674)}) \quad (694)$$

и для любого j -го промежуточного продукта (между А и Р)

$$d[I_j]/dt = 0 = v_1 - V_j[I_j]_{ss}/(K_j + [I_j]_{ss}), \quad j = 2, \dots, n \quad (695)$$

$$[I_j]_{ss} = v_1 K_j / (V_j - v_1), \quad \tau_j = K_j / (V_j - v_1) \quad (696, 697)$$

$$\tau = \sum_{j=2}^n [K_j / (V_j - v_1)] = \sum_{j=2}^n \tau_j \quad (698)$$

Если $V_j \gg v_1$, то $\tau_j \rightarrow K_j/v_j$.

Если реакции $I_2 \dots I_n$ обратимы, а необратимы только реакции

$A \xrightarrow{v_1} I_2$ и $I_n \xrightarrow{k_n} P$, то получим

$$k_j[I_j]_{ss} - k_{-j}[I_{j+1}]_{ss} = v_1, \quad k_n[I_n]_{ss} = v_1 \quad (699, 700)$$

$$\tau_n = 1/k_n \quad (701)$$

$$\tau_{n-1} = 1/k_{n-1} + K_{\text{равн}}^{n-1}/k_n \quad (702)$$

$$\tau_{n-2} = 1/k_{n-2} + K_{\text{равн}}^{n-2} K_{\text{равн}}^{n-1}/k_n \quad (703)$$

\vdots

$$\tau_j = 1/k_j + \sum_{x=j+1}^n (1/k_x) \prod_{y=j}^{x-1} K_{\text{равн}}^y \quad (704)$$

где $K_{\text{равн}}^j = k_{-j}/k_j$

Для реакции в целом

$$\tau = \sum_{j=1}^n \tau_j \quad (705)$$

Все без исключения вышеприведенные рассуждения основаны на предположении, что не происходит ни взаимодействия, ни комплексообразования между ферментами, ни один из них не влияет на активность другого и не наблюдается канального эффекта (channelling

effect), т. е. прямого переноса промежуточного соединения между активными центрами ферментов. Один из методов обнаружения подобных взаимодействий, в частности, основан на измерении отклонений величин, определенных экспериментально, от предсказанных теоретически для сопряженных ферментативных реакций.

Из выражения (656) видно, что длительность *лаг-периода* (время перехода) является линейной функцией от $1/[E_2]$. Однако, если активность E_2 зависит от присутствия E_1 из-за образования комплекса между ферментами, то данная функция не будет линейной. Подобно этому могут быть получены различные значения V_{\max} при прямых измерениях и из измерений сопряженной реакции (на основе (665)), если E_1 влияет на реакцию, катализируемую E_2 , путем модификации каталитического центра. Однако если E_1 влияет на центр связывания E_2 или преобладает канальный эффект, то значение $K_M^{E_2}$, определенное независимо для E_2 , будет отличаться от значения, полученного на основании изучения сопряженной реакции при помощи уравнения (656).

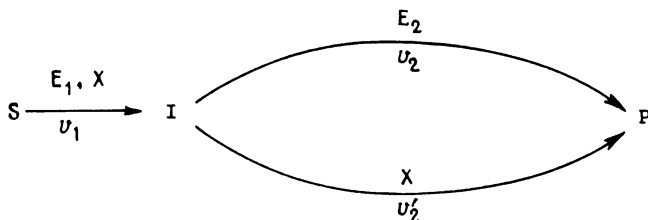
Другой способ анализа взаимодействий между ферментами — изучение влияния комплексообразования на кинетику сопряженной реакции.

Если происходит образование комплекса E_1 с E_2 , то в том случае, когда E_1 насыщен своим субстратом и реакция должна быть нулевого порядка по первому субстрату, можно записать



где X — комплекс E_1SE_2 , а K — его константа диссоциации.

Таким образом, изучаемая реакция имеет вид



Мы предполагаем, что и E_1 , и X катализируют превращение субстрата в промежуточное соединение I со скоростью v_1 , т. е. E_2 не влияет на активность E_1 . Поскольку E_2 катализирует превращение промежуточного соединения в продукт со скоростью v_2 , а соответствующая скорость для X равна v_2' , то, следовательно, E_1 влияет на активность E_2 .

Пусть E_2 имеет n независимых активных центров, а реакция, катализируемая E_2 , является реакцией первого порядка по I ; тогда

$$v_2 = (k_2/K_M)([E_2]_0 - n[X])[I] \quad (707)$$

$$v'_2 = (k'_2/K'_M)n[X][I] \quad (708)$$

где k_2 , k'_2 , K_M и K'_M — микроскопические константы скорости и константы Михаэлиса.

Если $v_1 = \text{const}$, то закон сохранения массы требует (при условии, что при $t = 0$ $[P] = [I] = 0$), чтобы

$$[P] = v_1 t - [I] - v_2/k_2 - v'_2/k'_2 \quad (709)$$

В стационарном состоянии последовательной реакции, если $[I] = [I]_{ss} = \text{const}$, то $v_1 = v_2 + v'_2 = \text{const}$, $[X] = [X]_{ss} = \text{const}$ и

$$[P] = v_1(t - \tau) \quad (\text{ср. (674)}) \quad (710)$$

$$v_1 \tau = [I]_{ss} + v_2/k_2 + v'_2/k'_2 \quad (711)$$

Если выбрать концентрацию $[E_2]_0$ достаточно малой, чтобы можно было использовать выражение (656) вместо (677), и обеспечить $v_1 \ll k_2[E_2]_0$, $k'_2[E_2]_0$, $[E_2]_0 \ll K_M$, K'_M и $[I]_{ss} \ll K_M$, K'_M , то получим

$$v_2 \approx (K_2/K_M)([E_2]_0 - n[X]_{ss})[I]_{ss} \quad (712)$$

$$v'_2 \approx (k'_2/K'_M)n[X]_{ss}[I]_{ss} \quad (713)$$

$$[X]_{ss} \approx (1/2)([E_1]_0 + [E_2]_0/n + K)[1 - \sqrt{1 - 4[E_1]_0[E_2]_0/n([E_1]_0[E_2]_0/n + K)^2}] \quad (714)$$

$$v_1 \tau = [I]_{ss} \quad (715)$$

$$[E_1]_0/(k_2[E_2]_0/K_M - 1/\tau) + K/(k'_2[E_2]_0/K'_M - 1/\tau) \approx \approx (1/n)/(k_2/K_M - k'_2/K'_M) \quad (716)$$

Измерив τ при разных $[E_1]_0$ и $[E_2]_0$, можно с помощью нелинейной регрессии рассчитать k_2/K_M , K'_M и K . Если k_2/K_M известно и $[E_1]_0 = [E_2]_0/n$, то можно также определить k'_2/K'_M и K по следующему уравнению:

$$1/(\tau[E_2]_0) = k'_2/K'_M \pm \sqrt{K|nk_2/K_M - nk'_2/K'_M|} \times \times \sqrt{(1/[E_2]_0)|k_2/K_M - 1/\tau[E_2]_0|} \quad (717)$$

Наиболее чувствительный способ обнаружения канального эффекта при комплексообразовании — это добавление в реакционную смесь меченного изотопами промежуточного соединения с последующим отделением конечного продукта от исходных веществ и про-

межуточного продукта. Если реакция протекает полностью по каналному механизму, то радиоактивность в продукте не обнаруживается. При отсутствии канального механизма изотопная метка равномерно распределяется между промежуточным и конечным продуктами. В случае частичного протекания реакции по каналному механизму радиоактивность продукта обратно пропорциональна доле молекул, превращенных по этому механизму. Разумеется, такой анализ можно проводить и в обратном порядке, т. е. к первому ферменту добавлять радиоактивный субстрат и далее «разбавлять» нерадиоактивным промежуточным продуктом. При протекании реакции полностью по каналному механизму удельная радиоактивность конечного продукта будет той же, что у субстрата первого фермента. При отсутствии такого механизма радиоактивность конечного продукта будет пропорционально уменьшаться с разбавлением, а при частичном протекании реакции по каналному механизму величина разбавления будет обратно пропорциональна доле молекул, превращенных по последнему механизму.

Например, рассмотрим нашу первоначальную систему $A \xrightarrow{v_1} S \xrightarrow{k_2} P$, для которой в стационарном состоянии с учетом (674), (662), (672) справедливо следующее уравнение:

$$[P] = v_1 t + (v_1/k_2)(\exp(-k_2 t) - 1) \quad (718)$$

Если в сопряженную реакцию вводят радиоактивный субстрат A^* и разбавляют систему нерадиоактивным S , то при полном отсутствии канального механизма удельная радиоактивность продукта P равна

$$r_1 = [v_1 t + (v_1/k_2)(\exp(-k_2 t) - 1)]/[v_1 t + (v_1/k_2)(\exp(-k_2 t) - 1) + [S](1 - \exp(-k_2 t))] \quad (719)$$

В случае частичного протекания реакции по каналному механизму

$$r_2 = v_1 t/[v_1 t + [S](1 - \exp(-k_2 t))] \quad (720)$$

а если реакция происходит полностью по каналному механизму, удельная радиоактивность продукта

$$r_3 = 1 \quad (721)$$

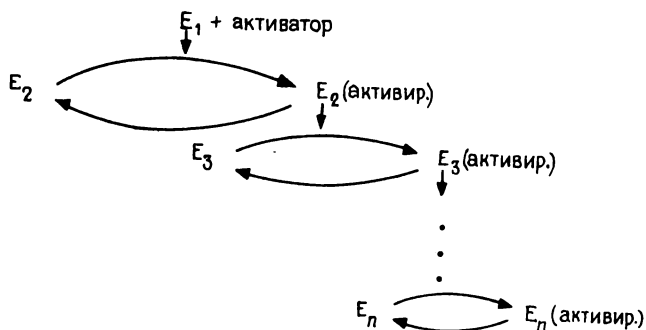
В некоторых случаях ориентировочные сведения о наличии или отсутствии канального механизма можно получить исходя из кинетических данных, полученных при введении нерадиоактивных субстрата и промежуточного соединения.

Канальный эффект можно обнаружить путем улавливания само-

го промежуточного продукта или путем изучения возможных побочных реакций. Улавливание может, например, заключаться в применении подходящего растворителя, растворяющего промежуточный продукт, но не растворяющего субстрат и конечный продукт. Если преобладает канальный эффект, то активность второго фермента не уменьшается (концентрация поступающего к нему промежуточного продукта не изменяется), тогда как в соответствии с долей уменьшения канального эффекта растворитель экстрагирует промежуточный продукт, и из-за этого активность второго фермента убывает. Аналогичный подход — разработанный Фридрихом метод *добавки фермента* (enzyme probe), при котором промежуточный продукт подвергают разложению под действием третьего фермента, добавляемого в систему. При канальном эффекте этот дополнительный фермент не имеет доступа к промежуточному продукту, и поэтому активность второго фермента комплекса не меняется.

Для обнаружения канального эффекта используют также побочные реакции промежуточного продукта. Если, например, промежуточный продукт способен химически взаимодействовать с каким-либо веществом, присутствующим в системе, а субстрат и продукт с этим веществом не взаимодействуют, то о наличии канального эффекта свидетельствует отсутствие второй реакции (о чем можно судить по данным спектрофотометрического, спектрофлуорометрического, микрокалориметрического и других методов).

Наиболее эффективной формой фермент-ферментного взаимодействия являются *каскадные* реакции ферментов. При этом образование ферментного комплекса в действительности заключается в активации второго фермента, который в свою очередь активирует третий, четвертый и т. д. вплоть до n -го фермента.



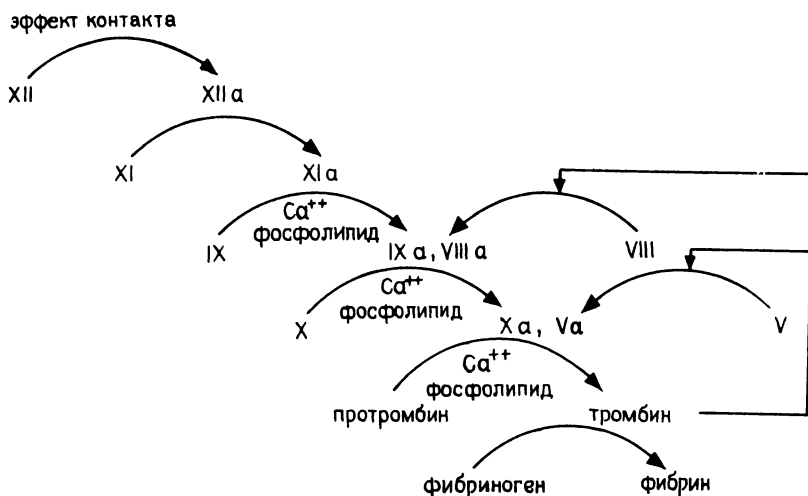


Рис. 47. Схема каскадных реакций при свертывании крови. Факторы VIIIa и Va стимулируют активность факторов IXa и Xa.

Реакция, приводящая к активации, может быть обратимой, если происходит дезактивация под действием другого фермента, или необратимой, если дезактивирующий фермент отсутствует.

В случае обратимой реакции

$$\frac{E_n^{\text{активир}}}{E_n} = \left[\frac{(K_M^E/[E_1 - \text{активатор}] + 1)(k_r/k_f)^n + (k_r/k_f)^{n-1} + \dots + k_r/k_f + 1 \right]^{-1} \quad (722)$$

где k_f и k_r — константы скорости лимитирующих стадий реакций активации и дезактивации соответственно (предполагается, что это величины одного порядка). Если $k_r/k_f = 10$, то в зависимости от числа стадий в каскаде будет происходить относительная активация в 9,1; 83; 833; 8333 и т. д. раз.

Наиболее известная каскадная система, состоящая из необратимых стадий, — свертывание крови, важность которой не нужно объяснять (рис. 47).

3.2.7. Кинетика параллельных ферментативных реакций. В случае параллельных ферментативных реакций два фермента катализируют одну и ту же реакцию. Тогда скорость реакции равна

$$\begin{aligned} v_0 &= [S] V_{\max,1}/(K_{M,1} + [S]) + [S] V_{\max,2}/(K_{M,2} + [S]) = \\ &= [S](K_{M,2} V_{\max,1} + K_{M,1} V_{\max,2}) + [S]^2 (V_{\max,1} + V_{\max,2}) / [K_{M,1} K_{M,2} + [S](K_{M,1} + K_{M,2}) + [S]^2] \end{aligned} \quad (723)$$

Если K_M фермента с большей V_{\max} имеет меньшую величину, то фермент с меньшей V_{\max} , имеющий большую K_M , может не обнаруживаться. Если величины K_M обоих ферментов близки, но значения их V_{\max} различаются, то экспериментальные данные указывают на наличие одного фермента, у которого наблюдаемая $V_{\max, \text{набл}} = V_{\max, 1} + V_{\max, 2}$. Если равны обе величины V_{\max} , а различны K_M , либо и V_{\max} , и K_M различны, то будет наблюдаться кажущаяся активация избытком субстрата.

3.3. СПЕЦИФИЧЕСКОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ

Существуют реагенты, способные взаимодействовать более или менее специфично с той или иной боковой цепью белков, что приводит к ингибированию активности фермента. В принципе это явление позволяет нам изучать природу аминокислотных боковых остатков, принимающих участие в данной ферментативной реакции. Однако на практике следует учитывать многочисленные тонкости, делающие однозначную интерпретацию результатов, полученных со специфическими ингибиторами, довольно трудной и зачастую сомнительной. Прежде всего, чтобы реакция с ингибитором подходила для изучения природы участвующих в реакции боковых цепей, она должна удовлетворять следующим критериям*: 1) быть специфичной, т. е. ингибитор должен блокировать только нужные группы; 2) ингибировать активность фермента, и это ингибирование должно становиться полным при увеличении числа модифицированных групп; 3) реагент не должен вызывать неспецифическую денатурацию белка.

Согласно так называемой «классической» концепции, специфическое ингибирование может быть конкурентным, неконкурентным, бесконкурентным, или смешанным (см. ниже). Однако в настоящее время также выделяют несколько подгрупп, чтобы правильно оценить различные типы ингибирования. Первоначальная номенклатура также была частично изменена.

В данной главе обсуждается обратимое ингибирование только таких ферментативных реакций, которые подчиняются предположению о быстром установлении равновесия.

3.3.1. Конкурентное ингибирование (*competitive inhibition*). Конкурентное ингибирование было открыто при изучении ингибирования,

* Необходимо подчеркнуть, что, даже если эти условия выполняются, нет гарантии, что данная реакция будет практически подходить для указанной цели.

вызываемого аналогами субстрата. Классическим примером тому является ингибирование сукцинатдегидрогеназы малоновой кислотой или ингибирующее действие аналога кофермента, пиридинсульфоновой кислоты, на лактатдегидрогеназу.

В этих случаях химические структуры ингибитора и субстрата аналогичны, поэтому вполне разумным кажется объяснение, что ингибитор связывается с той же группой (группами) на поверхности белка, что и субстрат. Поскольку из-за сходства химической структуры аналог занимает на поверхности фермента участок связывания субстрата, последний не может связаться с белком, и поэтому активность фермента уменьшается. Здесь субстрат и его аналог конкурируют за участок связывания субстрата на белке, и этот тип ингибирования был назван конкурентным.

Такие представления о механизме ингибирования были подтверждены экспериментами по кинетике реакций конкурентного ингибирования. Так, было показано, что в случае конкурентного ингибирования аналог субстрата не влияет на скорость разложения уже образовавшегося комплекса фермент—субстрат, т. е. при использовании «бесконечно большого» избытка субстрата получается одна и та же максимальная скорость как в присутствии, так и в отсутствие ингибитора. Напротив, ингибитор влияет на величину константы диссоциации и константы Михаэлиса. Из этого можно сделать вывод, что ингибитор реагирует с группами белка, участвующими тем или иным образом в связывании субстрата, следовательно, из-за взаимодействия его с этими группами прочность связывания субстрата уменьшается (т. е. уменьшается число молекул фермента, способных связывать субстрат).

Позже было показано, что кинетически конкурентное ингибирование может быть вызвано не только аналогами субстратов, но и другими реагентами, химическая структура которых абсолютно отличается от структуры субстрата. В этих случаях также предполагалось, что данный реагент взаимодействует с группой, ответственной за связывание субстрата.

Теоретически на активном центре фермента можно различить два участка: 1) *центр связывания*, ответственный за связывание субстрата, и 2) *каталитический центр* (или, по другой номенклатуре, *активный центр*), способствующий превращению (разложению) уже связанного субстрата. Эти участки обычно представляются в виде углублений (карманов) на поверхности фермента; они содержат аминокислотные боковые цепи, которые непосредственно принимают участие в связывании или катализе.

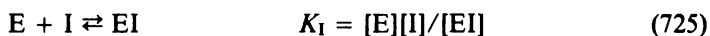
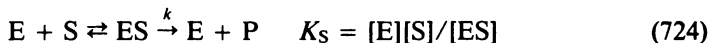
Для конкурентного ингибирования теоретически могут существовать две возможности:

1) связывающие и каталитические центры фермента перекрываются; ингибитор связывается с ними, но влияет только на группы центра связывания;

2) центр связывания и каталитический центр в молекуле фермента пространственно обособлены; ингибитор взаимодействует с центром связывания.

С кинетической точки зрения Диксон подразделил конкурентное ингибирование на два типа.

3.3.1.1. Полностью конкурентное ингибирование (purely competitive inhibition). Все группы, связывающие субстрат, способны реагировать с ингибитором, поэтому, если последний взят в достаточно высокой концентрации, он может полностью блокировать реакцию фермента. В этом случае можно предположить существование следующих элементарных стадий реакции (при условии, что выполняется кинетика Михаэлиса—Ментен со всеми ранее подробно обсужденными предпосылками и ограничениями):



где I — ингибитор, а K_I — константа диссоциации комплекса фермент—ингибитор.

Относительная скорость (отношение скорости ферментативной реакции, измеренной в присутствии ингибитора (v_i), к максимальной скорости) равна

$$v_i/V = [ES]/[E]_T \quad (726)$$

поскольку для общей концентрации фермента справедливо

$$[E]_T = [E] + [ES] + [EI] \quad (727)$$

то

$$1/v_i = (K_S/V[S])(1 + [I]/K_I) + 1/V \quad (728)$$

Очевидно, если $[I] = K_I$, то наклон прямой линии становится вдвое больше, чем для зависимости $1/v_0$ от $[S]$ (v_0 — скорость ферментативной реакции в отсутствие ингибитора).

Тип ингибирования так же, как и значение K_I , обычно определяют графически. При графическом представлении v_0 обозначает начальную скорость независимо от того, измеряем ли мы начальную

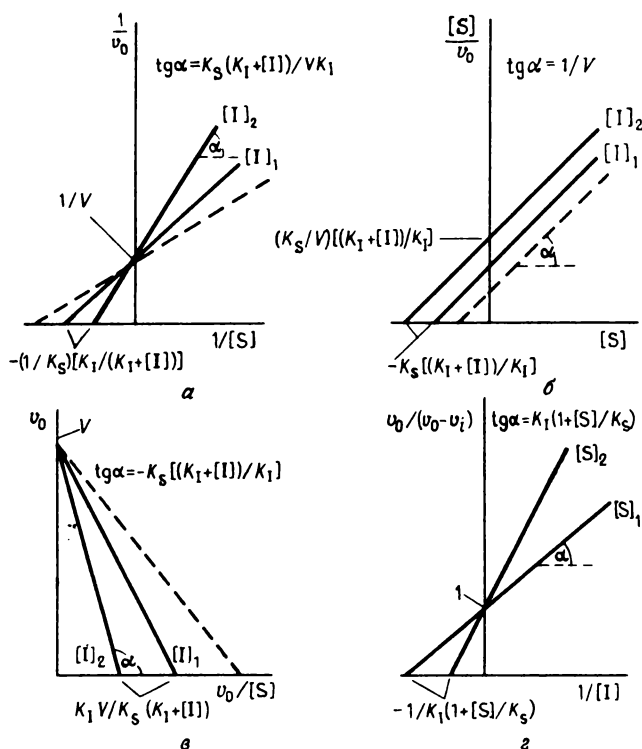


Рис. 48. Графический анализ конкурентного ингибирования. а — график Лайнуивера — Берка; б — график Хейнса; в — график Иди — Хофсти; г — график Уэбба.

скорость неингибированного фермента или начальную скорость реакции, катализируемой ингибированным ферментом (v_i). На рис. 48, а—г приведены графики для конкурентного ингибирования в координатах Лайнуивера—Берка ($1/v_0$ от $1/[S]$), Хейса ($[S]/v_0$ от $[S]$) и Иди—Хофсти (или Августинсона) (v_0 от $v_0/[S]$). Во всех случаях штриховые линии соответствуют значениям, полученным для фермента в отсутствие ингибитора. Чтобы определить тип ингибирования, можно воспользоваться *методом Уэбба*. В этом случае строят зависимость обратной величины доли сохранившейся активности (т. е. активности фермента в присутствии ингибитора по сравнению с активностью неингибированного фермента) $v_0/(v_0 - v_i)$ от $1/[I]$ (рис. 48, г). Напротив, *метод Хантера и Даунса* основан на расчете доли ингибированной активности фермента: ($\alpha \equiv v_i/v_0$).

Поскольку, $1 - \alpha = 1 - v_i/v_0$, то имеем

$$\alpha/(1 - \alpha) = v_i/(v_0 - v_i) \quad (729)$$

Используя эти соотношения, уравнение конкурентного ингибирования можно привести к следующему виду:

$$[I][\alpha/(1 - \alpha)] = K_I + K_I[S]/K_S \quad (730)$$

Строят графическую зависимость $[I][\alpha/(1 - \alpha)]$ от $[S]$ (рис. 49, а).

Для определения константы ингибирования чаще всего используют так называемый *график Диксона*. Уравнение конкурентного ингибирования представляется в следующем виде:

$$1/v_i = (1/V)(1 + K_S/[S] + K_S[I]/V[S]K_I) \quad (731)$$

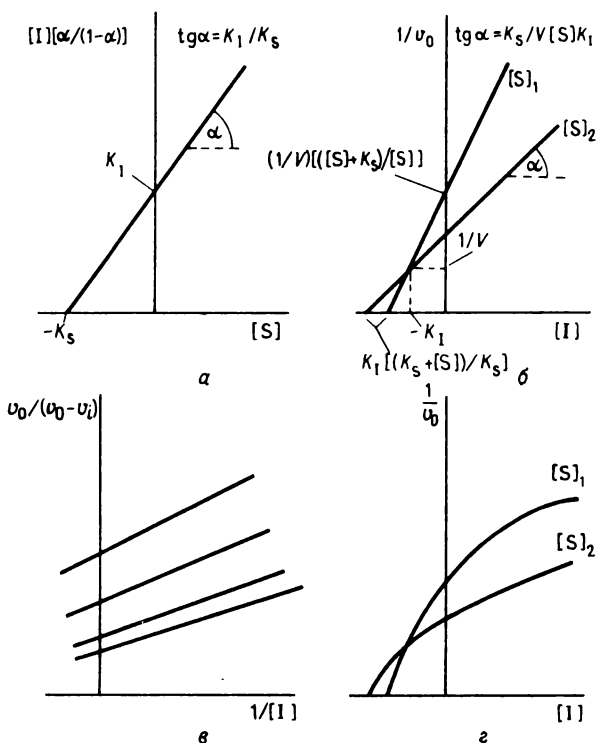
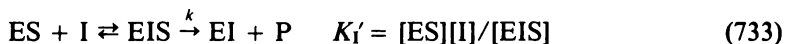
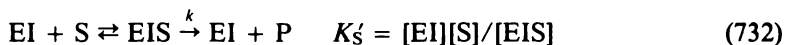


Рис. 49. Графический анализ конкурентного ингибирования. а — график Хантера — Даунса; б — график Диксона; в — график Уэбба для неполностью конкурентного ингибирования; г — график Диксона для неполностью конкурентного ингибирования.

Если построить зависимости $1/v_0$ от $[I]$ при различных $[S]$, то абсцисса общей точки пересечения этих прямых линий дает константу ингибирования (рис. 49,б).

На всех рисунках $[I]_1 < [I]_2$ и $[S]_1 < [S]_2$, а $[I]$ и $[S]$ (без индексов) в уравнениях для наклонов прямых или отсекаемых отрезков относятся к концентрации для соответствующей кривой.

3.3.1.2. Неполностью конкурентное ингибирование (*partially competitive inhibition*). Ингибитор лишь частично блокирует субстратсвязывающие группы фермента, поэтому он не способен полностью помешать присоединению субстрата. Для неполностью конкурентного ингибирования следует рассмотреть такие элементарные стадии:



$$v_i/V = ([ES] + [EIS])/[E]_T \quad (734)$$

$$[E]_T = [E] + [ES] + [EIS] + [EI] \quad (735)$$

$$1/v_i = (K_S/V[S])[K'_I/([I] + K'_I)] + (K'_S/V[S])[([I]/(K'_I + [I]))] + 1/V \quad (736)$$

$$K_I/K'_I = K_S/K'_S \quad (737)$$

Как полностью, так и неполностью конкурентное ингибирование *качественно* дают одни и те же графики в координатах Лайнуивера—Берка, Хейнса, Иди—Хофсти или Хантера и Даунса. Тем не менее эти типы ингибирования можно различить с помощью графиков в координатах Уэбба или Диксона. Согласно первому из этих методов, прямые линии в случае неполностью конкурентного ингибирования не пересекаются на оси ординат, так как для данной концентрации субстрата в присутствии ингибитора, независимо от концентрации субстрата, мы получаем единственную прямую (рис. 49,в). Разные прямые, показанные на рис. 49, в, соответствуют разной силе взаимодействия между субстратом и ингибитором, которая увеличивается от верхних прямых к нижним.

Координаты Диксона не дают прямых линий, поскольку функция $1/v_0$ от $[I]$ является гиперболой (рис. 49,г) или другой нелинейной зависимостью.

Наклон прямых в координатах Лайнуивера—Берка зависит от $[I]$. Это является основой для классификации Келланда. Она разли-

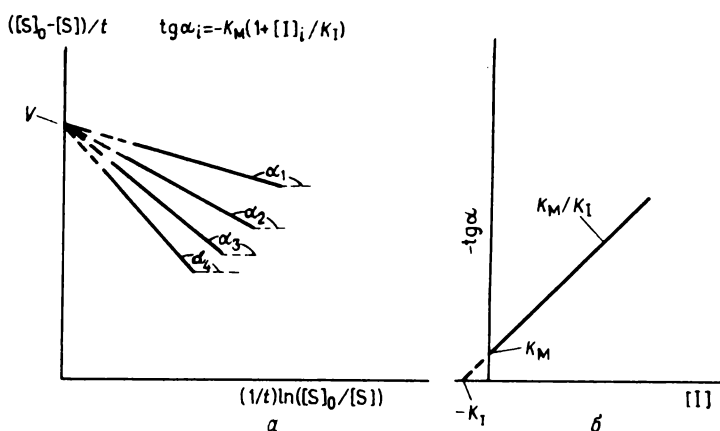


Рис. 50. Графический анализ интегральной формы уравнения для полностью конкурентного ингибирования.

часть *линейное конкурентное ингибирование* (т. е. полностью конкурентное ингибирование, когда наклон прямых линий в двойных обратных координатах является линейной функцией $[I]$), *гиперболическое и параболическое конкурентное ингибирование*. В случае гиперболического ингибирования наклон прямых зависит от $[I]$ по гиперболическому закону, и это соответствует неполному конкурентному ингибированию, детально рассмотренному выше. В случае параболического конкурентного ингибирования, наклон прямой линии в двойных обратных координатах умножается на множитель $(1 + a[I] + b[I]^2)$, что отвечает процессу, в котором с одной субъединицей фермента связываются две молекулы ингибитора. В этом случае координаты Диксона также дают параболу. На еще более сложный механизм указывает зависимость наклона прямой от концентрации ингибитора $[I]$ по так называемой функции $2/1$, когда появляется множитель $(1 + a[I] + b[I]^2)/(1 + c[I])$. Коэффициенты a , b и c обозначают константы.

3.3.1.3. Интегральное уравнение для полностью конкурентного ингибирования. Зависимость полностью конкурентного ингибирования от времени описывается уравнением

$$d[P]/dt = V_{\max}/[1 + K_M/([S_0] - [P])](1 + [I]/K_I) \quad (738)$$

Интегрируем его по t и подставляем значение $[P]$:

$$([S]_0 - [S])/t = V_{\max} - K_M(1 + [I]/K_I)(1/t) \ln([S]_0/[S]) \quad (739)$$

Построив график зависимости $([S]_0 - [S])/t$ от $(1/t) \ln ([S]_0/[S])$, получим прямые, наклон которых является функцией $[I]$ (рис. 50,а).

График зависимости тангенсов угла наклона прямых, взятых с обратным знаком, от $[I]$ представляет собой прямую, пересекающую ось ординат в точке K_M , и ось абсцисс — при $(-K_I)$ (рис. 50,б).

3.3.1.4. Кажущееся конкурентное ингибирование (*apparently competitive inhibition*). В последние годы появились сомнения относительно корректности одинаковой интерпретации конкурентного ингибирования для всех случаев, т. е. утверждения, что при конкурентном ингибировании ингибитор связывается с тем же участком, что и субстрат. В свою очередь было показано, что связывание некоторых ингибиторов с белком изменяет его стерическую структуру. Таким образом, в некоторых случаях причиной ингибирующего эффекта является изменение нативной конформации белка, а не изменение функции модифицированной группы. При этом может наблюдаться ингибирование, по кинетике напоминающее конкурентное. Однако по своему механизму оно не является конкурентным ингибированием, так как ингибитор не взаимодействует с группой, связывающей субстрат. В качестве объяснения можно представить себе следующие возможности:

а) Ингибитор не присоединяется к группе, связывающей субстрат, однако, реагируя с белком, он изменяет его пространственную структуру, тем самым ингибируя его активность (*теория индуцированного несоответствия Герхарта и Парди*). Если субстрат, связанный с белком, принимает некоторое участие в стабилизации нативной конформации белка, то восстановить пространственную структуру, нарушенную ингибитором, можно в присутствии большей концентрации субстрата, и вследствие этого восстановится первоначальная активность фермента. В этих примерах будет наблюдаться кажущееся конкурентное ингибирование, т. е. ингибирование, которое выглядит как конкурентное, но на самом деле таковым не является, так как в отличие от ингибитора субстрат присоединяется к другому участку фермента. Поэтому можно утверждать, что субстрат и ингибитор конкурируют не за участок связывания, а за конформацию, необходимую для проявления активности фермента.

б) Возможна также ситуация, противоположная вышеописанной. Субстрат, связанный с ферментом, модифицирует конформацию белка так, что он становится способным катализировать реакцию (*теория индуцированного соответствия Кошланда*). Если

ингибирующая частица, будучи связанной с белком, препятствует такому действию субстрата, либо она способна возратить модифицированную молекулу в ее исходное (каталитически неактивное) состояние, то также наблюдается кажущееся конкурентное ингибирование, хотя реагент и субстрат и не присоединяются к одним и тем же группам. В обоих случаях (а) и (б) единственное условие, которое должно выполняться, — чтобы действие как субстрата, так и ингибитора было пропорционально их концентрации. Тогда будет преобладать действие того вещества, относительная концентрация которого по сравнению с константой диссоциации будет больше. Если два таких лиганда взаимно препятствуют связыванию друг друга, будет наблюдаться полностью конкурентное ингибирование, тогда как если они лишь ослабляют связывание друг друга, будет наблюдаться кажущееся неполностью конкурентное ингибирование.

Эти представления были подтверждены экспериментальными данными о том, что мочевины и гуанидинхлорид, которые, как известно, изменяют конформацию белков, конкурентно ингибируют некоторые ферменты.

Если приобретение ферментом конформации, необходимой для его каталитической активности, представляется не по модели индуцированного соответствия Кошланда, а согласно *теории флуктуационного соответствия Штрауба—Саболич*, то для кажущегося конкурентного ингибирования мы приходим к аналогичным результатам. Опираясь на теоретические исследования Линдерштрем-Ланга и Шеллмана, эта теория предполагает, что белки-ферменты в растворе могут существовать в виде многочисленных «нативных» структур, находящихся в равновесии, благодаря их практически одинаковой устойчивости. Другими словами, подвижность — главная характеристика структуры белка, и не существует единственной жесткой нативной конформации; пространственная структура фермента непрерывно совершает переходы между несколькими термодинамически разрешенными состояниями. Субстрат может присоединиться к белку только в одном определенном состоянии, причем вследствие образования связи он стабилизирует данную структуру. Так как различные возможные нативные конформации находятся в равновесии друг с другом, присоединение субстрата к этому структурному состоянию приводит к сдвигу равновесия в сторону той конформации, которую стабилизирует субстрат. Возможный механизм появления кажущегося конкурентного ингибирования может следовать той же логике, что и для уже описанной модели индуцированного соответствия.

в) Хотя ингибитор и субстрат связаны с разными группами, все же первый способен стерически затруднять присоединение последнего, например, если группы, связывающие эти два вещества, расположены достаточно близко друг к другу, либо если обе молекулы или одна из них являются достаточно крупными. Данная (последняя) возможность особенно легко реализуется, если ингибитор также является белком (например, антитело в иммунохимических исследованиях) и поэтому соизмерим с молекулой фермента. Если связывание зависит от относительных концентраций антитела-ингибитора и субстрата, вытесняющих друг друга с поверхности фермента, может наблюдаться кажущееся конкурентное ингибирование. Так, например, при изучении ингибирования, вызываемого четвертичными солями аммония различного размера, по отношению к активности ацетилхолинэстеразы удалось определить расстояние между центрами связывания аниона и расщепления эфирной связи, равное 0,5 нм.

г) Аллостерическое конкурентное ингибирование также является одной из форм кажущегося конкурентного ингибирования. Однако, учитывая его важнейшую роль в регуляции метаболизма, целесообразно рассмотреть его более детально ниже (см. разд. 3.8).

3.3.2. Неконкурентное ингибирование (*non-competitive inhibition*).

При неконкурентном ингибировании специфический ингибитор не влияет на константу диссоциации комплекса фермент—субстрат. С другой стороны, максимально достижимая скорость реакции меньше в присутствии ингибитора, чем в его отсутствие, даже при бесконечно большом избытке субстрата. Наличие ингибирования доказывает, что ингибитор связывается с белком. Неизменность константы диссоциации как в присутствии, так и в отсутствие ингибитора в свою очередь указывает на то, что в отличие от субстрата ингибитор связывается с другой группой. С теоретической точки зрения, механизм подобного ингибирования может быть интерпретирован различными способами.

а) Центр связывания и каталитический центр фермента различны. В этом случае ингибитор, связанный с каталитическим центром, уменьшает активность фермента и максимально достигаемую скорость, не влияя на образование комплекса фермента с субстратом.

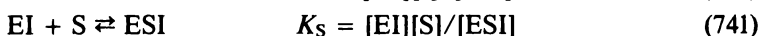
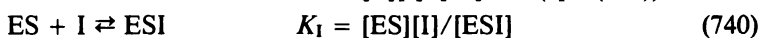
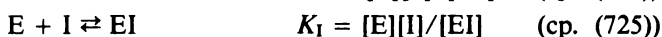
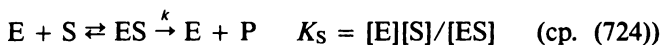
б) Центр связывания и каталитический центр перекрываются на поверхности фермента, а ингибитор связывается с другими группами белка. Благодаря связыванию ингибитора с поверхностью фермента конформация белка изменяется и становится неблагоприят-

ной для осуществления катализа, несмотря на легкость образования комплекса фермента с субстратом и неизменность константы его диссоциации.

в) Ингибитор не связывается ни с каталитическим центром, ни с центром связывания, и при этом не влияет на конформацию белка. Тем не менее он может локально изменять распределение заряда на участке поверхности белка. Ингибирование активности может происходить и в этом случае, если, например, делается невозможной ионизация групп, существенных для проявления активности, или, если наоборот происходит ионизация групп, активных только в неионизованной форме. Такое явление наблюдается главным образом при использовании сильноокислых или сильнощелочных реагентов. Например, в случае фумаразы ингибирующее действие одновалентных ионов можно объяснить исходя из предположения, что они влияют на ионизацию групп в каталитической полости.

Кинетически неконкурентное ингибирование можно разделить на две подгруппы (разд. 3.3.2.1 и 3.3.2.2).

3.3.2.1. Полностью неконкурентное ингибирование (*purely non-competitive inhibition*). Ингибитор и субстрат не влияют на связывание друг друга с ферментом, но комплексы фермента, содержащие ингибитор, совершенно неактивны. В таком случае можно предположить следующие элементарные стадии:



$$v_i/V = [ES]/[E]_T \quad (\text{ср. (726)})$$

$$[E]_T = [E] + [ES] + [EI] + [ESI] \quad (\text{ср. (735)})$$

$$1/v_i = (K_s/V[S])(1 + [I]/K_i) + (1/V)(1 + [I]/K_i) \quad (742)$$

Если $[I] = K_i$, величины наклонов прямых и ординаты точки пересечения с вертикальной осью удваиваются по сравнению с $1/v_0$. Графическое представление полностью неконкурентного ингибирования показано на рис. 51, а—е в координатах Лайнуивера—Берка, Хейнса, Иди—Хофсти, Узбба, Хантера и Даунса и Диксона соответственно.

3.3.2.2. Неполностью неконкурентное ингибирование (*partially non-competitive inhibition*). Комплексы, содержащие ингибитор, частично сохраняют активность и могут превращать субстрат, хотя и с меньшей скоростью. В этом случае элементарные стадии, которые

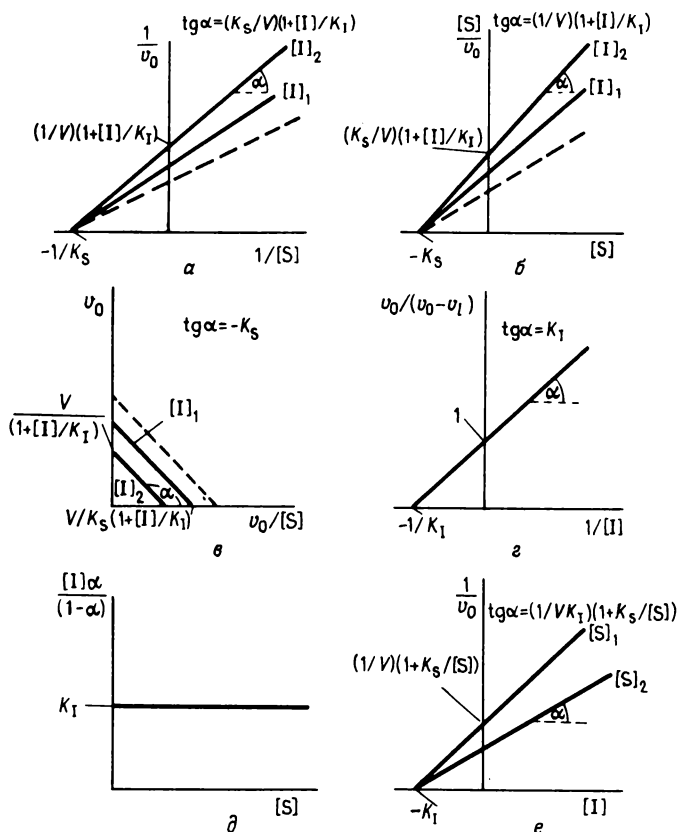
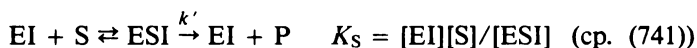
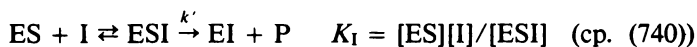


Рис. 51. Графический анализ неконкурентного ингибирования в координатах: а — Лайнуивера — Берка; б — Хейнса; в — Илли — Хофсти; г — Уэбба; д — Хантера — Даунса; е — Диксона.

следует принимать во внимание, таковы:



$$v_i = (V'[ES] + V''[ESI])/[E]_T \quad (743)$$

$$[E]_T = [E] + [ES] + [EI] + [ESI] \quad (\text{ср. (735)})$$

$$1/v_i = [(K_I + [I])/(V'K_I + V''[I])(1 + K_S/[S])] \quad (744)$$

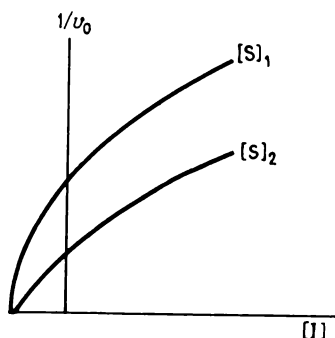


Рис. 52. График Диксона для не полностью неконкурентного ингибирования.

где V' и V'' — максимальные скорости разложения комплексов ES и ESI соответственно. В действительности $V' = V_{\max}$, и мы используем различные обозначения только для того, чтобы привлечь внимание к необходимости проведения расчетов с двумя видами скорости.

Неполностью неконкурентное ингибирование в координатах Лайнуивера—Берка, Хейнса, Иди—Хофсти, Хантера и Даунса и Уэбба дает кривые, аналогичные кривым для случая полностью неконкурентного ингибирования. Эти два вида ингибирования можно отличить только в координатах Диксона, поскольку в них получаются гиперболы (рис. 52), параболы и другие кривые в отличие от прямых линий, характерных для полностью неконкурентного ингибирования.

Для неконкурентного ингибирования и ордината точки пересечения прямых с вертикальной осью, и наклон прямых являются функцией от $[I]$. Полностью неконкурентное ингибирование, согласно Келланду, является простым неконкурентным ингибированием с линейными зависимостями ординат точек пересечения и наклонов от $[I]$. Келланд различает типы неконкурентного ингибирования с линейной зависимостью ординаты и параболической зависимостью наклона, параболической зависимостью ординаты и параболической зависимостью наклона, гиперболической зависимостью ординаты и зависимостью наклона по функции $2/1$ и т. д. (возможны любые комбинации зависимостей ординаты и наклона от $[I]$ согласно линейной, гиперболической, параболической и $2/1$ -функциям). Все они принадлежат к группе неконкурентного ингибирования.

Подобный анализ, т. е. построение вторичной зависимости ординат точек пересечения с вертикальной осью и наклонов прямых в координатах Лайнуивера—Берка от концентрации ингибитора дает новую информацию о механизме ингибирования.

3.3.2.3. *Интегральное уравнение для полностью неконкурентного ингибирования.* Уравнение зависимости скорости реакции от времени для полностью неконкурентного ингибирования:

$$d[P]dt = V_{\max}/[1 + [I]/K_I + K_M/([S]_0 - [P])(1 + [I]/K_I)] \quad (745)$$

После интегрирования и подстановки значения $[P]$ получаем

$$([S]_0 - [S])/t = V_{\max}/(1 + [I]/K_I) - K_M(1/t) \ln ([S]_0/[S]) \quad (746)$$

Графическое представление уравнения (746) показано на рис. 53,а. Наклон прямых линий равен $(-K_M)$, а ордината их пересечения с вертикальной осью является функцией $[I]$. На рис. 53,б продемонстрировано, что путем построения графика зависимости величин, обратных ординатам точек пересечения, от $[I]$ получают прямую линию, отсекающую на осях координат отрезки, из которых можно определить $(1/V_{\max})$ и $(-K_I)$.

3.3.2.4. *Кажущееся неконкурентное ингибирование.* Если ингибитор способен связываться с центром связывания субстрата (конкурирующий компонент), а также с другим участком молекулы белка в комплексе фермент—субстрат (неконкурирующий компонент, см. разд. 3.3.3), в некоторых случаях может наблюдаться ингибирование, формально аналогичное неконкурентному. Условием для этого является равенство константы диссоциации комплекса фермент—ингибитор и константы диссоциации тройного комплекса фермент—ингибитор—субстрат при отщеплении ингибитора.

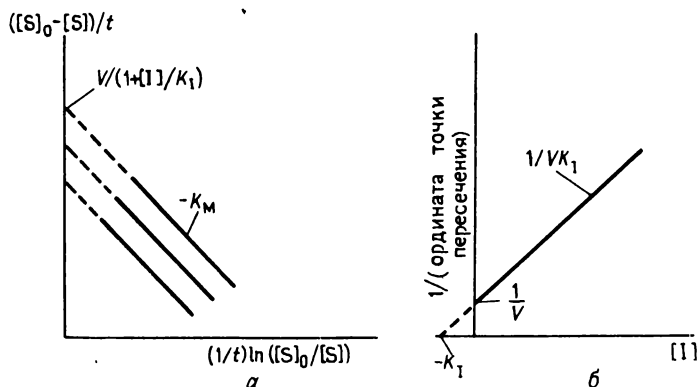
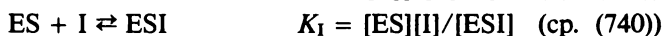
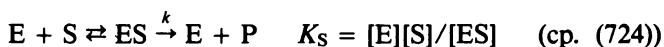


Рис. 53. Графический анализ интегрального уравнения для полностью неконкурентного ингибирования.

3.3.3. Бесконкурентное ингибирование (*incompetitive inhibition*). Этот тип ингибирования в литературе называют также *антиконкурентным* или *сопряженным ингибированием*, однако термин «бесконкурентное ингибирование» используется наиболее широко. Характеристикой этого типа ингибирования является то, что ингибитор не способен присоединяться к ферменту, но он присоединяется к комплексу фермент—субстрат. Здесь также можно выделить несколько разновидностей.

3.3.3.1. Полностью бесконкурентное ингибирование (*purely uncompetitive inhibition*). В этом случае комплекс, содержащий ингибитор, полностью неактивен



$$v_i/V = [ES]/[E] \quad (\text{ср. (726)})$$

$$[E]_T = [E] + [ES] + [ESI] \quad (747)$$

$$1/v_i = K_S/V[S] + (1/V)(1 + [I]/K_I) \quad (748)$$

Графики для полностью бесконкурентного ингибирования в координатах Лайнуивера—Берка, Хейнса, Иди—Хофсти (называемых некоторыми авторами также координатами Августинсона), Хантера — Даунса, Узбба и Диксона приведены на рис. 54, *a—e* соответственно.

3.3.3.2. Неполностью бесконкурентное ингибирование (*partially uncompetitive inhibition*). Здесь ингибитор также может связываться с уже образовавшимся комплексом фермент—субстрат, а не со свободным ферментом, но комплекс, содержащий ингибитор, частично активен, скорость его разложения ниже, чем для фермент-субстратного комплекса в отсутствие ингибитора:



$$v_i = ([ES]V' + [ESI]V'')/[E]_T \quad (\text{ср. (743)})$$

$$[E]_T = [E] + [ES] + [ESI] \quad (\text{ср. (747)})$$

$$1/v_i = [1/(V'K_I + V''[I])][[I] + K_I(1 + K_S/[S])] \quad (749)$$

Графическое представление данного типа ингибирования любым из уже обсуждавшихся способов дает графики, идентичные графикам ингибирования смешанного типа (см. ниже, разд. 3.3.4,

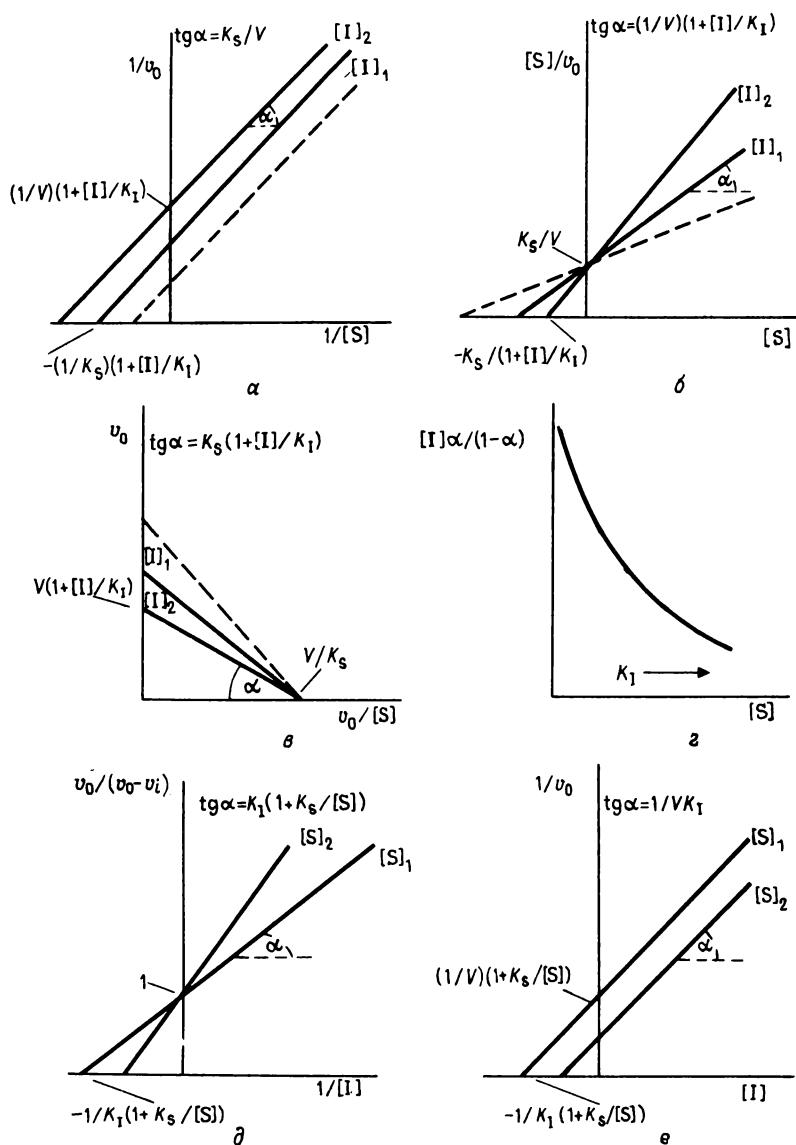


Рис. 54. Графическое представление бесконкурентного ингибирования в координатах:
 а — Лайнуивера — Берка; б — Хейнса; в — Иди — Хофсти; г — Хантера — Даунса;
 д — Уэбба; е — Диксона.

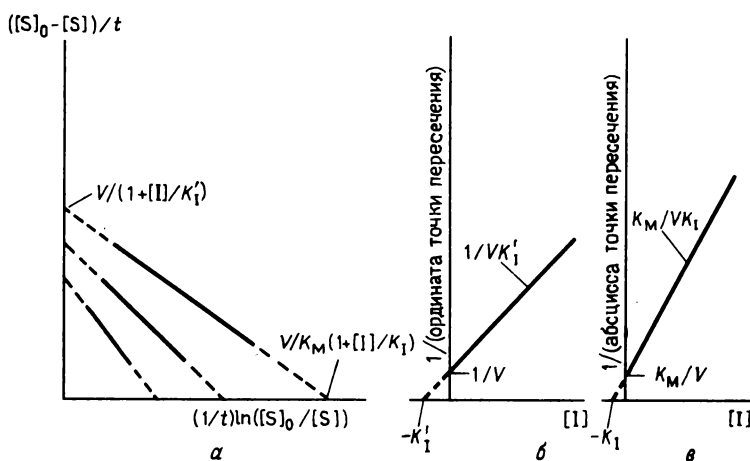


Рис. 55. Графический анализ интегрального уравнения для полностью бесконкурентного ингибирования.

рис. 56). Единственным различием между этими типами ингибирования является то, что координаты пересечения с осями абсцисс и ординат противоположным образом зависят от $[I]$ и K_I , т. е. для неполностью бесконкурентного ингибирования точка пересечения прямых с осью ординат зависит от указанных параметров таким же образом, как координата точки пересечения прямых с осью абсцисс для смешанного ингибирования.

3.3.3.3. Интегральное уравнение для полностью бесконкурентного ингибирования. Зависимость скорости реакции от времени для полностью бесконкурентного ингибирования выглядит следующим образом:

$$d[P]/dt = V_{\max} / \{ (1 + [I]/K_I) + [K_M/([S]_0 - [P])] \} \quad (750)$$

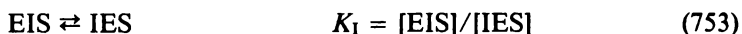
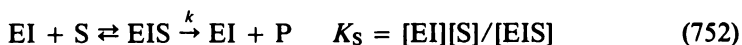
Интегрирование и подстановка значения $[P]$ приводит к уравнению

$$([S]_0 - [S])/t = V_{\max} / (1 + [I]/K_I) - [K_M / (1 + [I]/K_I)t] \ln ([S]_0/[S]) \quad (751)$$

Таким образом, при обычном графическом представлении концентрация ингибитора влияет как на наклон, так и на ординату точки пересечения с вертикальной осью (рис. 55,а). Строя график зависимости величины, обратной наклону, с противоположным знаком от $[I]$, получаем K_M и K_I (рис. 55,б), а график зависимости

величины, обратной ординате точки пересечения с осью Y , от $[I]$ дает величины V_{\max} и K_I (рис. 55,б).

3.3.3.4. *Кажущееся бесконкурентное ингибирование (apparently uncompetitive inhibition)*. Это фактически случай, противоположный полностью неконкурентному ингибированию. Субстрат не реагирует со свободным ферментом, а реагирует только с уже образовавшимся комплексом фермент—ингибитор. Образованный таким образом тройной комплекс претерпевает внутримолекулярную перегруппировку или конформационное изменение, и получается неактивный комплекс. Константа равновесия этой реакции — K_I — здесь является не константой диссоциации комплекса фермент—ингибитор, а так называемой «константой внутренней конверсии»:



$$v_i/V = [EIS]/[E]_T \quad (754)$$

$$[E]_T = [EI] + [EIS] + [IES] \quad (755)$$

$$1/v_i = K_S/V[S] + (1/V)(1 + 1/K_I) \quad (756)$$

Данный тип ингибирования в любых указанных координатах дает графики, аналогичные графикам для случая полностью бесконкурентного ингибирования, и его можно отличить от последнего благодаря тому, что координаты точек пересечения прямых с осями абсцисс и ординат зависят только от K_I . Они не зависят от $[I]$, так как свободный ингибитор не присутствует в смеси, а содержится в виде комплекса с ферментом.

Кажущееся бесконкурентное ингибирование также может наблюдаться и в других случаях, или по крайней мере кинетический анализ может указывать на подобие бесконкурентного ингибирования. Однако фактически может не выполняться условие, согласно которому ингибитор связывается только с комплексом фермент—субстрат.

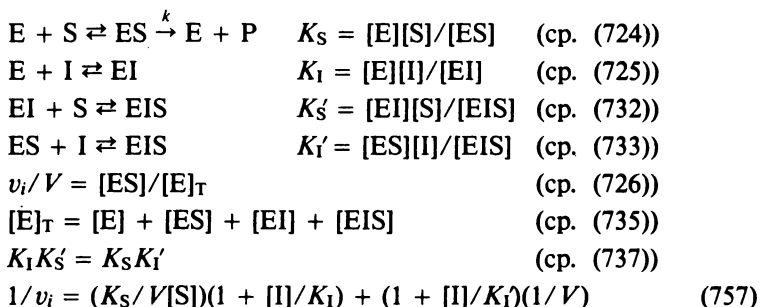
Таков, например, случай, когда ферментативная реакция находится в стационарном состоянии по Бриггсу—Холдейну, а не подчиняется кинетике Михаэлиса—Ментен, но $k_{-1} \ll k_2$, т. е. $K_k = k_2/k_1$ (кинетическая константа), и ингибитор уменьшает значение k_2 .

Аналогично можно наблюдать кажущееся бесконкурентное ингибирование, если константы диссоциации комплексов фермент—субстрат и ингибитор—фермент—субстрат связаны друг с другом, как связаны константы скорости распада комплексов фермент—субстрат и ингибитор—фермент—субстрат.

Бесконкурентное ингибирование также может быть разделено на подгруппы, такие, как ингибирование, имеющее линейные зависимости ординаты точки пересечения графиков с вертикальной осью и наклона прямых от [I] (для полностью бесконкурентного ингибирования), или типы ингибирования, при которых либо ордината точки пересечения с вертикальной осью, либо наклон является гиперболической, параболической или 2/1-функцией от [I] (для полностью бесконкурентного ингибирования).

3.3.4. Ингибирование смешанного типа (*mixed type inhibition*). Как при бесконкурентном, так и при смешанном ингибировании ингибитор действует и на участок связывания, и на каталитический центр фермента, независимо от того, перекрываются они или нет. Однако если при бесконкурентном ингибировании ингибитор снижает и константу диссоциации субстрата, и максимальную скорость реакции, при смешанном ингибировании он увеличивает константу диссоциации и уменьшает максимальную скорость. Ингибирование смешанного типа можно представить себе как состоящее из конкурентного и неконкурентного ингибирования, но константы диссоциации отличаются друг от друга в зависимости от того, относятся они к свободному ферменту или к комплексу.

В данном случае фактически образуются как двойной комплекс фермент—ингибитор, так и тройной комплекс ингибитор—фермент—субстрат, и оба комплекса каталитически неактивны:



Графики для ингибирования смешанного типа в координатах Лайнуивера—Берка, Хейнса, Иди—Хофсти, Хантера и Даунса, Уэбба и Диксона показаны на рис. 56, *a—e* соответственно.

Следует отметить, что по номенклатуре Келланда и неконкурентное, и смешанное ингибирование называется неконкурентным, так как в обоих случаях координаты точек пересечения графиков с осью ординат и наклоны графиков являются однотипными функ-

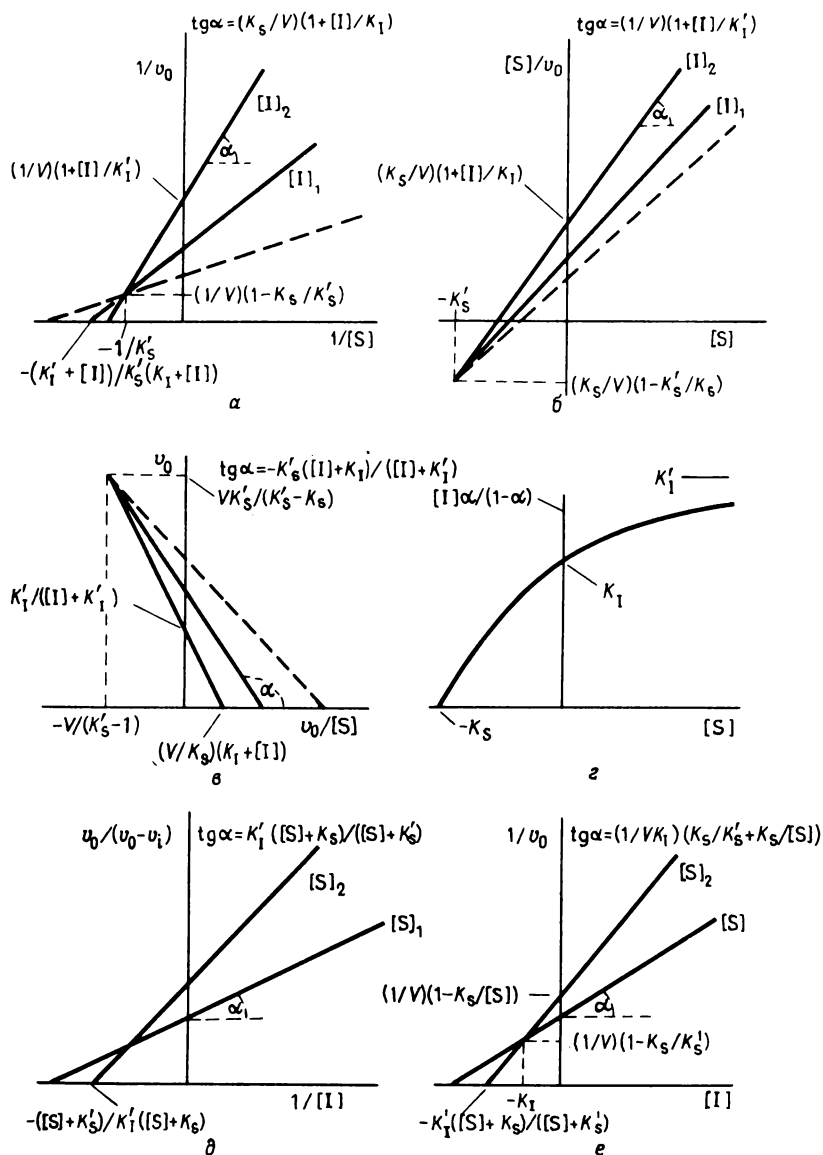


Рис. 56. Графическое представление смешанного ингибирования в координатах: а — Лайнуивера — Берка; б — Хейнса; в — Иди — Хофсти; г — Хантера — Даунса; д — Уэбба; е — Диксона.

циями [I]. Первый из указанных случаев Келланд называет «простым неконкурентным ингибированием», отличая его тем самым от смешанного ингибирования по Диксону, которое он называет неконкурентным ингибированием.

Конечно, смешанное ингибирование также может быть с линейными, гиперболическими, параболическими или подчиняющимися 2/1-функции зависимостями ординат точек пересечения с осью Y и наклонов прямых в любых комбинациях.

3.3.4.1. Интегральное уравнение для смешанного ингибирования. Уравнение, описывающее зависимость скорости реакции от времени для смешанного ингибирования, имеет вид

$$d[P]/dt = V_{\max} / \{ (1 + [I]/K_I) + [K_M / ([S]_0 - [P]) (1 + [I]/K_I)] \} \quad (758)$$

Интегрирование и подстановка в него значения [P] приводит к уравнению

$$([S]_0 - [S])/t = V_{\max} / (1 + [I]/K_I) - [K_M (1 + [I]/K_I) / (1 + [I]/K_I) t] \ln ([S]_0/[S]) \quad (759)$$

Из рис. 57, а очевидно, что положение точек пересечения графиков с осями ординат и абсцисс зависят от [I]. Это позволяет определить константы путем построения вторичных графиков (рис. 57, б и в).

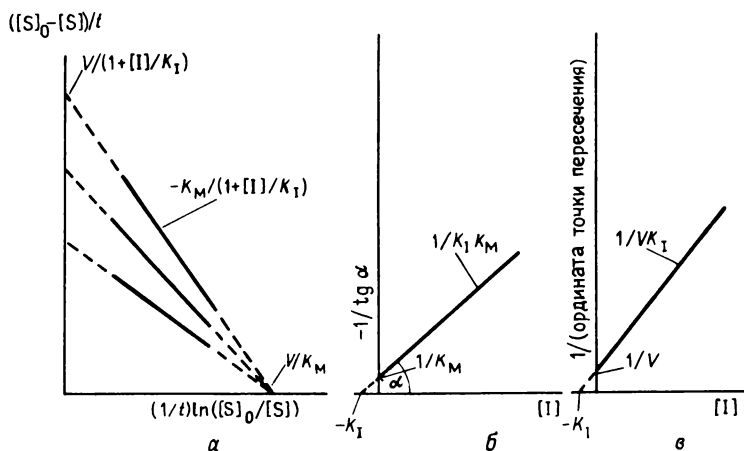


Рис. 57. Графический анализ интегрального уравнения для смешанного ингибирования. $K_I < K'_I$.

3.3.5. Проблемы интерпретации различных типов ингибирования.

Существуют также некоторые другие, особые виды ингибирования, но они встречаются крайне редко так что мы не будем на них останавливаться. Тем не менее следует выделить два важных аспекта, связанных со специфическим ингибированием.

Интерпретация результатов, полученных при специфическом ингибировании, часто вызывает затруднения. Трудно решить однозначно, является ли конкурентное ингибирование лишь кажущимся конкурентным или нет и т. д., т. е. является ли наблюдаемое ингибирование действительно прямым следствием модификации боковых цепей или это только результат вторичной реакции вследствие конформационных изменений, происходящих после блокирования боковой цепи. Если изменение конформации обнаруживается после блокирования боковой цепи, следует тщательно исследовать, является ли ингибирование активности лишь вторичным следствием конформационных изменений или нет. Следует помнить, что относительно малочувствительные физико-химические методы, доступные в настоящее время, не всегда могут надежно зарегистрировать тонкие конформационные изменения, порой локализованные лишь на крошечном участке фермента (возможно, лишь на его активном центре). Поэтому, если отсутствуют (не обнаруживаются) изменения пространственной структуры после блокирования боковых цепей, это еще не является доказательством того, что исключается возможность вторичного эффекта.

Следует четко различать аспекты ингибирования, связанные с кинетикой и механизмом ингибирования. Если ингибитор конкурирует с субстратом за центр связывания, то механизм ингибирования, действительно, конкурентный. Однако, как мы видели, ингибитор, имеющий признаки конкурентного, не обязательно действует по конкурентному механизму. Как подробно обсуждалось выше, то же справедливо и для неконкурентных ингибиторов, для которых неконкурентный тип кинетической схемы не доказывает однозначно идентичность механизма ингибирования с кинетическим поведением системы.

Другая проблема, которую следует выделить, — то, что уравнения и графические представления для обсуждавшихся типов ингибирования справедливы только в тех случаях, когда механизм реакции соответствует предположению Михаэлиса—Ментен о быстро устанавливаемом равновесии. Именно поэтому мы всегда считаем необратимой стадией, ведущую к образованию продукта.

Было показано, что и кинетическое уравнение, и графические

представления для случая полностью конкурентного ингибирования одинаковы независимо от того, подчиняется ли реакция, катализируемая ферментом, механизму с быстро устанавливающимся равновесием или механизму Бриггса—Холдейна со стационарным состоянием. Однако во всех других случаях ингибирования ферментативных реакций, подчиняющихся механизму со стационарным состоянием, линейные зависимости не наблюдаются (или наблюдаются только при весьма специальных условиях). Вследствие этого определение отдельных кинетических констант и даже типа ингибирования может быть затруднено. Уравнения для реакций в стационарном состоянии для различных типов ингибирования здесь не будут рассмотрены ввиду их относительной сложности.

Для многосубстратных реакций, если не определен порядок связывания субстратов и если реакция протекает по механизму со стационарным состоянием, кинетика реакции будет соответствовать кажущемуся ингибированию или активации в зависимости от реального механизма. Это будет рассмотрено в разд. 3.10.1 и 3.11.1, касающихся многосубстратных реакций, так как здесь ингибирование является только кажущимся, как следует из конкретного механизма (см. разд. 3.13).

Другой очевидный эффект — изменение конформации фермента по мере протекания реакции, что также иногда может влиять на кинетику ферментативной реакции. Более того, изменение конформации может вызывать кажущееся ингибирование или активацию в зависимости от конкретного механизма, а также от того обстоятельства, протекает ли реакция в соответствии с предположением о быстром установлении равновесия или о наличии стационарного состояния.

Особый случай ингибирования ферментативной реакции — ингибирование избытком субстрата или продукта реакции. Ввиду его особого характера и большой важности этот случай будет рассмотрен отдельно в разд. 3.3.12.

3.3.6. Определение констант ингибирования. Константу диссоциации или константу Михаэлиса фермент-субстратного комплекса и максимальную скорость обычно определяют с помощью графика Лайнуивера—Берка (хотя, как мы уже отмечали, это наименее точный метод). Для измерения константы диссоциации (K_1) комплекса фермент—ингибитор чаще всего используют график Диксона. Этот метод требует измерения изменения скорости реакции при нескольких заданных постоянных концентрациях субстрата при изменении

концентрации ингибитора. В некоторых случаях это оказывается затруднительным. Например, весьма сложно определить константу диссоциации (K_I') для отщепления ингибитора от комплекса фермент—субстрат и измерить скорость разложения (V'') тройного комплекса фермент—субстрат—ингибитор с образованием продукта. При некоторых типах ингибирования эти константы можно оценить с помощью простого графика Лайнуивера—Берка, хотя при этом не достигается точность, которую обеспечивает график Диксона.

В табл. VII приведены обозначения, которые будут использоваться ниже.

По координатам точек пересечения графиков с осями и тангенсам угла наклона константы ингибирования можно рассчитать следующим образом.

Полностью конкурентное ингибирование:

$$K_I = b[I]/(a - b) = c[I]/(d - c) \quad (760)$$

Таблица VII. Обозначения в уравнениях для расчета констант ингибирования

	График Лайнуивера—Берка		Наклон
	Величины отрезка, отсекаемого		
	на оси X	на оси Y	
Реакция в отсутствие ингибитора	a	e	c
Реакция в присутствии ингибитора	b	f	d

Полностью неконкурентное ингибирование:

$$K_I = c[I]/(d - c) = e[I]/(f - e) \quad (761)$$

Полностью бесконкурентное ингибирование:

$$K_I = e[I]/(f - e) = a[I]/(b - a) \quad (762)$$

Неполностью бесконкурентное ингибирование:

$$K_I = a[I]/(b - a), \quad V'' = (eb - fa)/ef(b - a) \quad (763, 764)$$

Смешанное ингибирование:

$$K_I = c[I]/(d - c), \quad K_I' = e[I]/(f - e) \quad (765a, 765b)$$

$$K_S' = -(d - c)/(f - e) \quad (766)$$

С помощью приведенных соотношений можно одновременно определить все константы ингибирования ферментативных реакций, а также тип ингибирования.

Однако данный метод не следует использовать в случае неполностью конкурентного или неполностью неконкурентного ингибирования, так как число независимых уравнений при этом меньше числа неизвестных.

Для полностью конкурентного ингибирования K_I можно быстро определить из разности интегральных уравнений для реакции в присутствии и в отсутствие ингибитора. В отсутствие ингибитора

$$t_c = ([S]_0 - [S])/V_{\max} + (K_M/V_{\max}) \ln ([S]_0/[S]) \quad (\text{см. (461)})$$

а в присутствии конкурентного ингибитора

$$t = ([S]_0 - [S])/V_{\max} + (K_M/V_{\max})(1 + [I]/K_I) \ln ([S]_0/[S]) \quad (\text{см. (739)})$$

где t и t_c — времена, необходимые для образования одинакового количества продукта при протекании реакции в присутствии и в отсутствие ингибитора соответственно.

Вычитая второе уравнение из первого и предполагая, что оба эксперимента проводились при одинаковой концентрации фермента, получаем

$$t - t_c = (K_M/V_{\max})([I]/K_I) \ln ([S]_0/[S]) \quad (767)$$

Построив график зависимости $(t - t_c)$ от $\ln ([S]_0/[S])$, можно рассчитать значение K_I из наклона прямой, равного $K_M[I]/V_{\max}K_I$ (если известны K_M , V_{\max} и $[I]$).

Для смешанного ингибирования

$$t - t_c = ([I]/V_{\max}K_I')([S]_0 - [S]) + (K_M[I]/V_{\max}K_I) \ln ([S]_0/[S]) \quad (768)$$

Если среднее значение $[S]$ аппроксимировать $([S]_0 + [S'])/2$ (см. (447)), то можно построить график зависимости наклона $([I]/V_{\max}K_I')[S'] + K_M[I]/V_{\max}K_I$ от $[S']$ и из наклона и отрезков, отсекаемых на осях вторичного графика, определить K_I и K_I' .

В фармакологии часто используется величина $[I]_{50}$. Это концентрация ингибитора, необходимая для ингибирования реакции наполовину. Часто считают, что $[I]_{50}$ равна K_I , хотя это справедливо только для полностью неконкурентного ингибирования. Соотношения между $[I]_{50}$ и K_I для разных типов ингибирования приведены в табл. VIII.

Методы, используемые для определения числа молекул ингибитора, связанных с белком, подробно рассмотрены выше (см.

разд. 3.2.2). Простейший из них — применение модифицированного уравнения Хилла (ср. (439)) при условии, что отсутствует взаимодействие между связанными молекулами ингибитора:

$$\lg [(v_0 - v_i)/v_i] = n \lg ([I]/K) \quad (\text{ср. (493)})$$

где v_0 и v_i — начальные скорости реакции в отсутствие ингибитора и при концентрации ингибитора, равной $[I]$, соответственно. Стехиометрический коэффициент n можно получить из наклона прямой линии в координатах $\{\lg [(v_0 - v_i)/v_i]; [I]\}$ в логарифмической шкале. Важно помнить, что коэффициент K в этом уравнении совершенно не связан с K_M , K_S или K_I . Он является комбинацией констант, а также содержит концентрацию субстрата (см. (567)).

Таблица VIII. Соотношения между $[I]_{50}$ и K_I для ингибирования полностью по указанному типу ^a

Тип ингибирования	$[I]_{50}$
Конкурентное	$(K_M + [S])K_I/K_M$
Неконкурентное	K_I
Бесконкурентное	$(K_M + [S])K_I/[S]$
Смешанное	$(K_M + [S])K_I K_I' / (K_M K_I' + K_I [S])$

^a Для случаев ингибирования неполностью по данному типу такие простые соотношения отсутствуют.

Подобно линеаризации уравнения Михаэлиса—Ментен, для определения типа ингибирования лучше применять график Хейнса, Иди—Хофсти или Диксона, чем график Лайнуивера—Берка. Широкое применение графика в двойных обратных координатах объясняется удобством сравнения результатов с полученными ранее данными. Кроме того, этот метод был разработан для определения кинетических параметров двух- и трехсубстратных реакций и требует наименьшего количества расчетов. Наконец, с помощью такого графического представления наиболее просто аппроксимировать экспериментальные точки, имеющие разброс, прямой линией (и из-за этого метод наименее точен). Наиболее точные результаты могут быть получены аппроксимацией кривых накопления продуктов с помощью нелинейной регрессии и определения констант методом итерации. Без сомнения, по мере распространения микрокомпьютеров будет использоваться исключительно данный метод, а графические методы постепенно потеряют свое значение.

3.3.7. Системы со взаимным истощением или псевдонеобратимое ингибирование. Приведенные выше рассуждения основывались на двух принципиальных предположениях. Во-первых, что реакция подчиняется кинетике Михаэлиса—Ментен, и, во-вторых, что изменением концентрации ингибитора по сравнению с его исходной концентрацией можно пренебречь, т.е. ингибирование является обратимым. Если, однако, константа диссоциации комплекса фермент—ингибитор очень мала, и нельзя пренебречь $[E]$ по сравнению с $[I]$, то это условие не выполняется. Такие системы называются *системами со взаимным истощением*.

При неконкурентном ингибировании в таких системах

$$[I]_T = [I] + [EI] \quad (769)$$

где $[I]$ — концентрация свободного ингибитора, $[EI]$ включает в себя все формы комплекса фермент—ингибитор (так, в данном случае форму ESI и т.д.). Это уравнение можно преобразовать, вводя константу диссоциации ингибитора $K_I = [I][E]/[EI]$, парциальное ингибирование $i = [EI]/[E]_T$ и уравнение материального баланса $[E]_T = [E] + [EI]$:

$$[I]_T = K_I[i/(1 - i)] + i[E]_T \quad (770)$$

$$[I']_T = i/(1 - i) + i[E']_T \quad (771)$$

где удельные концентрации равны $[I']_T = [I]_T/K_I$ и $[E']_T = [E]_T/K_I$. Здесь различают три состояния системы, называемые *зонами по Штраусу и Гольдштейну*.

Если ингибитор в основном находится в свободном состоянии, то это соответствует *зоне А*:

$$[I']_T = i/(1 - i), \quad \text{т.е. } i = [I']_T/(1 + [I']_T) \quad (772)$$

Зона А характерна для случаев, которые обсуждались.

Если ингибитор находится частично в свободной и частично в связанной форме, то это соответствует *зоне В*:

$$[I']_T = i/(1 - i) + i[E']_T \quad (773)$$

$$i = \frac{([I']_T + [E']_T + 1) - \sqrt{([I']_T + [E']_T + 1)^2 - 4[I']_T[E']_T}}{2[E']_T} \quad (774)$$

Если ингибитор в основном находится в связанной форме, то это соответствует *зоне С*:

$$[I']_T = i[E']_T, \quad \text{т.е. } i = [I']_T/[E']_T \quad (775)$$

По мере возрастания $[E_i']$ система переходит из зоны А через зону В в зону С.

Для выбора подходящего соотношения следует определить границы между зонами. Уравнения Михаэлиса—Ментен справедливы только в зоне А, и их применение в зонах В и С приводит к ошибкам. Пусть Δi — максимально допустимое отклонение от i , тогда $\Delta i/i$ — мера ошибки при любой степени ингибирования.

Граница между зонами А и В:

$$i/(1-i) + i[E_i'] = (i + \Delta i)/(1-i-\Delta i) \quad (776)$$

т. е.

$$[E_i'] = \Delta i/i(1-i-\Delta i)(1-i) \quad (777)$$

Граница между зонами В и С:

$$i/(1-i) + i[E_i'] = (i + \Delta i)[E_i'] \quad (778)$$

$$[E_i'] = i/\Delta i(1-i) \quad (779)$$

Изменение границ между зонами в зависимости от допустимой погрешности показано в табл. IX.

Таблица IX. Границы между зонами в зависимости от допустимой погрешности (при 50%-ном ингибировании)

Допустимая погрешность, %	$[E_i']$	
	А-зона/В-зона	В-зона/С-зона
1	0,041	200
5	0,21	40
10	0,45	20
20	1,0	20
50	4,0	4

Следовательно, чтобы можно еще было применить уравнение Михаэлиса—Ментен, относительная концентрация фермента (по сравнению с константой ингибирования) должна быть менее 0,45 при 50%-ном ингибировании при $\Delta i/i = 0,1$, т. е. допускается погрешность 10%. При той же погрешности, если относительная концентрация фермента превосходит 20, то система находится в зоне С. На рис. 58 показано изменение границ между зонами в зависимости от значений Δi .

При конкурентном ингибировании в системе со взаимным истощением уравнения значительно сложнее. Важно отметить, однако,

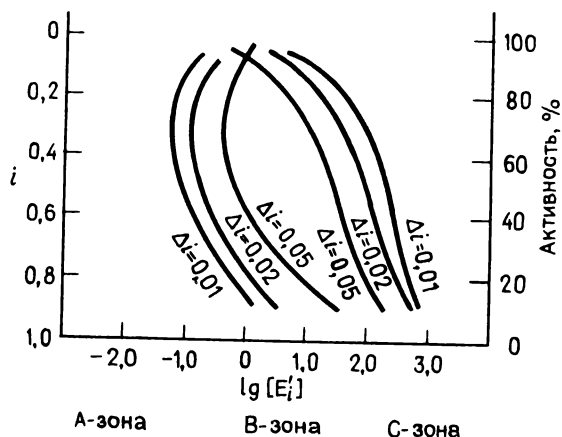


Рис. 58. Границы между зонами по Штраусу и Гольдштейну. Каждая пара кривых представляет зависимость точных границ зоны В от значений i и $\lg[E']$ при заданном Δi .

что в зоне С конкурентное ингибирование не может происходить. Причиной этого является то, что при большой относительной концентрации субстрата, достаточной для того, чтобы происходила конкуренция, сопутствующее вытеснение ингибитора с фермента увеличивает концентрацию свободного ингибитора — и система переходит в зону В.

В зоне С все ингибиторы действуют одинаково независимо от их сродства к ферменту, так как ингибитор практически полностью связан, и поэтому относительное количество неактивного фермента не зависит от константы диссоциации комплекса фермент—ингибитор. Поэтому в зоне С нельзя определить K_I .

Если и субстрат, и конкурентный ингибитор очень сильно связаны с ферментом, то

$$Y_{S,I} = [ES]/[E]_T = K_I[S]/(K_I[S] + K_S K_I + K_S[I]) \quad (780)$$

где $Y_{S,I}$ — доля центров связывания, занятых S в присутствии I.

$$[I]_T = [I] + [EI] = [I] + [I][E]/K_I = [I](K_I[S] + K_S[ES])/K_I[S] \quad (781)$$

$$[I]/[S] = [I]_T K_I / (K_T[S] + K_S[ES]) \quad (782)$$

Подставив (782) и (780) и взяв обратные величины от обеих частей уравнения, получим

$$1/Y_{S,I} = 1 + K_S/[S] + K_S[I]_T/(K_I[S] + K_S[ES]) \quad (783)$$

В отсутствие I

$$1/Y_{S,0} = 1 + K_S/[S] \quad (784)$$

$$(1/Y_{S,I} - 1/Y_{S,0}) = K_S[I]_T/(K_I[S] + K_S[ES]) \quad (785)$$

Умножив правую часть (785) на $[ES]$, а левую часть на $[ES] = Y_{S,I}[E]_T$ (см. (780)) и взяв обратные величины, получим

$$Y_{S,0}/[E]_T(Y_{S,0} - Y_{S,I}) = K_I[S]/K_S[I]_T[ES] + 1/[I]_T \quad (786)$$

Если выполняются условия (см. разд. 3.8.3): $Y_{S,0} \propto v_0/V_{\max}$, $Y_{S,I} \propto v_i/V_{\max}$, $[ES] \propto v_0$, $[S] = [S]_T - v_0$ (при $t \rightarrow 0$, когда уже $[P] \approx 0$), то имеем

$$v_0/[E]_T(v_0 - v_i) = K_T[S]_T/K_S[I]_Tv_0 + (1/[I]_T)(1 - K_I/K_S) \quad (787)$$

Из этого соотношения можно определить отношение K_I/K_S .

В случае необратимого ингибирования (если ингибитор ковалентно связан с ферментом) система всегда находится в зоне С. Именно по этой причине типы ингибиторов не являются осмысленными терминами при необратимом ингибировании. Нельзя говорить о конкурентном ингибировании, даже если необратимый ингибитор связан с группой, присоединяющей субстрат. Субстрат не может вытеснить ингибитор даже при бесконечно большой концентрации, так как последний образует с ферментом ковалентную связь. Поэтому в данном случае экспериментально определяемые «типы ингибирования» всегда будут неконкурентными независимо от истинного механизма необратимого ингибирования.

Различное поведение ферментов в разных зонах следует принимать во внимание при планировании экспериментов. Никогда нельзя игнорировать эти различия при попытке сделать выводы о работе ферментов *in vivo* исходя из экспериментов *in vitro*. Фактически все ферменты *in vivo* действуют в зоне С.

3.3.8. Кинетика ингибирования. В исследованиях ингибирования ферментативной активности недостаточно внимания уделялось кинетике ингибирования, т. е. развитию ингибирующего эффекта во времени. Очевидно, что кинетика поддается изучению, только если скорость процесса связывания фермента и ингибитора не слишком велика, так что за уменьшением скорости реакции можно проследить с помощью имеющегося прибора. (В дальнейшем мы ограничим рассмотрение зависимостями, связанными с зоной А; см. разд. 3.3.7.)

Сначала обратимся к системе, в которой присутствуют только фермент и ингибитор. Останавливая реакцию в различные моменты

времени, можно определить остаточную ферментативную активность в отобранных образцах. Из этих данных можно вычислить скорость развития ингибирования в отсутствие субстрата (т. е. скорость образования фермент-ингибиторного бинарного комплекса) следующим образом.

Скорость ферментативной реакции экспоненциально уменьшается в присутствии ингибитора:

$$v_i = v_f + (v_0 - v_f)e^{-at} \quad (788)$$

где v_i — скорость реакции, измеренная в момент t , v_0 — скорость в отсутствие ингибитора, v_f — конечная скорость при максимальном ингибировании, когда $t \rightarrow \infty$, и a — константа. Преобразование этого уравнения дает

$$\lg(v_i - v_f) = \lg(v_0 - v_f) - (a/2,3)t \quad (789)$$

Строя график зависимости $\lg(v_i - v_f)$ от t , получаем прямую линию, имеющую наклон, равный $-a/2,3$, и пересекающую ординату в точке $\lg(v_0 - v_f)$.

Обозначим $i = (v_0 - v_i)/v_0$ (ср. (729)) и относительное максимальное ингибирование $i_f = (v_0 - v_f)/v_0$. В этом случае уравнение (788) может быть записано следующим образом:

$$i = i_f(1 - e^{-at}) \quad (790)$$

Дифференцируем (790) при $t = 0$:

$$(di/dt)_0 = ai_f \quad (791)$$

Соотношение (791) показывает, что начальная скорость ингибирования пропорциональна максимальному ингибированию (т. е. ингибированию, отмечаемому по достижении равновесия). Время 50%-ного ингибирования начальной активности определяется как

$$t_{0,5} = -(2,3a) \lg(1 - 0,5/i_f) \quad (792)$$

а время достижения половины конечного максимального ингибирования равно

$$t_{0,5i_f} = 0,69/a \quad (793)$$

т. е. не зависит от i_f .

Если конечное ингибирование полное, т. е. конечная скорость v_f равна нулю, уравнение (788) переходит в

$$v_i = v_0 e^{-at} \quad (794)$$

Для реакции $E + I \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} EI$ скорость образования комплекса EI равна

$$d[EI]/dt = k_1[E][I] - k_{-1}[EI] = k_1([E]_T - [EI])[I] - k_{-1}[EI] \quad (795)$$

Примем

$$i = [EI]/[E]_T \quad \text{и} \quad K_I = k_{-1}/k_1 \quad (\text{константа диссоциации комплекса фермент-ингибитор})$$

$$di/dt = k_1[I] - ik_1([I] + K_I) \quad (796)$$

В результате интегрирования получаем

$$i = [I]/([I] + K_I) \{1 - \exp[-k_1 t([I] + K_I)]\} \quad (797)$$

$$i = i_f \{1 - \exp[-k_1 t([I] + K_I)]\} \quad (798)$$

Это означает, что при $t = 0$ степень ингибирования равна нулю, и она постепенно возрастает до тех пор, пока не достигнет i_f . Подстановка (797) в (796) дает

$$di/dt = k_1[I] \exp[-k_1 t([I] + K_I)] \quad (799)$$

$$\text{т. е.} \quad a = k_1([I] + K_I) \quad (\text{ср. (790) и (798)}) \quad (800)$$

Если образование комплекса практически необратимо или мы рассматриваем только начальную скорость, т. е. $k_{-1}t \approx 0$, тогда

$$i = 1 - \exp(-k_1 t[I]) \quad (801)$$

Следовательно, график зависимости $\lg(1 - i)$ от t дает прямую линию, наклон которой составляет $-k_1[I]/2,3$.

Для необратимых систем с взаимным истощением

$$d[EI]/dt = k_1([E]_T - [EI])([I]_T - [EI]) \quad (802)$$

$$di/dt = k_1[I]_T - ik_1([E]_T + [I]_T) + i^2 k_1[E]_T \quad (803)$$

После интегрирования

$$i = \{1 - \exp[-k_1 t([I]_T - [E]_T)]\} / \{1 - ([E]_T/[I]_T) \exp[-k_1 t([I]_T - [E]_T)]\} \quad (804)$$

Очевидно, что при $[I]_T \gg [E]_T$ (804) переходит в (801).

Гораздо более сложная картина наблюдается при образовании фермент-ингибиторного комплекса в присутствии субстрата, с которым ингибитор конкурирует. Присутствие субстрата значительно замедляет образование комплекса EI . Пренебрегая детальным выводом, приведем конечное уравнение

$$i = [I]/([I] + K_I[S]/K_S) \{1 - \exp[-(k_1 k_2([I]K_S + [S]K_I)t)/(k_1[I] + k_2[S])]\} \quad (805)$$

где k_2 — константа скорости образования комплекса ES .

Если $[I] \gg [E]_T$ и $[S] \gg [E]_T$, концентрация продукта будет выражаться следующим уравнением:

$$[P] \approx ([S] V_{\max} / K_S k_1 [I]) \{1 - \exp [-k_1 [I] K_S t / ([S] + K_S)]\} \quad (806)$$

3.3.9. Ингибирование медленно реагирующими ингибиторами. Исследование кинетики ингибирования дает ответ на вопрос, что происходит, если скорость образования комплекса EI невысока, но соизмерима (возможно, несколько меньше) со скоростью лимитирующей стадии ферментативной реакции. Для полностью конкурентного ингибирования, когда фермент предварительно не инкубируется с ингибитором и $[I]_T \gg [E]_T$, концентрация продукта в любой момент времени описывается следующим уравнением:

$$[P] = v_{ss} t + (v_0 - v_{ss})(1 - e^{-kt})/k \quad (807)$$

где v_0 — начальная, v_{ss} — стационарная скорость, а k — кажущаяся константа скорости первого порядка

$$k = k_i [1 + 1/K_I (1 + [S]/K_M)] \quad (808)$$

k_i — константа скорости второго порядка образования фермент-ингибиторного комплекса. Если $t \rightarrow 0$, то $[P] = v_0 t$, а если $t \rightarrow \infty$, мы можем написать

$$[P] = v_{ss} t + (v_0 - v_{ss})/k \quad (809)$$

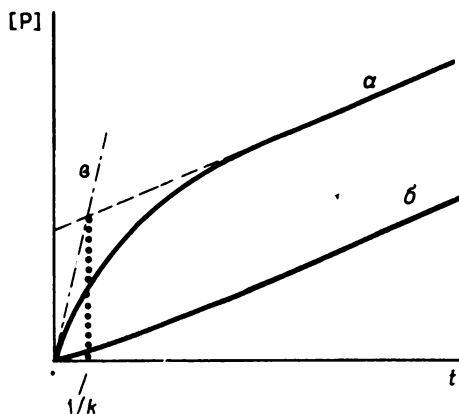
Пересечение этих двух прямых дает точку $t = 1/k$ (рис. 59).

Для вычисления K_I необходимы следующие уравнения:

$$v = v_0 / (1 + [I]/K_{I, \text{каж}}) \quad (810)$$

$$K_I = K_{I, \text{каж}} / (1 + [S]/K_M) \quad (811)$$

Рис. 59. Анализ ингибирования в присутствии медленно реагирующего ингибитора. a — реакция инициируется ферментом, штриховая линия — экстраполяция к стационарной скорости ($t \rightarrow \infty$); b — реакция инициируется ферментом, прединкубированным с ингибитором (в стационарном состоянии кривые a и b параллельны); v — экстраполяция к началу времени ($t \rightarrow 0$), дающая начальную скорость.



3.3.10. Ингибирование лабильным ингибитором. Если обратимый неконкурентный ингибитор неустойчив, т. е. его распад ощутим во время измерения (например, в результате гидролиза), и константа скорости его распада k_h , тогда для полностью неконкурентного ингибирования

$$v_i = V_{\max}[S]K_I / \{ K_I(K_S + [S]) + [I]_0 [\exp(-k_h t)(K_S + [S])] \} \quad (\text{ср. (742)}) \quad (812)$$

Перекрестное умножение на знаменатель и перегруппировка приводят к

$$\exp(-k_h t) = (K_I/[I]_0)[V_{\max}[S]/(K_S + [S]) - v_i]/(1/v_i) \quad (813)$$

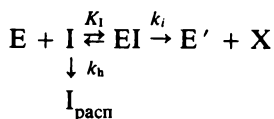
$$\ln[(v_0 - v_i)/v_i] = \ln([I]_0/K_I) - k_h t \quad (814)$$

Строя зависимость левой части уравнения от времени, можно определить k_h и K_I .

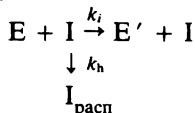
Для полностью конкурентного ингибирования пересечение с ординатой дает величину $\ln[K_S[I]_0/K_I(K_S + [S])]$, для полностью бесконкурентного ингибирования оно определяется величиной $\ln[S][I]_0/K_I(K_S + [S])$; таким образом, чтобы получить K_I в обоих случаях надо знать величину K_S . В случае смешанного типа ингибирования — пересечение при $\ln\{[I]_0(K_S K_I' + [S]K_I)/K_I K_I'(K_S + [S])\}$. Если построить график зависимости этих пересечений от $\ln\{[I]_0/(K_S + [S])\}$ (вторичный график), получим прямую, пересекающую ординату при $\ln[(K_I'K_I + [S]K_I)/K_I K_I']$ (вторичное пересечение, Y^*).

График зависимости e^{Y^*} от $[S]$ дает прямую с наклоном $1/K_I'$ и отрезком, отсекаемым на ординате, K_S/K_I .

Если неустойчивый ингибитор вызывает необратимое ингибирование по следующему механизму (например, в случае протеаз и эстераз):



где $I_{\text{расп}}$ — ингибитор после распада, E' — необратимо ингибированный фермент, то в случае $[I] \ll K_I$ может быть написана следующая приближенная схема:



Отсюда

$$k_i = k_i' / K_I \quad (815)$$

и поскольку $[I]_t = [I]_0 \exp(-k_h t)$, то

$$\ln([E]_t/[E]_0) = ([I]_0 k_i/k_h)[\exp(-k_h t) - 1] \quad (816)$$

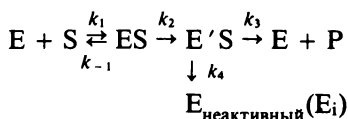
$$\ln([E]_\infty/[E]_0) = -[I]_0 k_i/k_h \quad (817)$$

$$k_i = k_h \ln([E]_\infty/[E]_0)/[I]_0 \quad (818)$$

$$\ln[\ln([E]_t/[E]_0) - \ln([E]_\infty/[E]_0)] = \ln \ln([E]_0/[E]_\infty) - k_h t \quad (819)$$

Измеряя концентрацию фермента при $t = 0$, в момент t и после полного исчерпания ингибитора ($t \rightarrow \infty$), можно определить величину k_h .

3.3.11. Кинетика ферментов-самоубийц. Известны ферменты, обладающие особенным свойством превращать субстраты при определенных условиях не только в конечные продукты, но и (частично) во вторичные продукты, способные необратимо инактивировать сам фермент. Эти ферменты называют ферментами-самоубийцами. Полагают, что они действуют согласно следующему механизму:



Для каждого компонента этого механизма могут быть написаны дифференциальные уравнения и уравнения материального баланса. В стационарном приближении могут быть получены следующие уравнения:

$$\begin{aligned} [ES] &= k_1([E]_T - [ES] - [E'S] - [E_i])[S]/(k_{-1} + k_2) = \\ &= k_1([E]_T - [E_i] - [E'S])[S]/(k_{-1} + k_2 + k_1[S]) \end{aligned} \quad (820)$$

$$\begin{aligned} [E'S] &= k_2[ES]/(k_3 + k_4) = k_1 k_2([E]_T - [E_i])/[k_1(k_2 + k_3 + \\ &+ k_4)[S] + (k_{-1} + k_2)(k_3 + k_4)] \end{aligned} \quad (821)$$

Из (821) следует, что

$$\begin{aligned} [ES] &= k_1(k_3 + k_4)([E]_T - [E_i])[S]/[k_1(k_2 + k_3 + k_4)[S] + \\ &+ (k_{-1} + k_2)(k_3 + k_4)] \end{aligned} \quad (822)$$

Подстановка (821) и (822) в дифференциальное уравнение изменения субстрата с соответствующими преобразованиями дает

$$\begin{aligned} d[S]dt &= ([E]_T + [E_i])[S]/(k_2 + k_3 + k_4)[S]/k_2(k_3 + k_4) + \\ &+ (k_{-1} + k_2)/k_1 k_2] = -c(1 + 1/r)[a[S]/(B + [S])] \end{aligned} \quad (823)$$

где

$$B = (k_{-1} + k_2)(k_3 + k_4)/k_1(k_2 + k_3 + k_4) \quad (824)$$

$$c = k_2 k_3 / (k_2 + k_3 + k_4), \quad a = [E]_T - [E_i], \quad r = k_3 / k_4$$

B — константа Михаэлиса, c — скорость V_{\max} , $1/r$ — это K_1 , а r характеризует распределение трансформированного субстрата в продуктах, так как

$$r = [P]/[E_i] \quad (825)$$

Поскольку

$$[S]_T = [S] + [P] + [E_i] \quad (826)$$

то

$$a = [E]_T - ([S]_T - [S]) / (1 + r) \quad (827)$$

Подстановка (827) в (823) и интегрирование приводят к

$$t = (1/c) \{ [(rB/[S]_T) / (1 + (1 + r)u)] \ln \{ [(1 + r)u] [([S]/[S]_T) / ([S]/[S]_T - 1 + (1 + r)u)] \} - r \ln \{ ([S]/[S]_T - 1 + (1 + r)u) / (1 + r)u \} \} \quad (828)$$

где $u = [E]/[S]_T$.

Используя (825) и (826), получаем следующие выражения:

$$t = (1/c) \{ [(rB/[S]_T) / (1 - (1 + r)u)] \ln [(1 - (1 + r)[P]/r[S]_T) / (1 - [P]/ru[S]_T)] - r \ln (1 - [P]/ru[S]_T) \} \quad (829)$$

$$t = (1/c) \{ [(rB/[S]_T)(1 - (1 + r)u)] \ln [(1 - (1 + r)u[E_i]/[E]_T) / (1 - [E_i]/[E]_T)] - r \ln (1 - [E_i]/[E]_T) \} \quad (830)$$

Если $r \gg 1$ ($1 + r \approx r$), уравнение (823) переходит в

$$d[S]/dt = -Ara[S]/(B + [S]) \quad (831)$$

где $A = k_2 k_4 / (k_2 + k_3 + k_4)$. В этом случае вместо (826) можно записать

$$[S]_T = [S] + [P] = [S] + r[E_i] \quad (832)$$

вместо (827) —

$$a = [E]_T - ([S]_T - [S]) / r \quad (833)$$

Из вышеприведенного следует, что

$$t = (1/A) \{ [B/([S]_T - r[E]_T)] \ln [(1 + [P]/[S]_T) / (1 - [P]/r[E]_T)] - \ln (1 - [P]/r[E]_T) \} \quad (834)$$

$$t = (1/A) \{ [B/([S]_T - r[E]_T)] \ln [([E]_T/a)(1 - r/[S]_T)([E]_T - a) - a] - \ln (a/[E]_T) \} \quad (835)$$

Отсюда можно сделать вывод, что

$$t_{1/2} = (1/A) \{ [(B/[E]_T) \ln(2 - r[E]_T/[S]_T)] / (1 - r[E]_T/[S]_T) + \ln 2 \} \quad (836)$$

Если $r[E]_T \ll [S]_T$

$$t_{1/2} = (1/A) [\ln 2(1 + B/[E]_T)] \quad (837)$$

В общем случае (т. е. независимо от величины r) график $[P]_f/[S]_T$ от $[E]_T/[S]_T$ (где $[P]_f$ — конечная концентрация продукта после окончания реакции, т. е. когда субстрат исчерпан или фермент полностью инактивирован) представляет собой прямую линию в пределах определенного диапазона значений $[E]_T/[S]_T$, а именно от 0 до $1/(1 + r)$, и ее наклон равен r .

Аналогичное уравнение, описывающее начальную скорость $[d[S]/dt = v_0]$, может быть получено из (823):

$$1/v_0 = 1/[c(1 + 1/r)[E]_T] + \{ B/[c(1 + 1/r)[E]_T] \} (1/[S]_T) \quad (838)$$

откуда, зная r , можно определить величины c и B (т. е. V_{\max} и K_M).

Ферменты-самоубийцы играют важную роль в современной фармацевтической промышленности. Синтезируя аналоги субстратов, подходящие для самоинактивации определенных бактериальных ферментов, можно получить новые, высоко эффективные химиотерапевтические препараты.

3.3.12. Ингибирование избытком субстрата и продуктом.

3.3.12.1. Ингибирование избытком субстрата. Для многих ферментов наблюдалось, что при добавлении субстрата выше определенной оптимальной концентрации скорость катализируемой реакции далее не увеличивается и не остается постоянной при концентрациях выше насыщающей, а понижается, т. е. развивается ингибирование. Это явление было названо ингибированием избытком субстрата.

Что касается его механизма, можно предложить пять различных типов ингибирования:

1. Субстрат связывается с ферментом двумя или более группами, и только субстрат, связанный таким образом, может принимать участие в реакции. Если присутствуют много молекул субстрата, может возникнуть такая ситуация, что на одном связывающем центре фермента связывается одна молекула субстрата, в то время как на другом участке связывается другая молекула субстрата вместо того, чтобы взаимодействовать с другой группой первой молекулы субстрата. Так как в реакции может принимать участие только молекула, связанная с ферментом двумя точками,

молекула фермента, удерживающая две молекулы субстрата будет неактивной, т. е. будет развиваться ингибирование.

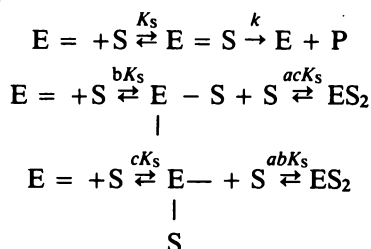
2. При высокой концентрации субстрат может связываться с другим участком, отличающимся от активного центра белка. В этом случае он может «неконкурентно» ингибировать скорость распада субстрата, связанного в активном центре.

3. Фермент требует для проявления активности присутствия необходимого активатора. Если субстрат способен образовывать комплекс с активатором, избыток субстрата удаляет активатор, таким образом уменьшая активность фермента.

4. Для реакций с двумя или несколькими субстратами избыток одного из субстратов способен связываться с участком связывания другого, таким образом ингибируя реакцию.

5. Увеличение концентрации субстрата выше определенного предела неспецифично ингибирует реакцию вследствие увеличения ионной силы.

Для первого типа ингибирования может быть предложен следующий механизм:



где b и c — коэффициенты, показывающие изменение констант диссоциации, если субстрат связан только на одном из связывающих центров, а a — константа взаимодействия, характеризующая влияние одного субстрата на связывание другого. Уравнение, описывающее скорость:

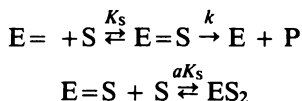
$$v = \frac{V_{\max}[S]/K_s}{1 + ([S]/K_s)[1 + 1/b + 1/c] + ([S]/K_s)^2 abc} \quad (839)$$

В общем случае b и c больше 1, потому что связывание субстрата одной группой слабее, чем двумя. Обычно a также больше 1, так как две связывающие группы образуют комплекс с идентичными субстратами; они находятся достаточно близко, чтобы взаимно влияли друг на друга.

Интегрирование (839) дает

$$\begin{aligned}
 V_{\max} t = K_s \ln \left[\frac{[S]_0}{[S]_0 - y} \right] + y \left[(1 + 1/b + 1/c) + \right. \\
 \left. + abc(2[S]_0 - y)/2K_s \right] \quad (839a)
 \end{aligned}$$

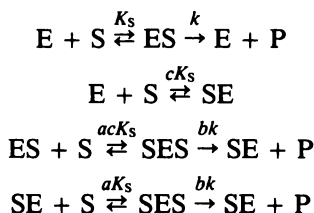
Упрощенная версия ингибирования первого типа:



Соответствующее уравнение скорости может быть написано следующим образом:

$$v = V_{\max}/(1 + K_S/[S] + [S]/aK_S) \quad (840)$$

В общем случае для первого типа ингибирования следует рассмотреть следующий механизм:



Если ингибирование *полностью конкурентное* ($a = \infty$), то

$$v = V_{\max}/(1 + K_S[S] + 1/c) \quad (841)$$

Если ингибирование *неполностью конкурентное* ($\infty > a > 1$, $b = 1$), то

$$v = V_{\max}/\{1 + (aK_S/[S])[([S]/K_S + c)/([S]/K_S + ac)]\} \quad (842)$$

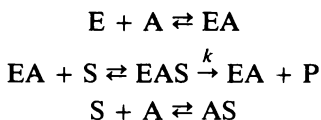
Для второго типа ингибирования, если ингибирование *полностью неконкурентное* ($a = 1$, $b = 0$), то

$$v = V_{\max}/(1 + K_S/[S] + 1/c + [S]/cK_S) \quad (843)$$

Если же ингибирование *неполностью неконкурентное* ($a = 1$, $0 < b < 1$), то

$$v = V_{\max}[1 + (b/c)([S]/K_S)]/(1 + K_S/[S] + 1/c + [S]/aK_S) \quad (844)$$

В случае третьего типа ингибирования могут происходить следующие реакции:



Соответствующее уравнение, описывающее скорость реакции, до-

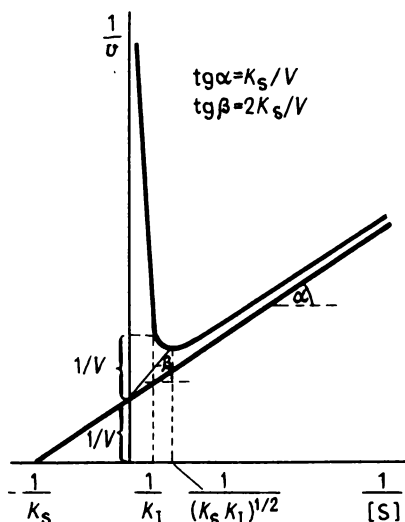


Рис. 60. График Лайнуивера — Берка для случая ингибирования избытком субстрата.

вольно сложно и показывает квадратичную зависимость от концентрации субстрата.

Механизмы двух остальных типов ингибирования избытком субстрата понятны сами по себе и не нуждаются в дальнейших комментариях.

Наличие ингибирования избытком субстрата проверяется по графику в двойных обратных координатах Лайнуивера—Берка. В этом случае при высоких концентрациях субстрата $[S]$ функция отклоняется от линейности и наблюдается кривизна, направленная вверх. Это показывает, что при высоких концентрациях субстрата активность фермента ниже, чем можно было бы ожидать из линейного соотношения (рис. 60). Частая ошибка при графической оценке заключается в том, что линейная часть графика просто экстраполируется и полученное пересечение используется для оценки V_{\max} и K_M неингибированного фермента. В действительности ингибирование избытком субстрата, очевидно, начинается уже в точке, где отклонение графика от линейности не может быть практически замечено.

В общем виде уравнение (840) может быть записано следующим образом:

$$v = V[S]/(K_s + [S] + [S]^2/K_I) \quad (845)$$

Координаты точки минимума кривой

$$1/[S] = 1/(K_s K_I)^{1/2} \quad (846)$$

$$1/v' = (1/V)[1 + 2(K_S/K_I)^{1/2}] \quad (847)$$

Координаты указывают то место, где производная от (845) равна нулю.

Пересечение ординаты с асимптотой к кривой может быть соединено с минимумом кривой прямой линией. Наклон этой прямой линии, равный $2K_S/V$, вдвое больше наклона асимптоты (рис. 60). Если значение ординаты пересечения асимптоты откладывается на ординате в сторону возрастающих значений, и этот отрезок проецируется на ту часть кривой, которая лежит ближе к ординате, из проекции этой точки на абсциссу может быть определена величина $1/K_I$. Прямая линия $1/[S] = 1/K_I$ пересекает кривую в одной точке, а асимптоту в другой. Значения ординат точек: $(1/V)(2 + K_S/K_I)$ и $(1/V)(1 + K_S/K_I)$ соответственно.

Кривая ингибирования избытком субстрата также может быть линеаризована (*график Мармассе*). Примем $a = [S]/[S]_{\min}$, где $[S]_{\min}$ — величина $[S]$ в минимуме кривой. Уравнение (845) может быть преобразовано к следующему виду:

$$1/v = (K_S/K_I)^{1/2}(a + 1/a)/V + 1/V \quad (848)$$

Строя график $1/V$ от $(a + 1/a)$, получаем пересечение прямой с абсциссой в точке $-(K_S/K_I)^{1/2}$, что после умножения на $[S]_{\min} = (K_S K_I)^{1/2}$ дает $-K_S$, а после деления на то же выражение — $(-1 + K_I)$.

Правильность определения зависит в основном от точности оценки $[S]_{\min}$. Вводя выражение $[S] = a([S]_{\min} + \varepsilon)$, мы получаем, если $\varepsilon < [S]_{\min}$:

$$1/v = 1/V_{\max} + (1/V_{\max})\sqrt{K_S K_I}(a + 1/a) + (\varepsilon/K_I V_{\max})(a - 1/a) \quad (849)$$

Если $\varepsilon = 0$, то (849) равно (848). Фактически уравнение (849) представляет собой уравнение множественной линейной регрессии для величины $1/v$ относительно $(a + 1/a)$ и независимому от $(a + 1/a)$ члену $(a - 1/a)$. Решая уравнение (849) подстановкой приближенного значения $[S]_{\min}$, мы получаем величину ε и более точное значение $[S]_{\min}$. Эту процедуру следует повторять до тех пор, пока две последующие величины $[S]_{\min}$ не станут равны. Используя точное значение $[S]_{\min}$, можно получить V_{\max} и $\sqrt{K_S/K_I}$ из (848) и $\sqrt{K_S K_I}$ из $[S]_{\min}$, таким образом могут быть вычислены как K_S , так и K_I .

Интегрируя (845), получаем

$$([S]_0 - [S])/t = V_{\max} - ([S]_0^2 - [S]^2)/2K_I t - (K_S/t) \ln([S]_0/[S]) \quad (850)$$

Зависимость нелинейна, и из нее трудно оценить константы.

График v от $\lg [S]$ представляет собой колоколообразную кривую. Обозначим положения максимума кривой через $[S]_{\max}$, а через $[S]_1$ и $[S]_2$ те значения $[S]$ на нижней части колоколообразной кривой, которые соответствуют скорости, составляющей половину от $[S]_{\max}$. Константы рассчитываются по следующим уравнениям:

$$K_I = [S]_1 + [S]_2 - 4[S]_{\max}, \quad K_S = [S]_{\max}^2 / K_I \quad (851, 852)$$

$$v = [S]_{\max} [1 + 2(K_S / K_I)^{1/2}] \quad (853)$$

3.3.12.2. Ингибирование продуктом. В основном ингибирование продуктом может происходить по двумя различным путям: 1) обратная реакция ингибирует прямой процесс; 2) образуется неактивный комплекс между продуктом и ферментом.

Первая возможность превалирует во всех обратимых реакциях, если скорость реакции анализируется не только в период начальной скорости. Скорость общей реакции в этом случае дается следующим уравнением:

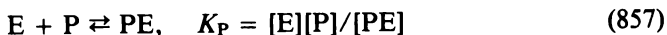
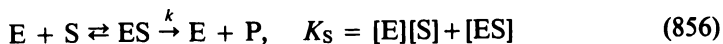
$$v = \frac{V_{\max}([S] - [P]K_{\text{равн}})}{[S] + K_S(1 + [P]/K_P)} \quad (854)$$

Интегрирование (854) и комбинация с уравнением Холдейна (487а) приводит к

$$[P]/t = V_t [1 + (1/K_{\text{равн}})/(1 - K_S/K_P) + K_S K_P / (K_P - K_S) + (K_P + K_S K_{\text{равн}})[S]_0 / (K_P - K_S)(1 + K_{\text{равн}})] (1/t) \ln (1 - [P]/[P]_{\text{равн}}) \quad (855)$$

График $[P]/t$ от $(1/t) \ln (1 - [P]/[P]_{\text{равн}})$ дает линейную зависимость, и, если известны $K_{\text{равн}}$ и $[P]_{\text{равн}}$, из временных зависимостей при различных $[S]_0$ могут быть получены константы.

Во втором случае простейшим является следующий механизм (конкурентное ингибирование):



Уравнение, описывающее начальную скорость, решается обычным путем:

$$v_0 = V_{\max} K_P [S] / (K_S K_P + K_P [S] + K_S [P]) \quad (858)$$

Уравнение (858) может быть решено для любого момента времени методом интегрирования. Обозначим через u концентрацию

образовавшегося продукта. Тогда

$$dy/dt = VK_P([S]_0 - y)/[K_S K_P + K_P([S]_0 - y) + K_S y] \quad (859)$$

$$Vt = \int_0^t [K_S/([S]_0 - y) + 1 + K_S y/K_P([S]_0 - y)] dy \quad (860)$$

$$Vt = K_S \ln [[S]_0/([S]_0 - y)] + y + (K_S/K_P)\{[S]_0 \ln [[S]_0/([S]_0 - y)] - y\} \quad (861)$$

Первые два члена правой части уравнения (861) соответствуют правой части интегрированного уравнения Михаэлиса—Ментен для неингибированного фермента, в то время как третий член представляет влияние конкурентно ингибирующего продукта. Для графической оценки (861) преобразуют к виду

$$Vt = [K_S(K_P + [S]_0)/K_P] \ln [[S]_0/([S]_0 - y)] + (K_P - K_S)y/K_P \quad (862)$$

Согласно Фостеру и Ниманну, график y/t в зависимости от $(1/t) \ln \{[S]_0/([S]_0 - y)\}$ представляет собой прямую линию, наклон которой равен $-K_S(K_P + [S]_0)/(K_P - K_S)$; ее пересечение с ординатой дает значение $VK_P/(K_P - K_S)$ и с абсциссой — значение $VK_P/K_S(K_P + [S]_0)$ (рис. 61, а).

Строя график зависимости отрицательной величины наклона от $[S]_0$, мы получаем прямую линию, пересекающую абсциссу в точке $-K_P$. Наклон принимает отрицательные значения, только если $K_P < K_S$ (см. рис. 61, б). Если $K_P > K_S$, наклон положительный, в то время как для $K_P = K_S$ получается вертикальная линия (наклон бесконечен).

Эксперимент проводится при различных значениях $[S]_0$ ($[S]_{0,1}$, $[S]_{0,2}$, ..., $[S]_{0,n}$). Соединяя пересечения прямых линий, проведенных из начала координат и имеющих наклоны, соответствующие $[S]_{0,i}$, и экстраполированных линейаризованных кинетических кривых, измеренных при соответствующих значениях $[S]_{0,i}$, получаем график Фостера—Ниманна, соответствующий кинетике без ингибирования продуктом (см. рис. 29). Точки пересечения — это значения функций, экстраполированных к $t = 0$, и эти значения равны активности, измеренной в начальных условиях реакции (начальные условия: $t = 0$ и $y = 0$, т. е. ингибирования продуктом нет, см. рис. 61, б). Таким образом, используя две кривые, мы можем получить величины K_S , V и K_P .

Для неконкурентного ингибирования продуктом

$$(y/t) = V_{\max}/(1 + y/2K_P - K_S/K_P) - [K_S(K_P + [S]_0)/(K_P + y/2 - K_S)](1/t) \ln [[S]_0/([S]_0 - y)] \quad (863)$$

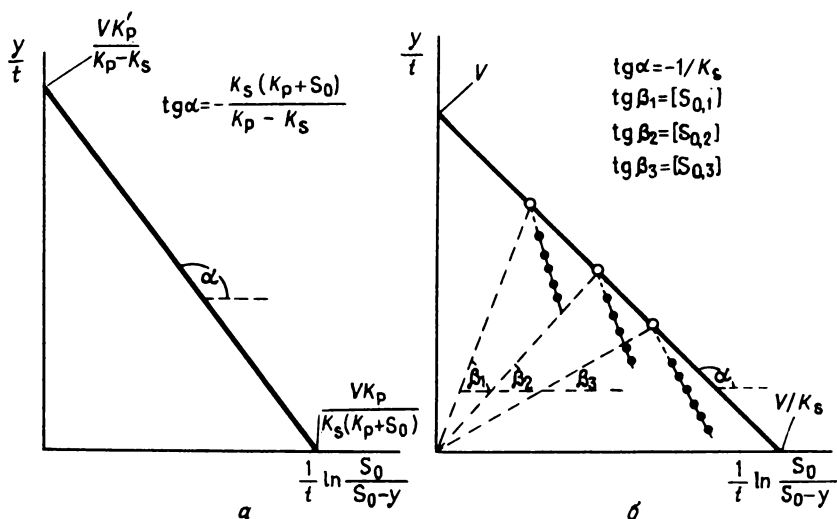


Рис. 61. Анализ ингибирования конечным продуктом по методу Фостера — Ниманна. *а* — графическое представление интегрального уравнения кинетики Михаэлиса — Ментен в случае ингибирования конечным продуктом. *б* — график, согласно рис. *а*, для трех различных начальных концентраций субстрата. Темные кружки — экспериментальные значения, светлые кружки — пересечения экстраполированных прямых линий, полученных из эксперимента, и прямых линий, проведенных из начала координат с наклоном, соответствующим начальной концентрации субстрата. Соединяя эти точки, получаем график Фостера — Ниманна, соответствующий неингибированной реакции.

Для бесконкурентного ингибирования продуктом

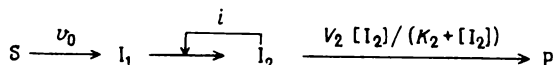
$$y/t = V_{\max}/(1 + y/2K_P) - [K_S/(1 + y/2K_P)](1/t) \ln [(S)_0/((S)_0 - y)] \quad (864)$$

Наконец, для смешанного типа ингибирования

$$y/t = V_{\max}/(1 + y/2K_P' - K_S/K_P) - [K_S(K_P + [S]_0)/(K_P + K_P y/2K_P' - K_S)](1/t) \ln [(S)_0/((S)_0 - y)] \quad (865)$$

где K_P' — константа диссоциации P из тройного комплекса ESP .

3.3.12.3. Ингибирование продуктом одного из ферментов последовательных сопряженных реакций. Допустим, мы имеем следующую систему:



Второй фермент, катализирующий превращение промежуточного продукта I_1 в I_2 , ингибируется I_2 .

Если I_2 — неконкурентный ингибитор по отношению к I_1 , в стационарных условиях можно записать

$$v_1 = V_1 [I_1]_{ss} / (1 + [I_2]_{ss} / K_i) (K_1 + [I_1]_{ss}) = V_2 [I_2]_{ss} / (K_2 + [I_2]_{ss}) \quad (866)$$

где K_i — константа ингибирования.

Значения времени, характеризующие систему и требуемые для достижения стационарного состояния:

$$\tau_1 = K_1 / [V_1 / (1 + [I_2]_{ss} / K_i) - v_0] \quad (867)$$

$$\tau_2 = K_2 / (V_2 - v_0) \quad (868)$$

в то время как концентрация промежуточного продукта в стационарном состоянии

$$[I_2]_{ss} = v_0 K_2 / (V_2 - v_0) \quad (869)$$

Если I_2 — конкурентный ингибитор по отношению к I_1 , тогда

$$\tau_1 = K_1 (1 + [I_2]_{ss} / K_i) / (V_1 - v_0) \quad (870)$$

в то время как τ_2 и $[I_2]_{ss}$ равны (868) и (869) соответственно.

3.3.13. Система двойного ингибирования. Чтобы определить строение активного центра фермента, можно использовать два ингибитора одновременно. Они могут быть либо одного типа (например, оба конкурентные) или различных типов (например, один неконкурентный, другой бесконкурентный). Общая схема двойного ингибирования показана на рис. 62.

Штриховые линии отмечают те элементарные стадии, на которых происходит взаимодействие между субстратом и одним из ингибиторов. Двойные линии символизируют стадии, на которых два ингибитора взаимодействуют с поверхностью свободного от субстрата фермента, а пунктирные линии обозначают взаимодействие между ингибиторами на фермент-субстратном комплексе. Кружками обозначены комплексы, способные распасться с образованием продукта. Очевидно, в зависимости от природы двух ингибиторов

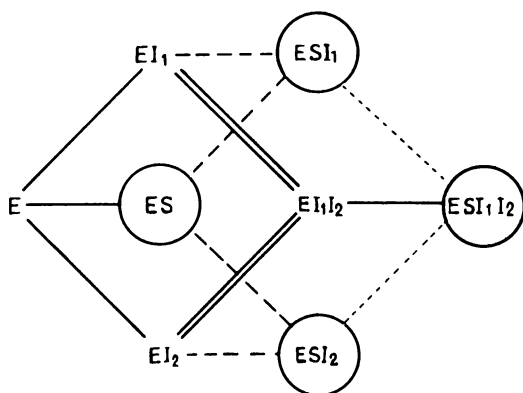


Рис. 62. Общая схема двойного ингибирования.

некоторые стадии необходимо исключить из общей схемы, и соответственно изменится зависимость начальной скорости реакции от концентрации конкретного ингибитора и субстрата.

Применение метода двойного ингибирования позволяет решить такие вопросы: связываются ли два ингибитора с одними или различными группами фермента, является ли наблюдаемое конкурентное ингибирование истинно конкурентным или кажущимся конкурентным, имеются ли стерические помехи между ингибиторами или между ингибитором и субстратом, вызывает ли субстрат конформационные изменения в ферменте и т. п.

На практике до сих пор в основном использовали *метод двойного полностью конкурентного ингибирования*. Поэтому мы будем рассматривать только этот случай.

Тип двойного полностью конкурентного ингибирования теоретически не отличается от полностью конкурентного ингибирования, но выделить все же его нужно, так как его математическая формулировка более сложна и графическое представление иное. Важность исследования этого типа ингибирования заключается в том, что, если по химической структуре один ингибитор аналогичен одной из половин субстрата, а другой ингибитор — другой половине, эксперименты могут доказать, что субстрат связывается с белком двумя точками и, если ингибиторы являются специфичными (и обратимо) связывающимися реагентами, могут быть идентифицированы группы белка, ответственные за связывание любой половины субстрата.

Легко установить, какой из двух ингибиторов ингибирует пол-

Таблица X. Различие ингибиторов при двойном ингибировании

$1/v_i$		Ингибитор	
как функция $[I_1]$ при постоянной $[I_2]$	как функция $[I_2]$ при постоянной $[I_1]$	I_1	I_2
Линейная	Линейная	Полный	Полный
Линейная	Гиперболическая	Полный	Неполный
Гиперболическая	Гиперболическая	Неполный	Неполный

ностью или частично вне зависимости от типа ингибирования. Табл. X показывает способ такого анализа.

Если оба ингибитора полностью проявляют свой эффект, анализ наклонов и отрезков, отсекаемых на осях как функций концентраций ингибитора и субстрата, достаточен для определения типа ингибирования (табл. XI).

Пусть I_1 и I_2 — два ингибитора, конкурентные по отношению к субстрату. Примем, что ингибиторы не реагируют друг с другом и с субстратом (таким образом, комплексы I_1I_2 , I_1S , I_2S и I_1I_2S не образуются); более того, ингибиторы полностью конкурентны (т. е. комплексы EI_1S , EI_2S не регистрируются).

В этом случае будут наблюдаться следующие элементарные стадии:

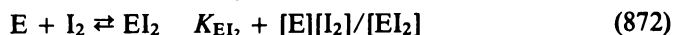


Таблица XI. Определение типа ингибирования

Форма уравнения $1/v_i$ при постоянной $[I_2]$ ^a	Ингибирование I_1
$a + b/[S] + [I_1]d/[S]$	Полностью конкурентное
$a + b/[S] + [I_1]d/[S] + [I_1]c$	Полностью неконкурентное
$a + b/[S] + [I_1]c$	Полностью бесконкурентное

^a a , b , c и d — различные константы в различных уравнениях.

и допустим, что $K_{EI_1, I_2} = \alpha K_{EI_2}$ и $K_{EI_2, I_1} = \alpha K_{EI_1}$, где α — константа взаимодействия между I_1 и I_2 в комплексе EI_1I_2 . Если I_1 и I_2 связываются с одной группой фермента, комплекс EI_1I_2 не может образовываться, так что $\alpha = \infty$. Если I_1 и I_2 взаимодействуют с различными группами фермента, комплекс EI_1I_2 образуется и $\infty > \alpha > 0$. Если I_1 и I_2 не влияют на связывание другого ингибитора с ферментом, тогда $\alpha = 1$. Наконец, если связывание I_1 способствует связыванию I_2 , то $1 > \alpha > 0$; если же I_1 ингибирует связывание I_2 , то $\infty > \alpha > 1$.

Мы можем также использовать стационарное приближение, потому что два вещества являются полностью конкурентными ингибиторами (3.3.5) и тогда

$$d[ES]/dt = k_1[S][E] - (k_{-1} + k_2)[ES] = 0 \quad (876)$$

$$[E]_T = [E] + [ES] + [EI_1] + [EI_2] + [EI_1I_2] \quad (877)$$

Поскольку из (876) $[E] = [ES]K_M/[S]$, все другие комплексы могут быть выражены в явном виде через уравнение, содержащее $[ES]$. Таким образом, подставив уже упомянутые константы диссоциации [см. выражения (871—874)] в выражение для $[E]_T$, получим

$$v_i = V/[1 + (K_M/[S])(1 + [I_1]/K_{EI_1} + [I_2]/K_{EI_2} + [I_1][I_2]/\alpha K_{EI_1}K_{EI_2})] \quad (878)$$

Линеаризация этого уравнения дает

$$1/v_i + 1/V + (K_M/[S]V)(1 + [I_2]/K_{EI_2} + (K_M/[S]VK_{EI_1})(1 + [I_2]/\alpha K_{EI_2})[I_1]) \quad (879)$$

Аналогичное уравнение может быть записано для $[I_2]$. Если строить график $1/v_i$ либо как функцию $[I_1]$ при различных постоянных значениях $[I_2]$, либо как функцию $[I_2]$ при постоянных величинах $[I_1]$, мы получим серию прямых линий, которые параллельны при $\alpha = \infty$, имеют общую точку пересечения во втором или третьем квадранте при $0 < \alpha < 1$, или $1 < \alpha < \infty$ соответственно. При $\alpha = 1$ прямые пересекаются на абсциссе (рис. 63, а и б).

Аналогичные кривые получаются, если строить график $1/v_i$ от $[I_2]$, за исключением того, что при $\alpha = \infty$ наклон параллельных линий равен $K_M/[S]VK_{EI_2}$, в то время как при $\infty > \alpha > 0$ абсцисса общего пересечения равна $-\alpha K_{EI_2}$. Так как при использовании ингибиторов I_1 и I_2 по отдельности могут быть вычислены K_{EI_1} и K_{EI_2} с помощью метода Диксона или любого другого подходящего метода определения константы ингибирования, вышеуказанный метод можно использовать для определения величины α .

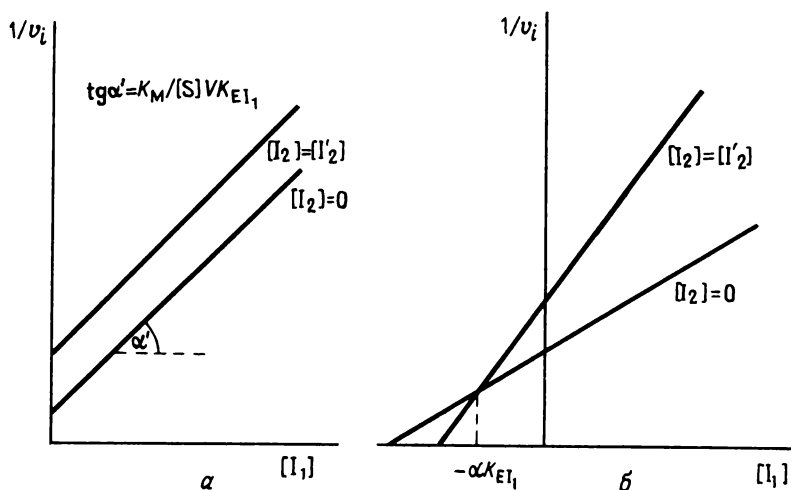


Рис. 63. Определения константы диссоциации комплекса фермент — ингибитор и константы взаимодействия двух полностью конкурентных ингибиторов согласно теории Йонетани и Теорелла. а) $\alpha = \infty$; б) $1 > \alpha > 0$.

В приведенном виде метод был разработан *Йонетани и Теореллом* при изучении связывания кофермента с алкогольдегидрогеназой. Однако следует отметить, что принцип метода был известен задолго до этого. Впервые он был применен *Лоуэ*, который построил график зависимости $[I_1]$ от $[I_2]$ при постоянной величине v_i/v_0 (*изоболограмма*). Этот метод приводит к получению прямых линий при $\alpha = \infty$ и выпуклых кривых при $\infty > \alpha > 0$. Аналогичный способ графического представления был предложен позже *Уэббом*. Другой метод был разработан *Яги и Озава*, которые строили график зависимости v_0/v_i от $([I_1] + [I_2])$. При $\alpha = \infty$ получается прямая линия, при $\infty > \alpha > 0$ — квадратичная зависимость. Однако эти способы представления данных обычно не рассматриваются, так как в случае двух полностью конкурентных ингибиторов наиболее простым и точным является уже упомянутый метод *Йонетани—Теорелла*.

Если оба ингибитора не являются полностью конкурентными, необходимо определить другую константу взаимодействия β , чтобы охарактеризовать взаимодействие I_1 и I_2 в комплексе с ES. Как и в случае с α величина $\beta = 1$ означает независимое связывание двух ингибиторов, а $\beta = \infty$ указывает на взаимоисключающее влияние

при связывании с комплексом ES. Если $1 < \beta < \infty$, один из ингибиторов ограничивает связывание другого с комплексом ES, в то время как при $0 < \beta < 1$ они промотируют связывание друг друга.

Константы взаимодействия легко можно определить, если один из ингибиторов проявляет лишь неполное ингибирование. График зависимости $1/v_i$ от концентрации полного ингибитора $[I_1]$ при постоянных концентрациях $[S]$ и $[I_2]$ имеет вид прямой линии. Обозначим ее пересечение с абсциссой через $-m$. Очевидно, что m является функцией $[S]$ и $[I_2]$. Табл. XII суммирует способы определения константы взаимодействия с использованием этой зависимости.

Таблица XII. Определение констант взаимодействия с использованием двойного ингибирования

График зависимости m от $[I_2]$ при постоянном значении $[S]$	Константа взаимодействия
Прямая линия	$\alpha = \infty$ и(или) $\beta = \infty$
Линия, параллельная абсциссе	$\alpha = 1, \beta = 1$
Вогнутая гипербола	$1 < \alpha < \infty, 1 < \beta < \infty$
Выпуклая гипербола	$0 < \alpha < 1, 0 < \beta < 1$

Анализ несколько затрудняется, если используют два полностью ингибирующих вещества. Однако константа взаимодействия может быть определена и в этом случае, если насытить фермент одним из ингибиторов и построить график зависимости $1/v_0$ от $1/[S]$. В результате получается прямая линия, наклон которой и отсекаемый ею отрезок являются функциями концентрации другого ингибитора. Из анализа этой функции можно определить константы ингибитора.

При работе с двумя ингибиторами следует учитывать тот факт, что одновременное действие трех лигандов фермента может дать специфический эффект. Например, влияние двух ингибиторов суммируется только в особых случаях; обычно они действуют синергично или антагонистично, т. е. усиливают или ослабляют влияние другого. В определенных случаях взаимодействие ингибиторов зависит от концентрации субстрата, т. е. в зависимости от этой величины два ингибитора могут сначала ослаблять влияние один другого, затем влияние обоих ингибиторов суммируется и наконец при дальнейшем изменении $[S]$ в действии двух ингибиторов может обнаруживаться эффект синергизма. Если одно из веществ является

неполным ингибитором, то в определенных случаях совместное использование двух ингибиторов может вызвать меньшее ингибирование, чем наблюдалось при наличии одного из них. В особых условиях одновременное добавление двух неполных ингибиторов может даже привести к увеличению скорости ферментативной реакции по сравнению с неингибированным ферментом, т.е. одновременное использование двух ингибиторов может привести к активации (*парадокс ингибирования*).

3.3.14. Обратимо-необратимое двойное ингибирование. Если один из ингибиторов вызывает обратимое, другой — необратимое ингибирование, и первый — неконкурентный, а второй — конкурентный, тогда (принимая, что $[I_1] \gg [E]_T$, $[S] \gg [E]_T$ и $[P] = v_0 t$) в отсутствие обратимого ингибитора:

$$[EI_1] \approx [E]_T \{1 - \exp[-k_i[I_1]K_S t / ([S]_0 + K_S)]\} \quad (880)$$

где I_1 — необратимый ингибитор и k_i — константа скорости второго порядка образования фермент-ингибиторного комплекса:

$$d[P]/dt \approx v_0 \exp[-k_i[I_1]K_S t / ([S]_0 + K_S)] \quad (881)$$

$$[P] \approx [V_{\max}[S]_0 / K_S k_i [I_1]] \{1 - \exp[-k_i[I_1]K_S t / ([S]_0 + K_S)]\} \quad (882)$$

Обозначая неконкурентный обратимый ингибитор как I_2 , для случая присутствия обоих ингибиторов получаем следующие выражения:

$$[EI_2] \approx [E]_T \{1 - \exp[-k_i[I_1]t / (1 + [S]/K_S)(1 + [I_2]/K_i)]\} \quad (883)$$

$$d[P]/dt \approx k_2[E]_T / (1 + K_S/[S])(1 + [I_2]/K_i) \exp[-k_i[I_1]t / (1 + [S]/K_S)(1 + [I_2]/K_i)] \quad (884)$$

$$[P] \approx \{V_{\max}[S]/K_S k_i [I_1]\} \{1 - \exp[-K_S K_i k_i [I_1]t / (K_S + [S])(K_i + [I_2])]\} \quad (885)$$

Измеряя образование продукта при различных $[I_1]$, $[I_2]$ и $[S]$, можно вычислить величины констант.

3.4. ВЛИЯНИЕ ДРУГИХ ЛИГАНДОВ И ФАКТОРОВ ОКРУЖЕНИЯ

3.4.1. Влияние активаторов. Ферментативная реакция может быть не только ингибирована, но и активирована. В этом случае активаторы, а не ингибиторы связываются с белком. Если активатор обратимо связывается с белком, т.е. может диссоциировать, и фермент подчиняется обычной кинетике Михаэлиса—Мэнтен, то

для исследования активированной реакции можно использовать принципы, рассмотренные выше. Можно применять те же уравнения и графические построения, за исключением того, что член $(1 + K_A/[A])$ заменяет член $(1 + [I]/K_I)$ и величина $1/v_0$ в левой части уравнения представляет собой обратную величину от величины максимально активированной начальной скорости. Это означает, что под воздействием А (активатора) либо увеличивается прочность связи фермент—субстрат (в противоположность влиянию I, который вызывает дестабилизацию связи), либо ускоряется стадия распада фермент-субстратного комплекса (в отличие от воздействия I, который уменьшает ее). Аналогично можно выделить явно конкурентную, неконкурентную и т. д. активацию.

Естественно, могут возникнуть и специфические случаи. Например, случай, когда *активатор необходим*, т. е. он не просто ускоряет реакцию, а в его отсутствие реакция вообще не может протекать. Тогда следует рассмотреть следующие элементарные стадии процесса:



$$v_0/V = [EAS] + [E]_T \quad (888)$$

$$[E]_T = [E] + [EA] + [EAS] \quad (889)$$

$$1/v_0 = K_S(1 + K_A/[A])/V[S] + 1/V \quad (890)$$

Другие особые примеры (например, случаи, когда активатор, а не фермент образует комплекс с субстратом, или активатор и ингибитор одновременно действуют на фермент, или избыток активатора ведет себя как ингибитор) подробно обсуждаться не будут.

Если связывание второй молекулы субстрата необходимо для протекания реакции, т. е. она активирует фермент (активация избытком субстрата), кривая насыщения имеет сигмоидную форму и

$$-d[P]/dt = V_{\max}/\{[K_S K_M/([S_0] - [P])^2] + [K_M/([S_0] - [P])] + 1\} \quad (891)$$

После интегрирования, подстановки значения $[P]$ и перегруппировки получается нелинейное выражение:

$$([S_0] - [S])/t = V_{\max}[1 + (K_S K_M/[S_0][S])] - (K_M/t) \ln ([S_0]/[S]) \quad (892)$$

3.4.2. «Либратор». В добавление к субстрату, ингибитору и активатору имеется еще тип веществ, взаимодействующих с ферментом. Это может быть соединение, непосредственно не влияющее на ферментативную активность, т. е. не являющееся ни ингибитором, ни активатором, но оно может подавить или по крайней мере умень-

шить влияние ингибитора или активатора, связанного с ферментом. Такие вещества называют *либераторами*, потому что они освобождают фермент от ингибитора или активатора. В настоящее время известны либераторы для ряда ферментов (например, для треониндеаминазы, изоцитратдегидрагеназы, глутаматдегидрогеназы и ацетилглутаматкиназы и т. д.). Кинетическая модель действия либератора достаточно сложна, так как ингибитор (или активатор) сам может быть конкурентным, неконкурентным или бесконкурентным по отношению к субстрату (здесь отмечены только основные типы), и во всех случаях либератор может показать те же типы взаимодействия по отношению к ингибитору (активатору).

Таким образом, если принять во внимание только простейшие (основные) типы взаимодействия, может быть рассмотрено девять различных вариантов.

В двойных обратных координатах обычно мы получаем картину, соответствующую типу ингибирования независимо от способа действия либератора. Исключением являются случаи, когда используют неконкурентный либератор, бесконкурентный ингибитор или бесконкурентный либератор вместе с конкурентным, неконкурентным или бесконкурентным ингибиторами. В этих случаях графическое представление характерно для смешанного типа ингибирования. Однако точки пересечения во втором квадранте отличаются попарно друг от друга.

В общем случае при увеличении концентрации либератора ингибирующий эффект ингибитора постепенно уменьшается вплоть до полного снятия ингибирования. Тем не менее в некоторых случаях ингибирующий эффект либератора не зависит непосредственно от его концентрации, потому что полное снятие ингибирования происходит только при определенной концентрации либератора. При более низких его концентрациях происходит лишь частичное снятие ингибирования, а при более высоких концентрациях вещество теряет свои свойства либератора и активирует фермент.

В действительности влияние pH тоже попадает в уже рассмотренную категорию модифицирующих эффектов, так как H^+ или OH^- могут так же ингибировать или активировать ферментативную реакцию, как и любой ингибитор или активатор (и, по всей вероятности, они могут так же действовать, как либераторы). Тем не менее общая и особо важная роль pH требует отдельного рассмотрения (см. разд. 3.4.4).

3.4.3. Влияние температуры на скорость и ингибирование ферментативной реакции. Как показано в разд. 2.13, из температурной за-

висимости константы скорости реакции, согласно уравнению Аррениуса (283), и из константы равновесия процессов, согласно уравнению Вант-Гоффа (293), могут быть вычислены термодинамические параметры реакции.

В случае механизма Михаэлиса—Ментен, когда вслед за быстрым равновесием следует скоростьлимитирующая стадия ферментативной реакции, константа скорости (k_2) этой стадии может быть использована для построения графика Аррениуса. Так как в случае стационарной кинетики нет скоростьлимитирующей стадии, температурная зависимость k_2 не будет характеризовать ферментативную реакцию с термодинамической точки зрения. Обычно принято использовать для графика Аррениуса V_{\max} вместо k_2 (ср. (428a)), т. е. строить график зависимости $\lg V_{\max}$ от $1/T$. Это обоснованно, если принять во внимание, что величина отсекаемого отрезка, из которого вычисляется ΔS^* (см. (285)), также содержит $\lg [E]_T$. Однако, если ферментативная реакция не подчиняется простейшему механизму Михаэлиса—Ментен, а, например, приводит к проявляющемуся в кинетике комплексу EP, тогда нельзя использовать V_{\max} вместо k_2 . Причиной этому служит то, что в этом случае максимальная скорость является функцией концентрации продукта, суммы и отношения трех констант скорости (ср. (458)), а уравнение Аррениуса справедливо только для элементарных стадий реакции. Аналогично, широко используемая практика построения графика $\lg v_0$ от $1/T$ в качестве графика Аррениуса ошибочна. Так как в выражение (433) для v_0 входит величина K_M , зависящая от температуры, этот метод не может привести к имеющим смысл результатам.

Обычный график Аррениуса, зависимость $\lg(k/T)$ от $1/T$, может иметь точку(и) перелома. Если температурная зависимость данной ферментативной реакции не подчиняется линейному закону, это может объясняться следующими причинами:

- 1) изменение фазового состояния растворителя;
- 2) в реакционной смеси протекают две параллельные реакции с разными температурными коэффициентами, катализируемые разными активными центрами фермента, либо различными ферментами;
- 3) изучаемая реакция протекает в две или более последовательные элементарные стадии. Это наиболее частая причина отсутствия линейности графика Аррениуса;
- 4) фермент, катализирующий реакцию, присутствует в двух формах, имеющих разные активности;
- 5) фермент инактивируется необратимо. Этот случай идентичен

предыдущему, но одна из двух форм фермента, находящихся в равновесии, неактивна;

б) изменение температуры влияет только на сродство субстрата к ферменту, но не на сродство продукта (или наоборот), что изменяет механизм реакции.

Однако, если рассмотреть точку перелома на «псевдоаррениусовом» графике $\lg v_0$ в зависимости от $1/T$, она отражает лишь изменение температурной зависимости K_M и из этого нельзя сделать выводы, касающиеся механизма реакции.

Обычной практикой также является построение графика $\lg K_M$ от $1/T$ в качестве графика Вант-Гоффа. Это тоже бессмысленно, и не приводит к полезным результатам, так как даже в простейшем случае K_M является суммой и отношением трех констант скорости, в то время как интерпретация соотношения Вант-Гоффа справедлива только для равновесия (т. е. для отношения двух констант скорости) элементарных стадий. Для определения константы диссоциации фермент-субстратного или фермент-ингибиторного комплекса можно использовать график Вант-Гоффа (с относительными концентрациями, см. разд. 2.13, рис. 20).

Соотношение констант скорости ингибированной и неингибированной ферментативных реакций (в случае механизма быстрого установления равновесия Михаэлиса—Ментен) также можно использовать для того, чтобы определить, обусловливается ингибирование энтропийными или энтальпийными факторами.

Если k и k_i — константы скорости неингибированной и ингибированной реакций соответственно, тогда, согласно уравнению (274), $k = Ae^{-E/RT}$ и $k_i = A_i e^{-E_i/RT}$. Умножив обе части уравнений на $[E]_T$, после деления уравнений друг на друга и логарифмирования, получим

$$\lg (V/V_i) = \lg (A/A_i) + \Delta E/2,3RT \quad (893)$$

где V_i — максимальная скорость ингибированной реакции, A/A_i — константа, величина которой составляет $\Delta S^*/2,3R$, и ΔE — разность энергий активации ингибированной и неингибированной реакций. Строя график $\lg (V/V_i)$ от $1/T$, получаем прямую линию с наклоном, который непосредственно дает разность между энергиями активации, а также и энтальпиями обеих реакций. Если наклон равен нулю, т. е. линия параллельна абсциссе, ингибирование вызвано энтропийными факторами. Последний случай относится к полностью конкурентному ингибированию, когда тип ингибирования не изменяется с изменением температуры.

3.4.4. Влияние рН на скорость ферментативной реакции. рН может влиять на скорость ферментативной реакции тремя способами, воздействуя на: 1) максимальную скорость; 2) образование фермент-субстратного комплекса, что в простом случае (т. е. когда V_{\max} не зависит от рН) проявляется в изменении константы Михаэлиса; 3) устойчивость фермента.

Информацию, касающуюся природы групп активного центра фермента, можно получить только при изучении двух первых эффектов. Третий только дает кажущийся рН-оптимум, форма которого такая же, как и так называемого температурного оптимума фермента. Последний также не является истинным оптимумом, потому что форма функции зависит также от неспецифической денатурации фермента.

Скорость ферментативных реакций всегда зависит от концентрации H^+ и фермента при условии, что субстрат используется в достаточном избытке. К тому же на скорость реакции могут также влиять константы кислотной и щелочной ионизаций 1) фермента, 2) фермент-субстратного комплекса и 3) субстрата.

Исследуя влияние рН на максимальную скорость, мы получаем информацию о тех группах фермента, ионизационное состояние которых влияет на активность каталитического центра. Величина pK , получения из рН-зависимости максимальной скорости, характеризует pK того аминокислотного остатка, ионизация или деионизация которого необходима для превращения субстрата.

По характеру зависимости константы Михаэлиса и константы диссоциации от рН можно судить о природе групп, участвующих в образовании фермент-субстратного комплекса, *ионизированное* или *деионизированное состояние* которых необходимо для образования комплекса. Полученные таким образом величины pK характеризуют аминокислотную группу, которая принимает участие в образовании комплекса, т. е. находится в связывающем центре.

Если максимальная скорость и константа Михаэлиса имеют аналогичные рН-зависимости, связывающий и каталитический центры могут перекрываться на поверхности фермента и, таким образом, ионизация одних и тех же групп необходима для связывания и превращения субстрата.

Этот метод оказался полезным для объяснения роли гистидина в механизме действия различных эстераз или в доказательстве роли SH-групп в папаине и т. д.

Описанный подход можно применять и для изучения ингибирования. Анализируя рН-зависимость константы диссоциации (K_1) ин-

гибитора, по величине pK можно сделать выводы об аминокислотных группах, участвующих в связывании ингибитора. В некоторых случаях это может служить контролем того, является ингибирование истинно конкурентным или имеет кажущийся конкурентный характер. В этом случае вычисленные из pH -зависимости констант диссоциации субстрата и ингибитора величины pK должны быть одинаковыми, так как в случае конкурентного ингибирования одни и те же группы связывают субстрат и ингибитор. Если оба этих измерения дают разные величины pK , ингибирование имеет только кажущийся конкурентный характер, поскольку связывающие группы неидентичны.

Рассмотрим процесс ионизации двухосновной кислоты, обозначая H^+ через H :



$$K_1 = [AH^-][H]/[AH_2] \quad (894)$$

$$K_2 = [A^{2-}][H]/[AH^-] = [A^{2-}][H]^2/[AH_2]K_1 \quad (895)$$

$$[A]_T = [AH_2] + [AH^-] + [A^{2-}] \quad (896)$$

$$[A]_T = [AH_2](1 + K_1/[H] + K_1K_2/[H]^2) = [AH_2]f \quad (897)$$

$$[A]_T = [AH^-](1 + [H]/K_1 + K_2/[H]) = [AH^-]f^- \quad (898)$$

$$[A]_T = [A^{2-}](1 + [H]/K_2 + [H]^2/K_1K_2) = [A^{2-}]f^{2-} \quad (899)$$

т. е.

$$f = 1 + K_1/[H] + K_1K_2/[H]^2 \quad (900)$$

$$f^- = 1 + [H]/K_1 + K_2/[H] \quad (901)$$

$$f^{2-} = 1 + [H]/K_2 + [H]^2/K_1K_2 \quad (902)$$

Это так называемые *pH-функции Михаэлиса*.

Точно такие же отношения применяются к диполярным ионам, в которых второе промежуточное соединение несет как положительный, так и отрицательный заряд. Строя график pH -функций Михаэлиса мы получаем кривые, в которых pH -зависимость величины, обратной f^- , соответствует pH -зависимости активности фермента (рис. 64).

По крайней мере для простейшей односубстратной реакции, подчиняющейся уравнению Михаэлиса—Ментен, можно сделать вывод о том, ионизация какой группы (основной или кислотной) необходима для проявления ферментативной активности. Из вышеприведенной функции ($1/f^-$ от pH) следует, что в точке pH -оптимума $[H^+] = \sqrt{K_1K_2}$.

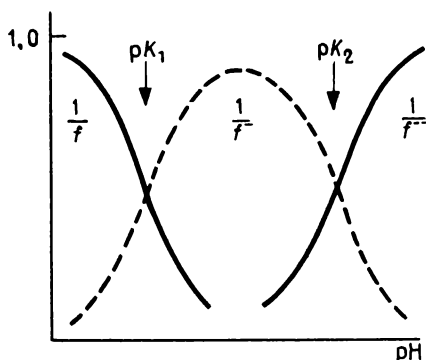


Рис. 64. График рН-функций Михаэлиса.

Если мы исследуем отдельно влияние рН на максимальную скорость, то рН-зависимость ее будет функцией только рН-зависимости k_2 , так как $V_{\max} = k_2[E]_T$. Поэтому константа скорости k_2 включает две величины: рН-независимую часть \tilde{k}_2 , определяющую скорость распада активного комплекса ES в данном ионизационном состоянии, и соотношение, определяющее концентрацию этого комплекса с данным состоянием ионизации при разных значениях рН:

$$k_2 = \tilde{k}_2 / f_{ES} \quad (903)$$

Из этого следует, что

$$v = \tilde{k}_2 [ES]^* / f_{ES} \quad (904)$$

где k_2 — константа скорости распада $[ES]^*$, $[ES]^*$ — общая концентрация фермент-субстратного комплекса, $[ES]^* / f_{ES}$ — концентрация комплекса в том ионизационном состоянии, которое вызывает распад субстрата при разных рН.

Из соотношений (901) и (903)

$$V_{\max} = \tilde{k}_2 [E]_T / (1 + [H]/K_{ES_1} + K_{ES_2}/[H]) \quad (905)$$

где K_{ES_1} — кислотная, а K_{ES_2} — щелочная константы диссоциации. Чтобы сделать уравнение безразмерным, умножаем обе части на $M^{-1} \cdot c$; логарифмируя, получаем выражение

$$\lg V_{\max} = \lg \tilde{k}_2 [E]_T - \lg f_{ES} \quad (906)$$

Так как первый член в правой части уравнения не зависит от рН, строя график $\lg V_{\max}$ от рН, получаем значения рК, характерные для ионизации тех групп комплекса ES, которые влияют на активность (рис. 65, б).

Анализируя влияние pH на K_S , можно записать

$$E^* + S \rightleftharpoons ES^*, \quad \bar{K}_S = [E^*][S]/[ES]^* \quad (907)$$

где \bar{K}_S не зависит от pH, если E^* обозначает уже определенную ионизированную форму фермента, а S обозначает субстрат в требуемой (например, неионизированной) для протекания реакции форме.

$$K_S = [E][S]/[ES] = [E^*]f_E^- [S]f_S / [ES^*]f_{ES}^- = \bar{K}_S (f_E^- f_S / f_{ES}^-) \quad (908)$$

Умножив обе части уравнения на M^{-1} и взяв отрицательный логарифм, получаем

$$pK_S = p\bar{K}_S + \lg f_{ES}^- - \lg f_E^- - \lg f_S \quad (909)$$

Графики зависимости pK_S , pK_M или $\lg V_{\max}$ от pH дают кривые с целочисленными наклонами, а именно -2 , -1 , 0 , 1 , 2 (см. разд. 2.21 и рис. 23). Выпуклые участки кривой позволяют вычислить величины pK групп свободного фермента, а вогнутые участки кривой дают значения pK групп в комплексе ES (рис. 65, а).

Из графика зависимости $\lg (V_{\max}/K_M)$ от pH получаем величину pK для свободного фермента (рис. 65, в). Таким образом, с помощью трех графических построений можно установить, какие pK отвечают группам свободного фермента, фермент-субстратного комплекса или субстрата.

При изучении зависимости скорости реакции от pH следует иметь в виду возможность изменения механизма реакции. Так, известны реакции, скорость лимитирующей стадией которых в кислой среде является ассоциация субстрата, а в щелочной среде скорость реакции определяется стадией диссоциации продукта. В этих случаях наблюдаемая pH-зависимость, по крайней мере частично, является следствием изменения реакционного механизма.

Часто бывает, что V_{\max} сильно зависит от pH, а K_M практически не зависит от него (это несправедливо для K_S). В таких случаях желательно проверить pH-зависимость не только параметров полной реакции, но также и индивидуальных констант.

Если кинетика реакции подчиняется приближению Бриггса—Холдейна, а не Михаэлиса—Ментен (т. е. при рассмотрении используется $K_M = (k_{-1} + k_2)/k_1$, а не K_S , то следует обратить внимание на тот факт, что k_1 зависит от ионизации как фермента, так и субстрата, но не зависит от ионизации ES -комплекса. В то же время k_{-1} и k_2 являются функциями ионизации ES , но не свободных фермента и субстрата. Поэтому

$$K_M = (k_{-1} + k_2)/k_1 = [(\bar{k}_{-1} + \bar{k}_2)/\bar{k}_1] (f_E^- f_S / f_{ES}^-) \quad (910)$$

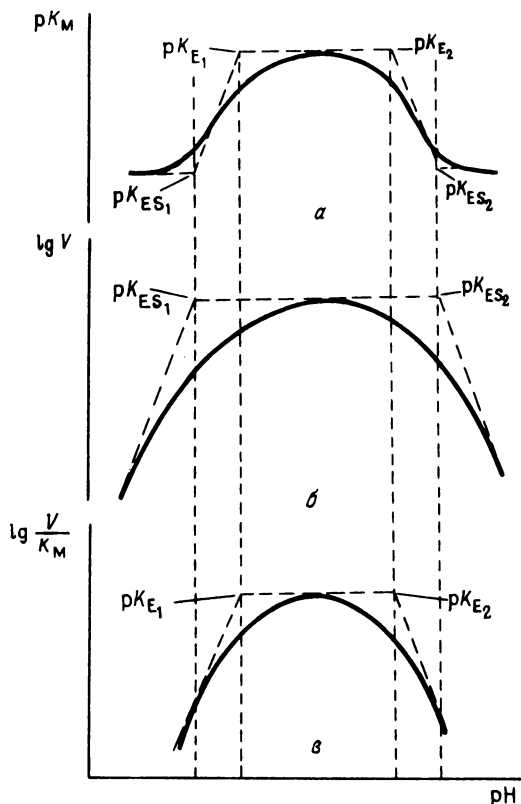


Рис. 65. Изучение pH-зависимостей кинетических параметров ферментативных реакций согласно Диксону (а и б) и Пеллеру и Альберти (в).

а — pH-зависимость pK_M ; б — $\lg V = f(\text{pH})$; в — изменение $\lg(V/K_M)$ от pH. Наклоны во всех случаях равны 0, -1 и 1.

Уравнение для полной реакции имеет вид

$$v = [\tilde{k}_2[E]_T / (1 + [H]/K_{ES_1} + K_{ES_2}/[H])] / \{1 + (1 + [S])(\tilde{k}_{-1} + \tilde{k}_2)/\tilde{k}_1\} [(1 + [H]/K_{E_1} + K_{E_2}/[H])(1 + K_{S_1}/[H] + K_{S_1}K_{S_2}/[H]^2) / (1 + [H]/K_{ES_1} + K_{ES_2}/[H])] \} \quad (911)$$

Для pH-зависимости ингибирования справедливы следующие уравнения:

$$K_I = \tilde{K}_I (f_{E^-} f_I / f_{EI}) \quad (912)$$

$$pK_I = p\tilde{K}_I + \lg f_{E^-} - \lg f_{EI} - \lg f_I \quad (913)$$

Как и описано выше, график зависимости pK_I от pH дает кривые, для которых точки пересечения касательных дают величины pK , характерные для свободного фермента и фермент-ингибиторного комплекса.

Таблица XIII. Комплексный анализ pH-зависимости ферментативных реакций

pH-Оптimum	w при низких [S]		w при высоких [S]		K _m	V/v ₀		Группы фермента E, участвующие в образовании ES
	кислый	щелочной центр	кислый	щелочной центр	кислый	кислый	щелочной центр	
Не зависит от [S]	Увеличивается с pH и ся с рН и проходит экстремум	Уменьшается с pH и ся с рН и проходит экстремум	Не зависит от pH	Увеличивается с pH и ся с рН и проходит экстремум	Уменьшается с pH и ся с рН и проходит экстремум	Пропорционально [H ⁺] ^a	Пропорционально 1/[H ⁺]	Обе кислотная и щелочная группы г
Увеличивается с увеличением [S]	Увеличивается с pH и ся с рН и проходит экстремум	Увеличивается с pH и ся с рН и проходит экстремум	Не зависит от pH	Увеличивается с pH и ся с рН и проходит экстремум	Увеличивается с pH и ся с рН и проходит экстремум	Пропорционально [H ⁺] ^б	Пропорционально 1/[H ⁺] ^а	Только кислотная группа г
Уменьшается с увеличением [S]	Увеличивается с pH и ся с рН и проходит экстремум	Уменьшается с pH и ся с рН и проходит экстремум	Уменьшается с pH и ся с рН и проходит экстремум	Не зависит от pH	Уменьшается с pH и ся с рН и проходит экстремум	Пропорционально [H ⁺] ^а	Пропорционально 1/[H ⁺] ^б	Только щелочная группа г
Не зависит от [S]	Увеличивается с pH и ся с рН и проходит экстремум	Уменьшается с pH и ся с рН и проходит экстремум	Увеличивается с pH и ся с рН и проходит экстремум	Не зависит от pH	Не зависит от pH	Пропорционально [H ⁺] ^в	Пропорционально 1/[H ⁺]	Ни щелочная, ни кислотная лютная группа

^а Коэффициент пропорциональности уменьшается с увеличением [S]. ^б Коэффициент пропорциональности изменяется с изменением [S].

^в Коэффициент пропорциональности не зависит от [S]. ^г В ионизированной форме.

Однако не следует забывать, что этот интересный и важный метод имеет серьезные недостатки. В первую очередь pK свободных аминокислот может отличаться от pK аналогичных аминокислотных остатков в белке на 1—3 единицы pH . Таким образом, идентификация природы группы только по величине pK весьма сомнительна, если мы не имеем других независимых данных, подтверждающих данные pH -зависимости. Другая трудность заключается в том, что величины pK ряда аминокислот весьма близки друг к другу и даже одинаковы. Очевидно, что в таких случаях использование только этого метода недостаточно для идентификации групп, активно участвующих в реакции.

Комплексный анализ может показать, какая группа фермента — кислая или щелочная — включена в образование фермент-субстратного комплекса. Такого рода комплексный анализ суммирован в табл. XIII.

3.5. КИНЕТИКА ТРАНСПОРТНЫХ ПРОЦЕССОВ И ВЛИЯНИЕ ДИФфуЗИИ СУБСТРАТА НА КИНЕТИКУ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Исследование кинетики транспортных процессов имеет важное значение при изучении перемещения метаболитов в цитоплазме и через мембрану. Поддержание специфической среды красных кровяных клеток, нейронов, митохондрий и т. д. невозможно без активного транспорта определенных веществ. Это подчеркивает важность изучения кинетики как пассивного (диффузия), так и активного (с помощью переносчиков, транслоказ) транспорта. В процессах, происходящих в живом организме, скорость ферментативной реакции сама по себе не определяет скорости рассматриваемого метаболического превращения, так как пассивный и(или) активный транспорт промежуточных соединений всегда влияет на общий выход.

В случае *пассивного транспорта*, согласно *первому закону Фика*,

$$J_c = -P_c \Delta C \quad (914)$$

где J_c — скорость движения субстрата C (моль/с), P_c — *коэффициент проницаемости* (ед. длины/с) в данной среде и ΔC — разность концентраций C между начальным и конечным состояниями (примем, что это величина почти постоянна). В микроскопическом объеме *концентрационный профиль* можно получить исходя из

второго закона Фика

$$d(D dC/dx)/dx = 0 \quad (915)$$

а скорость — из первого закона (т. е. из уравнения (914)):

$$J_c = -D dC/dx \quad (916)$$

где D — коэффициент диффузии ($\text{см}^2/\text{с}$) и x — координата направления диффузии (см. (329), (330)).

Если концентрация вещества C равна C_0 во внеклеточном пространстве и C в клетке или в клеточной органелле, в которую вещество входит с коэффициентом проницаемости P_0 и превращается в продукт, согласно кинетике первого порядка, характеризующейся константой скорости k , то

$$P_c(C_0 - C) - kC = 0, \quad C = C_0/(1 + k/P_c) \quad (917, 918)$$

где $k/P_c = \beta$ — одна из форм модуля Тиле, отражающего влияние транспортных процессов на химическую реакцию.

Скорость реакции равна скорости транспорта:

$$J_r = kC_0/(1 + \beta) \quad (919)$$

Если мембрана толщиной L разделяет два резервуара, концентрация вещества C в которых равна C_0 и C_L , и константа скорости первого порядка потребления C равна k , то граничные условия имеют следующий вид:

$$Dd^2C/dx^2 - kC = 0, \quad C(0) = C_0, \quad C(L) = C_L \quad (920)$$

и модуль Тиле равен

$$\beta = L(k/D)^{1/2} \quad (921)$$

Концентрационный профиль задается уравнением

$$C(x) = \{C_0 \operatorname{sh} [\beta(1 + x/L)] + C_L \operatorname{sh} (\beta x/L)\} / \operatorname{sh} \beta \quad (922)$$

и скорость реакции

$$J_r = 2Lk\bar{C} \operatorname{th} (\beta/2)/\beta \quad (923)$$

где

$$\bar{C} = (C_0 + C_L)/2 \quad (924)$$

Ясно, что сочетание диффузионных процессов с химической реакцией делает уравнения, описывающие потребление субстрата (или образование продукта) такими сложными, что использование их в обычной лабораторной практике биохимиков весьма сложно.

Если для ферментов, включенных в мембраны, но подчиняющихся кинетике Михаэлиса—Ментен (например, для ферментов митохондрий), принять, что фермент случайным образом (почти равномерно) распределен по мембране толщиной l , то изменение концентрации субстрата внутри мембраны задается уравнением

$$\partial S_m / \partial t = D_m \partial^2 S_m / \partial x^2 - v_m(x, t) \quad (925)$$

где t — время; индекс m обозначает величину внутри мембраны; x — координата в направлении l . На внешней границе (соответствующие величины сопровождаются нижним индексом o) $x = 0$, на внутренней (индекс i) $x = l$. S — концентрация субстрата, D — коэффициент диффузии субстрата и v — скорость ферментативной реакции. В точке x мембраны в момент времени t уравнение для скорости движения субстрата имеет вид

$$J_m(x, t) = -D_m(\partial S_m / \partial x)_{x,t} \quad (926)$$

Средняя скорость расходования субстрата во внешнем пространстве задается уравнением

$$\bar{v}_{m,o} = -J_m(A/v_o) \quad (927)$$

где A — площадь поверхности, v_o — объем внешнего пространства. В стационарных условиях $\partial S_m / \partial t = 0$. Примем, что $S_o = S_i$ и отсутствует влияние pH на исследуемый процесс. Тогда, если $S_m \gg K_M$ (реакция нулевого порядка), получаем

$$\bar{v}_{m,o}(0) = -V_{\max} l A / 2\nu \quad (928)$$

Если $S_m \ll K_M$ (реакция первого порядка), то

$$\bar{v}_{m,o}(1) = -V_{\max} l A S_o 2(e^a + e^{-a} - 2) / 2\nu_o K_M a (e^a - e^{-a}) \quad (929)$$

где a — безразмерный параметр диффузионной реакции:

$$a = \sqrt{V_{\max} l^2 / K_M D_m} \quad (930)$$

где отношения V_{\max} / K_M и D_m / l^2 характеризуют ферментативную реакцию и процесс диффузии субстрата S соответственно.

Если $a \ll 1$, графики в координатах Лайнуивера—Берка имеют линейный характер, потому что из преобразования (929) получаем

$$\bar{v}_{m,o}(1) = -V_{\max} l A S_o / 2\nu_o K_M = \bar{V}_{\max} S_o / K_M \quad (931)$$

где

$$\bar{V}_{\max} = -V_{\max} l A / 2\nu_o \quad (932)$$

и из уравнений (928) и (932) следует, что

$$\bar{V}_{\max} = \bar{v}_{m,0}(0) \quad (933)$$

Таким образом, величина K_M , полученная из графика Лайнуивера—Берка, та же самая, что и в растворе, а V_{\max} — пропорциональна величине, измеренной в растворе. Если $a \ll 1$, график в двойных обратных координатах не дает линейной зависимости. При малых величинах $1/S$ график имеет форму вогнутой кривой, как в случае активации избытком субстрата. В менее сложных случаях кривую можно аппроксимировать двумя прямыми линиями, которые напоминают случай либо фермента, имеющего два различных значения K_M , либо двух ферментов, действующих параллельно. Такого рода артефакты следует всегда иметь в виду при изучении ферментов, включенных в структуры мембран, в том случае, если пассивный транспорт субстрата влияет на кинетику реакции. Аналогично не возникает линейной зависимости как в двойных обратных координатах, так и в координатах Диксона даже в присутствии ингибиторов различных типов. Таким образом, если $a \gg 1$, нельзя определить величину K_I никаким из обычных методов.

В случае *активного транспорта*, если мембрана сообщается с перемешиваемым внешним пространством (которое близко к физиологическим условиям), скорость однонаправленного движения вещества определяется как

$$J = J_{\max} C / (K_M + C) \quad (934)$$

где J — скорость переноса на единицу поверхности мембраны в одном направлении, C — концентрация переносимого вещества. Так как во внешнем пространстве отсутствует перемешивание, вблизи от переносчика (т. е. белка, с помощью которого осуществляется активный транспорт) концентрация переносимого вещества уменьшается. То есть

$$J = J_{\max}(C - RJ) / [K_M + (C - RJ)], \quad \text{где} \quad R = d/DA \quad (935, 936)$$

d — истинная толщина перемешиваемого слоя раствора, D — коэффициент диффузии для транспортируемого вещества, A — истинный объем абсорбционного слоя на единицу поверхности мембраны. Следовательно, R — это эффективное сопротивление перемешиваемого слоя (ед. поверхности \times время/объем).

Преобразованием уравнения (935) получаем

$$J = J_{\max} - (J/C)[K_M + R(J_{\max} - J)] \quad (937)$$

График J от J/C (график Иди—Хофсти, см. (504), рис. 33) не

дает линейных зависимостей, но экстраполяция к пересечению с осью J/C (где C и J равны нулю) приводит к следующему уравнению (так как для низких величин J аппроксимация прямой линией не приводит к слишком большим ошибкам):

$$(J/C)_{C=0} = J_{\max}/(K_M + RJ_{\max}) \quad (938)$$

С помощью еще одного преобразования (935) получаем

$$J = C(J_{\max} - J)/[K_M + R(J_{\max} - J)] \quad (939)$$

Подставляя (939) в третьи скобки правой части уравнения (937), получаем

$$J = J_{\max} - (J/C)[K_M + RJ_{\max} - CR(J_{\max} - J)]/[K_M + R(J_{\max} - J)] \quad (940)$$

После перегруппировки

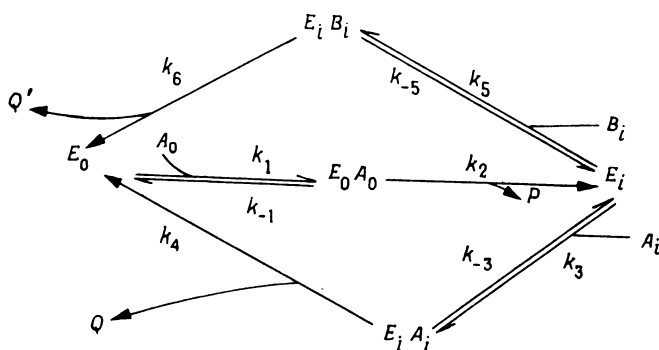
$$J[1 - R(J_{\max} - J)/(K_M + R(J_{\max} - J))] = J_{\max} - (J/C)(K_M + RJ_{\max}) \quad (941)$$

$$J = J_{\max}[K_M + R(J_{\max} - J)]/K_M - (J/C)\{[K_M + R(J_{\max} - J)](K_M + RJ_{\max})\}/K_M \quad (942)$$

Точка пересечения с осью J при $C = \infty$ дает величину

$$(J)_{C=\infty} = J_{\max} \quad (943)$$

Если активный транспорт происходит в результате действия фермента транслоказы (Е), обеспечивающего обратимый ввод вещества или, в обмен на ввод, вывод другого вещества, то этот белок имеет связывающие участки как на внешней, так и на внутренней стороне мембраны (E_o и E_i соответственно). Пусть E_T — общая концентрация транслоказы, A_o , A_i и B_o , B_i — начальные концентрации обмениваемых веществ; кроме того, пусть часть A_o , которая переносится во внутреннее пространство, будет тождественно равна P , часть A_i , переносимая во внешнее пространство, равна Q , а часть B_i равна Q' , тогда модель системы в простом случае может быть представлена следующим образом:



При условии, что комплексы EQ , EQ' и EP кинетически несущественны, уравнение для начальной скорости транспорта имеет вид

$$E_T/v_0 = [k_3(k_2 + k_4)(k_{-5} + k_6) + k_5(k_2 + k_6)(k_{-3} + k_4)(B_i/A_i)] / [k_2 k_3 k_4 (k_{-5} + k_6) + k_2 k_5 k_6 (k_{-3} + k_4)(B_i/A_i)] + (k_{-1} + k_2)/k_1 k_2 A_0 + (k_{-3} + k_4)(k_{-5} + k_6) / [k_4 k_4 (k_{-5} + k_6) + k_5 k_6 (k_{-3} + k_4)(B_i/A_i)] A_i \quad (944)$$

График зависимости E_T/v_0 от $1/A_i$ при условии, что $1/A_0$ или B_i/A_i — константы, имеет вид прямой линии с наклоном, независимым от A_i или A_0 . Таким образом при изменении A_i или A_0 получается серия параллельных прямых (ср. пинг-понговый механизм для двухсубстратной ферментативной реакции, разд. 3.10.1).

В общем случае можно принять следующую модель:

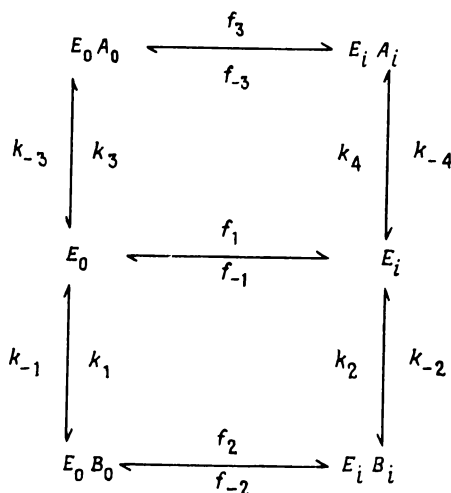


Таблица XIV. Величины констант в уравнении (945)

Константа	В общем случае	При быстрой диссоциации
\bar{K}_{A_0}	$(f_1 + f_{-1})H/k_1[k_{-2}(f_{-1} + f_2) + f_{-1}(f_2 + f_{-2})]$	$K_{A_0}(f_1 + f_{-1})/(f_{-1} + f_2)$
\bar{K}_{B_1}	$(f_1 + f_{-1})G/k_3[k_{-4}(f_{-1} + f_3) + f_{-1}(f_3 + f_{-3})]$	$K_{B_0}(f_1 + f_{-1})/(f_{-1} + f_3)$
\bar{K}_{A_1}	$(f_1 + f_{-1})H/k_2[k_{-1}(f_1 + f_{-2}) + f_1(f_2 + f_{-2})]$	$K_{A_1}(f_1 + f_{-1})/(f_1 + f_{-2})$
\bar{K}_{B_1}	$(f_1 + f_{-1})G/k_4[k_{-3}(f_1 + f_{-3}) + f_1(f_3 + f_{-3})]$	$K_{B_1}(f_1 + f_{-1})/(f_1 + f_{-3})$
$\bar{K}_{A_0}^A$	$[k_{-1}(f_1 + f_{-2}) + f_1(f_2 + f_{-2})]/k_1(f_2 + f_{-2})$	$K_{A_0}(f_1 + f_{-2})/(f_2 + f_{-2})$
$\bar{K}_{B_0}^B$	$[k_{-3}(f_1 + f_{-3}) + f_1(f_3 + f_{-3})]/k_3(f_3 + f_{-3})$	$K_{B_0}(f_1 + f_{-3})/(f_3 + f_{-3})$
$\bar{K}_{A_0}^B$	$[k_{-3}(f_1 + f_{-3}) + f_1(f_3 + f_{-3})]H/k_1[k_{-3}f_{-3}(k_{-2} + f_2 + f_{-2}) + k_{-2}f_2(k_{-3} + f_3 + f_{-3})]$	$K_{A_0}(f_1 + f_{-3})/(f_2 + f_{-3})$
$\bar{K}_{B_0}^A$	$[k_{-1}(f_1 + f_2) + f_1(f_2 + f_{-2})]G/k_3[k_{-1}f_{-2}(k_{-4} + f_3 + f_{-3}) + k_{-4}f_3(k_{-1} + f_2 + f_{-2})]$	$K_{B_0}(f_1 + f_{-2})/(f_{-2} + f_3)$
\bar{V}_{A_1}	$k_{-1}f_1f_{-2}[E_T]/[k_{-1}(f_1 + f_{-2}) + f_1(f_2 + f_{-2})]$	$[E_T]f_1f_{-2}/(f_1 + f_{-2})$
$\bar{V}_{A_0}^B$	$k_{-1}k_{-4}f_{-2}f_3[E_T]/[f_3k_{-4}(k_{-1} + f_2 + f_{-2}) + f_{-2}k_{-1}(k_{-4} + f_3 + f_{-3})]$	$[E_T]f_{-2}f_3/(f_3 + f_{-2})$
\bar{V}_{B_0}	$k_{-4}f_{-1}f_3[E_T]/[k_{-4}(f_{-1} + f_3) + f_{-1}(f_3 + f_{-3})]$	$[E_T]f_{-1}f_3/(f_{-1} + f_3)$
\bar{V}_{A_0}	Можно вычислить из (946)	
\bar{V}_{B_1}	Можно вычислить из (947)	

Уравнение для скорости реакции, соответствующей вышеприведенной схеме, имеет вид

$$\begin{aligned}
 -d[A_i]/dt = & [(\bar{V}_{A_i}/\bar{K}_{A_i})([A_i] - \alpha[A_0]) + (\bar{V}_{A_i}^B/\bar{K}_{A_i}\bar{K}_{B_0}^A)([A_i][B_0 - \\
 & - (\alpha/\beta)[A_i][B_0]])/(1 + [A_0]/\bar{K}_{A_0} + [A_i]/\bar{K}_{A_i} + [B_0]/\bar{K}_{B_0} + [B_i]/\bar{K}_{B_i} + \\
 & + [A_0][A_i]/\bar{K}_{A_0}^A\bar{K}_{A_i} + [B_0][B_i]/\bar{K}_{B_0}^B\bar{K}_{B_i} + [A_0][B_i]/\bar{K}_{A_0}^B\bar{K}_{B_i} + \\
 & + [B_0][A_i]/\bar{K}_{B_0}^A\bar{K}_{A_i})] \quad (945)
 \end{aligned}$$

где (нижний индекс f означает конечное состояние)

$$\alpha = ([A_i]/[A_0])_f = (\bar{V}_{A_0}/\bar{K}_{A_0})/(\bar{V}_{A_i}/\bar{K}_{A_i}) = f_{-1}f_2k_1k_{-2}/f_1f_{-2}k_{-1}k_2 \quad (946)$$

$$\beta = ([B_i]/[B_0])_f = (\bar{V}_{B_0}/\bar{K}_{B_0})/(\bar{V}_{B_i}/\bar{K}_{B_i}) = f_{-1}f_3k_3k_{-4}/f_1f_{-3}k_{-3}k_4 \quad (947)$$

Здесь $K_{A_0} = k_{-1}/k_1$, $K_{A_i} = k_{-2}/k_2$, $K_{B_0} = k_{-3}/k_3$, $K_{B_i} = k_{-4}/k_4$, а другие константы сведены в табл. XIV, где $G = k_{-3}f_{-3} + k_{-3}k_{-4} + k_{-4}f_3$ и $H = k_{-1}f_{-2} + k_{-1}k_{-2} + k_{-2}f_2$.

Если $[A_0] = [B_i] = 0$ и $[A_i] \ll \bar{K}_{A_i}$, то

$$v = -d[A_i]/dt = ([A_i]/\bar{K}_{A_i})[\bar{V}_{A_i} + \bar{V}_{B_0}^A([B_0]/\bar{K}_{B_0}^A)]/(1 + [B_0]/\bar{K}_{B_0}) \quad (948)$$

При изучении кинетики транспорта можно использовать конкурентные, неконкурентные, бесконкурентные и т. д. ингибиторы та-

ким же образом, как в случае анализа ферментативных реакций. Однако вследствие относительной сложности этих подходов, они не будут рассматриваться в этой книге.

3.6. КИНЕТИКА ДЕЙСТВИЯ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ

Первый вопрос, который возникает, заключается в том, есть ли смысл в изучении кинетического поведения ферментов, включенных *in vitro* в искусственные мембраны или связанных с носителем. В действительности это необходимо с двух точек зрения.

Практический аспект проблемы состоит в том, что иммобилизованные ферменты находят все большее применение в промышленности, медицине и аналитической химии. В промышленности они применяются в качестве высокоэффективных, специфических катализаторов, которые могут быть регенерированы и использованы для разделения рацематов, в производстве различных реактивов, фармацевтических средств, пищевых и кормовых добавок и т. п. Их можно использовать в реакторе перемешивания, в колоночном реакторе, в виде волокон и т. д. В медицине использование иммобилизованных ферментов перспективно для лечения наследственных дефектов ферментов или в виде микрокапсул для создания искусственной почки или поджелудочной железы. Аналитическое применение иммобилизованных ферментов приобретает все большее значение особенно в случае мембранных электродов, обладающих повышенной чувствительностью и (что более важно) высокой специфичностью.

Теоретическое значение этой проблемы заключается в создании путей лучшего понимания функционирования ферментов *in vivo*, так как ферменты дыхания, белкового синтеза или активного транспорта все включены в мембраны или субклеточные структуры.

Для ферментов, связанных с носителем или включенных в мембраны, можно рассматривать такую последовательность процессов: 1) субстрат из раствора диффундирует к поверхности носителя; 2) субстрат пересекает границу раздела и диффундирует внутри носителя; 3) субстрат превращается в продукт под действием фермента; 4) продукт диффундирует к поверхности носителя; 5) продукт диффундирует в объем раствора от поверхности носителя.

Понятно, что в противоположность реакциям, протекающим в растворе, на кинетику реакции будут оказывать влияние как диффузионные свойства продукта и субстрата, так и характеристика рас-

твора, пограничного слоя и носителя, как это имеет место в транспортных процессах. На активность фермента влияет химический состав и физическое состояние носителя, локальные концентрации и вид концентрационного профиля реагирующих веществ в носителе. Гидрофобный или гидрофильный характер поверхности и внутренней части носителя, так же как плотность и вид поверхностных зарядов могут оказывать критическое влияние на скорость реакции. Например, если концентрация ионов в растворе соизмерима с K_M субстрата и мембрана обладает идентичными зарядами, тогда наблюдается сигмовидная форма кривой насыщения, хотя в растворе это и не имеет места.

Влияние носителя непосредственно на фермент и на реакцию, им катализируемую, проявляется в виде ниже перечисленных эффектов.

1. *Конформационный эффект*, т.е. структура связанного или включенного в мембрану фермента отличается от его структуры в растворе.

2. *Влияние окружения*, т.е. та окружающая связанный фермент среда, через которую субстрат проникает в активный центр, отличается от среды раствора, например, она более гидрофобна или обладает другим распределением электростатических зарядов и т.д.

3. *Эффект распределения*, т.е. концентрация субстрата внутри носителя отличается от концентрации в растворе.

4. *Диффузионный эффект*, т.е. на кинетику в большей или меньшей степени оказывает влияние скорость диффузии.

5. *Стерические затруднения*, проявляющиеся в том, что мембрана может экранировать активный центр или часть его.

Уравнения, описывающие систему, не могут быть решены в общем случае вследствие их сложности. Решение возможно только при введении ряда ограничений такого рода: 1) мембрана плоская; 2) нет помех массопереносу между раствором и мембраной; 3) давлением набухания носителя можно пренебречь; 4) не наблюдается градиента давления в носителе; 5) заряды на носителе фиксированы; 6) не наблюдается ионного градиента в носителе; 7) степень гидратации ионов в носителе не изменяется даже локально; 8) влиянием диэлектрической проницаемости можно пренебречь; 9) различием между коэффициентами активности во внешнем растворе и в носителе можно пренебречь; 10) во всем внешнем объеме (или у любой стороны мембраны) концентрации субстрата и продукта одинаковы; 11) диффузия субстрата и продукта внутри мембраны подчиняется первому закону Фика и процесс диффузии не является функцией локальной координаты; 12) заряды субстрата и продукта

идентичны; 13) не наблюдается взаимодействия между субстратом и носителем; 14) фермент равномерно распределен по мембране; 15) величины V_{\max} и K_M для всех молекул иммобилизованного фермента идентичны; 16) реакция является односубстратной и подчиняется уравнению Михаэлиса—Ментен; 17) продукт не влияет на кинетику реакции; 18) реакция изотермична; 19) система находится в стационарном состоянии.

Все эти ограничения ясно показывают, что полученные таким образом кинетические зависимости имеют мало общего с кинетическим поведением мембраносвязанных ферментов, работающих *in vivo*, потому что вышеприведенные ограничения не соблюдаются для клетки. В случае ферментов с двумя и большим числом субстратов или для регуляторных ферментов решение вообще едва ли существует.

Имеется ряд специфических зависимостей, важных только для ферментов, включенных в мембраны или связанных с носителем.

Коэффициент распределения характеризует соотношение концентраций субстрата (или продукта) между носителем и раствором:

$$S_i = HS, \quad H = \exp(z\epsilon\Omega/RT) \quad (949, 950)$$

где S_i — концентрация субстрата на поверхности мембраны; S — концентрация субстрата в растворе, z — валентность субстрата, ϵ — электрический заряд, Ω — электростатический потенциал.

Фактор эффективности (E) — это отношение скорости, включающей диффузионные затруднения, к скорости при бесконечно высокой скорости диффузии. Для фермента, заключенного в плоскую мембрану и подчиняющегося механизму Михаэлиса—Ментен, получаем

$$E = [(K_M + S_i)/\sqrt{(V_{\max}S_i/2D_S)L}] \times \\ \times \sqrt{(S - S_C) - K_M \ln [(K_M + S)/(K_M + S_C)]} \quad (951)$$

где S_C — концентрация субстрата в центре мембраны, D_S — диффузионная константа субстрата, L — полуширина мембраны.

Если $S_i \rightarrow \infty$ и $m \rightarrow h$, где m — общий модуль, равный

$$m = h/(\beta_1 + \beta_2 + \beta_3)\sqrt{I_2(1, 0)} \quad (952)$$

$$I_2(y, y_C) = (y^2 - y_C^2)/2\beta_1, \quad h = \sqrt{(V_{\max}/2D_S S_i)L} \quad (953) \\ y = S/S_i, \quad y_C = S_C/S_i$$

то, если выполняется кинетика Михаэлиса—Ментен, $\beta_1 = K_M/S_i$,

$\beta_2 = 1, \beta_3 = 0$ и

$$E = E_0 = \begin{cases} 1 & (0 < m \leq 1) \\ 1/m & (m > 1) \end{cases} \quad (954)$$

Если $S_i \rightarrow 0$ и $m \rightarrow \Phi$, где Φ — модуль Тиле, равный

$$\Phi = L\sqrt{(V_{\max}/K_M D_S)} \quad (955)$$

тогда

$$E = E_1 = \text{th}(m)/m \quad (956)$$

Если $0 < S_i < \infty$, то

$$E = (E_0 + \beta_1 E_1)/(1 + \beta_1) \quad (957)$$

Если происходит только поверхностная реакция, т. е. $S_C = 0$, то

$$E = [(1 + \beta_1)/h]\sqrt{1 - \beta_1 \ln(1 + 1/\beta_1)} \quad (958)$$

Для сферической частицы радиусом R

$$E_0 = \begin{cases} 1 & (0 < h_C \leq \sqrt{3}) \\ 1 - \{(1/2) \cos[(\psi + 4\psi)^3/3]\} & (h_C > \sqrt{3}) \end{cases} \quad (959)$$

$$E_1 = (3/\Phi_C)(1/\text{th } \Phi_C - 1/\Phi_C), \quad E = 1/\text{th } 3\Phi_C \quad (960, 961)$$

где

$$\psi = \cos^{-1}(6/h_C^2 - 1), \quad h_C = R\sqrt{(V_{\max}/2D_S S_i)}, \\ \Phi_C = R\sqrt{(V_{\max}/K_M D_S)} \quad (962)$$

Модуль Тиле, упомянутый уже несколько раз, в действительности является соотношением вклада кинетики (V_{\max}/K_M) и характеристических параметров диффузии. Квадрат его, число Дамколера, фактически служит той же цели:

$$F = k'_{\text{cat}}[E]_m r_0^2 / D_S K'_M \quad (963)$$

где k'_{cat} и K'_M — измеряемые (не обязательно истинные) константы скорости и Михаэлиса соответственно; $[E]_m$ — концентрация связанного фермента и r_0 — радиус частицы.

Коэффициент массопереноса дается уравнением

$$k_C = \text{Nu } D_S / d \quad (964)$$

где d — диаметр частицы, Nu — величина критерия Нуссельта, т. е. $\text{Nu} = al/K$, где l — характеристический размер, K — коэффициент теплопроводности жидкости, a — фактор теплопереноса $= q/\Delta T$, где q — количество тепла, перенесенное через единицу поверхности

в единицу времени, и ΔT — разность абсолютных температур между поверхностью тела и жидкостью.

Если необходимо принять во внимание электростатические эффекты, то поток субстрата из раствора к поверхности будет составлен из двух частей, а именно диффузии и миграции, последняя протекает за счет градиента потенциала:

$$J_s = D_s(dS/dx) + S(zD_sF/RT)(d\psi/dx) \quad (965)$$

где x — расстояние от поверхности, z — число зарядов S , F — константа Фарадея и $\psi(x)$ — электростатический потенциал.

В этом случае фактор эффективности имеет вид

$$E = 2(1 + \nu)\{1 + \mu + \nu e^\lambda + [(1 + \mu + \nu e^\lambda)^2 - 4\mu]^{1/2}\}^{-1} \quad (966)$$

где $\nu = K_M/S_f$, $\mu = V_{\max}/Mk_C S_f$, k_C — коэффициент массопереноса (964), S_f — концентрация, измеренная в растворе, $\lambda = zF\psi(0)/RT$ и M — электростатический модифицирующий множитель

$$M^{-1} = (1/\delta) \int_0^\infty \exp(\lambda\psi(x)) dx \quad (967)$$

$\delta = D_s/k_C$ — толщина пограничного слоя.

Для сферической частицы

$$M^{-1} = \int_0^\infty (1 + x/r)^{-2} \exp[\lambda\psi(x)] d(x/r) \quad (968)$$

Коэффициент электростатического распределения имеет вид

$$\Lambda = \exp(-E_D/RT) \quad (969)$$

где $E_D = (RT/F) \ln([S^+]/[S^+]_0)$ — потенциал Доннана, причем индекс «0» обозначает внутримембранную концентрацию, $[B^-]\Lambda^2 \pm \pm [X^\pm]\Lambda - [B^-] = 0$; и $[B^-]$, и $[S^+]$ — концентрации аниона и положительно заряженного иона субстрата в растворе соответственно и X^\pm — заряды, зафиксированные в мембране.

Из этого следует, что $K_M^{\text{эл.-стат.}} = K_M/\Lambda^\pm$ и

$$\Lambda^\pm = (\pm[X^\pm] + \sqrt{[X^\pm]^2 + 4[B^-]^2})/2[B^-] \quad (970)$$

Если не учитывать электростатический эффект, то условия стационарного состояния в системе соответствуют равенству скоростей диффузии и ферментативной реакции, т. е.

$$D_s(d^2S/dl^2) = V_{\max}S/(K_M + S) \quad (971)$$

где l — расстояние от центра мембраны, $2L$ — толщина мембраны.

Решение, полученное в безразмерной форме, имеет вид

$$d^2y/dz^2 = 2h^2y/(\beta_1 + \beta_2y + \beta_3y^2) \quad (972)$$

где

$$y = S/S_i, \quad z = 1/L, \quad h = L\sqrt{(v_{\max}/2D_sS_i)} \quad (973)$$

и при условии если соблюдается кинетика Михаэлиса—Ментен, то $\beta_1 = K_M/S_i$, $\beta_2 = 1$, $\beta_3 = 0$.

Величины констант β отличаются друг от друга в присутствии конкурентного, неконкурентного или бесконкурентного ингибиторов. Важность этого соотношения заключается в том, что оно дает общее решение и при изменении механизма меняются только значения констант.

Для ферментов, включенных в мембраны или связанных с носителями, график Лайнуивера—Берка обычно не является линейным. Все же он может быть аппроксимирован прямой линией в узком диапазоне, где $v = K_M/S \gg 1$ и S — концентрация субстрата в равновесии. Наклон прямой равен $\Phi_m K_M/V_{\max}$, где $\Phi_m = L(V_{\max}/K_M D_{\text{эф}})^{1/2}$. В этом случае можно записать

$$V_{\text{измерен}}/V_{\max} = 1/2 - \eta/(1 + K_M/K_{M, \text{ каж}}) \quad (974)$$

$$\eta \approx (\sqrt{2}\Phi_m)(1 + \nu)[\nu^{-1} - \ln(1 + \nu^{-1})]^{1/2} \quad (975)$$

при условии, что скорость реакции гораздо выше по сравнению со скоростью диффузии.

График Лайнуивера—Берка линеен при $M = 0,1-5$ и $\nu^{-1} = 0,01-1$, так же, как и при $M = 0,1-1$ и $\nu^{-1} = 1-1000$, но нелинеен при $M = 1-5$ и $\nu^{-1} = 1-1000$, где

$$M = (k_{2p}/K_{Mp}D)^{1/2}L \quad (976)$$

и индекс «р» относится к иммобилизованному ферменту. В линейных диапазонах наклон прямой линии равен $L^2/DM \operatorname{th} M$.

В случае сферической подложки

$$V_{\max, \text{ каж}} = V_{\max, w}(r/R)^n \quad (n \geq 0) \quad (977)$$

где R — радиус сферы, а индекс «w» относится к параметру, измеренному на поверхности носителя.

Пересечение прямой линии с ординатой находится в точке $(n+3)V_{\max, w}R$.

При малых концентрациях субстрата наклон прямой определяется выражением

$$\operatorname{tg}(\text{угла наклона}) = R/[D(\sqrt{MR^2} \operatorname{cth} \sqrt{MR^2} - 1)] \quad (978)$$

где $M = V_{\max}/K_M D$.

При наличии диффузионных и электростатических эффектов и выполнении условия $\mu \ll 1 + \nu e^\lambda$ справедливо соотношение

$$K_{M, \text{ каж}} = K_M e^\lambda [1 + V_{\max}/Mk_C (S_f + K_M e^\lambda)] \quad (979)$$

а если $\mu > 1$ и выполняется условие $\nu e^\lambda \ll \mu - 1$, то

$$K_{M, \text{ каж}} = (V_{\max}/Mk_C) [1 + K_M e^\lambda / (V_{\max}/Mk_C - S_f)] - S_f \quad (980)$$

Так как кажущаяся величина константы Михаэлиса ($K_{M, \text{ каж}}$) зависит от концентрации субстрата, график Лайнуивера—Берка не может быть линейным.

3.7. РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Биологические системы регулируются и имеют сложную организацию в пространстве и времени. Индивидуальные метаболические процессы, так же как и составляющие их реакции, протекают в пространственно разделенных компартментах (например, в цитоплазматических компартментах, разделенных мембранами, в клеточных органеллах — митохондриях, микросхемах, ядрах и т. д. или в функциональных ферментных комплексах. Таким образом, пространственная иерархия развивается, начиная от микрокомпартментов, содержащих несколько молекул, через клеточные частицы, клетки и индивидуальные органы к целым живым организмам, как микроскопическим одноклеточным, так и гигантам. Временная иерархия имеет такую же шкалу измерений, начиная от элементарных стадий ферментативных реакций, занимающих пико- или наносекунды, до сотен (для растений даже тысяч) лет жизни организма. Структурная иерархия вещества простирается от неорганических ионов, имеющих размер атома, через метровую длину некоторых нервных клеток и до размеров целого живого организма.

Функционирование таких сложных структур в живых организмах возможно только при наличии строго регулируемых и координированных процессов. Регулироваться должны активности индивидуальных ферментов по отношению друг к другу, концентрации промежуточных метаболитов при их переносе из одного компартмента в другой, множественные взаимосвязи метаболических процессов в пространстве и времени и т. д.

Все эти сложные процессы и взаимосвязи обеспечивают нормальное функционирование в отсутствие внешнего влияния. Однако живые организмы должны быть готовы к любым видам изменений во внутреннем и внешнем окружении и должны обладать опреде-

ленным регуляторным механизмом, чтобы противостоять вредным эффектам и использовать полезные. Только такой механизм обеспечивает достаточные основания для объяснения факта сохранения отдельных организмов и развития более приспособленных видов, т. е. эволюцию.

При изучении процессов метаболизма, механизма регуляции и ответа на внешние воздействия возникают простые вопросы. В чем заключается и как осуществляется роль ферментов и промежуточных метаболитов, как воспрепятствовать излишнему потреблению продуктов данного метаболического процесса за счет сосуществования ферментов и что происходит, чтобы рассматриваемый фермент не был перегружен субстратом, превращение которого не необходимо в данном процессе? Как связаны промежуточные продукты и ферменты, если необходимо, с продуктами и ферментами другого метаболического пути? (Заметим, что определенная доля фермента участвует не только в одном метаболическом процессе, и промежуточный метаболит может расходоваться в ряде различных реакций.) Имеется ли ключевой фермент, ответственный за общую регуляцию данного метаболического пути? Как внешние воздействия влияют на действие данного фермента (или ферментов)?

В первом приближении текущую концентрацию промежуточного метаболита можно вычислить, зная кинетические параметры ферментов данного метаболического пути. Если пренебречь диффузионными эффектами, а также принять равномерное распределение промежуточных соединений, стационарное состояние функционирования ферментов и если концентрациями комплексов фермент—метаболит можно пренебречь по сравнению с концентрацией метаболита, то можно получить следующее выражение:

$$d[S_i]/dt = \sum_{j=1}^r c_{ij}v_j \quad (i = 1, \dots, n) \quad (981)$$

где $[S_i]$ — концентрация метаболита, n — число метаболитов, v_j — активность фермента в метаболическом процессе, r — число реакций в системе и c_{ij} — элементы *стехиометрической матрицы*, определяющей потоки взаимодействующих метаболитов, т. е. показывающей *топологию ферментной системы*; c_{ij} — положительная величина, если S_i — продукт, и отрицательная, если S_i — субстрат v_j -реакции. В других случаях c_{ij} равно нулю.

$$v_j = v_j^+ - v_j^- = (p_j \prod_{\substack{i \\ \text{субстраты}}} S_i - p_{-j} \prod_{\substack{i \\ \text{продукты}}} S_i) R_j(S_i, p_k) \quad (982)$$

где p_k — кинетические параметры (K_M , K_I , K_A), p_j и p_{-j} — кинетические константы, пропорциональные концентрации фермента Е и обратно пропорциональные K_M реагирующих веществ. $R_j(S_i, p_k)$ — так называемый *регуляторный фактор*, отражающий особые кинетические параметры фермента.

Пусть константа равновесия имеет вид

$$q_j = k_j/k_{-j} \quad (983)$$

а отношение действующих масс

$$\Gamma_j = \prod_i S_i / \prod_i S_i \quad (984)$$

продукты субстраты

Тогда после преобразования уравнения (982) и с использованием (983) и (984) получаем

$$v_j = k_j \prod_i S_i (1 - \Gamma_j/q_j) R_j \quad (985)$$

субстраты

Хотя в целом метаболизм является открытой системой, его подсистемы можно рассматривать как закрытые, и таким образом:

$$(d/dt) \left(\sum_{i=1}^n S_i \right) = \sum_{j=1}^r \left(\sum_{i=1}^n c_{ij} \right) v_j = 0 \quad (986)$$

и поэтому

$$\sum_{i=1}^n c_{ij} = 0 \quad (987)$$

Очевидно, что скорости потока индивидуальных метаболитов нельзя вычислить таким простым образом, если мы знаем только кинетические параметры взаимодействующих ферментов. Сложная сеть положительных и отрицательных обратных связей, т. е. ингибирующий и активирующий эффекты различных метаболитов на разные ферменты, так же как изменение кинетических параметров вследствие взаимодействия ферментов, значительно влияют на вычисленный вышеуказанным простым способом результат.

Степень влияния можно выразить различными константами и функциями такого рода, как *сила контроля* или *коэффициент чувствительности потока*

$$C_i = v_i \partial v_g / v_g \partial v_i = \partial(\ln v_g) / \partial(\ln v_i)$$

и если изменение v_i происходит только в результате изменения кон-

концентрации E_i , то выражение принимает вид

$$(\partial v_g / v_g) / (\partial [E_i] / [E_i]) = \partial (\ln v_g) / \partial (\ln [E_i]) \quad (988)$$

Уравнение описывает относительные изменения общего потока метаболического процесса v_g как функцию относительных изменений индивидуальных ферментативных активностей v_i .

Сила эффектора, или коэффициент эластичности,

$$X_{ik} = [F_k] \partial v_i / v_i \partial [F_k] = \partial (\ln v_i) / \partial (\ln [F_k]) \quad (989)$$

отражает влияние вещества F_k на активность данного изолированного фермента. F_k может быть субстратом, продуктом или внешним эффектором (активатором или ингибитором) фермента E .

Термин *переходный контроль* (transient control) связан с ферментом E_j и отражает среднее время релаксации ($\hat{\tau}_i$) метаболита S_i после возмущения, внесенного извне в параметры системы или концентрацию промежуточного продукта:

$$K_{ij} = \partial (\ln \hat{\tau}_i) / \partial (\ln [E_j]) \quad (990)$$

Все эти «силы», «коэффициенты», «контроли» в действительности характеризуют взаимодействия ферментов с различными метаболитами и другими ферментами. Давно исследуется, как и по какому механизму эти взаимодействия осуществляют свои регуляторные функции.

Изучение биосинтетической активности бактерий привело к открытию *регуляции по механизму обратной связи* как наиболее эффективного способа самоконтроля метаболизма. В исследование его основных принципов важный вклад сделали Новик, Сцилард, Амбаргер, Эйтс и многие другие ученые. Дальнейшие исследования показали, что этот механизм не является уникальным для бактерий и играет важную роль в регуляции метаболизма всех живых организмов.

В общих чертах этот механизм может быть объяснен влиянием, оказываемым на соответствующие ферменты веществами с малой молекулярной массой, которые являются продуктами рассматриваемого метаболического процесса. Ранние исследования показали, что конечный продукт данного пути метаболизма может ингибировать первый фермент в реакционной последовательности, регулируя таким образом скорость процесса и препятствуя бесполезному накоплению конечного продукта. Термин «регуляция по механизму обратной связи» был заимствован из радиотехники, чтобы показать, что именно конечный продукт влияет на первый фермент реакционной последовательности.

В качестве примера рассмотрим аспартат-карбамоилтрансферазу (КФ 2.1.3.2), детально исследованную Герхартом и Парди. Фермент катализирует первую стадию биосинтеза пиримидина в *E. coli*, а именно образование карбамоиласпартата, предшественника шести-стадийного синтеза цитидинтрифосфата и уридинтрифосфата. Цитидинтрифосфат может связываться с аспартат-карбамоилтрансферазой, ингибируя фермент. Таким образом, если образующийся в *E. coli* цитидинтрифосфат не потребляется, он накапливается и ингибирует первый фермент своего биосинтеза, предотвращая свое собственное накопление.

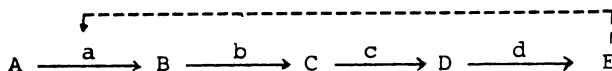
Позже было показано, что такого рода способ регуляции широко распространен в живых организмах, и огромное число ферментов регулируется большим количеством низкомолекулярных метаболитов. Это означает, что не только конечный продукт метаболического пути может быть регулятором и не всегда регулируется именно первый фермент. Более того, механизм регуляции может заключаться не только в ингибировании, но также и в активации.

Очень интересным является сложный регуляторный процесс, особенности которого были исследованы Вебером с сотрудниками. Свободные жирные кислоты, синтезируемые в организме, могут регулировать по механизму обратной связи различные стадии глико-неогенеза, гликолиза, цикла Кребса, пентозофосфатного шунта, т. е. всех метаболических путей, так или иначе включенных в процесс биосинтеза жирных кислот.

Имеется ряд механизмов регуляции конечным продуктом. Ниже приведены некоторые хорошо известные примеры процессов такого рода (заглавные буквы обозначают промежуточные метаболиты, строчные буквы — соответствующие ферменты, осуществляющие их превращение). Необходимо подчеркнуть, что в живых организмах различные механизмы регуляции обычно встречаются одновременно.

3.7.1. Регуляция по механизму обратной связи

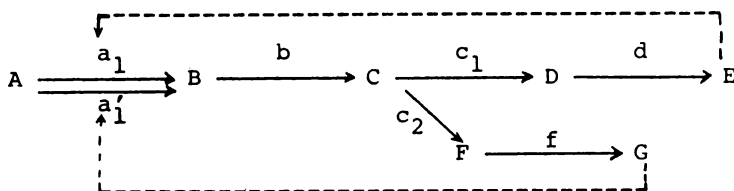
а. Простое ингибирование конечным продуктом



Это «классический» механизм обратной связи, так как конечный продукт метаболического пути ингибирует первый фермент после-

довательности. В качестве примеров можно привести ингибирование гистидином АТР-фосфорибозилтрансферазы (КФ 2.4.2.17) — первого фермента биосинтеза гистидина или ингибирование серином 3-фосfogлицератдегидрогеназы — первого фермента биосинтеза серина.

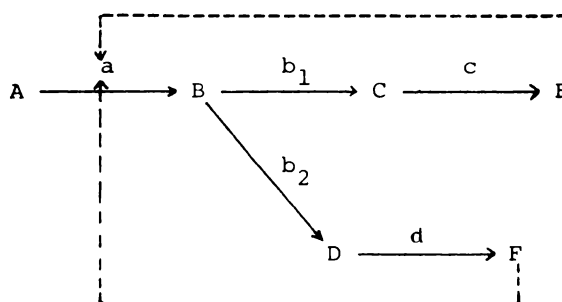
б. Ингибирование конечным продуктом изоферментов различной регуляторной специфичности как первого фермента в разветвленном метаболическом пути



Пусть первый фермент метаболического процесса является смесью двух изоферментов. Один из изоферментов может ингибироваться первым, а другой — вторым конечным продуктом. Очевидно, что это приводит к неудовлетворительной регуляции и, таким образом, может существовать только как компонент более сложной регуляторной системы. В качестве примера можно привести первый фермент процесса биосинтеза ароматических аминокислот, 3-дезоксид-арабиногептулозонат-7-фосфатсинтетазу (КФ 4.1.2.15). Фермент имеет три изоформы, одна из которых чувствительна к фенилаланину, другая — к тирозину. Третий изофермент не ингибируется ни одной аминокислотой, но триптофан осуществляет специфический контроль через репрессивную регуляцию. При биосинтезе аминокислот, начинающемся с аспарагиновой кислоты, наблюдается такой же способ регуляции. Первый фермент метаболического пути, аспараткиназа, является смесью трех изоферментов. Один из них ингибируется одним из конечных продуктов — треонином, второй — лизином — другим конечным продуктом. Репрессивная регуляция третьего изофермента осуществляется метионином.

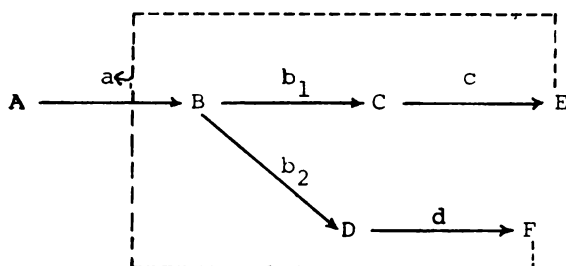
в. Аддитивное ингибирование конечными продуктами

Все различные конечные продукты разветвленного метаболитического пути ингибируют первый фермент, и их эффект аддитивен.



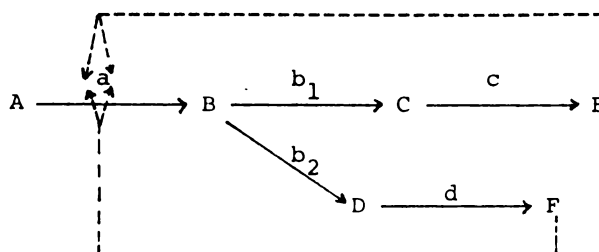
Например, активность глутаминсинтетазы (КФ 6.3.1.2) регулируется восемью различными конечными продуктами.

г. Согласованное ингибирование конечным продуктом



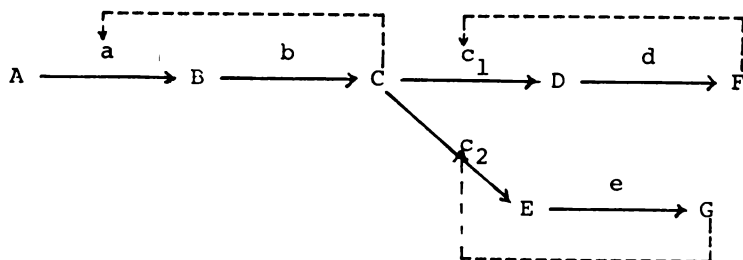
Ни один из конечных продуктов разветвленного метаболического пути не обладает самостоятельным ингибирующим действием, только их совместное связывание с ферментом приводит к ингибированию. Аспараткиназа (КФ 2.7.2.4) из *B. polymixa* или *B. subtilis* может служить примером, когда ингибирование наблюдается только при кооперативном связывании лизина и треонина.

д. Синергизм в ингибировании конечными продуктами



Конечные продукты разветвленного метаболического процесса индивидуально ингибируют активность первого фермента. Однако их совместное действие не аддитивно, а синергично (см. разд. 3.3.13). Первый фермент биосинтеза пурина — глутамин-фосфорибозилпирофосфатамидотрансфераза (КФ 2.4.2.14) ведет себя таким образом.

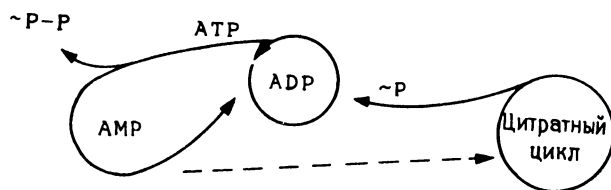
е. Ингибирование промежуточными соединениями



Это наиболее эффективный путь регуляции разветвленного метаболического пути. Как правило, точка разветвления ингибируется накапливаемыми конечными продуктами, в то время как общий промежуточный продукт блокирует первый фермент. Активность первого фермента биосинтеза ароматических аминокислот в *B. subtilis* регулируется промежуточными соединениями — хоризматом и префенатом.

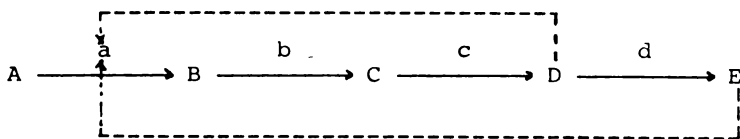
ж. Регуляция активацией

Один из промежуточных метаболитов или конечный продукт активирует ключевой фермент биосинтеза.



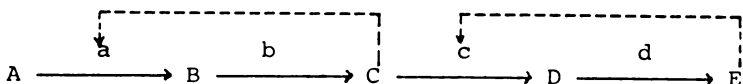
Например, AMP увеличивает активность изоцитратдегидрогеназы (КФ 1.1.1.41). В результате цитратный цикл дает больше АТФ за счет окислительного фосфорилирования.

3. Увеличение активности путем подавления ингибирования



Одно из промежуточных соединений или конечный продукт ингибирует активность первого фермента, в то время как другое промежуточное соединение или конечный продукт активирует его или осуществляет эффект высвобождения фермента (см. разд. 3.4.2). Аспартаткиназа и гомосериндегидрогеназа (КФ 1.1.1.3) *Rhodospirillum rubrum* ингибируются треонином, но ингибирование может быть подавлено изолейцином — другим конечным продуктом.

и. Последовательная регуляция



Конечный продукт ингибирует только частичную последовательность полного метаболического пути, а первый фермент регулируется некоторыми интермедиатами. Этот тип регуляции наблюдается в *E. coli* при биосинтезе треонина и изолейцина, начинающемся с аспарагиновой кислоты, и в биосинтезе серина и цистеина. В общем случае этот механизм идентичен ингибированию промежуточными продуктами (см. п. e), но в данном случае один или оба эффектора могут быть также активаторами.

3.7.2. Регуляция ковалентным связыванием. Модуляция ферментативной активности или модификация регуляции может заключаться в ковалентной модификации фермента. Фермент АТФ-глутаминсинтетаза-аденилтрансфераза из *E. coli* в присутствии АТФ и Mg^{2+} присоединяет молекулу адениловой кислоты на каждую субъединицу глутаминсинтетазы. Немодифицированный фермент ингибируется глицином, но почти не ингибируется АТФ и СТР. В противоположность этому аденилированный фермент сильно ингибируется АТФ, СТР, гистидином и триптофаном и только слегка глицином.

Известно много ферментов, которые активны только в фосфо-

рилированной форме, либо фосфорилированная и дефосфорилированная формы обладают различными активностями.

3.7.3. Регуляция ограниченным протеолизом. Накопленный конечный продукт связывается с ингибиторами протеолитических ферментов, снижая их ингибирующее действие. Протеолитические ферменты, освобожденные таким образом от ингибирования, расщепляют фермент, наиболее чувствительный к протеолизу в данной метаболической последовательности. В результате концентрация конечного продукта понижается, тройной комплекс конечный продукт — протеолитический фермент — ингибитор диссоциирует, освобожденный ингибитор снова связывается с протеолитическим ферментом, и расщепление фермента прекращается.

Регуляция ферментными каскадами (разд. 3.2.5) также принадлежит к этой группе.

Без сомнения, одним из важнейших открытий последних 30 лет в области метаболизма и его регуляции было объяснение регуляции по механизму обратной связи. Не случайно, что в десятилетие всплеска развития молекулярной биологии, это важное достижение было немедленно использовано для исследования молекулярных основ регуляторного механизма, т. е. механизма ингибирования или активации ферментов метаболизма низкомолекулярными веществами, имеющими отношение к данному пути метаболизма.

3.8. КИНЕТИКА РЕГУЛЯТОРНЫХ ФЕРМЕНТОВ

Еще в 1958 г. Фриден продемонстрировал наличие двух активных центров в молекуле глутаматдегидрогеназы. С одним из них связывается восстанавливаемый кофермент, а ассоциация другой молекулы кофермента NAD или любого из его аналогов (аденозина, АМР, АТР) с другим активным центром фермента (называемым «активирующим» центром согласно Фридону) приводит к увеличению активности фермента.

Тем не менее объяснение молекулярного механизма регуляции по принципу обратной связи стали связывать с именем Моно и его коллег, которые провели детальное изучение треониндегидратазы (треониндезаминазы; КФ 4.2.1.16), а также регуляции метаболизма треонина. Другие авторы ранее продемонстрировали, что изолейцин синтезируется из треонина через α -оксобутират, α -ацетогидроксibuтират, α,β -дигидрокси- β -метилвалерат и α -оксо- β -метилвалерат. Конечный продукт — изолейцин — ингибирует по механизму

обратной связи треониндегидратазу, первый фермент метаболической последовательности.

Так как конечный продукт метаболического пути не является структурным аналогом субстрата регуляторного фермента, предполагалось (и позднее было доказано экспериментально в ряде случаев), что эти два вещества связываются с различными участками поверхности фермента. Поэтому эти белки были названы *аллостерическими ферментами*, т. е. ферментами, имеющими различные участки связывания субстрата и специфического регулятора. В настоящее время, однако, независимо от типа механизма регуляции и участка связывания регулятора на поверхности фермента ряд авторов называют аллостерическими все ферменты, активность которых контролируется лигандами.

Моно и сотрудники провели детальное исследование кинетического поведения треониндегидратазы и механизма ее ингибирования изолейцином и, как оказалось, ошибочно распространили полученные выводы на все аллостерические ферменты, подверженные ингибированию промежуточными метаболитами и участвующие в регуляции по механизму обратной связи. Они показали, что кривая насыщения фермента субстратом не является гиперболой, подчиняющейся кинетике Михаэлиса—Ментен, а напротив, представляет собой сигмоидную (S-образную) кривую, аналогичную описанной кривой насыщения гемоглобина кислородом.

Исходя из этой аналогии, было сделано предположение, что аллостерические регуляторные ферменты являются *олигомерами*, т. е. состоят из конечного числа идентичных субъединиц. Субъединицы в олигомере называются *протомерами*, а если олигомер диссоциирует на свободные субъединицы, то они называются *мономерами*.

Аллостерические взаимодействия можно разделить на два типа: *гомотропное влияние*, относящееся к взаимодействию между идентичными лигандами и *гетеротропное влияние* — взаимодействие между лигандами разной природы.

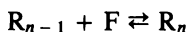
Гетеротропное взаимодействие может быть либо положительным, либо отрицательным (т. е. кооперативным или антагонистичным), в то время как гомотропные взаимодействия, согласно данному определению, всегда кооперативны. В настоящее время известны примеры отрицательных гомотропных взаимодействий, например у некоторых дегидрогеназ. Согласно исходной теории, аллостерические системы с *исключительно* гетеротропными эффектами не должны существовать, т. е. в этих системах обязательно должны проявляться гомотропные взаимодействия.

Аллостерические взаимодействия всегда сопровождаются изменениями четвертичной структуры (взаимодействие между субъединицами) в белке, потому что, согласно гипотезе Моно, Уаймена и Шанжё, все аллостерические ферменты имеют олигомерную структуру, состоящую из идентичных протомеров, и по крайней мере одну ось симметрии (*симметричная модель*). На конформацию протомера влияет взаимодействие с другими протомерами. Таким образом, в противоположность исходной классификации в настоящее время термин «аллостерические» относится к таким ферментам, активность которых регулируется взаимодействием между субъединицами независимо от того, связывается ли аллостерический лиганд в центре, отличном от активного.

Было предложено несколько моделей при исследовании проблемы регуляции ферментативной активности, и примеры почти всех из них были найдены в действительности. Впоследствии произошло смещение понятий из-за недифференцированного использования терминов «аллостерия» и «кооперативность», смешения различных моделей, так же как и из-за соответствующей номенклатуры. В дальнейшем будем обозначать аллостерическими те ферменты, которые имеют отдельный регуляторный центр для связывания промежуточных метаболитов, влияющих на активность. Термином «кооперативное взаимодействие» обозначим такое явление, когда любое изменение, возникающее в одной из субъединиц олигомерного фермента, вызывает изменение в других субъединицах. Эти процессы можно моделировать, используя различные механизмы. В следующем разделе рассмотрим один из них.

3.8.1. Модель Моно — Уаймена — Шанжё. Фундаментальные предпосылки модели следующие. Каждый аллостерический фермент может существовать в двух обратимо превращаемых формах, отличающихся друг от друга в распределении связей между протомерами и(или) в энергиях этих связей, что может проявляться также в изменении конформации протомера. Энергия связывания связывающих центров изменяется при переходе от одной формы к другой (т. е. K_S увеличивается или уменьшается), хотя симметрия олигомера сохраняется. Это сохранение симметрии представляет собой взаимодействие между субъединицами. Таким образом, фиксация одного протомера в одной из возможных форм вызывает изменения в другом протомере, что обеспечивает стабилизацию олигомера в той же форме. Пусть F — реагирующее вещество (*аллостерический эффе́ктор*), R_0 и T_0 — две возможные формы белка, L — *аллостерическая константа* и n — число связывающих участ-

ков, тогда



$$[R_1] = [R_0]n([F]/K_R) \quad [T_1] = [T_0]n([F]/K_T) \quad (992)$$

$$[R_2] = [R_1]((n-1)/2)([F]/K_R) \quad [T_2] = [T_1]((n-1)/2)([F]/K_T) \quad (993)$$

$$\dots\dots\dots [R_n] = [R_{n-1}](1/n)([F]/K_R) \quad [T_n] = [T_{n-1}](1/n)([F]/K_T) \quad (994)$$

где K_R и K_T — константы диссоциации для вещества F , связанного с R -и T -состояниями белка соответственно. Номер индекса соответствует числу молекул лиганда, связанных с олигомером в данной форме.

Введя обозначения $[F]/K_R = \alpha$ и $K_R/K_T = c$, можно записать выражение для доли молекул белка, находящегося в R -состоянии:

$$R = (1 + \alpha)^n / [L(1 + c\alpha)^n + (1 + \alpha)^n] \quad (995)$$

а следующая формула относится к доле молекул белка с занятыми связывающими центрами

$$Y_F = [Lc\alpha(1 + c\alpha)^{n-1} + \alpha(1 + \alpha)^{n-1}] / [L(1 + c\alpha)^n + (1 + \alpha)^n] \quad (996)$$

Кооперативность связывания зависит от величин L или c . Чем больше L и чем меньше c , тем сильнее кооперативное взаимодействие между участками.

Моно и сотрудинки предсказали возможность существования гетеротропных взаимодействий, принимая, что субстрат (S) может связываться только с R -формой, ингибитор (I) — только с T -формой (т. е. $c = 0$), а активатор — опять только с R -формой. Тогда для относительного насыщения фермента субстратом получаем выражение

$$Y_S = \alpha(1 + \alpha)^{n-1} / [L' + (1 + \alpha)^n] \quad (997)$$

где L' — кажущаяся аллостерическая константа, имеющая вид

$$L' = \sum_0^n T_i / \sum_0^n R_A \quad (998)$$

и T_i — T -форма белка, содержащая различные ингибиторы, а R_A — обозначает комплексы R -формы с различными активаторами. Мож-

но записать, что

$$L' = L[(1 + \beta)^n / (1 + \gamma)^n] \quad (999)$$

где $\beta = [I]/K_I$ и $\gamma = [A]/K_A$, K_I и K_A — константы диссоциации для ингибитора из Т-формы и для активатора из R-формы соответственно и n — число протомеров. Если рассматривать ферментативную активность вместо связывания, то $Y_S = v_0/V_{\max}$ и $\alpha = [S]/K_S$.

Если взять обратные величины от левой и правой части уравнения (997), то после перегруппировки и логарифмирования получаем линейное соотношение:

$$\lg(\alpha/Y_S - \alpha - 1) = \lg L' - (n - 1)\lg(1 + \alpha) \quad (1000)$$

График $\lg(\alpha/Y_S - \alpha - 1)$ от $\lg(1 + \alpha)$ представляет собой прямую линию, пересекающую ординату в точке $\lg L'$, а абсциссу в точке $(\lg L')/(n - 1)$ и идущую с наклоном $-(n - 1)$.

Для графика в случае $\beta = 0$, $\gamma = 0$ точка пересечения ординаты дает значение $\lg L$, а абсциссы $(\lg L)/(n - 1)$. Повторяя эксперимент при $\gamma = 0$ с различными β и при $\beta = 0$ с различными γ , получим параллельные линии, пересекающие ординату в точках $\lg L + n\lg(1 + \beta)$ и $\lg L - n\lg(1 + \gamma)$ и абсциссу в точках $(\lg L)/(n - 1) + \lg(1 + \beta)$ и $(\lg L)/(n - 1) - \lg(1 + \gamma)$ соответственно. Наклон прямых во всех случаях будет неизменным $-(n - 1)$.

Моно и сотрудники различали два типа аллостерических систем.

«*K-система*»: сродство как F, так и S различно по отношению к T и R, т. е. оба вещества являются аллостерическими лигандами. Следовательно, присутствие F обязательно изменяет сродство белка к S, и наоборот; таким образом, величина K_M изменяется.

«*V-система*»: S имеет одинаковое сродство по отношению к T и R, более того, F и S не мешают связыванию друг друга. F оказывает влияние только на скорость реакции, если T и R различаются по каталитическим свойствам.

Если сродство F больше к активной форме, то это вещество будет активатором (*положительная V-система*), а если его сродство выше к неактивной форме — ингибитором (*отрицательная V-система*).

Было высказано предположение, что если аллостерический характер вступает в гомотропные взаимодействия с аллостерическим ферментом, то сам субстрат тоже будет оказывать гомотропное кооперативное влияние. Если эффектор не влияет на кажущееся сродство субстрата, то последний не оказывает кооперативного гомотропного влияния.

Авторы этой гипотезы сделали общее предположение, что в присутствии аллостерического эффектора кривая насыщения фермента субстратом в случае К-системы имеет сигмовидную форму и кривая насыщения эффектором имеет такую же форму в присутствии субстрата. Было высказано также предположение, что параметр n в уравнении Хилла не является целочисленным. Однако в отсутствие субстрата кривая насыщения эффектором может быть типа Михаэлиса — Ментен и наоборот. Более того, такой же тип кривой можно получить, если фермент десенсибилизирован какими-либо внешними воздействиями (тепло, химические агенты и т. п.), приводящими к диссоциации субъединиц или подавлению кооперативных взаимодействий.

Вышеуказанная модель Моно — Уаймена — Шанжэ основана на предположении, что лиганды различных типов связываются только с R или только с T. Однако экспериментальные факты противостоят этой модели, поэтому она была расширена Рубеном и Шанжэ на те случаи, когда при гетеротропных и гомотропных взаимодействиях связывание лигандов не является «исключительным» (non-exclusive binding), т. е. лиганды могут связываться как с R, так и с T.

Можно получить общее уравнение для гомотропных аллостерических взаимодействий как для специфического, так и для неспецифического связывания лигандов, если L'' подставить вместо L и L' в уравнения (995)—(997) (т. е. в уравнениях для R и Y_S), где

$$L'' = L \{ [(1 + \beta d)/(1 + \beta)] [(1 + \gamma e)/(1 + \gamma)] \}^n \quad (1001)$$

В этом уравнении для *ингибирующего гетеротропного эффектора* $K_R^I/K_T^I = d > 1$, для *активирующего эффектора* $K_R^A/K_T^A = e < 1$, и их относительные концентрации равны β и γ (отнесенные в обоих случаях к соответствующей величине K_R). Если присутствует только ингибирующий или активирующий эффектор, тогда γ или β равны нулю и соответственно один из членов произведения будет равен 1. Такие системы называются «*KV-системами*», и в этом случае эффектор действует как на K_M , так и на V_{\max} .

Это расширение теории по сравнению с первоначальной, где основной концепцией было то, что аллостерический эффектор и субстрат взаимно исключают друг друга при связывании с R- и T-состояниями, разрешает относительные изменения количества двух форм (R и T) в присутствии эффектора или субстрата. Степень кооперативности тоже может меняться, если один из лигандов присут-

ствует в ненасыщающей концентрации и, аналогично, взаимосвязь кооперативных и антагонистических взаимодействий может тоже меняться по отношению к различным лигандам.

Эта расширенная форма модели Моно — Уаймена — Шанжё в принципе не отличается от теории флуктуационного соответствия Штрауба и Саболичи, которая основана на предположении, что нативный белок в растворе присутствует в нескольких термодинамически равновероятных состояниях, находящихся в обратимо равновесном состоянии по отношению друг к другу. Одно из них способно связывать субстрат, что приводит к стабилизации его структуры и сдвигу равновесия в сторону стабилизированной формы. В качестве альтернативы *косвенного кооперативного взаимодействия* (модели Моно и др.), где присутствуют формы R и T, Волькенштейн и Гольдштейн предположили модель *прямого кооперативного взаимодействия*, где присутствует только одна F-форма фермента, и кооперативное взаимодействие между субстратом и аллостерическим эффектом происходит только на ней (в действительности это эквивалентно «классической» аллостерии, первоначально описанной Моно и др.)

3.8.2. Модель Кошланда — Немети — Фильмера. Ряд авторов исследовали пути моделирования аллостерических ферментов, т. е. визуализации регуляции по механизму обратной связи. Приближение Кошланда, Немети и Фильмера имеет особое значение. Они предположили, что фермент состоит из четырех идентичных субъединиц. Если субстрат связывается с одной из них, то это изменяет ее конформацию (теория вынужденного соответствия) и приводит к различным изменениям кооперативного взаимодействия субъединиц, т. е. изменению связывания субстрата на других субъединицах. Действительный эффект зависит от относительного расположения субъединиц в молекуле фермента. Для объяснения связывания субстрата авторы предположили следующие возможности (рис. 66).

Согласованная модель идентична симметричной модели Моно — Уаймена — Шанжё. Другая модель Кошланда названа *последовательной моделью*, так как субъединицы изменяются одна за другой, т. е. последовательно, при увеличении степени насыщения фермента лигандом. В общем случае относительное насыщение олигомера лигандом (в последующем изложении это субстрат, хотя уравнения также применимы для любых эффекторов, ингибиторов, активаторов и т. д.) можно описать хорошо известным *уравнением*

Эдгера:

$$\bar{Y}_S = \frac{\sum_{i=1}^n a_i [S]^i}{\sum_{i=1}^n b_i [S]^i} \quad (\text{ср. 569})$$

где a_i и b_i — константы и $a_i = (i/n)b_i$.

В случае гомотетрамерного фермента при условии, что субъединицы могут находиться только в двух различных конформациях и субстрат может связываться только с одной из них, число молекул S , связанных с ферментом, можно представить выражением:

$$N_S = (4K_1[S] + 12K_1K_2[S]^2 + 12K_1K_2K_3[S]^3 + 4K_1K_2K_3K_4[S]^4) / (1 + 4K_1[S] + 6K_1K_2[S]^2 + 4K_1K_2K_3[S]^3 + K_1K_2K_3K_4[S]^4) \quad (1002)$$

где $K_1 - K_4$ — внутренние константы ассоциации (поэтому константы a_i и b_i должны содержать статистические множители).

Если $K_1 = K_2 = K_3 = K_4$, то это означает, что фермент действует по механизму Михаэлиса — Ментен, т. е. не происходит взаимодействия субъединиц. Если $K_1 \neq K_2 = K_3 = K_4$ можно предположить справедливость согласованной (симметричной) модели.

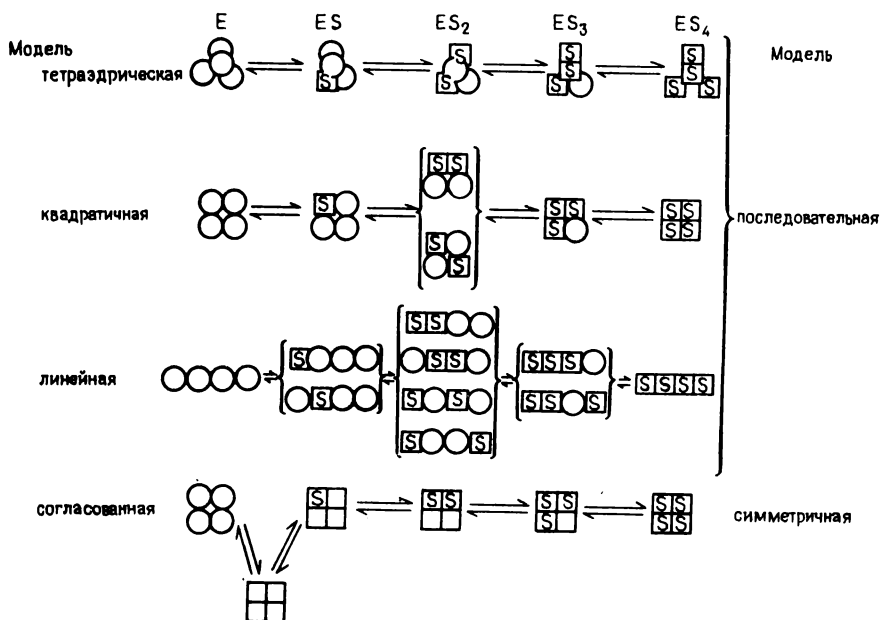


Рис. 66. Некоторые возможные модели регуляция ферментов.

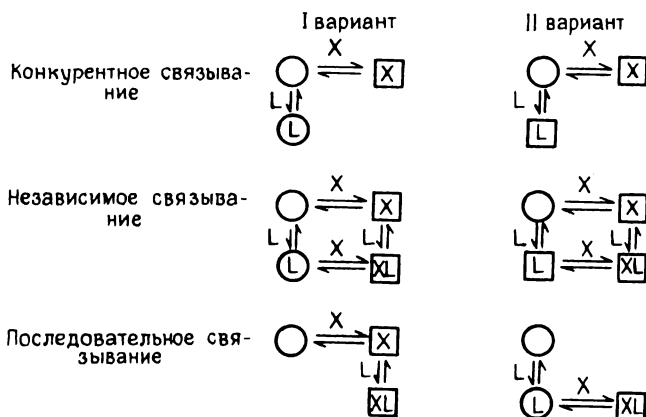


Рис. 67. Возможности связывания субстрата и аллостерического лиганда в предположении одновременно происходящего конформационного изменения.

В расширенной, более общей модели Моно — Уаймена — Шанжё $K_1 < K_2 \leq K_3 \leq K_4$. В простейшей квадратичной или тетраэдрической модели $K_1 \cdot K_4 = K_2 \cdot K_3$, однако в большинстве случаев нельзя получить простое соотношение такого рода.

Анализируя величину относительного насыщения, т. е. число молекул субстрата, связанных с одной молекулой фермента, как функцию концентрации субстрата и используя различные графические представления, можно провести различие между четырьмя случаями. Они также могут быть дискриминированы от тех случаев, когда, например, четыре субъединицы неидентичны, или число субъединиц, вступающих в кооперативные взаимодействия между собой, изменяется при связывании субстрата.

Эта модель получила дальнейшее развитие в работах Киртли и Кошланда. Авторы охарактеризовали другие три типа связывания и два варианта для всех четырех случаев, если с ферментом связывается как субстрат (X), так и аллостерический эффектор (L) (рис. 67).

Эта классификация имеет смысл, если субстрат и аллостерический эффектор одновременно связываются с белком. Определяя различные параметры, можно различить все возможности, включая те, при которых субстрат или эффектор не вызывает кооперативных взаимодействий, т. е. фермент не является аллостерическим.

3.8.3. Определение кинетических параметров аллостерических и кооперативных ферментов. Определение характеристических парамет-

ров (K_M , V_{\max} , n , L , L' , c и т. д.) для аллостерических и кооперативных ферментов обычно является довольно трудной задачей, Методы, пригодные для специальных случаев, были уже упомянуты выше (см. уравнения (995)—(997), (1000), (1002)). Однако в общем случае возникает проблема определения существенно большего числа параметров (отдельные величины K_M и V_{\max} для нескольких, по крайней мере двух, форм фермента, число n для различных лигандов, связанных с ферментом, и т. д.). Проблема становится еще более трудной для решения, когда фермент, несмотря на наличие аллостерических свойств или кооперативности, может показывать нормальную кинетику Михаэлиса — Ментен. В этих случаях одни кинетические измерения не дадут достаточно информации для оценки всех констант. Более того, если кинетическое поведение фермента отличается от кинетики Михаэлиса — Ментен, например характеризуется сигмоидной кривой насыщения, трудно определить, является ли фермент в действительности аллостерическим или показывает кооперативность взаимодействий, или аномалии связаны с другой причиной.

В первую очередь поэтому следует определить тип фермента (т. е. является ли он аллостерическим или проявляет кооперативные взаимодействия). Наиболее общим употребляемым методом является определение относительного связывания лиганда как функции его концентрации. Соответствующее уравнение Хилла имеет вид

$$\lg[\bar{Y}_S/(1 - \bar{Y}_S)] = n_H \lg([S]/K) \quad (1003)$$

(ср. (493)), где \bar{Y}_S — относительное насыщение лигандом S , n_H — коэффициент Хилла, K — константа диссоциации. Коэффициент Хилла n_H не равен числу связывающих центров.

Так как во время вывода уравнения Хилла пренебрегли комплексами ES , ES_2 , ..., ES_{n-1} и, согласно исходному предположению, n частей молекулы S связываются с ферментом в одну стадию, то n_H дает возможное минимальное число связывающих участков. Коэффициент n_H равен n , истинному числу связывающих центров, в случае, если взаимодействие между связывающими участками бесконечно велико. Если $n_H = 1$, не происходит кооперативных взаимодействий (кинетика Михаэлиса — Ментен), и чем ближе n_H к n , тем выше степень кооперативности.

В обычном графике $\lg[\bar{Y}/(1 - \bar{Y})]$ от $\lg[S]$ точки могут быть аппроксимированы прямой линией (см. уравнение (1003)). Однако мы упоминали допущения, сделанные при выводе уравнения. Точная функция, не учитывающая допущений, в действительности не явля-

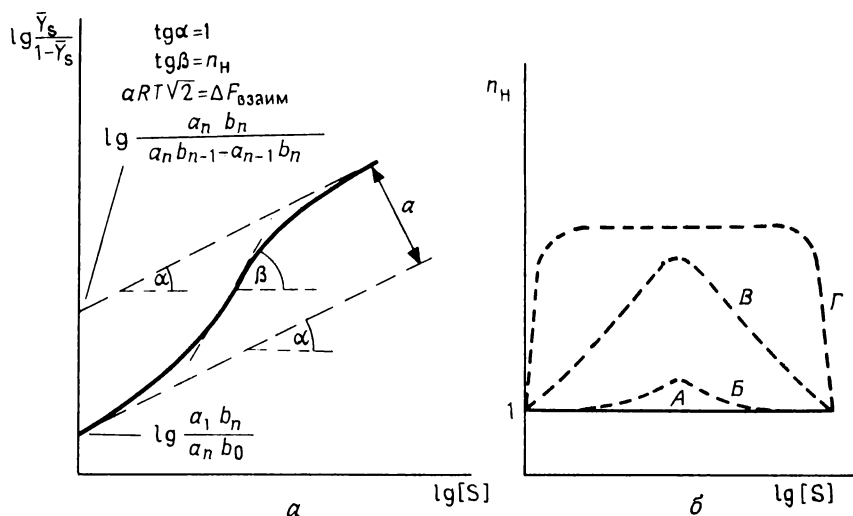


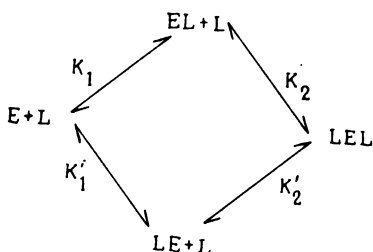
Рис. 68. Определение коэффициента Хилла. *a* — логарифмический график функции связывания. *б* — зависимость коэффициента Хилла от логарифма концентрации лиганда (*A* — нет кооперативности; *B* — очень слабая кооперативность; *B* — средняя кооперативность; *Г* — очень сильная кооперативность).

ется уравнением прямой линии, а представляет собой отношение двух полиномов (см. (569), (1002)). Наклон равен 1 независимо от того, выполняется условие $[S] \rightarrow 0$ или $[S] \rightarrow \infty$. При $[S] \rightarrow 0$ экстраполяция графика до пересечения с осью ординат дает $\lg(a_1 b_n / a_n b_0)$, а при $[S] \rightarrow \infty$ получаем значение $\lg[a_n b_n / (a_n b_{n-1} - a_{n-1} b_n)]$. Если провести линии, перпендикулярные двум предельным касательным, то расстояние между ними после умножения на $RT\sqrt{2}$ равно свободной энергии взаимодействия (рис. 68, *a*).

Функция не имеет линейной части, ее наклон непрерывно изменяется. Величина n_H дается максимальным, а не средним наклоном. Если среднюю часть кривой аппроксимировать прямой линией, согласно уравнению Хилла, то полученный средний наклон близок к максимальному только при очень высокой степени кооперативности. Максимальный наклон можно получить из графика зависимости n_H от $\lg[S]$ (рис. 68, *б*). Поэтому n_H является не константой, а функцией концентрации лиганда (Курганов обозначает его q).

В случае олигомеров соотношение между коэффициентом Хилла и внутренними константами ассоциации (K_1, K_2, K'_1, K'_2) лиганда

(L) с индивидуальными субъединицами различается для симметричных и асимметричных димеров и для тетрамерного фермента. В модели, приведенной ниже, продемонстрировано гомотропное аллостерическое взаимодействие лиганда с олигомерным ферментом (E).



Очевидно, что $K_1 K_2 = K'_1 K'_2$.

Соответствующие взаимосвязи между величинами K и n_H представлены в табл. XV.

Таблица XV. Взаимосвязь между коэффициентом Хилла и значением микроскопических констант ассоциации в олигомерных ферментах в случае гомотропных аллостерических взаимодействий

Олигомерный фермент	Характеристическое соотношение	n_H
Симметричный димер	$K_1 = K'_1$ и $K_2 = K'_2$	$2/[1 + \sqrt{(K'_1/K'_2)}]$
Асимметричный димер	$K_1 = K'_2$ и $K'_1 = K_2$	$4/[2 + \sqrt{(K_1/K_2)} + \sqrt{(K'_1/K'_2)}]$
Тетрамер	$K_1 \neq K_2 \neq K'_1 \neq K'_2$	$4/[\sqrt{(K_1/K'_2)} + 1]/[4\sqrt{(K_1/K'_2)} + 3(K_2/K'_2) + 1]$

Вышеприведенные рассуждения относятся к случаю, когда измеряется непосредственно связывание лиганда \bar{Y}_S . Однако указанные выше утверждения не применимы, если для анализа уравнения $Y_S = v_0/V_{\max}$ используют относительную скорость ферментативной реакции (согласно уравнению (493)). Коэффициент Хилла n_H , полученный таким образом, не характеризует даже минимальное число связывающих участков. Измерение скорости ферментативной реакции можно использовать вместо измерения изотермы связывания только в том случае, если 1) конформационные измерения,

предшествующие скоростьлимитирующей стадии, быстры и обратимы; 2) в случае симметричной модели фермент должен представлять собой чистую К-систему и 3) для последовательной модели комплексы ES , ES_2 , ..., ES_n распадаются до свободного фермента и продукта с одинаковой константой скорости.

Выполнимость этих условий необходимо проверить вначале независимыми экспериментами, и только, если они выполняются, можно при проведении анализа измерять скорость реакции вместо измерения связывания.

Если такой эксперимент дает положительный результат, тогда, согласно Курганову с сотр. и Эндрени с сотр., анализ предпочтительнее проводить не при произвольном изменении концентрации субстрата (или лиганда), а изменяя ее таким образом, что отношение двух последующих концентраций остается постоянным.

Пусть одна концентрация равна $[S]$, другая — равна $a[S]$, где $a \neq 1$:

$$v = V[S]^n / (K^n + [S]^n) \quad (1004)$$

$$w = V(a[S])^n / [K^n + (a[S])^n] \quad (1005)$$

Выражая K^n из (1004) и (1005) и приравнявая их, получаем

$$w = Dv / (E + v) \quad (1006)$$

где $E = V/(a^n - 1)$ и $D = a^n E$.

Выражение (1006) представляет собой уравнение гиперболы, которая может быть линеаризована обычным способом. Если уравнение Хилла (493) справедливо, т. е. кооперативные взаимодействия отсутствуют, либо они бесконечно велики, то характеристические параметры реакции могут быть получены из табл. XVI.

Если линейное соотношение, описываемое уравнением Хилла, не выполняется (что является обычным случаем), применима трансформированная форма уравнения Эдера (569)

$$v = V(a_2'[S]^2 + a_1'[S]) / (b_2[S]^2 + b_1[S] + b_0) \quad (1007)$$

где $a_2' = b_2$, тогда параметры реакции могут быть получены из табл. XVII.

Важно еще раз подчеркнуть, что в противоположность ранним представлениям ни дробное значение величины n_H , ни сигмоидный характер кривой насыщения не доказывают аллостерическую или кооперативную природу рассматриваемого фермента. Так, Санвал, Стахов и др. показали, например, что в случае изоцитратдегидрогеназы и график Хилла дает дробную величину n , и кривая насыще-

Таблица XVI. Линеаризация уравнения Хилла

Рассматриваемая функция ^a	Пересечение с ординатой (b)	Наклон (c)	Пересечение с абсциссой	n	V	Фиксированная прямая с наклоном	Координаты пересечений фиксированной прямой с рас- считываемой функцией x y
v/w от v	1/a ⁿ	(a ⁿ - 1)/Va ⁿ	-V/(a ⁿ - 1)	$-\frac{\lg b}{\lg a}$	$\frac{1-b}{c}$	y = 1	V 1
w от w/v	Va ⁿ /(a ⁿ - 1)	-V/(a ⁿ - 1)	a ⁿ	$\frac{\lg(-b/c)}{\lg a}$	c + b	x = 1	1 V
1/w от 1/v	(a ⁿ - 1)/Va ⁿ	1/a ⁿ	-(a ⁿ - 1)/V	$-\frac{\lg c}{\lg a}$	$\frac{1-c}{b}$	y = x	1/V 1/V

^aЗависимая переменная от независимой переменной.

ния сигмоидная, и все же в течение реакции не наблюдается изменений в четвертичной структуре фермента, хотя фермент проявляет аллостерические свойства, так как α-оксоглутарат ингибирует, а цитрат активирует фермент и эффекторы связываются в отличном от субстратсвязывающего участка центре.

Все отклонения от кинетики реакции неаллостерических ферментов можно объяснить несинхронностью связывания двух молекул субстрата, и, таким образом, нет необходимости рассматривать ко-

Таблица XVII. Графическое решение квадратичного, трансформированного уравнения Эдера

Рассматриваемая функция ^a	Пересечение с		Предел наклона при концентрациях	
	ординатой	абсциссой	низких	высоких
v/w от v	1/a	V	$(a-1)(a_1' b_1 - a_2' b_0)/aa_1'^2$	$(a-1)/Va$
w от w/v	V	a	$a_1'^2/(1-a)(a_1' b_1 - a_2' b_0)^6$	$V/(1-a)$
1/w от 1/v	$(1/V)[(a^n - 1)/a^n]$	$-(a^n - 1)/V$	1/a	1/a

^aЗависимая переменная от независимой переменной.

⁶Если $a_1' b_1 = a_2' b_0$, наклон равен 1.

оперативные взаимодействия между активными центрами. Кроме того, было показано, что изменения во вторичной и четвертичной структуре белка происходят в ходе реакции, а также при активации и ингибировании. Известно, что различные ингибиторы могут вызывать отклонения от классической кинетики Михаэлиса — Ментен и, кроме того, ингибирующий эффект ионов в определенных буферах может быть причиной сигмоидной формы кривой насыщения, наблюдаемой для некоторых ферментов.

Кинетическое поведение, характерное для аллостерических ферментов, можно получить, если фермент катализирует реакцию, характеризующуюся упорядоченным присоединением субстратов, и конечный продукт или другой аллостерический эффектор изменяет первоначальный порядок связывания субстрата. В этом случае не изменяется четвертичная структура и сигмоидная форма кривой насыщения не требует предположения существования кооперативного взаимодействия. Аткинсон и др., однако, указывают, что все отклонения от кинетики Михаэлиса — Ментен для аллостерических ферментов можно объяснить моделью, в которой принимаются во внимание конформационные изменения белка, а не кооперативные взаимодействия. Вследствие этого изменяются как сила связывания субстрата, так и максимальная скорость реакции.

Николь, Джексон и Винзор выдвинули предположение, что мономерная форма фермента может превращаться в полимерную форму, и доказали, что сигмоидная форма кривой насыщения может быть результатом этих процессов.

Курганов отмечает, что сигмоидная форма кривой насыщения и дробное n_H могут быть получены для олигомерных ферментов, состоящих из обратимо диссоциирующих систем (тетрамер — димер, димер — мономер и т. д.) в случае, если активности форм, имеющих различные степени полимеризации, отличаются друг от друга.

Мономерный фермент, подчиняющийся обычному механизму Михаэлиса — Ментен, может тоже давать сигмоидную кривую при условии, что константа в уравнении скорости является так называемой кинетической константой, т. е. $k_{-1} \ll k_2$, и поэтому $K_k = k_2/k_1$.

Если рассматриваемый фермент неустойчив и его инактивация не принимается во внимание во время измерений, то может быть получена сигмоидная кривая насыщения при условии, что константа скорости инактивации по крайней мере на порядок превышает константу скорости образования комплекса ES, или $k_{-1} > k_1$.

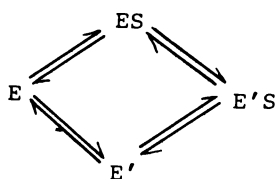
В некоторых случаях двухсубстратные реакции могут давать кажущиеся эффекты активации избытком субстрата и ингибирования,

приводя таким образом к отклонениям от кинетики Михаэлиса — Ментен. Для двухсубстратной реакции, для которой справедлив общий механизм и выполняются условия стационарности, нельзя получить линейное соотношение между обратными величинами скорости и концентрации субстрата, так как «активация» или «ингибирование» избытком субстрата присущи этому механизму. При получении сигмоидной кривой насыщения одним только кинетическим методом недостаточно для ответа на вопрос, что является этому причиной: либо фермент обладает двумя активными центрами с разными активностями, либо двумя активными центрами с одинаковой скоростью, кооперативно взаимодействующими друг с другом, либо наблюдается активация избытком субстрата.

Также было показано, что если: 1) фермент может существовать в растворе в различных конформациях, 2) обе формы способны реагировать с субстратом и 3) реакция протекает согласно стационарному приближению, то независимо от того, одна или обе формы фермента активны, скорость реакции описывается следующим уравнением:

$$v_0 = (a[S] + b[S]^2)/(c + d[S] + e[S]^2) \quad (1008)$$

при условии, что и свободный фермент, и фермент-субстратные комплексы могут свободно взаимопревращаться, т. е. реакция является циклической:



В этом случае либо ES, либо E'S или оба вместе являются активными комплексами, и сигмоидная кривая насыщения наблюдается при условии соблюдения следующих соотношений между константами в уравнении для начальной скорости реакции:

$$db > ae, bc > 0, ac > 0, bc > ad$$

(эти константы являются сложными функциями констант скорости различных стадий). Как видно из приведенного примера сигмоидная форма кривой не является указанием на наличие кооперативных

взаимодействий; более того, возможно отсутствие самих субъединиц, так как выражение справедливо и для мономерных ферментов.

В сущности, это является основой *гистерезисной теории ферментативного катализа Фридена*. Если как в модели Моно, так и Кошланда принимается, что изменения, вызываемые лигандами (изомеризация, ассоциация — диссоциация, обмен лигандами), не являются быстрыми равновесными процессами, а напротив, их скорости сравнимы со скоростью ферментативной реакции или меньше ее, то в результате наблюдается уменьшение активности фермента. Это так называемый *гистерезисный фермент*. Если дополнительно предположить существование промежуточной конформации, то возникает так называемый *мнемонический фермент* (согласно Рикару). Кроме того, необходимо упомянуть явление *активности половины центров* (half-of-the-sites-activity), которое заключается в том, что у некоторых ферментов (например, тетрамерных) работает только половина активных центров (в указанном случае два). Аналогично протекает реакция по *механизму «качелей»* (flip-flop) *Ладзунского*, для которого характерно то, что половина активных центров связывает, а другая половина превращает субстрат; затем следует обмен ролями. Такие механизмы могут также давать кривые насыщения сигмовидной формы.

Следует напомнить, что для различных аллостерических ферментов, регулируемых по механизму обратной связи (ситуация, когда конечный продукт последовательности реакции ингибирует первый фермент путем связывания с участком, отличным от активного центра), было доказано, что кинетика действия фермента и функция связывания (Y_S) подчиняются даже для олигомерных ферментов обычному уравнению Михаэлиса — Ментен, т. е. имеют гиперболическую форму кривой насыщения.

Зависимость насыщения от концентрации субстрата не может поэтому дать достаточно информации для решения вопроса, является ли рассматриваемый фермент аллостерическим, или имеют место кооперативные взаимодействия между субъединицами. Достаточная информация может быть получена только из сложной серии независимых экспериментов, которые суммированы в табл. XVIII.

Рис. 69 иллюстрирует общую схему взаимодействий субъединиц. Возможность или невозможность конкретных путей определяют модель, наилучшим образом описывающую механизм действия исследуемого фермента.

Таблица XVIII. Анализ аллостерических ферментов и кооперативных взаимодействий

Эксперимент	Результат	Вывод
$\bar{Y}_x = f([X])$	Функция гиперболическая Функция сигмоидная Функция сложная	Вероятно, нет взаимодействий Возможны положительные взаимодействия Возможна комбинация отрицательных и положительных взаимодействий
Индекс кооперативности (R_x) ^a	$R_x = 81$ $R_x < 81$ $R_x > 81$	Вероятно, нет взаимодействий Возможна положительная кооперативность Возможна отрицательная кооперативность
Коэффициент Хилла	$n_H = 1$ $n_H > 1$ и нецелочисленный $n_H > 1$, целочисленный, равный истинному числу связывающих участков $n_H < 1$	Нет кооперативности Возможна положительная кооперативность Бесконечно высокая кооперативность Возможны отрицательные взаимодействия
График Скэтчарда	Линейный Вогнутая кривая Выпуклая кривая	Вероятно, нет взаимодействий Возможно положительное взаимодействие Возможно отрицательное взаимодействие
Определение внутренних констант диссоциации (для тетрамерного фермента) путем подбора их численных значений для наилучшего совпадения расчетных и экспериментальных кривых	$K_1 = K_2 = K_3 = K_4$ $K_1 \leq K_2 = K_3 = K_4$ $K_1 K_4 = K_2 K_3$ $K_1 < K_2 < K_3 < K_4$ $K_1 > K_2 > K_3 > K_4$ $K_1 < K_2 > K_3 > K_4$ $K_{\text{измеренная}} = 4K_1 = (3/2)K_2 = (2/3)K_3 = K_4/4$ $K_{\text{измеренная}} = 4K_1 = (3/4 - 3/1800)K_2 = (2/6 - 2/2700)K_3 = K_4/4000$ $K_{\text{измеренная}} = 4K_1 = (3/2000)K_2 = (2/3000)K_3 = K_4/4000$	Нет взаимодействий Симметричная модель Простейшая последовательная квадратичная или тетраэдрическая модель Простая положительная кооперативность Простая отрицательная кооперативность Смешанная положительная и отрицательная кооперативность Нет кооперативности Положительная кооперативность ^б Симметричная модель
Ингибитор	С кажущейся конкурентностью, неконкурентный или бесконкурентный	Аллостерия

^a $R_x = S_{0,9}/S_{0,1}$, где $S_{0,9}$ и $S_{0,1}$ — концентрации субстрата, при которых достигаются 90% или 10% V_{max} соответственно.

^бВзаимосвязь между измеренными и внутренними константами диссоциации представляет собой промежуточный случай между двумя предельными случаями отсутствия взаимодействий и симметричной моделью.

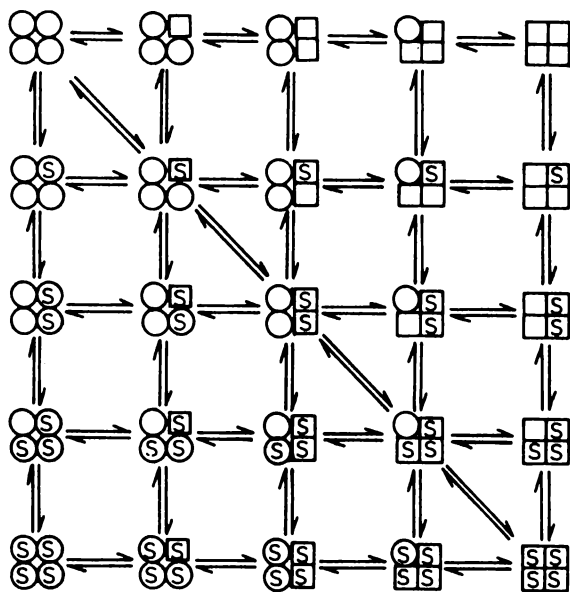


Рис. 69. Общая схема возможных моделей взаимодействия субъединиц.

3.9. КЛАССИФИКАЦИЯ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Ферментативные реакции можно классифицировать по различным принципам. Наиболее известными являются классификации Альберти и Келланда.

Альберти рассматривает два признака для группирования ферментативных реакций: 1) стехиометрия реакции и 2) число и свойства комплексов, образующихся во время реакции.

Стехиометрия реакции указывает на число молекул субстрата, стехиометрически взаимодействующих с ферментом.

В *односубстратной* реакции одно вещество превращается в продукт под действием фермента. Реакции, катализируемые таутомеразми, некоторыми изомеразми, рацемазми и т. д., попадают в эту категорию.

В *кажущейся односубстратной реакции* участвуют два субстрата, но один из них — вода, концентрация которой при обычных условиях практически «бесконечно высока», и поэтому остается постоянной во время реакции и не включается в уравнение скорости. В качестве примеров можно привести реакции, катализируемые фумаразой, аконитазой, кротонойзой, енолазой и дегидратазой.

В *двухсубстратной реакции* два вещества взаимно превращаются друг в друга под действием фермента. Почти все ферменты, использующие коферменты, так же как и ряд других ферментов: большая часть дегидрогеназ, фосфорилаз, гексокиназа, фосфатазы и т. п., принадлежат к этой группе.

К *трехсубстратным* можно отнести реакции, катализируемые различными синтетазами, пируватоксидазой (КФ 1.2.3.3) *Lactobacillus* и т. д.

Все эти типы реакций имеют одинаковую стехиометрию в обоих направлениях.

В реакциях со смешанной стехиометрией последняя меняется при изменении направления реакции. Например, реакции, катализируемые различными эстеразами, являются кажущимися односубстратными в прямом направлении и, по крайней мере теоретически, двухсубстратными в обратном. Например, под действием ацетилхолинэстеразы (КФ 3.1.1.7) ацетилхолин реагирует с водой. Концентрация последней «бесконечно высока» при рассмотрении реакций, поэтому в данном направлении имеет место кажущаяся односубстратная реакция. Образуются два продукта — ацетат и холин, и, таким образом, обратная реакция будет двухсубстратной. Реакции, катализируемые некоторыми синтетазами или глицеральдегидфосфатдегидрогеназой (КФ 1.2.1.12), являются двухсубстратными в прямом и трехсубстратными в обратном направлении и т. д.

Второй признак классификации реакций по Альберти — это число и природа фермент-субстратных комплексов, образующихся во время реакции. Основываясь на этом критерии, можно различать механизмы реакций без образования комплекса и с образованием переходных промежуточных комплексов.

Кинетически незначительные переходные комплексы могут быть химически устойчивы и даже выделены. Их «переходная» природа проявляется только кинетически в данной реакции.

Терминология Келланда относится к механизму реакции. Поэтому номенклатура Альберти была постепенно замещена номенклатурой Келланда.

Согласно номенклатуре Келланда, число реагирующих субстратов и продуктов обозначается уни-, би-, тер-, квад- и т. д. Таким образом, реакция с двумя субстратами и двумя продуктами сокращенно обозначается би-би, один субстрат/два продукта — уни-би, а три субстрата/два продукта — тер-би и т. д.

По типу механизма реакция может быть: 1) *последовательной*, если все субстраты должны быть связаны с ферментом до выделения любого продукта; 2) *упорядоченной*, если связывание субстра-

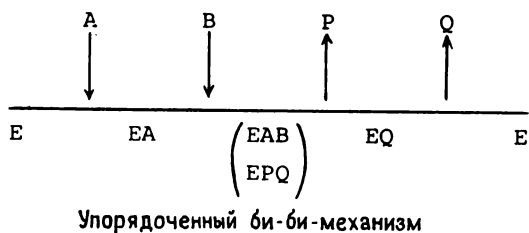
тов с ферментом протекает в определенном порядке и аналогичная ситуация наблюдается для отщепления продуктов; 3) *неупорядоченной*, если не наблюдается строгого порядка связывания субстратов и отщепления продуктов, но субстраты связываются (а продукты отщепляются) с ферментом по параллельным реакциям с почти одинаковой вероятностью; 4) *пинг-понговой*, если один или больше конечных продуктов отщепляются раньше, чем второй и(или) третий субстрат свяжется с ферментом.

Субстраты обозначаются буквами А, В, С, D ..., продукты — Р, Q, R, S, ..., устойчивый свободный фермент — Е, устойчивый ферментативный комплекс или измененный (изомеризованный) фермент — F, G, H. *Центральный комплекс* заключается в скобки. В центральном комплексе субстрат превращается в продукт. Если превращение центрального комплекса (процесс, который может протекать одновременно с изомеризацией фермента) не влияет на кинетику, то на схеме начальный и конечный центральные комплексы помещают друг под другом в скобках.

Если центральный комплекс влияет на кинетику всей реакции, следует поставить приставку *изо-* перед кинетическим названием реакции (например, *изо-упорядоченная*, *изо-неупорядоченная*, *изо-пинг-понговая*). Так, если имеются два центральных комплекса, влияющих на кинетику реакций, то реакция называется *ди-изо-пинг-понг* и т. д.

3.10. НЕКОТОРЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДВУХСУБСТРАТНЫХ РЕАКЦИЙ

Ниже продемонстрированы несколько примеров по номенклатуре Келланда и способы их представлений.



Уравнение, описывающее начальную скорость реакции, подчиняющейся механизму этого типа, имеет вид

$$v_0 = V[A][B]/(K_{ia}K_b + K_b[A] + K_a[B] + [A][B]) \quad (1009)$$

где А и В — два субстрата, K_a и K_b — константы Михаэлиса А и В при насыщении В и А соответственно, а K_{ia} — константа диссоциации комплекса ЕА. Этот механизм характеризуется следующим кинетическим соотношением Холдейна:

$$K_{\text{равн}} = V_f K_p K_{iq} / V_r K_{ia} K_b \quad (1010)$$

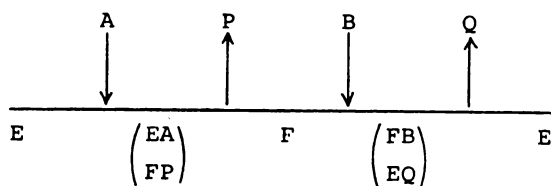
где K_p — константа Михаэлиса по Р при насыщении Q, а K_{iq} — константа диссоциации комплекса EQ.

Термодинамическое соотношение Холдейна имеет вид

$$K_{\text{равн}} = (V_f / V_r)^2 (K_{ip} K_q / K_a K_{ib}) \quad (1011)$$

где K_{ip} и K_{ib} — константы диссоциации комплексов EP и ES соответственно, а K_q — константа Михаэлиса по Q при насыщении Р.

Упорядоченному би-би-механизму подчиняются цитоплазматическая малатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.37) и глицеролдегидрогеназа (КФ 1.1.1.6) *Aerobacter aerogenes* (где NAD является первым связывающимся субстратом), лактатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.27) и глицерол-3-фосфат-дегидрогеназа (КФ 1.1.1.8), где NADH связывается первым с ферментом, и многие другие ферменты.



Пинг-понговый би-би-механизм

Уравнение скорости для ферментов с пинг-понговым би-би-механизмом имеет вид

$$v_0 = V[A][B] / (K_b[A] + K_a[B] + [A][B]) \quad (1012)$$

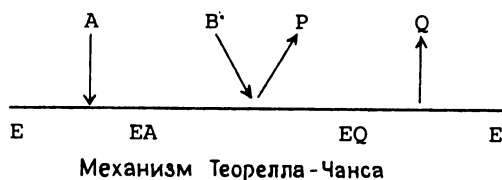
Кинетическое уравнение Холдейна

$$K_{\text{равн}} = V_f K_{ip} K_q / V_r K_{ia} K_b \quad (1013)$$

Термодинамическое уравнение Холдейна

$$K_{\text{равн}} = (V_f / V_r)^2 (K_p K_q / K_a K_b) \quad (1014)$$

Это механизм действия дрожжевой D(-)лактат-цитохром-редуктазы, дигидролипоамид-дегидрогеназы (КФ 1.8.1.4) и т. п.



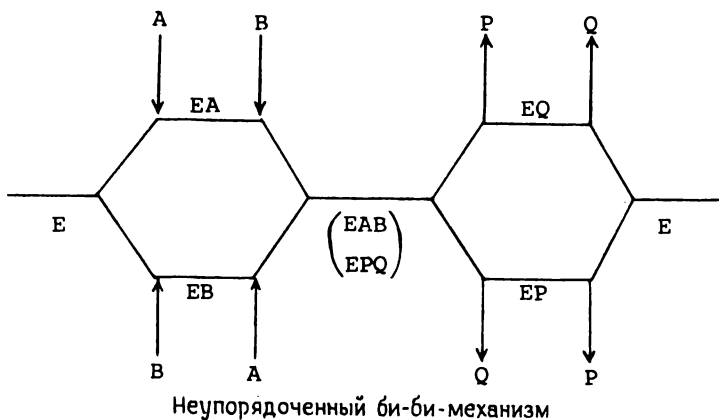
Это единственный механизм, в котором не происходит образования кинетически существенного тройного комплекса. Уравнение для начальной скорости имеет вид

$$v_0 = V[A][B]/(K_{ia}K_b + K_a[B] + K_b[A] + [A][B]) \quad (1015)$$

Кинетическое соотношение Холдейна для этого случая

$$K_{\text{равн}} = V_i^3 K_p K_{iq} / V_r^3 K_{ia} K_b \quad (1016)$$

Известным представителем ферментов, действующих по такому механизму, является алкогольдегидрогеназа (КФ 1.1.1.1) печени лошади.



Различают два типа неупорядоченного би-би-механизма. Один из них подчиняется стационарному приближению. В этом случае двойные обратные координаты (или любая другая «линеаризация») не дают прямой линии. Уравнение начальной скорости имеет вид

$$v_0 = V(K_{xab}[A][B] + K_{a/b}[A]^2[B] + [A][B]^2)/(K_x + K_{b2}[A] + K_{a2}[B] + K_{b1}[A]^2 + K_{a1}[B]^2 + K_{abl}[A][B] + K_{a/b}[A]^2[B] + [A][B]^2) \quad (1017)$$

Индивидуальные константы представляют собой сложные функции констант скорости (см. (1058)).

Кинетика действия ферментов, подчиняющихся быстрому равновесному неупорядоченному би-би-механизму, гораздо проще. В этом случае линеаризованное уравнение скорости имеет вид прямой линии и, таким образом, позволяет графически определить численные значения индивидуальных констант. Уравнение, характеризующее начальную скорость этих реакций имеет вид

$$v_0 = V[A][B]/(K_{ia}K_b + K_a[B] + K_b[A] + [A][B]) \quad (1018)$$

Быстрому равновесному неупорядоченному би-би-механизму подчиняются дрожжевая алкогольдегидрогеназа, мышечная гексокиназа и много других ферментов.

3.10.1. Кинетический анализ двухсубстратных реакций. Известны два метода определения величин констант из уравнения, описывающего начальную скорость двухсубстратной реакции. Согласно *методу Флорини и Вестлинга*, следующее обобщенное уравнение принимают в качестве исходного (при условии, что реакция соответствует последовательному и/или быстрому равновесному приближению):

$$v_0 = V_f[A][B]/(K_{ia}K_b + K_a[B] + K_b[A] + [A][B]) \quad (1019)$$

Взяв обратную величину и выделив множители $1/[A]$ и $1/[B]$, получим

$$1/v_0 = (K_a/V_f + K_{ia}K_b/V_f[B])(1/[A]) + (1 + K_b/[B])(1/V_f) \quad (1020)$$

$$1/v_0 = (K_b/V_f + K_{ia}K_b/V_f[A])(1/[B]) + (1 + K_a/[A])(1/V_f) \quad (1021)$$

Основываясь на уравнении (1020), можно построить график зависимости $1/v_0$ от $1/[A]$ при нескольких различных, но внутри одной серии эксперимента постоянных концентрациях $[B]$ (рис. 70,а). Проекция на абсциссу точки общего пересечения линий, относящихся к различным экспериментам, дает величину $-1/K_{ia}$.

Используя уравнение (1021), можно построить график зависимости $1/v_0$ от $1/[B]$ при различных, но внутри одной серии эксперимента постоянных концентрациях $[A]$ (рис. 70,б). Проекция на абсциссу точки общего пересечения прямых линий, относящихся к различным экспериментам, дает величину $-K_{ia}K_b/K_a$. Остальные параметры могут быть получены, если построить графики зависимостей отсекаемых на оси ординат отрезков $1/V_A$ и $1/V_B$ от $1/[B]$ и $1/[A]$ соответственно (рис. 70,в,г).

$$1/V_A = (K_b/V_f)(1/[B]) + 1/V_f \quad (1022)$$

$$1/V_B = (K_a/V_f)(1/[A]) + 1/V_f \quad (1023)$$

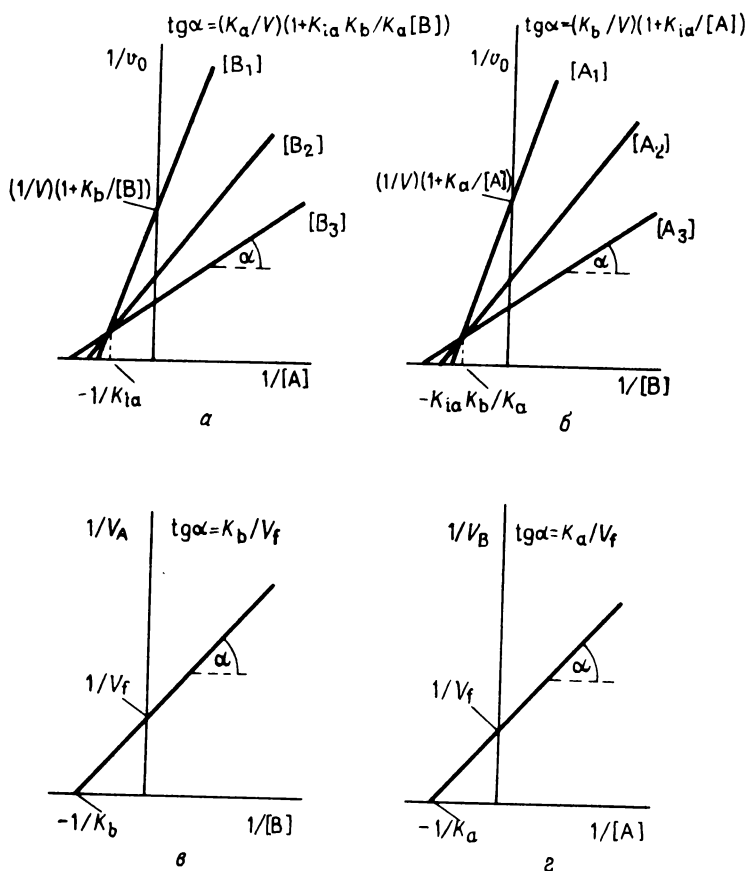


Рис. 70. Кинетический анализ двухсубстратных реакций по методу Флорини — Вестлинга с использованием номенклатуры Клееланда.

Таким образом, для определения четырех неизвестных (V_f , K_a , K_b , K_{ia}) имеем четыре уравнения. Для определения констант можно также использовать график зависимости наклонов кривых на рис. 70, а и б от другого субстрата.

Из рис. 70, а и б можно сделать определенные заключения, касающиеся механизма реакции. Если точка пересечения находится во втором квадранте, реакция последовательная, т. е. все субстраты связываются с ферментом прежде, чем начнут отщепляться продукты. Если точка пересечения находится на оси абсцисс, субстраты не мешают связыванию друг друга. Если линии параллельны, реак-

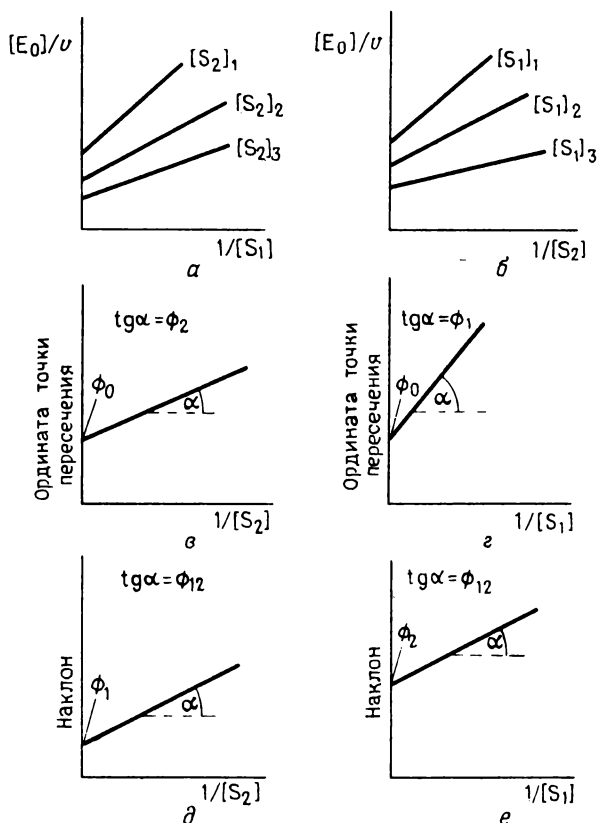


Рис. 71. Анализ двухсубстратных реакций по Дизлу. Ординаты пересечения и наклоны на рис. в и г, так же как на д и е относятся к прямым линиям на рис. а и б.

ция следует пинг-понг-механизму, т. е. один из продуктов отщепляется от фермента до связывания второго субстрата.

Вариант этого метода был разработан Дизлом*. Она основана на следующем общем уравнении:

$$[E]/v_0 = \phi_0 + \phi_1/[S_1] + [\phi_2]/[S_2] + \phi_{12}/[S_1][S_2] \quad (1024)$$

Если выполнить серию экспериментов, как в предыдущем случае, т. е. построить график зависимости $[E]/v_0$ от $1/[S_1]$ (рис. 71, а)

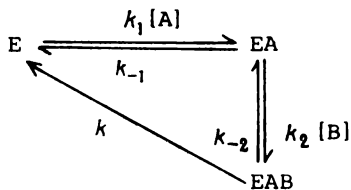
* В отечественной литературе Дизл (K. Dalziel) иногда цитируется как Даль-циль. — Прим. ред.

или $1/[S_2]$ (рис. 71,б), то в результате получим прямую линию, для которой точки пересечения и наклоны являются функциями $1/[S_2]$ и $1/[S_1]$. Вторичные графики точек пересечений (рис. 71,в и г) и наклонов прямых линий от обратных величин концентраций соответствующих субстратов (рис. 71,д и е) непосредственно дают величины четырех констант ϕ в уравнении.

Соотношение между константами ϕ и кинетическими константами Михаэлиса зависит от типа механизма. Аналогично, взаимосвязи между индивидуальными константами, так же как и величины констант равновесия в терминах ϕ , различны в зависимости от механизма. Эти взаимосвязи можно использовать для предварительной дискриминации различных механизмов (табл. XIX).

Тем не менее, как подчеркнуто ранее, имеются механизмы, неразличимые друг от друга ни одним из этих методов, и поэтому требуется использование других методов. Прекрасные результаты дает широко распространенный метод кинетического анализа начальных скоростей, определенных в присутствии продукта. В этом случае один или другой или оба продукта реакции добавляются в разных известных концентрациях к реакционной смеси до инициирования реакции, и измеряется начальная скорость. В зависимости от характера влияния продуктов на скорость реакции часть механизмов, неразличимых другими простыми кинетическими методами, могут быть дифференцированы (табл. XX)

Другую возможность представляет метод *альтернативного субстрата* Фридена и Фромма. В этом случае кроме физиологического субстрата к ферменту добавляется другой субстрат. Скорости реакции при этом, конечно, различаются. Для быстрой равновесной, последовательной, упорядоченной би-би-реакции при рассмотрении только начальной скорости механизм можно представить следующий схемой:



Начальная скорость реакции дается уравнением (в символах Дизла):

$$[E_0]/v = \phi_0 + \phi_1/[A] + \phi_2/[B] + \phi_{12}/[A][B] \quad (1025)$$

Таблица XIX. Связь констант ϕ с кинетическими равновесными константами в различных двухсубстратных реакциях

Механизм	Кинетические коэффициенты ^a			Соотношение между коэф-циентами	Соотношение Холдейна $K_{рам}$
	ϕ_0	ϕ_1	ϕ_2	ϕ_{12}	
Быстрый равновесный неупорядоченный би-би	$\frac{1}{k}$	$\frac{K_4}{k}$	$\frac{K_3}{k}$	$\frac{K_1 K_3}{k}$	$\frac{\phi'_{12}}{\phi_{12}}$
Изо-упорядоченный би-би	$\frac{1}{k_{-1}} + \frac{1}{k_3} + \frac{1}{k} + \frac{k'}{kk_3}$	$\frac{1}{k_1}$	$\frac{k_{-2}k_3 + k_{-2}k' + k_{-2}k}{k_2 k_3 k}$	$\frac{k_{-1}(k_{-2}k_3 + k_{-2}k)(k' + k_3 k)}{k_1 k_2 k_3 k}$	$\frac{\phi_{12}}{\phi_{12}} < \phi_0$
Упорядоченный би-би	$\frac{1}{k_4} + \frac{1}{k_3}$	$\frac{1}{k_1}$	$\frac{k_{-2} + k_3}{k_2 k_3}$	$\frac{k_{-1}(k_{-2} + k_3)}{k_1 k_2 k_3}$	$\frac{\phi'_{12}}{\phi_{12}} < \phi_0$
Теорелла — Чанса	$\frac{1}{k_3}$	$\frac{1}{k_1}$	$\frac{1}{k_2}$	$\frac{k_{-1}}{k_1 k_2}$	$\frac{\phi_{12}}{\phi_{12}} = \phi_0$
Пинг-понг-би-би	0	$\frac{1}{k_1}$	$\frac{1}{k_{-1}}$	0	$\frac{\phi'_{12}}{\phi_{12}}$

^a Константы, обозначенные штриховым индексом относятся к реакции справа налево. k константа скорости образования продукта слева направо. За исключением случая неупорядоченного би-би-механизма, использовано стационарное приближение.

Таблица XX. Дифференциация механизмов реакции по ингибирующему влиянию продукта на начальную скорость

Механизм (в номенклатуре Келланда)	Добавленный ингибирующий продукт	Субстрат с изменяемой концентрацией ^a			
		А		В	
		ненасыщение В	насыщение В	ненасыщение А	насыщение А
Упорядоченный би-би	P	НК	БК	НК	НК
	Q	К	К	НК	—
Теорелла — Чанса	P	НК	—	К	К
	Q	К	К	НК	—
Изо-упорядоченный би-би	P	НК	БК	НК	НК
	Q	НК	НК	НК	БК
Изо-механизм Теорелла — Чанса	P	НК	—	К	К
	Q	НК	НК	НК	НК
Быстрый равновесный неупорядоченный би-би	P или Q	К	—	К	—
Пинг-понг-би-би	P	НК	—	К	К
	Q	К	К	НК	—
Изо-пинг-понг-би-би	P	НК	—	К	К
	Q	НК	НК	НК	НК
Ди-изо-пинг-понг-би-би	P или Q	НК	НК	НК	НК
Неупорядоченный би-би ^б	P или Q	НК	НК	НК	НК

^a К — конкурентное ингибирование, НК — неконкурентное ингибирование, БК — бесконкурентное ингибирование.

^б Графики в двойных обратных координатах не обнаруживают линейной зависимости; аналогично наклоны и точки пересечения графиков в двойных обратных координатах при ингибировании не являются линейными функциями ингибитора, показывая гиперболический и более сложный характер.

где $\phi_0 = 1/k$, $\phi_1 = 1/k_1$, $\phi_2 = (k_{-2} + k)/kk_2$, $\phi_{12} = k_{-1}(k + k_{-2})/k_1k_2k_{-}$.

При использовании альтернативного субстрата (A'):

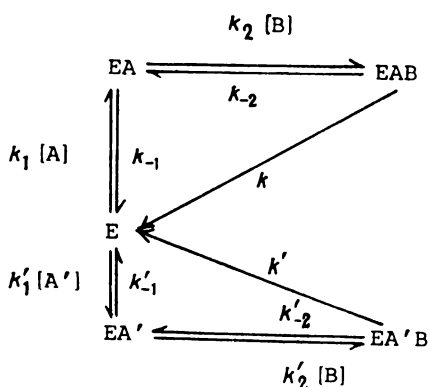


Таблица XXI. Использование альтернативного субстрата для исследования механизма двухсубстратной реакции

График зависимости	Альтернативный субстрат	Вид зависимости	Вывод
$[E_0]/v$ от $1/[A]$	A'	Линейный	Упорядоченный механизм, первый субстрат: A
$[E_0]/v$ от $1/[B]$	A'	Нелинейный	
$[E_0]/v$ от $1/[A]$	B'	Нелинейный	Упорядоченный механизм, первый субстрат: B
$[E_0]/v$ от $1/[B]$	B'	Линейный	

Если в этом случае штриховым верхним индексом отмечены константы, относящиеся к альтернативному субстрату, то уравнение для обратной величины начальной скорости имеет вид

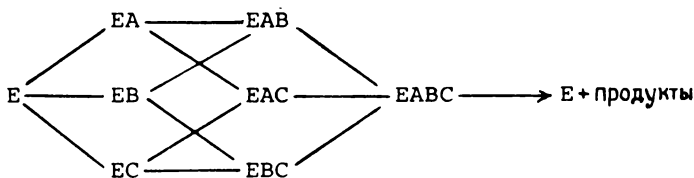
$$[E_0]/v = \phi_0 + \phi_1/[A] + \phi_2/[B] + \phi_{12}/[A][B] + ([A']/[A][B])(\phi_{12}/\phi_1 + [B])(\phi_1\phi'_0/\phi'_1)[(\phi'_2/\phi'_0 + [B])/(\phi'_{12}/\phi'_1 + [B])] \quad (1026)$$

Аналогично могут быть выведены соответствующие уравнения для других механизмов. Табл. XXI суммирует взаимосвязи, которые необходимо использовать для анализа (согласно Рикару).

Если два графика дают прямые линии, то метод неприменим для решения вопроса, является ли механизм неупорядоченным, или это некая вырожденная форма упорядоченного механизма (т. е. некоторые из констант ϕ_i или их комбинации равны между собой), либо скорее всего превалирует пинг-понг-механизм.

3.11. МЕХАНИЗМЫ ТРЕХСУБСТРАТНЫХ РЕАКЦИЙ

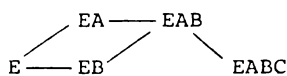
В первую очередь следует рассмотреть общий механизм: т. е. неупорядоченный тер-тер-механизм, в котором могут образовываться и обладают активностью бинарные, тройные и четверные комплексы



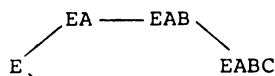
Распад четверного комплекса может давать один, два, три или более продуктов. Название реакции, стехиометрия и, конечно, кинетика будут изменяться соответственно этому, если анализироваться будет не только начальная скорость реакции, протекающей слева направо и показанной на схеме.

В другой группе механизмов образование тройного комплекса из двух субстратов не следует упорядоченному последовательному механизму. Тройной комплекс реагирует с третьим субстратом, протекает реакция, и от полученного комплекса отщепляется конечный продукт. В терминах *номенклатуры Дизла* это *частично неупорядоченные механизмы*.

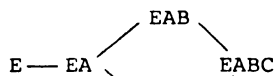
Три из них, частично неупорядоченные АВ-, АС- и ВС-механизмы, основаны на неупорядоченном связывании субстратов.



Частично неупорядоченный
АВ-механизм



Частично неупорядоченный
АС-механизм



Частично неупорядоченный
ВС-механизм

Очевидно, что эти механизмы могут следовать приближениям как стационарного состояния, так и быстрого равновесия.

Если исследуется изменение начальной скорости как функции концентраций неупорядоченно связывающихся субстратов (т. е. А и В — в первом, А и С — во втором и В и С — в третьем случаях), линеаризованные формы уравнений скорости дают прямые линии только для механизма с быстро устанавливающимся равновесием. Процесс распада четверных комплексов и число конечных продуктов влияют только на кинетику всего процесса и на реакцию в направлении справа налево.

Легко показать, что имеется шесть вариантов трехсубстратных строго упорядоченных механизмов. Кроме того, существуют многочисленные пинг-понг-механизмы. Эти механизмы трудно различить; если анализировать исключительно начальную скорость как функцию концентрации субстратов, то различить их практически невозможно, особенно для трехсубстратных реакций. Поэтому механизмы следует анализировать комплексными методами с использованием разных подходов. Некоторые методы, применимые для таких исследований, описаны ниже.

3.11.1. Кинетический анализ трехсубстратных реакций. Для проведения кинетического анализа (по методу Диезла) прежде всего надо построить график зависимости $[E_0]/v$ от $1/[A]$ при нескольких концентрациях В при постоянной концентрации С. Такой же эксперимент повторяют при различных концентрациях С при постоянной концентрации В, и затем вновь проводят, используя несколько различных концентраций В. Расширяя эксперимент, строят график зависимости $[E_0]/v$ от $1/[B]$ при нескольких постоянных концентрациях А и при одной концентрации С. Повторяют эксперимент с несколькими различными концентрациями С. Затем меняют субстраты, имеющие постоянные концентрации, т. е. С на А, и, наконец, ту же серию экспериментов проводят, строя график зависимости $[E_0]/v$ от $1/[C]$. Таким образом получают первичные графики (рис. 72).

Общее уравнение для трехсубстратной реакции имеет вид

$$[E_0]/v = \phi_0 + \phi_A/[A] + \phi_B/[B] + \phi_C/[C] + \phi_{AB}/[A][B] + \phi_{AC}/[A][C] + \phi_{BC}/[B][C] + \phi_{ABC}/[A][B][C] \quad (1027)$$

Координаты точек пересечения, а также наклоны прямых линий первичных графиков приведены в табл. XXII. Как можно видеть, координаты точек пересечения и наклоны являются функциями постоянных концентраций субстратов. Таким образом могут быть построены вторичные графики, суммированные на рис. 73.

Координаты точек пересечения и наклоны вторичных графиков являются функциями концентрации первого субстрата. Третичные графики, построенные таким образом, дают величины индивидуальных констант (рис. 74).

Поэтому большинство констант можно получить из нескольких графических представлений. Таким образом, вышеприведенный анализ является весьма многостадийным. Однако, хотя точность опре-

Таблица XXII. Ординаты точек пересечения и наклоны первичных графиков для трехсубстратных реакций

График	Ордината точки пересечения	Наклон
$[E_0]/v$ от $1/[A]$	$\phi_0 + \phi_B/[B] + \phi_C/[C] + \phi_{BC}/[B][C]$	$\phi_A + \phi_{AB}/[B] + \phi_{AC}/[C] + \phi_{ABC}/[B][C]$
$[E_0]/v$ от $1/[B]$	$\phi_0 + \phi_A/[A] + \phi_C/[C] + \phi_{AC}/[A][C]$	$\phi_B + \phi_{AB}/[A] + \phi_{BC}/[C] + \phi_{ABC}/[A][C]$
$[E_0]/v$ от $1/[C]$	$\phi_0 + \phi_A/[A] + \phi_B/[B] + \phi_{AB}/[A][B]$	$\phi_C + \phi_{AC}/[A] + \phi_{BC}/[B] + \phi_{ABC}/[A][B]$

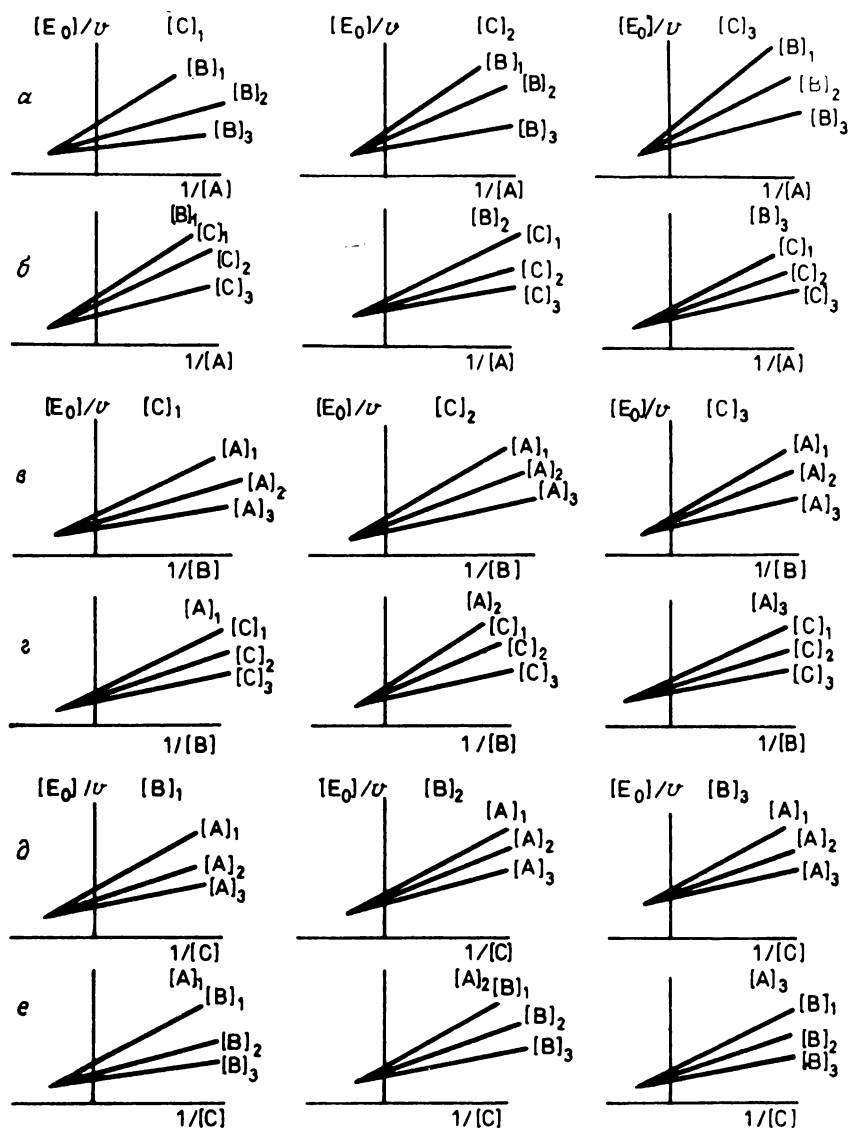


Рис. 72. Кинетический анализ трехсубстратных реакций. Первичные графики. Нижние индексы 1, 2, 3 у концентраций субстратов А, В и С означают порядок анализа.

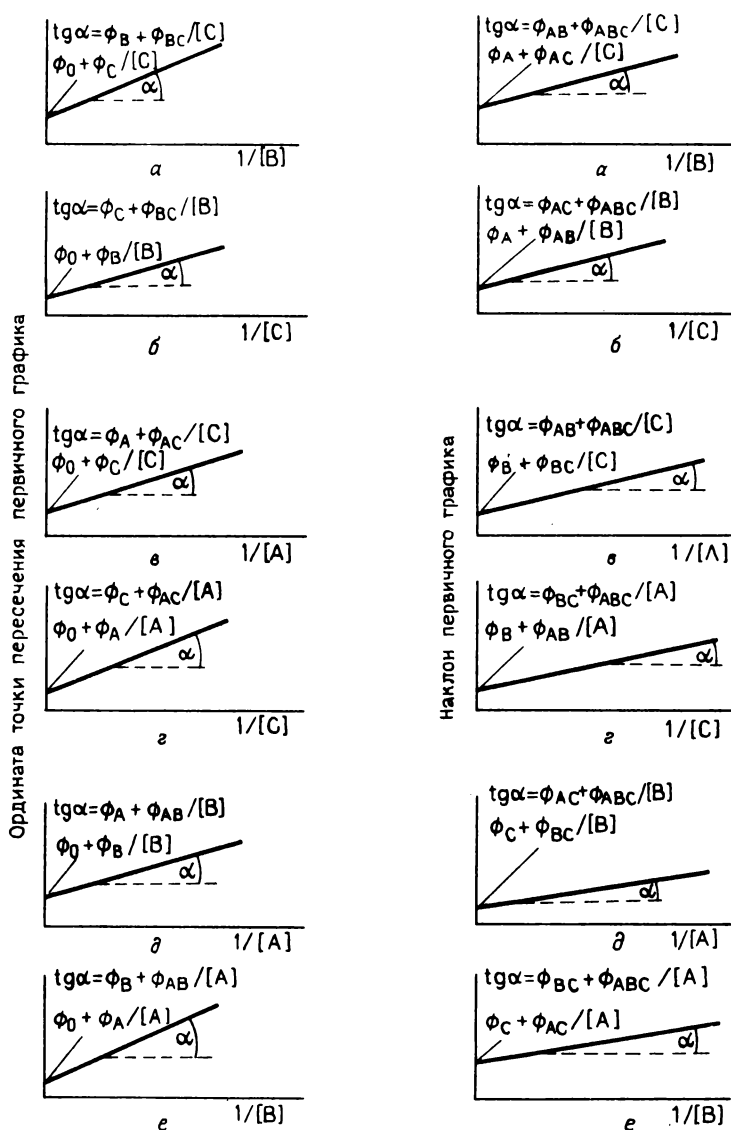


Рис. 73. Вторичные графики для трехсубстратных реакций.

делений довольно низка (для определения констант требуется трехкратная трансформация), эти повторения не бесполезны.

Взаимосвязь констант ϕ со скоростью и константами равновесия для ряда механизмов суммированы в табл. XXIII.

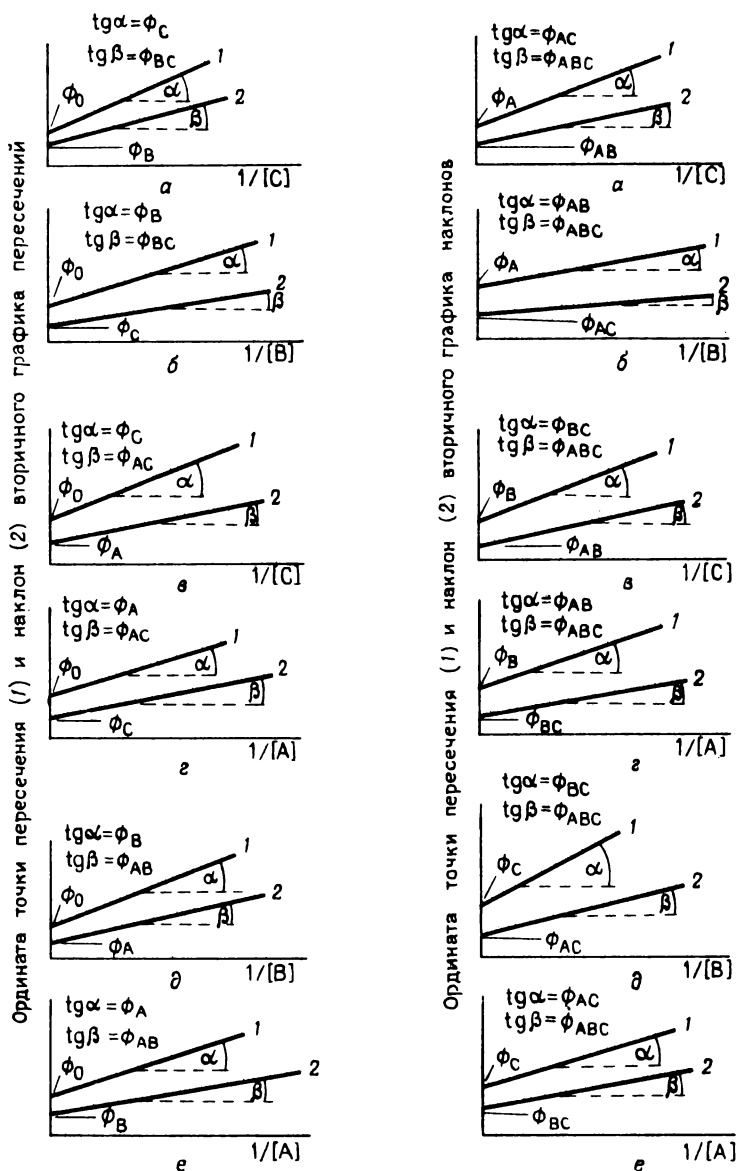


Рис. 74. Третичные графики для трехсубстратных реакций.

Менее точную информацию можно получить более простым способом. Первичные графики (рис. 72) пересекаются в одной точке. Эти общие пересечения являются функциями «третьего» суб-

Таблица XXIII. Связь констант ϕ с константами скорости и равновесия

Механизм	ϕ_0	ϕ_A	ϕ_B	ϕ_C	ϕ_{AB}	ϕ_{AC}	ϕ_{BC}	ϕ_{ABC}	$K_{равн}$
Неупорядоченный	$\frac{1}{k}$	$\frac{K_{BCA}}{k}$	$\frac{K_{ACB}}{k}$	$\frac{K_{ABC}}{k}$	$\frac{K_{ABC}K_{AC}}{k}$	$\frac{K_{ABC}K_{BC}}{k}$	$\frac{K_{ABC}K_{AB}}{k}$	$\frac{K_A K_{AB} K_{ABC}}{k}$	$\frac{\phi_{PQR}}{\phi_{ABC}}$
Упорядоченный	$\frac{1}{k_3} + \frac{1}{k_4} + \frac{k'}{k k_4}$	$\frac{1}{k_1}$	$\frac{1}{k_2}$	$\frac{Y^a}{k_3}$	$\frac{k-1}{k_1 k_2}$	0	$\frac{k-2Y^a}{k_2 k_3}$	$\frac{k-1 k-2 Y^a}{k_1 k_2 k_3}$	$\frac{\phi_{PQR}}{\phi_{ABC}}$
Частично неупорядоченный	$\frac{1}{k}$	$\frac{1}{k_1}$	$\frac{K_{ACB}}{k}$	$\frac{K_{ABC}}{k}$	0	0	$\frac{K_{ABC}K_{AB}}{k}$	$\frac{k-1 K_{ABC} K_{AB}}{k_1 k}$	$\frac{\phi_{PQR}}{\phi_{ABC}}$
Пинг-понг, только с би-нарными комплексами	$\frac{1}{k_2} + \frac{1}{k_4} + \frac{1}{k_6}$	$\frac{k-1 + k_4}{k_1 k_2}$	$\frac{k-3 + k_4}{k_3 k_4}$	$\frac{k-5 + k_6}{k_5 k_6}$	0	0	0	0	$\frac{\phi_P \phi_Q \phi_R}{\phi_A \phi_B \phi_C}$

^a $Y = (k-3k' + k-3k_4 + k k_4)/k k_4$

Таблица XXIV. Определение механизма трехсубстратных реакций

1-й, 2-й, 3-й субстраты	a — абсцисса точки общего пересечения первичных графиков	a как функция концентрации третьего субстрата	
		линейная	нелинейная
ABC	$(-\phi_B[C] + \phi_{BC})/(\phi_{AB}[C] + \phi_{ABC})$	$\phi_{AB} = 0$	$\phi_{AB} \neq 0$
ACB	$(-\phi_C[B] + \phi_{BC})/(\phi_{AC}[B] + \phi_{ABC})$	$\phi_{AC} = 0$	$\phi_{AC} \neq 0$
BAC	$(-\phi_A[C] + \phi_{AC})/(\phi_{AB}[C] + \phi_{ABC})$	$\phi_{AB} = 0$	$\phi_{AB} \neq 0$
BCA	$(-\phi_C[A] + \phi_{AC})/(\phi_{BC}[A] + \phi_{ABC})$	$\phi_{BC} = 0$	$\phi_{BC} \neq 0$
CAB	$(-\phi_A[B] + \phi_{AB})/(\phi_{AC}[B] + \phi_{ABC})$	$\phi_{AC} = 0$	$\phi_{AC} \neq 0$
CBA	$(-\phi_B[A] + \phi_{AB})/(\phi_{BC}[A] + \phi_{ABC})$	$\phi_{BC} = 0$	$\phi_{BC} \neq 0$

страта. Анализ этих функций может дать непосредственную информацию, касающуюся типа механизма, хотя его нельзя использовать для определения численных значений констант. Этот простой анализ представлен в табл. XXIV.

Если $\phi_{AB}, \phi_{AC}, \phi_{BC}, \phi_{ABC} \neq 0$ и первичные графики линейны, механизмы называются быстрыми равновесными. Если $\phi_{AC} = 0$ — механизм упорядоченный; если $\phi_{AB}, \phi_{AC} = 0$ — механизм, частично неупорядоченный BC; если $\phi_{AB}, \phi_{AC}, \phi_{BC} = 0$, можно предположить наличие частично неупорядоченного АВ-механизма. Если $\phi_{AB}, \phi_{AC}, \phi_{ABC} = 0$ или $\phi_{AB}, \phi_{AC}, \phi_{BC}, \phi_{ABC} = 0$, действуют различные пинг-понговые механизмы.

Дальнейшую информацию о механизме трехсубстратной реакции можно получить, используя метод ингибирования продуктом (табл. XXV).

Аналогично для определения механизма трехсубстратной реакции можно использовать метод альтернативного субстрата (табл. XXVI).

Комбинация этих методов дает надежную картину механизма трехсубстратной реакции. Так как число возможных механизмов огромно, а различия в кинетическом поведении незначительны, необходимо подчеркнуть, что только отрицательные результаты несут положительную, информацию, т.е. только исключение механизма можно считать точным утверждением. Если экспериментальные результаты соответствуют какому-либо механизму, то это указывает лишь на возможность, а не на единственность рассматриваемого механизма.

Ингибирование или активация мультисубстратных реакций

Таблица XXV. Применение ингибирования продуктом для анализа механизма трехсубстратных реакций ^a

Механизм	Ингибирующий продукт	[A] изменяется при			[B] изменяется при			[C] изменяется при		
		насыщаю-щих [B] и [C]	[B] шающих	[A] насы-щающих [B] и [C]	[C] насы-щающих [A] и [C]	насыщаю-щих [A] и [C]	[A] насы-щающих [B] и [C]	[C] насы-щающих [A] и [B]	[A] насы-щающих [B] и [C]	[B] насы-щающих [A] и [C]
Упорядоченный Тер-тер	P	НК	БК	БК	БК	БК	НК	НК	НК	НК
	Q	БК	БК	БК	БК	БК	БК	БК	БК	БК
Би-уни-уни-Би Пинг-понг	R	К	К	К	К	К	К	К	К	К
	P	НК	БК	БК	—	НК	НК	К	К	К
Гекса-уни Пинг-понг	Q	БК	БК	БК	БК	БК	БК	НК	НК	НК
	R	К	К	К	К	К	—	БК	—	БК
Би-би-уни-уни Пинг-понг	P	НК	—	НК	НК	К	К	БК	БК	—
	Q	БК	БК	БК	—	БК	НК	К	К	К
	R	К	К	К	К	К	—	НК	—	НК
	P	НК	БК	БК	НК	НК	НК	БК	БК	БК
	Q	БК	БК	БК	—	БК	БК	К	К	К
	R	К	К	К	К	К	—	НК	—	НК

^a К, НК, БК — соответственно конкурентный, неконкурентный, бесконкурентный типы ингибирования.

Таблица XXVI. Применение альтернативного субстрата в анализе механизма трехсубстратных реакций

Механизм	Альтернативный субстрат	График Лайнуивера—Берка *		
		$1/v - 1/[A]$	$1/v - 1/[B]$	$1/v - 1/[C]$
Упорядоченный тер-тер	A'	К	НЛ	НЛ
	B'	НК	К	НЛ
	C'	НК	НК	К
Быстрый равновесный неупорядоченный	A'	К	НК	НК
	B'	НК	К	НК
	C'	НК	НК	К
Частично неупорядоченный АВ	A'	К	НК	НК
	B'	НК	К	НК
	C'	БК	БК	К
Частично неупорядоченный ВС	A'	К	НК	НК
	B'	БК	К	НК
	C'	БК	НК	К
Частично неупорядоченный АС	A'	К	НК	НК
	B'	НК	К	НК
	C'	НК	НК	К
Гекса-уни пинг-понг	A'	К	НК	НК
	B'	НК	К	НК
	C'	НК	НК	К
Би-уни-уни-би пинг-понг	A'	К	НЛ	НК
	B'	НК	К	НК
	C'	НК	НК	К
Уни-уни-би-би пинг-понг	A'	К	НК	НК
	B'	НК	К	НЛ
	C'	НК	НК	К

* К, НК, БК и НЛ — сокращения, показывающие, что график Лайнуивера—Берка в двойных обратных координатах в присутствии альтернативных субстратов дает графики, характерные соответственно для конкурентного, неконкурентного, бесконкурентного ингибирования, или имеет нелинейный характер.

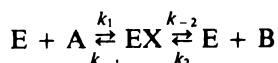
обычно анализируется при насыщающих или постоянных концентрациях одного или двух субстратов, а тип ингибирования устанавливается относительно одного из субстратов. Затем концентрация одного или обоих других субстратов поддерживается постоянной, тип ингибирования определяется относительно второго субстрата и т. д. В действительности этот метод является в принципе неправильным и дает лишь весьма приблизительную информацию о процессе ингибирования мультисубстратной реакции. Теоретически правильный подход, однако, приводит к таким сложным соотноше-

ниям, что их трудно использовать на практике и из-за их сложности экспериментальная ошибка столь велика, что после всех преобразований этот метод не является более предпочтительным, чем обсужденный выше ошибочный экспериментальный метод. Необходимые сведения о сложном теоретическом методе читатель может найти в учебниках и статьях, указанных в списке литературы в конце главы.

3.12. ИЗОТОПНЫЙ ОБМЕН В ДИНАМИЧЕСКОМ РАВНОВЕСИИ КАК СПОСОБ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМА РЕАКЦИИ

Следует различать два метода. Один из них количественный кинетический метод, когда из уравнений скорости и их параметров, определенных методами формальной кинетики, можно сделать выводы о механизме реакции. Другой метод является качественным, когда, исходя из положения метки в промежуточных и конечных продуктах, полученных в присутствии изотопно меченных субстратов, можно сделать вывод о природе фермент-субстратного комплекса, образующегося в реакции, и, исходя из этих данных, о механизме реакции.

3.12.1. Количественный кинетический метод. Пусть реакция протекает с одним субстратом и одним промежуточным соединением:



Концентрация комплекса EX в равновесии является суммой концентраций EX_a и EX_b — комплексов, полученных при взаимодействии с A и B соответственно. Очевидно, что эти комплексы равновесны, и дальнейшие превращения EX не зависят от пути его образования. Все же различия становятся важными, если в реакционную смесь добавляют радиоактивно меченные A и B, делая таким образом EX_a или EX_b радиоактивно меченным.

Если в реакционную смесь добавить изотопно меченный A и пренебречь незначительным количеством EX_b , полученным из радиоактивного B, возникшего из радиоактивного A, то удельная активность EX равна отношению $[EX_a]/[EX_b]$, умноженному на удельную активность A. В равновесии скорость, с которой добавленный A превращается в B или добавленный B превращается в A (при пренебрежимо малых превращениях $A \rightarrow B$ и $B \rightarrow A$), равна

$$R = k_{-2}[EX_a] = k_{-1}[EX_b] \quad (1028)$$

$$\text{откуда } [EX_a]/[EX_b] = k_{-1}/k_{-2} \quad (\text{ср. (198)}) \quad (1029)$$

Константа равновесия:

$$K_1 = [E][A]/([EX_a] + [EX_b]) \quad (1030)$$

Максимальная скорость

$$\begin{aligned} V &= k_{-2}[E]_T = k_{-2}([E] + [EX_a] + [EX_b]) = \\ &= k_{-2}[EX_a](1 + k_{-2}/k_{-1})(1 + K_1/[A]) \end{aligned} \quad (1031)$$

Подстановка дает

$$R = V/(1 + k_{-2}/k_{-1})(1 + K_1/[A]) \quad (1032)$$

Вводим обычные константы Михаэлиса и равновесия:

$$K_A = (k_{-1} + k_{-2})/k_1, \quad K_B = (k_{-1} + k_{-2})/k_2 \quad (1033, 1034)$$

$$[B]/[A] = k_1 k_{-2}/k_{-1} k_2, \text{ так что } K_A[B]/K_B[A] = k_{-2}/k_{-1} \quad (1035, 1036)$$

Подставляя (1036) в (1032), получаем

$$R = V/(1 + K_A[B]/K_B[A])(1 + K_1/[A]) \quad (1037)$$

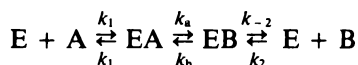
Так как V , K_A и K_B можно определить в независимых экспериментах, а $[A]$ и $[B]$ — известные величины, то определяя величину R при данном $[A]$, можно вычислить K_1 . Из известных соотношений очевидно, что

$$R/V_f = [EX_a]/[E]_T, \quad R/V_r = [EX_b]/[E]_T \quad (1038, 1039)$$

(f и r — индексы для обозначения прямой и обратной реакции соответственно.)

Исходя из этого, зная K_1 и R , получаем два уравнения для определения неизвестных $[EX_a]$ и $[EX_b]$.

Если во время реакции образуются два бинарных комплекса, то имеем следующую схему:

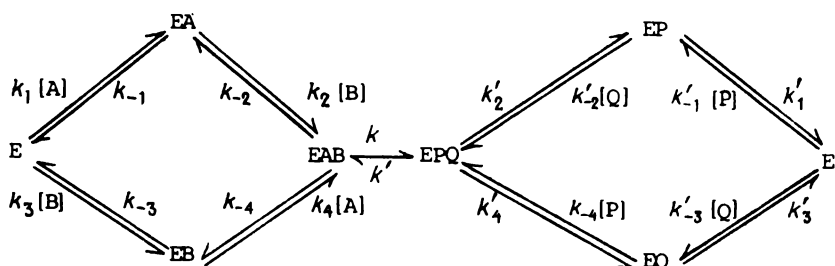


Аналогичные рассуждения и преобразования приводят к уравнению

$$\begin{aligned} R &= V[1 + (k_{-2} + k_b)/k_a]/\{[1 + (k_{-2}k_{-1} + \\ &+ k_{-2}k_a)/k_{-1}k_b][1 + k_b/k_a + K_2/[B]]\} \end{aligned} \quad (1040)$$

Таким образом, измеряя скорость изотопного обмена в фазе динамического равновесия, можно отличить два механизма друг от друга.

Этот метод удобно применять для определения механизма двух-субстратных реакций. Для неупорядоченного би-би-механизма после добавления радиоактивного субстрата А к смеси и установления равновесия можно измерить наличие изотопной метки в продукте. Допустим, мы исследуем механизм



Основываясь на рассмотрении, подробно описанном ранее, можно записать:

$$[EA] = [EA]_a + [EA]_p \quad (1041)$$

$$[EAB] = [EAB]_a + [EAB]_p \quad (1042)$$

$$[EPQ] = [EPQ]_a + [EPQ]_p \quad (1043)$$

$$[EP] = [EP]_a + [EP]_p \quad (1044)$$

Скорость обмена (R) между А и Р в равновесии равна

$$R = k'_4[EPQ]_a + k'_1[EP]_a = k_{-4}[EAB]_p + k_{-1}[EA]_p \quad (1045)$$

$$R = k[EAB]_a - k'[EPQ]_a = k'[EPQ]_p - k[EAB]_p \quad (1046)$$

$$[E]_T = [E] + [EA] + [EB] + [EAB] + [EPQ] + [EP] + [EQ] \quad (1047)$$

Используя выражение для констант диссоциации комплексов, уравнение (1047) можно представить в виде

$$[E]_T = [EPQ](1 + k'/k + k'K_2/k[B] + k'K_4/k[A] + k'K_1K_2/k[A][B] + K'_2/[Q] + K'_4/[P]) \quad (1048)$$

При условии состояния равновесия имеем

$$d[EP]_a/dt = 0 = k'_2[EPQ]_a - (k' + k'_{-2}[Q])[EP]_a \quad (1049)$$

и, таким образом,

$$[EP]_a = k'_2[EPQ]_a/(k' + k'_{-2}[Q]) \quad (1050)$$

Подставляя (1050) в (1045), получаем

$$[EPQ]_a = R(k'_1 + k'_{-2}[Q])/[k'_1 k'_2 + k'_4(k'_1 + k'_{-2}[Q])] \quad (1051)$$

Аналогично

$$d[EA]_p/dt = 0 = k_{-2}[EAB]_p - (k_{-1} + k_2[B])[EA]_p \quad (1052)$$

$$[EA]_p = k_{-2}[EAB]_p/(k_{-1} + k_2[B]) \quad (1053)$$

Подставляя (1053) в (1046), получаем

$$[EAB]_p = R(k_{-1} + k_2[B])/[k_{-1}k_{-2} + (k_{-1} + k_2[B])k_{-4}] \quad (1054)$$

$$[EPQ]_p = R\{1 + k(k_{-1} + k_2[B])/[k_{-1}k_{-2} + k_{-4}(k_{-1} + k_2[B])]\}(1/k') \quad (1055)$$

Так как $[EPQ] = [EPQ]_a + [EPQ]_p$, подстановка (1051) и (1054) в (1048) дает

$$R = [E]_T / \{ [1 + k(k_{-1} + k_2[B])/[k_{-1}k_{-2} + k_{-4}(k_{-1} + k_2[B])]] + k'(k'_1 + k'_{-2}[Q])/[k'_1 k'_2 + k'_4(k'_1 + k'_{-2}[Q])]] [(1/k)(1 + K_2/[B] + K_4/[A] + K_1 K_2/[A][B]) + (1/k')(1 + K'_2/[Q] + K'_4/[P])] \} \quad (1056)$$

Скорость обмена между А и Q

$$R' = [E]_T / \{ [1 + k(k_{-3} + k_4[A])/[k_{-3}k_{-4} + k_{-2}(k_{-3} + k_4[A])]] + k'(k'_3 + k'_{-4}[P])/[k'_4 k'_3 + k'_2(k'_3 + k'_{-4}[P])]] [(1/k)(1 + K_2/[B] + K_4/[A] + K_1 K_2/[A][B]) + (1/k')(1 + K'_2/[Q] + K'_4/[P])] \} \quad (1057)$$

Для строго упорядоченных механизмов скорость обмена $A \rightleftharpoons P$ и $B \rightleftharpoons Q$ можно получить непосредственно из (1056) и (1057), если K_4 , K'_4 , k_{-4} , k'_{-4} и K_4 , K'_4 , k_{-3} и k'_{-3} равны нулю.

Эти уравнения дают возможность разделить различные механизмы с использованием приведенного метода так, как это сделано для простых односубстратных реакций. Очевидно, что не только уравнения, но и требуемые эксперименты будут сложнее двух субстратных реакций.

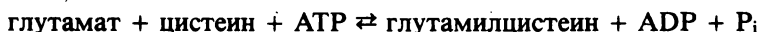
Количественный анализ становится удивительно простым, если использовать изучение соотношения потоков. Если один из продуктов двухсубстратной реакции добавляется к реакционной смеси в виде радиоактивного меченого соединения, то можно определить скорость, с которой метка переносится с продукта Р на субстрат А (поток от Р к А, или короче $F(P \rightarrow A)$). Аналогично можно измерить скорость превращения изотопно меченого Р в субстрат В, т. е. поток от Р к В ($F(P \rightarrow B)$). Проанализируем влияние изменения концентрации субстрата на соотношение $F(P \rightarrow A)/F(P \rightarrow B)$. Для стро-

го упорядоченного механизма соотношение потоков не зависит от [A], но является линейной функцией [B]. В случае неупорядоченного механизма график зависимости соотношения потоков от концентраций любого субстрата имеет вид кривой с насыщением.

Для определения механизма мультисубстратных реакций относительно просто можно использовать качественный изотопный метод, т. е., используя меченный субстрат, промежуточное соединение или продукт, можно охарактеризовать природу получающихся в процессе реакции комплексов и получить информацию о механизме реакции.

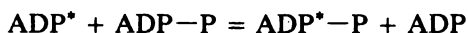
3.12.2. Качественный изотопный метод. Применение этого метода можно продемонстрировать на примере исследования механизма трехсубстратных ферментативных реакций.

Глутамилцистеинсинтетаза (КФ 6.3.2.2) катализирует следующую реакцию:



Было обнаружено, что параллельно основной реакции фермент катализирует также нижеперечисленные реакции а—г.

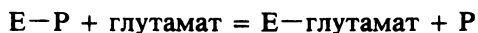
а) Обменная реакция



Эта реакция доказывает, что фермент способен образовывать комплексы типа E—P, так как вышеприведенная реакция может протекать только следующим образом:

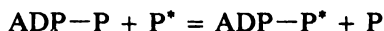


Последняя реакция ингибируется глутаматом по следующему пути:

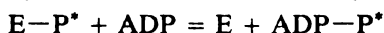
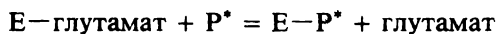
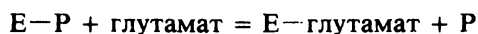
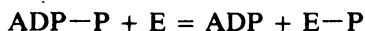


и таким образом комплекс E—P, реагирующий с ADP, распадается.

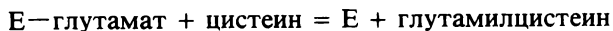
б) Обмен фосфата только в присутствии глутамата



В этом случае необходимо рассмотреть такую последовательность реакций:

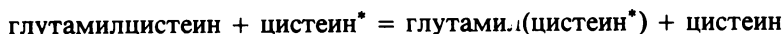


Реакция ингибируется цистеином по следующему пути:

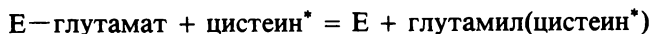
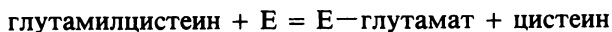


и, таким образом, комплекс $E\text{—}глутамат$ распадается до взаимодействия с фосфатом.

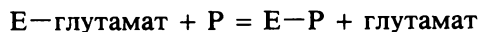
в) Обмен цистеина по реакции



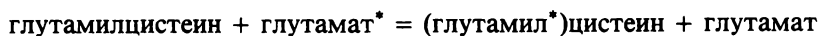
Это доказывает существование следующих процессов:



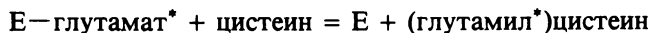
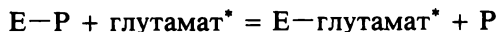
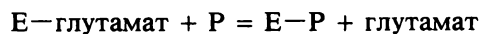
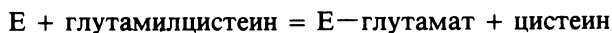
Эта реакция ингибируется фосфатом, так как он разрушает комплекс $E\text{—}глутамат$:



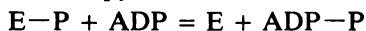
г) Обмен глутамата только в присутствии фосфата.



Это указывает на наличие следующих реакций:

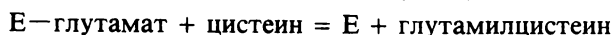
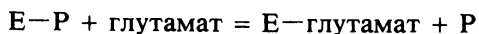
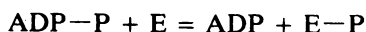


Эта серия реакций ингибируется ADP:



разрушая таким образом эффективный комплекс $E\text{—}P$.

Эти реакции доказывают, что фермент способен образовывать комплекс фермент—фосфат, используя концевой фосфат от АТФ или неорганический фосфат, но последний не включается, если только фермент не связывается с глутаматом. Фермент-фосфатный комплекс реагирует с глутаматом, приводя к образованию комплекса фермент—глутамат, и только этот комплекс обладает активностью в присутствии цистеина. Имея в руках эти данные, можно с определенностью указать точный механизм действия глутамилцистеинсинтетазы:



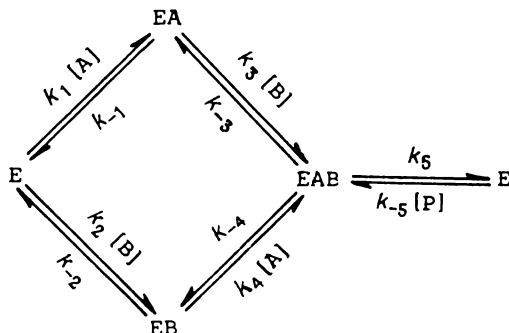
Очевидно, что этот метод может быть применен, только если индивидуальные компоненты легко выделить из равновесной реакционной смеси и проанализировать по радиоактивности. В последнем случае метод дает ценное средство для выяснения механизмов сложных мультисубстратных реакций.

3.13. Методы графов для получения уравнения скорости

а) *Метод Кинга и Альтмана.* Много различных уравнений скорости, описывающих двух- и мультисубстратные реакции, было получено на основании стационарного приближения при использовании длинного и сложного способа одновременного решения уравнений, описывающих элементарные стадии. Решение систем уравнений с помощью определителей было введено в ферментативную кинетику Кингом и Альтманом, что значительно упростило численные расчеты. Тем не менее достигаемое упрощение относительно, так как, например, для случая двухсубстратной реакции, подчиняющейся общему механизму и условию стационарности, для получения уравнения скорости реакции в обоих направлениях необходимо решить восемь определителей восьмого порядка.

Чтобы упростить эту сложную картину, Кинг и Альтман использовали метод графов для получения определителей и вывели правила графического решения, что значительно упростило метод с технической точки зрения. В результате можно вычислить уравнение скорости (в обоих направлениях) для реакции с таким сложным механизмом. Метод можно также использовать для трех- и четырехсубстратных реакций.

В качестве примера приведен относительно простой механизм, который является двухсубстратным неупорядоченным только в направлении слева направо (см. схему реакции), но односубстратным в противоположном направлении:



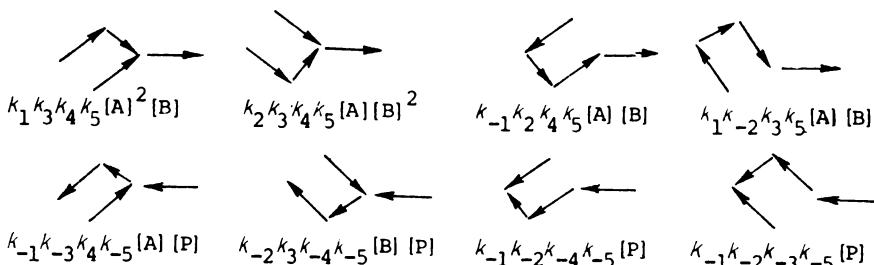
Для получения уравнения скорости следует нанести на схему константы скорости, а также стрелки, представляющие произведение константы скорости и концентрации соответствующего субстрата, согласно определенным правилам. Для определения числителя в уравнении скорости эти правила таковы:

1. Из каждого ферментного комплекса и свободного фермента должна начинаться одна и только одна стрелка.

2. Стрелки не должны образовывать замкнутого кольца.

3. Для любой комбинации стрелок одна стадия должна протекать только в одном направлении. В противоположном направлении она может участвовать только в другой комбинации стрелок. Таким образом для n однонаправленных стадий следует построить все комбинации $(n - 1)$ стрелок.

По этим правилам можно получить 8 различных комбинаций стрелок, причем первые 4 соответствуют реакции в направлении слева направо, а вторые 4 — справа налево:



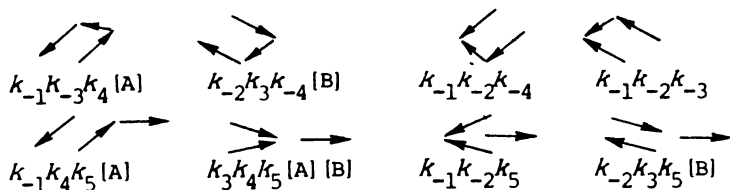
Множители в уравнении скорости, относящиеся к субстратам или продуктам, сопровождаются положительными или отрицательными знаками соответственно.

Чтобы вычислить знаменатель, следует описать все нециклические комбинации стрелок, которые содержат на одну стрелку меньше, чем в числителе. Правила для вычисления такие же, как и для числителя, но кроме того есть дополнительное правило:

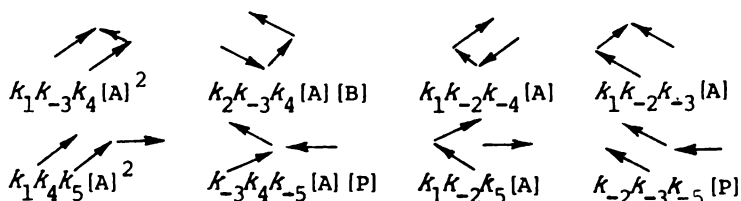
4. Всегда имеется только один тип ферментного комплекса (или сам свободный фермент), из которого стрелки не начинаются, и в случае n однонаправленных стадий следует составить комбинации из $(n - 2)$ стрелок.

Придерживаясь этих правил, можно получить 32 комбинации стрелок: по 8 оканчивающихся на E, EB, EA и EAB.

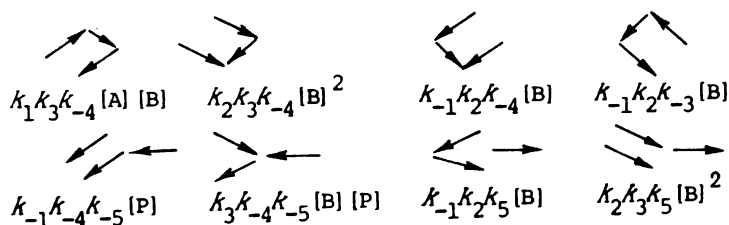
Комбинации стрелок, оканчивающихся на E:



Комбинации стрелок, оканчивающиеся на EA:



Комбинации стрелок, оканчивающиеся на EB:



Комбинации стрелок, оканчивающиеся на EAB:

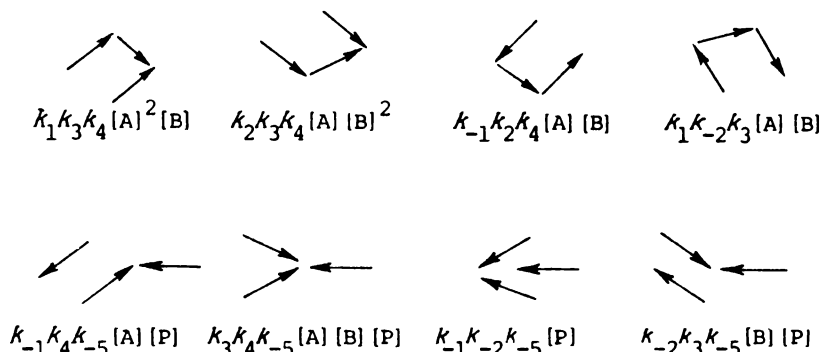


Таблица XXVII. Величины констант в уравнении скорости

Константа	Константы скорости
c_1	$k_1k_{-2}k_3k_5 + k_{-1}k_2k_4k_5$
c_2	$k_1k_3k_4k_5$
c_3	$k_2k_3k_4k_5$
c_4	$k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-5} + k_{-1}k_{-2}k_{-4}k_{-5}$
c_5	$k_{-1}k_{-3}k_4k_{-5}$
c_6	$k_{-2}k_3k_{-4}k_{-5}$
c_7	$k_{-1}k_{-2}k_{-3} + k_{-1}k_{-2}k_{-4} + k_{-1}k_{-2}k_5$
c_8	$k_1k_{-2}k_{-3} + k_1k_{-2}k_{-4} + k_1k_{-2}k_5 + k_{-1}k_{-3}k_4 + k_{-1}k_4k_5$
c_9	$k_{-1}k_2k_{-3} + k_{-1}k_2k_{-4} + k_{-1}k_2k_5 + k_{-2}k_3k_{-4} + k_{-2}k_3k_5$
c_{10}	$k_1k_{-2}k_3 + k_{-1}k_2k_4 + k_1k_3k_{-4} + k_2k_{-3}k_4 + k_3k_4k_5$
c_{11}	$k_1k_{-3}k_4 + k_1k_4k_5$
c_{12}	$k_2k_3k_{-4} + k_2k_3k_5$
c_{13}	$k_1k_3k_4$
c_{14}	$k_2k_3k_4$
c_{15}	$k_{-1}k_{-2}k_{-5} + k_{-1}k_{-4}k_{-5} + k_{-2}k_{-3}k_{-5}$
c_{16}	$k_{-1}k_4k_{-5} + k_{-3}k_4k_{-5}$
c_{17}	$k_{-2}k_3k_{-5} + k_3k_{-4}k_{-5}$
c_{18}	$k_3k_4k_{-5}$

Уравнение, описывающее скорость всей реакции, имеет вид:

$$\begin{aligned}
 v = & (c_1[A][B] + c_2[A]^2[B] + c_3[A][B]^2 - c_4[P] - \\
 & - c_5[A][P] - c_6[B][P]) \times [E]_T / (c_7 + c_8[A] + \\
 & + c_9[B] + c_{10}[A][B] + c_{11}[A]^2 + c_{12}[B]^2 + \\
 & + c_{13}[A]^2[B] + c_{14}[A][B]^2 + c_{15}[P] + \\
 & + c_{16}[A][P] + c_{17}[B][P] + c_{18}[A][B][P])
 \end{aligned} \quad (1058)$$

Константы суммированы в табл. XXVII.

Из этого общего уравнения можно получить уравнение начальной скорости реакции в направлении слева направо или обратной, приравнявая члены, содержащие P или A , B соответственно, нулю. В последнем случае, так как это обычная односубстратная реакция, получается уравнение, соответствующее уравнению Бриггса—Холдейна, где

$$V = c_4[E]_T / c_{15} \quad \text{и} \quad K_M = c_7 / c_{15}$$

При рассмотрении уравнения, описывающего начальную скорость реакции в направлении слева направо (по схеме), становится ясно, что оно содержит квадратичные члены, поэтому, как уже отмечалось несколько раз, двухсубстратная неупорядоченная реакция в стационарном состоянии не приводит к линеаризуемому уравнению типа Михаэлиса—Ментен.

Если аналогично для другой двухсубстратной реакции надо проверить зависимость скорости реакции от концентрации субстратов, то необходимо поддерживать концентрацию одного из субстратов постоянной и определять кривую насыщения для другого субстрата. Возникает, однако, проблема, что соотношение, полученное таким путем, будет совершенно отличаться от соотношения, характеризующего упорядоченный механизм или приближение быстрого равновесия. Если, например, B поддерживать постоянным, то начальную скорость реакции в направлении слева направо можно записать следующим образом:

$$v_{0f} = (a[A] + b[A]^2)/(d + e[A] + f[A]^2) \quad (1059)$$

где

$$\begin{aligned} a &= (c_1[B] + c_3[B]^2)[E]_T, & b &= c_2[B][E]_T \\ d &= c_7 + c_9[B] + c_{12}[B]^2, & e &= c_8 + c_{10}[B] + c_{14}[B]^2 \\ f &= c_{11} + c_{13}[B] \end{aligned}$$

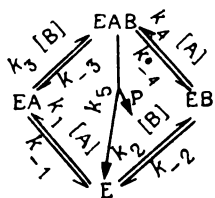
Форма зависимости начальной скорости от $[A]$ определяется соотношениями констант в уравнении. Можно получить четыре типа кривых; ни один из них не является гиперболическим, причем два характерны для активации избытком субстрата, а два других имеют вид ингибирования избытком субстрата, и это также свидетельствует о том, что ингибирование и активация субстратом присущи двухсубстратной реакции со строго упорядоченным механизмом, подчиняющейся стационарной кинетике.

Во всех случаях обязательно $bd > 0$ и $ad > 0$, так как в противном случае некоторые из констант скорости должны быть отрицательными, что не имеет смысла с физико-химической точки зрения. Поэтому вышеприведенная формула в таких случаях не может быть интерпретирована даже математически.

Рис. 75,а показывает зависимости при $be > af$ и $ae > bd$, рис. 75,б — при $be > af$ и $bd > ae$, рис. 75,в — при $af > be$ и $ae > bd$ и рис. 75,г — при $af > be$ и $bd > ae$.

б) Дальнейшее упрощение рассмотренного графического метода предложено *Волькенштейном* и *Гольдштейном*.

Запишем схему реакции:



которую можно графически представить просто как \diamond .

Для решения уравнения следует графически решить четыре определителя, применяя следующие правила.

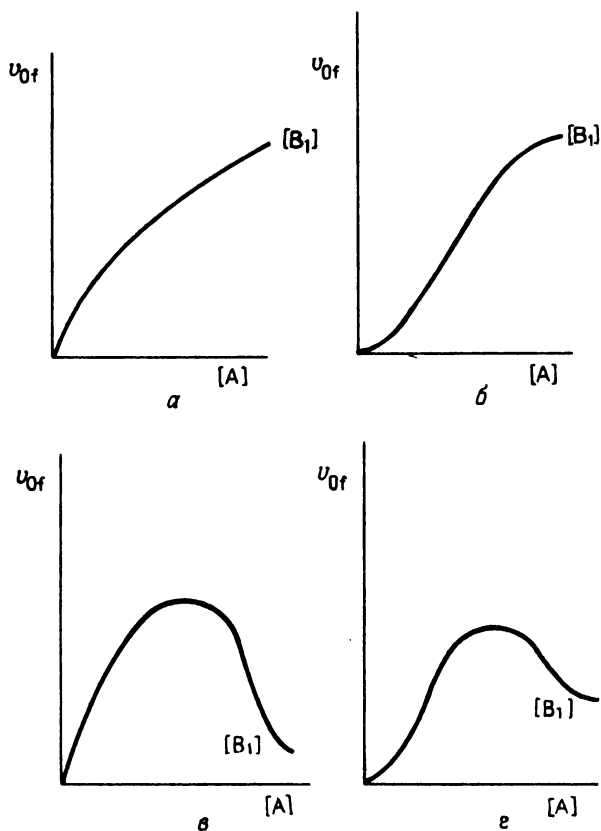
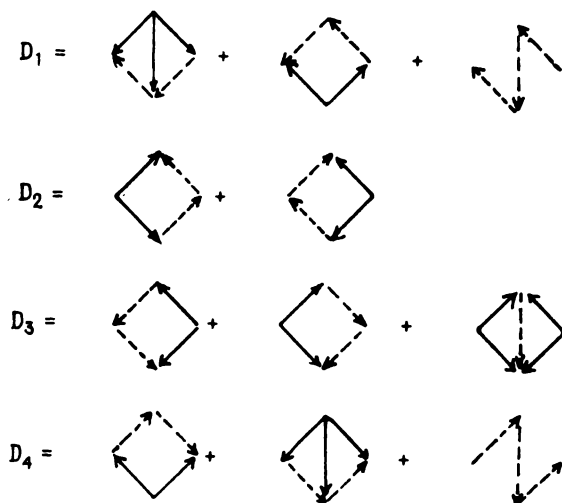


Рис. 75. Кривые насыщения для неупорядоченной би-би-реакции при постоянной концентрации В.

Для всех определителей следует выбрать одну точку, в которой кончается каждая стрелка. Пусть это будет D_1 для EA, D_2 для EAB, D_3 для E и D_4 для EB. Выберем вспомогательную точку, находящуюся в наибольшем отдалении от точки окончания стрелок. Из этой точки начертим прерывистые линии так, чтобы они прошли все возможные пути до выбранной точки. Каждый из определителей будет иметь столько членов, сколько имеется путей. Отметим незанятые пути сплошными стрелками, направленными в точки начала и окончания и по крайней мере парами исходящими из идентичных точек.



Решение будет следующим: умножить константу скорости, обозначенную прерывистой линией (или произведение константы скорости и концентрации субстрата), на другую прерывистую стрелку, а результат вновь умножить на сумму сплошных стрелок. Получатся следующие численные значения для четырех определителей:

$$D_1 = k_{-2}k_1[A](k_{-3} + k_5 + k_{-4}) + k_{-3}k_4[A](k_1[A] + k_2[B]) + k_1k_4k_5[A]^2 \quad (1060)$$

$$D_2 = k_2[B]k_4[A](k_{-1} + k_3[B]) + k_1[A]k_3[B](k_{-2} + k_4[A]) \quad (1061)$$

$$D_3 = k_{-1}k_{-3}(k_4[A] + k_{-2}) + k_{-2}k_{-4}(k_3[B] + k_{-1}) + k_5(k_3[B] + k_{-1})(k_4[A] + k_{-2}) \quad (1062)$$

$$D_4 = k_{-4}k_3[B](k_1[A] + k_2[B]) + k_{-1}k_2[B](k_{-3} + k_5 + k_{-4}) + k_2k_3k_5[B]^2 \quad (1063)$$

Уравнение, описывающее начальную скорость двухсубстратной реакции в направлении слева направо, имеет вид

$$v_0 = k_3 D_2 [E]_T / (D_1 + D_2 + D_3 + D_4) \quad (1064)$$

Подставляя определители (1060)—(1063) в (1064) и выделяя члены, относящиеся к одному субстрату, получаем формулу

$$v_0 = (c_1 [A][B] + c_2 [A]^2 [B] + c_3 [A][B]^2) [E]_T / (c_7 + c_8 [A] + c_9 [B] + c_{10} [A][B] + c_{11} [A]^2 + c_{12} [B]^2 + c_{13} [A]^2 [B] + c_{14} [A][B]^2) \quad (1065)$$

где c_i — константы, вычисленные при решении уравнения Кинга—Альтмана и представленные в табл. XXVII.

Все вышеприведенные методы можно использовать для определения уравнений скорости так называемых циклических реакций, т. е. реакций, механизм которых может быть записан в виде замкнутого цикла.

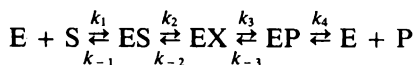
в) Однако метод графов используют не только для циклических реакций. Для нециклических реакций правила применения метода графов следующие:

1. Числитель представляет собой произведение константы скорости образования продукта, общей концентрации фермента и всех констант скорости (или произведений скорости и концентрации вещества), представленных стрелками, заканчивающимися на фермент-субстратном комплексе, дающем конечный продукт.

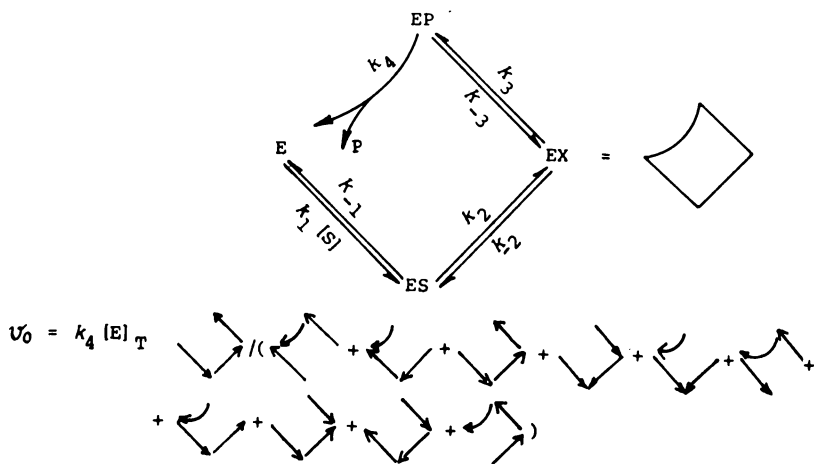
2. Знаменатель является суммой произведений всех констант скорости, представленных стрелками, которые кончаются на свободном ферменте или на каком-либо фермент-субстратном комплексе. Параллельные стрелки (например, \rightleftharpoons) обозначаются суммой соответствующих констант скоростей.

3. Число стрелок, которые необходимо использовать для вычисления числителя или знаменателя, определяется числом элементарных стадий в исследуемом механизме, за исключением стадии образования конечного продукта. (С этой точки зрения параллельные стрелки можно рассматривать как одну стрелку.)

Применяя эти правила, графически легко получить уравнение, описывающее любой нециклический механизм. Например, реакция



в графическом представлении имеет следующий вид:



и, таким образом,

$$v_0 = k_4 [E]_T k_1 k_2 k_3 [S] / (k_{-1} k_{-3} k_4 + k_{-2} k_{-1} k_4 + k_1 k_2 k_3 [S] + k_1 k_{-2} k_{-3} [S] + k_1 k_{-2} k_4 [S] + k_1 k_3 k_4 [S] + k_1 k_2 k_4 [S] + k_1 k_2 k_{-3} [S] + k_{-1} k_{-2} k_{-3} + k_2 k_3 k_4) \quad (1066)$$

Из этого уравнения следует, что реакция подчиняется схеме Бриггса—Холдейна и

$$V = k_4 [E]_T k_2 k_3 / (k_2 k_3 + k_{-2} k_{-3} + k_{-2} k_4 + k_3 k_4 + k_2 k_4 + k_2 k_{-3}) \quad (1067)$$

$$K_M = [k_{-1}(k_{-3} k_4 + k_{-2} k_4 + k_{-2} k_{-3}) + k_2 k_3 k_4] / k_1 (k_2 k_3 + k_{-2} k_{-3} + k_{-2} k_4 + k_3 k_4 + k_2 k_4 + k_2 k_{-3}) \quad (1068)$$

3.14. ПРИЛОЖЕНИЕ

3.14.1. Решение линейных дифференциальных уравнений первого порядка. Система уравнений (1а) называется *системой неоднородных линейных дифференциальных уравнений первого порядка с постоянными коэффициентами*:

$$\begin{aligned} dy/dx + a_1 y + b_1 z &= f_1(x) \\ dz/dy + a_2 y + b_2 z &= f_2(x) \end{aligned} \quad (1a)$$

где $y = y(x)$ и $z = z(x)$ — неизвестные, $f_1(x)$ и $f_2(x)$ — известные функции и a_1 , b_1 , a_2 и b_2 — константы.

Если $f_1(x) = 0$ и $f_2(x) = 0$, имеем систему *однородных дифференциальных уравнений первого порядка*:

$$\begin{aligned} dY/dx + a_1 Y + b_1 Z &= 0 \\ dZ/dx + a_2 Y + b_2 Z &= 0 \end{aligned} \quad (2a)$$

Если постоянные коэффициенты систем уравнений (1a) и (2a) одинаковы, систему (2a) называют *системой однородных линейных дифференциальных уравнений, соответствующей однородной системе (1a)*.

Ищем *частное решение* системы (2a). Частное решение представляет собой функцию, которая удовлетворяет дифференциальному уравнению, но, либо вовсе не содержит параметров, либо содержит параметры, число которых по крайней мере на один меньше, чем порядок дифференциального уравнения. Частное решение можно искать в следующем виде:

$$Y = ce^{kx} \quad \text{и} \quad Z = de^{kx} \quad (3a)$$

c , d и k такие, чтобы удовлетворить системе (2a). После подстановки (3a) и их производных

$$Y' = cke^{kx} \quad \text{и} \quad Z' = dke^{kx} \quad (4a)$$

в систему (2a) и затем после сокращения и перегруппировки получаем

$$\begin{aligned} (a_1 + k)c + b_1 d &= 0 \\ a_2 c + (b_2 + k)d &= 0 \end{aligned} \quad (5a)$$

(5a) — система *линейных однородных дифференциальных уравнений* по отношению к c и d . Она имеет решение, отличное от тривиального $c = d = 0$, только если k -зависимый определитель равен нулю, т. е.

$$\begin{vmatrix} a_1 + k & b_1 \\ a_2 & b_2 + k \end{vmatrix} = 0 \quad (6a)$$

Раскрыв определитель, получаем характеристическое уравнение

$$k^2 + (a_1 + b_2)k + (a_1 b_2 - a_2 b_1) = 0 \quad (7a)$$

В этом частном примере *характеристическое уравнение* является квадратичным и, таким образом, имеет два корня (в разд. 2.9 их обозначили λ). Корни характеристического уравнения называются *собственными значениями матрицы*.

а) Если оба корня действительны, подстановка в (5a) дает

решения

$$\begin{aligned} Y_1 &= c_1 e^{k_1 x}, & Z_1 &= d_1 e^{k_1 x} \\ Y_2 &= c_2 e^{k_2 x}, & Z_2 &= d_2 e^{k_2 x} \end{aligned} \quad (8a)$$

б) Если корни являются комплексными величинами, решение имеет вид

$$\begin{aligned} Y_1 &= c e^{(a + bi)x}, & Z_1 &= d_1 e^{(a + bi)x} \\ Y_2 &= c_2 e^{(a - bi)x}, & Z_2 &= d_2 e^{(a - bi)x} \end{aligned} \quad (9a)$$

в) Если корни равны, получаем

$$Y = e^{k'x}(A_1 + B_1 x), \quad Z = e^{k'x}(A_2 + B_2 x) \quad (10a)$$

Общее решение дается линейной комбинацией частных решений:

$$Y = \alpha_1 Y_1 + \alpha_2 Y_2, \quad Z = \beta_1 Z_1 + \beta_2 Z_2 \quad (11a)$$

Общее решение системы однородных дифференциальных уравнений представляет собой линейную комбинацию частного решения системы однородных дифференциальных уравнений и общего решения соответствующей системы однородных дифференциальных уравнений.

3.14.2. Метод наименьших квадратов. Функциональная связь между измеряемыми параметрами может быть известна, или можно принять приближительную функциональную связь между ними. Пусть эта функция имеет вид

$$y = f(x, \vec{a}) \quad (12a)$$

где y и x — измеряемые параметры, а \vec{a} — вектор, состоящий из параметров a_1, a_2, \dots, a_n , которые необходимо определить. Если x и y — функционально связанные величины, то величины определяемых параметров подбираются так, чтобы наилучшим образом удовлетворялось соотношение

$$y_i = f(x_i, \vec{a}) \quad (13a)$$

для любых $i = 1, 2, \dots, n$.

Условие наилучшего соответствия следующее:

$$Q(a) = \sum_{i=1}^m [y_i - f(x_i, \vec{a})]^2 / s_i = \min \quad (14a)$$

и $m > n$, т.е. число измерений (m) должно превышать число пара-

метров (n), s_i — весовой множитель (обычно дисперсия величины y_i).

Рассмотрим простой пример серии измерений:

y	5	8	9	10
x	1	2	3	4

Предположим, что функция может быть аппроксимирована прямой линией, т.е. $y = ax + b$.

В первую очередь вычисляем коэффициент корреляции

$$r = [(1/N) \sum xy - \bar{x}\bar{y}] / \sigma_x \sigma_y \quad (15a)$$

где N — число пар $x - y$; σ_x и σ_y — стандартные отклонения x и y .

x	y	xy	x^2	y^2
1	5	5	1	25
2	8	16	4	64
3	9	27	9	81
4	10	40	16	100
Σ	10	32	88	270

$$\bar{x} = 10/4 = 2,5, \quad \bar{y} = 32/4 = 8, \quad \bar{x}\bar{y} = 20, \quad (1/N) \sum xy = 88/4 = 22$$

Значения дисперсий равны

$$\begin{aligned} \sigma_x^2 &= (1/N) \sum x^2 - \bar{x}^2 = 30/4 - 2,5^2 = 1,25, \quad \sigma_x = 1,12 \\ \sigma_y^2 &= (1/N) \sum y^2 - \bar{y}^2 = 270/4 - 64 = 3,5, \quad \sigma_y = 1,87 \\ r &= (22 - 20) / 1,12 \cdot 1,87 = 0,957 \end{aligned}$$

Используя найденный коэффициент корреляции, получаем уравнение регрессии для y относительно x :

$$\begin{aligned} y - \bar{y} &= r(\sigma_y / \sigma_x)(x - \bar{x}) \\ y - 8 &= 0,957(1,87/1,12)(x - 2,5) \end{aligned} \quad (16a)$$

и, таким образом:

$$y = 1,6x + 4$$

Стандартное отклонение оценки (estimate) определяется выражением

$$\sigma_y \sqrt{1 - r^2} \quad (17a)$$

и составляет $1,87 \sqrt{(1 - 0,957^2)} = 0,54$.

Метод наименьших квадратов может быть аналогично использован для любой другой функции. Для более сложного случая нелинейных функций или наличия большого числа экспериментальных точек предпочтительнее использовать метод компьютерной итерации.

3.14.3. Определение начальной скорости ферментативной реакции.

Точность определения начальной скорости имеет решающее влияние на точность всех вычислений, использующих этот параметр. Чем лучше (по накоплению продукта или расходу субстрата) выбран временной интервал, при котором $d[ES]/dt = 0$, тем точнее будет оценка начальной скорости. Однако в некоторых случаях выбор указанного временного интервала связан с большими трудностями. Чем быстрее реакция, тем затруднительнее непосредственное измерение истинной начальной скорости. Это особенно существенно при регистрации «кривых насыщения» для субстратов при низких концентрациях последнего (см. разд. 3.2.1.1 и рис. 36).

Относительно точное определение начальной скорости обеспечивается *интерполяционным методом Грегори—Ньютона*. Концентрацию образующегося продукта y_i в момент времени t_i следует определить в возможно более широком интервале времени. Из соответствующих пар значений конструируется следующая система:

t	y	Δy	$\Delta^2 y$	$\Delta^3 y$	$\Delta^4 y$
t_0	y_0				
		$\Delta y_0 = y_1 - y_0$			
t_1	y_1		$\Delta^2 y_0 = \Delta y_1 - \Delta y_0$		
		$\Delta y_1 = y_2 - y_1$		$\Delta^3 y_0 = \Delta^2 y_1 - \Delta^2 y_0$	
t_2	y_2		$\Delta^2 y_1 = \Delta y_2 - \Delta y_1$		$\Delta^4 y_0 = \Delta^3 y_1 - \Delta^3 y_0$
		$\Delta y_2 = y_3 - y_2$		$\Delta^3 y_1 = \Delta^2 y_2 - \Delta^2 y_1$	
t_3	y_3		$\Delta^2 y_2 = \Delta y_3 - \Delta y_2$		
		$\Delta y_3 = y_4 - y_3$			
t_4	y_4				

Проводя измерения через равные промежутки времени $t_1 - t_0 = t_2 - t_1 = \dots = t_n - t_{n-1} = \Delta t$, получаем

$$\begin{aligned}
 y = & (\Delta y_0 / \Delta t)t + [\Delta^2 y_0 / 2!(\Delta t)^2]t(t - t_1) + \\
 & + [\Delta^3 y_0 / 3!(\Delta t)^3]t(t - t_1)(t - t_2) + \dots \\
 & \dots + [\Delta^n y_0 / n!(\Delta t)^n]t(t - t_1)(t - t_2) \dots (t - t_{n-1})
 \end{aligned} \quad (18a)$$

Производная (18a) при $t = 0$ дает следующее выражение для на-

чальной скорости реакции:

$$v_0 = \Delta y_0 / \Delta t - [\Delta^2 y_0 / 2! (\Delta t)^2] t_1 + [\Delta^3 y_0 / 3! (\Delta t)^3] t_1 t_2 - [\Delta^4 y_0 / 4! (\Delta t)^4] t_1 t_2 t_3 \quad (19a)$$

Для неравных промежутков времени

$$v_0 = y(t_1, t_0) - t_2 y(t_2, t_1, t_0) + t_1 t_2 y(t_3, t_2, t_1, t_0) - t_1 t_2 t_3 y(t_4, t_3, t_2, t_1, t_0) \quad (20a)$$

где

$$\begin{aligned} y(t_1, t_0) &= [y(t_1) - y(t_0)] / (t_1 - t_0) \\ y(t_2, t_1) &= [y(t_2) - y(t_1)] / (t_2 - t_1) \\ y(t_2, t_1, t_0) &= [y(t_2, t_1) - y(t_1, t_0)] / (t_2 - t_1) \\ y(t_3, t_2, t_1) &= [y(t_3, t_2) - y(t_2, t_1)] / (t_3 - t_1) \\ y(t_3, t_2, t_1, t_0) &= [y(t_3, t_2, t_1) - y(t_2, t_1, t_0)] / (t_3 - t_0) \end{aligned}$$

При необходимости точных измерений, без сомнения, следует использовать рассмотренный метод.

3.14.3. Метод складного ножа. Для определения истинных значений K_M и V_{\max} , связанных с начальной скоростью, может также быть использован полный диапазон измерений. Все экспериментальные данные (n измерений) подгоняются к уравнению скорости так, чтобы получить приближенную величину b_0 для каждого параметра (т. е. $b_0^{K_M}$ и $b_0^{V_{\max}}$ для K_M и V_{\max} соответственно). Данные разделяются на g подгрупп, каждая состоящая из h измерений; таким образом $n = gh$.

Пренебрегая i -й подгруппой экспериментальных данных, остальные подгоняют к уравнению скорости так, чтобы получить новое приближение \bar{b}_{-i} (отдельно для каждого индивидуального параметра). Натуральные логарифмы \bar{b}_{-i} следует перевести в псевдозначения \tilde{b}_i следующим образом:

$$\ln \tilde{b}_i = g \ln b_0 - (g - 1) \ln \bar{b}_{-i} \quad (21a)$$

т.е. \tilde{b}_i выбирается так, чтобы значение b_0 представляло собой геометрическое среднее между \tilde{b}_i и \bar{b}_{-i} .

Приближение «складного ножа» (jack-knife) \tilde{b}_0 представляет собой геометрическое среднее значение \tilde{b}_i (т.е. арифметическое среднее значений $\ln \tilde{b}_i$).

3.14.5. Дельта-функция Дирака. Дельта-функция Дирака — $\delta(t)$ — импульсная функция:

$$\int_a^b F(t)\delta(t)dt = \begin{cases} F(t) & \text{— если } a \leq t < b, \text{ включая нуль} \\ 0 & \text{— во всех других случаях} \end{cases}$$

где $F(t)$ — произвольная функция.

3.4.6. Теорема Маклорена (или Стирлинга). За несколькими исключениями, любая функция с одной переменной может быть представлена в виде степенного ряда:

$$f(x) = f(0) + (x/1!)f'(0) + (x^2/2!)f''(0) + \dots \quad (22a)$$

где $f(0)$, $f'(0)$, $f''(0)$ и т.д. — значения $f(x)$, $f'(x)$ и $f''(x)$ при $x = 0$ и число штрихов обозначает первую, вторую и т.д. производные по отношению к x .

3.14.7. Теорема Тейлора. Теорему Маклорена нельзя применить, если $f(0) = \pm \infty$. В этом случае выбираем функцию, которая является алгебраической суммой двух переменных: $y = f(x \pm h)$. Тогда

$$f(x \pm h) = f(x) \pm (h/1!)f'(x) + (h^2/2!)f''(x) \pm \dots \quad (23a)$$

ЛИТЕРАТУРА *

Обзоры

- Березин И.В., Клесов А.А.*, Практический курс химической и ферментативной кинетики. — М.: Изд. Московского университета, 1976.
- Корниш-Боуден А.*, Основы ферментативной кинетики. — М.: Мир, 1979.
- Диксон М., Уэбб Э.*, Ферменты. — М.: Мир, 1982.
- Endrényi L.*, (ed.), Kinetic Data Analysis, Plenum Press, New York, London, 1981.
- Engel P.*, Enzyme Kinetics, Wiley and Sons, New York, 1977.
- Feredinand W.*, The Enzyme Molecule, Wiley and Sons, London — New York — Sydney, 1976.
- Fersht A.*, Enzyme Structure and Mechanism, Freeman W.H. and Co., Reading, San Francisco, 1977.
- Fromm H.J.*, Initial Rate Enzyme Kinetics, Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin, 1975.
- Gutfreund H.*, An Introduction to the Study of Enzymes, Blackwell Sci. Publ., Oxford, 1965.
- Gutfreund H.*, Enzymes, Physical Principles, Wiley-Intersci., London, 1972.
- Hiromi K.*, Kinetics of Fast Enzyme Reactions, Kodanasha Ltd., Tokyo, 1979.
- Keleti T.*, Reaktionskinetik, Wirkungsmechanismus und aktives Zentrum. In: Strukturelle

* Ниже приведен также список дополнительной литературы, составленный редактором перевода книги Б.И. Кургановым. — Прим. ред.

Grundlagen der Biologischen Funktion der Proteine, (*Dévényi T., Elődi P., Keleti T., Szabolsci G.*) Akadémiai Kiado, Budapest, 1969, pp. 317—522.

Keleti T., Telegdi M., Batke J., The method and application of kinetic analysis in studying the mechanism of dehydrogenases. — *MTA Biol. Oszt. Közl.*, **12**, 343—380 (1970).

Keleti T., Ovádi J., Batke J., Catalysis and Enzymes. The thermodynamic and kinetic basis of enzyme regulation. — *J. Mol. Catal.*, **1**, 173—200 (1975/76).

Laider K.J., The Chemical Kinetics of Enzyme Action, Clarendon Press, Oxford, 1968.

Plowman K.M., Enzyme Kinetics, McGraw-Hill Book Comp., New York, 1972.

Reiner J.M., Behaviour of Enzyme Systems, 2nd ed. Van Nostrand Reinhold Comp., New York, 1969.

Ricard J., Cinétique et mécanismes d'action des enzymes. Doin, Paris, 1973.

Segel I.H., Enzyme Kinetics, Wiley and Sons, New York, Sydney, London, Toronto, 1975.

Варфоломеев С.Д., Зайцев С.В., Кинетические методы в биохимических исследованиях, — М.: Изд. Московского университета, 1982.

Walter C., Steady-State Applications in Enzyme Kinetics, Ronald Press, New York, 1965.

Walter C., Enzyme Kinetics, Ronald Press, New York, 1966.

Узбе Дж.Л., Ингибиторы ферментов и метаболизма. — М.: Мир, 1966.

Wong J.T.F., Kinetics of Enzyme Mechanisms, Academic Press, London, New York, San Francisco, 1975.

Яковлев В.А., Кинетика ферментативного катализа. — М.: Наука, 1965.

К разделу 3.1

Bartha F., Effect of error of the quasi-steady-state approximation on the estimation of K_M and V_{max} from a single time curve. — *J. Theor. Biol.*, **86**, 105—115 (1980).

Bocker E.A., Initial rates. — *Biochem. J.*, **203**, 117—123 (1982).

Henderson P.J.F., Steady-state enzyme kinetics with high-affinity substrates or inhibitors. — *Biochem. J.*, **135**, 101—107 (1973).

Lee H.J., Wilson I.B., Enzymatic parameters; measurement of V and K_M . — *Biochim. Biophys. Acta*, **242**, 519—522 (1971).

Waley S.G., An easy method for determination of initial rates. — *Biochem. J.*, **193**, 1009—1012 (1981).

Wharton C.W., Szawelski R.J., Half-time analysis of the integrated Michaelis equation. — *Biochem. J.*, **203**, 351—360 (1982).

К разделу 3.2

Áranyi P., Kinetics of the glucocorticoid hormone-receptor interaction. False association constants determined in slowly equilibrating systems. — *Biochim. Biophys. Acta*, **584**, 529—537 (1979).

Áranyi P., Tóth J., A full stochastic description of the Michaelis-Menten reaction for small systems. — *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, **12**, 375—388 (1977).

Bartha F., Keleti T., Kinetic analysis of interaction between two enzymes catalyzing consecutive reactions. — *Oxid. Commun.*, **1**, 75—84 (1979).

Boeynaems J.M., Cantraine F.R.L., Comparison between the kinetics of heterogeneous and sequentially co-operative binding systems. — *J. Theor. Biol.*, **83**, 447—456 (1980).

Brocklehurst K., Cornish-Bowden A., The pre-eminence of k_{cat} in manifestation of optimal enzymic activity delineated by using Briggs-Haldane two-step irreversible kinetic model. — *Biochem. J.*, **159**, 165—166 (1976).

Bryce C.F.A., Williams D.C., John R.A., Fasella P., The anomalous kinetics of coupled aspartate aminotransferase and malate dehydrogenase. Evidence for compartmentation of oxaloacetate. — *Biochem. J.*, **153**, 571—577 (1976).

Damjanovich S., Somogyi B., A molecular enzyme model based on oriented energy transfer. — *J. Theor. Biol.*, **41**, 567—569 (1973).

Dixon M., The graphical determination of K_m and K_i . — *Biochem. J.*, **129**, 197—202 (1972).

Easterby J.S., Coupled Enzyme assays; a general expression for the transient. — *Biochim. Biophys. Acta*, **293**, 552—558 (1973).

Easterby J.S., A generalized theory of the transition time for sequential enzyme reactions. — *Biochem. J.*, **199**, 155—161 (1981).

Fajsz Cs., Endrényi L., New linear plots for the separate estimation of Michaelis—Menten parameters. — *FEBS Lett.*, **44**, 240—246 (1974).

Haldane J.B.S., Stern K.G., Allgemeine Chemie der Enzyme, Steinkopf, Dresden u. Leipzig, 1932.

Hess B., Wurster B., Transient time of the pyruvate kinase-lactate dehydrogenase system of rabbit muscle in vitro. — *FEBS Lett.*, **9**, 73—77 (1970).

Heyde C.C., Heyde E., A stochastic approach to a one substrate, one product enzyme reaction in the initial velocity phase. — *J. Theor. Biol.*, **25**, 159—172 (1969).

Horiike K., McCormick D.B., Effect of ligand on chemical modification of proteins. Graphical determination of dissociation constant and number of essential residues affected by ligand binding. — *J. Theor. Biol.*, **84**, 691—708 (1980).

Huang C.Y., Determination of binding stoichiometry by the continuous variation method; the Job plot. — *Methods in Enzymology*, **87**, 509—526 (1982).

Keleti T., Data analysis from Michaelis—Menten kinetics: ins and outs. In: *Kinetic Data Analysis* (ed. *Endrényi L.*), Plenum Publ. Comp., New York, 1981, pp. 353—373.

Keleti T., A novel parameter estimation from the linearized Michaelis—Menten equation at low substrate concentration. — *Biochem. J.*, **203**, 343—344 (1982).

Klotz I.M., Number of receptor sites from Scatchard graphs: fact and fantasies. — *Science*, **217**, 1247—1249 (1982).

Klotz I.M., Hunston D.L., Properties of graphical representations of multiple classes of binding sites. — *Biochemistry*, **10**, 3065—3069 (1971).

Klotz I.M., Hunston D.L., Protein affinities for small molecules: conceptions and misconceptions. — *Arch. Biochem. Biophys.*, **193**, 314—328 (1979).

Kuchel P.W., Roberts D.V., The behavior of coupled enzyme systems in the transient and steady—state regions of the reaction. — *Biochim. Biophys. Acta*, **364**, 181—192 (1974).

Kuchel P.W., Nichol L.W., Jeffrey P.D., Steady-state kinetics of consecutive enzyme catalysed reactions involving single substrates; procedures for the interpretation of coupled assays. — *J. Theor. Biol.*, **48**, 39—49 (1974).

Marcus M., Hess B., Ottaway J.H., Cornish—Bowden A., The analysis of kinetic data in biochemistry. A critical evaluation of methods. — *FEBS Lett.*, **63**, 225—230 (1976).

McClure W.R., A kinetic analysis of coupled enzyme assays. — *Biochemistry*, **8**, 2782—2786 (1969).

Nakatani H., Hiromi K., Analysis of signal amplitude in stopped flow method for enzyme-ligand systems. — *J. Biochem.*, **87**, 1805—1810 (1980).

Peters F., Pingoud A., Numerical analysis of binding studies; a direct procedure avoiding the pitfalls of a Scatchard analysis of equilibrium data for unknown binding models. — *Int. J. Bio-Medical Comput.*, **10**, 401—415 (1979).

Rudolph F.B., Bangher B.W., Beissner R.S., Techniques in coupled enzyme assays. — *Methods in Enzymol.*, **63**, 22—41 (1979).

Somogyi B., Damjanovich S., A molecular anzyme kinetic model, *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, **6**, 353—364 (1971).

Somogyi B., Damjanovich S., A theoretical model for calculation of the rate constant of enzyme-substrate complex formation. — *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, **8**, 153—160 (1973).

Somogyi B., Damjanovich S., Relationship between the lifetime of an enzyme-substrate complex and the properties of the molecular enviroment. — *J. Theor. Biol.*, **51**, 393—401 (1975).

Storer A.C., Cornish-Bowden A., The kinetics of coupled enzyme reactions. — *Biochem. J.*, **141**, 205—209 (1974).

Варфоломеев С.Д. Кинетика реакций в полиферментных системах. — *Мол. биол.*, 1977, т. 11, с. 564—581.

К разделу 3.3

Ashani Y., Wins P., Wilson I.B., The inhibition of cholineesterase by diethylphosphorochloridate. — *Biochim. Biophys. Acta*, **284**, 427—434 (1972).

Cleland W.W., The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. II. Inhibition: nomenclature and theory. — *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 173—187 (1963).

Fajsz Cs., Methods of analysis of double inhibition experiments. — *Symp. Biol. Hung.*, **18**, 77—103 (1976).

Fajsz Cs., Keleti T., Kinetic basis of enzyme regulation. The triple-faced enzyme-inhibitor relation and the inhibition paradox. — *Symp. Biol. Hung.*, **18**, 105—119 (1976).

Gaal J., Bartha F., Batke J., Change in the reactivity of the active-site serine-OH of butyrylcholinesterase caused by a new reversible inhibitor. — *Eur. J. Biochem.*, **135**, 157—162 (1983).

Keleti T., Fajsz Cs., The system of double inhibitions. — *Math. Biosci.*, **12**, 197—215 (1971).

Keleti T., Telegdi M., Systematization, completion and differentiation of enzymic inhibition types. — *Enzymologia*, **31**, 39—50 (1966).

Marmasse C., Enzyme inhibition by excess substrate. Exploitation of kinetic data. I. Linear method. — *Biochim. Biophys. Acta*, **77**, 530—535 (1963).

Morrison J.F., The slow-binding and slow, tight-binding inhibition of enzyme-catalyzed reactions. — *TIBS*, **7**, 102—105 (1982).

Orsi B.A., Tipton K.F., Kinetic analysis of progress curves. — *Methods in Enzymol.*, **63**, 159—183 (1979).

Talsunami S., Yago N., Hosoe M., Kinetics of suicide substrates. Steady-state treatments and computer-aided exact solutions. — *Biochim. Biophys. Acta*, **662**, 226—235 (1981).

Waley S.G., Kinetics of suicide substrates. — *Biochem. J.*, **185**, 771—773 (1980).

Waley S.G., A quick method for the determination of inhibition constants. — *Biochem. J.*, **205**, 631—633 (1982).

К разделу 3.4

Keleti T., The liberator. — *J. Theor. Biol.*, **16**, 337—355 (1967).

К разделу 3.5

Bunow B., Chemical reactions and membranes; a macroscopic basis for facilitated transport, chemiosmosis and active transport. Part I. Linear analysis. — *J. Theor. Biol.*, **75**, 51—78 (1978).

Bunow B., Cellular enzymology; the steady-state kinetics of compartmentalized enzymes. — *J. Theor. Biol.*, **84**, 611—627 (1980).

Devés R., Krupka R.M., A simple experimental approach to the determination of carrier transport parameters for unlabeled substrate analogs. — *Biochim. Biophys. Acta*, **556**, 524—532 (1979).

Devés R., Krupka R.M., A general kinetic analysis of transport test of the carrier model based on predicted relations among experimental parameters. — *Biochim. Biophys. Acta*, **556**, 533—547 (1979).

Duyckaerts C., Sluse-Goffart C.M., Fux J.-P., Sluse F.E., Liebecq C., Kinetic mechanism of the exchange catalyzed by the adenine-nucleotide carrier. — *Eur. J. J. Biochem.*, **106**, 1—6 (1980).

Gains N., The determination of the kinetic parameters of a carrier mediated transport process in the presence of an unstirred water layer. — *J. Theor. Biol.*, **87**, 559—568 (1980).

Vincent J.C., Thellier M., Theoretical analysis of the significance of whether or not enzymes or transport systems in structured media follow Michaelis—Menten kinetics. — *Biophys. J.*, **41**, 23—28 (1983).

К разделу 3.6

Березин И.В., Антонов В.К., Мартинек К. (ред.), Имобилизованные ферменты, т. I, II. — М.: Изд-во Московского университета, 1976.

Engasser J.M., Horváth Cs., Effect on internal diffusion in heterogeneous enzyme systems: evaluation of true kinetic parameters and substrate diffusivity. — *Theor. Biol.*, **42**, 137—155 (1973).

Hamilton B.K., Gardner C.R., Colton C.K., Effect of diffusional limitations on Lineweaver—Burk plots for immobilized-enzymes. — *AIChE J.*, **20**, 503—510 (1974).

Kobayashi T., Laidler K.J., Kinetic analysis for solid-supported enzymes. — *Biochim. Biophys. Acta*, **302**, 1—12 (1973).

Kobayashi T., Laidler K.J., Theory of the kinetics of reactions catalyzed by the enzymes attached to membranes. — *Biotechn. Bioeng.*, **16**, 77—97 (1974).

Moo-Young M., Kobayashi T., Effectiveness factors for immobilized enzyme reactions. — *Canad. J. Chem. Engineering*, **50**, 162—167 (1972).

Shuler M.L., Aris R., Tsuchiya H.M., Diffusive and electrostatic effects with immobilized enzymes. — *J. Theor. Biol.*, **35**, 67—76 (1972).

Thomas D., Bourdillon C., Broun G., Kernevez J.-P., Kinetic behaviour of enzymes in artificial membranes. Inhibition and reversibility effects. — *Biochemistry*, **13**, 2995—3000 (1974).

К разделу 3.7

Heinrich R., Rapoport S.M., Rapoport T.A., Metabolic regulation and mathematical models. — *Progr. Biophys. Molec. Biol.*, **32**, 1—82 (1977).

Heinrich R., Rapoport S.M., The utility of mathematical models for the understanding of metabolic systems. — *Biochem. Soc. Trans.*, **11**, 31—35 (1983).

Kacser H., The control of enzyme systems in vivo; elasticity analysis of the steady state. — *Biochem. Soc. Trans.*, **11**, 35—40 (1983).

Stadtman E.R., Mechanisms of enzyme regulation in metabolism. In: *The Enzymes* (Ed. *Boyer P.D.*), 3rd ed. Vol. 1, Academic Press New York, London, 1970, pp. 397—459.

Umbarger H.E., Regulation of amino acid metabolism. — *Ann. Rev. Biochem.*, **38**, 323—370 (1969).

К разделу 3.8

Endrényi L., Fajsz Cs., Kwong F.H.F., Evaluation of Hill slopes and Hill coefficients when the saturation binding or velocity is not known. — *Eur. J. Biochem.*, **51**, 317—328 (1975).

Frieden C., Kinetic aspects of regulation of metabolic processes. The hysteretic enzyme concept. — *J. Biol. Chem.*, **245**, 5788—5799 (1970).

Horn A., Börnig H., Analysis of kinetic data of allosteric enzymes by a linear plot. — *FEBS Lett.*, **3**, 325—329 (1969).

Keleti T., Effect of steric changes in protein on the kinetics of enzymic reaction. II. Steady-state treatment of reactions with one substrate. — *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, **3**, 247—258 (1968).

Koshland D.E., Jr., The molecular basis for enzyme regulation. In: *The Enzymes* (Ed. *Boyer P.D.*), 3rd ed., Vol. 1, Academic Press, New York, London, 1970, pp. 341—396.

Koshland D.E., Jr., Némethy G., Filmer D., Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. — *Biochemistry*, **5**, 365—385 (1966).

Курганов Б.И., Аллостерические ферменты, — М.: Наука, 1978.

Kurganov B.I., Kagan Z.S., Dorozhko A.I., Yakovlev V.A., Kinetic manifestation of allosteric interactions in models of regulatory enzyme with "indirect" cooperativity. — *J. Theor. Biol.*, **47**, 1—41 (1974).

Lazdunski M., Petitclerc C., Chappelet D., Lazdunski C., Flip-flop mechanisms in enzymology. A model: the alkaline phosphatase of *E. coli*. — *Eur. J. Biochem.*, **20**, 124—139 (1971).

Levitzi A., Quantitative Aspects of Allosteric Mechanisms, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1978.

Monod J., Wyman J., Changeux J.P., On the nature of allosteric transitions: a plausible model. — *J. Mol. Biol.*, **12**, 88—118 (1965).

Ricard J., Meunier J.-C., Buc J., Regulatory behavior of monomeric enzymes. I. The monomeric enzyme concept. — *Eur. J. Biochem.*, **49**, 195—208 (1974).

Seydoux F., Malhotra O.P., Bernhard S.A., Half-site reactivity. — *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **2**, 227—257 (1974).

Volkenstein M.V., Goldstein B.N., Allosteric enzyme models and their analysis by the theory of graphs. — *Biochim. Biophys. Acta*, **115**, 478—485 (1966).

Welch G.R., On the role of organized multienzyme systems in cellular metabolism; a general synthesis. — *Progr. Biophys. Molec. Biol.*, **32**, 103—191 (1977).

К разделу 3.9

Cleland W.W., The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. 1. Nomenclature and rate equations. — *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 104—137 (1963).

Cleland W.W., Steady-state kinetics. In: *The Enzymes* (Ed. *Boyer P.D.*) 3rd ed., Vol. 2, Academic Press, New York, London, 1970, pp. 1—65.

Peller L., Alberty R.A., Physical chemical aspects of enzyme kinetics. — *Progr. Reaction. Kin.*, **1**, 237—260 (1961).

К разделу 3.10

Cheng Y.C., Prusoff W.H., Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. — *Biochem. Pharmacol.*, **22**, 3099—3108 (1973).

Dalziel K., Initial steady-state velocities in the evaluation of enzyme-coenzyme-substrate reaction mechanisms. — *Acta Chem. Scand.*, **11**, 1706—1723 (1957).

Florini J.R., Vestling C.S., Graphical determination of the dissociation constants for two-substrate enzyme systems. — *Biochim. Biophys. Acta*, **25**, 575—578 (1957).

Ricard J., Noat G., Got C., Borel M., The theory of alternative substrates in enzyme kinetics and its application to yeast hexokinase. — *Eur. J. Biochem.*, **31**, 14—24 (1972).

Wong J.T.F., Hanes C.S., Kinetic formulation for enzymic reactions involving two substrates. — *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **40**, 763—844 (1962).

К разделу 3.11

Dalziel K., The interpretation of kinetic data for enzyme-catalyzed reactions involving three substrates. — *Biochem. J.*, **114**, 547—556 (1969).

Fisher J.R., Hoagland W.D., Jr., A systematic approach to kinetic studies of multi-substrate enzyme systems. — *Adv. Biol. Med. Phys.*, **12**, 163—211 (1968).

Hurst R.O., The analysis of dead-end inhibition patterns for multisubstrate systems. *Canad. J. Biochem.*, **47**, 91—109 (1969).

Keleti T., New method to differentiate between some mechanisms of action of enzymes with three substrates, *FEBS Lett.*, **28**, 287—288 (1972).

Rudolph F.B., Fromm H.J., Use of isotope competition and alternative substrates for studying the kinetic mechanism of enzyme action. II. Rate equations for three substrate enzyme systems. — *Arch. Biochem. Biophys.*, **147**, 515—526 (1971).

Schulz A.R., Fisher D.D., Computer-based derivation of rate equations for enzyme-catalysed reactions. 1. Effects of modifiers on kinetics of multireactant systems. — *Canad. J. Biochem.*, **47**, 889—894 (1969).

Wong J.T.F., Hanes C.S., A novel criterion for enzymic mechanisms involving three substrates. — *Arch. Biochem. Biophys.*, **135**, 50—59 (1969).

К разделу 3.12

Boyer P.D., Uses and limitations of measurements of rates of isotopic exchange and incorporation in catalyzed reactions. — *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 387—410 (1959).

Boyer P.D., Silverstein E., Equilibrium reaction rates and enzymes mechanisms. — *Acta Chem. Scand.*, **17**, S195—S202 (1963).

Britton H.G., Dann L.G., Use of flux ratio measurements for the determination of the order of addition of substrates and products in enzyme reactions. — *Biochem. J.*, **169**, 29—37 (1978).

К разделу 3.13

Chou K.S., Jiang S.P., Lin W.M., Fee C.H., Graph theory of enzyme kinetics. — *Sci. Sinica*, **22**, 341—358 (1979).

King E.L., Altman C., A schematic method of deriving the rate laws for enzyme-catalyzed reactions. — *J. Phys. Chem.*, **60**, 1375—1378 (1956).

Volkenstein M.V., Goldstein B.N., A new method for solving the problems of the stationary kinetics of enzymological reactions. — *Biochim. Biophys. Acta*, **115**, 471—477 (1966).

Whitehead E.P., The structure of steady-state enzyme kinetic equations; a graph-theoretical algorithm for obtaining conditions for reduction in degree by common-factor cancellation. — *J. Theor. Biol.*, **80**, 355—381 (1979).

К приложению

Algranati I.D., Determination of initial rates in enzymic nonlinear progress reactions. — *Biochim. Biophys. Acta*, **73**, 152—155 (1963).

Oppenheimer L., Capizzi T.P., Miwa G.T., Application of jack-knife procedures to inter-experiment comparisons of parameter estimates for the Michaelis—Menten equation. — *Biochem. J.*, **197**, 721—729 (1981).

Дополнительная литература*

Березин И.В., Варфоломеев С.Д. Биокинетика. — М.: Наука, 1979.

Гачок В.П. Кинетика биохимических процессов. — Киев: Наукова думка, 1988. Химическая и биологическая кинетика. /Под ред. Н.М. Эмануэля, И.В. Березина, С.Д. Варфоломеева. — М: Изд-во МГУ, 1983.

Purich D.L. (ed.) *Methods in enzymology*, vol. 63. Enzyme kinetics and mechanism. Part A. Initial rates and inhibitor methods. Academic Press, Orlando, 1980.

Purich D.L. (ed.) *Methods in enzymology*, vol. 64. Enzyme kinetics and mechanism. Part B. Isotopic probes and complex enzyme systems. Academic Press, Orlando, 1980.

Purich D. L. (ed.) *Methods in enzymology*, vol. 87. Enzyme kinetics and mechanism. Part C. Intermediates, stereochemistry, and rate studies. Academic Press, Orlando, 1982.

К разделу 3.2

Варфоломеев С.Д., Зайцев С.В., Мевх А.Т. Итоги науки и техники, сер. Биоорганическая химия, т. 3. Физико-химические исследования молекулярных механизмов действия физиологически-активных соединений. Рецепция. /Под ред. И.В. Березина. — М.: ВИНТИ, 1985.

Курганов Б.И. Адсорбция периферических ферментов олигомерными «якорными» белками мембран. — Биологические науки, (1984), т. 1, с. 363—371.

К разделу 3.5

Friedman M.H. Principles and models of biological transport. Springer-Verlag, Berlin, 1986.

К разделу 3.6

Варфоломеев С.Д., Судына Г.Ф. Кинетика реакций с иммобилизованными ферментами. — В сб.: Итоги науки и техники, сер. Биотехнология, т. 5. /Под ред. И.В. Березина, — М.: ВИНТИ, 1986, с. 87—133.

Сорочинский В.В., Курганов Б.И. Итоги науки и техники, сер. Биотехнология, т. 16. Ферментные электроды. /Под ред. С.Д. Варфоломеева. — ВИНТИ, 1988.

К разделу 3.7

Курганов Б.И. Принципы интеграции клеточного метаболизма. — Молекулярная биология, 1986, т. 20, с. 369—377.

* Составлена В.И. Кургановым. — Прим. ред.

- Ньюсхолм Э., Спарт К. Регуляция метаболизма. — М.: Мир, 1977.
- Bohnsack R. Theory of steady-state control in complex metabolic networks. — Biomed. Biochim. Acta, **44**, 1567—1578 (1985).
- Chock P.B., Huang Ch.Y., Tsou C.L., Wang J.H. (eds) Enzyme dynamics and regulation. Springer-Verlag, New York, 1987.
- Cohen P. (ed.) Enzyme regulation by reversible phosphorylation. Further aspects. Elsevier, Amsterdam, 1984.
- Cohen P., Houslay M.D. (eds) Molecular mechanisms of transmembrane signalling. Elsevier, Amsterdam, 1985.
- Grabtree B., Newsholme E.A. A systematic approach to describing and analysing metabolic control systems. — Trends Biochem. Sci., **12**, 4—12 (1987).
- Damjanovich S., Keleti T., Trón L. (eds) Dynamics of biochemical systems. Symposia Biologica Hungarica, vol. 30. Akadémiai Kiadó, Budapest, 1986.
- Kascer H., Porteous J.W. Control of metabolism: What do we have to measure. — Trends Biochem. Sci., **12**, 5—14 (1987).
- Martin B.R. Metabolic regulation. A molecular approach. Blackwell Scientific regulation. A molecular approach. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1987.
- Reich J.G., Sel'kov E.E. Energy metabolism of the cell. A theoretical treatise. Academic Press, London, 1981.
- Ricard J., Cornish-Bowden A. (eds) Dynamics of biochemical systems. Plenum Press, New York, 1984.
- Welch G.R. (ed.) Organized multienzyme systems. Catalytic properties. Academic Press, Orlando, 1985.
- Welch G.R., Clegg J.S. (eds) Organization of cell metabolism. Plenum Press, New York, 1986.

К разделу 3.8

- Курганов Б.И. Физико-химические механизмы регуляции ферментативной активности. — В сб.: Физическая химия. Современные проблемы. т. 5./Под ред. Я.М. Колотыркина, — М.: Химия, 1985.
- Hill T.L. Cooperativity theory in biochemistry. Steady-state and equilibrium systems. Springer-Verlag, New York, 1985.
- Koshland D.E., Jr. Switches, thresholds and ultrasensitivity. — Trends Biochem. Sci., **12**, 225—229 (1987).
- Ricard J., Cornish-Bowden A. Co-operative and allosteric enzymes: 20 years on. — Eur. J. Biochem., **166**, 255—272 (1987).

К разделу 3.13

- Гольдштейн Б.Н. Кинетические графы в энзимологии. — М.: Наука, 1989.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Абсолютная скорость реакции 75—82
Абсолютный нуль 75—82
Авогадро число 23
Автокаталитические реакции 59—60
 графический анализ 60
Автокаталитический процесс 47
Аддитивное ингибирование конечным продуктом 262
Аконитаза 284
Активатор 29, 233—234
 необходимый 234
Активация 233—234
 кажущаяся, избытком субстрата 131, 315
 мультисубстратной реакции 302
 регуляция 264
 свободная энтальпия 73, 91
 энергия 69, 71, 79, 81
 — относительная ошибка определения 73
 энтальпия 71, 81
 энтропия 71
Активированный комплекс 79
Активирующий центр 266
Активность
 ионов 92
 коэффициент 92
Активный транспорт 247—251
Активный центр 184
Алкогольдегидрогеназа 288—289
Аллостерическая константа 268
 кажущаяся 269
Аллостерический эффектор 288
Аллостерическое взаимодействие гомотропное 277
Аллотерия 11, 266—284
Альберт
 координаты 242
 номенклатура 284—286
Альтернативного субстрата метод 292
 для двухсубстратного механизма 295
 — трехсубстратного механизма 302
Альтман см. *Кинга* — *Альтмана* метод 311
Амбаргера исследование регуляции по механизму обратной связи 260
Амплитуда
 колебаний 108
 множитель 68
Анаболический процесс 16
Антиконкурентное ингибирование 197
Ароматических кислот биосинтез 262
Аррениуса
 график 71, 236
 закон 73
 комплекс 97
 уравнение 69, 81, 236
 — интегральное 73
Асимптотическое стабильное состояние 107
Аспартаткарбамоилаза 261
Аспартаткиназа 262—263, 265
Ассоциации константа 148
 внутренняя 276
 микроскопическая 158
Атомная теплота 16
АТР-фосфорибозилтрансфераза 262
Ацетилхолинэстераза 285

Барьер потенциальный 69, 79
Берцелиуса открытие катализа в живых организмах 112
Бесконкурентное ингибирование 197—201
 графическое представление 198
 интегральное уравнение 199—200
 кажущееся 200—201
 неполностью 197—199
 полностью 197
 продуктом 226
Би-би механизм упорядоченный 286
Биокатализ 82
Биологические часы 110

- Боденштейна* принцип 116
Боковые цепи существенные 145—146
Больцмана 22—23
 постоянная 23
 статистическая интерпретация энтропии 22
Бриггса — Холдейна кинетика 116—119
- Вант-Гоффа*
 график 74—75, 237
 закон 75
 комплекс 97
 уравнение 70, 237
 — интегральное 76
- Вебера* исследование регуляции метаболических процессов 261
Вероятностное приближение 169
Вероятность 83
 математическая 19
 термодинамическая 19, 22
- Вестлинг* см. *Флорини — Вестлинга*
 метод 289
- Вечный двигатель
 второго типа 18
 первого типа 16
- Взаимодействия константа 231
 коэффициент 25
- Волькенштейна*
 метод графов 272
 модель 315
- Время жизни
 среднее 171
 частичное 42
- Второго порядка реакция
 бимолекулярная 13, 31—32
 графический анализ 37, 39
 необратимая 31, 36—40
 обратимая 45
- Вульфа* метод, координаты 132
Ву — Хэммеса график 152
- Газовая постоянная 23
- Гамметта*
 константа 94
 уравнение 93
- Ганша* соотношение 95
Гаусса закон 41
Гексокиназа 258, 289
Гельмгольца свободная энергия 20
- Герхарда — Парди* теория индуцированного несоответствия 190, 261
Герцфельда — Поляни теория столкновений 77, 79
Гесса закон 16
Гетеротропное влияние 267
Гиббса 20
 свободная энергия 20
 функция 16
 энтальпия 20
Гидрофобность, параметр 95
Гиперболического насыщения кривая 132, 136
Гистерезисный фермент 282
Гликолиз 110
Глицеролдегидрогеназа 287
Глицерол-3-фосфатдегидрогеназа 287
Глутаматдегидрогеназа 266
Глутамил-цистеин-синтетаза 309
Глутаминсинтетаза 262
Глутамин-фосфорибозил-пирофосфатаминотрансфераза 264
Гольдштейн см. *также* Зоны по Штраусу и Гольдштейну
 метод графов 315
 модель кооперативного взаимодействия 272
Гомосериндегидрогеназа 265
Гомотропное влияние 267
Градиенты термодинамические 24
Графический анализ
 автокаталитические реакции 60
 аллостерические ферменты 275
 бесконкурентное ингибирование 198
 границы зон 211
 двойное конкурентное ингибирование 231
 двухсубстратная реакция 290, 291
 зависимость константы скорости от ионной силы 93
 ингибирование избытком субстрата 222
 ингибирование продуктом 226
 интегральное уравнение, полностью бесконкурентное ингибирование 198
 — — — конкурентное ингибирование 186
 — — — неконкурентное ингибирование 196
 смешанный тип ингибирования 203
 кинетический изотопный метод 100

- конкурентное ингибирование 186—187
 медленное развивающееся ингибирование 215
 неконкурентное ингибирование 194, 196
 необратимые химические реакции второго порядка 32—34
 — — — первого порядка 33, 34, 35
 обратимые химические реакции первого порядка 44
 определение константы скорости 161, 164
 осциллирующие реакции 109
 параллельные реакции первого порядка 58
 рН-зависимость констант скорости 97
 — — — ферментативные реакции 242
 реакция *Михаэлиса — Ментен* 133—134, 136
 релаксационные процессы 63, 64, 65
 связывание лиганда 148, 150, 151, 153, 155, 157
 сопряженные химические реакции 172
 температурная зависимость константы равновесия 74
 — — — скорости 71
 трехсубстратная реакция 298—302
 уравнение *Хилла* 276
 Графическое дифференцирование 29
 Графов метод 311—319
Грегори — Ньютона метод 323
Гугенгейма график 34
Гульдберга — Вааге закон действия масс 45
Гурвица — Раута условия 108
Гутфройнда — Роутена метод 161—164
- Дамколера* число 254
Дамьяновича — Шамоги метод 170
 Двойное ингибирование 227—223
 графический анализ 231
 обратимое—необратимое 233
 полностью конкурентное 228—234
 Двухвалентный рецептор 150
 Двухсубстратные реакции 285, 286—295
 графический анализ 290—291
 ингибирование продуктом 292—294
 метод альтернативного субстрата 292—295
Дебая — Хюккеля теория 92
- Дегидратаза 284
 Дезокси-Р-арабиногептулозонат-7-фосфатсинтеза 262
 Дельта-функция *Дирака* 106, 325
Де Мигуэл Марино-Тамари метод 134, 135
 Денатурация белковой молекулы 51
 Детоксикация, процесс 52
Джоба график 153
 Диализ 159, 160
Диксона 185, 242
 график для бесконкурентного ингибирования 197—198
 — — конкурентного ингибирования 187, 188
 — — неконкурентного ингибирования 193—194
 — — неполностью конкурентного ингибирования 194—195
 — — смешанного ингибирования 201—203
 координаты для рН-зависимости 242
 метод 135, 136
 Динамика 13
 процесс 14
 термодинамика 13—14
 Динамическое равновесие 13, 125
 при изотопном обмене 305—311
 Диполь 93
 Дипольный момент 93
 Диссоциация обратимая 280
 константа фермент-субстратного комплекса 114, 145—160
 — ингибитора 157
 — внутренняя 157, 283
 — макроскопическая 158
 рН зависимость 241
 Дифференциальное уравнение линейное неоднородное 319
 однородное 320
 Дифференциальный метод 46—47
 Диффузия 83, 244
 влияние на ферментативную кинетику 244—247, 252
 коэффициент 83, 245
Дизла метод исследования двухсубстратных реакций 291, 292
 номенклатура 296
 Диэлектрическая проницаемость 90
 зависимость константы скорости 91
Доннана потенциал 255

- Донорно-акцепторные взаимодействия 84
Дробного порядка реакция 40
- Енолаза 284
- Закрытая система 13
Затухающие колебания 107
Зимоген 60
Зоны по *Штраусу* и *Гольдштейну* 209
границы 210—211
- Иди — Хофсти* график 132, 147, 247
для бесконкурентного ингибирования 197—200
— конкурентного ингибирования 186—188
— неконкурентного ингибирования 192—195
— смешанного ингибирования 201—203
- Изоболограмма 231
Изомеразы 285
Изотерма
 Ленгмюра 85
 Фройндлиха 85
- Изотоп
 графический анализ 100
 кинетический метод 97—101
 обмен при динамическом равновесии 305—311
- Изоцитрат дегидрогеназа 264, 278
Иммобилизованные ферменты 251—257
Ингибирование 183—233
 бесконкурентное 197—201
 — продуктом 226
 двойное 227—233
 — полностью конкурентное 228—231
 — обратимо-необратимое 233
 избытком субстрата 219—224
 — — кажущееся, избытком субстрата 131, 315
 — — — конкурентное 190—192
 — — кинетика 212—215
 конечным продуктом 261—263
 — — аддитивное 262
 — — изоферментов 262
 — — простое 261
 — — синэргетическое 263
 — — согласованное 263
 конкурентное 183—192, 210
 лабильным ингибитором 216—217
 медленно действующим ингибитором 215
 мультисубстратные реакции 286
 неконкурентное 193—196, 209
 — продуктом 225
 — простое 203
 — сопряженных реакций 227
 необратимое 212, 215, 216
 неполностью бесконкурентное 197, 206
 — неконкурентное 193—195
 — — избытком субстрата 221
 — конкурентное 188, 189
 — — избытком субстрата 221
 рН-зависимость 242
 полностью неконкурентное 197—199, 206
 — конкурентное 185—190, 206, 207
 — — избытком субстрата 221
 последовательных сопряженных реакций 226
 продуктом 224—227
 промежуточными соединениями 264
 псевдонеобратимое 209—212
 смешанный тип 201—203, 206—207
 — — графическое представление 202
 — — интегральное уравнение 203
 — — продуктом 226
 специфическое 183—219
 стационарной ферментативной реакции 205
 ферментами-самоубийцами 217—219
 энтальпийное 237
 энтропийное 237
- Ингибирование продуктом реакции 261—265
 для проферментов 262
 согласованное 263
- Ингибитор 30
 лабильный 216, 217
 константа 205—208
 — диссоциации 157
- Ингибиторный гетеротропный эффект 271
- Индукции несоответствия теория 190
- Индукции соответствия теория 190
- Инициатор 36

Интегральное уравнение

Аррениуса 73

бесконкурентное ингибирование 199—200

— — продуктом 225

Вант-Гоффа 76

ингибирование продуктом 189

ингибирование продуктом 226

Михазиса-Ментена 123, 124, 208

неконкурентное ингибирование 196—197

— — продуктом 225

полностью конкурентного ингибирования 189, 190

Интегрирования метод 33—47

Интерполяции метод *Грегори — Ньютона* 323

Ионная сила 91—93

графический анализ 93

Итерация констант 138

Йонетани — Теорелла график 231

Калориметрические методы 22—24

Канальный эффект 177—181

Каскады 182

Катаболические процессы 16

Катализ 81—90

гетерогенный 81, 83—90

гомогенный 28, 82—83

полупроводник 86—89

фермент 82

физический 82

химический 82

яд 30

Каталитическая эффективность 83

Каталитические реакции 81—90

Каталитический центр 184, 192

«Качелей» механизм 282

Квазистационарное состояние 52, 125

Кезди — Свинборна график 35*Кельвина* шкала 14*Кинга — Альтмана* метод 311, 318

Кинетика

в водных растворах 90—93

влияние концентрации субстрата 120—122

иммобилизованные ферменты 251—257

ингибирование 212—215

протеазы 122—123, 163

рецептор 150—151, 166—168

связывание лигандов 146—159

транспорта 244—251

ферментативная 113—244, 266—320

химическая 28—112

Кирквуда уравнение 93*Кирхгоффа* закон 17

Кислотно-основной катализ 95—97

Классификация ферментативных реакций 286—288

Клеланда классификация 188, 195, 201, 285, 286

терминология 286—287

Ключевой фермент 258

Ковалентное связывание, регуляция 265

Колебательные химические реакции 107—110

Колебание

единичное 54

затухающее 107

незатухающее 107

Компартмент 103

анализ 103—106

регулируемый 105

системы линейные 105

— насыщенные 105

— нелинейные 105

Конкурентное ингибирование 183—192, 210, 224

аллостерическое 192

гиперболическое 189

графический анализ 186—187

двойное 227—230

избытком субстрата 222

кажущееся 189—192

линейное 189

продуктом 224

частичное 188—189

чистое 184—187

— интегральное уравнение 189

Константы скорости диссоциации 158

инактивации 155

Контактные реакции 83

Контроль метаболизма 258—260

Конформационный эффект 252

Концентрация, влияние на кинетику 141—142

Кооперативное взаимодействие 268, 283

непрямое 268

прямое 268

- Кооперативность
индекс 283
отрицательная 283
положительная 283
Кошланда — Немети — Фильмера модель 272—275
Коэффициент распределения 95
Крови свертывания каскадные реакции 182
Кротоназа 286
К-система 270
KV-система 271
Курганова исследования кинетики регуляторных ферментов 276, 278, 280
- Лавуазье* закон 17
Лаг-период 85
Ладзунского механизм регуляции 282
Лактатдегидрогеназа 287
Лактат цитохромредуктаза 287
Лайнуивера — Берка
график 133
— бесконкурентное ингибирование 197—198
— ингибирование избытком субстрата 222
— конкурентное ингибирование 185—186
— неконкурентное ингибирование 193—194
— смешанное ингибирование 201—202
соотношение 146
Ленгмюра изотерма 85
Ле Шателье принцип 15
Либратор 30, 234—235
Лиганд
графический анализ 148—151
защитное действие 154—157
связывание 145—160
Лоуэ метод изоболограммы 231
Льюиса теория столкновений 77
Ляпунова функция 107
- Мак-Лорена* теорема 175, 325
Макроскопическая константа 157—159
Максимальная скорость 131—158
pH-зависимость 240, 241—244
Малатдегидрогеназа 287
Мармассе график 223
Математическая вероятность 19
- Медиана 134
Мертвое время 167
Микрокалориметры 22—24
сканирующие 23—24
Микроскопическая константа 157—159
Минимальное производство энтропии, принцип *Пригожина* 26
Михаэлиса
константы 116—119, 131—158
pH-зависимость 243—244
pH-функция 239—240
Михаэлиса — Ментен
кинетика 114—116
уравнение 85, 114—115
— графический анализ 124, 132—135, 137
— линеаризация 131—137
— интегральное 124
Множитель
вероятностный 78
предэкспоненциальный 73, 78
стерический 78
электростатический 255
Модель
последовательная 272
ферментативной регуляции 273
Молекулярная модель ферментативной кинетики 170—171
Молекулярность 30
Моно механизм регуляции 266—267, 269—270, 272, 282
Моно — Уаймена — Шанже модель 268, 272—274
Мономер 267
Мультисубстратные реакции 286—305
- Наименьших квадратов метод 133, 137, 321—323
Насыщения кривая 131—132, 137
неупорядоченной би-би реакции 316
сигмоидная 272
Начальная скорость 113, 323—324
Неконкурентное ингибирование 192—196, 209
графический анализ 194, 196
избытком субстрата 221
интегральное уравнение 196
кажущееся 196—197
полностью 193—194
продуктом 225
— сопряженных реакции 226—227

- Немети* см. *Кошланда* — *Немети* — *Фильмера* модель
- Неравновесная термодинамика 24—26
- Нернста*
теорема тепловая 21
уравнение 109
- Необратимый процесс 12, 18—19
- Неупорядоченный
би-би механизм 288
— быстрое равновесие 289
би-би реакции, кривые насыщения 316
- Нулевой
закон термодинамики 15
порядок реакции 26—27
- Нуссельта* критерий 254
- Обратной связи регуляция 261—267
- Ограниченный протеолиз, регуляция 266
- Одного оборота метод 164—165
- Ожидание математическое 169
- Озава* см. *Яги* — *Озава* метод
- Олигомеры
- Онзагера*
линейный закон 24
обратное соотношение 26
- Ориентации эффект 89
- Открытая система 13
последовательные реакции 53
стационарное состояние 55
термодинамика 24—26
- Ошибка 42, 94
относительная 43
— константы скорости 43
предполагаемая суммарная 42
распределение (закон *Гаусса*) 41
- Параметр
определение 139
состояния 14
- Парди* 190, 261 см. также *Герхарда* — *Парди* теория индуцированного несоответствия
- Пассивный транспорт 244—247
- Пеллера* — *Альберти* координаты рН-зависимости кинетических параметров 242
- Первого порядка реакции 31, 34—35, 43—45
графический анализ 34, 35, 44
мономеокулярные необратимые 33—36
— обратимые 43—45
параллельные 55—57
последовательные 31—55
«Переброс» 55
- Переносчик 244
- Переходный комплекс 81
кинетически несущественный 285
- Переходный контроль 260
- Переходное время 174
- Переходное состояние 125
- Пинг-понг
би-би механизм 293
реакции 291
- Планка*
постоянная 23
соотношение 22
- Полулогарифмический график реакции первого порядка 34
- Полупревращения время, период 36, 38, 40, 42
ферментативной реакции 141
- Полупроводниковый катализ 86—89
- Поляни* см. *Герцфельда* — *Поляни* теория столкновений
- Полярности константа 94
- Порядок реакции 33—48, 101—103
второй 36—40
графический анализ 46—47
«истинный» 46
необратимых реакций 33—43
нулевой 40—41
л-ный 41
обратимых реакций 43—45
первый 33—36, 43—54
половинный 40—41
полуторный 40—41
• по отношению ко времени 47
— к концентрации 46
псевдопервый 36
- Последовательная регуляция 265
- Предстационарная фаза 125, 161—163
- Пригожина* принцип 26
- Продуктом ингибирование 224—227
бесконкурентное 226
в последовательных сопряженных реакциях 226—227
двухсубстратной ферментативной реакции 293
интегральное уравнение 225
конкурентное 225
— графический анализ 225

- неконкурентное 225—226
смешанного типа 226
трехсубстратной ферментативной реакции 299
Протеолизом ограниченным регуляции 266
Протеолитические ферменты, протеазы 122—123, 163—164
Протомер 267
Проферментные формы 60
Прямой график 133
- Работа 15
Равновесие 19
 константа 446, 45, 70, 74
 — температурная зависимость 69—77
Радикалы 87—88
Рацемаза 285
Распределение
 коэффициент 253
 — электростатический 255
Реакционная способность соединения, влияние заместителей 93—95
Реакция
 автокаталитическая 59—60
 бимолекулярная 36—40
 второго порядка необратимая 36—41
 — — обратимая 45
 дробного порядка 40
 каталитическая 81—90
 механизм 30
 мономолекулярная 33—36
 на границе раздела 83
 необратимая 33—45
 n-молекулярная обратимая 45
 n-ого порядка 41, 45—48
 обратимая 18, 43—45
 односубстратная 132—173, 284
 параллельная 56—59
 — первого порядка 56—57
 первого порядка мономолекулярная
 — — — необратимая 33—36
 — — — обратимая 43—45
 половинного порядка 40—41
 полулогарифмический график 34
 полуторного порядка 40
 последовательная 285
 — первого порядка 48—55
 псевдопервого порядка 36
 скорость 29
 — абсолютная 77—79
 смешанной стехиометрии 285
 стадии 30
 теплота 23
 упорядоченная 285
 ферментативная параллельная 182
 химическая 28
 — в водном растворе 90—93
 — гетерогенная 28
 — гомогенная 28
 — колебательная 107—110
 — параллельная 55—59
- Регрессия
 уравнение 322
 нелинейная 137—138
Регуляция метаболических процессов 257—286
 активацией 264
 ковалентным связыванием 265
 ограниченным протеолизом 266
Редокс-потенциал 109
Резонансная константа 94
Релаксация
 метод 61—69, 166, 169
 — графический анализ 63, 64, 67, 68
 время 61, 62, 65—67
 — определение 66
Рецептор 149—151, 166—168
 связывание 166
 — скорость 166
 бивалентный 150
- Саболчи 272 см. также Штрауба — Саболчи* теория флуктуационного ответа
- «Самоубийцы»-ферменты 217—219
Свободная энергия
 Гиббса 20
 Гельмгольца 20
 молярная 20
Свободная энтальпия
 активации 73
 Гиббса 20—23
 стандартная 20—23, 74, 76—77
Свободный радикал 87
Связывания центр 184, 192
Сегрегации метод 47
Сигмоидная кривая 49, 136
Сила контроля 259
Симметричная модель 268—270
Синтетаза 285

- Система
 закрытая 13
 гетерогенная 14
 гомогенная 14
 идентифицированных компартментов 106
 изолированная 13
 открытая 13
 термодинамическая 13
- Системы со взаимными истощением, псевдонеобратимые ингибиторы 209—212
- Сканирующий микрокалориметр 23
- Скорости константа 31, 43, 67, 160—168
 зависимость от диэлектрической константы 91
 — — ионной силы 93
 — — pH 97
 — — температуры 69—81
 инактивации 155
 микроскопическая 158
 необратимых реакций 33—43
 обратимых реакций 45
 определение 160—168
 — графический анализ 161—162
 — методом релаксации 61—69, 165—166
 диссоциации микроскопическая 158
- Скорость
 диффузии 83
 изменения энергии 17
 лимитирующая стадия 52
 уравнение, стохастическое решение 168—170
- Скэтчарда* уравнение 147
 график 148, 283
- Слетера* метод 160
- Смешанного типа ингибирование 201—203, 207—208, 226
 графическое представление 202
 интегральное уравнение 203
 продуктом 226
- Согласованная модель 272
- Сопряженные ферментативные реакции последовательные 172—182
- Стабильное состояние 107
- Стандартное отклонение 322
- Статистическая интерпретация энтропии *Больцмана* 22
- Статистическая механика равновесная 79—81
- Статистическая формулировка второго закона 19
- Статистическое механическое определение нулевого закона 15
- Стационарное состояние 13, 54
 в открытых системах 55
 приближение 118
 ферментативная кинетика 117—119
- Стерические помехи 192, 252
- Стехиометрическое уравнение 30
 матрица 258
 число 145—160
- Стехиометрия 30
 реакции 284
- Стирлинга* теорема 325
- Стокелла*
 график 148
 соотношение 147
- Столкновение
 кинетика 77—78
 число 78
- Стохастическое решение уравнения скорости 168—170
- Субстрат
 влияние концентрации на кинетику 119—121
 ингибирование избытком 219—224
 — — интегральное уравнение 220
 — — *Лайнуивера — Берка* график 222
 — — *Мармассе* график 223
 нестабильный 142—143
 кажущаяся активация избытком 131, 315
 кажущееся ингибирование избытком 130, 315
 связывание 129—131
 низкие концентрации 141—142
- Субъединица 267
 взаимодействия 284
- Сумма состояний 79
- Сциларда* исследование регуляции по механизму обратной связи 260
- Тамари см. Де Мигуэл Марино — Тамари* метод
- Тауомеразы 284
- Тафта* соотношение 94
- Тейлора* теорема 140, 325

- Температура 13, 15
 графический анализ 71, 74
 зависимость ферментативной реакции 235—237
 — — — константы равновесия 70—77
 — — — константы скорости 69—77
*Теорелл см. Йонетани — Теорелла гра-
фик*
Теорелла — Чанса механизм 288
Теория индуцированного
 соответствия 190
 несоответствия 190, 272
Теплота 15
 атомная 16
 Гиббса 16
 изменение 17
 молярная 16, 23
 Нернста теорема 21
 переноса 14, 17
 реакции 22
 средняя удельная 16
 фактор переноса 254
Термодинамика 13—26
 второй закон 18—21
 необратимая 24—26
 неравновесная 24—26
 нулевой закон 21—22
 первый закон 15—18
 третий закон 21—22
Термодинамическая сила 24
Термодинамическая функция характери-
 стическая 21
Термодинамическая шкала 13
Термодинамический потенциал 20—21
Термодинамический процесс 14
Тиле модуль 245
Транслоказа 244
Трансмиссионный коэффициент 80
Транспорта кинетика 244—251
Треониндезаминаза 266
Трехстадийный двухпродуктный меха-
 низм 163
Трехсубстратная реакция 285, 295—305
 графический анализ 297—302
 ингибирование продуктом 302—303
 метод альтернативного субстрата 295—305
T-скачок 61, 168
*Уаймен см. Моно — Чаймена — Шанже
модель*
Упорядоченные реакции 285
Узбба график
 бесконкурентного ингибирования 198
 ингибирования смешанного типа 202
 конкурентного ингибирования 194
 неконкурентного ингибирования 194
Фактор
 колебательный 84
 регуляторный 259
 стерический 83
 теплопереноса 254
Фарадея число 109
Фейси — Эндрени метод 139
Феноменологическое соотношение 25
Фермент 26
 аллостерический 266—284
 графический анализ 276
 каскады 266
 катализ 82, 89—90
 кооперативный 274—284
 модели регуляции 273
 молекулярно-кинетическая модель 170—171
 протеолитические (см. протеазы) 60
 реакции, классификация 284—286
 — ингибирование продуктом 226—227
 — параллельные 182
 — сопряженные 172—182
 регуляторные 266—284
 -субстратный комплекс 114—116
 эффективность 143—144
Ферми уровень 89
Физический катализ 82
Фика
 второй закон 83—84, 244
 первый закон 245
*Фильмер см. Кошланда — Немети —
Фильмера* модель
Флип-флоп механизм 282
Флорини — Вестлинга метод 289, 290
Флуктуационного соответствия теория 191
Фостера — Ниманна
 метод 225—226
 график 124, 226
Фосфатаза 285
Фосфолипидальдегиддегидрогеназа 262
Фосфорилаза 285
Фридена гистерезисная теория фермен-
 тативного катализа 282

Фридена — Фромма метод альтернативного субстрата 292
Фридриха метод добавки фермента 181
Фройндлиха изотерма 85
 Фумараза

Хантера — Даунса график для бесконкурентного ингибирования 198
 — конкурентного ингибирования 186—188
 — неконкурентного ингибирования 193—195
 — смешанного ингибирования 201—202

Характеристическое уравнение 54, 320

Хейнса график 132—133
 — для бесконкурентного ингибирования 198
 — конкурентного ингибирования 186, 188
 — неконкурентного ингибирования 193—195
 — смешанного ингибирования 201—202
 уравнение 132

Хемосорбция 86—88

Хилла график 276, 279
 коэффициент 131, 275—277, 283
 линеаризация 279
 уравнение 85, 129, 208, 275, 279

Химические реакции
 параллельные 55—59
 — графический анализ 58
 — первого порядка 55—57
 последовательные 48—55, 64—65
 — в открытых системах 53
 — графический анализ 49
 — первого порядка 48
 — серии 50

Химический потенциал 20

Холдейм 118, 132
 уравнение кинетическое 128, 287—288
 — термодинамическое 128, 287—288
 соотношение 128—129

Хорды метод 140—141

Центральный комплекс 286

Частотная константа 69

Четвертичная структура 268

Шанжэ см. *Моно — Уаймена — Шанжэ* модель

Шомоги см. *Дамьяновича — Шомоги* метод

Штрауба — Саболчи теория флуктуационного соответствия 191

Штраус см. *Зоны и Штраусу и Гольдштейну*

Эдера уравнение 158, 273, 279

Эйгена метод релаксации 61, 165—166

Эйзенталя график 133

Эйзенталя — Корниш-Боудена метод 135

Эйринга — Поляни теория абсолютных скоростей 79

Экзотермические процессы 16

Экстенсивные свойства 14

Электрон
 акцептор 84
 донор 84

Электронно-парамагнитный резонанс 87

Элластичности коэффициент 260

Эндотермические процессы 16

Эндрени см. *Фейси — Эндерени* метод

Энергия
 активации 73
 свободная *Гельмгольца* 20
 свободная *Гиббса* 20
 стандартное изменение 70
 тепловая 10
 туннелирования 171

Энтальпия 16, 18
 активации 72
 изменение 24
 ингибирование 237
 свободная 73

Энтропия 18
 активации 72—73
 изменение 24
 ингибирование 237
 нормальная 21
 принцип *Пригожина* 26
 статистическая интерпретация 22

Эстераза 163

Эффективности фактор 253

Эффект напряжения ориентации и сближения 96

Эффектор
 ингибирующий гетеротропный 271
 сила 260

Яги — Озава метод 231

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие редактора перевода	5
Предисловие автора к русскому изданию	9
Предисловие	11
1. Законы и основные понятия термодинамики	13
1.1. Основные теории и определения	13
1.2. Нулевой закон термодинамики	15
1.3. Первый закон термодинамики	15
1.4. Второй закон термодинамики	18
1.4.1. Статистическая формулировка второго закона	19
1.4.2. Функции термодинамического потенциала	20
1.5. Третий закон термодинамики	21
1.6. Определение термодинамических параметров	22
1.7. Неравновесная термодинамика	24
Литература	26
2. Химическая кинетика	28
2.1. Классификация химических реакций	28
2.2. Скорость реакции	29
2.3. Вещества, влияющие на скорость реакции	29
2.4. Механизмы реакций	30
2.5. Молекулярность, стехиометрия, порядок	31
2.6. Интегральное определение порядка и константы скорости необратимых реакций	33
2.6.1. Мономолекулярная реакция первого порядка	33
2.6.2. Бимолекулярная реакция второго порядка при взаимодействии двух молекул одного вещества друг с другом	36
2.6.3. Реакция второго порядка, протекающая между двумя различными веществами	38
2.6.4. Реакции нулевого и некоторых дробных порядков	40
2.6.5. Реакция n -го порядка	41
2.6.6. Общие соотношения	41
2.7. Интегральное определение порядка реакции и констант скоростей обратимых реакций	43
2.7.1. Мономолекулярные реакции первого порядка	43
2.7.2. Реакции разных порядков	45
2.7.3. Реакция n -порядка	45

2.8. Дифференциальное определение порядка реакций	46
2.9. Последовательные реакции	48
2.10. Скорость параллельных реакций	55
2.11. Скорость автокаталитических реакций	59
2.12. Определение констант скорости релаксационным методом	61
2.13. Изменение константы скорости в зависимости от температуры	69
2.14. Кинетическая теория столкновений	77
2.15. Равновесная статистическая механика	79
2.16. Каталитические реакции	81
2.17. Гомогенный газовый катализ	82
2.17.1. Физический катализ	82
2.17.2. Химический катализ	82
2.18. Гетерогенный катализ (реакции на границе раздела фаз)	83
2.18.1. Полупроводниковые катализаторы	86
2.18.2. Ферментативный катализ	89
2.19. Кинетика химических реакций в водных растворах	90
2.20. Влияние заместителей на реакционную способность соединения А (количественные соотношения между структурой и активностью, КССА)	93
2.21. Кислотно-основный катализ	95
2.22. Кинетический изотопный метод	97
2.22.1. Определение порядка реакции по уменьшению концентрации исходного вещества	101
2.22.2. Определение порядка уменьшения концентрации промежуточного продукта путем введения в него радиоактивной метки	101
2.22.3. Определение порядка реакции путем введения меченого предшественника	102
2.23. Компартментный анализ	103
2.24. Колебательные химические реакции	107
Литература	110
3. Ферментативная кинетика	112
3.1. Кинетика Михаэлиса—Ментен	113
3.1.1. Образование кинетически устойчивого фермент-субстратного комплекса	114
3.1.2. Природа константы K в уравнении	116
3.1.3. Влияние концентрации субстрата на кинетику реакции	119
3.1.4. В ходе реакции происходит образование кинетически устойчивого комплекса фермент — продукт	121
3.1.5. Анализ полной кинетической кривой реакции	123
3.1.6. С каждым активным центром фермента связывается более одной молекулы субстрата	129
3.2. Односубстратные реакции	131
3.2.1. Определение константы Михаэлиса и максимальной скорости	131
3.2.2. Определение константы диссоциации и стехиометрического коэффициента фермент-субстратного комплекса	145
3.2.3. Определение констант скорости	160
3.2.4. Стохастическое решение уравнения скорости для односубстратных реакций	168

3.2.5. Интерпретация уравнения скорости односубстратной реакции с точки зрения молекулярнокинетической модели действия фермента	170
3.2.6. Анализ последовательных (сопряженных) реакций	172
3.2.7. Кинетика параллельных ферментативных реакций	182
3.3. Специфическое ингибирование	183
3.3.1. Конкурентное ингибирование (<i>competitive inhibition</i>)	183
3.3.2. Неконкурентное ингибирование (<i>non-competitive inhibition</i>)	192
3.3.3. Бесконкурентное ингибирование (<i>incompetitive inhibition</i>)	197
3.3.4. Ингибирование смешанного типа (<i>mixed type inhibition</i>)	201
3.3.5. Проблемы интерпретации различных типов ингибирования	204
3.3.6. Определение констант ингибирования	205
3.3.7. Системы со взаимным истощением или псевдонеобратимое ингибирование	209
3.3.8. Кинетика ингибирования	212
3.3.9. Ингибирование медленно реагирующими ингибиторами	215
3.3.10. Ингибирование лабильным ингибитором	216
3.3.11. Кинетика ферментов-самоубийц	217
3.3.12. Ингибирование избытком субстрата и продуктом	219
3.3.13. Система двойного ингибирования	227
3.3.14. Обратимо-необратимое двойное ингибирование	233
3.4. Влияние других лигандов и факторов окружения	233
3.4.1. Влияние активаторов	233
3.4.2. «Либератор»	234
3.4.3. Влияние температуры на скорость и ингибирование ферментативной реакции	235
3.4.4. Влияние pH на скорость ферментативной реакции	238
3.5. Кинетика транспортных процессов и влияние диффузии субстрата на кинетику ферментативных реакций	244
3.6. Кинетика действия иммобилизованных ферментов	251
3.7. Регуляция метаболических процессов	257
3.7.1. Регуляция по механизму обратной связи	261
3.7.2. Регуляция ковалентным связыванием	265
3.7.3. Регуляция ограниченным протеолизом	266
3.8. Кинетика регуляторных ферментов	266
3.8.1. Модель Моно—Уаймса—Шанжэ	268
3.8.2. Модель Кошланда—Немети—Фильмера	272
3.8.3. Определение кинетических параметров аллостерических и кооперативных ферментов	274
3.9. Классификация ферментативных реакций	284
3.10. Некоторые механизмы двухсубстратных реакций	286
3.10.1. Кинетический анализ двухсубстратных реакций	289
3.11. Механизмы трехсубстратных реакций	295
3.11.1. Кинетический анализ трехсубстратных реакций	297
3.12. Изотопный обмен в динамическом равновесии как способ изучения механизма реакции	305
3.12.1. Количественный кинетический метод	305
3.12.2. Качественный изотопный метод	309
3.13. Методы графов для получения уравнения скорости	311
3.14. Приложение	319
3.14.1. Решение линейных дифференциальных уравнений первого порядка	319
3.14.2. Метод наименьших квадратов	321

3.14.3. Определение начальной скорости ферментативной реакции	323
3.14.3. Метод складного ножа	324
3.14.5. Дельта-функция Дирака	325
3.14.6. Теорема Маклорена (или Стирлинга)	325
3.4.7. Теорема Тейлора	325
Литература	325
Предметный указатель	334

Научное издание

Тамаш Келети

Основы ферментативной кинетики

Заведующий редакцией академик О. А. Реутов

Зам. зав. редакцией Н. А. Козырева

Научный редактор И. С. Беленькая

Мл. научный редактор Н. Н. Устякова

Художник А. А. Лукьяненко

Художественный редактор М. Н. Кузьмина

Технический редактор Н. И. Борисова

Корректоры Т. М. Подгорная, Р. Л. Вибке

ИБ № 6721

Подписано к печати 21.12.89. Формат 60×90¹/₁₆. Бумага офсетная № 2.
Гарнитура таймс. Печать офсетная. Объем 11,00 бум. л. Усл. печ. л. 22,00.

Усл. кр.-отт. 22,00. Уч.-изд. л. 22,59. Изд. № 3/5810. Тираж 4100 экз.

Зак. 1 . Цена 4 р. 80 к.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»

В/О «Совэкспорткнига» Государственного комитета СССР по печати.

129820, ГСП, Москва И-110, 1-й Рижский пер., 2.

Набрано в Межиздательском фотонаборном центре издательства «Мир»

Тульская типография Государственного комитета СССР по печати.

300600, Тула, проспект им. В. И. Ленина, 109.