ВЫСШЕЕ ПРОФЕССИОНАЛЬНОЕ ОБРАЗОВАНИЕ

С. Д. ВАРФОЛОМЕЕВ

ХИМИЧЕСКАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ

Допущено
Советом по химии Учебно-методического объединения
по классическому университетскому образованию в качестве
учебника для студентов, обучающихся по специальности
011000 «Химия» и направлению 510500 «Химия»

Москва
ACADEM'A
2005

УДК 577.1(075.8)
ББК 24.239я73
В18

Рецензенты:
чл.-корр. РАН, профессор *С. О. Бачурин*,
чл.-корр. РАН, профессор *Е. С. Северин*

Варфоломеев С. Д.

В18 Химическая энзимология: Учебник / Сергей Дмитриевич Варфоломеев. — М.: Издательский центр «Академия», 2005. — 480 с.

ISBN 5-7695-2062-0

Изложены основы ферментативного катализа, обсуждаются аспекты его практического использования. Рассмотрены структура ферментов и их активных центров, кинетика ферментативного катализа и молекулярные механизмы действия ферментов, физико-химические основы высокой специфичности и эффективности биологического катализа Обсуждаются проблемы генетической инженерии ферментов, получения и применения гетерогенных катализаторов на основе иммобилизованных ферментов. Дается исчерпывающая информация о современных биокаталитических технологиях, ферментной биоинженерии, включая использование ферментов для тонкого органического синтеза, в анализе, медицине и экологии

Для студентов и аспирантов химических факультетов университетов и химических специальностей вузов.

УДК 577.1(075.8)
ББК 24.239я73

ISBN 5-7695-2062-0

© Варфоломеев С Д , 2005
© Издательский центр «Академия», 2005

ПРЕДИСЛОВИЕ

Последние десятилетия характеризуются динамичной интеграцией химии и биологии. Химия как наука о строении и свойствах молекул создала фундаментальный базис развития биохимии и молекулярной биологии. В то же время химическая наука активно исследует и применяет принципы молекулярной организации процессов, характерных для систем, которые мы определяем как «живые». Химия и химическая технология непосредственно используют биологические материалы и катализаторы для создания полезных молекул, многообразие которых постоянно увеличивается.

Многие проблемы фундаментальной и прикладной химии инициировались интересом к превращениям углеводородов и родственных молекул. Это обусловлено тем, что углеводороды нефти были самыми доступными и ресурсоемкими соединениями углерода. В настоящее время ситуация существенно изменилась. Тезис «углерод из биомассы вместо углерода из нефти» стал девизом многих крупнейших химических компаний. Новые материалы, новые виды топлив и систем преобразования энергии, продукты фармацевтической химии и препараты для медицины и сельского хозяйства, высококачественные удобрения создаются с использованием методов биомолекулярной химии.

Принципиальной является полная совместимость получаемых продуктов и используемых технологических процессов с окружающей средой. Химическая индустрия воспринимается обществом как главный фактор загрязнения среды обитания человека. Переход к биомолекулярной химической технологии представляется естественным и логичным и решает на новом уровне проблему взаимоотношения химии и окружающей среды.

Химические процессы с участием биомолекул — традиционная сфера интересов фундаментальной

химической науки. Достаточно сказать, что в настоящее время классические химические журналы до половины своего объема посвящают проблемам современной биомолекулярной химии.

Ключевое место в развитии современной биомолекулярной химии и технологии занимают ферменты. Для реализации различного рода процессов с участием биомолекул необходимы соответствующие инструменты. В природе такого рода высокоточными и селективными агентами являются ферменты — белковые катализаторы.

Перед читателем учебник, посвященный молекулярным аспектам ферментативного катализа и биотехнологическим процессам на его основе. Интенсивное развитие исследований в области катализа ферментами в последние десятилетия привело к тому, что ферменты стали хорошо изученными и широко применяемыми катализаторами.

Ферменты, безусловно, самые распространенные, доступные и самые активные катализаторы. Весь окружающий нас биологический мир насыщен ферментами. Развитие биотехнологии и генетической инженерии сделало возможным получение и производство ферментов с новыми свойствами в неограниченных количествах.

Как же «работают» ферменты? Координированные усилия ученых по изучению структуры белков, их активных центров, исследование кинетики реакций с участием ферментов привели к тому, что молекулярная картина действия многих ферментов стала понятной.

Изучение механизма действия катализатора подразумевает исследование лабильных промежуточных соединений субстрата с компонентами активного центра, их кинетическую и структурную идентификацию. Процессы, происходящие в активном центре фермента при его взаимодействии с субстратом, представляют собой молекулярно-программированные, организованные многостадийные последовательные процессы. При этом ферменты используют образование слабых, но быстро возникающих связей (электростатических, водородных, гидрофобных) для реализации структур, позволяющих в наибольшей степени снизить свободную энергию активации на лимитирующей стадии процесса и в результате ускорить химическую реакцию в 10^{10}—10^{14} раз.

Эти общие и простые соображения — продукт длительной эволюции области, которую называют химической энзимологией. Задачами химической энзимологии являются: изучение структуры и механизмов действия биологических катализаторов, разработка методов получения ферментов с новыми свойствами, развитие многочисленных областей применения ферментов.

Химическая энзимология проникает во все области современной химической науки, активно используя методы и подходы различных областей химии.

Физическая химия и, в частности, химическая кинетика являются основой изучения механизмов ферментативных реакций. Белок как макромолекула — предмет исследования химии полимеров. Использование ферментов для тонкого органического и энантиоселективного синтеза — вклад химической энзимологии в органическую химию. На основе ферментов созданы современные, широко применяемые аналитические методы, такие как иммуноферментный анализ и биосенсоры. Очевидно, что мицеллярная энзимология представляет интерес как для коллоидной химии, так и для белкового катализа. Явление биоэлектрокатализа объединяет энзимологию и электрохимию.

Во многих областях современной химии ферменты находят место либо как объект исследования, либо как инструмент для осуществления тех или иных процессов.

Изучение белков и биологического катализа вошло в образовательные стандарты химических факультетов классических университетов. В Московском государственном университете им. М. В. Ломоносова на химическом факультете с 1974 г. существует кафедра химической энзимологии, обеспечивающая подготовку студентов и аспирантов в этой области. Для студентов химического факультета МГУ в течение многих лет преподается общий курс «Химические основы биологических процессов». Подобные общие курсы читаются во многих классических университетах России и стран СНГ. Вместе с тем в педагогической литературе, в том числе и в мировой, отсутствуют учебники в этой области, предназначенные студентам, получающим глубокое химическое образование. Предлагаемый учебник позволит восполнить этот пробел.

Учебник базируется на общем курсе лекций по химическим основам биологических процессов, а также на ряде спецкурсов, преподаваемых на кафедре химической энзимологии МГУ. Поэтому он может быть использован как для первичного знакомства с предметом, так и для более углубленного его изучения.

Автор выражает благодарность проф. А. В. Левашову, проф. В. И. Тишкову, канд. физ.-мат. наук И. В. Упорову, канд. биол. наук Н. Г. Белогуровой, канд. хим. наук И. В. Гачок за обсуждение учебника и ряд ценных замечаний. Автор благодарен Т. А. Осиповой, С. А. Смирнову, К. И. Саутиевой, оказавшим большую помощь в оформлении рукописи.

Глава 1

ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ И ИССЛЕДОВАНИЯ ФЕРМЕНТОВ

История науки — это история идей, которые изменили мир, но которые сначала были осмеяны и отвергнуты.

Р. Брэдбери

История открытия и исследования ферментов весьма интересна и поучительна. Вопросы о том, что же собой представляют живые системы, какова природа процессов в живом, каковы химические основы наблюдаемых превращений вещества, волновали всех великих химиков XIX столетия.

Современная химия многим обязана Йенсону Якобу Берцелиусу. Он в рамках атомистической теории Дальтона создал первую таблицу атомных масс, разработал номенклатуру соединений и усовершенствовал химическую символику, создал химический язык, которым мы пользуемся в настоящее время. Й. Берцелиус создал электрохимическую теорию химических реакций, ввел представление об изомерии, открыл ряд новых элементов, таких как церий, селен, торий, ванадий. Им же было введено в химию понятие катализа.

К этому времени уже накопилось много необъяснимых фактов, обнаруживающих влияние «третьего тела» на протекание химической реакции. В 1812 г. Ф. Фогель продемонстрировал, что в присутствии угля происходит реакция водорода и кислорода. В 1817 г. Г. Дэви экспериментально показал, что в присутствии металлической платины или палладия происходит медленное горение водорода, монооксида углерода, метана, паров спирта, эфира. Это были «химические фокусы». Г. Дэви демонстрировал, что при внесении в колбу, содержащую пары спирта или эфира, нагретой плати-



Йенсон Якоб Берцелиус (1779—1848)



Гемфри Дэви
(1778—1829)

новой проволоки, часть проволоки, находящаяся в колбе, раскалялась докрасна и «оставалась в таком состоянии, пока в колбе было достаточное количество пара и воздуха». В это время уже были хорошо известны опыты К. Кирхгофа (1811, 1814 г.) по гидролизу крахмала под действием разбавленной серной кислоты и некоего «клейковатого вещества», выделяемого из пшеницы.

Й. Берцелиус был первым, кто осознал значимость влияния «третьего тела». Он использовал данные опытов К. Кирхгофа при построении своей концепции о катализе*. В 1836 г. в статье «Некоторые соображения о до сих пор еще не познанной силе, действующей при образовании органических соединений в живой природе» Й. Берцелиус писал: «Сущность "каталитической силы" состоит в том, что тело лишь своим присутствием, а не благодаря химическому сродству, не проявляющемуся при этой температуре, может возбуждать дремлющие химические сродства взаимодействующих веществ». С самого начала развития представлений о катализе было ясно, что в биологических системах ускорение реакций под действием катализаторов играет первостепенную роль. Й. Берцелиус писал: «В живых растениях и животных, в тканях и жидкостях протекают тысячи *каталитических процессов*, осуществляя большое количество различных химических синтезов из общего исходного материала». Это была гениальная догадка.

Из школьной характеристики Й. Берцелиуса: «У мальчика хорошие способности, но плохое поведение. Его будущее сомнительно».

В современном смысле понятие «катализ» вошло в химию лишь спустя полвека после смерти Й. Берцелиуса благодаря работам Вильгельма Оствальда. Были сформулированы основные понятия о скорости химических реакций, установлены зависимости скорости реакции от концентраций взаимодействующих веществ (Якоб Вант-Гофф (1852—1911) «Очерки по химической динамике» (1884 г.), Нобелевская премия по химии 1901 г. за открытие законов химической кинетики и осмотического давления), прежде чем понятие о катализе прочно вошло в категорию фундаментальных представлений химии. В. Оствальд определил катализатор как ве-

---

* Термин «катализ» впервые был использован алхимиком Андреасом Либавием (1550—1616), однако он не придавал ему смысла, определенного Й. Берцелиусом.

щество, «которое, не входя в конечный продукт химической реакции, увеличивает ее скорость». Соответственно катализ представляет собой «ускорение медленно протекающих химических процессов в присутствии посторонних веществ». В 1901 г. В. Оствальд писал, что он различает четыре типа катализаторов: контактное действие «зародышей», гомогенный катализ, гетерогенный катализ и действие ферментов. В 1909 г. В. Оствальду была присуждена Нобелевская премия по химии за работы по катализу и основополагающие исследования скоростей химических реакций.



Вильгельм Оствальд (1853—1932)

Таким образом, основоположники теории катализа изначально рассматривали ферментативный катализ как неотъемлемую составную часть катализа в целом.

Представления о том, что катализ в живых системах осуществляют химические вещества, также имеют свою историю.

Впервые каталитическое действие биоматериала было обнаружено Константином Сигизмундовичем Кирхгофом (1764—1833). К. Кирхгоф (аптекарь и химик по образованию) занимался проблемой получения сахара из крахмала*. В это время он работал в главной аптеке Санкт-Петербурга. К. Кирхгоф понимал, что сахар и крахмал являются химически родственными соединениями. В 1811 г. он представил в Академию наук образцы сахарного сиропа и кристаллического «сахара», полученные им путем гидролиза картофельного крахмала под действием разбавленной серной кислоты. Реакция протекала сутки, при этом серная кислота не расходовалась и по завершении процесса нейтрализовалась расчетным количеством карбоната кальция. Это был истинно каталитический процесс. В 1812 г. К. Кирхгофом были изложены основы этого процесса в статье «О приготовлении сахара из крахмала». Расширяя свои исследования, К. Кирхгоф обнаружил, что аналогичного результата можно добиться и без добавления кислоты, а под действием «клейковатого вещества» (клейковины), которое он получил из пшеничного зерна. 30 ноября 1814 г. К. Кирхгоф выступил с докладом «О получении сахара при осолаживании злаков». Впервые было показано, что агентом, обеспечивающим гидролиз, является отличное от крахмала «клейковатое вещество». Работая в России, К. Кирхгоф провел большое число исследова-

* Проблема гидролитического расщепления различного углеводного сырья не потеряла своего значения и сегодня. В середине 1960-х гг. она вышла на технологический уровень, и сейчас создана мощная индустрия ферментативного получения сахаров путем гидролиза крахмала под действием глюкоамилаз.

ний в области технической химии. В 1812 г. он был избран экстраординарным академиком Петербургской академии наук, был членом Падуанской и Бостонской академий.

Все великие химики первой половины XIX в. участвовали в дискуссии о природе процессов, происходящих в живых системах. В качестве модели и главного объекта анализа и дискуссии рассматривался процесс конверсии сахара в спирт или уксусную кислоту (винное или уксуснокислое брожение).

Парижская академия наук в 1799 г. задала конкурсный вопрос: «Чем отличаются растительные и животные вещества, действующие как фермент*, от тех веществ, которые подвергаются ферментации».

Обоснованный ответ на этот вопрос был дан французским исследователем Шарлем Каньяр-Латуром (Ш. Каньяр де ла Тур) (1777—1859). Он экспериментально показал, что дрожжи, осуществляющие ферментацию, — не просто химические вещества, а живые организмы, способные расти и размножаться, причем исходные вещества и продукты реакции — простые химические соединения. Этот вывод был встречен в штыки Й. Берцелиусом, Ю. Либихом, Ф. Вёлером.

Вклад Юстуса фон Либиха в развитие органической химии и агрохимии сравним лишь со значением работ Й. Берцелиуса для общей и неорганической химии. Ю. Либихом создана теория радикалов, разработаны методы анализа и впервые осуществлен синтез многих органических соединений, показана роль фосфора и азота в развитии растений, впервые использованы минеральные удобрения — суперфосфат и сульфат аммония для повышения плодородия почв.

> *Великий Ю. Либих в школе имел много проблем. Он увлекался химией и пренебрегал традиционными школьными предметами. Отец устроил его практикантом в аптеку. Но Юстус больше интересовался химическими экспериментами, чем производством лекарств. Опасные опыты с серебром и ртутью он проводил тайно. Опыты закончились сильным взрывом, взлетела на воздух крыша аптеки. На этом карьера Либиха-аптекаря закончилась.*

Фридрих Вёлер (1800—1882) знаменит прежде всего своими работами по получению мочевины и щавелевой кислоты (простейших органических соединений) из неорганических веществ. Им также впервые получен в значительных количествах металли-

---

* Термины «фермент» (*fermentum*), «ферментация» (*fermentation*) происходят от лат. *fervere* — вскипать или *ferveo* — пениться и отражают наблюдаемый процесс пенообразования при спиртовом брожении. Термины уходят своими корнями в алхимию.



Юстус фон Либих
(1803—1873)



Фридрих Вёлер
(1800—1882)

ческий алюминий, открыта практически важная реакция получения ацетилена из карбида кальция.

Ф. Вёлер так описал лабораторию Й. Берцелиуса, в которой были сделаны выдающиеся научные открытия: «Рядом с жилым помещением находились две очень скромно оборудованные комнаты. Там не было газа и воды. В одной комнате стоял обычный деревянный стол, у стены — несколько маленьких шкафов с небольшим количеством реагентов. Канализационную систему заменяли сосуд с водой, фаянсовая раковина и стоящие внизу ведра. Во второй комнате находились весы и другие инструменты и мастерская с маленьким токарным станком. На кухне выполняла свои служебные обязанности Анна, которая была служанкой и лаборанткой великого ученого. Там же стояла маленькая печь и постоянно горячая песочная баня». При этом Й. Берцелиус утверждал, что хороший химик должен уметь просверлить отверстия пилой.

Й. Берцелиус, Ю. Либих и Ф. Вёлер представляли себе процесс брожения как истинный химический процесс, в котором осадок (дрожжи) обладает некоторой химической активностью. Фактически вопрос сводится к тому, что же представляет собой катализатор: химическое вещество неизвестной, возможно, очень сложной структуры или живой микроорганизм? Ю. Либих, Й. Берцелиус, Ф. Вёлер и многие другие химики не могли воспринять идею о том, что живые организмы при брожении осуществляют химическую реакцию, несмотря на то что поток фактов, подтверждающих это, непрерывно рос.

Однажды у Анны, которая была служанкой Й. Берцелиуса, журналисты спросили, как работает ее шеф и что он делает весь день. Служанка ответила, что рано утром она приносит

ему различные порошки, жидкости и другие химические вещества.

— Что он делает со всем этим? — спросили журналисты.

— Он смешивает все в большом сосуде.

— Что дальше?

— Затем нагревает смесь и переливает в другую посуду.

— А что в конце?

— В конце он выливает все в ведро, на следующий день начинает все сначала.

Бурная дискуссия о природе химических реакций в живом развернулась между Л. Пастером, Ю. Либихом и М. Бертло.

Луи Пастер был ярым сторонником того, что брожение (т.е. конверсию сахара в спирт или в уксусную кислоту и сопутствующие продукты) могут осуществить лишь живые клетки микроорганизмов. Л. Пастер отвергал саму идею необходимости существования растворимых ферментов, участвующих в брожении. Он писал: «Я не вижу никакой необходимости ни в существовании этих ферментов, ни в полезности их функционирования при брожении».

Отметим, что Ю. Либих, проводя различные химические реакции с органическими молекулами, не мог допустить мысли, что для реализации простого химического процесса — окисления спирта в уксусную кислоту (реакция идет под действием различных химических окислителей) — необходимо участие такого сложного агрегата, как целая клетка живого микроба*. Ю. Либих предполагал, что наблюдается всего лишь корреляция между «физиологическим процессом» образования продуктов и ростом клеток.

Значительную роль в выяснении вопроса сыграла дискуссия между Л. Пастером и Марселеном Бертло. Работы М. Бертло внесли громадный вклад в развитие синтетической органической химии. Им были осуществлены реакции получения уксусной и муравьиной кислот, проведен синтез этанола из этилена, синтез жиров из глицерина и карбоновых кислот, синтез бензола из ацетилена, созданы основы газовой электрохимии и проведен синтез ацетилена в электрическом разряде.

М. Бертло полагал, что процесс брожения осуществляется органической субстанцией дрожжей. Важным был эксперимент М. Бертло, в котором он разрушил клетки дрожжей, получил бесклеточный экстракт, переосадил его спиртом без существенной потери активности и доказал, что полученная субстанция обладает каталитическими свойствами. Этот эксперимент показал, что «фер-

---

* В конечном счете Ю. Либих оказался прав. Известно, что конверсию этанола в уксусную кислоту осуществляют два фермента — алкогольдегидрогеназа и ацетальдегидрогеназа.



Луи Пастер
(1822—1895)



Марселен Бертло
(1827—1907)

мент» и живые клетки микроорганизмов не одно и то же, продемонстрировал, что клетки содержат вещества, реально осуществляющие химическую реакцию.

На то, что брожение имеет характер каталитического процесса, указывал Эйхальд Митчерлих. В 1843 г. он отмечал, что для проведения процесса сбраживания сахара необходимо незначительное количество дрожжей (менее 1 %), несоизмеримое с количеством конвертированного субстрата, т. е. вкладом дрожжей как вещества в материальный баланс реакции можно пренебречь.

Дискуссия закончилась, но участники остались при своем мнении. Необходимо отметить: авторитет Л. Пастера был настолько высок, что его мнение, что лишь живые клетки микроорганизмов являются носителями процессов конверсии вещества, господствовало среди микробиологов длительное время. Его влияние на исследователей ощущалось и в XX в.

Особую роль в дискуссии сыграла неоднозначность в терминах, существовавшая в те годы. В течение многих лет дрожжи называли ферментом. Л. Пастер был против распространения термина «фермент» на растворимые вещества, способные проводить конверсию сахара, а понимал под «ферментом» живые растущие клетки, осуществляющие образование этиленового спирта и CO_2. Термины «энзим» и «энзимология» были введены в 1876 г. В. Кюном для обозначения «неорганизованных», «бесформенных» ферментов, таких как диастаза, пепсин, трипсин, известных уже тогда.



Эйхальд Митчерлих
(1794—1863)

Точку в этом историческом споре поставили опыты Э. Бухнера (1897 г.), кото-

рый продемонстрировал возможность проведения процесса брожения под действием бесклеточных экстрактов. Э. Бухнер механически разрушал клетки дрожжей, наблюдая за процессом под микроскопом, проводил экстракцию водой с отделением жидкости от твердых частиц фильтрованием под высоким давлением. Полученный раствор смеси ферментов был способен к интенсивному выделению спирта и CO_2 при введении его в раствор сахарозы. На реакцию не действовали классические антисептики. Опыты показали, что брожение — результат действия ферментов, не зависящего от целостности клетки. В 1907 г. Э. Бухнеру была присуждена Нобелевская премия по химии.

Результатом работы большой группы исследователей, начиная с К. Кирхгофа, Й. Берцелиуса, заканчивая В. Оствальдом и Э. Бухнером, явилось утверждение, что ферменты — это химические катализаторы и необходимо искать объяснения действия ферментов на химической основе.

Таким образом, стало ясно следующее.

• Химический катализ и биологический катализ — это явления одного порядка; катализаторы («третье тело») обладают общим свойством — они способны ускорять химические реакции. При этом существуют как общие катализаторы, способные ускорять многие реакции (например, кислоты), так и специфические катализаторы, ускоряющие лишь узкий круг реакций и работающие с ограниченным набором субстратов. Последнее свойство характерно для ферментов.

• В клетках микроорганизмов, растений, животных, человека имеются вещества, обладающие исключительно высокой каталитической активностью.

• Биологические катализаторы способны ускорять как простейшие химические реакции (инверсию сахара, гидролиз белков, реакции окисления), так и сложные процессы, такие как диспропорционирование сахара в этанол и CO_2.

Важным результатом была демонстрация того факта, что биокаталитической функцией обладают белки. Наиболее четко это было сформулировано немецким исследователем М. Траубе. В 1858 г. он в рамках своего представления о действии ферментов охарактеризовал ферменты как химические вещества белковой природы. Этому предшествовал этап накопления экспериментальных фактов. В 1830 г. П. Робике и А. Бутрон-Шаляр исследовали гидролиз амидалина под действием измельченного горького миндаля. В 1831 г. Э. Лейксом было обнаружено, что слюна обладает активностью диастазы. Впервые достаточно очищенный препарат фермента удалось получить А. Пайену и Ж. Персу в 1833 г. Они выделили амилазу из солода, осадив ферментный препарат спиртом. Аналогичными методами удалось получить ферментный препарат синигриназы (Ж. Форс, 1835 г.), пепсина (Т. Шванн, 1836 г.), трипсина

(Л. Корвизар, 1857 г.). Заметную роль в развитии методологии выделения ферментов сыграли работы Э. Брюкке и А. Я. Данилевского, которые использовали явление адсорбции для разделения белков. В 1862 г. А. Я. Данилевскому впервые удалось разделить трипсин и панкреатическую амилазу. Эти работы стали основой современных методов получения белков.



Эмиль Фишер
(1852—1919)

Следующий этап исследования ферментов связан с осознанием того факта, что ферменты обладают способностью взаимодействовать лишь с избранными субстратами, т.е. обладают специфичностью. Также было доказано, что субстрат в процессе каталитической реакции образует лабильный комплекс с белком. Детальное исследование ряда систем позволило Эмилю Фишеру сформулировать представления о специфичности ферментативного катализа. Э. Фишер — выдающийся химик-органик. Он занимался изучением природы белков, сахаров, красителей, азотистых оснований, дубильных веществ. Э. Фишер гидролитически расщепил белки и показал, что все белки построены из α-аминокислот. Ряд аминокислот он получил встречным синтезом.

Э. Фишер происходил из богатой купеческой семьи, и отец хотел, чтобы Эмиль пошел по его стопам. Эмиля отдали на практику к родственнику, но его совершенно не интересовала торговля. Через некоторое время родственник заявил, что из него ничего не получится. В конце концов отец Эмиля отказался от этой идеи и вынес приговор: «Жаль, что для купца он слишком глуп. Пусть лучше изучает химию».

Э. Фишер синтезировал дипептиды и олигопептиды. В 1907 г. им синтезирован пептид, состоящий из восемнадцати различных аминокислот. В 1894 г. Э. Фишер начал цикл работ по изучению специфичности действия ферментов. Эти работы были продолжением его исследований структуры сахаров и пептидов. Для объяснения специфичности действия ферментов Э. Фишер сформулировал положение о том, что субстрат подходит к ферменту, как ключ к замку. Это положение не потеряло актуальности и сегодня лежит в основе представлений о стерическом соответствии между субстратом и ферментом.

Выдающиеся работы были выполнены Э. Фишером в области химии углеводов и красителей. Работы Э. Фишера заложили основы изучения нуклеиновых кислот. За исследования сахаров и пуриновых производных в 1902 г. Э. Фишер был удостоен Нобелевской премии по химии.



Леон Михаэлис
(1875—1949)

То, что фермент взаимодействует с субстратом и образует фермент-субстратный комплекс, следовало из анализа кинетики каталитической реакции. Изучение кинетических закономерностей действия ферментов начиналось на этапе развития химической кинетики.

Впервые скорость ферментативных реакций анализировал Г. Тамман. Он провел тщательное сравнительное исследование действия ферментов и химических катализаторов реакции гидролиза и показал, что ферментативный гидролиз гликозидов и дисахаридов аналогичен классическому кислотному, исследуемому со времен К. Кирхгофа. Г. Тамман впервые изучил температурные зависимости скорости ферментативной реакции. Результаты работы были опубликованы в 1892 г. в Журнале русского физико-химического общества и впоследствии в Журнале физической химии, издаваемом Я. Вант-Гоффом и В. Оствальдом.

Завершенную форму химико-кинетические исследования приобрели в работах Луи Анри (1834—1913) и Леона Михаэлиса. Из кинетических данных однозначно следовало, что в процессе каталитического действия фермент образует комплекс с субстратом. Интерпретация Л. Анри и Л. Михаэлисом роли этого комплекса была различной (см. гл. 4), однако оба подхода для объяснения экспериментальных данных постулировали образование фермент-субстратного комплекса.

Значительный вклад в фундамент кинетики ферментативного катализа внесли работы Э. Армстронга (1904 г.), обнаружившего эффекты ингибирования ферментативных реакций аналогами субстрата, и С. Соренсена (1868—1939), продемонстрировавшего зависимость скоростей ферментативных реакций от концентрации ионов водорода.

* * *

Мудрее всего — время, ибо оно раскрывает все.

Фалес

История открытия ферментов и первых исследований биокатализаторов интересна и поучительна. Практически все великие химики XIX столетия внесли свой вклад в создание фундамента химической энзимологии, их привлекал феномен биологического катализа. Работая в различных областях химии (общая и неорганическая химия, органическая химия, физическая химия), каждый

сформировал свое понимание этой загадки природы. Общий междисциплинарный характер химической энзимологии сохраняется и сегодня.

Многие положения, сформулированные исследователями в XIX в., предметы споров, мнения и выводы сегодня могут показаться очевидными и в чем-то наивными. Однако это кажущаяся простота. Каждый шаг вперед — это шаг в неизвестное. Таков тернистый путь постижения истины.

Двадцатый век внес много нового в понимание феномена биологического катализа. Новые физико-химические методы исследования качественно изменили облик химической энзимологии. Методы молекулярной биологии и генетической инженерии многое прояснили в механизмах реакций и позволили получать новые биокатализаторы, не существующие в природе. В XX в. в науку пришло много исследователей, что способствовало резкому количественному и качественному росту знаний. Наконец, появились методы работы с большими объемами информации и проведения вычислений гигантских объемов. Как многие области химии, химическая энзимология стала разделом технической химии. Все это создает качественно новый уровень понимания проблемы.

Тем не менее сегодня мы не можем утверждать, что до конца понимаем феномен биологического катализа. Непонятно, каким образом возникли биологические катализаторы, обладающие фантастической активностью, как они эволюционируют, не ясны детали многих ферментативных реакций, не до конца изучены механизмы регуляции активности ферментов и механизмы регуляции их экспрессии, не всегда однозначно прослеживается связь каталитической активности фермента с физиологическими откликами клетки. Самым непонятным и интригующим остается вопрос о происхождении биокатализаторов и биологических систем в целом. Современное понимание феномена ферментативного катализа представлено в этой книге.

Глава 2

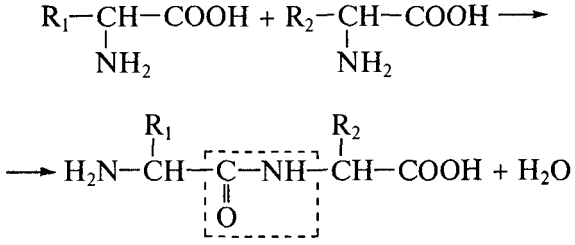
ХИМИЯ БЕЛКА

Смешанное тело сложено из тех составляющих, на которые оно разделяется анализом и из которых оно образуется синтезом. Справедливость этого вполне очевидна из представления о целом и его частях и не требует какого-либо доказательства. Напомним лишь, что в химии синтез нередко более достоверен, чем анализ, и даже он один достаточен для показания составляющих.

М.В.Ломоносов

2.1. Аминокислоты и пептидная связь

Основой биополимерной цепи, формирующей белки и ферменты, являются α-аминокислоты. В природе известно более 500 различных аминокислот, однако белки формируются всего лишь из 20, при этом аминокислоты белков представляют собой α-аминокислоты. Реакция синтеза белков из аминокислот в химическом смысле является реакцией поликонденсации, при которой образуются амидные (пептидные) связи между карбоксильной группой и аминогруппой аминокислоты:



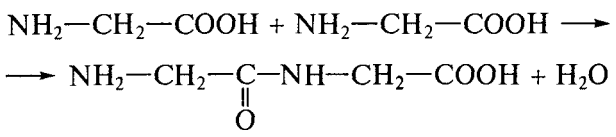
Таким образом, в любой полипептидной цепи имеются свободная аминогруппа (на N-конце) и свободная карбоксильная группа (на С-конце). При pH 7 аминогруппа, как правило, протонирована и, значит, положительно заряжена, карбоксильная группа депротонирована и заряжена отрицательно.

Реакция образования пептидной связи обратима. Состояние равновесия зависит от строения радикала R, показателя pH раствора, содержания воды. Константа равновесия K может быть вычислена на основании свободной энергии ΔG° реакции образования пептидной связи

$$K = \exp[\Delta G^\circ/(RT)].$$

Далее в качестве примера приведены значения стандартной свободной энергии ΔG° реакций образования пептидной связи при взаимодействии соответствующих аминокислот в водном растворе при pH 7 и температуре 25 °C:

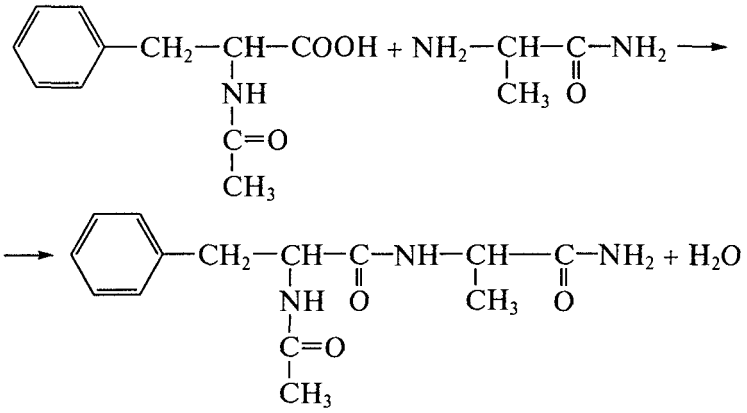
1)



Глицилглицин

ΔG° = 18 кДж/моль;

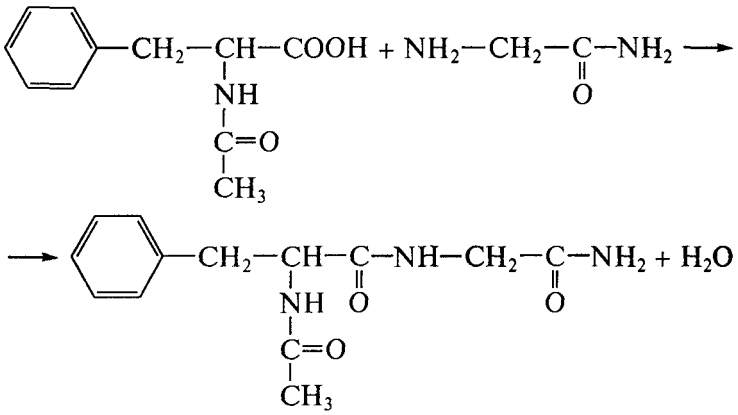
2)



N-ацетилфенилаланилаланинамид

ΔG° = 5,4 кДж/моль;

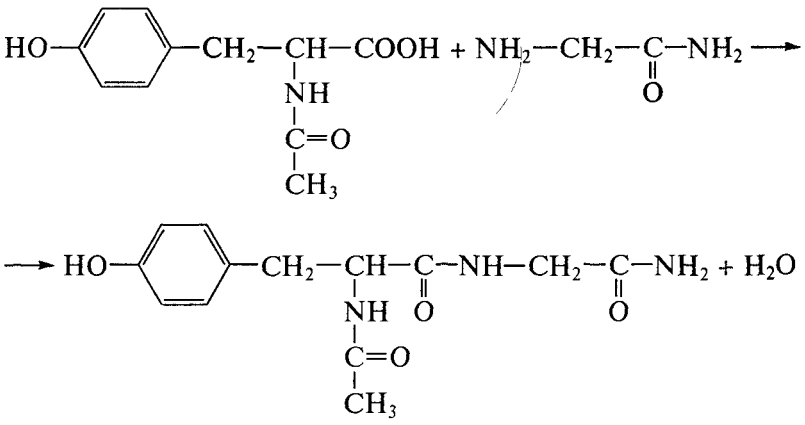
3)



N-ацетилфенилаланилглицинамид

ΔG° = 3,4 кДж/моль;

4)



N-ацетилтирозилглицинамид

ΔG° = 1,8 кДж/моль.

В соответствии с принципами химической термодинамики процесс протекает самопроизвольно, если свободная энергия реакции отрицательная. Как следует из приведенных выше данных, пептидные связи в водной среде термодинамически неустойчивы (свободные энергии реакций синтеза пептидов положительные). Стабильность пептидной связи в значительной степени зависит от строения аминокислот, образующих пептид. Например, введение метильной группы в углеводородную цепь уменьшает прочность связи на 2 кДж/моль (сравните вторую и третью реакции); введение гидроксильной группы в ароматическое кольцо стабилизирует пептидную связь на 1,6 кДж/моль (сравните третью и четвертую реакции).

При равновесии в водном растворе пептиды и белки должны были бы быть полностью гидролизованы и представлять собой смеси свободных аминокислот.

Из сказанного выше можно сделать два вывода.

1. Синтез белков и пептидов — термодинамически невыгодный процесс, требующий затрат энергии. Поэтому реальный синтез белка в биосистемах идет с одновременным расходованием аденозин-5′-трифосфорной кислоты (АТФ) — источника энергии для биологических процессов:

$$\text{АТФ} + H_2O \rightleftharpoons \text{АДФ} + H_3PO_4, \quad \Delta G^\circ = -34 \text{ кДж/моль (pH 7)},$$

где АДФ — аденозин-5′-дифосфорная кислота.

2. Значения свободной энергии реакции образования пептидной связи не велики: для второй реакции 5,4 кДж/моль, для четвертой реакции 1,8 кДж/моль, что позволяет проводить синтез белков и пептидов при относительно небольших затратах энергии

(для сравнения: свободная энергия реакции гидролиза уксусного ангидрида равна –91,1 кДж/моль).

Двадцать аминокислот, из которых построены все белки биологического мира, приведены в табл. 2.1.

Все аминокислоты, за исключением глицина, имеют хиральный атом в α-положении. Все природные аминокислоты в белках представлены левовращающим L-диастереомером.

Первичная структура белка (последовательность аминокислот) записана в молекулах дезоксирибонуклеиновых кислот (ДНК) в виде последовательности тринуклеотидных фрагментов — кодонов. Азотистые основания, определяющие генетический код, представлены в нуклеиновых кислотах урацилом (U), тимином (T), цитозином (C), аденином (A) и гуанином (G). Аденин, гуанин, цитозин входят в состав как ДНК, так и рибонуклеиновых кислот (РНК), урацил — только в состав РНК, тимин — преимущественно в ДНК. Каждая аминокислота кодируется в молекуле ДНК трехнуклеотидным кодом. При этом из четырех оснований нуклеотидов может быть составлено 64 различных сочетания. Поскольку аминокислот всего 20, генетический код является вырожденным, т.е. одной аминокислоте соответствуют несколько кодонов. Генетический код, т.е. соответствие между аминокислотой и кодонами, представлен в табл. 2.1. Видно, что лейцин, серин и аргинин представлены в генетическом коде шестью кодонами, а триптофан и метионин — всего одним.

Каждый белок индивидуален; в состав каждой белковой молекулы входит строго определенное число аминокислот. Однако если рассмотреть большую выборку белков, можно получить информацию о среднем содержании каждой аминокислоты в биологическом мире. Эти данные приведены на рис. 2.1. Видно, что наиболее распространенной в живой природе аминокислотой является лейцин, на втором месте — аланин, третью позицию занимает серин. Наиболее редкая аминокислота в белках — триптофан.

Разнообразие белковых структур колоссально. Число N возможных вариантов структур задается уравнением

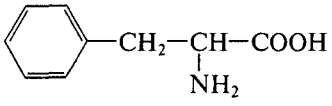
$$N = 20^n,$$

где n — число аминокислот в белке. Для относительно небольшого белка, состоящего из 100 аминокислот, число возможных структур равно $20^{100} \approx 10^{130}$ (для сравнения: число нуклонов (протонов и нейтронов) во Вселенной составляет 10^{80}, что в 10^{50} раз меньше).

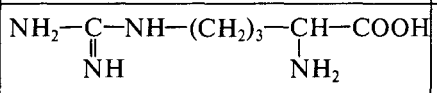
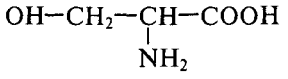
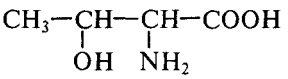
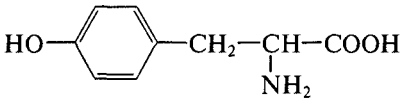
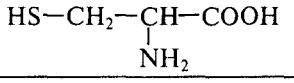
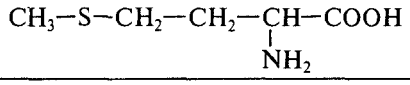
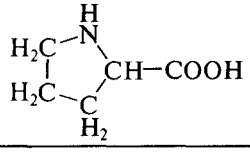
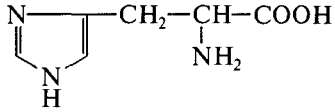
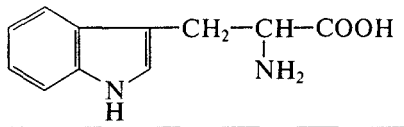
Химические свойства аминокислот в белках, т.е. их способность вступать в те или иные реакции, определяются свойствами бокового радикала R. Условно аминокислоты можно разделить на несколько групп. Наибольшей химической стабильностью обладают аминокислоты (аланин, валин, лейцин, изолейцин), содер-

Таблица 2.1

Аминокислоты, из которых построены белки

Название	Обозначение*	Структурная формула	Кодон**
Глицин	Gly (G)	$NH_2—CH_2—COOH$	GGU GGC GGA GGG
Аланин	Ala (A)	$CH_3—\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{\vert}{CH}}—COOH$	GCU GCC GCA GCG
Валин	Val (V)	$H_3C\diagdown\!\!\diagup CH—\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{\vert}{CH}}—COOH$ $H_3C\diagup\!\!\diagdown$	GUU GUC GUA GUG
Лейцин	Leu (L)	$H_3C\diagdown\!\!\diagup CH—CH_2—\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{\vert}{CH}}—COOH$ $H_3C\diagup\!\!\diagdown$	UUA UUG CUU CUC CUA CUG
Изолейцин	Ile (I)	$CH_3—CH_2\diagdown\!\!\diagup CH—\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{\vert}{CH}}—COOH$ $H_3C\diagup\!\!\diagdown$	AUU AUC AUA
Фенилаланин	Phe (F)		UUU UUC
Аспарагиновая кислота	Asp (D)	$HOOC—CH_2—\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{\vert}{CH}}—COOH$	GAU GAC
Глутаминовая кислота	Glu (E)	$HOOC—CH_2—CH_2—\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{\vert}{CH}}—COOH$	GAA GAG
Аспарагин	Asn (N)	$NH_2—\underset{\displaystyle O}{\underset{\Vert}{C}}—CH_2—\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{\vert}{CH}}—COOH$	AAU AAC
Глутамин	Gln (Q)	$NH_2—\underset{\displaystyle O}{\underset{\Vert}{C}}—CH_2—CH_2—\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{\vert}{CH}}—COOH$	CAA CAG
Лизин	Lys (K)	$NH_2—(CH_2)_4—\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{\vert}{CH}}—COOH$	AAA AAG

Окончание табл. 2.1

Название	Обозначение*	Структурная формула	Кодон**
Аргинин	Arg (R)		CGU CGC CGA CGG AGA AGG
Серин	Ser (S)		UCU UCC UCA UCG AGU AGC
Треонин	Thr (T)		ACU ACC ACA ACG
Тирозин	Tyr (Y)		UAU UAC
Цистеин	Cys (C)		UGU UGC
Метионин	Met (M)		AUG
Пролин (иминокислота)	Pro (P)		CCU CCC CCA CCG
Гистидин	His (H)		CAU CAC
Триптофан	Trp (W)		UGG

* В скобках указано однобуквенное обозначение соответствующей аминокислоты.
** G — гуанин; U — урацил; C — цитозин; A — аденин.

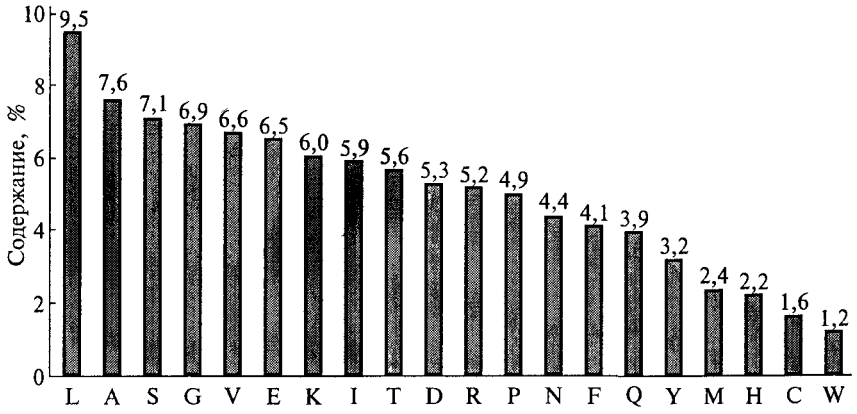


Рис. 2.1. Среднее содержание аминокислот в биологическом мире

жащие в качестве бокового остатка алифатический радикал. Эти аминокислоты практически не подвергаются химической модификации.

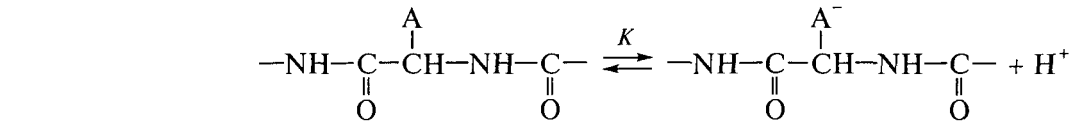
Химические свойства серина, треонина и цистеина определяются реакционной способностью OH- и SH-группы. Возможность химической модификации фенилаланина, тирозина и триптофана обусловлена способностью ароматических радикалов этих аминокислот участвовать в реакциях электрофильного замещения. Свойства аспарагиновой и глутаминовой кислот определяются реакционной способностью карбоксильной группы; свойства лизина и N-концевой аминокислоты — способностью аминогруппы вступать в те или иные химические реакции.

Однако главной особенностью многих аминокислот является их способность к протонированию. Этот фактор определяет многие свойства белков, ферментов и их активных центров.

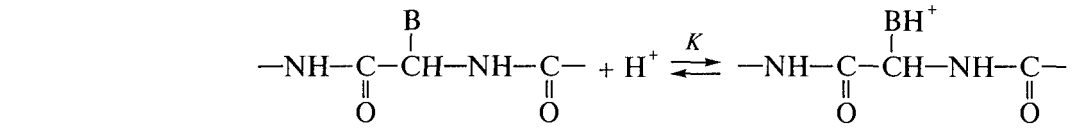
2.2. Модификация белков протонированием. Белки как полиэлектролиты

Некоторые аминокислоты содержат в качестве заместителей функциональные группы, являющиеся кислотами и основаниями. Эти группы могут присоединить протон и изменить знак заряда молекулы в диапазоне pH 3 — 12. Речь идет об аминогруппе и карбоксильной группе соответственно N-концевой и C-концевой аминокислоты, карбоксильных группах аспарагиновой и глутаминовой кислот, SH-группе цистеина, имидазольной группе гистидина, фенольной группе тирозина, ε-аминогруппе лизина и гуанидиновой группировке аргинина.

Карбоксильная и фенольная группы тирозина (А) выступают в этих реакциях как донор протонов:



Аминогруппы, имидазол гистидина и гуанидиновая группировка аргинина (В) служат акцепторами протонов:



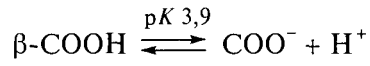
Реакции переноса протона являются обратимыми и могут быть охарактеризованы константами равновесия

$$K = \frac{[A^-][H^+]}{[AH]}, \quad K = \frac{[B][H^+]}{[BH^+]}.$$

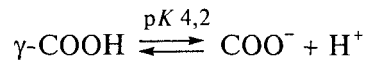
В зависимости от концентрации ионов водорода в растворе функциональные группы могут находиться в протонированном и ионизированном состоянии.

Ниже приведены реакции диссоциации и значения pK наиболее важных функциональных групп аминокислот:

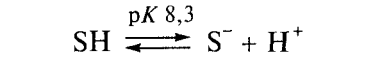
аспарагиновая кислота



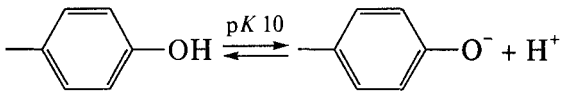
глутаминовая кислота



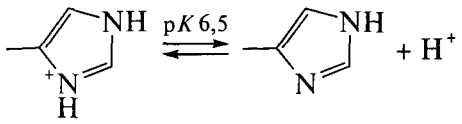
цистеин



тирозин



гистидин



лизин

$$\varepsilon\text{-}NH_3^+ \overset{pK\ 10,5}{\rightleftharpoons} \varepsilon\text{-}NH_2 + H^+$$

аргинин

$$-NH-\overset{\overset{+}{|}}{C}-NH_2 \overset{pK\ 12,5}{\rightleftharpoons} -NH-\overset{\|}{C}-NH_2 + H^+$$

NH_2 $\qquad\qquad$ NH

Диссоциация карбоксильной группы С-конца полипептидной цепи характеризуется $pK \sim 3{,}5$; аминогруппы N-конца — $pK \sim 9$.

Приведенные значения pK дают представление о диапазонах pH, в котором та или иная группа претерпевает изменение.

На рис. 2.2 показано, как зависит степень ионизации различных аминокислот от показателя pH. При pH > 3 карбоксильные группы аминокислот ионизированы (отрицательно заряжены), а при pH < 3 — протонированы (нейтральная форма). Аминогруппы лизина, имидазола гистидина и гуанидиновой группировки аргинина при pH < 6—12 находятся в протонированном состоянии (положительно заряжены), при pH > 6—12 — в депротонированном (нейтральная форма).

В реальных белках значения pK ионогенных групп могут изменяться в широком интервале. Свойства этих групп в значительной степени зависят от их окружения и доступности для молекул воды. В некоторых случаях наблюдается смещение pK на несколько единиц.

При каждом значении pH молекула белка характеризуется определенным распределением зарядов, которое зависит от природы ионогенных групп и степени их ионизации. Значение pH, при котором молекула белка электронейтральна, называется изоэлек-

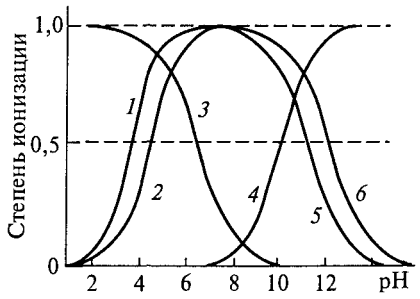


Рис. 2.2. Степень ионизации ионогенных групп различных аминокислот полипептидной цепи:

1 — карбоксильная группа аспарагиновой кислоты; *2* — карбоксильная группа глутаминовой кислоты; *3* — имидазольная группа гистидина; *4* — фенольная группа тирозина; *5* — ε-аминогруппа лизина; *6* — гуанидиновая группировка аргинина

трической точкой и обозначается pI. Ниже приведены значения pI для некоторых белков и ферментов:

Пепсин	1,0	Глюкозоксидаза	4,3
Родопсин	4,5	Гексокиназа	4,7
Инсулин	5,35	Ацетилхолинэстераза	5,0
Каталаза	5,6	α-Амилаза	5,7
Карбоксилаза	6,0	α-Химотрипсин	7,8
γ-Глобулин	6,5	Трипсин	10,8
Гемоглобин	7,0	Папаин	9,0
Рибонуклеаза	7,8	Уреаза	5,0
Цитохром *c*	10,6	Альдолаза	6,6

При pH > pI молекула белка заряжена отрицательно, при pH < pI — положительно.

Процессы протонирования и депротонирования функциональных групп молекул белка играют важную роль в катализе. Присоединение или передача протонов оказывает существенное влияние на электронные характеристики функциональных групп и соответственно на роль этих групп в катализе. Если функциональная группа играет роль нуклеофильного агента в каталитическом цикле, присоединение протона превращает ее из основания в кислоту и придает ей электрофильные свойства, что ведет к утрате группой каталитических свойств. Это проявляется в том, что зависимости каталитической активности ферментов от показателя pH имеют, как правило, экстремальный характер.

В то же время одна и та же функциональная группа в зависимости от степени протонирования может играть роль как электрофильного, так и нуклеофильного агента. Так, в активных центрах многих ферментов карбоксильные группы аспарагиновой и глутаминовой кислот в зависимости от их ионного состояния «работают» как электрофильные или нуклеофильные агенты, атакующие субстрат (см. гл. 8).

2.3. Химическая модификация аминокислот белков

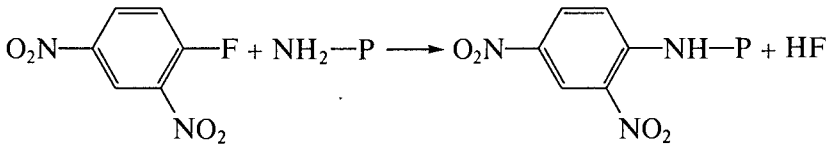
Особый этап в развитии химической энзимологии и химии белка связан с разработкой реакций химического превращения функциональных групп аминокислот полипептидной цепи. Эти реакции широко используются для идентификации функциональных групп, определяющих каталитическую активность ферментов. Кроме того, эти реакции позволили разработать методы манипулирования белками в практических целях (химическое «сшивание» белков с различными носителями, получение конъюгатов белков и т. п.).

Далее рассмотрены типичные и наиболее часто используемые реакции модификации некоторых функциональных групп аминокислот белков.

Свободная аминогруппа N-концевой аминокислоты, ε-аминогруппа лизина. Эти группы частый объект модификации.

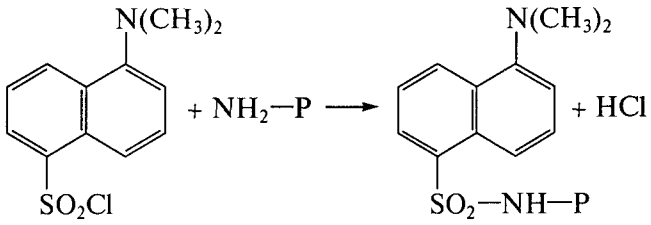
Хромофорные и флуоресцентные метки. Несколько реакций функциональных групп аминокислот сыграли ключевую роль в изучении структуры белков и идентификации природы каталитических групп активного центра.

Свободные аминогруппы могут взаимодействовать с динитрофторбензолом с образованием хромофорного соединения:



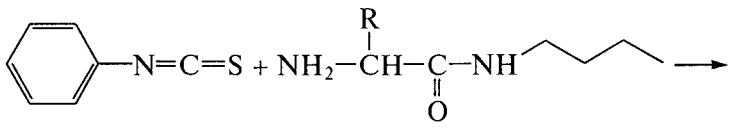
(Здесь и далее P — белок.) Таким образом можно ввести хромогенную метку в N-концевую аминогруппу пептида. Аналогично себя ведет ε-аминогруппа лизина. Это соединение устойчиво в кислой среде. После кислотного гидролиза пептида или белка удается выделить окрашенный продукт и идентифицировать природу N-концевой аминокислоты. Проводя реакции с пептидами — продуктами частичного гидролиза белков, можно установить последовательность аминокислот в белке. Так была определена последовательность аминокислот в инсулине (Ф.Сенгер, Нобелевская премия по химии 1958 г.).

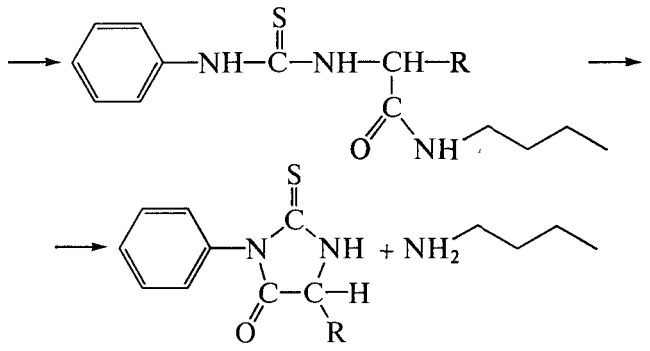
Более чувствительной является реакция свободных аминогрупп с флуоресцентным реагентом — дансилхлоридом:



Эта реакция позволяет работать с очень низкими концентрациями пептидов.

Отщепление N-концевой аминокислоты. Реакция с участием N-концевой аминогруппы была введена в практику П.Эдманом. Реакция позволяет химически модифицировать N-концевую аминокислоту и отделить ее от полипептидной цепи. В качестве реагента был использован фенилизотиоцианат:





В кислой среде продукт первой стадии реакции превращается в циклическое соединение и отщепляется в форме фенилтиогидантоина, соответствующего N-концевой аминокислоте.

Реакции с альдегидами с последующим восстановлением азометиновых связей. В химии белка часто используют реакцию аминогрупп с альдегидом:

$$P{-}NH_2 + RCHO \xrightarrow{pH\ 9} P{-}N{=}CHR \xrightarrow{NaBH_4} P{-}NH{-}CH_2R$$

Реакцию проводят в слабощелочной либо щелочной среде. Поскольку получающийся продукт не устойчив в нейтральной и слабокислой среде, на второй стадии реакции проводят восстановление азометиновых связей боргидридом натрия. Конечным продуктом реакции является устойчивый вторичный амин.

Реакции с имидоэфирами. Реакция идет в слабощелочной среде при pH 8,5:

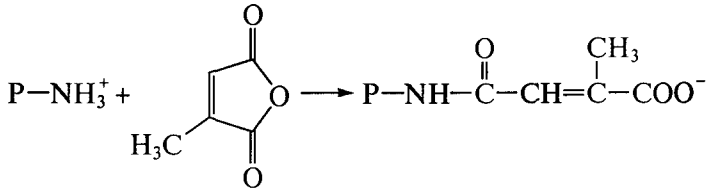
$$P{-}NH_2 + C_2H_5O{-}\overset{\overset{NH\cdot HCl}{\|}}{C}{-}CH_3 \longrightarrow P{-}NH{-}\overset{\overset{NH\cdot HCl}{\|}}{C}{-}CH_3 + C_2H_5OH$$

Реакции с ангидридами кислот. Реакцию проводят в большом избытке галогенангидрида кислоты, поскольку в водной среде последний гидролизуется:

$$P{-}NH_2 + Cl{-}\overset{\overset{O}{\|}}{C}{-}CH{=}CH_2 \longrightarrow P{-}NH{-}\overset{\overset{O}{\|}}{C}{-}CH{=}CH_2 + HCl$$

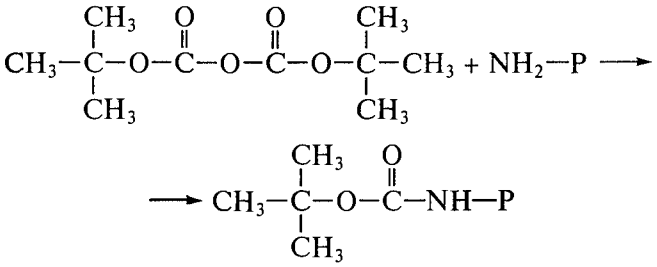
Реакцию используют для введения в белок фрагмента с двойной связью, который в дальнейшем может быть использован для включения белков в различные полимерные матрицы за счет радикальной полимеризации непредельных соединений.

Реакции с ангидридами дикарбоновых кислот. Реакция с цитраконовым ангидридом протекает следующим образом:

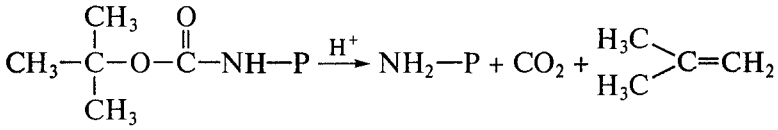


(Напомним, что при pH 7 аминогруппа протонирована — заряжена положительно, карбоксильная группа депротонирована — заряжена отрицательно.)

Защита аминогруппы. Иногда бывает необходимо провести химическую модификацию α-аминогруппы или карбоксильной группы, не затронув при этом свободную (концевую) аминогруппу. Например, это важно в пептидном синтезе при наращивании цепи в нужном направлении. Для этого сначала проводят реакцию, защищающую свободную аминогруппу. Наиболее часто используется *трет*-бутилоксикарбонильная защита. Свободную аминогруппу ацилируют ангидридом *трет*-бутилового эфира угольной кислоты:



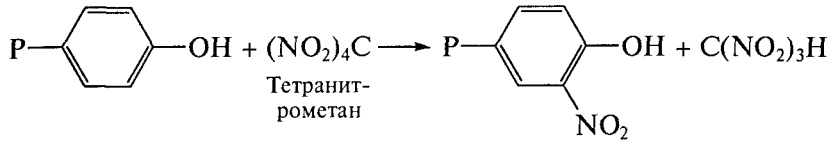
Защиту можно снять в мягких условиях действием кислот в органических растворителях:



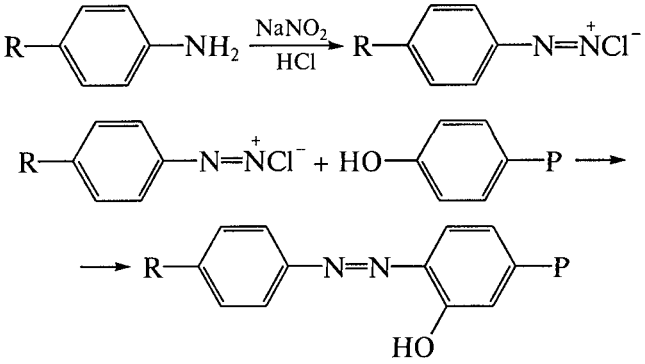
Карбоксильная группа С-конца полипептидной цепи, карбоксильные группы аспарагиновой и глутаминовой кислот. Свободные карбоксильные группы белков могут быть модифицированы реакцией этерификации или амидирования. Однако наибольшее распространение получили реакции, в результате которых увеличивается способность карбоксильных групп к взаимодействию с аминогруппами аминокислот с образованием пептидных связей. Речь идет о реакциях с участием карбодиимидов и изоксазолов (см. далее).

Фенольная группа тирозина. Химические свойства тирозина определяются возможностями фенольной группы. Основные реакции химической модификации в данном случае это реакции электрофильного замещения в ароматическом кольце.

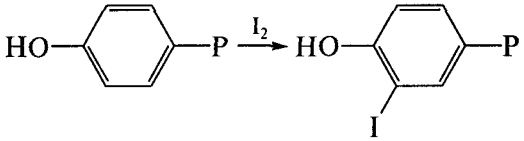
Тирозин в белках легко вступает в реакции нитрования:



С диазосолями фенольная группа тирозина вступает в реакции азосочетания с образованием азокрасителей:

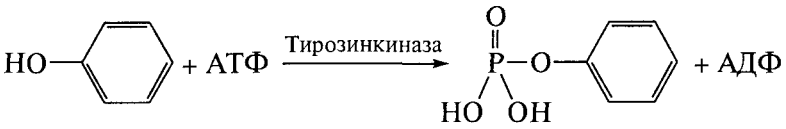


В биохимических исследованиях часто используют реакции иодирования тирозина:



Эта реакция применяется для введения в молекулу белка или фермента радиоактивной метки ^{127}I. Реакция идет количественно при низких температурах и позволяет получить радиоактивно меченый белок.

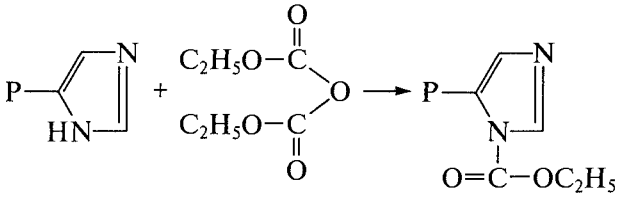
Оксигруппа тирозина в биохимических системах может быть ферментативно фосфорилирована с использованием ферментов киназного типа и АТФ в качестве фосфорилирующего агента:



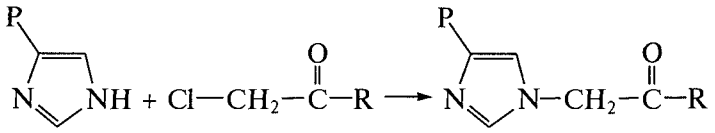
Эта реакция имеет большое физиологическое значение и является ключевой в регуляторном ответе клетки на внешние рецепторные сигналы.

Имидазольная группа гистидина. Эта группа гистидина играет большую роль в катализе ферментами. В химии белка используют несколько реакций для ее химической модификации.

Реакция с диэтилпирокарбаматом. Реакция с этиловым эфиром угольной кислоты в форме ангидрида идет эффективно в диапазоне pH 5—8:



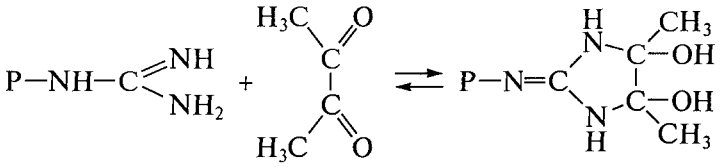
Алкилирование галогенкетонами. δ-Атом азота имидазольного кольца может быть проалкилирован реакцией с галогенкетонами. Атом галогена в α-галогенкетонах достаточно активирован для реакции нуклеофильного замещения:



Реакция фотоокисления. Имидазольная группа гистидина является электроннонасыщенной, она способна легко окисляться различными агентами с разрушением гетероцикла. При исследовании ферментов часто используют реакции фотоокисления гистидиновых остатков. С этой целью в присутствии сенсибилизатора (красителя метиленовый синий) проводят освещение образцов белка в аэробных условиях видимым светом. Результатом реакции является деструкция имидазольных групп гистидина.

Гуанидиновая группа аргинина. Эта группа характеризуется pK > 12. При pH 7 она протонирована и положительно заряжена.

Функциональная группа аргинина может быть модифицирована реакцией с дионами:



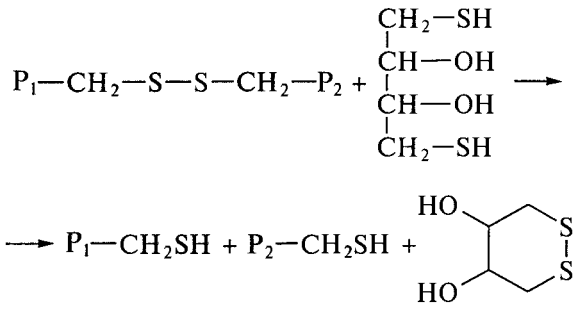
Бутандион

Сульфгидрильные группы. Эти группы характеризуются высокой реакционной способностью.

Дисульфидные мостики в белках могут быть легко восстановлены различными агентами, например сульфитом, дитиотрейтолом, дитиоэритротрейтолом:

$$P_1—CH_2—S—S—CH_2—P_2 + SO_3^{2-} + H^+ \rightarrow$$
$$\rightarrow P_1—CH_2—S—SO_3^- + HS—CH_2—P_2$$

Дитиоэритротрейтол восстанавливает связи S—S следующим образом:



Тиоловые группы являются высокореакционноспособными и легко окисляются на воздухе, их можно стабилизировать реакцией алкилирования. Для этого часто используют иодацетамид:

$$P{-}CH_2SH + ICH_2{-}CONH_2 \rightarrow P{-}CH_2{-}S{-}CH_2{-}CONH_2 + HI$$

или бромуксусную кислоту:

$$P{-}SH + BrCH_2COO^- \rightarrow P{-}S{-}CH_2COO^- + HBr$$

Хорошим алкилирующим агентом является также этиленимин:

$$P{-}CH_2{-}SH + \begin{matrix} CH_2 \\ | \\ CH_2 \end{matrix}\!\!>NH \rightarrow P{-}CH_2{-}S{-}CH_2{-}CH_2{-}NH_2$$

В результате модификации галогенуксусной кислотой в нейтральном растворе белковая молекула приобретает отрицательный заряд (за счет ионизированной при pH 7 карбоксильной группы); в случае модификации этиленимином — положительный (за счет протонированной аминогруппы).

Очень важный реагент для маркировки и количественного определения свободных SH-групп был предложен Дж. Эллманом (реактив Эллмана — 5,5′-дитио-*бис*-(2-нитробензойная кислота)). Реагент взаимодействует со свободными SH-группами стехиометрически с образованием хромогенного продукта. Эта реакция позволяет определить число сульфгидрильных групп в образце.

Бифункциональные сшивающие агенты. Получение конъюгатов белков и иммобилизация ферментов. Синтез пептидной связи. За последние десятилетия разработан большой набор реакций, позволяющих соединить белки химической связью или химически фиксировать белки или ферменты на носителях различной природы. Последний процесс называют иммобилизацией белка или фермента (см. гл. 11). Для этих целей используют различные бифункциональные сшивающие агенты.

Диальдегиды. Глутаровый диальдегид. Часто для получения конъюгатов белков и химического связывания белка с носителем, содержащим свободную аминогруппу, используют бифункциональный агент, например глутаровый диальдегид:

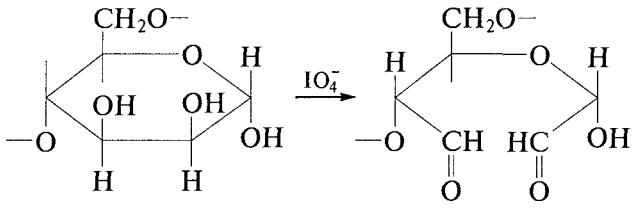
$$B{-}NH_2 + HOC{-}(CH_2)_3{-}COH + NH_2{-}P \longrightarrow$$
$$\longrightarrow B{-}N{=}CH{-}(CH_2)_3{-}CH{=}N{-}P$$

где $B{-}NH_2$ — носитель или белок, содержащий аминогруппу.

Последующее восстановление азометиновых связей ведет к химически прочной фиксации белков или иммобилизации белка на носителе. Эту реакцию можно также использовать для получения внутренних дополнительных связей в белке путем химической модификации двух стерически доступных групп.

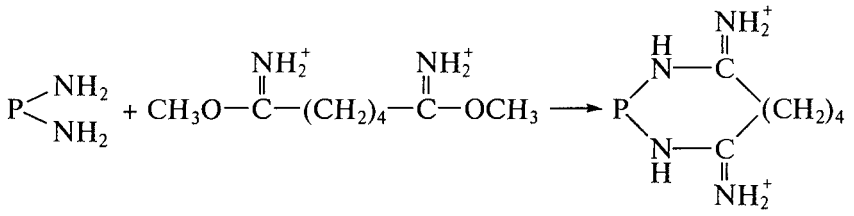
Реакция ведет к потере аминогруппы, а при pH 7, как правило, к потере одного положительного заряда.

Для иммобилизации ферментов или белков на полисахаридных носителях (целлюлозе и ее производных, декстранах и др.) можно использовать реакцию введения оксогруппы в носитель путем окисления углевода периодат-ионом:



Образовавшиеся альдегидные группы могут быть введены в реакцию с аминогруппами белка в нейтральной или слабощелочной среде с последующим восстановлением азометиновых связей боргидридом натрия.

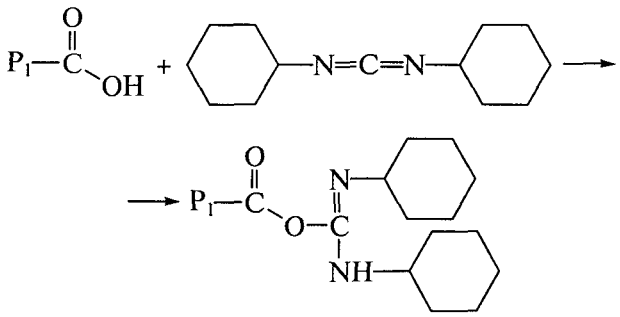
Имидоэфиры. Диметилапидимидат. Для получения дополнительных внутренних связей в белке можно использовать бифункциональные агенты на основе имидоэфиров, в частности диметилапидимидат. При наличии в молекуле белка двух стерически доступных групп ($NH_2{-}P{-}NH_2$) реакция протекает по следующей схеме:



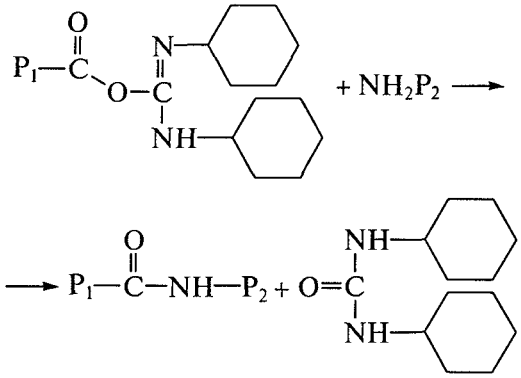
Реакцию проводят при низких концентрациях белка, для того чтобы избежать образования межмолекулярных связей. Получение допол-

нительных внутримолекулярных связей часто приводит к росту устойчивости белка к тепловой денатурации.

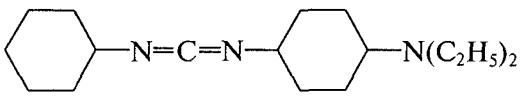
Карбодиимиды. Реактив Вудворда. Классический способ образования связи между карбоксильной группой и аминогруппой основан на использовании карбодиимидов. Реакция с участием дициклогексилкарбодиимида протекает в несколько стадий. Первая стадия — активация карбоксильной группы:



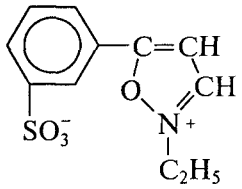
Вторая стадия — реакция с аминокомпонентой:



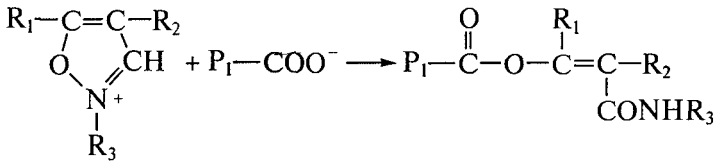
Реакцию используют в пептидном синтезе, при получении конъюгатов белков, при иммобилизации ферментов. Для проведения реакции в воде используют водорастворимые производные дициклогексилкарбодиимида, например N-(циклогексил)-N′-(*п*-диэтиламиноциклогексил)-карбодиимид:



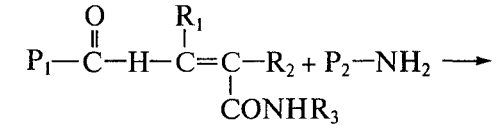
Другой распространенный подход к образованию пептидной связи был предложен Р. Вудвордом в 1961 г. Он использовал для активации карбоксильной группы изоксазолиевые соли, например N-этил-5-фенилизоксазолий-3′-сульфонат:

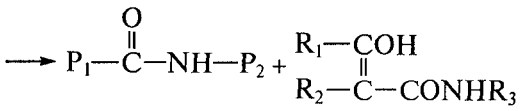


Реакция образования пептидной связи протекает следующим образом:



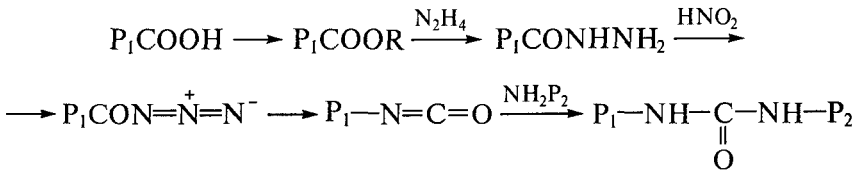
Полученное соединение представляет собой активированный виниловый эфир, который эффективно реагирует с аминокомпонентой:





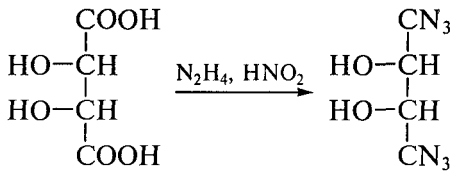
Как и в случае карбодиимидов, с помощью этого метода можно получать связи между аминокислотами, белками, белками и носителями.

Азиды карбоновых кислот. Карбоксильная группа может быть активирована путем получения азидов:



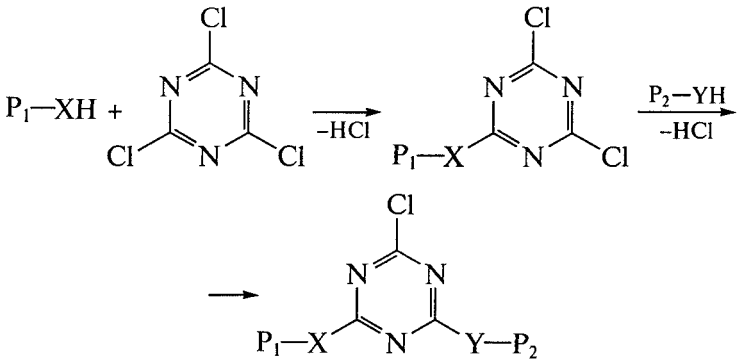
С помощью этого подхода в разных условиях могут быть получены как соединения с пептидной связью, так и производные мочевины.

Двухосновные кислоты могут быть трансформированы в бифункциональные сшивающие агенты. Для винной кислоты такая реакция протекает как показано выше:



Это позволяет получить бифункциональный агент и химически присоединить две аминокислоты.

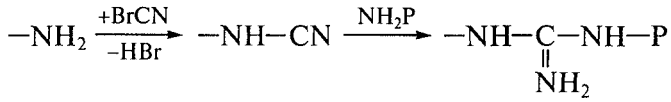
Хлорпроизводные 1,3,5-триазина. Хлористый цианур. Хлористый цианур — это многофункциональный сшивающий агент, реагирующий с различными группами белков, включая аминогруппы, спиртовые и фенольные оксигруппы, тиолы:



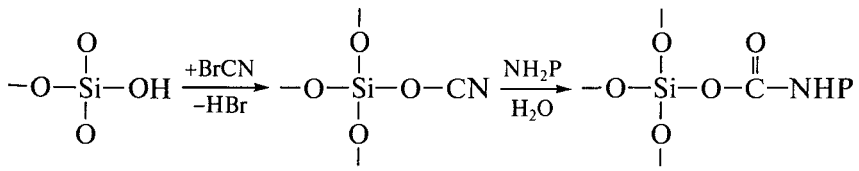
Удобным является то, что замещение атомов хлора происходит при различных температурах: первый реагирует при 0—10 °С, второй — при 20—50 °С, третий — при 80—100 °С.

Бромциан. Различные группы в белке или на носителе могут быть активированы бромцианом.

В случае аминогруппы реакция имеет вид



В случае оксигруппы, например при иммобилизации ферментов на стекле и на других производных кремнезема, реакция протекает по схеме



Бромциановый метод широко используется при иммобилизации ферментов.

Доступность функциональных групп белка для химической модификации. Белок представляет собой довольно жесткую, плотноупакованную структуру. Очевидно, что не все функциональные группы аминокислот доступны для химической модификации.

В настоящее время в связи с развитием методов кристаллизации белков и рентгеноструктурного анализа оценка доступности того или иного остатка аминокислоты для химической модификации может быть определена из структурных данных. В табл. 2.2 приведены сведения о доступности для модифицирования функциональных групп аминокислот таких ферментов, как α-химотрипсин, эластаза, рибонуклеаза.

Таблица 2.2

Суммарное число *N* функциональных групп аминокислот некоторых ферментов и число групп *n*, доступных для модифицирования

Аминокислота	α-Химотрипсин		Эластаза		Рибонуклеаза	
	N	*n*	*N*	*n*	*N*	*n*
Ala	22	15	17	12	10	2
Arg	3	3	12	12	4	2
Asn	13	13	18	18	9	5
Asp	9	7	6	4	5	2
Cys	10	5	8	2	8	0
Gln	10	8	15	14	—	—
Glu	5	5	4	4	5	2
Gly	23	15	25	15	—	—
His	2	0	6	3	4	2
Ile	10	5	10	5	3	0
Leu	19	10	18	10	2	1
Lys	14	14	3	3	9	4
Met	2	1	2	0	4	0
Phe	6	6	3	1	3	0
Pro	9	6	7	4	4	3
Ser	27	24	22	21	9	3
Thr	22	15	19	13	10	4
Trp	8	6	7	3	—	—
Tyr	4	4	11	10	6	3
Val	23	10	27	13	8	1

Понятно, что доступность функциональных групп аминокислоты определяет возможности ее модифицирования химическим агентом.

В качестве примера рассмотрим экспериментальные данные по химической модификации остатков гистидина в простагландин-Н-синтазе. Простагландин-Н-синтаза — лимитирующий элемент синтеза простагландинов (см. гл. 7). Фермент содержит 18 остатков гистидина. Однако химической модификации диэтилпирокарбоматом в апоферменте, т.е. в белке, не содержащем кофактор — гемин, подвергаются всего лишь шесть имидазольных групп. После того как белок присоединяет гемин и образуется холофермент, с диэтилпирокарбоматом взаимодействуют всего лишь две имидазольные группы гистидина. Таким образом, гемин дополнительно экранирует четыре имидазольные группы и делает их недоступными для модификации химическим агентом.

2.4. Химическая модификация каталитически важных групп активного центра

Первые сведения о природе групп, составляющих активные центры ферментов, были получены методами химической модификации. Любое химическое изменение группы, входящей в каталитический центр фермента, отражается прежде всего на каталитических характеристиках активного центра. Как правило, химическая модификация функционально важных групп ведет к потере ферментом каталитической активности.

Метод химической модификации позволяет получить весьма важную информацию о природе активных центров ферментов. При этом, однако, надо иметь в виду следующее.

Функциональные группы белка, составляющие активный центр, могут быть маскированы полипептидной цепью или остатками других аминокислот, что делает группы активного центра недоступными для реагента-модификатора (см. выше). Таким образом, метод химической модификации не позволяет получить исчерпывающую информацию о функциональных группах — участниках каталитического акта.

Химическая модификация, как правило, не является избирательной, химической реакции подвергаются сразу несколько аминокислотных остатков белка. Это ведет к существенному изменению структуры белка, развитию инактивационных и денатурационных процессов, что может привести к потере ферментом каталитической активности даже в том случае, если химически модифицировались остатки, не входящие в каталитический центр.

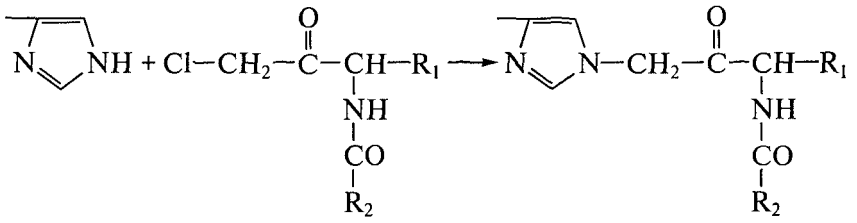
Поэтому выводы об участии тех или иных функциональных групп аминокислот в каталитическом процессе на основе данных

по химической модификации белка могут быть сделаны с известной осторожностью и оговорками. Как правило, для такого рода выводов требуются независимые структурные исследования.

Ситуация становится однозначной, если химический модификатор встраивается в структуру специфического субстрата или ингибитора фермента. В этом случае модификатор адресно направляется в активный центр, что существенно увеличивает вероятность химической реакции с функциональной группой активного центра.

Приведем несколько примеров.

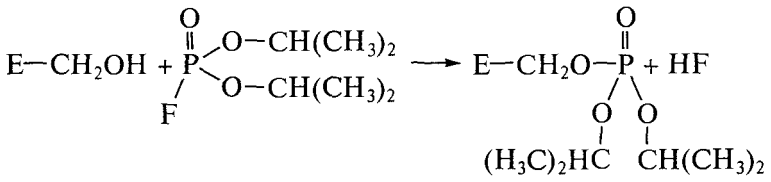
Имидазольная группа гистидина-57 α-химотрипсина. Эта группа была модифицирована реакцией алкилирования с хлоркетоном (см. выше). Для этих целей модифицирующий агент был включен в структуру субстрата:



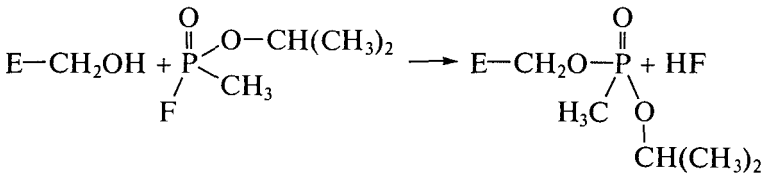
В результате химической реакции фермент полностью потерял каталитическую активность. После полного гидролиза белка был выделен и идентифицирован продукт химической модификации.

Сериновые протеазы и эстеразы. Каталитически активной группой многих ферментов является гидроксильная группа серина. В активном центре эта спиртовая группа играет роль нуклеофильного реагента в реакциях нуклеофильного замещения при гидролизе сложных эфиров, амидов, пептидов. При исследовании этих ферментов были использованы аналоги субстратов с заменой углерода на фосфор. Оказалось, что в этом случае происходит фосфорилирование серина с образованием стабильных производных. Фермент при этом полностью теряет свою активность. Таким образом, фосфорорганические аналоги субстратов являются эффективными необратимыми ингибиторами фермента.

Реакция сериновых протеаз $E-CH_2OH$ с диизопропилфторфосфатом протекает следующим образом:

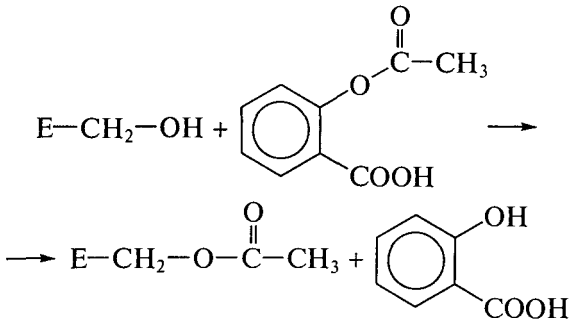


Ацетилхолинэстераза необратимо блокируется фосфорилированием гидроксильной группы производными фосфоновой кислоты:



В данном случае модификаторами выступают боевые отравляющие вещества типа зарина.

Простагландин-Н-синтаза. Аспирин (ацетилсалициловая кислота) представляет собой нестероидный противовоспалительный лекарственный препарат. Физиологическое действие препарата связано с его способностью ацетилировать Ser-514, входящий в центр сорбции арахидоновой кислоты — субстрата простагландин-Н-синтазы:



Таким образом, аспирин выступает необратимым ингибитором лимитирующего фермента синтеза простагландинов. Последующий гидролиз модифицированного белка и анализ продуктов гидролиза позволили идентифицировать центр модификации фермента.

* * *

Лишь в конце работы мы обычно узнаем, с чего ее нужно было начинать.

Б. Паскаль

Итак, читатель с большим трудом преодолел частокол химических формул и пытается ответить на вопрос, что же дает это изобилие химических реакций для понимания природы белков, ферментов, механизмов их действия.

Значение химических методов для химической энзимологии трудно переоценить. Для химика изобилие химических реакций —

это изобилие возможностей. Прежде всего, богатый набор химических реакций (выше обсуждаются далеко не все известные и применяемые реакции, а только их небольшая часть) дает возможность химику манипулировать с белком, как с обычным химическим реактивом. В руках исследователей и практиков появились методы, позволяющие изменять заряд белка, образовывать химическую связь между различными белками, а также создавать внутримолекулярные, внутрибелковые связи. Методами химической модификации можно связать белок или фермент с любым твердым телом или носителем (см. гл. 11). Химическими методами была установлена последовательность аминокислот в полимерной полипептидной цепи. Наконец, химически были синтезированы и еще будут синтезированы различные пептиды и белки. Как известно, впервые химический синтез пептидов осуществлен Э. Фишером (см. гл. 1). Синтез полипептидов на носителе с закреплением первой аминокислоты на полимере и последующим химическим удлинением полипептидной цепи позволил получить первые синтетические функционально активные белки.

Метод химической модификации ферментов позволил сформировать представление о наличии в белковой молекуле особого участка, состоящего из определенного числа остатков аминокислот и обеспечивающего каталитическую активность белка. Этот участок получил название активного центра фермента. Методами химической модификации была получена первая информация о химической природе функциональных групп, образующих активные центры ферментов.

Глава 3

СТРОЕНИЕ БЕЛКОВ

Опыт уже давно показал, что полное изучение химических процессов требует одновременного изучения тех физических явлений, которые вызывают и сопровождают химические реакции. Роль таких физических явлений настолько велика, своеобразна и многогранна, что в конечном результате развилась и оформилась специальная дисциплина — физическая химия — наука о физических явлениях, неразрывно связанных с химическими процессами.

А. В. Раковский

3.1. Молекулярные силы и взаимодействия

Ферменты — это глобулярные белки, содержащие как регулярные участки (α-спирали и β-листы), так и нерегулярные области типа полимерных петель. На рис. 3.1 приведена структура полипептидной цепи цитохром-*с*-пероксидазы. Видно, что это весьма сложное молекулярное образование, которое удерживается в структурированном состоянии действием каких-то внутренних сил. Какова природа этих сил? Что заставляет большую совокупность атомов взаимодействовать друг с другом и формировать уникальную структуру? (Очевидно, что эти же силы и взаимодействия проявляют себя в элементарных актах катализа, определяя способность субстрата входить в активный центр и претерпевать химические изменения.) В данном разделе постараемся ответить на эти вопросы.

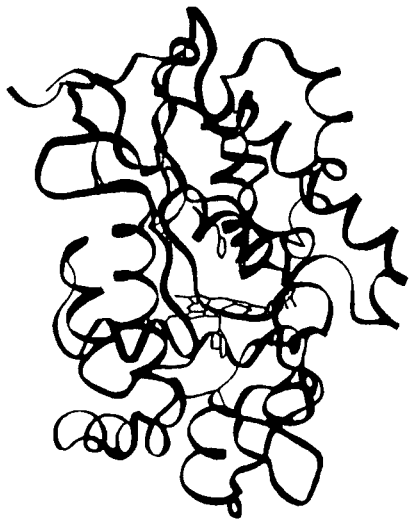
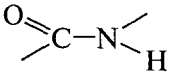


Рис. 3.1. Полипептидная цепь цитохром-*с*-пероксидазы

Внутри- и межмолекулярные связи в белках условно (по силе и природе взаимодействий) подразделяют на ковалентные, электростатические, водородные и гидрофобные.

Ковалентные связи. Стерические ограничения. Основой белка является полимерная полипептидная цепь, в которой отдельные аминокислоты связаны ковалентной амидной связью. Ха-

рактерные длины связей: C—H, N—H, O—H 0,1 нм; C=O, C=N, C=C 0,12 нм; C—C 0,15 нм; S—S 0,18 нм. Амидная связь в воде термодинамически неустойчива, и любой белок в водном растворе в состоянии равновесия должен был бы представлять собой смесь свободных аминокислот. Однако процесс гидролиза в нейтральных средах протекает исключительно медленно, что обеспечивает кинетическую стабильность белка.

Электронная конфигурация атомов пептидной связи делает ее плоской:  . Атомы O, C и N находятся в одной плоскости. Атомы, химически не взаимодействующие, могут притягиваться за счет слабых ван-дер-ваальсовых сил и сильно отталкиваться при сближении до 0,2—0,3 нм. Притяжение имеет квантовую природу и связано с согласованными колебаниями электронов обоих атомов. Сближение атомов на расстояние меньше критического вызывает мощное электростатическое отталкивание электронов. В общем случае энергия U ван-дер-ваальсового взаимодействия атомов как функция расстояния r между атомами может быть представлена кривой, показанной на рис. 3.2. Эта кривая хорошо описывается формулой Леннард-Джонса:

$$U(r) = E_0\left[\left(\frac{r_0}{r}\right)^{12} - 2\left(\frac{r_0}{r}\right)^{6}\right]^3, \qquad (3.1)$$

где E_0 — глубина энергетического минимума; r_0 — расстояние между атомами, отвечающее минимуму энергии, т.е. наиболее энергетически выгодному расположению атомов.

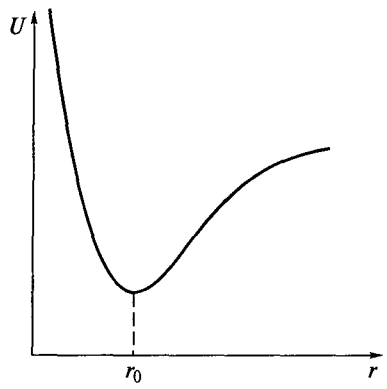


Рис. 3.2. Энергия ван-дер-ваальсового взаимодействия как функция расстояния между атомами

Как следует из формулы (3.1), сближение атомов на расстояние, меньшее r_0, вызывает их эффективное, так называемое стерическое отталкивание. В формуле (3.1) отталкивание описывается членом $(r_0/r)^{12}$. Данный эффект имеет определяющее значение при взаимодействии молекул в белковых системах, в частности, он определяет конформацию полипептидной цепи.

Относительно свободное вращение в полипептидной цепи возможно по связям C_i—C_i^{α} (угол ψ) и C_i^{α}—N_i (угол φ) (рис. 3.3). Плоскости пептидных связей показаны на рисунке цветом. Наличие заме-

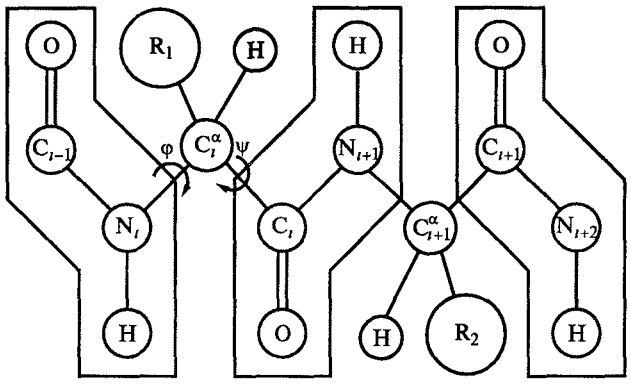


Рис. 3.3. Стерические взаимодействия групп пептидной связи

стителей у атомов C_i^α и их стерическое взаимодействие с атомами кислорода и амидным атомом водорода ограничивает свободу вращения вокруг этих связей. Очевидно, что в зависимости от размера и строения заместителей стерическое отталкивание атомов будет различным. Самым свободным является вращение по углам φ и ψ для глицина, самым ограниченным — для аминокислоты пролина. Впервые расчет потенциальной энергии как функции углов φ и ψ был проведен Г. Рамачандраном. Он предложил представлять результаты расчета в виде двухмерных зависимостей потенциальной энергии от значений углов φ и ψ. Эти зависимости получили название карт Рамачандрана. На рис. 3.4 приведены карты Рамачандрана для пептидной связи с участием глицина (*а*) и ала-

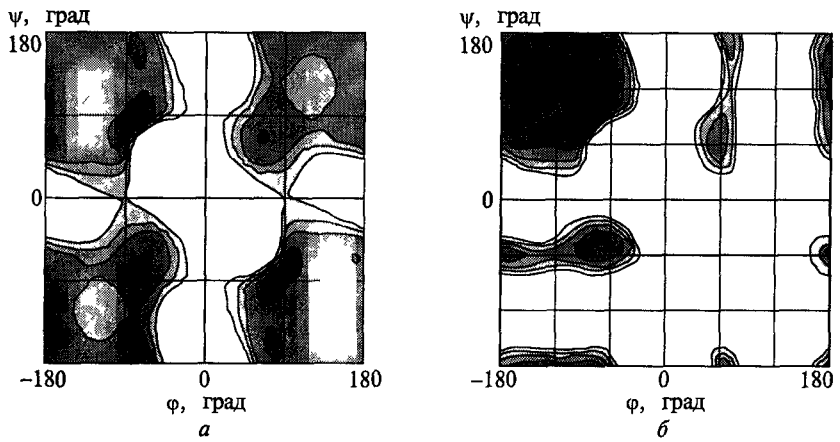


Рис. 3.4. Карта Рамачандрана для пептидной связи с участием глицина (*а*) и аланина (*б*)

нина (*б*). Затемненные области на этих картах соответствуют парам углов (φ, ψ), при которых стерическое отталкивание отсутствует и система энергетически стабильна. Светлые области отвечают парам углов (φ, ψ), при которых конформация испытывает напряжение и энергетически затруднена или вообще запрещена. Интенсивность затемнения областей на рис. 3.4, *а*, *б* характеризует степень энергетической стабильности конформаций.

Видно, что для глицина область разрешенных конформаций максимальная (наибольшая затемненная поверхность); для аланина область свободного вращения групп вокруг связей C_i—C_i^{α} и C_i^{α}—N_i существенно ограничена, однако существует область ненапряженных конформаций. Для пролина область разрешенных конформаций предельно ограничена. Эта структурная особенность аминокислот используется при формировании и функционировании белковых молекул. Если необходимо строго зафиксировать полипептидную цепь в пространстве, в качестве структурообразующей аминокислоты используется пролин. Если требуется обеспечить конформационную подвижность той или иной области белка или возможность поворота цепи, в структуре полипептидной цепи должен находиться глицин.

Электростатические взаимодействия. Природа электростатических взаимодействий определяется кулоновским притяжением противоположно заряженных групп или атомов и отталкиванием одноименно заряженных. Энергия электростатического взаимодействия заряженных частиц определяется законом Кулона

$$U(r) = -\frac{z_1 z_2 e^2}{\varepsilon r}, \qquad (3.2)$$

где z_1, z_2 — заряды взаимодействующих частиц; e — заряд электрона, равный $1{,}6 \cdot 10^{-19}$ Кл; ε — диэлектрическая проницаемость среды; r — расстояние между частицами.

Энергия взаимодействия заряженных частиц может быть весьма значительна. Так, в вакууме энергия взаимодействия частиц, находящихся на расстоянии 0,1 нм, составляет 1380 кДж/моль; на расстоянии 0,3 нм — 460 кДж/моль. Однако в водном растворе и особенно в растворах электролитов кулоновское взаимодействие существенно ослабляется. Молекулы воды имеют большой дипольный момент и поэтому способны, взаимодействуя с заряженными частицами, частично компенсировать их взаимное влияние. Диэлектрическая проницаемость воды равна ε = 80, и согласно закону Кулона сила взаимодействия заряженных частиц в воде будет в 80 раз меньше, чем в вакууме.

Из изложенного выше следуют два важных для практики вывода:

1) в органических растворителях или в микрофазе, близкой по характеристикам к гидрофобному аполярному органическому рас-

творителю, сила электростатического взаимодействия заряженных групп возрастает по сравнению с водой (диэлектрическая проницаемость органического растворителя существенно меньше диэлектрической проницаемости воды);

2) введение в систему дополнительных заряженных ионов должно приводить к ослаблению электростатического взаимодействия в силу экранирования зарядов введенными ионами.

Характеристикой влияния дополнительных ионов является ионная сила I раствора электролита:

$$I = \frac{1}{2}\sum_i (C_i z_i^2),$$

где C_i — концентрация i-го иона; z_i — заряд i-го иона.

Для удобства оценки влияния ионной силы раствора на электростатические взаимодействия можно ввести безразмерный фактор влияния.

Теория электростатических эффектов в растворе в общем виде была развита П. Дебаем и Э. Хюккелем. С учетом потенциальной энергии $U(r)$ взаимодействия заряженных частиц безразмерный фактор влияния f равен

$$f = \left\{ R_{1,2} \int_{R_{1,2}}^{\infty} \exp\left[\frac{U(r)}{k_B T}\right] \frac{dr}{r^2} \right\}^{-1}, \qquad (3.3)$$

где $R_{1,2}$ — сумма радиусов взаимодействующих частиц; k_B — константа Больцмана; T — абсолютная температура.

В реальных системах в присутствии диполей воды и дополнительных электролитов энергия ионных взаимодействий не превышает 12—20 кДж/моль, хотя может сильно возрастать в локальной области микроорганической фазы белковой молекулы.

При известной функции потенциальной энергии $U(r)$ электростатические взаимодействия могут быть детально проанализированы с использованием уравнения (3.3). Теоретически в аналитической форме значение f рассчитано для двух случаев — для бесконечно разбавленных растворов электролитов и для растворов электролитов, подчиняющихся предельному закону Дебая—Хюккеля.

Бесконечно разбавленные растворы электролитов. В растворах электролитов при бесконечном разбавлении потенциальная энергия взаимодействия заряженных частиц описывается законом Кулона (3.2). Подстановка (3.2) в уравнение (3.3) и последующее интегрирование приводят к выражению

$$f = \frac{\delta}{e^{\delta} - 1}, \qquad (3.4)$$

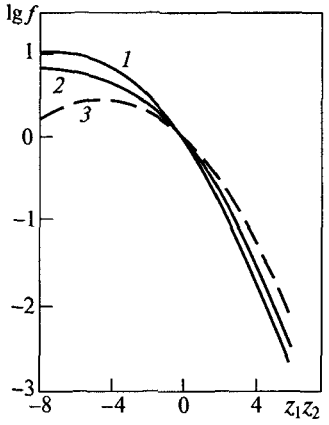


Рис. 3.5. Зависимость $\lg f$ от произведения зарядов реагирующих частиц для растворов ионной силы $I = 0$ (*1*), 10^{-3} (*2*), 10^{-2} (*3*) моль/л

где

$$\delta = \frac{z_1 z_2 e^2}{\varepsilon R T R_{1,2}}. \qquad (3.5)$$

Видно, что в зависимости от знака произведения $z_1 z_2$ параметр f может быть как больше ($z_1 z_2 < 0$), так и меньше ($z_1 z_2 > 0$) единицы. На рис. 3.5 приведена зависимость $\lg f$ от $z_1 z_2$, рассчитанная по уравнениям (3.4), (3.5) при $\varepsilon = 80$, $T = 298$ K, $R_{1,2} = 0{,}5$ нм (линия *1*). Видно, что линия *1* несимметричная, эффект уменьшения электростатического взаимодействия за счет отталкивания зарядов при $z_1 z_2 > 0$ более существенен, чем эффект увеличения при взаимодействии противоположно заряженных частиц.

Разбавленные растворы электролитов, подчиняющиеся закону Дебая — Хюккеля. В растворах электролитов происходит экранирование зарядов ионами. Для растворов с низкой ионной силой функция потенциальной энергии согласно теории Дебая — Хюккеля описывается уравнением

$$U(r) \approx \frac{1}{2}\left[\frac{\exp(\chi R_2)}{1+\chi R_2} + \frac{\exp(\chi R_1)}{1+\chi R_1}\right]\frac{z_1 z_2}{\varepsilon r} e^2 (1 - \chi r), \qquad (3.6)$$

где R_1, R_2 — радиусы взаимодействующих частиц; χ — величина, обратная толщине ионного слоя:

$$\chi = \left[\frac{4\pi e^2}{k_B T}\sum_i \left(C_i z_i^2\right)\right]^{1/2} = 3{,}295 \cdot 10^7 I^{1/2}. \qquad (3.7)$$

Используя для функции потенциальной энергии уравнение (3.6) и подставляя его в (3.3) при последующем интегрировании, получаем

$$f = \frac{\gamma\delta \exp(\delta R_{1,2}\chi)}{\exp(\gamma\delta) - 1}, \qquad (3.8)$$

где

$$\gamma = \frac{1}{2}\left[\frac{\exp(\chi R_2)}{1+\chi R_2} + \frac{\exp(\chi R_1)}{1+\chi R_1}\right]. \qquad (3.9)$$

Уравнение (3.4) является частным случаем уравнения (3.8), поскольку при $I \to 0$ имеем $\gamma \to 1$.

На рис. 3.5 приведена зависимость фактора f от $z_1 z_2$ для растворов различной ионной силы. Линии *2*, *3* рассчитаны по уравне-

нию (3.8). Видно, что введение инертного электролита в раствор заметно элиминирует влияние зарядов.

Разложение в ряд экспоненциальной функции уравнения (3.8) при $\gamma\delta \ll 1$ приводит к равенству

$$f = \exp(\gamma\delta R_{1,2}\chi). \tag{3.10}$$

При низких ионных силах имеем $\gamma \sim 1$ и уравнение (3.10) можно представить в виде

$$\lg f = z_1 z_2 I^{1/2}. \tag{3.11}$$

С помощью уравнения (3.11) можно получить классическое уравнение Бренстеда—Дебая—Хюккеля, описывающее зависимость константы скорости реакции от ионной силы раствора:

$$\lg k = \lg k_0 + z_1 z_2 a I^{1/2}, \tag{3.12}$$

где k_0, a — константы, не зависящие от I.

Уравнения (3.8)—(3.12) применимы и при высоких значениях ионной силы. Экспериментальным путем было показано, что зависимость $\lg f$ от $I^{1/2}$ сохраняется практически линейной с тангенсом угла наклона графика, близким к $z_1 z_2$ при $-6 \le z_1 z_2 \le 6$ и $I \le 0{,}01$. При этом фактор f мало чувствителен к параметру $\gamma\delta$, и линейность сохраняется вплоть до $|\gamma\delta| \le 8$.

Влияние общего заряда белковой глобулы. Приведенный выше анализ электростатических эффектов не учитывает воздействие на ферментативную реакцию общего заряда белковой глобулы. При исследовании ферментативной реакции в условиях, близких к изоэлектрической точке (см. далее) белка, этим эффектом действительно можно пренебречь.

Однако при проведении реакции вдали от изоэлектрической точки в условиях, когда белковая глобула несет большой заряд, влияние общего заряда глобулы может быть весьма значительным.

Предполагалось, что общий заряд белка можно представить равнодействующим зарядом, локализованным в центре сферической глобулы. Диэлектрические свойства среды считались постоянными по всему объему и характеризовались диэлектрической проницаемостью. В рассматриваемом приближении предполагалось также, что потенциальная энергия взаимодействия заряженных частиц не зависит от угловых характеристик и взаимодействие зарядов имеет линейный характер.

Для этой модели функция потенциальной энергии с учетом дебаевских эффектов имеет вид

$$U(r) = \frac{\exp(\chi R_{1,2})}{1+\chi R_{1,2}} \frac{z_1 z_2}{\varepsilon r} e^2 \exp(-\chi r) + \\ + \frac{\exp(\chi R_{1,3})}{1+\chi R_{1,3}} \frac{z_1 z_3}{\varepsilon (r+R_3)} e^2 \exp[-\chi(r+R_3)], \tag{3.13}$$

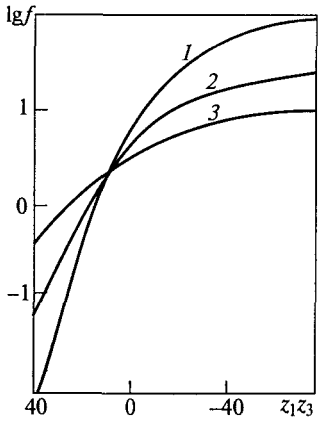


Рис. 3.6. Зависимость lg$f$ от произведения зарядов молекул субстрата и белка для растворов ионной силы $I = 0$ (*1*), 10^{-3} (*2*), 10^{-2} (*3*) моль/л

где $R_{1,3}$ — сумма радиусов молекул субстрата и фермента; R_3 — радиус молекулы фермента; z_3 — заряд молекулы фермента.

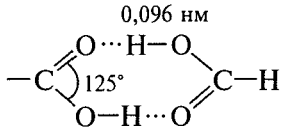
Подставив уравнение (3.13) в (3.3), можно вычислить фактор влияния f_i. На рис. 3.6 приведена зависимость f от z_1z_3 в растворах различной ионной силы при $z_1z_2 = -4$, $R_{1,2} = 0{,}5$ нм, $R_{1,3} = 2{,}8$ нм, $R_3 = 2{,}5$ нм. Видно, что влияние заряда глобулы может быть весьма значительным. Если субстрат заряжен и реакция проводится вдали от изоэлектрической точки ($z_3 \neq 0$), можно ожидать увеличения или уменьшения энергии взаимодействия примерно на два порядка.

Важно отметить, что электростатические взаимодействия являются ненаправленными в отличие, например, от водородной связи (см. далее).

Ослабление электростатического взаимодействия при высоких концентрациях солей часто используют в препаративной химической энзимологии. Например, выделение белков в большинстве случаев включает стадию осаждения белков концентрированным раствором электролита, часто сульфата аммония. При этом в первую очередь происходит нейтрализация зарядов белковых молекул и агрегация белка.

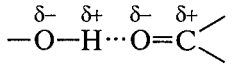
Водородная связь. Эта связь чрезвычайно важна в биохимических системах в общем и в ферментативном катализе в частности.

Представление о водородной связи сформировалось при изучении поведения алифатических кислот в газовой фазе. Оказалось, что летучие кислоты (муравьиная, уксусная, пропионовая) в газовой фазе образуют довольно устойчивые димеры. Методом электронной дифракции обнаружено, что, например, димерная молекула муравьиной кислоты плоская, расстояние между атомами кислорода 0,26—0,28 нм:



Исследование показало, что димеризация обусловлена дипольным характером связи O—H. В свою очередь дипольный характер связи определяется разными электроотрицательностями атомов, образующих связь. Электроотрицательность характеризует способность атома поляризовать ковалентные связи. Связь между атома-

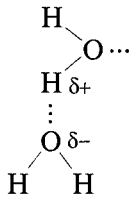
ми тем более полярная, чем больше разность электроотрицательностей атомов. Электроотрицательности атомов водорода и углерода близки (2,1 и 2,5 соответственно). Поэтому связи С—Н неполярные, их дипольный момент практически равен нулю. В это же время связи С=О, О—Н, N—Н полярные (электроотрицательность атома кислорода 3,5, азота 3,0). Связи О—Н и С—О характеризуются дипольным моментом 1,6 и 2,5 Д соответственно. Это приводит к тому, что на атоме кислорода связи О—Н локализуется некоторый избыточный отрицательный заряд δ−, на атоме водорода — некоторый избыточный положительный заряд δ+. При наличии в области связи О—Н любой другой поляризованной связи (в димере кислот это связь С=О) между ними неизбежно возникает электростатическое взаимодействие, приводящее к образованию комплекса или внутримолекулярной связи:

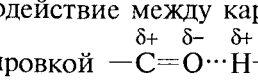


Данный тип связи был назван водородной связью.

Энергия водородной связи в димере алифатических кислот равна 28,4 ± 0,6 кДж/моль. Водородная связь в отличие от электростатического взаимодействия характеризуется определенной направленностью. Наибольшая энергия отвечает взаимодействию, реализующемуся линейно между акцептором и донором водорода.

Водородные связи играют исключительно важную роль в биологических системах. Прежде всего водородные связи формируют структуру воды, кластеризуя молекулы воды и существенно изменяя ее физико-химические характеристики:



В силу наличия системы водородных связей температура кипения воды повышается практически на 200°. Водородные связи принципиально важны в системах «записи» биологической информации в молекулах ДНК при образовании специфических комплексов между гетероциклами пиримидин-пуриновых оснований (рис. 3.7). Водородные связи формируют вторичную структуру белка. Взаимодействие между карбоксильным кислородом и амидной группировкой  обеспечивает образование α-спиралей и β-структур (см. далее). Образование фермент-субстратных комплексов и «узнавание» молекул субстрата активным центром происходит в большинстве случаев с участием водородных связей.

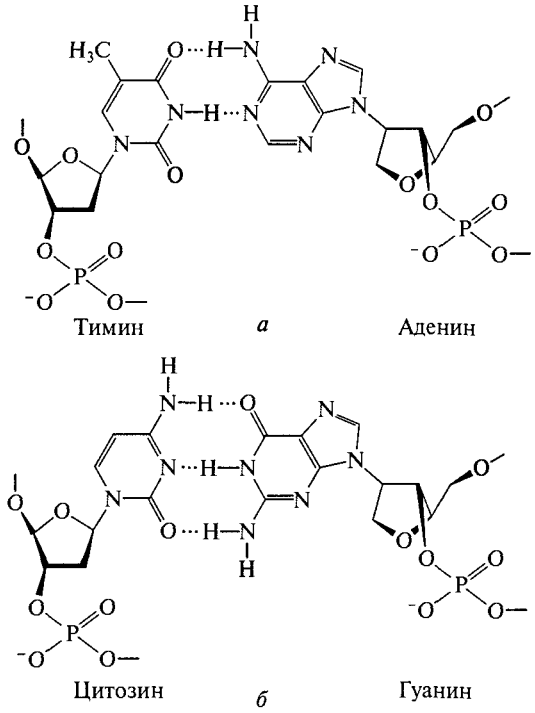
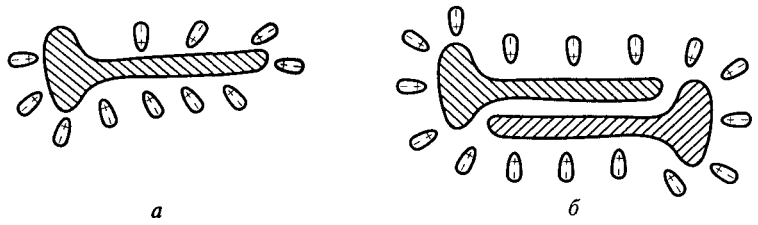


Рис. 3.7. Водородные связи между парами гетероциклов в нуклеиновых кислотах:

а — тимин—аденин; *б* — цитозин—гуанин

Гидрофобные взаимодействия. Структура диполь-дипольных взаимодействий и водородных связей между молекулами воды нарушается, если вода находится в контакте с неполярной группой, например с углеводородным радикалом. Отсутствие компенсирующих электростатических взаимодействий существенно повышает энергию системы. Система ищет пути стабилизации и находит их, вытесняя неполярные группы друг к другу, обеспечивая их ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями, ограничивая число неблагоприятных контактов с диполями воды.

Свойства воды как растворителя, внутри прошитого водородными связями, играет в этом случае первостепенную роль. Молекулы воды в контакте с неполярными соединениями (углеводородами и углеводородными фрагментами молекул, неполярными газами типа H_2, O_2, благородными газами) лишены возможности образовывать дополнительные водородные связи и находятся в энергетически неблагоприятном состоянии. Система стремится уменьшить число такого рода молекул. Это возможно за счет объединения неполярных молекул в комплекс (рис. 3.8), в результате



а *б*

Рис. 3.8. Схема образования комплекса из молекул, объединенных гидрофобными связями:

а — индивидуальная неполярная молекула (находится в контакте с 11 диполями воды); *б* — комплекс, образованный из двух неполярных молекул (в неблагоприятных условиях комплекс контактирует с 16 диполями воды вместо 22)

поверхность взаимодействия станет меньше. Связи, объединяющие неполярные молекулы в водном растворе, получили название гидрофобных.

Исследование термодинамики гидрофобных взаимодействий показало, что основной вклад во взаимодействие вносит энтропийная составляющая свободной энергии. Как известно, свободная энергия процесса, определяющая термодинамическую возможность его протекания, включает энтальпийный и энтропийный члены $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$.

В табл. 3.1 приведены термодинамические параметры процесса перехода циклогексана из газовой фазы в жидкую органическую фазу, образуемую циклогексаном, из газовой фазы в воду и из жидкой фазы циклогексана в воду. Видно, что переход циклогексана в жидкую фазу термодинамически выгоден ($\Delta G < 0$). Перенос циклогексана в воду как из газообразного состояния, так и из жидкой фазы термодинамически неблагоприятен ($\Delta G > 0$). Перенос молекулы циклогексана из собственной жидкой фазы в водную вызывает существенное увеличение энтропийной составля-

Таблица 3.1

Термодинамические параметры процесса растворения циклогексана в органической фазе и воде

Процесс	ΔH, кДж/моль	$T\Delta S$, кДж/моль	ΔG, кДж/моль	Δc_p, кДж/(моль · К)
Переход C_6H_{12}(г.) — C_6H_{12}(ж.)	–30,7	–12,2	–18,5	33,6
Переход C_6H_{12}(г.) — H_2O(ж.)	–30,7	–40,3	9,6	394,8
Переход C_6H_{12}(ж.) — H_2O(ж.)	0	–28,1	28,1	361,2

ющей свободной энергии. Из табл. 3.1 видно, что для этого процесса $\Delta H = 0$ и все изменения свободной энергии определяются энтропийным членом. Сильное падение энтропии ведет к росту свободной энергии. Молекулы воды структурируются и «замораживаются» на поверхности контакта с неполярной группой. При этом также резко возрастает теплоемкость Δc_p системы.

Как количественно охарактеризовать силу гидрофобного взаимодействия? Силу гидрофобных взаимодействий можно оценить, изучая распределение веществ между двумя несмешивающимися фазами: водной и органической. В двухфазной системе вода — несмешивающийся с водой органический растворитель вещество А распределяется между фазами и можно найти коэффициент его распределения: $P_A = [A]_{орг}/[A]_{вод}$. Оказалось, что коэффициент распределения практически не зависит от природы органического растворителя при условии, что между растворителем и веществом нет каких-либо дополнительных, например водородных, связей.

Логарифм коэффициента распределения является характеристикой гидрофобности вещества А: $\pi_A = \lg P_A$. Понятие гидрофобности π может быть отнесено не только к целым молекулам, но и к их фрагментам: $\pi_{A'} = \lg P_{A'} - \lg P_A$, где $\pi_{A'}$ — константа гидрофобности фрагмента (заместителя) молекулы А; $P_{A'}$ — коэффициент распределения молекулы А с заместителем; P_A — коэффициент распределения незамещенной молекулы А.

В табл. 3.2, 3.3 приведены константы гидрофобности Ганша для ряда фрагментов органических молекул. На основании этих данных можно оценить гидрофобность практически любого соединения.

Гидрофобные взаимодействия играют особую роль в белковых системах. В глобулярных белках гидрофобные взаимодействия часто формируют ядро белковой молекулы. На поверхности белковой молекулы, как правило, локализуются полярные или заряженные группы, которые взаимодействуют с молекулами воды. Гидрофобные остатки аминокислот находят энергетически выгодные положения внутри белковой молекулы, создавая внутреннюю гидрофобную среду. Важную роль гидрофобные взаимодействия выполняют при «узнавании» субстратов или ингибиторов активными центрами (см. гл. 9). Гидрофобные фрагменты субстрата взаимодействуют с гидрофобными участками активного центра, образуя специфические комплексы, ориентирующие реакционный центр субстрата относительно каталитических групп. При этом совсем не обязательно участие в этом процессе гидрофобной фазы большого объема. Достаточно вытеснения нескольких молекул воды, для того чтобы гидрофобная связь удерживала две неполярные группировки. При этом при увеличении размера молекулы субстрата на каждую группу CH_2 (с учетом геометрии активного центра) выигрыш свободной энергии образования комплекса составит примерно 3 кДж/моль.

Таблица 3.2

Константы гидрофобности Ганша для некоторых фрагментов молекул органических соединений алифатического ряда (система *н*-октанол—вода)

Фрагмент	π	Фрагмент	π
H	0	OC_6H_5	2,08
CH_2	0,50	SC_6H_5	2,32
CH_3	0,50	Циклопентил	2,14
C_2H_5	1,00	Циклогексил	2,50
C_3H_7	1,50	$CH_2C_6H_{11}$	2,89
$CH(CH_3)_2$	1,30	NHC_6H_{11}	1,54
C_4H_9	2,00	$CONH_2$	−1,71
$CH_2CH(CH_3)_2$	1,80	$COCH_3$	−0,71
$CH_2CH{=}CH_2$	1,10	COC_6H_5	1,05
$CH_2C{\equiv}CH$	0,94	$OCOCH_3$	−0,27
$CH_2CH_2C(CH_3)_3$	2,98	$NHCOCH_3$	−1,21
$CH_2CH{=}CHCH_3$	1,60	$COOCH_3$	−0,27
C_5H_{11}	2,50	$COOC_2H_5$	0,51
C_6H_{13}	3,00	$CH_2OC_2H_5$	0,53
F	−0,17	$(CH_2)_2N(CH_3)_3$	−3,20
Cl	0,39	SO_2CH_3	−1,63
Br	0,60	NHC_6H_5	1,37
CN	−0,84	$SO_2C_6H_5$	0,27
CF_3	0,88	$(CH_2)_2OC_6H_5$	2,01
$(CH_2)_2Cl$	1,39	$NH(CH_2)_4C_6H_5$	2,61
$(CH_2)_2SCH_2CH_3$	1,95	Фуроил	1,75
C_6H_5	2,13	Никотиноил	1,55
$CH_2C_6H_5$	2,63	Изоникотиноил	1,66
$(CH_2)_2C_6H_5$	2,66	Пиколиноил	1,10
$(CH_2)_3C_6H_5$	3,03	2-Аминобензоил	2,80
OH	−1,16	2-Хинолиноил	2,45
—O—	−1,03	Разветвление в цепи	−0,20
OCH_3	−0,47	Двойная связь	−0,30

Таблица 3.3

Константы гидрофобности Ганша для некоторых фрагментов молекул органических соединений ароматического ряда (система *н*-октанол — вода)

Фрагмент	π	Фрагмент	π
H	0	3-CN	−0,30
2-CH_3	0,68	4-CN	−0,32
3-CH_3	0,50	2-NO_2	−0,23
4-CH_3	0,93	3-NO_2	0,11
2-C_2H_5	1,22	4-NO_2	0,24
3-C_2H_5	0,97	NH_2	−1,23
4-C_2H_5	1,02	$CONH_2$	−1,49
3-*н*-C_3H_7	1,43	CH_2OH	−1,03
3-*i*-C_3H_7	1,30	3-COOH	−0,15
4-*i*-C_3H_7	1,40	2-$COCH_3$	0,01
3-*н*-C_4H_9	1,90	3-$COCH_3$	−0,28
3-OH	−0,49	4-$COCH_3$	−0,37
4-OH	−0,61	4-OC_2H_5	0,38
2-OCH_3	−0,33	4-$N(CH_3)_2$	0,18
3-OCH_3	−0,02	4-$C(CH_3)_3$	1,98
4-OCH_3	−0,04	4-$CH(CH_3)_2$	1,53
2-F	0,01	3-NHCHO	−0,98
3-F	0,13	3-$NHCOCH_3$	−0,79
4-F	0,15	4-$NHCOCH_2Br$	−0,37
2-Cl	0,59	$COOC_2H_5$	0,51
3-Cl	0,76	CH_2COOH	−0,72
4-Cl	0,70	3-C_6H_5	1,89
2-Br	0,75	4-C_6H_5	1,96
3-Br	0,94	4-$CH_2C_6H_5$	2,38
4-Br	1,02	OC_6H_5	2,08
2-I	0,92	SC_6H_5	2,32
3-I	1,15	NHC_6H_5	1,37
4-I	1,26	$CH(OH)C_6H_5$	0,54

Окончание табл. 3.3

Фрагмент	π	Фрагмент	π
$(CH_2)_2OC_6H_5$	2,01	4-$O(CH_2)_3OC_6H_5$	2,50
3-$NHCOC_6H_5$	0,49	$NHCOC_6H_4$-3′-Cl	1,20
4-$O(CH_2)_3C_6H_5$	2,66	$NHSO_2C_6H_4$-4′-SO_2F	0,50
NHC_6H_{11}	1,54	$NHCOC_6H_4$-4′-SO_2F	0,54
4-$CON(CH_3)C_6H_5$	0,86	$NHCONHC_6H_4$-4′-SO_2F	1,84

Рассмотренные выше молекулярные силы (электростатические, гидрофобные, водородные) характеризуются следующими особенностями.

1. Это слабые взаимодействия, обеспечивающие относительно невысокий выигрыш энергии (свободная энергия образования этих связей составляет 2—25 кДж/моль). Однако в любой белковой молекуле таких связей довольно много. Практически каждая аминокислота полипептидной цепи участвует в образовании одной или двух связей. Это и определяет высокую энергию внутрибелковых связей.

2. Взаимодействия с участием электростатических, водородных и гидрофобных связей протекают кинетически быстро. Скорости образования и распада связей определяются скоростями переориентации диполей и соизмеримы со скоростями движения молекул. Данное свойство позволяет биологическим системам реализовывать многостадийные процессы с перемещением больших групп ядер, разыгрывая различные сценарии взаимодействий и осуществляя процессы по маршруту с наименьшими кинетическими и термодинамическими барьерами.

3.2. Первичная структура белков. Биоинформатика

Базисным положением структурной химии белка является представление о том, что последовательность аминокислот полипептидной цепи (*первичная структура*) определяет все последующие структуры в иерархии, включая структуру активного центра фермента, а также возможность образования компактной функционально значимой структуры и комплексов с другими белковыми молекулами или биологический мембраной.

Традиционно иерархия структуры белка складывается из первичной структуры (последовательность аминокислот полипептидной цепи), вторичной структуры (укладка полипептидных цепей —

регулярные элементы типа α-спиралей и β-листов), третичной структуры (расположение атомов в пространстве) и четвертичной структуры (образование комплексов из субъединиц).

Развитие и автоматизация методов определения первичной структуры (сиквенирования) ДНК позволили расшифровать геномы различных организмов, включая геном человека, животных, растений и большого числа микроорганизмов. Поскольку существует однозначный переход структура ДНК — структура белка, в настоящее время получена информация о последовательности аминокислот более чем для миллиона белков. Для подавляющего большинства из них не известно ничего кроме первичной структуры. Лишь некоторые белки выделены и охарактеризованы как физические объекты. Однако поскольку первичная структура определяет все последующие структуры в иерархии, многие характеристики сиквенированных, но неизученных белков могут быть предсказаны теоретически.

Гигантские объемы расшифрованной генетической информации и современные возможности вычислительной техники обусловили возникновение новой области науки — биоинформатики. *Биоинформатика* — наука о компьютерном анализе генетических текстов, аминокислотных последовательностей, пространственной структуры и функций белков. В последние годы все быстрее увеличивается количество накопленной генетической информации, разрабатываются новые методы анализа полученных данных. Стремительное развитие молекулярной биологии и вычислительной техники позволяет анализировать все большее количество информации.

Закономерности формирования пространственной структуры белка, анализ взаимодействий белковых молекул друг с другом, поиск эволюционных взаимосвязей как на уровне молекул, так и на уровне организмов, предсказание структуры и функции генов и белков, поиск потенциальных мишеней для лекарственных веществ и предсказание возможных активностей этих веществ, исследование экзоинтронной структуры генов — вот некоторые проблемы, решать которые позволяет биоинформатика.

В настоящее время в общедоступном пользовании в Интернете находится несколько баз данных и программ. Наиболее популярны следующие.

1. Поиск гомологичных белков, обладающих близкой первичной структурой (программа BLAST).

2. База данных SWISS-PROT.

3. Выявление группы белков, близких по первичной структуре. Это позволяет объединить их в родовые группы (обычно считается, что белки родственны, если степень гомологии достигает 30 % и выше). Программы позволяют объединить гомологичные белки в кластеры и построить филогенетическое дерево, т.е. расположить белки по принципу наименьших изменений. На рис. 3.9 в

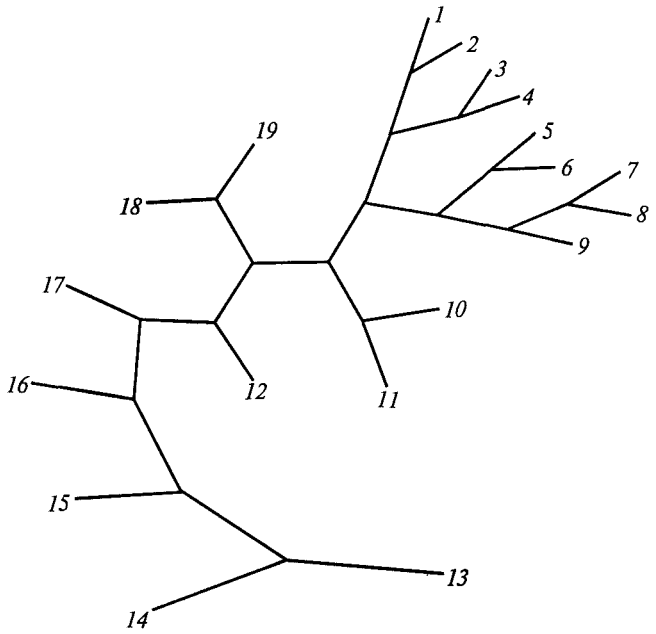


Рис. 3.9. Филогенетическое дерево пероксидаз, выделенных из растений:
1 — Cucumis sativus; 2 — Nicotiana tabacum; 3 — Populus kitakamiensis; 4 — Armoracia rusticana; 5 — Nicotiana sylvestris; 6 — Brassica rapa; 7 — Oryza sativa; 8 — Triticum aestivum; 9 — Arachis hypogaea; 10 — Artemisia annua; 11 — Medicago sativa; 12 — Vigna unguiculata; 13 — Mesembryanthemum crystallinum; 14 — Spinacia oleracea; 15 — Gossypium hirsutum; 16 — Arabidopsis thaliana; 17 — Hordeum vulgare; 18 — Lycopersicon esculentum; 19 — Solanum tuberosum

качестве примера показаны филогенетические связи «родственников» пероксидазы, выявленные в различных геномах. «Листики» на концах «ветвей» этого дерева представляют собой сиквенированные белки, в том числе и «вычисленные» на основе известной структуры ДНК; пересечения «ветвей» — гипотетические структуры, общие для всего семейства.

4. Сравнение белков по первичной структуре в больших группах (база данных HSSP (http://www.san.der.embl-heidelberg.de/hsspl)). Для сравнения последовательностей аминокислот, выявления близкородственных белков в биоинформатике широко используется процедура, которая называется «выравнивание» (alignment). Эту процедуру чаще всего проводят при моделировании пространственной структуры белка по гомологии, а также при поиске по базе данных с целью выявления объектов, сходных с изучаемой последовательностью аминокислот для предсказания ее функции. Процедура «выравнивания» представляет собой компьютерное сравнение последовательностей аминокислот в белках с выявле-

нием общих инвариантных участков цепи или позиций аминокислот. При таком сравнении легко обнаруживаются пропуски (делеции) отдельных участков цепи или вставки фрагментов цепи, возникающие за счет многообразных мутационных процессов или обменов фрагментами ДНК.

Пусть требуется провести «выравнивание» группы родственных белков относительно выбранного белка конкретного семейства. Для этого первичная структура этого белка берется за основу и на эту матрицу, как на «шаблон», нанизываются остальные белки семейства. Некоторые аминокислоты в определенных позициях будут совпадать для всего семейства. Другие позиции будут характеризоваться большим разнообразием аминокислот.

Если анализируемое семейство включает большое число белков (большая выборка), для каждой i-й позиции можно рассчитать вероятность p_i нахождения в этой позиции j-й аминокислоты, задаваемой «шаблоном». Для этого подсчитывается, сколько раз данная аминокислота встречается в конкретной позиции для всего семейства, и это число делится на общее количество анализируемых представителей семейства.

В биоинформатике для оценки инвариантности (или консервативности) положения j-й аминокислоты полипептидной цепи используется функция — энтропия Шеннона — интегральная характеристика вероятностного процесса:

$$H_j = -\sum_i (p_{ji} \log_2 p_{ji}), \qquad (3.14)$$

где p_{ji} — вероятность нахождения j-й аминокислоты в положении полипептидной цепи (случайное событие).

То обстоятельство, что для событий, вероятность которых стремиться к единице или к нулю, энтропия близка к нулю (или равна нулю), используется в биоинформатике. Если вероятность p_{ji} появления j-й аминокислоты в i-й позиции равна единице (абсолютно достоверное событие), энтропия Шеннона равна нулю. Таким образом, для аминокислот, занимающих абсолютно консервативные позиции, энтропия Шеннона равна нулю.

Представим себе семейство гомологичных белков, выравненных по определенному белку семейства. Последовательность аминокислот в этом белке взята за основу. Для каждой позиции этой последовательности может быть определена вероятность появления той или иной аминокислоты. Например, если сравниваются 100 белков и процедура выравнивания объединяет их в одну гомологичную группу, а в какой-либо позиции i оказываются 98 глицинов, то вероятность нахождения глицина в этой позиции равна 0,98. Соответственно для каждой позиции можно рассчитать энтропию H (уравнение (3.14)). В случае если практически для всех белков данного семейства (98 из 100) в этой позиции будет нахо-

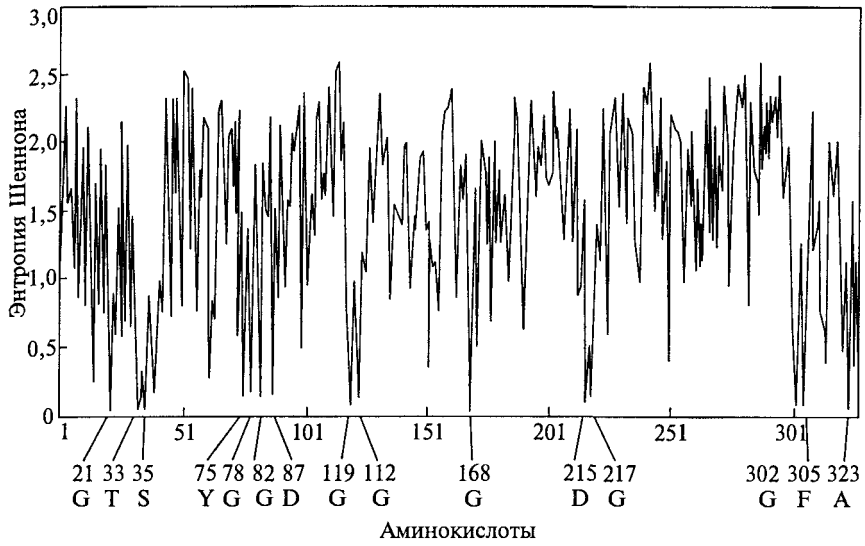


Рис. 3.10. Энтропия Шеннона, рассчитанная для 184 белков семейства пепсина при выравнивании относительно пепсина (указаны консервативные аминокислоты)

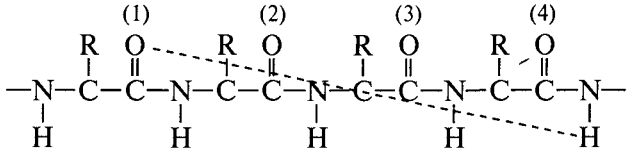
диться глицин, энтропия Шеннона будет стремиться к нулю. Это позволяет идентифицировать позиции аминокислот, общие для всего семейства. Такого рода позиции и соответствующие им аминокислоты называют консервативными.

На рис. 3.10 приведены результаты расчета энтропии Шеннона для белкового семейства (184 белка), близкого к ферменту пепсину. Все белки этого семейства обладают ферментативной активностью в реакции гидролиза белков и пептидов. Видно, что энтропия Шеннона для некоторых аминокислот (G21, T33, S35, Y75, G78, G82, D87, G119, G122, G168, D215, G217, G302, F305, A323) близка к нулю. Эти аминокислоты являются консервативными. Очевидно, что они выполняют важные функции, которые будут обсуждаться далее. Операцию выравнивания и расчета вероятности нахождения определенной аминокислоты в той или иной позиции будем использовать при обсуждении механизмов функционирования активных центров ферментов (см. гл. 8).

3.3. Вторичная, третичная и четвертичная структура белков

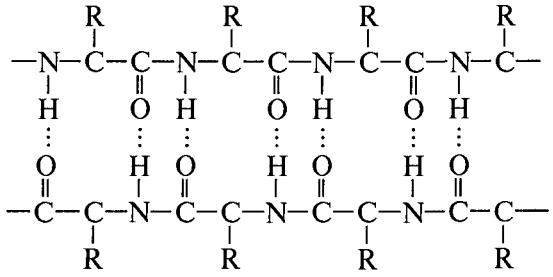
Водородные связи обеспечивают два типа *вторичных структур* в молекуле белка: α-спирали и β-структуры (складки или листы).

В рамках одной полипептидной цепи возможно взаимодействие амидного азота и карбоксильного кислорода с образованием водородной связи. Анализ возможных ненапряженных конформаций показывает, что наиболее выгодной и устойчивой является водородная связь между атомом кислорода одной и атомом азота другой аминокислоты, отстоящей от первой на четыре аминокислотных остатка:



Эта связь показана пунктирной линией. В образовании такой связи может участвовать каждый карбоксильный кислород и амидный азот. В силу этого полипептидная цепь сворачивается в спираль, получившую название α-спирали. Как правило, α-спираль закручена против часовой стрелки и обозначается α-R-спираль (в отличие от α-L-спирали, закрученной по часовой стрелке). Помимо классической α-спирали в образовании вторичных структур могут принимать участие спирали, образованные 1-м и 3-м, 1-м и 5-м аминокислотными остатками. Но эти структуры гораздо более напряженные и поэтому встречаются реже.

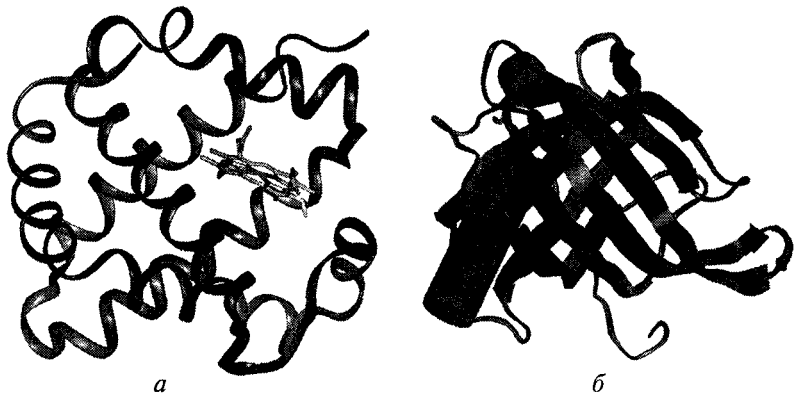
Два участка полипептидной цепи могут взаимодействовать друг с другом за счет водородных связей, создавая пространственные поверхности. Одна из возможных структур такого типа представлена на схеме



Множественные водородные связи, реализуясь по наименьшим расстояниям между атомами кислорода и азота двух участков полипептидной цепи, обеспечивают пространственный лист (складку, тяж). Такого рода структура получила название β-структуры. На рис. 3.11 показаны α-спираль (*а*) и β-лист (*б*).

Помимо регулярных вторичных структур типа α-спиралей или β-листов молекулы белков содержат нерегулярные элементы, такие как петли, связывающие α-спирали или β-листы.

Белки классифицируют, как правило, по содержанию регулярных структур — α-спиралей и β-листов (складок):



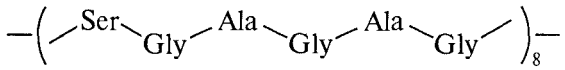
а *б*

Рис. 3.11. Укладка полипептидной цепи в α-спираль (*а*) и β-лист (*б*)

1) α-белки (состоят преимущественно из α-спиралей);
2) β-белки (структура образована β-складками или β-слоями);
3) α/β-белки (в структуре чередуются α-спирали и β-структуры);
4) (α + β)-белки (содержат как α-спирали, так и β-структуры, которые не чередуются, а группируются, и, таким образом, в молекуле белка содержатся блок α-спиралей и блок β-структур).

Полная классификация белков по вторичной структуре представлена в компьютерных базах данных Dai/FSSP, CATH (Class Architecline Topology Homology), SCOP (Structural Classification of Proteins).

Типичным представителем β-белков является фибриллярный белок шелка. По первичной структуре этот белок представляет собой блок-сополимер серина, глицина и аланина



включенный в менее регулярные участки цепи. Этот 8-кратный блок-сополимер из 6 аминокислот повторяется 50 раз и образует весьма прочный β-лист. Регулярность полипептидной цепи обеспечивает внутреннюю регулярную структуру полимера: двойной слой глицинов — двойной слой аланинов — двойной слой глицинов и т. д. Наличие большого числа ориентированных водородных связей определяет сверхвысокую прочность нити.

β-Структуры могут образовывать регулярные структуры типа «бочки», внутри которой локализуются функционально важные группы. На рис. 3.12 показана вторичная структура флюоресцирующего белка. Примером белков, содержащих α-спирали, могут служить мембранные белки — проводники протонов типа бактериородопсина (рис. 3.13). Полипептидная цепь образует семь α-спиральных участков, пронизывающих мембрану.



Рис. 3.12. Вторичная структура белка, содержащего флюороген внутри «бочки»

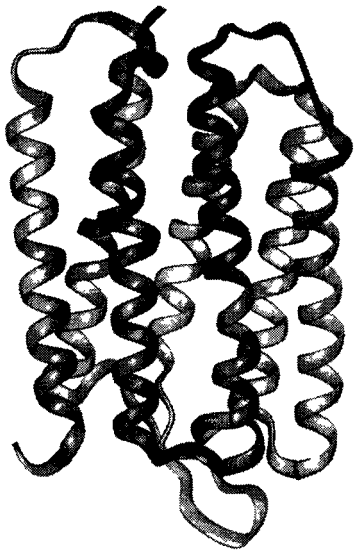
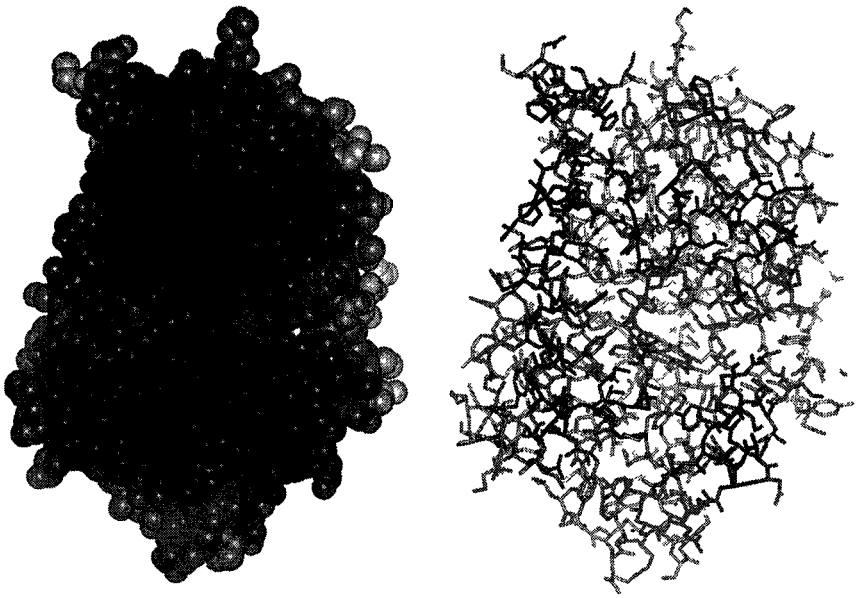


Рис. 3.13. Вторичная структура бактериородопсина

Структура белковой молекулы может быть стабилизирована за счет образования дисульфидных связей. Например, две SH-группы цистеина, находящиеся близко друг к другу, могут быть окислены с образованием внутримолекулярной дисульфидной связи Вклад дисульфидных связей в стабилизацию белковой молекулы составляет 4—20 кДж/моль, что весьма существенно. Образовавшаяся дисульфидная связь препятствует разворачиванию полипептидной цепи в процессе денатурации, тем самым увеличивая стабильность белка. Однако образование дисульфидных связей не всегда требуется для стабилизации белка. Так, для многих анаэробных и факультативно анаэробных организмов окислительно-восстановительный потенциал среды в клетке отрицателен, и сульфгидрильные группы находятся в восстановленном состоянии, тем не менее белки могут быть весьма стабильны, как, например, в случае термофильных микроорганизмов.

Под *третичной структурой* белка понимают расположение его полипептидной цепи в пространстве (рис. 3 14). При увеличении молекулярной массы белков можно наблюдать тенденцию к образованию в рамках одной полипептидной цепи структур глобулярного типа. Эти структуры включают гидрофобное ядро и сольватационную оболочку из полярных и заряженных групп. Такие структурные образования получили название доменов. Под доменами в белках понимают области в третичной структуре с автономной



а *б*

Рис. 3.14. Третичная структура (атомарное разрешение) цитохром-*с*-пероксидазы (показаны атомы (*а*) и связи (*б*))

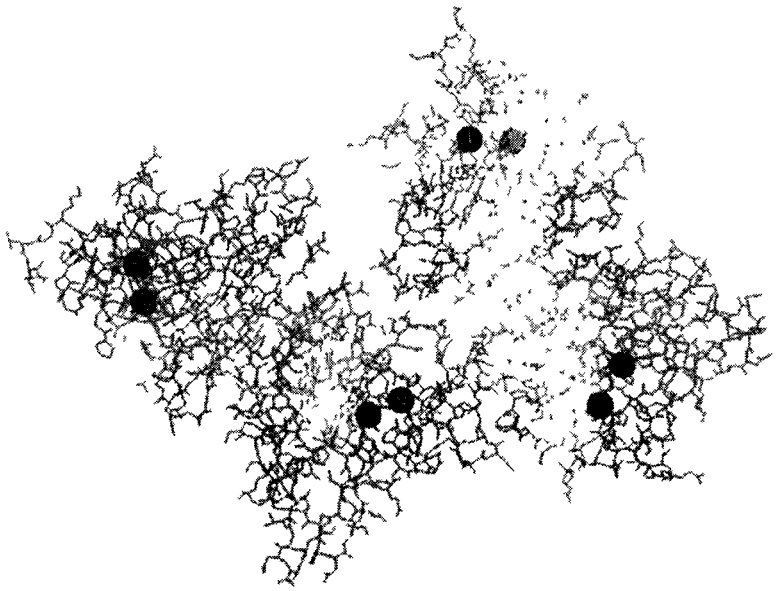


Рис. 3.15. Четвертичная структура супероксиддисмутазы

структурной организацией. Зачастую домены определяют какую-либо функцию белка. Так, в $НАД^+$-зависимых дегидрогеназах идентифицируется домен, ответственный за связывание кофактора — никотинамидадениндинуклеотида ($НАД^+$). Этот домен присутствует у большинства $НАД^+$-зависимых дегидрогеназ.

Многие белки склонны образовывать комплексы между субъединицами, образуя так называемую *четвертичную структуру*. В образовании комплексов значительную роль играют электростатические взаимодействия, водородные связи и иногда гидрофобные взаимодействия. На рис. 3.15 приведена структура фермента супероксиддисмутазы, обладающего четвертичной структурой. Оказалось, что образование четвертичной структуры играет определенную регуляторную роль в катализе. Образование контактов белок—белок может отражаться на конфигурации атомов активного центра и, как следствие, приводить к изменению каталитической активности. Это так называемое аллостерическое взаимодействие.

Этот феномен может иметь регуляторное значение, приводя к S-образным зависимостям скорости реакции от концентрации субстрата (см. гл. 4).

3.4. Масс-спектрометрия биомакромолекул

В настоящее время большое развитие получают методы масс-спектрометрического анализа биополимеров. Масс-спектрометрические методы, адаптированные к исследованию биополимеров, позволяют решать большой круг задач по идентификации нуклеиновых кислот, белков, пептидов, полисахаридов. Этот метод позволил расширить возможности генотипирования и генодиагностики, генетической инженерии, исследования углеводов сложного состава. Современная техника масс-спектрометрического анализа, совмещенная с унифицированной технологией разделения белков и пептидов, составляет основу протеомики — раздела современной молекулярной биологии, направленного на идентификацию и выявление функций всех белков клетки.

Масс-спектрометр — это устройство, позволяющее разделять пучок заряженных частиц на фракции частиц с одинаковым отношением массы к заряду m/z. Разделение происходит в высоком вакууме с помощью электрических и магнитных полей. Первый масс-спектрометр создал Дж. Дж. Томсон в 1907 г. Масс-спектрометрия широко используется в химии как универсальный метод анализа состава и структуры молекул. Для того чтобы разделить пучок заряженных частиц в электрическом и магнитном поле, молекулы необходимо предварительно ионизировать. Существует большое число методов ионизации, при этом наиболее часто ис-

пользуются методы электронного или фотонного удара. Очевидно, что когда речь идет о биомакромолекулах, принципиальные сложности возникают при переводе образца в газовую фазу. Революционные инженерные решения, найденные в середине 1990-х гг., позволили преодолеть эту трудность. Были созданы два метода ионизации белков и пептидов, нашедшие широкое применение. Это ассистированная матрицей лазерная десорбция — ионизация (Matrix-Assisted Laser Desorption — Ionization (MALDI)) и ионизация под действием электроспрея (Electrospray Ionization (ESI)). Для белков и пептидов молекулярной массой до 35 000 — 40 000 наибольшее применение нашел метод MALDI, сопряженный с время-пролетным (Time of Flight (TOF)) масс-спектрометром. При использовании метода MALDI образец наносят на матрицу — органическую кислоту, которая является донором протонов. Для анализа белков и пептидов часто используют α-циано-4-гидроксикоричную кислоту, 2,5-дигидроксибензойную кислоту, 3-метокси-4-гидрокоричную кислоту, для анализа нуклеотидов — 2,4,6-тригидроксиацетофенон, 3-метокси-4-гидрокоричную кислоту, 3-гидроксипиколиновую кислоту. Углеводы обычно анализируют с использованием матрицы в виде 2,5-дигидроксибензойной кислоты. Матрицы образуют с биополимерами кристаллоидные структуры, которые под действием короткого ($(2-5)\cdot 10^{-12}$ с), но достаточно мощного лазерного импульса испаряются. При этом происходит ионизация биополимера, обеспечивающая движение в газовой фазе и разделение отдельных полимерных молекул по массе и заряду.

В случае метода ESI образец ионизируется в тонком капилляре под действием мощного электрического поля (до 20 кВ). Электрический разряд вызывает образование заряженных микрокапель, которые в высоком вакууме освобождаются от воды. Усовершенствование техники масс-спектрометрии привело к созданию высокочувствительных методик, позволяющих оперировать с образцами массой 10^{-9} — 10^{-6} г.

Для разделения образцов на отдельные фракции используют традиционные методы: двумерный электрофорез, изоэлектрофокусирование, хроматографические методы.

Идентификацию белков проводят с использованием двумерного электрофореза с последующим триптическим гидролизом белков. Трипсин является специфической протеазой, расщепляющей белки и полипептиды по пептидным связям с участием лизина и аргинина. Образовавшиеся пептиды разделяют и идентифицируют по массам и зарядам с использованием, как правило, метода MALDI-TOF. На рис. 3.16 приведен масс-спектр пептидов, полученных в результате триптического гидролиза фермента органофосфатгидролазы (см. гл. 4). Белок был получен с заменой тирозина на фтортирозин. Масса пептида (см. рис. 3.16, пик 1411) отли-

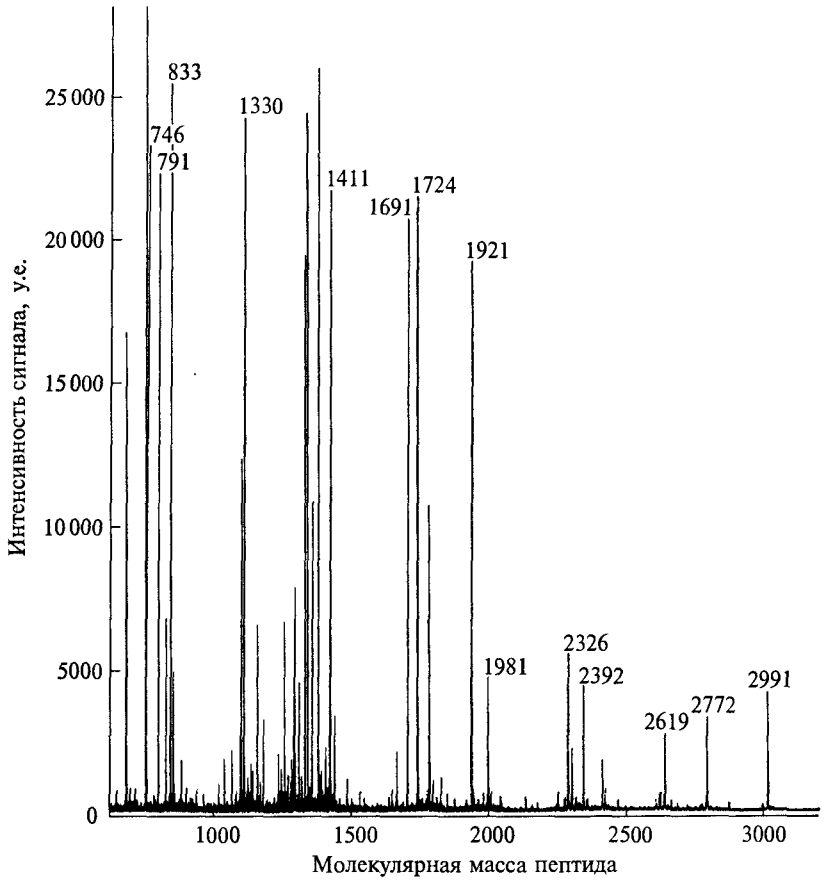


Рис. 3.16. Масс-спектр (метод MALDI TOF) пептидов, полученных при триптическом гидролизе органофосфатгидролазы, содержащей фрагменты фторированного тирозина

чается на 18 единиц от нативного белка, что соответствует увеличению молекулярной массы белка при замене атома водорода на фтор.

Таким образом, при исследовании структуры и каталитического действия ферментов масс-спектрометрический метод часто является в высшей степени полезным.

3.5. Методы изучения структуры белков

Рентгеноструктурный анализ. Принципиально важная информация о структуре белков, ферментов и их активных центров в

кристаллическом состоянии может быть получена методом рентгеноструктурного анализа. В настоящее время рентгеноструктурный анализ позволяет определять структуру биополимеров с атомарным разрешением при условии наличия кристалла размером до десятых долей миллиметра. Метод основан на дифракции рентгеновских лучей на периодической решетке, создаваемой упорядоченно расположенными атомами кристалла.

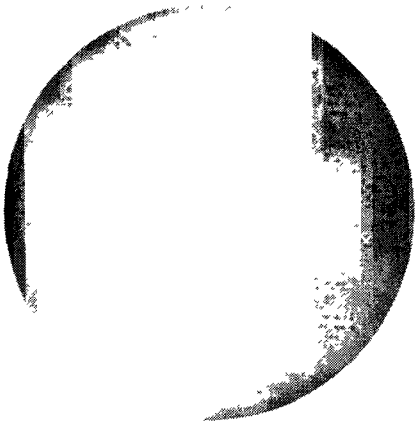


Рис. 3.17. Дифрактограмма фосфорилазы

Инструментальные методы исследования и компьютерные программы интерпретации дифракционных картин достигли высокого совершенства. В большинстве случаев самым трудным является получение кристалла биополимера требуемого размера и качества.

Необходимым условием является использование излучения с длиной волны, соизмеримой с межатомными расстояниями в кристалле. Поэтому основное применение для решения такого рода задач нашли рентгеновские дифрактометры. В аппаратах этого типа пучок рентгеновского излучения рассеивается на атомах кристаллической решетки, создавая интерференционную картину.

В некоторых направлениях происходит гашение волнового сигнала, в некоторых — усиление, создающее интенсивное рентгеновское пятно. Рассеянное излучение может быть зарегистрировано либо с помощью фотопленки, чувствительной к рентгеновскому излучению, либо с помощью счетчиков рентгеновского излучения. Изменяя направление падающего излучения, можно получить информацию о всех возможных вариантах интерференционной картины. Обычно направление излучения варьируют, вращая кристалл. Измеряемыми параметрами являются координаты реплик и интенсивность рассеянного излучения. Типичная рентгенограмма дифракционного рассеяния (дифрактограмма) приведена на рис. 3.17. Соответствующий математический аппарат и программное компьютерное обеспечение позволяют перейти от дифракционных реплик к координатам атомов.

Все полученные к настоящему времени структуры хранятся в международной базе данных белковых структур Protein Data Bank (PDB), к которой имеется свободный доступ.

Рассеяние рентгеновского излучения происходит за счет его взаимодействия с нековалентными внутренними электронами ато-

мов вещества. Поэтому часто в исследуемый объект вводят атомы тяжелых элементов, проводя так называемое изоморфное замещение. Если тяжелый атом обладает значительной электронной плотностью, изменение дифракционной картины будет существенным. По этой причине рентгеноструктурный анализ не дает информацию о положении протонов или атомов водорода.

Достижение высокой (0,2 нм) и низкой (0,5 нм) плотности разрешения зависит от многих факторов, таких как качество кристалла и степень упорядоченности молекул в кристаллической упаковке. Большую роль играет точность измерения интенсивности излучения.

В белках существуют области с высокой подвижностью, такой, что даже при полной кристаллизации не происходит «замораживания» структуры. Эти области в рентгеноструктурном анализе проявляются как участки с пониженным разрешением. Для характеристики разрешения вводится так называемый B-фактор, который позволяет идентифицировать области высокой подвижности.

Ограничение рентгеноструктурного анализа связано с тем, что структурная информация может быть получена только для кристаллического вещества.

В кристалле белка молекулы плотно упакованы; состояние кристалла характеризуется большими концентрациями компонентов. Это может повлиять на качество результатов рентгеноструктурного анализа биополимерных молекул.

В течение долгого времени шла дискуссия о том, можно ли на основе рентгеноструктурных данных делать вывод о строении молекул белка в растворе. Пришли к мнению, что искажения, которые вносит кристаллизация, относительно невелики, и можно считать, что рентгеноструктурный анализ дает адекватную атомарную структуру белка.

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса. В последние годы для изучения структуры биополимеров в растворе широко применяется спектроскопия ядерного магнитного резонанса. Метод основан на регистрации резонансного поглощения радиоизлучения веществом в сильном магнитном поле. Основой метода является следующий физический факт: ядра, имеющие спиновое квантовое число $^1/_2$, в постоянном магнитном поле могут находиться в двух состояниях, соответствующих разной ориентации ядерных магнитных моментов: по направлению и против направления поля. Разность энергий, соответствующих двум состояниям, линейно зависит от магнитной индукции поля. При облучении ядер радиоизлучением соответствующей частоты может происходить резонансное поглощение энергии, соответствующее разности энергии двух состояний ядер. Для биологических систем ядрами, имеющими спиновое квантовое число $^1/_2$, являются ^1H, ^{13}C, ^{31}P. Интерес представляет также ^{19}F.

В современных ЯМР-спектрометрах используются мощные магнитные поля 10—16 Тл; для протонов это соответствует резонансным частотам 400—800 мГц.

Каждое ядро находится в окружении ядер и электронов, создающих свое собственное локальное магнитное поле. В силу этого при индукции поля радиоизлучение поглощается в незначительной степени и отличается от индукции внешнего поля лишь на миллионные доли. Однако этого достаточно, чтобы современные ЯМР-спектрометры смогли зарегистрировать резонансные сигналы.

В основе структурных исследований сложных молекул, в том числе пептидов, белков, нуклеиновых кислот, лежит ядерный эффект Оверхаузера, который позволяет получить количественные сведения о расстоянии между определенными парами ядер, т.е. о геометрии молекул. Суть ядерного эффекта Оверхаузера заключается в том, что перенос энергии спинового возбуждения от одних ядер к другим зависит от расстояния между близлежащими ядрами. Устойчивое поглощение радиоизлучения может происходить лишь при условии быстрой релаксации избыточной энергии за счет ее передачи другим спиновым системам (спин-спиновая релаксация или спин-решетчатая релаксация). Если выброс энергии отсутствует, то система быстро насыщается, и поглощение радиоизлучения прекращается или заметно уменьшается. Релаксационные процессы происходят с участием близлежащих ядер, это позволяет получить информацию о геометрии молекул.

Данная методика использования спектроскопии ЯМР для структурных исследований — Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (NOESY) — находит широкое применение.

Дальнейшее развитие техники и методологии радиоспектроскопических измерений связано с получением двумерных спектров ЯМР. В этом случае каждый сигнал взаимодействующих ядер в виде кросс-пика получают как функцию двух переменных резонансных частот. Наиболее трудоемкая процедура заключается в соотнесении отдельных сигналов и ядер. Процедуру можно усовершенствовать, если искусственно дополнительно ввести в молекулу биополимера «сигналящее» ядро, такое как ^{15}N или ^{13}C. Для интерпретации спектров также применяют замену подвижных протонов на дейтроны, используя тяжелую воду.

В настоящее время техника спектроскопии ЯМР позволяет изучать структуру белков молекулярной массой 40 000—50 000 и можно ожидать дальнейшего прогресса в этой области.

3.6. Компьютерное молекулярное моделирование белков

Компьютерные методы находят широкое применение при решении различных задач современной биохимии и молекулярной

биологии. В последнее десятилетие большое развитие получили два метода — биоинформатика и молекулярное моделирование. Методология биоинформатики основана на анализе больших объемов информации, заложенной в последовательности оснований в нуклеиновых кислотах и аминокислот в белках (см. выше). Молекулярное моделирование позволяет в рамках существующих физических представлений описать структуру белков и прогнозировать ее изменения в случае тех или иных воздействий или локальных структурных изменений. Методы молекулярной динамики в совокупности с молекулярным моделированием обеспечивают понимание многих аспектов физики и химии белковых молекул. Графические возможности современных рабочих станций, относительная дешевизна и мощность современных процессоров, емкость устройств хранения информации, доступность большого числа разрешенных пространственных структур белков, нуклеиновых кислот и их комплексов — вот основные предпосылки быстрого распространения методов компьютерного моделирования и их эффективного применения. Методы компьютерного моделирования широко используются при определении структур биомолекул (рентгеноструктурный анализ и спектроскопия многомерного ядерного магнитного резонанса), при теоретическом изучении взаимодействий между биомолекулами, между мембранными белками и мембранами, для структурного анализа результатов направленного мутагенеза, а также для предсказания новых центров мутаций и структуры белков (метод гомологического моделирования).

Широкое применение метода молекулярного моделирования обусловило появление соответствующего программного обеспечения. Среди коммерческих программ следует отметить программы InsightII фирмы Accelrys Inc. (San Diego, CA, USA, http://www.accelrys.com), Sybyl фирмы Tripos Inc. (St. Louis, MO, USA, http://www.tripos.com). Этими программами легко пользоваться, они позволяют конструировать биомолекулы различной природы, редактировать структуру молекул (проводить замену групп, изменять конформацию молекулярных групп) и далее проводить структурную релаксацию методами молекулярной механики и динамики, вычислять различные характеристики молекул (электростатический потенциал, площадь поверхности, доступной растворителю, и др.), изучать взаимодействие между молекулами, проводить «выравнивание» последовательностей белков и построение структуры по гомологиям, осуществлять введение лигандов в активный центр ферментов. В последние годы появились также бесплатные программы, выполняющие некоторые из перечисленных выше функций, наиболее популярной является программа Swiss PDB Viewer (http://www.expasy.ch/spdbv/), обеспечивающая большие возможности.

Теоретической основой расчетов структуры биомакромолекул и их взаимодействия друг с другом является молекулярная механика. В рамках этого подхода вводится потенциальная энергия системы и полагается, что равновесной структуре соответствует глобальный минимум этой функции. Для поиска этого минимума (потенциальная энергия зависит от декартовых координат всех атомов, составляющих систему; количество переменных этой функции в типичной ситуации достигает нескольких тысяч) применяются различные методы динамического программирования. Вклад в потенциальную энергию отдельного атома зависит от его электронного состояния и заряда. Правила, по которым каждому атому в биомолекуле можно поставить в соответствие параметры его вклада в потенциальную энергию системы, и соответствующие значения этих параметров составляют так называемое силовое поле. В настоящее время общепринятыми силовыми полями являются CHARMM22 и AMBER. Первое разработано в Гарвардском университете группой под руководством проф. М. Карплюса и является частью пакета прикладных программ по молекулярной механике и динамике CHARMM. Второе было разработано в Калифорнийском университете под руководством проф. П. Колмана и является частью пакета прикладных программ AMBER. Оба силовых поля могут применяться к объектам, состоящим из белков, нуклеиновых кислот, липидов и углеводов, и приводят к схожим результатам.

Упомянутые пакеты программ CHARMM и AMBER по своей гибкости, эффективности и разнообразию изучаемых объектов превосходят любые коммерческие программы. Однако управление этими программами является довольно сложным, что предъявляет определенные требования к пользователю.

Методы молекулярного моделирования позволяют решить большой круг задач. Перечислим некоторые из них.

Компьютерный сайт-специфический мутагенез. Экспериментальный сайт-специфический мутагенез заключается в замене одной или нескольких аминокислот полипептидной цепи на уровне гена с последующей экспрессией нового белка (см. гл. 10). Это сложная и трудоемкая экспериментальная задача. В том случае, если известна кристаллическая структура белка, такую замену можно сделать виртуально. Процесс замены одной кислоты на другую с последующей оптимизацией системы по энергии позволяет получить новый белок. Это в высшей степени полезная процедура, позволяющая анализировать структурные изменения, вызываемые мутациями.

Построение структуры белка по принципу гомологии. Для большинства белков кристаллическая структура неизвестна. Однако каждый белок имеет близкого родственника с известной кристаллической структурой, который выявляется методами биоинфор-

матики (см. выше) как белок с высокой степенью гомологии. Если такой белок найден, молекулярное моделирование позволяет получить кристаллическую структуру гомологичного белка с высокой степенью надежности.

Взаимодействие фермента с субстратами и ингибиторами. При решении многих задач, прежде всего при поиске эффективных лекарственных средств, принципиально важно исследовать взаимодействие низкомолекулярных веществ (субстратов, ингибиторов) с активным центром фермента. Этот процесс можно моделировать на компьютере (процедура «докинга»). В результате будет получена информация, как вещество той или иной структуры взаимодействует с активным центром белка.

* * *

Когда скорости вычислений превысят скорости развития реальных событий — исчезнет будущее.

Белковая молекула формируется под действием разнообразных силовых полей, создаваемых атомами и группами атомов полимерной цепи. Ковалентные пептидные (амидные) связи создают первичную структуру — последовательность аминокислот, которая в значительной степени определяет все главные свойства молекулы. Относительно слабые, но многочисленные электростатические, гидрофобные взаимодействия, водородные связи формируют пространственную структуру белка. Все это создает достаточно прочные, уникальные по структуре молекулярные конструкции.

Несмотря на то что белок — это коллоидная система, молекула белка — это «твердое тело». Множественность слабых связей обеспечивает мощную энергетику формирования структуры.

Качественный прорыв в исследовании структуры белков обеспечили современные физико-химические методы. Рентгеноструктурный анализ, спектроскопия ядерного магнитного резонанса позволяют получать информацию о структуре белков с атомарным разрешением. Большую роль в современной химии белка играет масс-спектрометрический метод идентификации белков и пептидов. Объем структурной информации огромен. Только появление современной компьютерной техники обеспечило возможность адекватной интерпретации экспериментальных данных, создания новых способов хранения и переработки информации, а также трансформации и передачи ее потребителю в полном объеме.

В настоящее время трудно оценить, какая доля существующей в биологическом мире молекулярной структурной информации нами уже освоена. Однако очевидно, что подавляющее число изученных белков — близкие или далекие родственники. Существу-

ющие методы сравнения и идентификации структур, объединенные в новую отрасль знания — биоинформатику, позволяют выявить общие элементы различных белков и кодирующих их нуклеиновых кислот, объединить их в семейства и суперсемейства. Это позволяет построить структуры малоисследованных белков по принципу гомологии.

Все возрастающую роль в изучении биомакромолекул играют методы компьютерного молекулярного моделирования, молекулярной механики. Современный уровень этих методов и их доступность существенным образом облегчают исследователям возможность получения структурной информации.

С точки зрения понимания природы ферментов и механизмов их действия изучение элементарных взаимодействий в белковых молекулах и исследование структуры белков с атомарным разрешением являются фундаментальной базой, на которой строятся представления о механизмах каталитического действия ферментов. Другим важным базисом создания механистических представлений в химической энзимологии, как и во всей химии, является изучение кинетики реакций. Этому посвящена следующая глава.

Глава 4

КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА

Еще более фундаментальным вопросом химии является проблема химического превращения, механизма химических реакций, химической кинетики и как части ее — катализа.

Н.Н.Семёнов

4.1. Основные понятия химической кинетики

Химическая реакция является результатом взаимодействия молекул реагирующих веществ (субстратов). Это взаимодействие происходит при столкновении молекул. Однако не каждое столкновение приводит к образованию продуктов реакции. Для того чтобы произошла химическая реакция, энергия взаимодействующих молекул должна быть больше некоторой критической величины, называемой *энергией активации*. При этом для каждой химической реакции характерна своя энергия активации, зависящая от природы реагирующих веществ.

Все химические реакции делятся на простые и сложные. Реакции, представляющие собой совокупность однотипных элементарных актов, называются *простыми*. В зависимости от числа молекул, вступающих в простую реакцию, различают три вида реакций: мономолекулярные, бимолекулярные, тримолекулярные. Взаимодействие более чем трех молекул одновременно практически невозможно. Примеры схем простых реакций:

$$A \longrightarrow B$$

$$A + B \longrightarrow C$$

$$A \longrightarrow B + C$$

Реакции, представляющие собой совокупность нескольких простых реакций, называются *сложными*. К сложным реакциям относятся: обратимые, циклические, параллельные, последовательные, каскадные, смешанные.

Если химическая реакция протекает как от субстратов к продуктам, так и от продуктов к субстратам, то она называется *обратимой* при условии, что протекание реакции в обе стороны про-

ходит через одни и те же вещества, но в обратном порядке; *циклической* при условии, что реакция протекает в обе стороны через разные вещества или через те же вещества, но в порядке, отличном от обратного.

Реакции, протекающие одновременно с участием не менее чем одного общего субстрата, называются *параллельными*. Химические реакции, продукт одной из которых является субстратом следующей реакции, называются *последовательными*. В последовательных реакциях помимо субстрата и продуктов принято выделять *интермедиаты* (промежуточные продукты), представляющие собой вещества, образующиеся и распадающиеся в процессе химической реакции.

Основной задачей химической кинетики является изучение механизмов протекания химических реакций. При этом наиболее простой является задача определения количественных закономерностей химических превращений. Более сложная задача — определение всех промежуточных продуктов реакции. Полностью изучить механизм химической реакции — значит определить, из каких элементарных актов состоит реакция, в какой последовательности протекают элементарные акты и как они соотносятся между собой. Для того чтобы выяснить механизм любой химической реакции, проводят кинетический эксперимент, который заключается в измерении концентрации исследуемого вещества в зависимости от времени и ряда изучаемых параметров. Выбор исследуемого вещества зависит от известных или предполагаемых механизмов реакции и возможности экспериментальных методов.

Выбор конкретного вещества зависит от целей и задач исследования, методов, которыми владеет экспериментатор и которые в настоящий момент являются доступными. Целью кинетического эксперимента может являться: идентификация механизма реакции; оптимизация условий проведения реакции, т.е. нахождение условий, позволяющих провести реакцию с максимальным выходом за минимальное время.

При проведении кинетического эксперимента необходимо стремиться к количественной оценке динамики изменения концентрации всех компонентов системы. Однако в реальных исследованиях это практически невозможно. Поэтому экспериментатор вынужден ограничиться измерением лишь некоторых, как правило, наиболее информативных переменных. Если цель исследования — изучение процесса образования конечного продукта химической реакции, то разумным методом является измерение концентрации продуктов реакции. Измерение концентрации субстратов реакции для данной задачи также приемлемо. В эксперименте следует изучать кинетику превращения того соединения, концентрация которого может быть измерена наиболее простым способом или наиболее точно. Если цель исследования — определение ки-

нетических характеристик промежуточных соединений, следует определять концентрацию интермедиатов. Поскольку время превращения промежуточных соединений невелико (интермедиаты являются, как правило, нестабильными соединениями), для определения их концентрации следует использовать малоинерционные, высокочувствительные методы.

Кинетика простых реакций. Многочисленные исследования кинетики химических реакций показали (Я. Вант-Гофф, 1884 г.), что скорость простейшей химической реакции A ⟶ B линейно зависит от концентрации реагирующих веществ:

$$v = -\frac{dX}{dt} = kX, \quad v = \frac{dY}{dt} = kY,$$

где X — концентрация субстрата A; Y — концентрация продукта B; t — время; k — коэффициент пропорциональности.

Скорость химической реакции определяется как количество вещества, образующегося (распадающегося) в единицу времени в процессе химической реакции. Размерность скорости химической реакции — моль/(л · с), моль/(л · мин) и т.п. Скорость химической реакции в начальный момент времени, когда существенные изменения концентраций реагирующих веществ не успели произойти, называется *начальной скоростью реакции* и обозначается v_0. Скорость химической реакции в любой другой момент времени называется *текущей скоростью* v (рис. 4.1).

Реакции, скорость которых линейно зависит от концентраций взаимодействующих веществ, называются *реакциями первого порядка.* Обычно реакции первого порядка изображают в виде схемы A ⟶ B. Реакции первого порядка — самые распространенные в природе. Простые реакции первого порядка являются мономолекулярными (т. е. в элементарном акте участвует одна молекула субстрата). Кинетика реакций первого порядка описывается уравнением

$$v = -\frac{dX}{dt} = k_1 X.$$

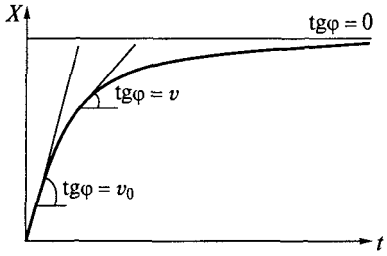


Рис. 4.1. Определение текущей v и начальной v_0 скорости химической реакции

В более сложных случаях скорость реакции нелинейным образом зависит от концентраций реагирующих веществ:

для *реакции второго (псевдовторого) порядка* A + B ⟶ C:

$$v = -\frac{dX}{dt} = k_2 X^2;$$

для *реакции третьего (псевдотретьего) порядка*:

$$v = -\frac{dX}{dt} = k_3 X^3.$$

Простые реакции второго порядка являются бимолекулярными, они протекают с участием двух молекул. Простые реакции третьего порядка являются тримолекулярными, они осуществляются при взаимодействии трех молекул. (Реакции третьего порядка встречаются крайне редко.)

Помимо реакций первого, второго и третьего порядка известны реакции нулевого порядка, скорость которых не зависит от концентрации вещества, вступающего в реакцию:

$$v = -\frac{dX}{dt} = \text{const}.$$

В общем случае

$$v = -\frac{dX}{dt} = kX^m,$$

где X — концентрация субстрата; k — коэффициент пропорциональности (константа скорости реакции); m — показатель степени (порядок реакции). Порядок реакции $m = 0, 1, 2, 3$ отвечает реакциям (псевдо)нулевого, (псевдо)первого, (псевдо)второго или (псевдо)третьего порядка. Заметим, что m принимает дробные значения только для сложных реакций.

Если в реакцию вступают несколько веществ, концентрация которых равна $X_1, X_2, ..., X_n$, то формально скорость реакции зависит от их концентраций следующим образом:

$$v = kX_1^{m_1} X_2^{m_2} ... X_n^{m_n}, \qquad (4.1)$$

где X_i — концентрация i-го компонента; k — коэффициент пропорциональности; m_i — порядок реакции по i-му компоненту.

Коэффициент пропорциональности k в уравнении (4.1) называют *константой скорости* химической реакции. Чем больше константа скорости реакции, тем быстрее протекает химическая реакция. Константа скорости не меняется при одних и тех же условиях эксперимента и не зависит от концентраций веществ, вступающих в реакцию. Константа скорости может зависеть от условий проведения реакции (температуры, давления, показателя pH). Константа скорости реакции отражает число активных соударений молекул веществ, вступающих в химическую реакцию, приводящих к образованию продуктов реакции. Если субстратом реакции (например, реакции распада) является только одно вещество, то константа скорости отражает вероятность химической трансформации молекул исходного вещества. Поэтому константа скорости реакции является одной из важнейших кинетических характеристик.

Размерность константы скорости реакции зависит от порядка реакции. Размерность константы скорости химической реак-

ции первого порядка — $с^{-1}$, $мин^{-1}$. Размерность константы скорости второго порядка — л/(моль·с), л/(моль·мин) и т.п.

Показатели степени в уравнении (4.1) m_1, m_2, ..., m_n называют порядком реакции по веществу X_1, X_2, ..., X_n соответственно. Их сумму называют (суммарным) *порядком реакции.* Порядок реакции является одной из важнейших характеристик механизма химической реакции. Значения m могут быть целочисленные и дробные; кроме того, значение m может быть равно нулю. Для простых реакций (реакций, протекающих без промежуточных соединений) значение m не превышает трех.

Следует особо отметить, что порядок реакции m характеризует механизм химической реакции в отличие от стехиометрических коэффициентов, отражающих пропорции между реагирующими веществами. Поэтому порядок реакции, как правило, не равен сумме стехиометрических коэффициентов веществ, вступающих в реакцию.

Порядок элементарной реакции всегда целочисленный; порядок сложной реакции (протекающей с образованием промежуточных соединений) может быть целым и дробным. Таким образом, если порядок реакции дробный, то эта реакция сложная; если порядок реакции целочисленный, то сделать однозначный вывод о сложности механизма химической реакции нельзя.

Определение порядка реакции и константы скорости реакции на основании результатов кинетических экспериментов — одна из важнейших задач химической кинетики.

Универсальный метод определения порядка и константы скорости химической реакции заключается в следующем. Для реакции порядка m константу скорости реакции можно найти, логарифмируя кинетическое уравнение $v = kX^m$:

$$\log v = \log k + m \log X. \qquad (4.2)$$

Тангенс угла наклона графика зависимости (4.2) равен порядку реакции по веществу X; отрезок, отсекаемый графиком на оси ординат, равен логарифму константы скорости реакции (рис. 4.2).

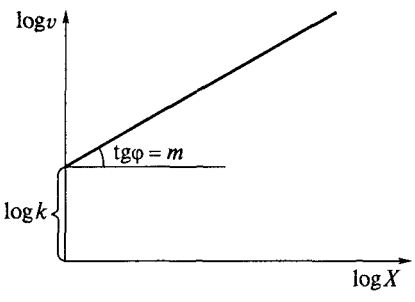


Рис. 4.2. Определение константы скорости k и порядка m химической реакции

Константу скорости реакции можно рассчитать, используя дифференциальное уравнение

$$v = -\frac{dX}{dt} = kX^m.$$

Это дифференциальное уравнение является уравнением с разделяющимися переменными. После преобразований получаем

$$-\frac{dX}{X^m} = kdt.$$

Из теории дифференциальных уравнений известно, что

$$\int \frac{dX}{X^m} = \begin{cases} \ln X, & m = 1, \\ \dfrac{1-m}{X^{m-1}}, & m \neq 1. \end{cases}$$

В качестве примера рассмотрим реакцию первого порядка

$$v = -\frac{dX}{dt} = kX, \quad \frac{dX}{X} = -kdt, \quad \int_{X_0}^{X} \frac{dX}{X} = -\int_0^t kdt, \quad \ln X - \ln X_0 = -kt.$$

Следовательно,

$$-kt = \ln \frac{X}{X_0}, \quad kt = \ln \frac{X_0}{X}. \tag{4.3}$$

Таким образом, график кинетической зависимости (4.3) для реакции (псевдо)первого порядка «спрямляется» в полулогарифмических координатах ($\ln(X_0/X)$, t), и тангенс угла наклона графика равен константе скорости реакции.

Для реакций первого порядка характерно следующее важное свойство: *время полупревращения* $\tau_{1/2}$ (время, за которое концентрация субстрата составит $X_0/2$) в реакции первого порядка не зависит от начальной концентрации субстрата X_0. Действительно, из уравнения (4.3) можно получить $\ln(X_0/X) = \ln 2 = k\tau_{1/2}$; тогда $\tau_{1/2} = 0{,}693/k$.

Кинетика сложных реакций. Реакция называется *сложной*, если химическое превращение исходных веществ в продукты происходит более чем за один элементарный акт.

Кинетика последовательных реакций. Простейшую последовательную реакцию можно записать следующим образом:

$$\mathrm{A} \xrightarrow{k_1} \mathrm{B} \xrightarrow{k_2} \mathrm{C}$$

Кинетика такой реакции описывается системой уравнений

$$\begin{cases} \dfrac{dA}{dt} = -k_1 A, \\ \dfrac{dB}{dt} = k_1 A - k_2 B, \\ \dfrac{dC}{dt} = -k_2 C. \end{cases}$$

Здесь A, B, C — текущая концентрация компонента A, B, C соответственно. Можно показать, что

$$B = \frac{k_1 A_0}{k_2 - k_1}[\exp(-k_1 t) - \exp(-k_2 t)],$$

$$C = \frac{A_0}{k_2 - k_1}[k_1 - k_2 + k_2 \exp(-k_1 t) - k_1 \exp(-k_2 t)],$$

$$A = A_0 - B - C,$$

где A_0 — начальная концентрация компонента А.

В ходе последовательной реакции происходит постепенное расходование вещества А и накопление вещества С. Вещество В в процессе последовательной реакции вначале накапливается, а затем расходуется.

В качестве иллюстрации на рис. 4.3 приведены данные по окислению смеси метана и воздуха (1 : 2) в присутствии 1 % NO при температуре 610 °С. Как следует из данных рис. 4.3, в этих условиях метан не сразу окисляется до конечного продукта CO — в процессе окисления образуется промежуточное соединение — формальдегид. Таким образом, схему данной реакции можно представить следующим образом:

$$CH_4 + O_2 \longrightarrow CH_2O + H_2O$$
$$CH_2O + O_2 \longrightarrow CO + H_2O$$

Кинетика параллельных реакций. Простейшая параллельная реакция имеет вид

$$A \xrightarrow{k_1} B, \quad A \xrightarrow{k_2} C$$

Кинетика этой реакции описывается системой уравнений

$$\begin{cases} \dfrac{dA}{dt} = -(k_1 + k_2)A, \\ \dfrac{dB}{dt} = k_1 A, \\ \dfrac{dC}{dt} = k_2 A. \end{cases}$$

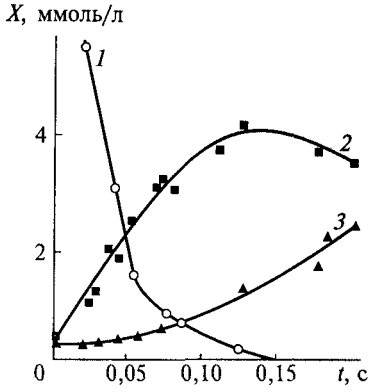


Рис. 4.3. Изменение концентрации X метана (*1*), формальдегида (*2*), монооксида углерода (*3*) во времени при окислении метана кислородом воздуха в присутствии 1 % NO при температуре 610 °С

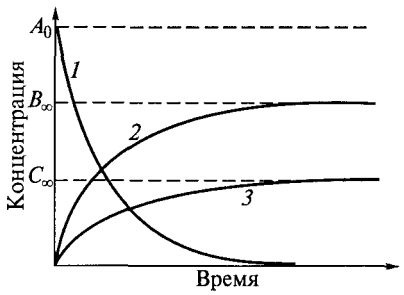


Рис. 4.4. Изменение во времени концентрации веществ А (*1*), В (*2*), С (*3*), участвующих в параллельной реакции

Закон сохранения вещества $A_0 = A + B + C$ позволяет сократить данную систему дифференциальных уравнений на одно уравнение

$$\begin{cases} \dfrac{dB}{dt} = k_1 A_0 - k_1 B - k_1 C, \\ \dfrac{dC}{dt} = k_2 A_0 - k_2 B - k_2 C, \end{cases}$$

тогда

$$B = \frac{k_1 A_0}{k_1 + k_2}\{1 - \exp[-(k_1 + k_2)t]\},$$

$$C = \frac{k_2 A_0}{k_1 + k_2}\{1 - \exp[-(k_1 + k_2)t]\},$$

$$A = A_0 - B - C.$$

Характерные изменения концентраций веществ в ходе параллельной реакции приведены на рис. 4.4. Видно, что концентрация вещества А убывает до тех пор, пока не станет равной нулю, а концентрации веществ В и С возрастают, пока не достигнут предельных значений:

$$B_\infty = \frac{k_1 A_0}{k_1 + k_2}, \quad C_\infty = \frac{k_2 A_0}{k_1 + k_2}.$$

Влияние различных факторов на скорость химической реакции. Скорость любой химической реакции зависит от условий ее проведения: состава реакционной смеси, температуры, давления, показателя pH и т.д. Изменение условий реакции обусловливает изменение константы скорости реакции или ее механизма.

Влияние температуры на скорость химической реакции. Зависимость константы скорости реакции от температуры определяется уравнением Аррениуса:

$$k = k_0 \exp[-E_A/(RT)]. \qquad (4.4)$$

График зависимости натурального логарифма константы скорости реакции от обратной температуры представляет собой прямую

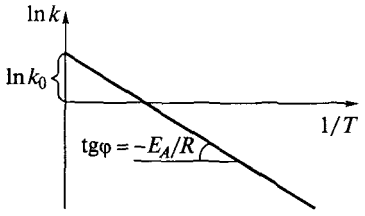


Рис. 4.5. Определение энергии активации по температурной зависимости константы скорости реакции

с тангенсом угла наклона $-E_A/R$, которая отсекает на оси ординат отрезок $\ln k_0$ (рис. 4.5).

Как показывают многочисленные исследования, скорость обычных реакций изменяется в 2—3 раза при увеличении температуры на 10 °С. Это соотношение легко получить, подставляя известные экспериментальные значения предэкспоненциального множителя k_0 и энергии активации в уравнение Аррениуса (4.4).

Теория абсолютных скоростей реакций. Теория абсолютных скоростей реакций основана на следующем предположении: для того чтобы произошла химическая реакция, необходимо непосредственное взаимодействие молекул реагирующих веществ между собой.

Согласно теории абсолютных скоростей реакций превращение молекул реагирующих веществ в продукты реакции осуществляется через промежуточное состояние, которое называется *активированным комплексом.* Именно образование активированного комплекса лимитирует скорость любой химической реакции.

Образование и распад активированного комплекса удобно описывать, используя потенциальную энергию ядер реагирующих молекул.

Рассмотрим простейшую систему, состоящую из атомов A, B, C, в которой протекает реакция A + BC ⟶ AB + C. При этом предполагаем, что атомы A, B, C расположены на одной прямой. Изолинии (т.е. линии, отвечающие одинаковым значениям) потенциальной энергии этой системы представлены на рис. 4.6, *а*. Процесс изменения расстояния r_{AB} между атомами A и B отражает протекание химической реакции. Этот процесс обозначен на рис. 4.6, *а* пунктирной линией, называемой координатой реакции.

Координата реакции начинается в «долине реагентов», где расстояние r_{AB} между атомами реагирующих веществ бесконечно большое. В «долине реагентов» потенциальная энергия системы атомов относительно невелика. Затем координата реакции проходит через область с повышенной энергией, называемой потенциальным барьером. Минимальное значение энергии в области потенциального барьера отвечает седловой точке *N*. Нахождение атомов A, B, C в области потенциального барьера означает образование активированного комплекса. Вслед за потенциальным барьером координата реакции вновь попадает в область с относительно низкими значениями потенциальной энергии («долину продуктов»).

Часто для описания химической реакции используют сечение поверхности потенциальной энергии по координате реакции

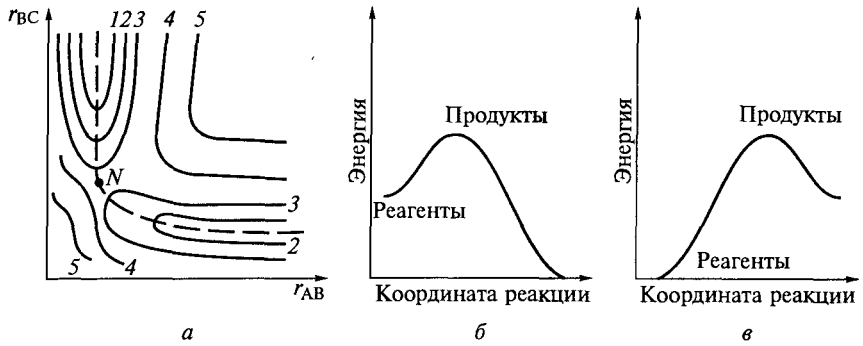


Рис. 4.6. Изменение потенциальной энергии системы в ходе химической реакции:

а — изолинии (*1*—*5*) потенциальной энергии (*N* — седловая точка; пунктирная линия — координата реакции); *б*, *в* — сечение вдоль координаты реакции соответственно для экзотермического и эндотермического процесса

(рис. 4.6, *б*, *в*). Начальные точки этого сечения отвечают относительно малым значениям потенциальной энергии. Они соответствуют «долине реагентов». Затем энергия в системе ядер реагирующих веществ возрастает. Это соответствует прохождению координаты реакции через потенциальный барьер. Согласно теории Аррениуса преодоление этого барьера возможно только в том случае, если энергия реагирующих молекул больше потенциального барьера, или, на языке теории Аррениуса, больше энергии активации. Вслед за потенциальным барьером энергия системы ядер вновь уменьшается. Это соответствует «долине продуктов».

Следует отметить, что время, за которое протекает элементарное химическое превращение, чрезвычайно мало и составляет 10^{-13}—10^{-12} с. За это время реагирующие частицы не успевают получить энергию извне или отдать ее своему окружению. Поэтому полная энергия системы реагентов, претерпевающих химическое превращение, не изменяется в течение элементарного акта.

Очевидно, что система реагентов не может оказаться в области потенциального барьера, если ее энергия мала. Таким образом, если энергия реагентов мала, то химическая реакция не произойдет. В то же время некоторые реагенты могут иметь энергию, существенно превышающую энергию потенциального барьера. Но, как следует из термодинамики, чем больше энергия таких молекул, тем число их меньше. Следовательно, большинство молекул реагентов, вступающих в химическую реакцию, будут иметь энергию, близкую к энергии потенциального барьера. Поэтому практически все реагенты, вступившие в химическую реакцию, пройдут через седловую точку потенциальной поверхности (или вблизи нее). Состояние системы атомов вблизи седло-

вой точки получило название *переходного состояния* (*активированного комплекса*).

Важнейшим положением теории абсолютных скоростей реакций (теории переходного состояния, теории активированного комплекса) является то, что активированный комплекс находится в квазиравновесии с исходными веществами. Это позволяет применять представления термодинамики для описания кинетики реакций.

Термодинамические параметры переходного состояния. Одним из наиболее важных следствий теории абсолютных скоростей химических реакций является определение константы скорости химической реакции:

$$k = \kappa \frac{k_B T}{h} \exp\left(-\frac{\Delta G^{\neq}}{RT}\right) = \kappa \frac{k_B T}{h} \exp\left(\frac{\Delta S^{\neq}}{R}\right) \exp\left(-\frac{\Delta H^{\neq}}{RT}\right), \quad (4.5)$$

где κ — трансмиссионный коэффициент (во всех случаях кроме специально оговоренных $\kappa = 1$); $\Delta G^{\neq}$ — стандартная свободная энергия активации; $\Delta S^{\neq}$ — энтропия реакции активации; $\Delta H^{\neq}$ — энтальпия реакции активации; k_B — постоянная Больцмана ($1{,}38 \cdot 10^{-23}$ Дж/К); h — постоянная Планка ($6{,}625 \cdot 10^{-34}$ Дж · с); R — универсальная газовая постоянная (8,31 Дж/(моль · К); T — абсолютная температура, К.

Из уравнения (4.5) следует, что константа скорости химической реакции определяется изменением энергии системы при переходе в активированное состояние. Следовательно, любой фактор, снижающий свободную энергию активации, будет способствовать ускорению химической реакции.

Можно показать, что энтальпия и энергия активации химической реакции связаны уравнением

$$\Delta H^{\neq} \approx E_A - RT. \quad (4.6)$$

Энергия активации и энтальпия активации отличаются на величину RT, которая при температуре 300 К составляет примерно 2,5 кДж/моль.

4.2. Стационарная кинетика ферментативных реакций. Кинетические схемы и механизмы

Термином «механизм» часто определяют совершенно разные понятия. На молекулярном уровне под механизмом понимают события, приводящие к превращению одних молекул в другие. Обычно эти гипотетические или реальные события выстраивают во времени, воссоздавая тем самым детальную картину превращений. Например, одним из фундаментальных представлений о механизме ферментативной реакции является представление о фер-

мент-субстратном комплексе, образующемся при превращении субстрата в продукт под действием фермента. Считается, что механизм ферментативной реакции заключается в следующем: субстрат образует комплекс с активным центром фермента, в комплексе происходят фермент-субстратные изменения, образуются продукты реакции, которые уходят из активного центра, освобождая его для взаимодействия с новой молекулой субстрата.

Что же послужило основой для этих представлений? Что доказывает существование фермент-субстратного комплекса и именно такой механизм реакции? Доказательством являются результаты изучения кинетики реакций, катализируемых ферментами.

В настоящем разделе будет рассмотрена кинетика реакций в ферментативных системах, находящихся в стационарном по концентрации промежуточных соединений состоянии, при избытке субстрата. В данном случае под *стационарным* понимается состояние системы, отвечающее неизменной (постоянной) во времени концентрации промежуточных соединений.

Рассмотрим классическую задачу, имеющую историческое значение. Биокинетика стала развиваться в начале XX в., когда несколькими исследователями была изучена зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата. Исследовалась реакция гидролиза сахарозы, катализируемая дрожжевой инвертазой. Эксперименты были поставлены в условиях существенного избытка субстрата по сравнению с ферментом. Оказалось, что зависимость начальной скорости реакции v_0 от начальной концентрации субстрата S_0 описывается гиперболической функцией (рис. 4.7):

$$v_0 = \frac{V_m S_0}{K_M + S_0}, \qquad (4.7)$$

где V_m (максимальная скорость) и K_M (константа Михаэлиса) — определяемые из экспериментальных данных параметры. При этом параметр V_m линейно увеличивается с ростом концентрации фермента, вводимого в реакцию:

$$V_m = k_{\text{кат}} E_0, \qquad (4.8)$$

где E_0 — начальная концентрация фермента.

Экспериментально наблюдаемые зависимости можно объяснить, основываясь, по крайней мере, на двух механизмах, дающих различную физическую картину явления.

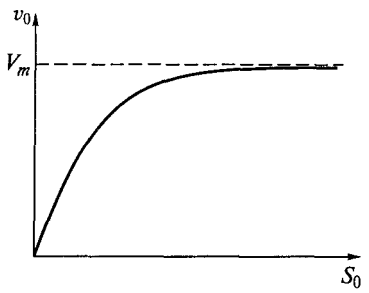


Рис. 4.7. Типичная зависимость начальной скорости ферментативной реакции от начальной концентрации субстрата

Согласно первому механизму (схема Михаэлиса) в процессе каталитического действия активный центр фермента E и субстрат S образуют промежуточный фермент-субстратный комплекс X, внутримолекулярное превращение которого приводит к образованию продуктов P с регенерацией активного центра:

$$\begin{aligned} &E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} X \\ &X \xrightarrow{k_2} E + P \end{aligned} \qquad (4.9)$$

где k_1, k_{-1} — константа скорости соответственно образования и диссоциации фермент-субстратного комплекса; k_2 — константа скорости мономолекулярного превращения комплекса.

Согласно второму механизму (схема Анри) комплекс фермент—субстрат образуется, однако он нереакционноспособен, а ферментативная реакция протекает бимолекулярно при взаимодействии субстрата с активным центром фермента:

$$\begin{aligned} &E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} X \\ &E + S \xrightarrow{k_a} P \end{aligned} \qquad (4.10)$$

где k_a — константа скорости реакции второго порядка взаимодействия активного центра фермента с субстратом.

Обе схемы описывают экспериментально наблюдаемую зависимость начальной скорости стационарной реакции от концентрации субстрата и фермента.

Схема Михаэлиса (4.9) при избытке субстрата приводит к следующей системе уравнений:

$$\begin{cases} \dfrac{dX}{dt} = k_1 E S_0 - (k_{-1} + k_2)X, \\ v_0 = \dfrac{dP}{dt} = k_2 X, \\ E_0 = E + X. \end{cases} \qquad (4.11)$$

В условиях стационарности концентрации промежуточного соединения ($dX/dt = 0$) уравнение для начальной скорости имеет вид

$$v_0 = \frac{k_2 E_0 S_0}{K_M + S_0}, \qquad (4.12)$$

где $K_M = \dfrac{k_{-1} + k_2}{k_1}$.

Схема Анри приводит к системе уравнений

$$\begin{cases} \dfrac{dX}{dt} = k_1 ES - k_{-1} X, \\ v_0 = \dfrac{dP}{dt} = k_a E S_0, \\ E_0 = E + X. \end{cases} \tag{4.13}$$

Согласно схеме Анри при стационарной концентрации X уравнение для начальной скорости имеет вид

$$v_0 = \frac{k_a K_A E_0 S_0}{K_A + S_0}, \tag{4.14}$$

где $K_A = \dfrac{k_{-1}}{k_1}$.

Таким образом, используя экспериментальные кинетические данные, полученные в стационарных по X условиях, нельзя определить, по какому механизму протекает ферментативная реакция. (Действительно, уравнения (4.12) и (4.14) практически совпадают.) Однако поскольку системы уравнений (4.11) и (4.13), описывающих кинетику ферментативной реакции, для двух обсуждаемых механизмов различны, следовательно, должны отличаться и уравнения, являющиеся решением этих систем. В самом деле, для схемы Михаэлиса с реакционноспособным промежуточным комплексом решение системы уравнений (4.11) позволяет получить следующее выражение для концентрации промежуточного соединения в нестационарных условиях:

$$X = \frac{E_0 S_0}{K_M + S_0}\{1 - \exp[-(k_1 S_0 + k_{-1} + k_2)t]\},$$

для концентрации продукта:

$$P = \frac{k_2 E_0 S_0}{K_M + S_0} t + \\ + \frac{k_2 E_0 S_0}{(K_M + S_0)(k_1 S_0 + k_{-1} + k_2)}\{\exp[-k_1 (K_M + S_0)t] - 1\}. \tag{4.15}$$

Для схемы Анри с реакционнонеспособным промежуточным комплексом соответствующие концентрации в нестационарных условиях описываются уравнениями

$$X = \frac{E_0 S_0}{K_A + S_0}\{1 - \exp[-k_1 (S_0 + K_A)t]\}, \tag{4.16}$$

$$P = \frac{K_A k_a E_0 S_0}{K_A + S_0} t - \frac{k_a E_0 S_0^2}{(K_A + S_0) k_1} \{\exp[-k_1 (S_0 + K_A) t] - 1\}. \quad (4.17)$$

Сопоставление уравнений (4.15) и (4.17) показывает, что на начальном этапе кинетика реакций по схеме Михаэлиса и схеме Анри существенно различается. Образование реакционноспособного промежуточного соединения в соответствии со схемой Михаэлиса (4.9) должно приводить к появлению участка на кинетической кривой $P(t)$ (рис. 4.8, кривая *1*), отвечающего периоду индукции:

$$\tau = [k_1 (S_0 + K_M)]^{-1}.$$

В то время как образование реакционнонеспособного комплекса согласно схеме Анри (4.10) должно приводить к уменьшению скорости процесса (рис. 4.8, кривая *2*). Отрезок, отсекаемый на оси абсцисс асимптотической прямой, соответствующий стационарной скорости процесса, равен

$$\tau' = -\frac{S_0}{k_1 K_A (K_A + S_0)}.$$

Таким образом, эти механизмы могут быть дискриминированы при изучении кинетики реакции в режиме, предшествующем установлению стационарного состояния.

Рассмотренные механизмы имеют лишь историческое значение. В настоящее время неизвестны ферменты, которые действовали бы по простой схеме (4.9) или (4.10). Реальные механизмы включают, как правило, большое число промежуточных соединений фермента с субстратом; их идентификация, исследование структуры, скоростей образования продуктов и расходования реагентов и составляют предмет изучения механизмов ферментативных реакций.

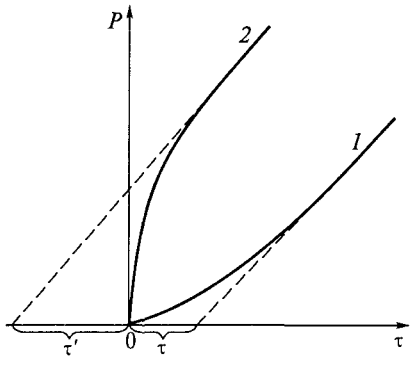


Рис. 4.8. Кинетические кривые образования продукта реакции, протекающей по схеме Михаэлиса (*1*) и схеме Анри (*2*)

Несмотря на то что схема и уравнение Михаэлиса не соответствуют на молекулярном уровне ни одному механизму реакции, они широко используются. Уравнение Михаэлиса — одно из фундаментальных уравнений ферментативной кинетики. Оно феноменологически описывает практически все ферментативные реакции, а наблюдаемые отклонения связаны, как правило,

с усложнением простейшей схемы. Дело в том, что уравнение Михаэлиса отражает фундаментальную особенность ферментативных реакций — участие в процессах лабильных промежуточных соединений субстрата и активного центра фермента. Все кинетические схемы, включающие стадии образования и расходования промежуточных соединений, приводят к зависимостям скорости от концентрации субстрата типа уравнения Михаэлиса. Возникает вопрос: является ли схема Михаэлиса единственной; может быть, существуют и другие кинетические схемы, приводящие к такой же зависимости скорости реакции от концентрации субстрата. Число кинетических схем, приводящих к аналогичной зависимости, неограниченно велико. В табл. 4.1 представлены лишь некоторые простейшие кинетические схемы, приводящие к уравнению для начальной скорости, формально эквивалентному уравнению Михаэлиса (4.12).

Несмотря на кажущуюся сложность реакции, независимо от числа и природы интермедиатов, принимающих участие в реакции, стационарная кинетика процесса будет описываться уравнением Михаэлиса. Для характеристики ферментативных реакций обычно определяют оба параметра, входящих в уравнение Михаэлиса: максимальную скорость V_m и константу Михаэлиса K_M. Важно отметить, что без детального знания механизма реакции интерпретация $k_{кат}$ и K_M как константы скорости процесса связывания фермента субстратом и константы скорости превращения фермент-субстратного комплекса соответственно неправильна, поскольку для разных кинетических схем константы $k_{кат}$ и K_M могут характеризовать совершенно различные процессы (см. табл. 4.1). Тем не менее эти характеристики легко определить экспериментально, и они в ряде случаев несут весьма важную информацию о свойствах каталитической системы.

Таблица 4.1

Некоторые кинетические схемы, приводящие к уравнению для начальной стационарной скорости, эквивалентному уравнению Михаэлиса

Схема	Параметры
$E + S \xrightarrow{k_1} X \xrightarrow{k_2} E + P$	$k_{кат} = k_2, \quad K_M = k_2/k_1$
$E + S \overset{K_S}{\rightleftarrows} X \xrightarrow{k_2} E + P$	$k_{кат} = k_2, \quad K_M = K_S$
$E + S \overset{K_A}{\rightleftarrows} X, \quad E + S \xrightarrow{k_a} E + P$	$k_{кат} = k_a K_A, \quad K_M = K_A$
$E + S \overset{K_S}{\rightleftarrows} X_1 \xrightarrow{k_2} X_2 \xrightarrow{k_3} E + P$	$k_{кат} = \dfrac{k_2 k_3}{k_2 + k_3}, \quad K_M = \dfrac{K_S k_3}{k_2 + k_3}$
$E + S_1 \xrightarrow{k_1} X + P_1, \quad X + S_2 \xrightarrow{k_2} E + P_2$	$k_{кат} = k_2[S_2]_0, \quad K_M = k_2[S_2]_0/k_1$

В качестве иллюстрации положения о существовании множества кинетических схем, приводящих к уравнению Михаэлиса, рассмотрим стационарную кинетику фермент-субстратного превращения в более общем случае — для системы с участием произвольного числа n промежуточных соединений:

$$E + S \underset{}{\overset{K_S}{\rightleftharpoons}} X_1 \xrightarrow{k_2} X_2 \xrightarrow{k_3} \cdots \xrightarrow{k_i} X_i \cdots \xrightarrow{k_n} X_n \xrightarrow{k_{n+1}} E + P \quad (4.18)$$

В стационарном состоянии по концентрациям промежуточных соединений ($dX_i/dt = 0$; $i = 2, \ldots, n$) при избытке субстрата ($S_0 \gg E_0$) кинетика процесса описывается системой уравнений

$$\begin{gathered} v_0 = \left(\frac{dP}{dt}\right)_{\text{ст}} = k_{n+1}X_n = k_2X_1, \quad E_0 = E + \sum_{i=1}^{n} X_i, \\ X_i = X_{i-1}\frac{k_i}{k_{i+1}} = X_1\frac{k_2}{k_{i+1}}, \quad i = 2, \ldots, n, \quad X_1 = \frac{ES_0}{K_S}. \end{gathered} \quad (4.19)$$

Для реакции (4.18) зависимость начальной стационарной скорости процесса от концентрации субстрата будет иметь вид уравнения Михаэлиса:

$$v_0 = \frac{k_{\text{кат}}E_0S_0}{K_M + S_0}, \quad (4.20)$$

где параметры K_M и $k_{\text{кат}}$ имеют эффективный характер и заданы уравнениями

$$k_{\text{кат}} = \left(\sum_{i=2}^{n+1}\frac{1}{k_i}\right)^{-1}, \quad K_M = \frac{K_S}{k_2}\left(\sum_{i=2}^{n+1}\frac{1}{k_i}\right)^{-1}.$$

Методы определения параметров V_m и K_M. Эти параметры могут быть определены из экспериментальных данных. Как правило, из данных по стационарной кинетике параметры V_m ($k_{\text{кат}}$) и K_M определяют на основе линеаризации уравнения Михаэлиса в рамках одной из его модификаций:

1) метод двойных обратных координат (рис. 4.9, *а*):

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_M}{V_m}\frac{1}{S_0}; \quad (4.21)$$

2) метод Скэтчарда (Иди—Хофсти) (рис. 4.9, *б*):

$$\frac{v_0}{S_0} = \frac{1}{K_M}V_m - \frac{1}{K_M}v. \quad (4.22)$$

Определение концентрации активных центров. Максимальная скорость реакции V_m равна

$$V_m = k_{\text{кат}}E_0, \quad (4.23)$$

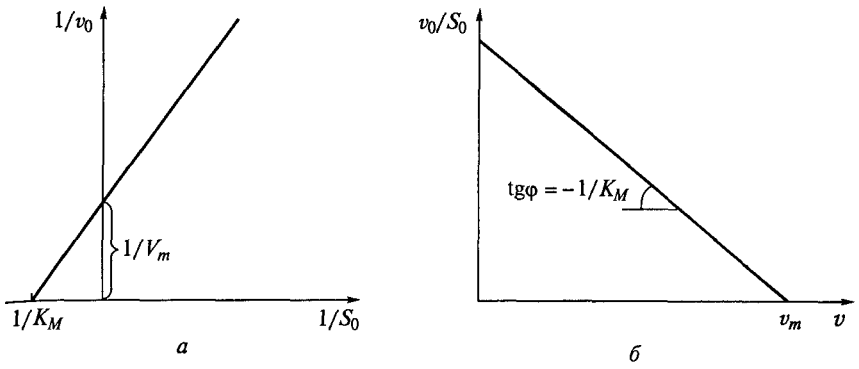


Рис. 4.9. Определение параметров V_m и K_M:
а — методом двойных обратных координат; *б* — методом Скэтчарда

где $k_{кат}$ — эффективная каталитическая константа скорости лимитирующей стадии, характеризующая число каталитических циклов, совершаемых активным центром в единицу времени; E_0 — концентрация активных центров фермента.

Для определения концентрации активных центров фермента используются следующие методы.

Определение по содержанию белка. Если известно, что фермент содержит один активный центр на молекулу белка и в растворе присутствует только один белок, молекулярная масса которого известна, концентрацию активных центров можно определить исходя из содержания белка в растворе:

$$E_0 = p/m, \tag{4.24}$$

где p — концентрация белка; m — молекулярная масса белка.

Определение по простетической группе. Для некоторых ферментов меткой активного центра является простетическая группа. Например, для ферментов, образующих прочный комплекс с гемом, определение концентрации активных центров сводится к определению в растворе гемина или его производных.

Определение методом необратимого ингибирования. Если для фермента известен ингибитор, необратимо блокирующий активный центр, то можно использовать метод, основанный на измерении остаточной активности фермента после инкубации его с ингибитором при варьировании концентрации I_0 последнего:

$$v_0 = k(E_0 - I_0); \tag{4.25}$$

при $I_0 = E_0$ имеем $v_0 = 0$.

Как правило, строят график (рис. 4.10) зависимости наблюдаемой скорости реакции от концентрации ингибитора. Точка пере-

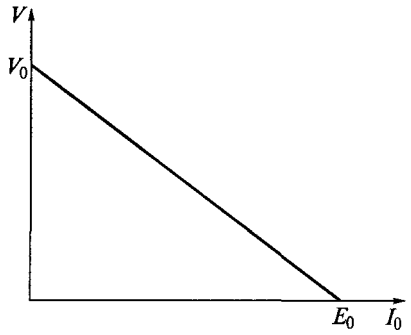


Рис. 4.10. Определение концентрации активных центров фермента методом необратимого ингибирования

сечения графика с осью абсцисс дает концентрацию активных центров.

Использование субстратов, стехиометрически образующих малореакционноспособный интермедиат. Если реакция фермента с субстратом связана со стехиометрическим образованием малореакционноспособного промежуточного соединения и выделением первого продукта, концентрация активных центров может быть определена по концентрации этого (первого) продукта. Так, гидролиз *п*-нитрофениловых эфиров и имидазольных производных алифатических и ароматических кислот под действием сериновых протеаз сопряжен с образованием ацилфермента и стехиометрическим образованием *п*-нитрофенола или имидазола:

$$R{-}\overset{\overset{O}{\|}}{C}{-}X + E \longrightarrow E{-}\overset{\overset{O}{\|}}{C}{-}R + X$$

Дальнейший гидролиз ацилфермента протекает относительно медленно. Определив концентрацию X, например спектрофотометрически, можно определить концентрацию E_0.

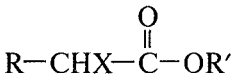
Лимитирующие стадии. Большинство экспериментальных кинетических исследований ферментов выполнено в режиме стационарной кинетики в условиях, когда скорость изменения концентраций лабильных интермедиатов существенно ниже скоростей образования продуктов или расхода субстратов. Как правило, постановка экспериментов в стационарном кинетическом режиме не вызывает сложностей. При этом из данных стационарной кинетики получают принципиально важную информацию о скоростях лимитирующих стадий ферментативных реакций.

Максимальная скорость ферментативной реакции характеризует самый медленный кинетический процесс (или группу самых медленных процессов), протекающий в активном центре катализатора. Действительно, из рассмотренной выше кинетической схемы реакции с участием произвольного числа n лабильных интермедиатов следует, что если существует какая-либо реакция, характеризуемая наименьшим значением константы скорости k_i (см. схему (4.18) и уравнение (4.20)), то эта константа будет определять максимальную скорость реакции. Если $k_i \ll k_j$; $j = 2, ..., n$; $j \neq i$, то $k_{кат} = k_i$. Поскольку лимитирующие процессы представляют наи-

больший интерес, информацию, получаемую методами стационарной кинетики, трудно переоценить.

В то же время существуют большие сложности в интерпретации стационарно-кинетических данных. Идентификация лимитирующих стадий реакции — одна из наиболее сложных задач в исследовании механизмов действия ферментов. Рассмотрим некоторые подходы к определению лимитирующей стадии реакции.

Использование субстратов с различной структурой и разной реакционной способностью. Если заметно различающиеся субстраты характеризуются одним и тем же значением $k_{кат}$, с высокой степенью достоверности можно утверждать, что реакция включает образование промежуточного соединения, структура которого является общей для всех исследованных субстратов, и превращение этого интермедиата лимитирует скорость каталитического процесса. Например, изучение гидролиза протеолитическими ферментами различных эфиров общей формулы



где структура R была постоянной, а уходящая группа R′ варьировалась, показало, что определяемое из данных стационарной кинетики значение V_m ($k_{кат}$) практически не зависит от структуры R′, в то время как реакционная способность эфиров в реакции щелочного гидролиза различается очень сильно. Это позволило предположить, что в реакции гидролиза α-химотрипсином и папаином сложноэфирных субстратов образуется промежуточное ацилферментное соединение, и гидролиз этого интермедиата является лимитирующей стадией.

В дальнейшем это предположение было проверено независимыми экспериментами: 1) исследовалась кинетика реакции в присутствии дополнительных низкомолекулярных реагентов, ускоряющих гидролиз ацилфермента; 2) некоторые ацилферментные промежуточные соединения, относительно стабильные при низких значениях pH, были выделены в индивидуальном виде и идентифицированы; 3) была исследована предстационарная кинетика реакции и детально изучена кинетическая схема процесса быстрокинетическими методами, позволяющими определять скорость образования и расхода ацилфермента.

Использование методов нестационарной кинетики. Этот подход является общим для идентификации механизма реакции и определения лимитирующей стадии процесса (подробно см. подразд. 4.3).

Зависимости начальной скорости реакции от концентрации субстрата, не подчиняющиеся уравнению Михаэлиса. Экспериментально наблюдаются зависимости скорости реакции от концентрации субстрата с экстремумом (рис. 4.11, линии *а*, *б*) или с ускорени-

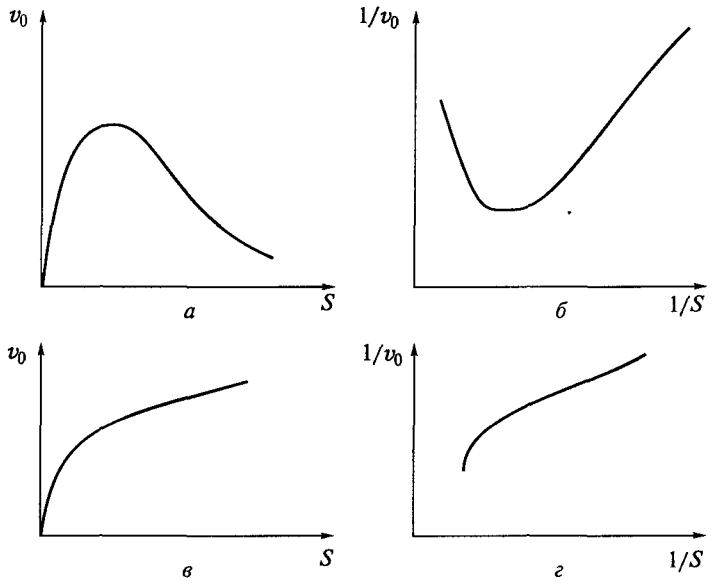


Рис. 4.11. Зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата, не подчиняющиеся уравнению Михаэлиса:
а, *б* — ингибирование избытком субстрата; *в*, *г* — активация избытком субстрата

ем на начальном этапе (линии *в*, *г*). Эти экспериментальные данные нельзя описать уравнением Михаэлиса, что связано с изменением механизма реакций. Известно несколько механизмов, приводящих к немихаэлисовым зависимостям. Все эти механизмы включают взаимодействие нескольких молекул субстрата с ферментом. Отклонения от уравнения Михаэлиса могут быть вызваны ингибированием или активацией реакции избытком субстрата, а также аллостерическими эффектами.

Ингибирование и активация избытком субстрата. Ингибирование субстратом приводит к экстремальной зависимости скорости от концентрации субстрата (см. рис. 4.11, *а*, *б*). Активация субстратом заключается в увеличении скорости реакции при высоких концентрациях субстрата (см. рис. 4.11, *в*, *г*). Оба этих эффекта обычно объясняют образованием тройного комплекса фермент—субстрат—субстрат, отличающегося по реакционной способности от фермент-субстратного комплекса:

$$\begin{array}{ccccc} E + S & \underset{}{\overset{K_M}{\rightleftharpoons}} & ES & \xrightarrow{k_{кат}} & E + P \\ & & \Big\uparrow\Big\downarrow K_{Si} & & \\ & & ES_2 & \xrightarrow{\alpha k_{кат}} & ES + P \end{array} \qquad (4.26)$$

С учетом дополнительного равновесия, характеризуемого константой диссоциации:

$$K_{Si} = \frac{[ES][S]}{[ES_2]},$$

уравнение для начальной скорости будет иметь вид

$$v_0 = \frac{\left(k_{кат} + \frac{\alpha k_{кат} S_0}{K_{Si}}\right) E_0 S_0}{K_M + S_0 + \frac{S_0^2}{K_{Si}}}. \qquad (4.27)$$

Если $\alpha > 1$, уравнение (4.27) объясняет эффект активации субстратом, если $\alpha < 1$ — эффект ингибирования субстратом.

Если тройной комплекс ES_2 нереакционноспособен ($\alpha = 0$), начальная скорость будет описываться уравнением

$$v_0 = \frac{k_{кат} E_0 S_0}{K_M + S_0\left(1 + \frac{S_0^2}{K_{Si}}\right)}. \qquad (4.28)$$

Это случай торможения реакции избытком субстрата. Такого типа уравнения часто встречаются в стационарной кинетике ферментативного катализа. Помимо торможения субстратом трехпараметрическое уравнение описывает зависимость скорости ферментативных реакций от pH, активацию и ингибирование ионами металлов и некоторые другие задачи. При определении параметров, если $K_M/K_{Si} \leq 0{,}1$, с достаточной степенью точности можно использовать асимптотические приближения. При относительно низких концентрациях субстрата ($S_0 \ll K_{Si}$) уравнение (4.27) преобразуется к виду

$$v_0 = \frac{k_{кат} E_0 S_0}{K_M + S_0},$$

т.е. представляет собой уравнение Михаэлиса, из которого определяют параметры V_m и K_M. При высоких концентрациях субстрата ($S_0 \gg K_M$) скорость реакции описывается уравнением

$$v_0 = \frac{k_{кат} E_0}{1 + S_0/K_{Si}}. \qquad (4.29)$$

Из этого уравнения при использовании преобразования

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{V_m} + \frac{1}{V_m K_{Si}} S_0 \qquad (4.30)$$

можно найти параметры V_m и K_{Si}.

Аллостерические эффекты. Уравнение Хилла. В свое время большое внимание исследователей привлекали часто наблюдаемые отклонения от уравнения Михаэлиса, приводящие к S-образной зависимости скорости реакции (степени насыщения) от концентрации субстрата. Впервые модель, приводящая к S-образной кривой, была рассмотрена в 1909 г. Р. Хиллом при интерпретации зависимости степени насыщения гемоглобина кислородом от парциального давления кислорода. На рис. 4.12 приведена типичная экспериментальная зависимость. По физической сути степень насыщения гемоглобина кислородом и степень насыщения фермента субстратом эквивалентны и могут рассматриваться в рамках одного подхода. Для объяснения экспериментально наблюдаемой зависимости было предположено, что в молекуле гемоглобина существуют n центров связывания, и процесс образования комплекса представляет собой кооперативное взаимодействие нескольких частиц:

$$P + nO_2 \rightleftharpoons P(O_2)_n,$$

где P — молекула белка.

Данный процесс может быть описан системой уравнений

$$K_a = \frac{[P(O_2)_n]}{[P][O_2]^n}, \qquad [P]_0 = [P] + [P(O_2)_n], \tag{4.31}$$

где $[P]_0$ — общая концентрация белка.

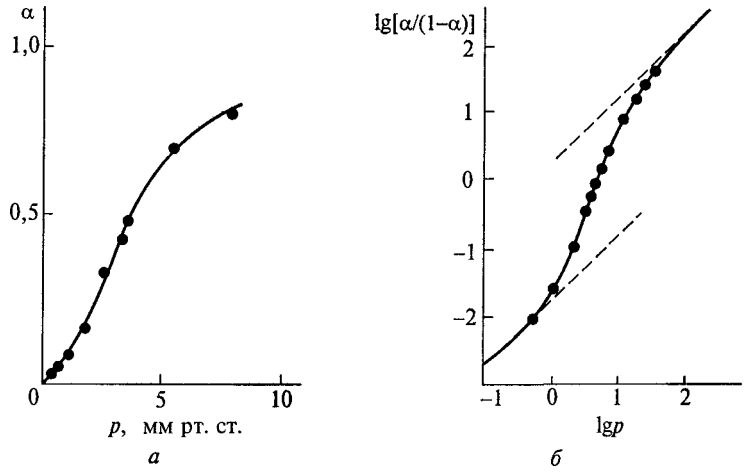


Рис. 4.12. Зависимость степени насыщения α гемоглобина кислородом (*а*) от парциального давления кислорода p и представление этих данных в координатах Хилла (*б*)

Если ввести безразмерный параметр — степень насыщения

$$\alpha = \frac{\left[\mathrm{P(O_2)}_n\right]}{[\mathrm{P}]_0},$$

то из выражений (4.31) следует уравнение Хилла:

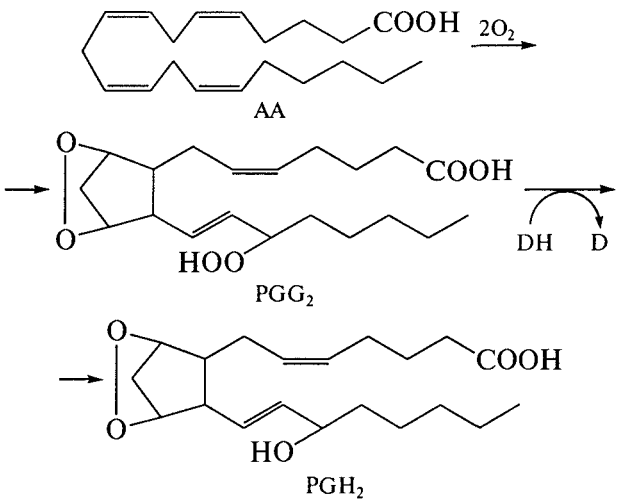
$$\alpha = \frac{K_a [\mathrm{O_2}]^n}{1 + K_a [\mathrm{O_2}]^n}. \qquad (4.32)$$

При очень низких концентрациях (парциальных давлениях) кислорода ($K_a[\mathrm{O_2}]^n \ll 1$) степень насыщения должна описываться степенной функцией концентрации кислорода $\alpha = K_a[\mathrm{O_2}]^n$. В соответствии с уравнением Хилла (4.32) экспериментальные данные должны линеаризоваться в координатах $\{\lg[\alpha/(1-\alpha)], \lg[\mathrm{O_2}]\}$, при этом тангенс угла наклона графика равен числу молекул лиганда, связанных с белком:

$$\lg\frac{\alpha}{1-\alpha} = \lg K_a + n\lg[\mathrm{O_2}]. \qquad (4.33)$$

Тщательная проверка уравнения Хилла при использовании уравнения (4.33) показала, что модель Хилла не позволяет адекватно описать экспериментальные данные. Во-первых, большая часть данных не линеаризуется в координатах уравнения (4.33). Во-вторых, тангенс угла наклона кривых в координатах уравнения (4.33) не превышает 2,8; в то время как экспериментальные данные показывают, что одна молекула гемоглобина связывает четыре молекулы кислорода. Таким образом, модель Хилла требует дальнейшей детализации и усовершенствования. Тем не менее данный подход нашел применение при интерпретации S-образных зависимостей скорости реакции от концентрации субстрата (модель Моно—Уаймена—Шанже).

Многосубстратные реакции. Ферменты катализируют, как правило, реакции с участием двух субстратов. Односубстратные реакции в большинстве случаев являются частным случаем двухсубстратных, протекающих в режиме большого избытка одного из компонентов реакции. Например, гидролитические реакции протекают при постоянном избытке воды, и в силу этого реакции имеют кажущийся односубстратный характер. Известны случаи, когда механизм каталитического действия включает взаимные реакции большого числа субстратов. Так, первая реакция образования простагландинов под действием простагландин-Н-синтазы (циклооксигеназы) из ненасыщенных тетраеновых кислот представляет собой двойное окисление с внедрением двух молекул кислорода, сопровождающееся последующим восстановлением перекисной группы в 15-м положении:



где AA — арахидоновая кислота; D — донор электронов; DH — восстановленная форма донора; PGH_2 — простагландин H_2 (продукт реакции); PGG_2 — промежуточный простагландин G_2.

Первым относительно стабильным продуктом реакции, обнаруживаемым в растворе, является PGG_2. Однако реакция циклооксигенирования ненасыщенных кислот не протекает в отсутствие четвертой молекулы субстрата D — донора электронов, который принимает участие в восстановлении перекисной группы в 15-м положении.

При анализе механизмов многосубстратных реакций полезную информацию дает исследование зависимостей скоростей реакций от концентрации всех субстратов. Эти зависимости позволяют определить механизмы и получить определенную информацию о возможной последовательности стадий.

В реакции с двумя субстратами участвуют: активный центр E, субстрат S_1 и субстрат S_2. Возможны два принципиально разных механизма реакции.

1. Активный центр фермента последовательно образует комплексы с первым и вторым субстратом; лимитирующей стадией является реакция, протекающая в тройном комплексе:

$$E \underset{K_1}{\overset{S_1}{\rightleftharpoons}} ES_1 \underset{K_2}{\overset{S_2}{\rightleftharpoons}} ES_1S_2 \xrightarrow{k} E + P \qquad (4.34)$$

2. Стадии взаимодействия субстратов с активным центром фермента разделены каким-либо необратимым химическим превращением (пинг-понг-механизм):

$$E \underset{K_1}{\overset{S_1}{\rightleftharpoons}} ES_1 \xrightarrow{k_1} X \qquad X \underset{K_2}{\overset{S_2}{\rightleftharpoons}} XS_2 \xrightarrow{k_2} E + P \qquad (4.35)$$

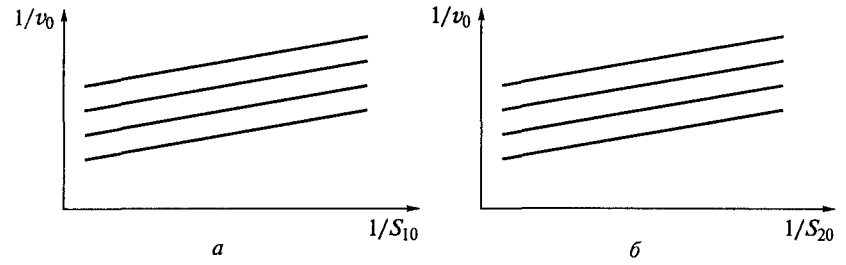


Рис. 4.13. Зависимость скорости серии ферментативных реакций от концентрации первого (*а*) и второго (*б*) субстрата для пинг-понг-механизма

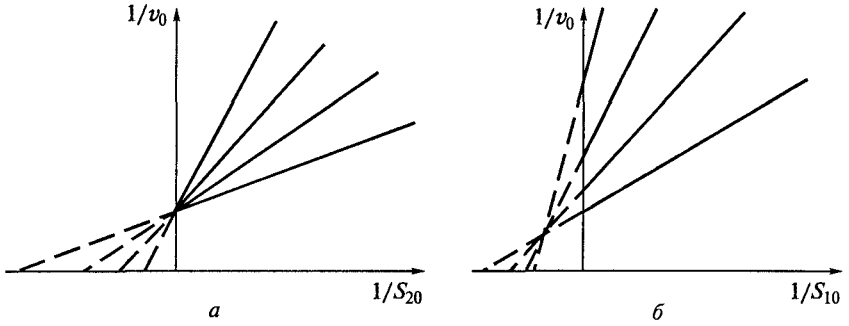


Рис. 4.14. Зависимость скорости серии ферментативных реакций от концентрации первого (*а*) и второго (*б*) субстрата для механизма с образованием тройного комплекса

Происходит образование комплекса активного центра с первым субстратом S_1, за этим следует его химическое превращение с образованием интермедиата X. Второй субстрат S_2 реагирует необратимо с фермент-субстратным комплексом.

Из эксперимента можно определить механизм реакции. Для этого исследуют зависимость скорости реакции от концентрации одного субстрата при постоянной концентрации другого субстрата, варьируя от серии к серии экспериментов концентрацию последнего.

Для реакции с образованием тройного комплекса ES_1S_2 зависимость начальной скорости от концентрации обоих субстратов описывается уравнением

$$v_0 = \frac{kE_0}{1 + \dfrac{S_{10}}{K_1} + \dfrac{S_{10}S_{20}}{K_1K_2}}, \qquad (4.36)$$

для реакции, протекающей по пинг-понг-механизму, — уравнением

$$v_0 = \frac{k_1 E_0}{1 + \frac{K_1}{S_{10}} + \frac{k_1}{k_2}\left(1 + \frac{K_2}{S_{20}}\right)}. \qquad (4.37)$$

Для пинг-понг-механизма графики зависимости скорости реакции от концентрации в двойных обратных координатах будут представлены серией параллельных прямых (рис. 4.13). Для механизма с образованием тройного комплекса экспериментальные данные должны линеаризоваться в обратных координатах, в результате будет получена серия пересекающихся прямых (рис. 4.14).

4.3. Нестационарная кинетика ферментативных реакций

Один из наиболее плодотворных подходов к исследованию механизмов последовательных реакций основан на изучении нестационарных процессов. Как правило, нестационарная кинетика позволяет детально проанализировать стадийность процесса. Прежде чем выйти на стационарный режим, реакция протекает в переходной фазе. Переходный нестационарный режим реакции, предшествующий стационарному, получил название предстационарного. В нестационарном режиме скорость изменения концентраций промежуточных соединений не равна нулю и является переменной в ходе реакции. С возможностями стационарного подхода для дискриминации механизмов реакции мы уже познакомились при обсуждении кинетических схем Михаэлиса и Анри.

Использование метода предстационарной кинетики позволило исследовать механизм действия протеолитических ферментов. При изучении гидролиза эфирных субстратов $R-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-OR'$ под действием α-химотрипсина были обнаружены следующие интересные особенности кинетики реакции.

1. Найдено, что для некоторых субстратов, отличающихся природой группы R′ и соответственно электронными свойствами реакционного атома углерода, экспериментально определяемые каталитические константы практически инвариантны, несмотря на то что реакционные способности соединений в модельной реакции, например в реакции щелочного гидролиза, различаются очень сильно. Это свидетельствует в пользу существования стадии, общей для всех изученных субстратов.

2. При исследовании кинетики гидролиза *п*-нитрофенилового эфира уксусной кислоты было обнаружено, что реакция протекает в две стадии. Вначале наблюдается быстрый «выброс» *п*-нитрофенола в приблизительно стехиометрической концентрации по отно-

шению к добавленному ферменту, затем следует стационарная, более медленная стадия дальнейшего гидролиза субстрата (рис. 4.15).

3. Для этой же реакции было показано, что при значении pH ~ 4 *п*-нитрофенилацетат ацетилирует активный центр фермента. Ацетилхимотрипсин можно выделить из реакционной смеси при низких значениях pH в виде индивидуального соединения.

Эти наблюдения позволили предположить, что при катализе α-химотрипсином происходит последовательное расщепление сложноэфирной связи с переносом ацильной группы на активный центр фермента, «выбросом» спиртового продукта и образованием ацилферментного промежуточного соединения.

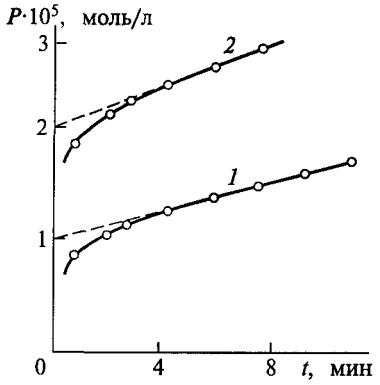


Рис. 4.15. Кинетические кривые образования *п*-нитрофенола в реакции гидролиза *п*-нитрофенилацетата под действием α-химотрипсина (концентрация фермента, соответствующая кривой *2*, в 2 раза выше, чем кривой *1*)

Доказательства ацилферментной природы катализа были получены при исследовании реакций, катализируемых протеолитическими ферментами, методом «остановленной струи» в предстационарном режиме. Детально была исследована кинетика гидролиза *п*-нитрофенилацетата под действием α-химотрипсина. В первую очередь возникает вопрос: является ли ацилхимотрипсин истинным промежуточным соединением в механизме катализа α-химотрипсином. Чтобы ответить на этот вопрос, необходимо рассмотреть и сопоставить две кинетические схемы.

Первая кинетическая схема, включающая образование промежуточного ацилфермента EA, имеет вид

$$\begin{aligned} E + S &\xrightarrow{k_a} EA + P_1 \\ EA &\xrightarrow[H_2O]{k_3} E + P_2 \end{aligned} \qquad (4.38)$$

Первая стадия реакции представляет собой ацилирование с «выбросом» в раствор спиртовой (фенольной) компоненты субстрата и переносом ацильной группы в активный центр фермента.

Вторая кинетическая схема может быть представлена следующим образом:

$$\begin{aligned} E + S &\xrightarrow{k_a} EA + P_1 \\ E + S &\xrightarrow{k_1} E + P_1 + P_2 \end{aligned} \qquad (4.39)$$

Первая стадия реакции представляет собой ацилирование активного центра, приводящее к образованию стабильного и реакционнеспособного ацилфермента, при этом ацильная группа «блокирует» активный центр. Ферментативная реакция протекает при взаимодействии фермента с субстратом (вторая стадия).

Для механизма (4.38) ацилфермент является промежуточным соединением; в случае схемы (4.39) происходит специфическое ингибирующее ацилирование активного центра. Анализ показывает, что эти кинетические схемы могут быть дискриминированы на основе экспериментальных данных. Для этих целей получим кинетическое уравнение для обеих кинетических схем и проведем их сравнение.

Кинетику реакции (4.38) при $S_0 \gg E_0$ описывает система уравнений

$$\begin{cases} \dfrac{dP_1}{dt} = k_a E S_0, \\ \dfrac{d[\mathrm{EA}]}{dt} = k_a E S_0 - k_3[\mathrm{EA}], \\ E_0 = E + [\mathrm{EA}]. \end{cases} \tag{4.40}$$

При разных начальных условиях зависимость концентрации ацилфермента от времени описывается различными функциями. Если в начальный момент времени все активные центры фермента находятся в свободном состоянии ($t = 0$: [EA] = 0), концентрация ацилфермента будет задана функцией

$$[\mathrm{EA}] = \frac{k_a E_0 S_0}{k_a S_0 + k_3}\{1 - \exp[-(k_a S_0 + k_3)t]\}. \tag{4.41}$$

Однако если в начальный момент все активные центры ацилированы ($t = 0$: [EA] = E_0), зависимость [EA] от времени имеет вид

$$[\mathrm{EA}] = \frac{E_0}{k_a S_0 + k_3}\{k_a S_0 + k_3 \exp[-(k_a S_0 + k_3)t]\}. \tag{4.42}$$

Соответственно для концентрации первого продукта реакции, вычисленной при подстановке уравнений (4.41) и (4.42) в (4.40) с учетом уравнения материального баланса, будут получены следующие зависимости:

при начальных условиях $t = 0$, [EA] = 0:

$$P_1 = \frac{k_a k_3 E_0 S_0}{k_a S_0 + k_3} t + \frac{k_a^2 S_0^2 E_0}{(k_a S_0 + k_3)^2}\{1 - \exp[-(k_a S_0 + k_3)t]\}; \tag{4.43}$$

при начальных условиях $t = 0$, [EA] = E_0:

$$P_1 = \frac{k_a k_3 E_0 S_0}{k_a S_0 + k_3} t + \frac{k_a^2 S_0^2 E_0}{(k_a S_0 + k_3)^2} \{\exp[-(k_a S_0 + k_3)t] - 1\}. \quad (4.44)$$

На рис. 4.16, *а* приведены функции (4.43) и (4.44). В первом случае наблюдается быстрый рост концентрации первого продукта реакции, во втором случае — период индукции. Естественно, что стационарная скорость реакции не зависит от начальных условий и для обоих начальных условий имеет вид

$$v_{ст} = \frac{k_a k_3 E_0 S_0}{k_a S_0 + k_3}.$$

Для схемы (4.39) кинетика реакции описывается системой уравнений

$$\begin{cases} \dfrac{dP_1}{dt} = (k_a + k_l) E S_0, \\ \dfrac{d[\text{EA}]}{dt} = k_a E S_0, \\ E_0 = E + [\text{EA}]. \end{cases} \quad (4.45)$$

Решение этой системы при начальных условиях $t = 0$, $[\text{EA}] = 0$ приводит к зависимостям

$$[\text{EA}] = E_0 [1 - \exp(-k_a S_0 t)], \quad (4.46)$$

$$P_1 = E_0 \left(1 + \frac{k_l}{k_a}\right) [1 - \exp(-k_a S_0 t)]. \quad (4.47)$$

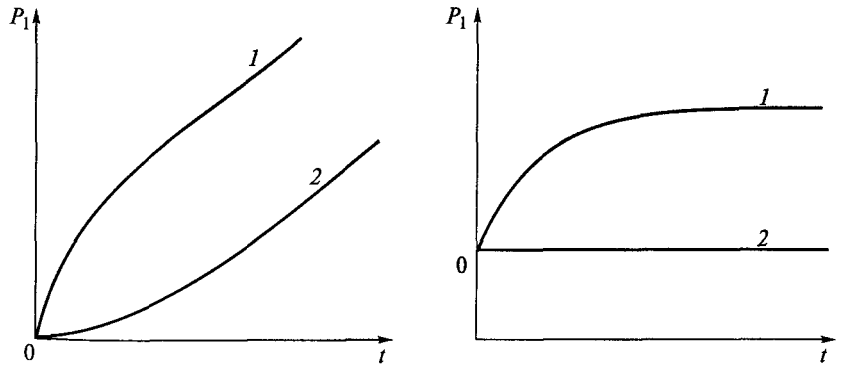


Рис. 4.16. Изменение во времени концентрации продукта реакции, протекающей по схеме (4.38) (*а*) и (4.39) (*б*) при различных начальных условиях:

1 — $t = 0$, $[\text{EA}] = 0$; *2* — $t = 0$, $[\text{EA}] = E_0$

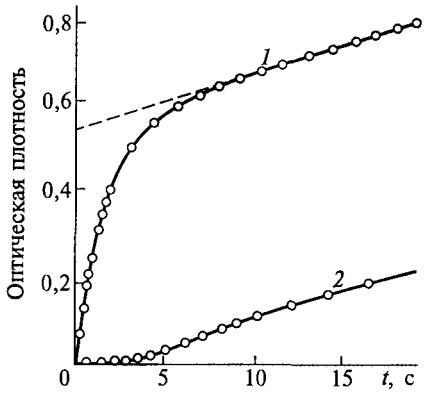


Рис. 4.17. Кинетические кривые образования *n*-нитрофенола в реакции гидролиза *n*-нитрофенилацетата под действием α-химотрипсина:

1 — реакция инициировалась быстрым смешиванием фермента с субстратом при pH 8,2; *2* — реакция инициировалась быстрым изменением pH от 4,8 до 8,2 (концентрация фермента $4{,}4 \cdot 10^{-5}$ моль/л, субстрата $2 \cdot 10^{-4}$ моль/л)

При начальных условиях $t = 0$, $[EA] = E_0$ фермент блокирован и реакция не протекает.

На рис. 4.16, *б* представлены зависимости $P_1(t)$ для кинетической схемы (4.39).

На рис. 4.17 приведены экспериментальные данные, которые однозначно свидетельствуют в пользу кинетической схемы, где ацилфермент выступает в качестве промежуточного соединения. Кривая *1* соответствует начальному условию $t = 0$, $[EA] = 0$ (в реакционную ячейку вводят свободный фермент). Кривая *2* наблюдается при условии $t = 0$, $[EA] = E_0$ (в реакционную среду при pH 8,2 вводили ацилфермент, полученный при низких значениях pH).

В дальнейшем ацилферментный механизм был показан для реакции гидролиза *n*-нитрофениловых эфиров с участием растительных ферментов — папаина, фицина, а также протеолитических ферментов животного происхождения — трипсина и плазминов.

Схема (4.38) является простейшей схемой с участием ацилфермента. Детальное экспериментальное исследование кинетики реакции показало, что механизм реакции более сложен и включает, по крайней мере, одну стадию, предшествующую образованию ацилфермента.

4.4. Влияние температуры и показателя pH на скорость ферментативных реакций

Влияние температуры и показателя pH на скорость ферментативных реакций имеет ряд особенностей, связанных в первую очередь с многостадийностью ферментативных превращений. Уравнение Вант-Гоффа, описывающее температурную зависимость константы равновесия ферментативной реакции, так же как и любых других химических реакций, имеет вид

$$\frac{d\ln K}{dT} = \frac{\Delta H}{RT^2}, \quad \text{или} \quad \frac{d\ln K}{d(1/T)} = -\frac{\Delta H}{R}. \qquad (4.48)$$

Таким образом, тангенс угла наклона графика зависимости $\ln K = f(1/T)$ равен $-\Delta H/R$ (рис. 4.18). Следовательно, экспериментальные данные по температурной зависимости константы равновесия ферментативной реакции можно обрабатывать так же, как и для обычных химических реакций.

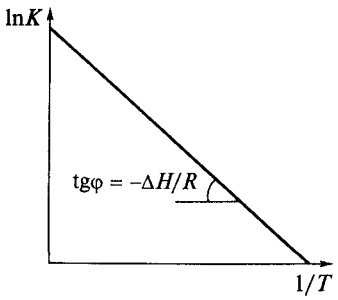


Рис. 4.18. Температурная зависимость константы равновесия ферментативной реакции

Температурная зависимость константы скорости ферментативной реакции описывается уравнением Аррениуса (4.4). Параметры процесса активации E_A, $\Delta S^{\neq}$, $\Delta H^{\neq}$ можно получить из температурной зависимости, используя уравнение Аррениуса (4.4) или уравнения (4.5), (4.6), полученные на основе теории активированного комплекса. Следует иметь в виду, что большинство определяемых в ферментативной кинетике констант имеют эффективный характер. Поэтому даже в тех случаях, когда изучаемая ферментативная реакция действительно протекает в равновесных условиях, равновесная константа K, входящая в выражение (4.48), может носить эффективный характер и зависеть, например, от pH среды (см. далее).

Для скоростей ферментативных реакций характерно наличие интервала температуры, в котором скорость максимальная. Уменьшение температуры приводит к снижению скорости химической реакции за счет уменьшения числа молекул фермента и субстрата с высокой энергией, что соответствует обычной химической кинетике. Поскольку ферменты являются белковыми молекулами, увеличение температуры приводит к их «плавлению», а затем и к денатурации. Поэтому повышение температуры выше определенных значений обычно вызывает уменьшение скорости ферментативной реакции.

Влияние конформационных изменений активных центров ферментов. Изучение конформационных изменений ферментов можно проводить на основании уравнения Вант-Гоффа для константы равновесия или уравнения Аррениуса для константы скорости. Рассмотрим инактивацию α-химотрипсина под действием ультразвука:

$$\begin{array}{ccc} \mathrm{E} & \overset{K}{\rightleftharpoons} & \mathrm{E}' \\ k_1 \downarrow & & \downarrow k_2 \\ \multicolumn{3}{c}{\text{Продукты инактивации фермента}} \end{array}$$

Здесь E, E' — фермент и его конформер соответственно. Было показано, что константы скоростей k_1, k_2 практически не зависят от температуры в исследуемом температурном интервале.

Суммарная скорость реакции инактивации определяется следующим образом: $v = k_1E + k_2E'$.

Используя уравнение материального баланса $E_0 = E' + E$, получаем

$$v = k_{эф}E_0, \quad k_{эф} = \frac{k_1 + k_2K}{1 + K}.$$

Продифференцируем полученное выражение по температуре T, предполагая константы скоростей постоянными (так как конформационные изменения происходят в узком температурном диапазоне), и получим

$$\frac{dk_{эф}}{dT} = \frac{k_2 - k_1}{(1 + K)^2}\frac{dK}{dT}.$$

При температуре, соответствующей конформационному переходу, $K = 1$, что соответствует точке перегиба в координатах ($k_{эф}$, T), тогда

$$\frac{dk_{эф}}{dT} = \frac{k_2 - k_1}{4}\frac{dK}{dT}.$$

Преобразуем уравнение Вант-Гоффа

$$\Delta H = \frac{RT^2}{K}\frac{dK}{dT},$$

получим

$$\Delta H = \frac{4RT^2}{k_2 - k_1}\frac{dk_{эф}}{dT}\bigg|_{T=T_c},$$

где T_c — температура конформационного перехода.

Из данных, приведенных на рис. 4.19, следует: $T_c = 27$ °С, $\Delta H =$ = 405 кДж/моль.

Влияние показателя pH на скорость ферментативных реакций. Все известные ферменты содержат ионогенные группы. Ионоген-

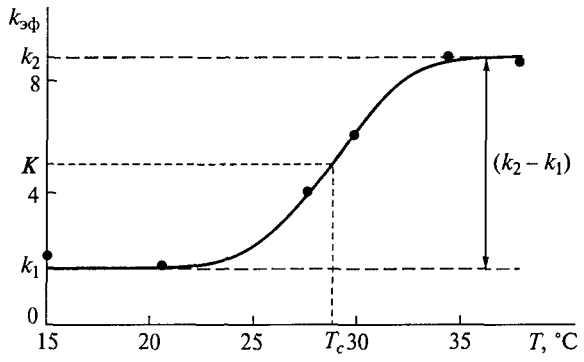
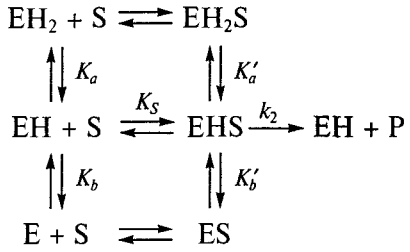


Рис. 4.19. Температурная зависимость эффективной константы $k_{эф}$ скорости инактивации α-химотрипсина под действием ультразвука

ные группы входят в состав активных центров ферментов. Анализ зависимостей скоростей ферментативных реакций от показателя pH позволяет получить информацию о числе и свойствах ионогенных групп, контролирующих ферментативную активность. Рассмотрим специфические для ферментативной кинетики методы анализа таких зависимостей.

Зависимость скорости ферментативной реакции, протекающей по схеме



от показателя pH можно описать следующим образом:

$$v = \frac{k_{кат} E_0 S_0}{K_M^* + S_0},$$

$$k_{кат} = \frac{k_2}{1 + \frac{[H^+]}{K_a'} + \frac{K_b'}{[H^+]}},$$

$$K_M^* = K_S \frac{1 + \frac{[H^+]}{K_a} + \frac{K_b}{[H^+]}}{1 + \frac{[H^+]}{K_a'} + \frac{K_b'}{[H^+]}}. \qquad (4.49)$$

Из уравнений (4.49) получим

$$\frac{k_{кат}}{K_M^*} = \frac{\frac{k_2}{K_M^*}}{1 + \frac{[H^+]}{K_a} + \frac{K_b}{[H^+]}}. \qquad (4.50)$$

Таким образом, для того чтобы определить константы ионизации каталитически активных групп в свободном ферменте, нужно исследовать зависимость от pH параметра $k_{кат}/K_M^*$ (уравнение (4.50)). Чтобы найти константы K_a', K_b' ионизации групп фермент-субстратного комплекса, необходимо проанализировать зависимость параметра $k_{кат}$ от pH (уравнение (4.49)).

На рис. 4.20, *а* приведена зависимость $k_{кат}/K_M^*$ от pH для реакции с участием протеолитического фермента папаина. Для папаи-

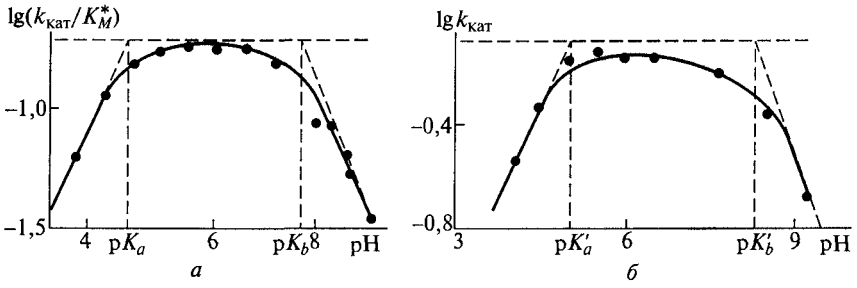


Рис. 4.20. Определение констант ионизации каталитически активных групп свободного фермента папаина (*а*) и его фермент-субстратного комплекса (*б*)

на значения pK_a и pK_b равны 4,9 и 8,1; для фермент-субстратного комплекса (рис. 4.20, *б*) — 5 и 8,2 соответственно.

Таким образом, в данном случае взаимодействие фермента с субстратом практически не влияет на способность каталитических групп взаимодействовать с ионами водорода.

4.5. Кинетика сопряженных ферментативных реакций. Полиферментные системы

Реакции в полиферментных системах с кинетической точки зрения можно рассматривать как последовательные процессы, специфической особенностью которых является катализ ферментами каждой из стадий реакции. В силу сложности процессов в полиферментных системах для анализа кинетики реакций оправдано использование некоторых упрощающих приближений. Рассмотрим наиболее важные закономерности реакций в такого рода системах.

Простейшая кинетическая схема, включающая образование активного промежуточного метаболита,

$$S_1 \xrightarrow[V_{1m},\ K_{1M}]{E_1} S_2 \xrightarrow[V_{2m},\ K_{2M}]{E_2} P$$

где S_1 — исходный субстрат; S_2 — промежуточный метаболит; P — продукт реакции; E_1, E_2 — ферменты, участвующие на первой и второй стадии соответственно; V_{1m}, V_{2m}; K_{1M}, K_{2M} — максимальные скорости и константы Михаэлиса первой и второй стадии соответственно. Предполагается, что скорости ферментативных реакций на первой и второй стадиях описываются уравнением Михаэлиса.

При постоянстве концентрации исходного субстрата ($S_1 = S_0 =$ = const) или при небольшой степени превращения субстрата кинетика реакции описывается системой уравнений

$$\begin{cases} \dfrac{dS_2}{dt} = v_0 - \dfrac{V_{2m}S_2}{K_{2M} + S_2}, \\ \dfrac{dP}{dt} = \dfrac{V_{2m}S_2}{K_{2M} + S_2}. \end{cases} \tag{4.51}$$

Здесь v_0 — скорость реакции на первой стадии — постоянная, не зависящая от времени величина:

$$v_0 = \frac{V_{1m}S_0}{K_{1M} + S_0}.$$

Уравнение (4.51) представляет собой дифференциальное уравнение первого порядка с разделяющимися переменными и может быть проинтегрировано

$$\int_0^{S_2} \frac{(K_{2M} + S_2)dS_2}{v_0K_{2M} + S_2(v_0 + V_{2m})} = t,$$

$$\frac{K_{2M}}{1 - \dfrac{v_0}{V_{1m}}} \ln\left[1 + \frac{S_2}{K_{2M}}\left(1 - \frac{V_{2m}}{v_0}\right)\right] + S_2 = (v_0 - V_{2m})t. \tag{4.52}$$

Уравнение (4.52) имеет смысл при условии

$$1 + \frac{S_2}{K_{2M}}\left(1 - \frac{V_{2m}}{v_0}\right) \geq 0,$$

что приводит к неравенству

$$S_2 \leq \frac{K_{2M}}{V_{2m}/v_0 - 1}.$$

Таким образом, концентрация промежуточного субстрата ограничена, и это ограничение определяется константой Михаэлиса второго фермента и отношением максимальной скорости второй реакции к скорости первой.

Рассмотрим наиболее важный частный случай, когда максимальная скорость второй стадии существенно превышает скорость первой ($V_{2m} \gg v_0$). В этих условиях уравнение (4.52) принимает вид

$$\ln\left[1 - \frac{S_2}{K_{2M}}\frac{V_{2m}}{v_0}\right] + \frac{S_2}{K_{2M}} = -\frac{V_{2m}}{K_{2M}}t. \tag{4.53}$$

При $V_{2m} \gg v_0$ имеем $S_2/K_{2M} \ll 1$, и в этих условиях справедливо неравенство

$$\ln\left[1 - \frac{S_2}{K_{2M}}\frac{V_{2m}}{v_0}\right] \gg \frac{S_2}{K_{2M}}.$$

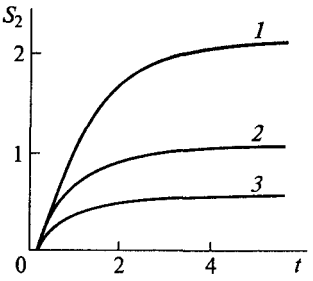


Рис. 4.21. Изменение во времени концентрации промежуточного субстрата в биферментной системе при V_{2m}/K_{2M} = 1 (*1*), 2 (*2*), 4 (*3*)

С учетом этого неравенства уравнение (4.53) приводит к следующей зависимости концентрации промежуточного субстрата от времени:

$$S_2 = \frac{K_{2M}}{V_{2m}} v_0 \left[1 - \exp\left(-\frac{V_{2m}}{K_{2M}} t\right)\right]. \quad (4.54)$$

Рисунок 4.21 иллюстрирует зависимость $S_2(t)$ при различных соотношениях параметров V_{2m}/K_{2M}.

Зависимость концентрации продукта от времени можно найти, подставив уравнение (4.54) в (4.51) и проинтегрировав полученное дифференциальное уравнение с учетом того, что в указанных условиях $S_2 \ll K_{2M}$:

$$P = v_0 t + \frac{v_0 K_{2M}}{V_{2m}} \left[\exp\left(-\frac{V_{2m}}{K_{2M}} t\right) - 1\right]. \quad (4.55)$$

На рис. 4.22 приведены кинетические кривые образования продукта в биферментной системе. На кривой $P(t)$ можно выделить период индукции; кривая асимптотически приближается к прямой с тангенсом угла наклона, равным стационарной скорости процесса. Период индукции τ определяется кинетическими характеристиками второго фермента

$$\tau = K_{2M}/V_{2m}. \quad (4.56)$$

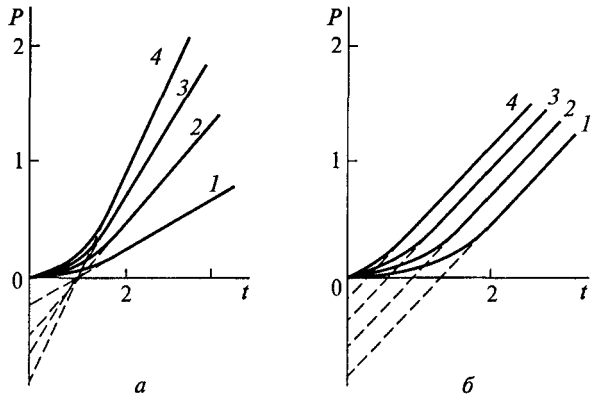


Рис. 4.22. Изменение во времени концентрации продукта, образующегося в биферментной системе:

а — при V_{2m}/K_{2M} = const, v_0 = 1 (*1*), 2 (*2*), 3 (*3*), 4 (*4*); *б* — при v_0 = const; V_{2m}/K_{2M} = 1 (*1*), 2 (*2*), 3 (*3*), 4 (*4*)

В общем случае, когда концентрация S_2 соизмерима с K_{2M} (это эквивалентно утверждению, что V_{2m} соизмерима с v_0), период индукции связан с кинетическими параметрами реакции более сложными соотношениями. Однако наличие периода индукции на кривой $P(t)$ указывает на участие в реакции, по крайней мере, одного промежуточного метаболита.

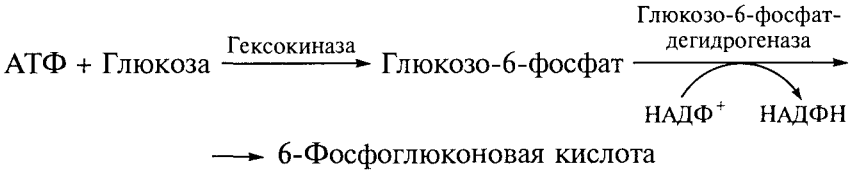
Важной особенностью обсуждаемой реакции является возможность установления стационарного состояния, при котором концентрация промежуточного метаболита постоянна и практически не меняется во времени. В стационарном состоянии $dS_2/dt = 0$,

$$S_{2\text{ст}} = \frac{V_{1m}S_0K_{2M}}{V_{2m}(K_{1M} + S_0) - V_{1m}S_0}.$$

Из этого уравнения вытекает условие возможности установления стационарного состояния. Поскольку $S_{2\text{ст}} > 0$, то должно выполняться неравенство $V_{2m} > V_{1m}S_0/(K_{1M} + S_0)$ или $V_{2m} > v_0$. Стационарное состояние возможно, если максимальная скорость второй стадии реакции больше скорости первой.

Сопряженные ферментативные реакции часто используют для количественного определения концентраций многих биоорганических соединений. В качестве примера можно привести методики определения АТФ в системе гексокиназа — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, АТФ в системе пируваткиназа — лактатдегидрогеназа, определения гликогена с помощью системы амилоглюкозидаза — глюкозидаза, определение дофамина и *n*-ацетилдофамина, неорганического пирофосфата, лецитина, креатинина, креатина и гуанозиндифосфата (см. гл. 14).

Рассмотрим кинетику реакции в системе гексокиназа — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа:



На рис. 4.23 представлена кинетическая кривая образования восстановленной формы никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФН), образующегося в результате окисления промежуточного глюкозо-6-фосфата. Кинетика образования продукта достаточно строго описывается уравнением (4.55). Параметр V_{2m}/K_{2M}, найденный по кривой рис. 4.23, равен 1,38 мин$^{-1}$. Важно отметить, что по кинетической кривой, приведенной на рис. 4.23, можно определить и стационарную концентрацию промежуточного глюкозо-6-фосфата. Из уравнения (4.55) следует, что при больших временах реакции ($t \gg \tau$) концентрация продукта становится линейной функцией времени ($t \to \infty$):

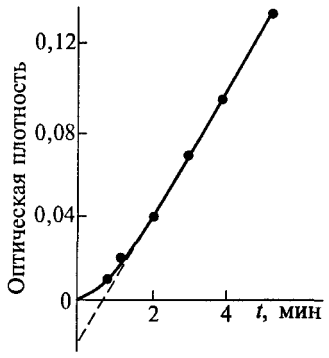


Рис. 4.23. Изменение во времени концентрации НАДФН в системе гексокиназа—глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа

$$P = v_0(t - \tau), \qquad (4.57)$$

где v_0 — стационарная скорость реакции; τ — период индукции, задаваемый уравнением (4.56). С учетом того, что $S_{2ст} = v_0\tau$, отрезок, отсекаемый асимптотической прямой $P(t)$ на оси ординат, по абсолютной величине равен стационарной концентрации промежуточного субстрата. Из данных рис. 4.23 следует, что стационарная концентрация глюкозо-6-фосфата в системе равна $3{,}5 \cdot 10^{-6}$ моль/л. Поскольку стационарная скорость реакции зависит от концентрации первого субстрата (в данном случае АТФ), с помощью кинетических данных, полученных в условиях $[АТФ]_0 < K_{1M}$, и калибровочного графика можно определить неизвестную концентрацию АТФ в исследуемом образце.

Большинство реакций с участием последовательно работающих ферментов контролируется первым ферментом цепи. Как правило, этот фермент обладает самыми низкими кинетическими характеристиками и катализирует необратимую, наиболее термодинамически выгодную реакцию. Часто этот фермент является регуляторным, т.е. его активность регулируется взаимодействиями аллостерического характера с некоторыми последующими компонентами цепи. Кинетическое поведение такого рода систем полностью определяется кинетическими характеристиками этого фермента. Следующая схема хорошо описывает поведение таких реакций:

$$S_1 \xrightarrow{E_1} \left(S_i \xrightarrow[\text{быстро}]{E_i} \right) P \qquad (4.58)$$

где S_i — некоторый промежуточный метаболит; E_i — фермент, катализирующий превращение этого метаболита.

Рассмотрим поведение реакции в двух случаях.

1. Первая стадия является лимитирующей, ее кинетические характеристики существенно более низкие. Формально это эквивалентно условиям, в которых концентрация исходного субстрата поддерживается постоянной. Материальный баланс по субстрату учитывает только концентрацию первого метаболита. После некоторого периода реакция переходит в стационарный режим, в котором концентрация промежуточного метаболита описывается уравнением

$$S_{iст} = \frac{V_{1m}S_0K_{iM}}{V_{im}(K_{1M} + S_0) - V_{1m}S_0},$$

где V_{1m}, V_{im} — максимальная скорость реакции на первой и i-й стадии соответственно; K_{1M}, K_{iM} — соответствующие константы Михаэлиса.

Условием установления стационарного состояния является выполнение неравенств $V_{im} > v_0$, $i = 2, \ldots, n$, где V_{1m} — максимальная скорость реакции на i-й стадии; v_0 — скорость первой стадии. Стационарная скорость накопления продукта, который образуется на последней n-й стадии, определяется работой первого фермента

$$\left(\frac{dP}{dt}\right)_{\text{ст}} = \frac{V_{1m}S_0}{K_{1M} + S_0}.$$

2. Кинетические характеристики двух стадий соизмеримы. В этом случае необходимо в уравнении материального баланса учитывать концентрацию i-го метаболита. Концентрация этого метаболита описывается уравнением

$$2S_{i\text{ст}} = S_0 + \frac{K_{1M} + \dfrac{V_{1m}}{V_{im}}K_{iM}}{1 - \dfrac{V_{1m}}{V_{im}}} - \sqrt{\left(S_0 + \frac{K_{1M} + \dfrac{V_{1m}}{V_{im}}K_{iM}}{1 - \dfrac{V_{1m}}{V_{im}}}\right)^2 - 4\frac{S_0 K_{iM}}{\dfrac{V_{im}}{V_{1m}} - 1}}. \quad (4.59)$$

Из анализа этих уравнений можно сделать весьма интересный вывод: если скорость первой стадии реакции является лимитирующей, т.е. справедливы неравенства $v_0 \ll V_{im}$ (или $V_{1m} \ll V_{im}$), стационарная концентрация промежуточного метаболита существенно меньше константы Михаэлиса в реакции превращения этого метаболита, соответственно все ферменты цепи, за исключением первого, работают в строго бимолекулярном режиме, а не в режиме максимальной скорости или в смешанном режиме. Действительно, если $V_{1m} \ll V_{im}$, то из уравнения (4.59) следует

$$S_{i\text{ст}} = \frac{S_0 \dfrac{V_{1m}K_{iM}}{V_{im} - V_{1m}}}{S_0 + \dfrac{V_{1m}K_{iM} + V_{im}K_{1M}}{V_{im} - V_{1m}}}.$$

При этом максимально возможная концентрация метаболита, реализуемая при «насыщении» системы исходным субстратом, равна

$$S_{i\text{ст}}^{\text{макс}} = \frac{K_{iM}}{V_{im}/V_{1M} - 1},$$

т.е. $S_{i\text{ст}}^{\text{макс}} \ll K_{iM}$ при $V_{1m} \ll V_{im}$.

В более общем случае с учетом всех промежуточных метаболитов, когда все стадии полиферментного процесса, включая первую стадию (случай линейной системы уравнений), протекают в

бимолекулярном режиме, стационарную кинетику реакций описывают уравнения

$$S_{n\,\text{ст}} = \frac{S_0}{1 + \dfrac{V_{nm}}{K_{nM}} \displaystyle\sum_{i=1}^{n-1} \dfrac{K_{iM}}{V_{im}}}, \tag{4.60}$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{S_0}{\displaystyle\sum_{i=1}^{n} \frac{K_{iM}}{V_{im}}}. \tag{4.61}$$

Анализ уравнения (4.61) приводит к выводу: наибольшее влияние на общую скорость процесса оказывают ферменты, имеющие наименьший параметр V_{im}/K_{iM}. В пределе, если существует фермент, для которого отношение K_{iM}/V_{im} много больше по сравнению с другими ферментами, уравнение скорости приобретает вид

$$\left(\frac{dP}{dt}\right)_{\text{ст}} = \frac{V_{im}}{K_{iM}} S_0.$$

Возникает вопрос о критериях, которые позволили бы определить, какая стадия сложного процесса является лимитирующей. Уравнения (4.60) и (4.61) позволяют однозначно определить лимитирующую стадию. Скорость процесса линейно зависит от концентрации фермента, определяющего скорость реакции, и практически не зависит от концентрации остальных ферментов.

При увеличении скорости наиболее медленной стадии или, наоборот, при уменьшении скорости быстрой стадии может происходить смена лимитирующей стадии. Если в общую скорость реакции наибольший вклад вносят два наименее активных фермента, уравнение стационарной скорости имеет вид

$$v_{\text{ст}} = \frac{S_0 V_{im} V_{jm}}{K_{iM} V_{jm} + K_{jM} V_{im}}. \tag{4.62}$$

В условиях $V_{im}K_{jM} \ll V_{jm}K_{iM}$ скорость процесса определяется i-й стадией реакции. В этой области должна наблюдаться линейная зависимость скорости процесса от концентрации j-го фермента. В области соизмеримых значений $V_{im}K_{jM}$ и $V_{jm}K_{iM}$ оба фермента вносят вклад в скорость процесса и наблюдается отклонение от линейной зависимости процесса по i-му ферменту. Наконец, при соотношении $V_{im}K_{jM} \gg V_{jm}K_{iM}$ скорость реакции не зависит от концентрации фермента E_i и лимитирующей становится j-я стадия превращения субстрата. Рисунок 4.24 иллюстрирует зависимость стационарной скорости реакции от концентрации фермента, лимитирующего скорость процесса на начальном этапе. На рис. 4.25 приведены экспериментальные данные по зависимости скорости реакции от содержания диоксофенилаланин-декарбоксилазы

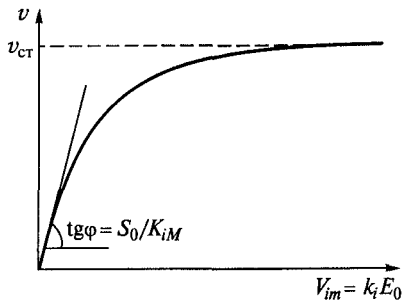


Рис. 4.24. Зависимость скорости реакции от концентрации фермента, лимитирующего скорость на начальном этапе процесса (результаты расчета по уравнению (4.62))

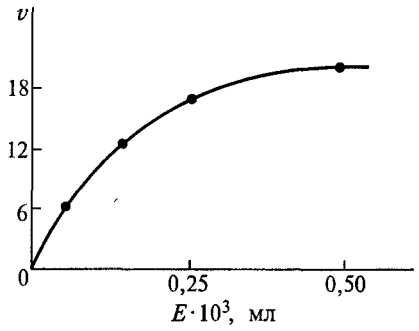


Рис. 4.25. Зависимость скорости реакции в системе ДОФА-декарбоксилаза — катехол-О-метилтрансфераза от содержания ДОФА-декарбоксилазы

(ДОФА-декарбоксилазы) в системе ДОФА-декарбоксилаза — катехол-О-метилтрансфераза. При добавлении в систему менее $5 \cdot 10^{-5}$ мл ДОФА-декарбоксилазы этот фермент определяет скорость реакции; при введении $5 \cdot 10^{-4}$ мл (и выше) ДОФА-декарбоксилазы лимитирующей стадией становится перенос метильной группы с помощью катехол-О-метилтрансферазы.

Другая группа критериев, позволяющих выявить лимитирующую стадию процесса, связана с анализом относительных концентраций субстрата и промежуточных метаболитов. Субстрат лимитирующей стадии в стационарном состоянии будет иметь относительно большую концентрацию. В то же время если обсуждаемая стадия реакции является быстрой и нелимитирующей, субстрат этой стадии будет присутствовать в сравнительно низкой концентрации. При этом если максимальная скорость реакции на этой стадии существенно меньше максимальной скорости лимитирующей стадии, концентрация промежуточного метаболита будет существенно меньше константы Михаэлиса быстро работающего фермента.

Указанные критерии могут быть весьма полезны при интерпретации кинетических данных различных сопряженных ферментативных реакций.

4.6. Ингибирование ферментативных реакций

Вещества, подавляющие каталитическую активность ферментов, называются *ингибиторы*. Взаимодействуя с активным центром фермента, ингибиторы по тому или иному механизму преры-

вают каталитический цикл и, таким образом, уменьшают скорость ферментативной реакции. Различают два основных класса ингибиторов — обратимые и необратимые. Необратимые ингибиторы иногда называют инактиваторами. Часто ингибиторы ферментов — сильные яды или лекарственные препараты. Необратимыми ингибиторами являются фосфорорганические соединения, используемые в качестве пестицидов или боевых отравляющих веществ (зарин, зоман, ви-газ). Фосфорилируя активный центр ацетилхолинэстеразы, соединения этого класса образуют прочные химически инертные соединения, блокируя центральную нервную систему человека, животного или насекомого. Классическим примером обратимого ингибитора является цианид-ион или монооксид углерода, взаимодействующие с гем-содержащими ферментами или переносчиками кислорода. Образуя комплексы с гем-белками, эти соединения обратимо выводят их из биохимических процессов.

Основной вопрос, который требует решения при изучении подавления ферментативной активности: обратим или необратим эффект ингибирования. Для этого необходимо вывести из системы ингибитор, например, диализом или гель-фильтрацией. Если фермент восстанавливает каталитическую активность, значит имеем дело с обратимым ингибитором; если активность фермента не восстанавливается — ингибирование необратимо.

Рассмотрим кинетические закономерности необратимого и обратимого ингибирования. В качестве иллюстрации будем использовать данные по ингибированию простагландин-Н-синтазы (PGH-синтазы) известными лекарственными средствами.

Необратимое ингибирование (инактивация). Кинетическую схему необратимого ингибирования можно представить в виде

$$E + I \xrightarrow{k} EI \qquad (4.63)$$

При необратимом ингибировании имеет место реакция второго порядка активного центра Е фермента и ингибитора I с образованием неактивного ферментативного производного EI.

При добавлении к раствору PGH-синтазы ацетилсалициловой кислоты наблюдается медленная потеря активности A (наблюдаемой скорости реакции) фермента в реакции окисления арахидоновой кислоты в PGH_2. Скорость инактивации фермента увеличивается с ростом концентрации аспирина. Типичные наблюдаемые зависимости изменения активности PGH-синтазы во времени для фермента микросомной фракции везикулярных желез барана представлены на рис. 4.26, *а*. Аналогичные зависимости наблюдаются для фермента из тромбоцитов человека. Процесс инактивации фермента необратим. Существенное уменьшение концентрации ингибитора путем разбавления реакционной смеси не приводит к

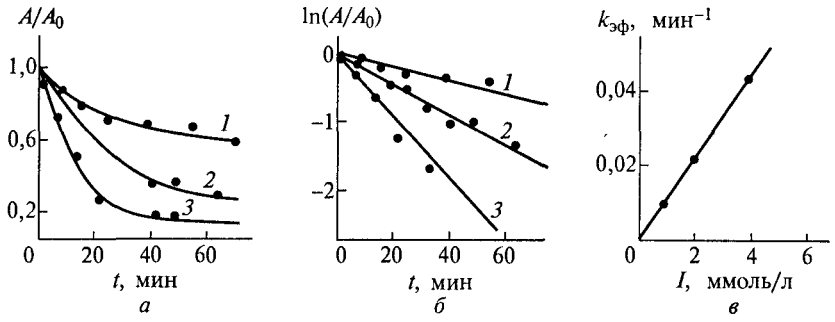


Рис. 4.26. Кинетика изменения активности PGH-синтазы при инкубации фермента в растворе аспирина:

а — зависимость $A/A_0 = f(t)$ при концентрации раствора аспирина I = 0,81 (*1*), 2,35 (*2*), 4,36 (*3*) ммоль/л (A_0 — скорость ферментативной реакции в отсутствие ингибитора); *б* — данные рис. 4.26, *а* представлены в полулогарифмических координатах; *в* — зависимость эффективной константы скорости инактивации от концентрации раствора аспирина

появлению активности фермента. Инактивацию фермента нельзя объяснить его денатурацией, поскольку в контрольном опыте в отсутствие аспирина фермент полностью сохраняет свою активность. Простейший механизм потери активности описывает уравнение (4.63).

В условиях избытка ингибитора по сравнению с концентрацией активных центров фермента кинетику изменения концентрации активных центров фермента во времени будут описывать следующие уравнения:

$$E_0 = E + [\mathrm{EI}], \quad -\frac{dE}{dt} = \frac{d[\mathrm{EI}]}{dt},$$

$$\frac{dE}{dt} = -kI_0E, \quad \text{или} \quad \frac{d\ln E}{dt} = -kI_0,$$

где E_0 — начальная концентрация активных центров; I_0 — начальная (постоянная) концентрация ингибитора ($I_0 \gg E_0$). Решение этого уравнения при начальных условиях $t = 0$, $E = E_0$ имеет вид

$$E = E_0\exp(-kI_0t). \qquad (4.64)$$

Поскольку измеряемая на опыте активность PGH-синтазы линейно зависит от концентрации фермента, по этому же закону должна изменяться и активность катализатора.

Экспериментальные данные рис. 4.26, *а* показывают, что эта зависимость при ингибировании аспирином действительно имеет место. Кинетические кривые описываются уравнением первого порядка, при этом показатель экспоненты линейно зависит от кон-

центрации ингибитора (рис. 4.26, *б*). Тангенс угла наклона графика этой зависимости позволяет определить константу скорости (рис. 4.26, *в*) необратимого взаимодействия аспирина с активным центром фермента. Видно, что необратимая инактивация PGH-синтазы аспирином — сравнительно медленный процесс. Аспирин необратимо реагирует с PGH-синтазой с переносом ацильной группы на белок, ацетилируя гидроксильную группу серина-530, расположенную на участке адсорбции арахидоновой кислоты.

Обратимое ингибирование. Инкубация PGH-синтазы с индометацином, как и в случае с аспирином, приводит к потере ферментом его активности. Этот процесс также развивается во времени (рис. 4.27). Принципиальное отличие механизма действия этого лекарственного препарата заключается в том, что индометацин представляет собой обратимый ингибитор PGH-синтазы. Этот вывод сделан на основании следующих фактов. Обратимость взаимодействия индометацина с PGH-синтазой подтверждается тем, что после отделения ингибитора от фермента активность PGH-синтазы восстанавливается. Кинетические измерения показали, что PGH-синтаза взаимодействует с индометацином по уравнению

$$E + I \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} EI \qquad (4.65)$$

На рис. 4.27 приведены кинетические кривые изменения активности PGH-синтазы в процессе инкубации фермента с индометацином. При бесконечном времени кинетические кривые выходят на предельное значение, отличное от нулевого. Кинетические данные рис. 4.27 свидетельствуют, что индометацин представляет со-

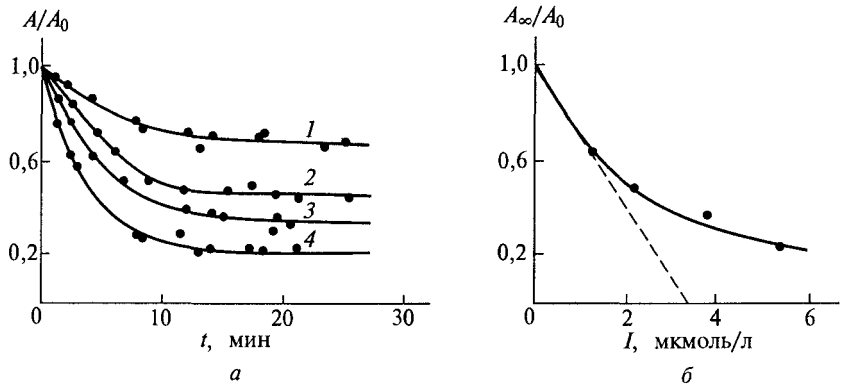


Рис 4.27. Кинетика изменения активности PGH-синтазы при инкубации фермента в растворе индометацина:

а — зависимость $A/A_0 = f(t)$ при концентрации раствора индометацина I = 1,4 (*1*), 2,2 (*2*), 3,8 (*3*), 5,4 (*4*) мкмоль/л, *б* — зависимость предельной активности фермента от концентрации раствора индометацина

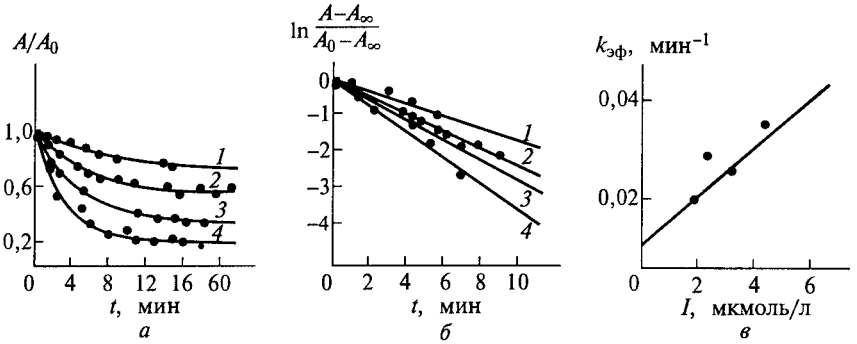


Рис. 4.28. Кинетика изменения активности PGH-синтазы при инкубации фермента в растворе вольтарена

а — зависимость $A/A_0 = f(t)$ при концентрации раствора вольтарена I = 0,86 (*1*), 1,54 (*2*), 2,81 (*3*), 4,25 (*4*) мкмоль/л, *б* — данные рис 4 28, *а* представлены в полулогарифмических координатах, *в* — зависимость эффективной константы скорости инактивации первого порядка от концентрации раствора вольтарена

бой медленный обратимый ингибитор PGH-синтазы. В соответствии со схемой (4.65) изменение концентрации комплекса фермент—ингибитор EI во времени может быть описано уравнением

$$[\mathrm{EI}] = \frac{k_1 E_0 I_0}{k_1 I_0 + k_{-1}}\left\{1 - \exp\left[-(k_1 I_0 + k_{-1})t\right]\right\}, \qquad (4.66)$$

а относительное изменение активности — уравнением

$$\frac{A}{A_0} = 1 - \frac{k_1 I_0}{k_1 I_0 + k_{-1}}\left\{1 - \exp\left[-(k_1 I_0 + k_{-1})t\right]\right\}. \qquad (4.67)$$

Эффективная константа скорости ингибирования, характеризующая динамику процесса, равна $k_{эф} = k_1 I_0 + k_{-1}$.

Вольтарен ведет себя в реакции ингибирования PGH-синтазы аналогично индометацину. На рис. 4.28, *а* приведены кинетические кривые изменения активности фермента при различных концентрациях раствора вольтарена. Результаты линеаризации кинетических данных в координатах уравнения (4.67) представлены на рис. 4.28, *б*. На рис. 4.28, *в* показана зависимость эффективной константы скорости инактивации от концентрации ингибитора, из которой могут быть найдены константы скоростей прямой и обратной реакций вольтарена с активным центром фермента.

Классическая кинетическая схема обратимого ингибирования односубстратных реакций имеет вид

$$\begin{array}{ccccc} \mathrm{E} + \mathrm{S} & \overset{K_S}{\rightleftharpoons} & \mathrm{ES} & \xrightarrow{k_{кат}} & \mathrm{E} + \mathrm{P} \\ \uparrow\downarrow K_i & & \uparrow\downarrow \alpha K_i & & \\ \mathrm{EI} & \overset{K_S'}{\rightleftharpoons} & \mathrm{ESI} & \xrightarrow{\beta k_{кат}} & \mathrm{E} + \mathrm{P} \end{array} \qquad (4.68)$$

Равновесные процессы образования ES, EI и ESI определяются тремя константами K_S, K_i и α. Это следует из простых термодинамических соображений. Процесс перехода от E к ESI в равновесном режиме не зависит от пути перехода. Таким образом, $K_S \alpha K_i = K_i K'_S$, или $K'_S = \alpha K_S$.

Начальная стационарная скорость процесса будет описываться уравнением

$$v_0 = \frac{k_{кат} \dfrac{\alpha K_i + \beta I}{\alpha K_i + I} E_0 S_0}{\alpha K_S \dfrac{K_i + I}{\alpha K_i + I} + S_0}. \qquad (4.69)$$

В зависимости от значений α и β возможны несколько вариантов ингибирования.

Конкурентное ингибирование. При $\alpha \to \infty$ тройной комплекс фактически не образуется. Схема реакции существенно упрощается:

$$E + S \underset{}{\overset{K_S}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_{кат}} E + P$$

$$E + I \overset{K_i}{\rightleftharpoons} EI$$

Скорость реакции равна

$$v_0 = \frac{k_{кат} E_0 S_0}{K_S (1 + I/K_I) + S_0}.$$

Видно, что ингибитор влияет на константу Михаэлиса и не влияет на V_m или $k_{кат}$. В двойных обратных координатах серия экспериментальных кривых, полученных при различных концентрациях субстрата и ингибитора, будет представлена пучком прямых, пересекающихся в точке $1/V_m$ (рис. 4.29, *а*).

Неконкурентное ингибирование. При $\alpha = 1$, $\beta = 0$ ингибитор связывается с фермент-субстратным комплексом так же эффектив-

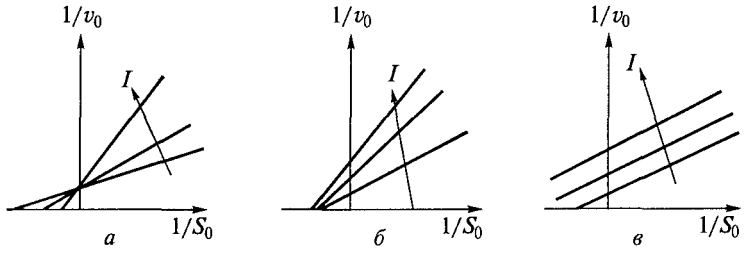


Рис. 4.29. Дискриминация механизмов ингибирования ферментативных реакций по графическим данным в двойных обратных координатах (стрелкой показано направление роста концентрации ингибитора):

а — конкурентное ингибирование; *б* — неконкурентное ингибирование; *в* — бесконкурентное ингибирование

но, как и со свободным активным центром, но комплексообразование приводит к потере реакционной способности

$$v_0 = \frac{\dfrac{k_{кат}}{1 + I/K_i} E_0 S_0}{K_M + S_0}.$$

Ингибитор влияет на максимальную скорость V_m реакции, но не влияет на константу Михаэлиса. В двойных обратных координатах будем иметь серию прямых, пересекающихся в точке $1/S_0$ (рис. 4.29, *б*).

Бесконкурентное ингибирование. При $\alpha = \beta$, $\alpha < 1$, $\beta < 1$ максимальная скорость и константа Михаэлиса при увеличении концентрации ингибитора уменьшаются в равной степени

$$v_0 = \frac{\alpha k_{кат} \dfrac{K_i + I}{\alpha K_i + I} E_0 S_0}{K_M \dfrac{K_i + I}{\alpha K_i + I} + S_0}.$$

В двойных обратных координатах экспериментальные данные будут представлены серией параллельных непересекающихся прямых (рис. 4.29, *в*).

Исследование ряда нестероидных противовоспалительных препаратов (бруфена, напроксена, бутадиона, анальгина) показало, что они являются быстродействующими обратимыми ингибиторами PGH-синтазы. При добавлении их к раствору фермента мож-

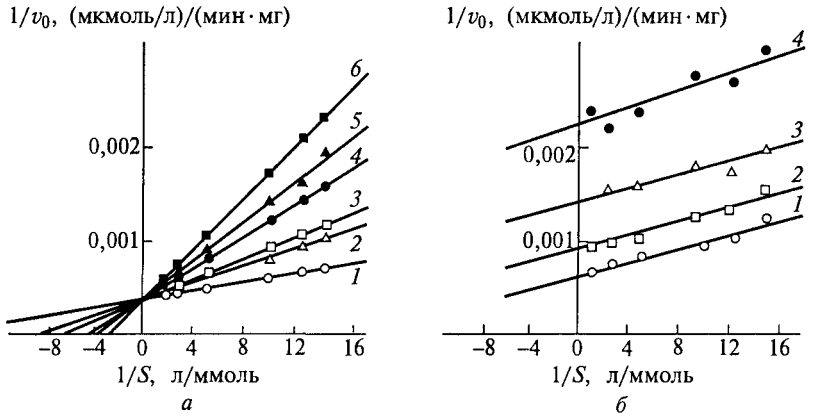


Рис. 4.30. Зависимость скорости реакции, катализируемой PGH-синтазой, от концентрации арахидоновой кислоты (*а*) и адреналина (*б*) в обратных координатах при концентрации раствора бруфена:

а — I = 0 (*1*), 3,7 (*2*), 15 (*3*), 25 (*4*), 35 (*5*), 50 (*6*) мкмоль/л; *б* — I = 0 (*1*), 25 (*2*), 50 (*3*), 126 (*4*) мкмоль/л

но наблюдать быстрое обратимое подавление активности катализатора. Как известно, в реакции, катализируемой PGH-синтазой, принимают участие такие субстраты, как арахидоновая кислота, кислород и восстановитель — донор электронов. На рис. 4.30 приведены зависимости скорости реакции от концентрации арахидоновой кислоты и адреналина при различных концентрациях раствора бруфена. Аналогичные зависимости наблюдаются для напроксена. Изучение бутадиона и анальгина показало, что они также являются обратимыми ингибиторами PGH-синтазы, однако эффективность ингибирования для бутадиона и анальгина несколько ниже, чем для бруфена и напроксена. С формально-кинетической точки зрения указанные ингибиторы (бруфен, напроксен, бутадион, анальгин) выступают в качестве конкурентных ингибиторов по отношению к арахидоновой кислоте и бесконкурентных — по отношению к донору электронов.

* * *

Логика — это химия мыслимого мира.

В. Соловьёв

Терпеть не могу логики. Она всегда банальна и нередко очень убедительна.

О. Уайльд

Подведем некоторые итоги и рассмотрим логику кинетического исследования.

Кинетику химического или биологического процесса обычно изучают с двумя целями.

1. С целью предсказать, что произойдет с системой в будущем. Если известны кинетический закон развития системы (как правило, формально известно дифференциальное уравнение, описывающее динамику процесса) и начальные условия (т.е. состояние системы в начальный момент времени), можно предсказать, что будет с системой в каждый момент времени в будущем. К этому классу задач относятся также оптимизационные задачи, т.е. задачи, решение которых позволяет перейти из одного состояния в другое за максимально малый (или большой) промежуток времени, достичь максимального выхода продукта и т.п.

2. С целью понять механизм процесса, т.е. представить отдельные элементы и стадии, обеспечивающие именно такое протекание процесса во времени. Любое представление о механизме процесса является модельным. Основной задачей химической и биохимической кинетики является изучение механизмов реакций. Под механизмом реакции в рамках химико-кинетического подхода обычно понимают последовательность молекулярных пре-

вращений исходных веществ в конечные продукты. Как правило, механизмы химических и биохимических реакций сложные и включают в себя образование лабильных и высокореакционноспособных промежуточных соединений. Установление наличия, изучение строения и свойств этих промежуточных соединений, обнаружение корреляций между их строением и реакционной способностью составляют сущность исследования механизма процесса.

Значение кинетического подхода для изучения механизмов химических и биохимических реакций трудно переоценить. Часто простейшее кинетическое наблюдение открывает целую эпоху в исследовательской работе.

Кинетическое исследование начинается, как правило, с эксперимента. При изучении изменения концентраций продуктов реакции, исходных реагентов или каких-либо промежуточных соединений во времени используют самые разнообразные химические и физические методы определения концентраций веществ. Экспериментатор для упрощения интерпретации результатов должен стремиться поддерживать ряд параметров системы постоянными. Обычно биохимические эксперименты проводят в изотермических условиях, при постоянных значениях pH, ионной силы раствора. При этом фиксируют концентрации каких-либо реагентов, создавая большой их избыток по сравнению с компонентами, концентрации которых изменяются во времени. В результате экспериментального исследования устанавливают зависимости концентраций веществ от времени при различных внешних фиксированных параметрах. Если реакция протекает при небольшой степени превращения субстрата, удобна переменная, определяемая из исходных экспериментальных данных, — начальная скорость реакции v_0. Для кинетического анализа можно использовать и другие переменные, например, такие как текущая концентрация исходного субстрата, продукта, промежуточного вещества, время жизни какого-либо интермедиата.

Для объяснения полученных экспериментальных данных на основе законов химической кинетики создают кинетические модели, согласно которым элементарные стадии превращения молекул в сложном механизме реакции представляют собой мономолекулярные, бимолекулярные или в очень редких случаях тримолекулярные процессы. Методологически оправданным представляется построение простейших моделей, включающих наименьшее число стадий; в дальнейшем возможно усложнение моделей по мере сравнения их с экспериментом при несоответствии выводов, следуемых из модели, экспериментальным результатам.

При построении кинетической модели используют данные о стехиометрии реакции и о природе промежуточных частиц, принимающих участие в реакции. При химико-кинетическом иссле-

довании наибольшая неопределенность — число возможных вариантов — связана с построением кинетической схемы процесса. На этой стадии исследования большую роль играет интуиция исследователя.

После построения моделей последующие операции и выводы в значительной степени детерминированы. Предлагаемая кинетическая схема записывается либо в виде последовательности стадий реакции, либо в виде схемы реакции, характеризующей взаимный переход компонентов процесса. Кинетическая схема реакции при использовании законов химической кинетики однозначно приводит к системе дифференциальных и (или) алгебраических уравнений. Как правило, полученная система уравнений представляет собой систему дифференциальных уравнений первого порядка с постоянными коэффициентами. При известных начальных или граничных (для макрокинетических задач) условиях система уравнений может быть решена, и это решение будет единственным. Получение и анализ решения требуют умения работать с дифференциальными уравнениями, которое можно приобрести при изучении курса математического анализа.

Исследователи обычно стремятся максимально упростить математическое описание системы и поиск решения. С этой целью экспериментально создаются условия, в которых система дифференциальных уравнений имеет линейный характер. Например, создается большой избыток одного из компонентов реакции, концентрация которого не изменяется во времени и может входить в дифференциальное уравнение в виде константы. При этом скорость бимолекулярных реакций с участием этого компонента становится линейно зависимой лишь от одной переменной, и уравнение скорости становится линейным. Это существенно упрощает решение системы дифференциальных уравнений, поскольку линейные уравнения имеют общее решение, которое детально описано в литературе.

При исследовании ферментативных реакций часто используется метод стационарных приближений. Использование условий стационарности концентраций промежуточных соединений переводит систему дифференциальных уравнений в систему алгебраических уравнений. В ряде случаев решение системы дифференциальных уравнений не может быть получено в аналитической форме, и тогда используют приближенные численные методы. Этот подход в последние годы широко развивается в связи с появлением и активным применением в химической кинетике ЭВМ, которые позволяют исследователям решать задачи, ранее неразрешимые ввиду математических сложностей. Однако в методологическом плане химико-кинетическое исследование сохраняет свою логику и при использовании ЭВМ. Отличие заключается лишь в том, что в случае ЭВМ решение получается не в виде уравнения,

а в виде функции, заданной таблицей или графиком. При исследовании решений весьма удобно использовать различные асимптотические приближения, позволяющие проанализировать поведение системы при экстремально высоких и низких значениях кинетических параметров или концентраций.

В химико-кинетическом исследовании очень важным моментом является сопоставление выводов, сделанных на основании кинетической модели, с экспериментальными результатами. Если уравнение кинетической модели описывает экспериментальные данные, говорят, что предложенная схема реакции соответствует экспериментальным результатам. При несоответствии результатов расчета экспериментальным данным из дальнейшего рассмотрения исключается какой-либо механизм или группа механизмов. Рассмотрение большого числа кинетических моделей позволяет по тем или иным причинам, приводящим к расхождению выводов экспериментальных результатов, отвергнуть некоторые механизмы и выбрать механизм (или группу механизмов), соответствующий опытным данным. Соответствие следствий кинетической модели экспериментальным данным не может служить однозначным доказательством справедливости предлагаемого механизма реакции, поскольку ниоткуда не следует, что другая модель или схема процесса не приведет к тем же уравнениям.

Однако важной чертой кинетического подхода является возможность демонстрации, что тот или иной механизм не соответствует экспериментальным данным и поэтому может быть исключен. Исследователь, проводя кинетический анализ, должен рассмотреть группу возможных механизмов, идентифицировать схемы и выбрать те кинетические модели, которые удовлетворяют экспериментальным данным. Часто для получения удовлетворительного результата необходимо усложнить первичную простейшую модель. Как правило, различные кинетические схемы приводят к разным системам уравнений и различающимся решениям. Поэтому кинетические схемы можно различить или, как иногда говорят, дискриминировать. Однако кинетические модели могут приводить в силу используемых упрощений к уравнениям, не отличающимся по зависимости от времени или от известных концентраций варьируемых компонентов системы. В этом случае необходимо проводить специальный теоретический и экспериментальный анализ, направленный на разграничение и дальнейшую дискриминацию механизмов.

Если предложенная схема (кинетическая модель) соответствует экспериментальным данным, важно определить численное значение параметров, входящих в уравнение, описывающее изменение концентрации компонента (решение обратной задачи). Из экспериментальных данных с помощью преобразований, приводящих к линейным зависимостям, или численного подбора на ЭВМ

определяют константы скорости или равновесия элементарных стадий процесса. Иногда, особенно для сложных механизмов, определить элементарные константы практически невозможно, и из экспериментальных данных определяют некоторые функции элементарных констант — эффективные константы. В дальнейшем, используя различные зависимости эффективных констант, получают информацию о константах скорости элементарных процессов.

Кинетическое исследование завершается построением молекулярной модели. Используя независимые данные о структуре исходных, конечных, промежуточных соединений, можно представить картину процессов, проходящих на молекулярном уровне. Зачастую построение такого рода молекулярных моделей сопряжено с известной степенью риска, и часто молекулярные модели имеют гипотетический характер. Однако создание представлений о молекулярных изменениях в процессе реакции в высшей степени стимулирует развитие исследования процесса и представляется необходимым на том или ином этапе работы.

Глава 5

ИНАКТИВАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ

Кинетика как наука о законах и механизмах развития различных процессов в природе находит в области биологии почти неограниченные перспективы для теоретических исследований и практических применений.

Н.М.Эмануэль

5.1. Схемы инактивации ферментов

Биополимерные молекулы являются термодинамически неустойчивыми и, как правило, с течением времени изменяют свою пространственную структуру и свойства. Если это отражается на функциональных характеристиках молекулы, изучение изменения во времени функциональной активности должно дать информацию о состоянии биополимерной молекулы. Наиболее отчетливо это проявляется при изучении ферментов. Каталитическая активность является мерой состояния активного центра фермента и соответственно белковой молекулы в целом. В большинстве случаев процесс потери активности ферментом (инактивация) может быть описан как переход между двумя состояниями белка — активным E_a и неактивным E_i:

$$E_a \underset{k_{21}}{\overset{k_{12}}{\rightleftharpoons}} E_i$$

Как правило, эти процессы необратимые, хотя в некоторых случаях можно наблюдать обратимую инактивацию ферментов. С точки зрения химической кинетики эта реакция представляет собой обратимую мономолекулярную реакцию

$$\begin{cases} \dfrac{dE_a}{dt} = -k_{12}E_a + k_{21}E_i, \\ E_0 = E_a + E_i, \end{cases}$$

где E_a, E_i — текущая концентрация соответственно активного E_a и неактивного E_i белка; E_0 — начальная концентрация белка.

Кинетика процесса характеризуется одним характеристическим временем $\tau^{-1} = k_{12} + k_{21}$. В кинетике реакции проявляется

наиболее быстрый процесс. Так, если $k_{12} \gg k_{21}$, изменение во времени концентрации активного состояния фермента описывает уравнение

$$E_a = E_0 \exp(-k_{12}t). \qquad (5.1)$$

Таким образом, константа скорости инактивации $k_i = k_{12}$ является характеристикой состояния биополимера. Если происходят какие-либо структурные изменения полимера, то они могут повлиять на константу скорости перехода E_a в E_i.

Процессы, приводящие к инактивации фермента, могут иметь различную физико-химическую природу. Молекулы белка в растворе существуют в виде конформеров, обратимо переходящих друг в друга. Конформационные переходы определяются в основном двумя параметрами — показателем pH и температурой. При повышении температуры происходит «плавление» некоторых участков белковой молекулы. Если такого рода процессы протекают глубоко, могут происходить необратимые изменения структуры, в большинстве случаев приводящие к потере функциональной активности. Этот процесс называют тепловой денатурацией. Тепловая денатурация белка приводит к существенной перестройке макромолекулы, изменению третичной и частично вторичной структуры. При каждом значении pH белок характеризуется соответствующим распределением зарядов, создаваемым ионогенными группами. При очень низких или высоких значениях pH распределение зарядов может существенно поляризовать молекулу белка, приводить к появлению конформеров, способных необратимо изменяться с разрушением структуры активного центра.

При изучении такого рода процессов важная информация получена релаксационными методами. Как правило, конформационные изменения сопровождаются изменением окружения ароматических аминокислот — тирозина и триптофана. Это проявляется в изменении спектров поглощения и флуоресценции в области ~290 нм и позволяет следить за изменениями структуры белка Обратимые конформационные изменения, индуцируемые изменением температуры или показателя pH, протекают в течение 10^{-4}—10^{-1} с, необратимые денатурационные изменения в зависимости от условий — в течение $1 - 10^3$ мин.

Помимо денатурационных воздействий температуры и pH, инактивация ферментов может быть вызвана применением денатурирующих агентов, разрушающих вторичную структуру белка, таких как мочевина или гуанидинхлорид Иногда, особенно при инактивации ферментов, активные центры которых содержат тиольные группы, существенную роль играют окислительные процессы с участием кислорода

Если обратимые конформационные изменения протекают относительно быстро и в каждый момент времени конформацион-

ные равновесия успевают устанавливаться, кинетика инактивации будет описываться одноэкспоненциальным уравнением, однако в константу скорости инактивации будут входить константы равновесия конформационных изменений.

Рассмотрим простейшую кинетическую схему инактивации с учетом равновесия конформеров E_1, E_2, E_i белка, при этом конформер E_i не обладает функциональной активностью:

$$E_1 \underset{}{\overset{K}{\rightleftharpoons}} E_2 \xrightarrow{k} E_i$$

Данная кинетическая схема описывается следующей системой уравнений:

$$\begin{cases} \dfrac{dE_i}{dt} = kE_2, \\ K = E_1/E_2, \\ E_0 = E_1 + E_2 + E_i, \end{cases}$$

где E_1, E_2, E_i — текущая концентрация конформера E_1, E_2, E_i соответственно.

Из уравнения материального баланса следует

$$\frac{dE_2}{dt}(1+K) + \frac{dE_i}{dt} = 0,$$

$$-\frac{dE_2}{dt} = \frac{k}{1+K}E_2.$$

Кинетика процесса описывается одним характеристическим временем

$$k_i = \tau^{-1} = \frac{k}{1+K}, \quad E_2 = E_0 \exp(-k_i t),$$

где k_i — эффективная (наблюдаемая) константа скорости инактивации.

В зависимости от термодинамических характеристик процесса эффективная константа скорости инактивации включает или не включает константу равновесия предшествующей лимитирующей стадии.

1. Если переход $E_1 \rightleftharpoons E_2$ является термодинамически выгодным, то $K \ll 1$, $k_i = k$.

2. Если образование конформера E_2 термодинамически невыгодно, то $K \gg 1$, $k_i = k/K$.

Термодинамически невыгодная быстрая равновесная стадия существенно снижает скорость денатурации белка.

В случае если инактивации подвержены оба конформера:

$$\begin{array}{ccc} E_1 & \overset{K}{\rightleftharpoons} & E_2 \\ \downarrow k_1 & & \downarrow k_2 \\ E_{1i} & & E_{2i} \end{array}$$

то эффективная константа скорости инактивации описывается уравнением

$$k_i = \tau^{-1} = \frac{k_1 + Kk_2}{1 + K}.$$

В общем виде для системы с участием n конформеров:

$$E_1 \overset{K_1}{\rightleftharpoons} E_2 \overset{K_2}{\rightleftharpoons} \ldots \rightleftharpoons E_{n-1} \overset{K_{n-1}}{\rightleftharpoons} E_n \xrightarrow{k} E_i$$

эффективная константа скорости инактивации будет равна

$$k_i = \tau^{-1} = \frac{k}{1 + K_{n-1}\{1 + K_{n-2}[1 + \ldots + K_2(1 + K_1)]\}}.$$

Если конформационные изменения термодинамически невыгодны, эффективная константа скорости инактивации отражает множество конформационных изменений белка

$$k_i = \frac{k}{\prod_{j=1}^{n-1} K_j}.$$

Именно таким образом протекает тепловая денатурация белков.

Эффективная константа скорости является мерой конформационных изменений, и из исследования инактивационных процессов можно получить информацию о конформационных состояниях молекулы белка. В то же время очевидно, что эффекты, приводящие к изменению скорости инактивации, например эффекты стабилизации или дестабилизации белка, могут проявляться как на лимитирующей стадии, так и на стадии равновесных конформационных изменений, оказывая влияние на константы равновесия. Природа инактивирующего воздействия может быть различной: высокие температуры, ультразвук, радиоактивное излучение.

Интересные экспериментальные результаты получены при изучении конформационных изменений белка, обусловленных изменением pH и перераспределением зарядов на белковой глобуле. Как правило, инактивация ферментов существенно возрастает или замедляется в сильнокислых или щелочных растворах. В качестве примера рассмотрим инактивацию α-химотрипсина под действием ультразвука. В диапазоне концентраций фермента 10^{-7} — 10^{-6} моль/л кинетика инактивации строго описывается уравнением (5.1) (рис. 5.1). Исследование кинетики инактивации α-химотрипсина

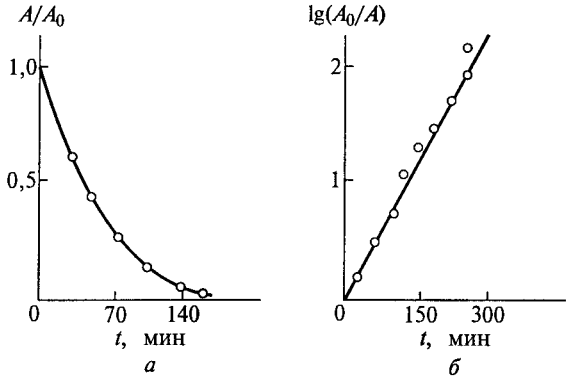


Рис. 5.1. Кинетика инактивации α-химотрипсина под действием ультразвука:

а — изменение активности фермента во времени; *б* — данные рис. 5.1, *а* представлены в полулогарифмических координатах

под действием ультразвука показало, что скорость инактивации резко падает при pH < 3 и pH > 9. На рис. 5.2 приведена зависимость константы скорости инактивации фермента под действием ультразвука от pH раствора.

Простейшая схема, описывающая инактивацию фермента, имеет вид

$$\underset{\downarrow k_к}{EH_2} \overset{K_1}{\rightleftharpoons} \underset{\downarrow k_н}{EH} \overset{K_2}{\rightleftharpoons} \underset{\downarrow k_о}{E}$$

Инактивированные формы

Здесь E, EH, EH_2 — основное, нейтральное и кислое состояние молекулы белка соответственно; $k_о$, $k_н$, $k_к$ — соответствующие константы скорости инактивации; K_1, K_2 — равновесные константы процессов протонирования — депротонирования.

Данная кинетическая схема описывается системой уравнений

$$\begin{cases} \dfrac{dE_t}{dt} = k_к[EH_2] + k_н[EH] + k_о[E], \\ E_0 = [EH_2] + [EH] + [E] + E_t, \\ K_1 = \dfrac{[EH][H^+]}{[EH_2]}, \quad K_2 = \dfrac{[E][H^+]}{[EH]}. \end{cases}$$

Эффективная константа скорости инактивации k_t будет равна

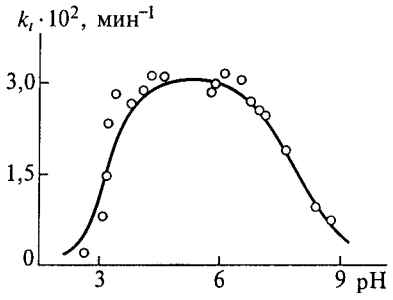


Рис. 5.2. Зависимость константы скорости инактивации α-химотрипсина под действием ультразвука от показателя pH

$$k_i = \frac{k_к \frac{[H^+]}{K_1} + k_н + k_о \frac{K_2}{[H^+]}}{1 + \frac{[H^+]}{K_1} + \frac{K_2}{[H^+]}}$$

или

$$p = \frac{k_i}{k_н} = \frac{1 + \frac{k_к[H^+]}{k_н K_1} + \frac{k_о K_2}{k_н [H^+]}}{1 + \frac{[H^+]}{K_1} + \frac{K_2}{[H^+]}}. \qquad (5.2)$$

При pH < 3 или pH > 9, когда система полностью переходит в состояние EH_2 или E соответственно, инактивация существенно замедляется. Это означает, что $k_н \gg k_к$ и $k_н \gg k_о$. Тогда уравнение (5.2) может быть записано в виде

$$p = \frac{1}{1 + \frac{[H^+]}{K_1} + \frac{K_2}{[H^+]}}.$$

Рассмотрим три случая:

1) если $[H^+] \ll K_1$, $[H^+] \ll K_2$, то $k_i = k_н[H^+]/K_2$, т.е. константа скорости инактивации линейно растет с увеличением концентрации ионов водорода (правая часть кривой на рис. 5.2);

2) если $[H^+] \gg K_2$, $[H^+] \ll K_1$, то $k_i = k_н$, т.е. константа скорости инактивации не зависит от pH (плато на рис. 5.2);

3) если $[H^+] \gg K_1$, $[H^+] \gg K_2$, то $k_i = k_н K_1/[H^+]$, т.е. константа скорости инактивации падает с ростом pH (левая часть кривой на рис. 5.2).

Из экспериментальных данных, представленных в логарифмических координатах, в соответствии с известными методами могут быть найдены pK ионогенных групп, контролирующих инактивацию фермента. В случае α-химотрипсина такими ионогенными группами являются карбоксильная группа остатка аспарагиновой кислоты-194 и α-аминогруппа остатка изолейцина-16 (pK этих групп 3,3 и 8,3 соответственно), образующие водородную связь, обеспечивающую конформацию активного центра α-химотрипсина. Известно, что разрушение этой связи за счет протонирования карбоксильной группы или за счет депротонирования аминогруппы ведет к существенному изменению конформации активного центра фермента, приводящему к нарушению каталитической функции. Однако к инактивации ультразвуком эти конформации активного центра устойчивы. Показано, что инактивация α-химотрипсина под действием ультразвука происходит за счет разрушения триптофана-215, входящего в активный центр α-химотрипсина. По-видимому, в развернутом неактивном состоянии

каталитического центра триптофан-215 становится менее доступным для свободных радикалов, которые возникают под действием ультразвука и приводят к инактивации фермента.

5.2. Инактивация ферментов в процессе реакции

Известны ферментативные реакции, в ходе которых происходит потеря активности ферментом (инактивация). Исследование закономерностей инактивации фермента представляет особый интерес, поскольку инактивация может являться одним из механизмов регуляции ферментативной активности. Механизм ферментативной реакции превращения субстрата S в продукт P включает образование промежуточных соединений X фермента с субстратом:

$$E + S \overset{K_M}{\rightleftarrows} X \xrightarrow{k_{кат}} E + P$$

В общем случае в системе находятся четыре компонента E, S, X, P, концентрации которых изменяются во времени и взаимодействия между которыми могут приводить к инактивации фермента. Возможны несколько механизмов, по которым происходит инактивация фермента в процессе реакции.

1. Элементарная стадия инактивации представляет собой мономолекулярный процесс, протекающий с постоянной частотой (интенсивностью) отказов k_i, например процесс тепловой денатурации фермента

$$E \xrightarrow{k_i} E_i \qquad (5.3)$$

2. Инактивация может происходить через промежуточное фермент-субстратное соединение

$$X \xrightarrow{k_i} E_i \qquad (5.4)$$

в условиях, когда свободная форма фермента E существенно стабильнее промежуточного соединения.

3. Инактивация фермента происходит при взаимодействии с субстратом

$$E + S \xrightarrow{k_i} E_i \qquad (5.5)$$

Протекающая параллельно с ферментативным процессом бимолекулярная реакция фермента с субстратом приводит к накоплению в системе неактивной формы фермента E_i.

4. К инактивации фермента может приводить параллельная реакция с продуктом каталитического превращения. В простейшем случае эта реакция может представлять собой бимолекулярный процесс

$$E + P \xrightarrow{k_i} E_i \qquad (5.6)$$

Очевидно, что для различных механизмов инактивации динамика изменения концентраций компонентов в системе будет различна. Экспериментальное исследование кинетики реакций должно дать информацию о механизме инактивации.

Рассмотрим детально два важных случая: мономолекулярную инактивацию свободной формы фермента (5.3) и мономолекулярную инактивацию фермент-субстратного комплекса (5.4), происходящих в процессе превращения субстрата.

Мономолекулярная инактивация свободной формы фермента. Рассмотрим кинетику ферментативной реакции (5.3), в которой инактивация фермента протекает через его свободную форму. Кинетика процесса в условиях стационарности концентрации фермент-субстратного комплекса при избытке субстрата $S_0 \gg E_0$ описывается системой уравнений

$$\begin{cases} -\dfrac{dS}{dt} = k_{\text{кат}} X, \\ \dfrac{dE_i}{dt} = k_i E, \\ E_0 = E + X + E_i, \\ K_M = \dfrac{ES}{X}. \end{cases}$$

Из этих уравнений следует, что

$$E = E_0 \exp(-k_i t). \tag{5.7}$$

Интегрирование дифференциального уравнения с разделяющимися переменными при начальных условиях $t = 0$, $P = 0$ приводит к неявной функции, отражающей изменение концентрации продукта в зависимости от времени и параметров реакции:

$$K_M \ln \frac{S_0}{S_0 - P} = \frac{k_{\text{кат}} E_0}{k_i} [1 - \exp(-k_i t)]. \tag{5.8}$$

Полезным представляется введение безразмерной переменной — степени конверсии субстрата:

$$\alpha = \frac{S_0 - S}{S_0}.$$

С учетом этого соотношения уравнение (5.8) будет иметь вид

$$\alpha - \frac{K_M}{S_0} \ln(1 - \alpha) = \frac{k_{\text{кат}} E_0}{k_i S_0} [1 - \exp(-k_i t)]. \tag{5.9}$$

При $t \to \infty$ степень конверсии субстрата выходит на предельный уровень $\alpha_{\lim} \leq 1$, который связан с начальными концентрациями фермента E_0, субстрата S_0 и кинетическими характеристиками процесса уравнением

$$-\frac{K_M}{S_0}\ln(1-\alpha_{\lim}) = \frac{V_m}{k_i S_0} - \alpha_{\lim}, \qquad (5.10)$$

где V_m — максимальная скорость ферментативной реакции при данной концентрации фермента.

Рассмотрим наиболее важные частные случаи.

Случай 1. При степени конверсии субстрата $\alpha \ll 1$ разложение логарифмической функции уравнения (5.9) в ряд относительно α и пренебрежение членами высшего порядка малости приводят к уравнению

$$\alpha = \frac{k_{кат} E_0}{k_i (S_0 + K_M)}[1 - \exp(-k_i t)]$$

или

$$\alpha = \frac{v_0}{k_i S_0}[1 - \exp(-k_i t)], \qquad (5.11)$$

где v_0 — начальная стационарная скорость реакции. На рис. 5.3, *а* приведены зависимости степени конверсии от безразмерного времени $\tau = k_i t$ при различных начальных концентрациях фермента. В ходе реакции степень конверсии субстрата не достигает единицы и при $t \to \infty$ выходит на предельное значение, определяемое начальной скоростью реакции и константой скорости инактивации фермента:

$$\alpha_{\lim} = \frac{k_{кат} E_0}{k_i (S_0 + K_M)} = \frac{v_0}{k_i S_0}.$$

В этих условиях предельная степень конверсии субстрата (или предельный выход продукта) линейно зависит от концентрации вво-

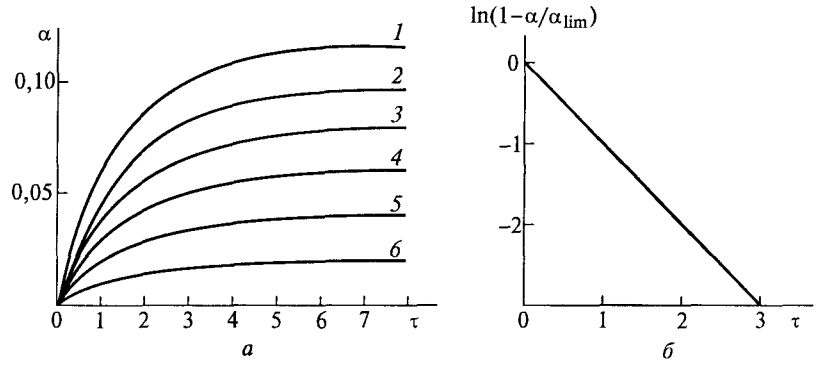


Рис. 5.3. Кинетика инактивации фермента по механизму (5.3), рассчитанная по уравнению (5.11):

а — изменение степени конверсии субстрата во времени при начальной концентрации фермента $E_0/6$ (*1*), $E_0/5$ (*2*), $E_0/4$ (*3*), $E_0/3$ (*4*), $E_0/2$ (*5*), E_0 (*6*); *б* — данные рис. 5.3, *а* представлены в полулогарифмических координатах

димого в реакцию фермента Кинетические кривые накопления продукта или степени конверсии субстрата, полученные при различных концентрациях фермента, должны «спрямляться» в полулогарифмических координатах (рис. 5.3, *б*), при этом тангенс угла наклона прямой равен константе скорости инактивации фермента. Кинетические данные, полученные при различных концентрациях фермента, могут быть представлены в виде одной прямой линии.

Случай 2. При степени конверсии субстрата $\alpha \approx 1$ логарифмический член уравнения (5.9) должен значительно превышать степень конверсии субстрата

$$\alpha \ll -\frac{K_M}{S_0}\ln(1-\alpha)$$

или

$$(1-\alpha)\exp\left(\frac{S_0}{K_M}\alpha\right) \ll 1. \qquad (5.12)$$

С учетом (5.12) зависимость степени конверсии от времени описывается уравнением

$$\alpha = 1 - \exp\left\{\frac{k_{кат}E_0}{k_i K_M}[\exp(-k_i t) - 1]\right\}$$

или

$$-\ln(1-\alpha) = \alpha_{lim}[1 - \exp(-k_i t)],$$

где

$$\alpha_{lim} = \frac{k_{кат}E_0}{k_i K_M}.$$

Соответственно кинетические кривые линеаризуются в полулогарифмических координатах

$$\ln\left[1 + \frac{\ln(1-\alpha)}{\alpha_{lim}}\right] = -k_i t$$

при всех использованных концентрациях фермента.

Предельная степень конверсии субстрата является функцией концентрации фермента:

$$\alpha_{lim} = 1 - \exp\left(-\frac{k_{кат}E_0}{k_i K_M}\right)$$

Таким образом, при увеличении концентрации фермента предельная степень конверсии субстрата стремится к единице.

Случай 3. При $\tau = k_i t \ll 1$ (или $k_{кат}E_0 \gg k_i S_0$) разложение экспоненциальной функции уравнения (5.9) в ряд относительно τ приводит к уравнению

$$\alpha - \frac{K_M}{S_0}\ln(1-\alpha) = \frac{V_m}{S_0}t, \qquad (5.13)$$

которое представляет собой классическое уравнение Михаэлиса в интегральной форме. При $\tau \ll 1$ инактивацией фермента можно пренебречь. На основе уравнения

$$-\frac{\ln(1-\alpha)}{\alpha} = \frac{V_m}{K_M}\frac{t}{\alpha} - \frac{S_0}{K_M},$$

полученного преобразованием (5.13), определяют кинетические параметры V_m и K_M действия фермента.

Мономолекулярная инактивация фермент-субстратного комплекса. Рассмотрим кинетические закономерности ферментативной реакции при условии, что инактивация протекает мономолекулярно через фермент-субстратный комплекс (реакция (5.4)). В условиях стационарности концентрации фермент-субстратного комплекса при избытке субстрата $S_0 \gg E_0$ кинетика процесса описывается системой дифференциальных и алгебраических уравнений

$$\begin{cases} \dfrac{dS}{dt} = -(k_{\text{кат}} + k_i)X, \\ \dfrac{dE_i}{dt} = k_i X, \\ E_0 = E + X + E_i, \\ K_M = \dfrac{ES}{X}. \end{cases}$$

Из этих уравнений следует, что концентрация инактивированной формы E_i фермента связана с концентрацией субстрата соотношением

$$E_i = \frac{k_i}{k_{\text{кат}} + k_i}(S_0 - S).$$

Концентрацию фермент-субстратного комплекса можно вычислить по уравнению

$$X = \frac{E_0 - \dfrac{k_i}{k_{\text{кат}} + k_i}(S_0 - S)}{1 + \dfrac{K_M}{S}}.$$

При переходе к степени конверсии α субстрата получим

$$\frac{b}{1-a}\ln\frac{1-a\alpha}{1-\alpha} - \frac{1}{a}\ln(1-a) = \frac{(k_i + k_{\text{кат}})E_0}{S_0}t, \qquad (5.14)$$

где

$$a = \frac{k_t S_0}{(k_t + k_{кат})E_0}, \quad b = \frac{K_M}{S_0}.$$

Рассмотрим наиболее важные частные случаи.

Случай 1. Скорость инактивации фермента существенно превышает максимальную скорость ферментативной реакции $k_t S_0 \gg \gg (k_{кат} + k_t)E_0$:

$$\alpha = \frac{(k_t + k_{кат})E_0}{k_t S_0}\left[1 - \exp\left(-\frac{k_t}{1 + K_M/S_0}\right)\right]. \qquad (5.15)$$

В ходе реакции степень конверсии субстрата выходит на предельное значение

$$\alpha_{lim} = \frac{1}{a} = \frac{(k_t + k_{кат})E_0}{k_t S_0} \ll 1.$$

Экспериментальным подтверждением выполнения этого приближения является предельный выход продукта ($\alpha_{lim} \ll 1$). В этих условиях путем линеаризации экспериментальных данных в полулогарифмических координатах на основе уравнения (5.15) может быть найдена эффективная константа скорости $k_{эф\,t}$ инактивации фермента (рис. 5.4):

$$k_{эф\,t} = \frac{k_t}{1 + K_M/S_0}.$$

При этом должен наблюдаться эффект стабилизации, т.е. уменьшение скорости инактивации, фермента при уменьшении концен-

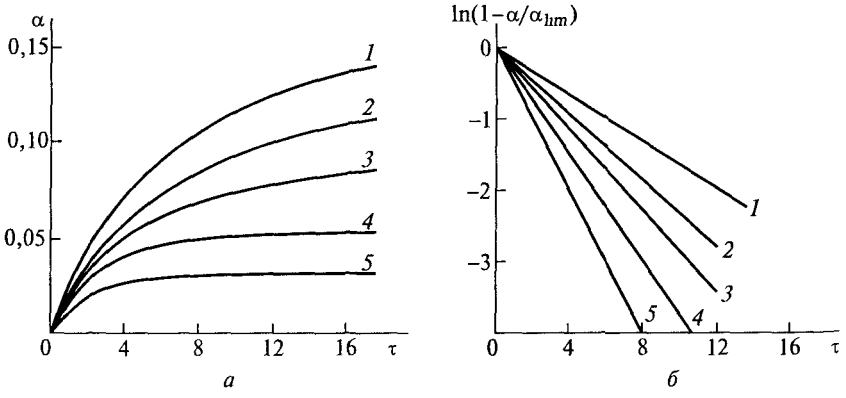


Рис. 5 4. Кинетика инактивации фермента по механизму (5 4), рассчитанная по уравнению (5.15):

а — изменение степени конверсии субстрата во времени при начальной концентрации субстрата $S_0/5$ (*1*), $S_0/3$ (*2*), $S_0/2$ (*3*), $3S_0/2$ (*4*), S_0 (*5*), *б* — данные рис 5 4, *а* представлены в полулогарифмических координатах

трации субстрата. При насыщении фермента субстратом ($S_0 \gg K_M$) эффективная константа скорости инактивации выходит на предельный уровень, определяемый константой скорости инактивации фермент-субстратного комплекса.

Случай 2. При высоких концентрациях фермента, когда $\alpha \approx 1$, справедливо соотношение $k_{кат}E_0 \gg k_i S_0$. При этом уравнение (5.14) преобразуется в уравнение (5.13), из которого можно найти значения V_m и K_M ферментативной реакции. В этих условиях инактивация фермента не оказывает влияния на кинетику реакции.

Случай 3. Скорость ферментативной реакции максимальна практически во всем диапазоне концентрации субстрата ($b = K_M/S_0 \ll \ll 1$). В этих условиях независимо от степени конверсии субстрата кинетика процесса описывается уравнением

$$\alpha = \frac{k_{кат}E_0}{k_i S_0}[1 - \exp(-k_i t)],$$

согласно которому все кинетические кривые, полученные при различных концентрациях фермента и субстрата, в полулогарифмических координатах этого уравнения должны укладываться на одну прямую, тангенс угла наклона которой равен константе скорости инактивации k_i.

Случай 4. Ферментативная реакция протекает в бимолекулярном режиме ($b = K_M/S_0 \gg 1$). Динамику изменения степени конверсии субстрата описывает уравнение

$$\alpha = \frac{\exp\left[\frac{V_m}{K_M}(1-a)\right]t - 1}{\exp\left[\frac{V_m}{K_M}(1-a)\right]t - a}.$$

В этих условиях при $t \to \infty$ и $a < 1$ получим $\alpha_{lim} = 1$; при $t \to \infty$ и $a > 1$ имеем

$$\alpha_{lim} = \frac{1}{a} = \frac{(k_i + k_{кат})E_0}{k_i S_0}.$$

Кинетические кривые, полученные при $\alpha_{lim} < 1$, должны линеаризоваться в координатах уравнения

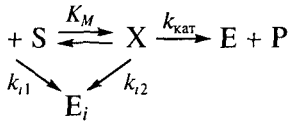
$$\ln\frac{1 - \alpha/\alpha_{lim}}{1 - \alpha} = \frac{V_m}{K_M}(1 - \alpha_{lim})t$$

(как правило, $k_i \ll k_{кат}$), на основании которого может быть найден параметр V_m/K_M.

Влияние субстрата на инактивацию фермента. В зависимости от соотношения констант инактивации свободной формы фермента E и фермент-субстратного комплекса X субстрат, присутству-

ющий в реакционной среде, может выступать в качестве как стабилизирующего, так и дестабилизирующего фактора.

Рассмотрим кинетическую схему с учетом возможности мономолекулярной инактивации как фермента (константа скорости k_{i1}), так и фермент-субстратного комплекса (константа скорости k_{i2}):



При условии, что реакцию проводят при избытке субстрата ($S_0 \gg E_0$) при низкой степени конверсии ($\alpha \ll 1$) (предполагается, что за время инактивации фермента его концентрация практически не меняется), кинетика процесса по различным компонентам описывается уравнениями

$$X = \frac{E_0 S_0}{K_M + S_0} \exp\left(-\frac{k_{i1} + k_{i2} S_0 / K_M}{1 + S_0 / K_M} t \right),$$

$$E = \frac{S_0}{1 + S_0 / K_M} \exp\left(-\frac{k_{i1} + k_{i2} S_0 / K_M}{1 + S_0 / K_M} t \right),$$

$$E_i = E_0 \left[1 - \exp\left(-\frac{k_{i1} + k_{i2} S_0 / K_M}{1 + S_0 / K_M} t \right) \right],$$

$$P = k_{i2} \int_0^t X dt = \frac{k_{i2} E_0 S_0}{K_M k_{i2} + k_{i1} S_0} \left[1 - \exp\left(-\frac{k_{i1} + k_{i2} S_0 / K_M}{1 + S_0 / K_M} t \right) \right].$$

Видно, что изменения во времени концентраций всех компонентов реакции описываются одной и той же экспоненциальной функцией и кинетические зависимости отличаются лишь предэкспоненциальными множителями и постоянными. Эффективная (наблюдаемая) константа скорости инактивации $k_{эфi}$, связанная с характеристическим временем реакции, равна

$$k_{эфi} = \tau^{-1} = \frac{k_{i1} + k_{i2} S_0 / K_M}{1 + S_0 / K_M}.$$

Анализ этого уравнения показывает, что в зависимости от соотношения констант k_{i1}, k_{i2}, K_M и концентрации S_0 субстрат может как ускорять, так и тормозить инактивацию фермента.

1. Если инактивации подвергается преимущественно свободная форма фермента $k_{i1} \gg k_{i2}$ ($k_{i2} \approx 0$), то $\tau^{-1} = k_{i1}/(1 + S_0/K_M)$. В этом случае увеличение концентрации субстрата уменьшает скорость инактивации фермента. При $S_0 \gg K_M$ субстрат препятствует инактивации (случай «защиты» фермента).

2. Если инактивации подвергается лишь промежуточное соединение $k_{i2} \gg k_{i1}$ ($k_{i1} \approx 0$), то $\tau^{-1} = k_{i2} S_0/(K_M + S_0)$. При $S_0 \ll K_M$

константа скорости инактивации фермента линейно зависит от концентрации субстрата; при $S_0 \gg K_M$ скорость инактивации не зависит от S_0 и определяется константой скорости k_{i2}.

3. Если инактивации подвергаются свободный фермент и промежуточное соединение с одинаковой частотой ($k_{i2} = k_{i1}$), то $\tau^{-1} = k_{i1} + k_{i2}$, следовательно, субстрат не влияет на инактивацию фермента.

Кинетические уравнения для различных механизмов инактивации (5.3)—(5.6) в ряде случаев имеют разный вид, что дает возможность, сопоставляя экспериментальные данные с теоретическими уравнениями, установить механизм инактивации фермента.

Полезными являются следующие способы установления механизма инактивации фермента.

1. Если в процессе реакции выход продукта (степень конверсии субстрата) зависит от концентрации фермента, значит реакция сопровождается инактивацией фермента. При этом нужно быть уверенным, что реакция проводится в условиях $S_0 \gg E_0$ и снижение скорости реакции не связано с обратимым ингибированием процесса продуктом реакции. Последнее обстоятельство может быть установлено с помощью обычных тестов на обратимость.

2. Для реакций, сопровождающихся инактивацией фермента, степень конверсии субстрата $\alpha = k_{кат}/(k_i K_M)$ связана со степенью инактивированности фермента $\beta = E_i/E_0$ (табл. 5.1).

На рис. 5.5 приведены расчетные кривые $\beta(\alpha)$ для различных механизмов инактивации. Видно, что при заданных кинетических параметрах значения α_{lim}, наблюдаемые при $\beta = 1$, изменяются в ряду: $\alpha_{lim\,2} \approx \alpha_{lim\,3} > \alpha_{lim\,1}$.

Таблица 5.1

Связь степени инактивированности фермента β со степенью конверсии субстрата α для различных механизмов инактивации

№	Механизм	Соотношение
1	$E \xrightarrow{k_i} E_i$	$\beta_1 = \frac{k_i S_0}{k_{кат} E_0} \frac{K_M}{S_0} \ln(\alpha - 1)$
2	$X \xrightarrow{k_i} E_i$	$\beta_2 = \frac{k_i S_0}{(k_{кат} + k_i) E_0} \alpha$
3	$E + S \xrightarrow{k_i} E_i$	$\beta_3 = S_0 \left[\left(1 + \frac{k_{кат}}{k_i K_M} \right) E_0 \right]^{-1} \alpha$
4	$E + P \xrightarrow{k_i} E_i$	$\beta_4 = -\frac{S_0}{E_0} \frac{\alpha}{a+1} \left[1 + \ln\left(1 - \frac{a+1}{a} \alpha \right) \right]$

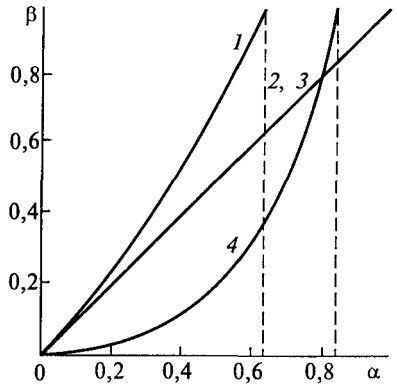


Рис. 5.5. Зависимость степени инактивированности фермента β от степени конверсии субстрата α для первого (*1*), второго (*2*), третьего (*3*) и четвертого (*4*) механизмов инактивации (табл. 5.1)

3. Установить механизм инактивации фермента можно, проводя реакцию при низких степенях конверсии субстрата и низких концентрациях фермента. При $\alpha_{lim} \ll 1$ ($\alpha_{lim} < 0{,}2$) кинетика образования продукта (конверсии субстрата) для всех механизмов (5.3)—(5.6) описывается простыми экспоненциальными уравнениями. По экспериментальным данным, представленными полулогарифмическими координатами, могут быть найдены значения параметра $k_{эф\,i}$, характеризующего инактивацию фермента во времени. В табл. 5.2 приведены параметры $k_{эф\,i}$ и α_{lim} как функции кинетических характеристик отдельных стадий и начальных концентраций субстрата и фермента. В случае инактивации фермента продуктом экспериментальные данные не могут быть линеаризованы в полулогарифмических координатах.

Установить механизм инактивации можно, анализируя зависимости $k_{эф\,i}$ и α_{lim} от начальных концентраций фермента и субстрата. Значения α_{lim} для 1-го, 2-го и 3-го (см. табл. 5.2) механизмов линейно зависят от концентрации фермента, в то время как для 4-го механизма (инактивация при взаимодействии с продуктом) α_{lim} зависит от $E_0^{1/2}$. Показатель экспоненты, описывающей

Таблица 5.2

Экспериментально определяемые параметры реакций, протекающих с инактивацией фермента при $\alpha_{lim} \ll 1$

№	Механизм	Параметры
1	$E \xrightarrow{k_i} E_i$	$k_{эф\,i} = k_i, \quad \alpha_{lim} = \dfrac{k_{кат}}{k_i(S_0 + K_M)} S_0$
2	$X \xrightarrow{k_i} E_i$	$k_{эф\,i} = \dfrac{k_i S_0}{S_0 + K_M}, \quad \alpha_{lim} = \dfrac{k_{кат}}{k_i S_0} E_0$
3	$E + S \xrightarrow{k_i} E_i$	$k_{эф\,i} = \dfrac{k_i K_M S_0}{S_0 + K_M}, \quad \alpha_{lim} = \dfrac{k_{кат}/K_M + k_i}{k_i S_0} E_0$
4	$E + P \xrightarrow{k_i} E_i$	$k_{эф\,i} = \dfrac{\sqrt{2k_i} S_0 K_M k_{кат} E_0}{S_0 + K_M}, \quad \alpha_{lim} = \sqrt{\dfrac{2k_{кат} E_0}{k_i S_0 K_M}}$

временную функцию инактивации для 4-го механизма, также зависит от концентрации фермента, при этом для 1-го, 2-го и 3-го механизмов эффективная константа скорости не зависит от начальной концентрации фермента. Таким образом, 4-й механизм может быть надежно идентифицирован.

Если экспериментально обнаружено, что $k_{эф_i}$ зависит от концентрации субстрата, то 1-й механизм можно исключить из рассмотрения. В то же время если экспериментально показано, что $k_{эф_i}$ не зависит от S_0, это не доказывает справедливость 1-го механизма, поскольку такая зависимость может выполняться для 2-го и 3-го механизмов при большом избытке субстрата по сравнению с константой Михаэлиса. В этих условиях принципиально важным является определение параметров V_m и K_M.

4. Процессом инактивации фермента можно пренебречь, если концентрация фермента в 30—100 раз превышает концентрацию субстрата, при этом степень конверсии субстрата близка к единице. Из интегральной формы уравнения Михаэлиса, которое описывает динамику процесса в этих условиях, могут быть найдены параметры V_m и K_M. Использование найденных значений V_m и K_M при сопоставлении зависимости $k_{эф_i}(S_0)$ с экспериментальными данными позволяет идентифицировать 1-й механизм: при $S_0 \approx K_M$ константа $k_{эф_i}$ для 1-го механизма не должна зависеть от концентрации субстрата. Наибольшие сложности представляет идентификация 2-го и 3-го механизмов. Кинетические данные, полученные в обсуждаемых выше приближениях, не позволяют различать эти механизмы; для этого необходимо проведение качественно других экспериментов.

5. Предварительная инкубация фермента с различными компонентами системы позволяет надежно идентифицировать механизмы инактивации. Действительно, начальная стационарная скорость реакции является линейной функцией концентрации фермента и может служить мерой изменения концентрации фермента в процессе его инактивации. Очевидно, что фермент, инактивирующийся по 1-му механизму, в отсутствие субстрата должен изменять свою активность экспоненциально, при этом константа $k_{эф_i}$ должна быть равна k_i. Для бисубстратных реакций инкубацию можно провести отдельно с каждым из субстратов.

6. Анализ, проведенный указанными выше способами, позволяет идентифицировать механизм инактивации и определять кинетические характеристики системы V_m, K_M, k_i. Дополнительным подтверждением сделанных выводов может быть линеаризация экспериментальных данных $\alpha(t)$ в координатах, полученных из интегральных уравнений, описывающих динамику процессов. В случае 4-го механизма экспериментальные данные, полученные при невысоких степенях конверсии субстрата, должны линеаризоваться в соответствии с интегральным уравнением

$$\ln\frac{1+\alpha/\alpha_{lim}}{1-\alpha/\alpha_{lim}} = \frac{\sqrt{2k_i S_0 K_M k_{кат} E_0}}{S_0 + K_M} t.$$

Инактивация простагландин-Н-синтазы — лимитирующего фермента синтеза простагландинов. Полиферментный комплекс синтеза простагландинов осуществляет превращение арахидоновой кислоты (АА) в простагландины (PGE_2, $PGF_{2\alpha}$) и включает, по крайней мере, два фермента — простагландин-Н-синтазу (PGH-синтазу) и простагландинизомеразу. Наиболее сложным и медленным процессом, определяющим скорость образования простагландинов, является реакция, катализируемая первым ферментом цепи. Свидетельством этому является тот факт, что стационарная концентрация продукта первого фермента PGH_2 при проведении реакции в биферментной системе близка к нулю и в реакционной смеси PGH_2 практически не обнаруживается (см. подразд. 4.5).

В большом числе работ по изучению биоспецифического синтеза простагландинов отмечается факт инактивации фермента в процессе реакции. Были исследованы кинетические закономерности действия PGH-синтазы на динамику расходования кислорода. На рис. 5.6, *а* приведены типичные кривые изменения степени конверсии кислорода α во времени при различных концентрациях PGH_2-синтазы. Предельная степень конверсии субстрата зависит от концентрации вводимого в реакцию фермента. В отдельных экспериментах было показано, что в данном случае уменьшение скорости реакции до нуля связано с инактивацией фермента. Так, при введении новой порции фермента в прореагировавшую реакционную смесь, скорость реакции которой равна нулю ($\alpha_{lim} < 1$), реакция возобновляется с исходной начальной скоростью.

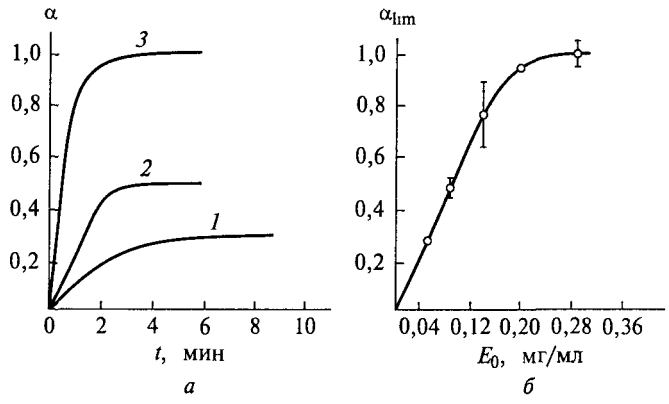


Рис. 5.6. Динамика расходования кислорода в PGH-синтазной реакции:

а — изменение степени конверсии кислорода во времени при концентрации фермента E_{01} (*1*), E_{02} (*2*), E_{03} (*3*) ($E_{01} < E_{02} < E_{03}$); *б* — зависимость предельной степени конверсии кислорода от концентрации фермента

Зависимость предельной степени конверсии субстрата (предельного выхода продукта) от концентрации фермента имеет вид кривой с насыщением (рис. 5.6, *б*). Необходимо выяснить, по какому механизму протекает инактивация фермента. Для этого были проведены эксперименты по исследованию кинетики реакции при малых степенях конверсии кислорода и опыты по предварительной инкубации фермента с компонентами реакционной смеси.

Изменение степени конверсии кислорода (выхода продукта) (при $\alpha_{lim} < 0{,}2$) во времени для всех рассмотренных случаев описывается простыми экспоненциальными уравнениями. Значение α_{lim} можно надежно определить как предел изменения концентрации продукта или субстрата. Представляя экспериментальные данные в полулогарифмических координатах, можно найти параметр $k_{эф,i}$, характеризующий инактивацию фермента во времени.

Идентификация механизма инактивации возможна при изучении зависимостей $k_{эф,i}$ и α_{lim} от начальных концентраций фермента и субстрата. В то время как степень конверсии α_{lim} для 1-го, 2-го и 3-го механизмов линейно зависит от концентрации фермента, для 4-го механизма параметр α_{lim} линейно зависит от $E_0^{1/2}$. Показатель экспонент, описывающих инактивацию во времени для 4-го механизма, также зависит от концентрации фермента; при этом для 1-го, 2-го и 3-го механизмов эффективная константа скорости не является функцией начальной концентрации фермента. Таким образом, на основании этих критериев может быть идентифицирован 4-й механизм.

Результаты исследования кинетики окисления арахидоновой кислоты при $\alpha_{lim} \ll 1$ приведены на рис. 5.7, *а*. Степень конверсии

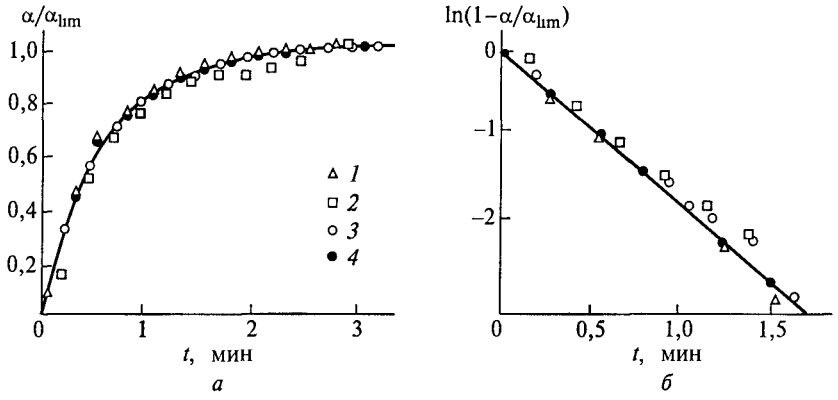


Рис. 5.7. Динамика расходования кислорода на начальном этапе PGH-синтазной реакции:

а — изменение во времени степени конверсии кислорода (точки *1*—*4* отвечают различным значениям E_0); *б* — данные рис. 5.7, *а* представлены в полулогарифмических координатах

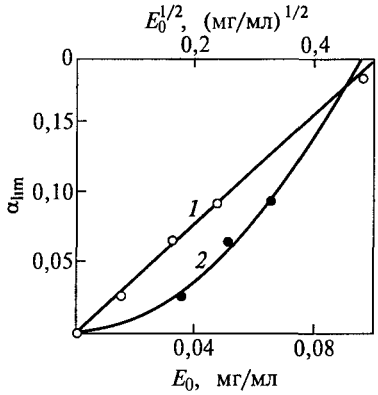


Рис. 5.8. Зависимость предельной степени конверсии кислорода в PGH-синтазной реакции (при $\alpha \ll 1$) от концентрации фермента E_0 (*1*) и $E_0^{1/2}$ (*2*)

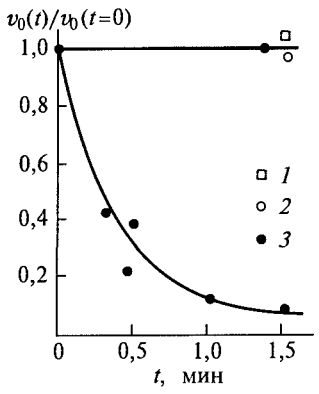


Рис. 5.9. Кинетика инактивации PGH-синтазы в условиях предварительной инкубации с 0,035 М раствором гемина (*1*), 0,001 М раствора адреналина (*2*), 0,0001 М раствором арахидоновой кислоты (*3*)

кислорода представляет собой экспоненциальную функцию времени; при этом константа $k_{эф,I}$, определенная как тангенс угла наклона прямой рис. 5.7, *б*, равна 1,6 ± 0,2 мин$^{-1}$ и не зависит от концентрации фермента. Предельная степень конверсии линейно увеличивается с ростом начальной концентрации фермента (рис. 5.8). Для сравнения на рис. 5.8 приведена также зависимость $\alpha_{lim} = f(E_0^{1/2})$.

Изучение инкубации фермента с различными компонентами системы позволит сделать выбор в пользу одного из трех механизмов: 1-го, 2-го или 3-го. Фермент, инактивирующийся по 1-му механизму, в отсутствие субстрата должен изменять свою активность экспоненциально, при этом $k_{эф,I}$ должна быть равна k_I. Для бисубстратных реакций инкубацию можно провести отдельно с каждым из субстратов. Это позволит идентифицировать 2-й и 3-й механизмы.

Апофермент в отсутствие гема инкубировали с одним из субстратов (кислородом, арахидоновой кислотой или донором электрона), после чего вводили остальные компоненты и измеряли начальную стационарную скорость поглощения кислорода. Данные по кинетике изменения активности фермента при инкубации с различными компонентами системы приведены на рис. 5.9. Фермент не инактивируется в отсутствие субстратов и кофакторов (это позволяет исключить из рассмотрения 1-й механизм), а также в присутствии кислорода и арахидоновой кислоты. Видно, что фермент инактивируется в системе, содержащей гемин и кислород. Константа скорости инактивации, найденная из данных по предварительной инкубации фермента (см. рис. 5.9), равна 1,5 ± 0,3 мин$^{-1}$ и

в первом приближении удовлетворительно согласуется со значением, найденным в независимой серии экспериментов по изучению кинетики поглощения кислорода при низких степенях конверсии субстрата (см. рис. 5.7, *б*).

Регуляторная роль инактивации фермента в процессе реакции. Очевидно, что инактивация (или активация) лимитирующего фермента может играть ключевую роль с точки зрения регуляции системы в целом. В некоторых случаях инактивационный процесс имеет ярко выраженный регуляторный характер.

Представляет интерес проанализировать, каково влияние процесса инактивации PGH-синтазы на динамику образования и расходования простагландинов. Рассмотрим кинетическую модель процесса

$$AA \xrightarrow{E_1} PGH_2 \xrightarrow{E_2} PGE_2 \xrightarrow{k} R$$

Здесь AA — арахидоновая кислота (исходный субстрат); PGH_2 — промежуточный простагландин H_2; PGE_2 — простагландин E_2 (продукт синтеза простагландинов); R — физиологически неактивный продукт конверсии PGE_2; E_1 — PGH-синтаза (лимитирующий фермент реакции); E_2 — PGH-конвертаза.

Предположим, что, участвуя в регуляторном процессе, простагландины расходуются, при этом скорость расходования пропорциональна их концентрации в системе. При условии, что скорость процесса строго лимитируется первым ферментом E_1 цепи, концентрация PGH_2 много меньше константы Михаэлиса изомеразной реакции (см. подразд. 4.5). Константа Михаэлиса для арахидоновой кислоты весьма мала, поэтому первый фермент цепи практически во всем диапазоне времени работает в режиме максимальной скорости. В этих условиях скорость изменения концентраций компонентов в системе описывается системой уравнений

$$\begin{cases} \dfrac{d[PGH_2]}{dt} = k_1 E_1(t) - \dfrac{V_{2m}}{K_{2M}}[PGH_2], \\ \dfrac{d[PGE_2]}{dt} = \dfrac{V_{2m}}{K_{2M}}[PGH_2] - k[PGE_2], \\ E_1(t) = E_0 \exp[-k_i(t)], \end{cases}$$

где k_1 — каталитическая константа первого фермента; V_{2m}, K_{2M} — соответственно максимальная скорость и константа Михаэлиса второго фермента; k — константа скорости первого порядка дальнейшего превращения PGE_2; k_i — константа скорости инактивации PGH-синтазы; E_0, E_1 — соответственно начальная и текущая концентрация первого фермента.

Динамику изменения концентраций простагландинов описывают уравнения

$$[PGH_2] = \frac{k_1 E_0}{k_t - V_{2m}/K_{2M}}\left[\exp\left(-\frac{V_{2m}}{K_{2M}}\right) - \exp(-k_t t)\right], \qquad (5.16)$$

$$[PGE_2] = \frac{V_{2m}}{K_{2M}}\frac{V_{2m}}{k_t - V_{2m}/K_{2M}}\left\{\frac{\exp(-k_t t)}{k_t - k} - \frac{\exp(-V_{2m}t/K_{2M})}{V_{2m}/K_{2M} - k} + \right.$$
$$\left. + \left[\frac{1}{V_{2m}/K_{2M} - k} - \frac{1}{k_t - k}\right]\exp(-kt)\right\}. \qquad (5.17)$$

Из этих уравнений следует, что процесс инактивации первого фермента цепи приводит к импульсному характеру действия системы. Концентрации простагландинов PGH_2 и PGE_2 возрастают после инициации реакции, проходят через максимум и уменьшаются до нулевого уровня. Эффекты импульсного характера изменения концентраций простагландинов наблюдаются экспериментально. На рис. 5.10 приведены экспериментальные данные, описывающие динамику изменения концентрации PGE_2 в культуре костной ткани после стрессового механического воздействия. Наблюдаемая кинетическая кривая хорошо описывается уравнением (5.17) (линия *1*); приведены также результаты расчета по уравнению (5.16) изменения в системе концентрации PGH_2 (линия *2*) с использованием параметров, найденных при математическом моделировании кривой образования PGE_2. Таким образом, использование кинетического подхода позволяет предсказывать динамику образования и расходования экспериментально трудно определяемого промежуточного соединения на основе исследования кинетики образования продукта реакции.

На рис. 5.11 показано влияние процесса инактивации первого фермента на динамику образования и расходование PGE_2. Приведена теоретическая кривая для процессов в отсутствие инактивации ($k_t = 0$) и серия кривых с последовательно увеличивающимися кон-

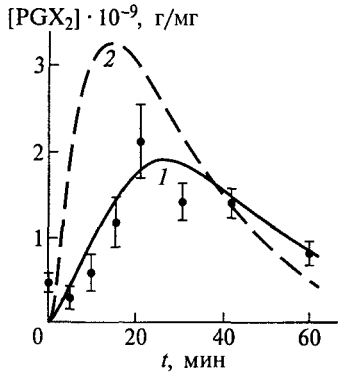


Рис. 5.10. Изменение во времени концентрации PGE_2 (*1*) и PGH_2 (*2*) в костной ткани после стрессового механического воздействия (точки — экспериментальные данные; линии *1*, *2* — результаты расчета по (5.17) и (5.16) соответственно при $V_{1m} = 6{,}65 \cdot 10^{-10}$ г/(мг · мин), $V_{2m}/K_{2M} = 0{,}059$ мин$^{-1}$, $k = 0{,}076$ мин$^{-1}$, $k_t = 0{,}091$ мин$^{-1}$)

стантами скорости инактивации фермента. Видно, что отсутствие инактивации приводит к исключительно высокой концентрации сильнодействующего физиологически активного соединения, при этом в рамках предпосылок используемой модели его концентрация достигает стационарного значения и не меняется во времени. Очевидно, что это может вызвать весьма глубокие неблагоприятные физиологические эффекты. Можно предположить, что для регуляции этих эффектов система обеспечила себя защитным механизмом, связанным с инактивацией первого фермента синтеза простагландинов.

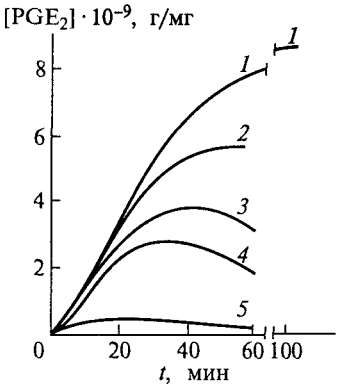


Рис. 5.11. Результаты расчета по (5.17) изменения во времени концентрации PGE_2 при k_t = 0 (*1*), 0,01 (*2*), 0,03 (*3*), 0,04 (*4*), 0,05 (*5*) (параметры для расчета те же, что на рис. 5.10)

В открытой системе, когда происходит ввод дополнительного количества фермента, например за счет биосинтеза, инактивация фермента в процессе реакции является механизмом стабилизации концентрации продукта реакции на постоянном уровне.

5.3. Инактивация ферментных систем

Ферменты в полиферментных системах в общем случае обладают различной устойчивостью к инактивирующим факторам. Часто экспериментатор имеет дело со сложными ферментными системами, изменяющими свои характеристики при хранении и инкубации. При этом необходимо знать: в каком временно́м интервале можно не опасаться заметных изменений каталитических характеристик системы, какая стадия исследуемой реакции является лимитирующей, какой участок полиферментной цепи инактивируется с наибольшей скоростью. Для того чтобы ответить на эти вопросы, необходимо исследовать кинетику инактивации системы.

Рассмотрим биферментную систему. Стационарную скорость биферментной реакции в условиях, когда первый фермент не является лимитирующим, можно представить в виде (см. подразд. 4.5):

$$v_0 = S_0 \left[\frac{K_{1M}}{V_{1m}} + \frac{K_{2M}}{V_{2m}} \right]^{-1},$$

где K_{1M}, K_{2M}, V_{1m}, V_{2m} — соответственно константы Михаэлиса и максимальные скорости на первой и второй стадии. Предполо-

жим, что скорости инактивации ферментов описываются экспоненциальной зависимостью с константами скоростей инактивации k_1 и k_2 соответственно. В этом случае максимальные скорости на каждой стадии являются функциями времени

$$V_{1m} = k_{\text{кат}\,1} E_{10} \exp(-k_1 t) = A_1 \exp(-k_1 t),$$
$$V_{2m} = k_{\text{кат}\,2} E_{20} \exp(-k_2 t) = A_2 \exp(-k_2 t).$$

Измеряемая каталитическая активность системы с течением времени будет изменяться, и с учетом этих уравнений скорость реакции будет равна

$$v = \frac{S_0 A_1 A_2 \exp[-(k_1 + k_2)t]}{K_{1M} A_2 \exp(-k_2 t) + K_{2M} A_1 \exp(-k_1 t)}. \qquad (5.18)$$

Относительное изменение скорости v/v_0 рассчитывается по уравнению

$$\frac{v}{v_0} = \frac{\left(1 + \dfrac{A_1/K_{1M}}{A_2/K_{2M}}\right)\exp(-k_1 t)}{1 + \dfrac{A_1/K_{1M}}{A_2/K_{2M}} \exp[-(k_1 + k_2)t]}. \qquad (5.19)$$

Видно, что зависимость, которую можно изучить экспериментально, определяется отношением, характеризующим активности ферментов в полиферментной цепи:

$$\alpha = \frac{A_1/K_{1M}}{A_2/K_{2M}} = \frac{V_{1m}/K_{1M}}{V_{2m}/K_{2M}}, \qquad (5.20)$$

и разностью констант скоростей инактивации обоих ферментов.

Анализируя кинетику инактивации, можно получить информацию о значениях этих параметров и решить вопрос, какая стадия является лимитирующей и какой фермент цепи является наименее устойчивым с точки зрения инактивирующего воздействия.

Рассмотрим несколько частных случаев.

Случай 1. Фермент, в исходном состоянии определяющий скорость полиферментной реакции, является наименее устойчивым. Если первый фермент цепи лимитирует скорость процесса, т.е $V_{1m}/K_{1M} \ll V_{2m}/K_{2M}$ и $k_1 \gg k_2$, то уравнение (5.18) преобразуется к виду $v/v_0 = \exp(-k_1 t)$. Кинетика инактивации описывается экспоненциальной функцией, при этом характеристическое время инактивации определяется константой скорости инактивации этого лабильного фермента.

Ситуация аналогичная, если второй фермент является лимитирующим и инактивируется намного быстрее $V_{1m}/K_{1M} \gg V_{2m}/K_{2M}$ и $k_2 \gg k_1$. Общее изменение скорости в этом случае также будет описываться экспонентой, показатель которой включает константу

скорости инактивации фермента, лимитирующего процесс $v/v_0 = \exp(-k_2 t)$.

Случай 2. Фермент, определяющий скорость реакции, является стабильным, а второй фермент цепи сравнительно быстро инактивируется. Понятно, что до того момента, пока скорость действия нелимитирующего фермента существенно превышает скорость лимитирующего, инактивация первого не должна повлиять на общую скорость процесса. Однако при большой степени инактивации участником лимитирующей стадии может стать лабильный фермент, т е. может произойти смена лимитирующей стадии процесса.

Например, если скорость реакции определяется действием первого фермента цепи, т.е. $V_{1m}/K_{1M} \ll V_{2m}/K_{2M}$, а скорость инактивации выше у второго $k_2 \gg k_1$, изменение активности системы описывается уравнением

$$\frac{v}{v_0} = \frac{\frac{V_{2m}/K_{2M}}{V_{1m}/K_{1M}} \exp(-k_2 t)}{1 + \frac{V_{2m}/K_{2M}}{V_{1m}/K_{1M}} \exp(-k_2 t)}.$$

Кинетическая кривая инактивации отличается от графика простой экспоненциальной функции: на ней наблюдается период индукции (рис. 5.12). Среднее время инактивации составляет

$$\tau = \int_0^t \frac{v}{v_0} dt = k_2^{-1} \ln \frac{V_{2m}/K_{2M}}{V_{1m}/K_{1M}}.$$

Если время, в рамках которого исследуется стабильность системы, существенно меньше τ, характеристики системы можно считать практически неизменными и инактивационными процессами можно пренебречь.

Важную информацию дает форма кинетической кривой инактивации. Если инактивация протекает по простому экспоненциальному закону, можно утверждать, что наиболее лабильным является фермент, определяющий скорость полиферментной реакции. Если кинетическая кривая инактивации имеет S-образную форму и характеризуется периодом индукции (см. рис. 5 12), можно с уверенностью утверждать,

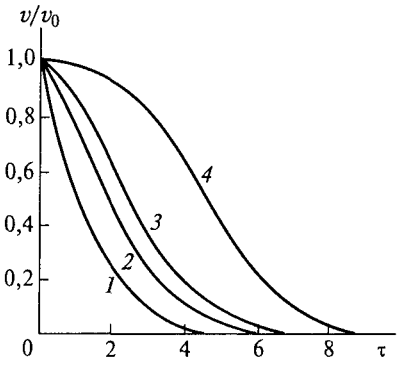


Рис 5 12 Кинетика инактивации ферментной системы, сопровождающейся сменой лимитирующей стадии, при α = 1 (*1*), 5 (*2*), 10 (*3*), 100 (*4*)

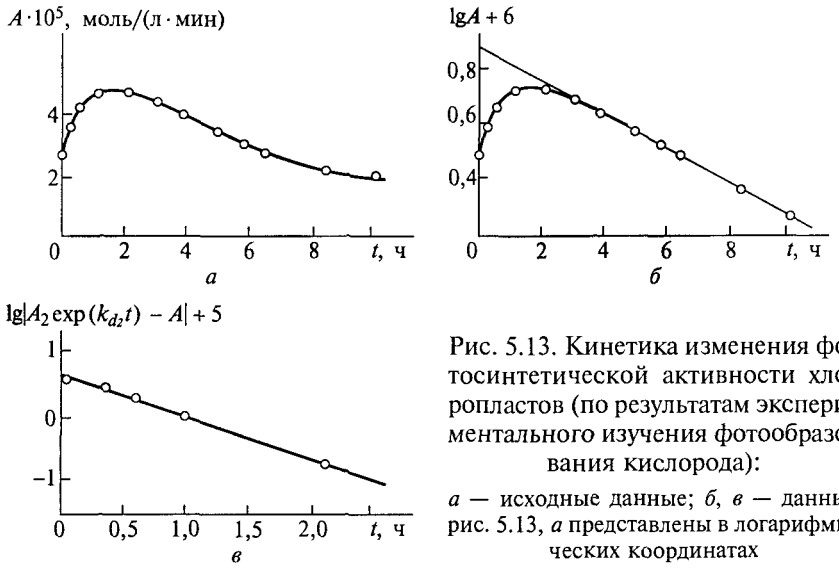


Рис. 5.13. Кинетика изменения фотосинтетической активности хлоропластов (по результатам экспериментального изучения фотообразования кислорода):

а — исходные данные; *б*, *в* — данные рис. 5.13, *а* представлены в логарифмических координатах

что наиболее лабильным является фермент, не определяющий скорость процесса в целом.

При решении ряда задач принципиальным является вопрос, какой именно фермент (или группа ферментов) полиферментной цепи является наиболее лабильным. Чтобы ответить на этот вопрос, исследуют специфические активности каждого фермента цепи и сравнивают константы инактивации.

Полиферментные цепи можно шунтировать — включить в ферментативный процесс определенный участок цепи. Этот метод можно использовать для изучения полиферментной системы и ее стабилизации путем шунтирования самого слабого звена цепи. Рассмотрим это более подробно на примере исследования системы фотоокисления воды в механизме фотосинтеза.

Инактивация электронно-транспортной цепи фотосинтеза протекает в две стадии и описывается суммой двух экспоненциальных членов (рис. 5.13): $A = A_1 \exp(-1/\tau_1) + A_2 \exp(-1/\tau_2)$, где A — измеряемая опытным путем активность цепи в реакции фоторазложения воды и фотовосстановления ферроцианида калия.

Простейшая кинетическая схема, описывающая эту зависимость, включает два состояния электронно-транспортной цепи, которые отличаются по стабильности и активности:

$$X_1 \xrightarrow{k_1} X_2$$
$$\downarrow k_{d1} \qquad \downarrow k_{d2}$$

Неактивные
электронно-транспортные цепи

Здесь X_1, X_2 — структурно и функционально отличающиеся состояния хлоропластов электронно-транспортной цепи, которые характеризуются парциальными активностями α_1, α_2 соответственно; k_1 — константа скорости трансформации состояния X_1 в X_2; k_{d1}, k_{d2} — константа скорости необратимой инактивации соответствующего состояния.

Анализ этой схемы приводит к следующей зависимости фотосинтетической активности хлоропластов от времени при начальных условиях $t = 0$, $X_1 = X_0$, $X_2 = 0$:

$$A = \left\{\alpha_1 X_0 - \frac{\alpha_2 k_1 X_0}{k_1 + k_{d1} - k_{d2}}\right\} \exp\left[-(k_1 + k_{d1})t\right] + \frac{\alpha_2 k_1 X_0}{k_1 + k_{d1} - k_{d2}} \exp(-k_{d2} t).$$

При сопоставлении этого уравнения с экспериментальными данными получено: $\tau_1 = 1{,}42$ ч, $\tau_2 = 3{,}3$ ч, что соответствует $k_1 + k_{d1} = 0{,}7$ ч$^{-1}$, $k_{d2} = 0{,}4$ ч$^{-1}$.

Как следует из данных, приведенных на рис. 5.13, *а*, в процессе старения хлоропластов до определенного момента происходит некоторое увеличение активности суспензии изолированных хлоропластов. Это говорит о том, что активность электронно-транспортной цепи хлоропластов в состоянии X_2 в реакции фотоокисления воды выше ее активности в состоянии X_1 ($\alpha_2 > \alpha_1$). Можно предположить, что, по крайней мере, два механизма приводят к увеличению активности хлоропластов. Первый механизм заключается в том, что в процессе старения увеличивается проницаемость фотосинтетических мембран хлоропластов для субстрата, т.е. в мембране образуется канал или серия каналов, открывающих доступ к фотохимическим реакционным центрам. В этом случае процесс, характеризуемый константой k_1, — это структурно-конформационное изменение во времени фотосинтетических мембран хлоропластов, приводящее к увеличению скорости диффузии субстрата к реакционным центрам. Второй механизм связан с инактивацией процесса образования на фотосинтетической мембране трансмембранного электрохимического потенциала ионов водорода и связанного с ним процесса фотофосфорилирования. Действительно, трансмембранный электрохимический потенциал, основной вклад в который в случае хлоропластов вносит трансмембранный градиент pH, в значительной мере определяет скорость электронно-транспортных процессов и фотофосфорилирования. Понижение градиента pH приводит к стимуляции электронного транспорта.

Таким образом, активация хлоропластов в процессе старения может быть обусловлена понижением трансмембранного градиента pH в результате инактивации.

Для того чтобы определить, какой из двух механизмов активации имеет место, был поставлен ряд экспериментов. Исследова-

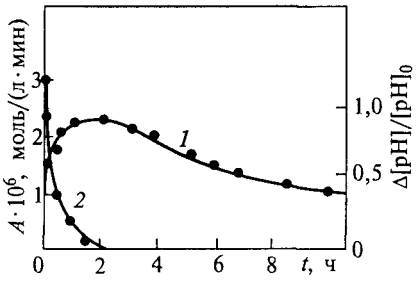


Рис. 5.14. Изменение во времени фотосинтетической активности (*1*) хлоропластов и относительного трансмембранного градиента pH (*2*)

ние влияния концентрации субстрата на активность хлоропластов и на кинетику их инактивации показало, что активность хлоропластов и изменение активности в процессе их инактивации не зависят от концентрации субстрата в диапазоне его концентрации 0,2—0,7 ммоль/л. Это позволяет сделать вывод, что процесс активации не связан с диффузионными эффектами. С целью проверки второго механизма активации было проведено сравнение кинетики потери активности хлоропластами в процессе старения с кинетикой уменьшения трансмембранного градиента pH на фотосинтетической мембране (рис. 5.14). Кинетика изменения трансмембранного градиента pH в процессе инактивации хлоропластов действительно коррелирует с процессом, характеризуемым τ_1: $\tau_{\Delta[pH]} = 0{,}50 \pm \pm 0{,}17$ ч, $\tau_1 = 0{,}72 \pm 0{,}08$ ч при температуре 30 °С.

Таким образом, можно сделать вывод, что активация хлоропластов в процессе старения связана с потерей фотосинтетической мембраной хлоропластов способности к образованию градиента pH и, следовательно, с потерей фосфорилирующей активности. Поскольку $\tau_{\Delta[pH]}$ и $\tau_1 = 1/(k_1 + k_{d1})$ имеют близкие (в пределах ошибки эксперимента) значения, можно сделать вывод, что константа k_1 существенно превышает константу k_{d1}, в силу чего необратимая инактивация хлоропластов проходит через состояние X_2 электронно-транспортной цепи и связана в первую очередь с процессом, характеризуемым константой k_{d2}. Этот процесс и приводит к полной потере хлоропластами их активности по отношению к реакциям электронного транспорта.

Серией независимых экспериментов было показано, что в процессе необратимой инактивации хлоропластов происходит в первую очередь инактивация марганецсодержащей системы разложения воды.

Исследование кинетики и механизма инактивации электронно-транспортной цепи хлоропластов в процессе старения показало, что переход исходного состояния X_1 электронно-транспортной цепи в промежуточное X_2 связан с инактивацией способности фотосинтетической мембраны к образованию трансмембранного градиента pH, а процесс необратимой инактивации состояния X_2 — с инактивацией системы разложения воды. Позитивной особенностью рассмотренной кинетической модели является возможность выделить в сложном процессе инактивации электрон-

но-транспортной цепи хлоропластов отдельные стадии и исследовать влияние различных факторов непосредственно на индивидуальные стадии.

* * *

Сколь бы сложной ни казалась проблема на первый взгляд, она, если правильно к ней подойти, окажется еще более сложной.

П. Андерсон

Белки вне клетки и вне организма (а зачастую и в организме) — короткоживущие молекулы. Инактивация ферментов, обусловленная нарушением структуры активного центра под действием теплового движения, экстремальных значений pH, концентрированных растворов солей, радиации, — общее свойство всех биокатализаторов и биокаталитических систем. Как правило, кинетические закономерности, описывающие инактивационные процессы, довольно просты. В большинстве случаев инактивация протекает по мономолекулярному механизму и динамику потери каталитической активности описывает экспоненциальная функция. Усложнение кинетики реакций может быть связано с участием промежуточных форм белка, остаточной каталитической активностью или наличием четвертичной структуры белка, разрушение которой является промежуточной стадией инактивации. Иногда инактивация протекает настолько быстро, что ее проявление наблюдается непосредственно в процессе измерения каталитической активности. В некоторых случаях сам субстрат является фактором, который инициирует инактивацию фермента. При инактивации фермента в процессе реакции одновременно протекают два кинетически соизмеримых процесса — ферментативное превращение субстрата и потеря ферментом каталитической активности. Эти динамические процессы отражаются на кинетике реакции, могут быть идентифицированы и интерпретированы на основе экспериментальных данных.

Кинетическая нестабильность ферментов приводит к кинетической нестабильности ферментных систем. Если неустойчивым элементом системы является фермент, лимитирующий скорость реакции в полиферментной системе, инактивация этого фермента является главным фактором потери активности системы в целом. Инактивация нелимитирующего фермента вначале оказывает влияния на кинетику процесса. На кинетических кривых можно наблюдать период индукции, сменяемый быстрой потерей каталитической функции системой в целом.

Для химика, исследующего стабильность ферментов и ферментных систем, изучение закономерностей инактивации дает бога-

тую информацию о свойствах и характере поведения белковых молекул в тех или иных условиях. Анализируя кинетику инактивации, можно получить сведения о конформационном состоянии белка, характеристиках его четвертичной структуры, данные о константах ионизации функциональных групп, контролирующих стабильность белковой молекулы. С практической точки зрения изучение инактивации обеспечивает рациональный путь к решению задачи стабилизации фермента. Это чрезвычайно важно при практическом использовании ферментативного катализа (см. гл. 14).

В целостных биологических системах также можно наблюдать большие скорости инактивации ферментов. В некоторых системах ферменты обмениваются за несколько десятков минут или часов. Необходимое стационарное состояние обеспечивается мощными процессами ресинтеза белков, регулируемыми процессами экспрессии генов. Это обеспечивает высокую динамическую стабильность биосистем на молекулярном уровне.

Глава 6

БИОЭЛЕКТРОКАТАЛИЗ. ЭЛЕКТРОННЫЙ ТРАНСПОРТ В БЕЛКОВЫХ СИСТЕМАХ

Самое прекрасное и глубокое переживание, выпадающее на долю человека, — это ощущение таинственности. Оно лежит в основе всех наиболее глубоких тенденций в искусстве и науке. Тот, кто не испытывал этого ощущения, кажется мне слепым.

А. Эйнштейн

6.1. Ферменты как катализаторы электрохимических реакций

При исследовании поведения ферментов на границе раздела фаз электронный проводник — ионный проводник (электрод — раствор электролита) было обнаружено неожиданное явление. Было показано, что может иметь место прямой перенос электронов из матрицы проводника на активный центр фермента (или в обратном направлении). Оказалось, что некоторые окислительно-восстановительные ферменты способны значительно увеличивать скорость электрохимических реакций после адсорбции (или хемосорбции) их на поверхности проводника. Это явление, названное биоэлектрокатализом, основано на свойстве ферментов ускорять электрохимические реакции при возникновении «электрического контакта» между проводником и активным центром фермента. «Электрический контакт» этого рода предполагает организацию быстрого и эффективного транспорта электронов между проводником и активным центром.

Явление биоэлектрокатализа позволило использовать экспериментальные и теоретические методы современной электрохимии при исследовании ферментативных реакций.

Рассмотрим особенности кинетики ферментативных реакций в электрохимических режимах.

Каталитические возможности ферментов в электрохимических реакциях. Как известно, зависимость начальной скорости реакции от концентрации субстрата в стационарном по концентрации фермент-субстратного комплекса режиме для большинства изученных ферментативных процессов описывается уравнением $v_0 = k_{кат} E_0 S_0/(K_M + S_0)$. Это уравнение отражает участие в механизме ферментативных превращений лабильных промежуточных соединений фермента с субстратом.

Рассмотрим систему, в которой фермент равномерно распределен по поверхности электрода. Обозначим поверхностную концентрацию фермента E_s (моль/см^2). Примем, что лимитирующей стадией процесса является ферментативная реакция

$$S + E \underset{}{\overset{K_M}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_{кат}} E(ne) \overset{Быстро}{\rightleftharpoons} E + ne$$
$$\downarrow$$
$$P$$

где ES — фермент-субстратный комплекс; E(ne) — фермент, получивший (или передавший) электроны.

С учетом существования на границе раздела фаз твердое тело — движущаяся жидкость диффузионного слоя толщиной δ (см. гл. 12) решение уравнения диффузии в стационарном режиме приводит к следующей зависимости удельного тока:

$$i = -\frac{nFk_{кат}E_s}{1 + \left\{\frac{S_\delta/K_M - (1+\theta)}{2} + \sqrt{\left\{\left[\frac{S_\delta/K_M - (1+\theta)}{2}\right]^2 + S_\delta/K_M\right\}}\right\}^{-1}}, \quad (6.1)$$

где F — число Фарадея; n — число переносимых электронов на молекулу субстрата; S_δ — концентрация субстрата в объеме; θ — безразмерный параметр; D — коэффициент диффузии субстрата.

Параметр θ рассчитывают по уравнению $\theta = k_{кат}E_s\delta/(K_M D)$. Параметр θ и отношение S_δ/K_M регулируют, в какой области — кинетической ($\theta \ll 1$) или диффузионной ($\theta \gg 1$, $S_\delta/K_M \approx 1$) — функционирует система.

На основании уравнения (6.1) можно сделать некоторые оценки. Каталитический ток, который должен наблюдаться при $\theta \ll 1$, определяется поверхностной концентрацией и эффективностью каталитического действия фермента. При монослойном заполнении поверхности электрода белком средних размеров поверхностная концентрация его составляет приблизительно 1 10^{-11} моль/см^2 Если константа скорости лимитирующей стадии ферментативного превращения близка к 10^3 с$^{-1}$, каталитический ток будет равен 10^{-4} А на 1 см^2 гладкой поверхности. Если условно принять проницаемость диффузионного слоя $P = D/\delta = 10^{-3}$ см/с для ферментов, имеющих кинетические параметры в промежуточной области $10^3 < k_{кат}/K_M < 10^6$ л/(моль · с), в зависимости от условий реакция может протекать как в диффузионном, так и в кинетическом режиме. Обычно иммобилизация ферментов на различных носителях позволяет получить образцы с содержанием белка 10 — 100 мг на 1 г носителя, что соответствует при «средней» молярной массе белка $3 \cdot 10^4$ г/моль содержанию активных центров ~$3 \cdot 10^{-7}$ — $3 \cdot 10^{-6}$ моль/г При создании из такого образца электрода, работающего в кинетическом режиме со «средней» константой скорости

10^2 $с^{-1}$, плотность тока должна иметь значение 3—30 А/г. К близким значениям приводят оценки на основе данных о поверхности доступных электропроводящих носителей. При использовании носителя с удельной поверхностью 10—50 мг/г и при среднем каталитическом токе 10^{-4} $А/см^2$ можно ожидать при работе электрода в кинетическом режиме плотности тока 10—50 А/г.

Приведенные оценки иллюстрируют высокие каталитические возможности ферментов в электрохимических системах.

Ферментативное электрохимическое восстановление кислорода. В классической электрохимии электровосстановление кислорода — одна из наиболее сложных проблем. Известно, что равновесный потенциал окисления—восстановления пары O_2/H_2O, равный 1,23 В, устанавливается лишь на специально обработанной платине и в особо чистых растворах. Токи обмена кислорода на платине весьма малы и составляют 10^{-11} $А/см^2$. В то же время известны ферменты, которые активно восстанавливают кислород по четырехэлектронному механизму до воды без промежуточного образования в растворе пероксида водорода (см. гл. 8).

Лакказа является медьсодержащим ферментом, осуществляющим четырехэлектронное восстановление кислорода при использовании в качестве донора различных ароматических аминов и фенолов. В активный центр фермента входят четыре катиона меди, осуществляющие координированное восстановление кислорода. Лакказа является типичным ферментом в плане каталитической эффективности и имеет $k_{кат} = 200$ $с^{-1}$ и $K_M = 10^{-5}$ моль/л.

Известно, что электровосстановление кислорода в нейтральных или слабокислых растворах на угольных материалах протекает со значительным перенапряжением. При введении в систему лакказы в незначительных количествах (10^{-9} моль/л) было замечено существенное смещение стационарного потенциала в область положительных значений и ускорение электровосстановления кислорода (рис. 6.1). Наблюдаемые эффекты не зависят от природы электрода. Электрохимические измерения проводили на электродах из сажи, пирографита, стеклоуглерода или золота. Иммобилизацию лакказы осуществляли адсорбционным способом непосредственно на электрод. В присутствии кислорода и лакказы наблюдалось увеличение потенциала для всех исследуемых электродов. Максимальное значение потенциала +1,207 В, близкое к равновесному потенциалу кислородного электрода, устанавливалось на электродах из углерода, которые предварительно были выдержаны в 10^{-5} моль/л растворе лакказы в течение суток. Адсорбция фермента на электродах из сажи практически необратима. После иммобилизации электрод сохраняет каталитические свойства в отсутствие лакказы в растворе. Ферментативная природа электрокатализа была доказана специфическим ингибированием электрокатализа фторид- и азид-ионами (см. рис. 6.1), инактивацией фер-

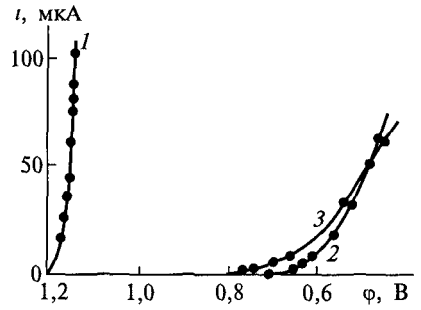


Рис. 6.1. Поляризационные кривые, полученные в атмосфере кислорода на электроде из углерода с иммобилизованной лакказой (*1*), в отсутствие фермента (*2*) и с иммобилизованным ферментом в присутствии 1 мкмоля NaN_3 (*3*)

ментов нагреванием, сопоставлением зависимости электрокаталитических эффектов и каталитической активности от показателя pH в реакции окисления феррицианид-иона кислородом.

Детальное изучение механизма катализа лакказы теоретическими и экспериментальными методами современной электрохимии показало, что лакказа катализирует процесс электрохимического восстановления кислорода по механизму прямого обмена электронов между электродом и активным центром фермента. Экспериментально была изучена зависимость силы тока от потенциала в потенциостатическом режиме при различных концентрациях ионов водорода и парциальных давлениях кислорода и обнаружены следующие закономерности.

1. Скорости и токи электрохимического восстановления кислорода в определенном диапазоне концентраций фермента и потенциалов зависят от концентрации фермента, вводимого в раствор при иммобилизации. При малых степенях заполнения поверхности эта зависимость имеет линейный характер. В этих условиях фермент практически необратимо адсорбируется на поверхности электрода из сажи и поверхностная концентрация фермента линейно связана с концентрацией вводимого в раствор фермента. Линейная связь между скоростью реакции и поверхностной концентрацией фермента наблюдается в диапазоне напряжения 0,6—1,2 В, определенного по водородному электроду в том же растворе. В этой области лимитирующей является ферментативная реакция. При более отрицательных значениях потенциала происходит смена лимитирующей стадии, линейная зависимость силы тока от концентрации адсорбированного фермента не выполняется. Можно полагать, что реакция переходит в смешанную область и протекает в диффузионно-контролируемом режиме. В дальнейшем будем рассматривать область потенциалов, отвечающую линейной зависимости скорости реакции от концентрации фермента.

2. Зависимости силы тока от потенциала (рис. 6.2) для электродов из сажи с иммобилизованной лакказой, полученные в одной серии экспериментов, имеют экспоненциальный характер. Данные рис. 6.2, *а* в полулогарифмических координатах приведены на рис. 6.2, *б*. Эти данные показывают, что реакция электрохимиче-

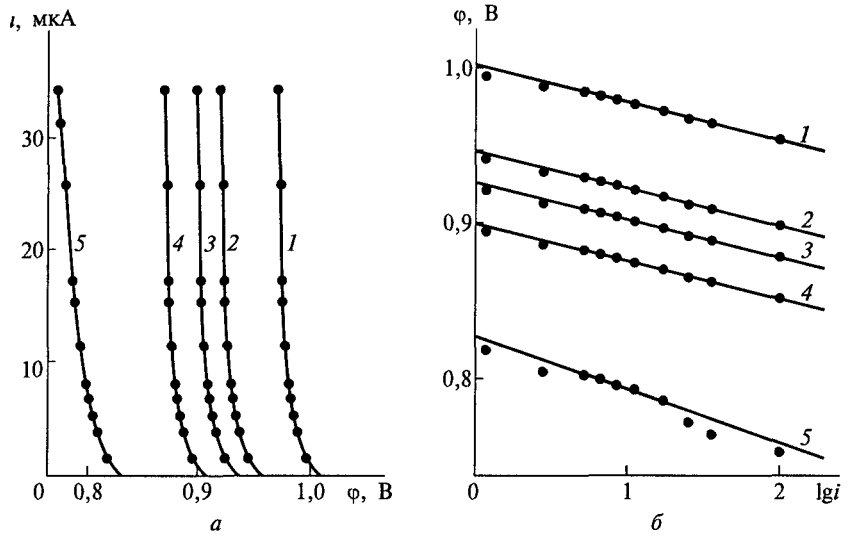


Рис. 6.2. Поляризационные кривые, полученные на электроде из углерода с иммобилизованной лакказой:

а — зависимость силы тока от потенциала при pH 3,08 (*1*), 4,0 (*2*), 4,5 (*3*), 5,0 (*4*), 6,05 (*5*); *б* — данные рис. 6.2, *а* представлены в полулогарифмических координатах

ского восстановления кислорода с помощью лакказы имеет характер обычного электрохимического процесса, который ускоряется с ростом потенциала.

3. Наблюдается зависимость стационарной скорости реакции (стационарного тока) от pH (рис. 6.2, 6.3). Диапазон исследованных значений pH определяется возможностью установления в условиях эксперимента состояния, характеризуемого стационарным потенциалом. Из рис. 6.2, *б* видно, что $\partial\varphi/\partial \lg i$ практически не зависит от pH. Значение $\partial\varphi/\partial \lg i$, найденное при статистической обработке экспериментальных результатов, составляет 26 ± 3 мВ (приведенные здесь и далее ошибки являются среднеквадратичными отклонениями от средних значений).

Потенциал при фиксированном значении i линейно зависит от показателя pH: $\partial\varphi/\partial(\text{pH}) = 60 \pm 7$ мВ.

Результаты, приведенные на рис. 6.2, *б*; 6.3, указывают на наличие зависимости скорости реакции от pH, и их можно представить в виде обычного кинетического уравнения.

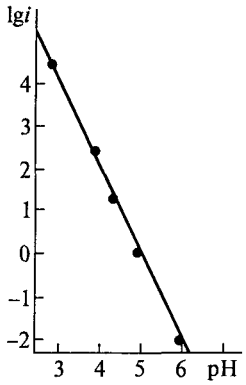


Рис. 6.3. Зависимость силы тока от показателя pH при φ = 0,9 В (по данным рис 6.2, *а*)

Зависимость скорости реакции от pH в логарифмических координатах приведена на рис. 6.3. Видно, что реакция в условиях эксперимента имеет второй порядок по концентрации ионов водорода (тангенс угла наклона графика зависимости $\lg i = f(\text{pH})$ равен 2).

4. При постоянной силе тока изучена зависимость стационарного потенциала от парциального давления p кислорода. Результаты экспериментов приводят к значению $\partial\varphi/\partial\lg p = 25 \pm 3$ мВ. Таким образом, кинетические результаты можно представить в виде уравнений

$$\partial\varphi/\partial\lg i = \partial\varphi/\partial\lg p \approx 0{,}5\partial\varphi/\partial\lg(\text{pH})$$

или

$$i \approx E[O_2][H^+]^2\exp(\varphi/a), \qquad (6.2)$$

где $a = 26 \pm 3$ мВ.

Механизм электрохимического восстановления кислорода под действием лакказы. Изучение механизма реакции включает в себя поиск схемы процесса, кинетическое описание которой приводит к кинетическому уравнению (6.2). При этом методологически правильным представляется выбор простейших схем, удовлетворяющих экспериментальным данным, и их последовательное усложнение в случае несоответствия получаемых выводов экспериментальным данным.

При анализе механизма каталитического действия лакказы в процессе восстановления кислорода были использованы следующие основные положения.

1. Активный центр фермента образует комплекс или химическое соединение с молекулой кислорода. На это указывает тот факт, что в растворе не обнаружены полувосстановленные формы кислорода (свободные радикалы, перекись водорода).

2. Реакции присоединения протона протекают в равновесном режиме и могут быть охарактеризованы константами равновесия. Это предположение основано на многочисленных данных исследования кинетики реакций переноса протона. Реакции присоединения протона к C-, O-, N-кислотам и основаниям протекают в диффузионно-контролируемом режиме.

3. Реакции переноса электронов с электрода на активный центр фермента — это обычные электрохимические процессы, скорость которых определяется строением двойного электрического слоя и потенциалом электрода.

При поляризации электрода при потенциалах, отличных от равновесного, преобладает катодный или анодный процесс. Зависимость силы тока от потенциала для катодного процесса описывается уравнением

$$i_к \approx k_\varphi = k_0 \exp\left(-\frac{\beta nF}{RT}\varphi\right), \qquad (6.3)$$

где k_φ — константа скорости электродного процесса переноса электронов; φ — потенциал, отсчитываемый от потенциала стандартного электрода (например, водородного); β — параметр, принимаемый обычно равным 0,5.

Если электродный процесс $A + ne \xrightarrow{k_\varphi} A^{n-}$ протекает быстро, обратимо и может быть описан уравнением Нернста, то

$$\varphi = \varphi_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[A]}{[A^{n-}]}. \tag{6.4}$$

Константа равновесия K_φ окисленной и восстановленной форм рассчитывается по уравнению

$$\frac{[A^{n-}]}{[A]} = K_\varphi = K_0 \exp\left(-\frac{nF}{RT}\varphi\right). \tag{6.5}$$

Для обсуждения механизмов целесообразно провести их классификацию. Рассмотрим классификацию ферментативных реакций, учитывающую последовательность стадий процесса. Важно то обстоятельство, что в стационарном состоянии в уравнение скорости реакции входят лишь параметры лимитирующих стадий и стадий, предшествующих лимитирующей. Быстрые (нелимитирующие) стадии процесса, следующие за наиболее медленной, не оказывают влияния на скорость реакции.

Экспериментально найденное уравнение скорости реакции электрохимического восстановления кислорода с помощью лакказы (уравнение (6.2)) показывает, что скорость процесса имеет второй порядок по концентрации ионов водорода. Это указывает на то, что лимитирующей стадии предшествуют две стадии присоединения протона. Простейшая схема, которая согласуется с этими фактами, включает стадии присоединения кислорода, двух протонов и кинетическую стадию восстановления активного центра:

$$\begin{aligned} E + O_2 &\overset{K_S}{\rightleftharpoons} EO_2 \\ EO_2 + H^+ &\overset{K_1}{\rightleftharpoons} EO_2H^+ \\ EO_2H^+ + H^+ &\overset{K_2}{\rightleftharpoons} EO_2H_2^{2+} \\ EO_2H_2^{2+} + e &\xrightarrow{k_{1\varphi}} EO_2H_2^+ \end{aligned} \tag{6.6}$$

Согласно выбранной нами классификации схема (6.6) обозначается O_2*ppe* (кислород — протон — протон — электрон). Перечислим константы, определяющие кинетику реакции: K_S — константа диссоциации фермент-кислородного комплекса; K_1, K_2 — константы протолитических равновесий; k_φ — константа скорости

электродного процесса (уравнение (6.3)); K_φ — константа равновесия электродного процесса (уравнение (6.5)).

Для схемы (6.6) уравнение для начальной скорости имеет вид

$$v_0 = \frac{\dfrac{k_{1\varphi}\dfrac{[H^+]}{K_1}\dfrac{[H^+]}{K_2}}{1+\dfrac{[H^+]}{K_1}\left(1+\dfrac{[H^+]}{K_2}\right)}[O_2]E_0}{[O_2]+\dfrac{K_S}{1+\dfrac{[H^+]}{K_1}\left(1+\dfrac{[H^+]}{K_2}\right)}}.$$

Соответственно

$$k_{кат}(O_2) = k_{O_2} = \frac{k_{1\varphi}\dfrac{[H^+]}{K_1}\dfrac{[H^+]}{K_2}}{1+\dfrac{[H^+]}{K_1}\left(1+\dfrac{[H^+]}{K_2}\right)},$$

$$K_M(O_2) = K_{O_2} = \frac{K_S}{1+\dfrac{[H^+]}{K_1}\left(1+\dfrac{[H^+]}{K_2}\right)}.$$

Из экспериментальных данных следует, что реакция имеет первый порядок по кислороду. Это означает, что $[O_2] \ll K_{O_2}$, и, следовательно, скорость реакции описывается уравнением

$$v_0 = \frac{k_{O_2}}{K_{O_2}} E_0[O_2] = \frac{k_{1\varphi}}{K_1 K_2 K_S}[H^+]^2 E_0[O_2].$$

С учетом уравнения (6.3) получим

$$i \sim E_0[O_2][H^+]^2 \exp\left(-\frac{\beta nF}{RT}\varphi\right). \qquad (6.7)$$

Уравнение (6.7) описывает экспериментально наблюдаемую зависимость скорости реакции от концентрации фермента, кислорода, ионов водорода. Логарифмирование уравнения (6.7) позволяет вычислить параметры реакции:

$$\frac{\partial\varphi}{\partial \lg i} = \frac{2,3\beta nF}{RT}, \quad \frac{\partial\varphi}{\partial(pH)} = 2\frac{2,3\beta nF}{RT}, \quad \frac{\partial\varphi}{\partial \lg[O_2]} = \frac{2,3\beta nF}{RT}.$$

При этом выполняется важное соотношение (6.2), поскольку реакция имеет второй порядок по ионам водорода.

Варьирование последовательности стадий до лимитирующей стадии приводит формально к разным механизмам, которые, однако, не могут быть идентифицированы на основании экспери-

ментальных данных. Тем не менее схема (6.6) весьма маловероятна, поскольку из нее следует, что элементарная стадия электрохимического восстановления активного центра фермента является четырехэлектронной. При $\beta < 1$ из уравнения (6.7) при сопоставлении с экспериментальными данными ($\partial\varphi/\partial\lg i \approx 26 \pm 3$ мВ) следует, что $n > 2$. Перенос трех или четырех электронов в одном элементарном акте — в высшей степени маловероятный процесс, и в электрохимии неизвестны реакции, которые протекают таким образом. Это заставляет внести некоторые усложнения в обсуждаемый механизм реакции. Можно полагать, что кинетической стадии переноса электрона предшествуют быстрые равновесные стадии, так что на лимитирующей стадии число переносимых электронов существенно меньше единицы. Это предположение приводит к группе механизмов, согласующихся с экспериментальными данными.

Рассмотрим кинетическую схему $O_2 pp e_{eq}^{n_1} e^{n_2}$, в рамках которой активный центр последовательно присоединяет в равновесном режиме кислород, затем — два протона, далее быстро и равновесно n_1 электронов и на медленной, лимитирующей стадии — n_2 электронов.

Для этой схемы скорость реакции описывается уравнением

$$i \sim \frac{k_0 \exp\left(-\frac{\beta n_2 F}{RT}\varphi\right) K_0 \exp\left(-\frac{n_1 F}{RT}\varphi\right)}{K_S K_1 K_2} [H^+]^2 E_0 [O_2], \qquad (6.8)$$

где k_0, K_0 — предэкспоненциальные множители (см. уравнения (6.3), (6.5)); K_1, K_2 — константы равновесия процессов переноса протона.

Принципиально важную информацию дает анализ значения $\partial\varphi/\partial\lg i$, поскольку позволяет определить число электронов, переносимых на каждой из стадий.

Из уравнения (6.8) следует

$$\lg i \sim \lg[O_2] + \lg E_0 - 2[pH] - \frac{F}{2{,}3RT}(n_1 + \beta n_2)\varphi \qquad (6.9)$$

или

$$\frac{\partial\varphi}{\partial\lg i} = \frac{\partial\varphi}{\partial\lg[O_2]} = \frac{2\partial\varphi}{\partial[pH]} = \frac{2{,}3RT}{F(n_1 + \beta n_2)}. \qquad (6.10)$$

Из сопоставления (6.10) с экспериментальными данными получаем

$$n_1 + \beta n_2 = 2, \quad n_2 + 2n_1 = 4. \qquad (6.11)$$

Поскольку n_1, n_2 — целые положительные числа, уравнение (6.11) дает неравенства $n_1 < 2$, $n_2 < 4$, при этом единственным положительным решением уравнения (6.11) является $n_1 = 1$, $n_2 = 2$.

В соответствии с этим механизм $O_2e_{eq}ppe^2$ будет иметь вид

$$\begin{aligned}
E + O_2 &\overset{K_S}{\rightleftharpoons} EO_2 \\
EO_2 + e &\overset{K_1}{\rightleftharpoons} EO_2^- \\
EO_2^- + H^+ &\overset{K_1}{\rightleftharpoons} EO_2H \qquad (6.12) \\
EO_2H + H^+ &\overset{K_2}{\rightleftharpoons} EO_2H_2^+ \\
EO_2H_2^+ + 2e &\xrightarrow{k_\varphi} EO^- + H_2O
\end{aligned}$$

Далее следуют быстрые нелимитирующие стадии. Необычным является двухэлектронный перенос электронов с электрода на активный центр фермента на лимитирующей стадии процесса. Обычно электрохимические реакции имеют одноэлектронный характер. Однако наличие двухэлектронной стадии в механизме действия лакказы согласуется со структурными исследованиями, согласно которым активный центр фермента содержит двухэлектронный акцептор, образуемый двумя ионами меди.

Таким образом, электрохимические измерения по-новому освещают механизм действия медьсодержащей оксидазы.

Полученные экспериментальные кинетические данные и их интерпретация легли в основу молекулярной модели действия ферментов этого типа (см. гл. 8).

6.2. Кинетика электронно-транспортных процессов

Фундаментальная особенность биологических систем — осуществление окислительно-восстановительных реакций с участием ферментов и белковых переносчиков электрона. Организация клеточных структур обеспечивает направленный перенос электронов от одних компонентов к другим, создавая своеобразные микротоки. Комплекс проблем, связанных с изучением реакций переноса электронов в биологических системах, по своей природе близок к проблемам электрохимии. Особенность биоэлектрохимических эффектов определяется белковым характером молекул, осуществляющих транспорт электронов, а также мембранным характером структур, в которых протекают эти процессы.

Наиболее полно изучена в настоящее время электронно-транспортная цепь аэробного дыхания. Комплекс белков-ферментов и переносчиков электронов, локализованный в митохондриях, осуществляет реакцию окисления кислородом восстановленных органических субстратов, прежде всего восстановленной формой никотинамидаденинуклеотида (НАДН). Этот процесс сопровожда-

ется фосфорилированием АДФ и обеспечивает образование АТФ в клетках. Схема переноса электронов в дыхательной цепи митохондрий имеет вид:

$$\text{НАДН} \rightarrow \text{ФП} \rightarrow \text{УХ} \rightarrow \text{Цитохром } b \rightarrow \text{Цитохром } c_1 \rightarrow$$
$$\rightarrow \text{Цитохром } c \rightarrow \text{Цитохром } a \rightarrow \text{Цитохром } a_3 \rightarrow O_2$$

Здесь ФП — флавопротеин; УХ — убихинон.

Донором электронов в электронно-транспортной цепи является НАДН, акцептором — кислород. В процессе аэробного дыхания поток электронов от НАДН через электронно-транспортную цепь переносится на кислород. Процесс окисления протекает с участием около десятка белковых переносчиков электрона.

Процессы фотосинтеза и дыхания складываются из последовательности элементарных одноэлектронных стадий переноса электрона. Участниками этих стадий являются белки, способные обратимо и быстро акцептировать и донировать электроны. Белковые переносчики электронов имеют различную природу. Как правило, они содержат активные простетические группы, на которых локализуются электроны в процессе окислительно-восстановительных реакций. Наиболее многочисленную и хорошо изученную группу белковых переносчиков электронов составляют цитохромы — белки, содержащие в качестве простетической группы гемин. Свойства простетической группы существенно зависят от белковой матрицы, в которой находится эта группа. Различные цитохромы имеют разные спектры поглощения. В процессе окисления — восстановления простетическая группа цитохромов претерпевает существенные изменения, что отражается в спектрах поглощения в видимой области. Это обеспечивает надежный способ определения состояния этих соединений в процессе электронного транспорта.

Большой класс переносчиков электронов составляют железосодержащие белки, включающие сульфгидрильные группы. В этих соединениях простетическая группа представляет собой комплекс ионов железа с серой и сульфгидрильными группами, организованными в специальную структуру — так называемый железо-серный кластер. Некоторые переносчики электронов способны акцептировать и отдавать два электрона. Такого рода переносчиками являются флавопротеины — белки, содержащие в качестве простетической группы флавинадениндинуклеотид (ФАД). Наиболее подвижный переносчик — убихинон (коэнзим Q) — также представляет собой двухэлектронный переносчик. Многие белки, участвующие в электронно-транспортных цепях, содержат в активных центрах ионы переменной валентности (Cu^{2+}, Mn^{2+} и др.), претерпевающие в процессе электронного транспорта обратимые реакции окисления — восстановления.

Фактически структурная организация электронно-транспортных цепей обеспечивает направленный поток электронов с созданием необходимых микроградиентов поля и градиентов электрохимического потенциала. Электроны, участвующие в электронно-транспортных процессах, не обобщены, как это имеет место в металлах. По существу, процессы переноса электронов при температуре примерно 20 °С представляют собой обычные химические реакции. Эти реакции ускоряются с ростом температуры в соответствии с уравнением Аррениуса и характеризуются положительными значениями энергии активации. При существенном понижении температуры в такого рода системах скорость реакции перестает зависеть от температуры и определяется в основном туннельным эффектом переноса электронов.

Таким образом, в реальных условиях функционирования электронно-транспортных цепей в биологических системах перенос электронов связан с преодолением электронами энергетического барьера. Частота переноса электронов между белковыми переносчиками отвечает диапазону $10^2 - 10^7$ $с^{-1}$. Поэтому в высшей степени интересным представляется анализ кинетики такого рода систем.

Модели электронно-транспортных процессов. При анализе кинетики сложных явлений весьма важно правильно выбрать модель процесса. Модель, с одной стороны, должна отражать основные свойства системы; с другой стороны, должна быть максимально простой и допускать аналитическое рассмотрение. Анализ процессов переноса электронов в биологических системах показывает, что кинетика реакций может быть описана, по крайней мере, двумя моделями, отличающимися по физическому смыслу.

Можно представить себе, что процесс электронного транспорта происходит в системе с гомогенным распределением переносчиков. В элементарном объеме системы находится полный набор переносчиков электронов, взаимодействие между которыми приводит к окислению исходного субстрата и восстановлению конечного акцептора через промежуточное окисление — восстановление переносчиков электронов. Эта модель предполагает высокую подвижность молекул переносчиков. Перенос электронов идет по пути, заданному термодинамикой и кинетикой взаимодействия между переносчиками электрона. Электрон переходит от переносчика с более отрицательным электрохимическим потенциалом к переносчику с более положительным. Кинетика процесса такова, что из всех возможных акцепторов электронов с данным переносчиком взаимодействует лишь тот, скорость реакции с которым существенно превышает скорость реакции с остальными компонентами системы. В такого рода системах реальный физический смысл имеет концентрация того или иного переносчика. Скорости взаимодействия между переносчиками определяются концентрация-

ми компонентов, и в простейшем случае стадии переноса электронов имеют бимолекулярный характер. Эта модель имеет, по-видимому, ограниченный характер и применима только к системам с высокой подвижностью переносчиков электронов, причем необходимое условие — отсутствие специфических комплексов между белковыми переносчиками.

Другая модель исходит из предположения, что переносчики образуют специфические структуры — комплексы, в которых строго задана последовательность стадий переноса электронов. Электронный транспорт осуществляется путем переноса электронов вдоль цепи связанных переносчиков путем электронного обмена между ними. Кинетическое описание реакций в такого рода системах принципиально отличается от первого случая, поскольку в кинетических уравнениях невозможно использование концентраций окисленной или восстановленной формы того или иного переносчика. В этом случае скорость элементарного акта переноса электрона не зависит от объемной концентрации восстановленного или окисленного переносчика, а определяется скоростью внутрикомплексного переноса электрона.

Описание кинетических закономерностей процессов в цепях переноса электронов потребовало развития новых формальных подходов. Поэтому рассмотрим вторую модель более подробно.

Перенос электронов в цепях структурносвязанных переносчиков. Биохимический и структурный анализ электронно-транспортной митохондриальной дыхательной цепи показывает, что переносчики электронов в цепи действуют не изолированно, а объединены в специфические комплексы строгого состава и определенной структуры. Внутренняя митохондриальная мембрана содержит ансамбли переносчиков (оксисомы), действующие независимо друг от друга. Поэтому кинетическая модель, основанная на бимолекулярном взаимодействии гомогенно распределенных переносчиков, по своему физическому смыслу не отражает реальной ситуации, в которой происходит транспорт электронов. Очевидно, что адекватная кинетическая модель должна учитывать комплексный характер организации переносчиков в мембране.

Электронный транспорт в нестационарном режиме. Рассмотрим простейшую электронно-транспортную цепь, состоящую из двух переносчиков, связанных между собой в комплекс X_1X_2. В ходе реакции электрон может быть локализован на активном центре любого из переносчиков цепи. Таким образом, в реакции участвуют четыре разные частицы, соответствующие различным состояниям электронно-транспортной цепи: $X_1^0X_2^0$, $X_1^0X_2^1$, $X_1^1X_2^0$, $X_1^1X_2^1$. Эти частицы, отличающиеся друг от друга локализацией электрона, могут иметь различные свойства.

Схему переноса электрона в системе с участием двух структурносвязанных переносчиков можно представить в виде

$$D + X_1^0X_2^0 \xrightarrow{k_1} X_1^1X_2^0 + P_1 \qquad (6.13)$$

$$D + X_1^0X_2^1 \xrightarrow{k_2} X_1^1X_2^1 + P_1 \qquad (6.14)$$

$$X_1^1X_2^0 \xrightarrow{k_3} X_1^0X_2^1 \qquad (6.15)$$

$$A + X_1^0X_2^1 \xrightarrow{k_4} X_1^0X_2^0 + P_2 \qquad (6.16)$$

$$A + X_1^1X_2^1 \xrightarrow{k_5} X_1^1X_2^0 + P_2 \qquad (6.17)$$

где D и A — соответственно донор и акцептор электронов электронно-транспортной цепи; P_1, P_2 — продукты превращения донора и акцептора соответственно. Для простоты предполагается, что все стадии практически необратимы.

Стадии (6.13) и (6.14) представляют собой стадии донирования электронов в электронно-транспортную цепь. Очевидно, что в общем случае скорость переноса электрона будет зависеть от того, содержит электронно-транспортная цепь восстановленный переносчик X_2 или нет ($k_1 \neq k_2$). Стадия (6.15) представляет собой стадию переноса электронов в электронно-транспортной цепи. Поскольку переносчики X_1 и X_2 объединены в комплекс, этот процесс представляет собой внутрикомплексный перенос электрона и характеризуется частотой переноса k_3 — константой скорости первого порядка. Это существенная особенность модели переноса электронов в цепи структурносвязанных переносчиков, которая отличает ее от модели с гомогенным распределением переносчиков. Перенос электронов на акцептор происходит на стадиях (6.16) и (6.17). Как и при донировании электронов, реакционная способность частиц $X_1^0X_2^1$ и $X_1^1X_2^1$ в этой реакции может быть различной (константа k_4 в общем случае не равна k_5).

Таким образом, в механизме переноса электронов участвуют четыре различные частицы. Кинетику процесса при условиях $[D]_0 \gg [X]_0$, $[A]_0 \gg [X]_0$ описывает система уравнений

$$\begin{aligned}
[X]_0 &= [X_1^0X_2^0] + [X_1^1X_2^0] + [X_1^0X_2^1] + [X_1^1X_2^1], \\
d[X_1^1X_2^1]/dt &= k_2[D]_0[X_1^0X_2^1] - k_5[A]_0[X_1^1X_2^1], \\
d[X_1^0X_2^1]/dt &= k_3[X_1^1X_2^0] - \{k_2[D]_0 + k_4[A]_0\}[X_1^0X_2^1], \\
d[X_1^1X_2^0]/dt &= k_1[D]_0[X_1^0X_2^0] - k_3[X_1^1X_2^0] + k_5[A]_0[X_1^1X_2^1],
\end{aligned} \qquad (6.18)$$

где $[X]_0$ — общая концентрация переносчиков.

Система уравнений (6.18) представляет собой систему линейных дифференциальных уравнений с постоянными коэффициентами. При исключении одной переменной с использованием уравнения материального баланса система (6.18) преобразуется к виду

$$
\begin{aligned}
d[X_1^0X_2^0]/dt &= -\{k_1[D]_0[X_1^0X_2^0] + k_4[A]_0\}[X_1^0X_2^1],\\
d[X_1^1X_2^0]/dt &= \{k_1[D]_0 - k_5[A]_0\}[X_1^0X_2^0] -\\
&- \{k_5[A]_0 + k_3\}[X_1^1X_2^0] - k_5[A]_0[X_1^0X_2^1] - k_5[A]_0[X]_0,\\
d[X_1^0X_2^1]/dt &= k_3[X_1^1X_2^0] - \{k_2[D]_0 + k_4[A]_0\}[X_1^0X_2^1].
\end{aligned}
\tag{6.19}
$$

Характеристическое уравнение системы является уравнением третьего порядка:

$$
\begin{vmatrix}
-k_1[D]_0 - \lambda & 0 & k_4[A]_0\\
k_1[D]_0 - k_5[A]_0 & -(k_5[A]_0 + k_3) - \lambda & -k_5[A]_0\\
0 & k_3 & -(k_2[D]_0 + k_4[A]_0) - \lambda
\end{vmatrix} = 0 \tag{6.20}
$$

или

$$
\begin{vmatrix}
-(k_1[D]_0 + k_3) - \lambda & -k_1[D]_0 & -(k_1[D]_0 - k_4[A]_0)\\
k_3 & -(k_2[D]_0 + k_4[A]_0) - \lambda & 0\\
0 & k_2[D]_0 & -k_5[A]_0 - \lambda
\end{vmatrix} = 0 \tag{6.21}
$$

Кинетика процесса описывается суммой трех экспоненциальных членов, показатели экспонент — корни характеристического уравнения. Видно, что в общем случае показатели экспонент или наблюдаемые в опыте характеристические времена реакции в процессе электронного транспорта τ_1, τ_2 и τ_3 являются сложными функциями констант скоростей элементарных стадий и концентраций компонентов:

$$
\tau_1 = -\frac{1}{\lambda_1}, \quad \tau_2 = -\frac{1}{\lambda_2}, \quad \tau_3 = -\frac{1}{\lambda_3}. \tag{6.22}
$$

Для экспериментального изучения системы наиболее удобны два следующих частных случая, существенно упрощающих кинетику реакции.

1. Рассмотрим кинетику процесса в условиях, когда концентрация акцептора электронов в системе равна нулю. Реакция инициируется быстрым введением донора электронов, при этом происходит последовательное восстановление переносчиков электронно-транспортной цепи. В этих условиях ($[A]_0 = 0$) определитель (6.20) диагонализуется:

$$
\begin{vmatrix}
-k_1[D]_0 - \lambda & 0 & 0\\
k_1[D]_0 & -k_3 - \lambda & 0\\
0 & k_3 & -k_2[D]_0 - \lambda
\end{vmatrix} = 0 \tag{6.23}
$$

и решение этого уравнения дает три корня:

$$
\lambda_1 = -k_1[D]_0, \quad \lambda_2 = -k_3, \quad \lambda_3 = -k_2[D]_0. \tag{6.24}
$$

Таким образом, из кинетических данных при $[A]_0 = 0$ могут быть определены константы скорости донирования электронов в электронно-транспортную цепь k_1, k_2 и константы скорости электронного обмена между белковыми переносчиками. Если $k_1 = k_2$, кинетику процесса описывает сумма двух экспоненциальных членов.

2. Рассмотрим случай, когда в системе концентрация донора электронов равна нулю. Если переносчики электронно-транспортной цепи восстановлены (это может быть достигнуто введением небольшого количества восстановителя), то реакцию переноса электронов можно инициировать быстрым введением в систему акцептора электрона. В условиях, когда $[D]_0 = 0$, определитель уравнения (6.21) диагонализуется:

$$\begin{vmatrix} -k_3 - \lambda & 0 & k_4[A]_0 \\ k_3 & -k_4[A]_0 - \lambda & 0 \\ 0 & k_3 & -k_5[A]_0 - \lambda \end{vmatrix} = 0 \qquad (6.25)$$

и корни этого характеристического уравнения равны

$$\lambda_1 = -k_3, \quad \lambda_2 = -k_4[A]_0, \quad \lambda_3 = -k_5[A]_0. \qquad (6.26)$$

Соответственно из экспериментальных данных могут быть определены константы скорости k_3, k_4, k_5 как время полупревращения в реакции окисления отдельных переносчиков.

Таким образом, из экспериментальных данных по электронному транспорту в нестационарных режимах могут быть найдены константы скоростей всех элементарных стадий переноса электрона. Этот подход последовательно и плодотворно был применен для исследования процесса переноса электрона в митохондриальной дыхательной цепи.

Электронный транспорт в стационарном режиме. Экспериментально реакции переноса электрона в биологических системах удобно исследовать в стационарном режиме. Далее детально анализируется стационарная кинетика процесса в системе с участием двух переносчиков, структурно связанных между собой.

В стационарном состоянии производные в системе (6.18) равны нулю, и система дифференциальных уравнений преобразуется в систему алгебраических уравнений

$$\begin{gathered} [X]_0 = [X_1^1X_2^1] + [X_1^0X_2^1] + [X_1^1X_2^0] + [X_1^0X_2^0], \\ k_2[D]_0[X_1^0X_2^1] - k_5[A]_0[X_1^1X_2^1] = 0, \\ k_3[X_1^1X_2^0] - \{k_2[D]_0 + k_4[A]_0\}[X_1^0X_2^1] = 0, \\ k_1[D]_0[X_1^0X_2^0] - k_3[X_1^1X_2^0] + k_5[A]_0[X_1^1X_2^1] = 0. \end{gathered} \qquad (6.27)$$

Полученная система алгебраических уравнений является линейной и может быть решена аналитически известными способами. Определитель системы равен

$$\Delta = \begin{vmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 \\ -k_5[A]_0 & k_2[D]_0 & 0 & 0 \\ 0 & -\{k_2[D]_0 + k_4[A]_0\} & k_3 & 0 \\ k_5[A]_0 & 0 & -k_3 & k_1[D]_0 \end{vmatrix} =$$

$$= k_1[D]_0k_2[D]_0k_3 + k_1[D]_0k_5[A]_0k_3 +$$

$$+ k_1[D]_0k_5[A]_0\{k_2[D]_0 + k_4[A]_0\} + k_5[A]_0k_4[A]_0k_3. \qquad (6.28)$$

Концентрации цепей переноса электрона в различном состоянии описываются уравнениями

$$\begin{aligned} [X_1^1X_2^1]_{ст} &= \Delta_{X_1^1X_2^1}/\Delta, \\ [X_1^0X_2^1]_{ст} &= \Delta_{X_1^0X_2^1}/\Delta, \\ [X_1^1X_2^0]_{ст} &= \Delta_{X_1^1X_2^0}/\Delta, \\ [X_1^0X_2^0]_{ст} &= \Delta_{X_1^0X_2^0}/\Delta, \end{aligned} \qquad (6.29)$$

где

$$\begin{aligned} \Delta_{X_1^1X_2^1} &= k_1[D]_0k_2[D]_0k_3[X]_0, \\ \Delta_{X_1^0X_2^1} &= k_1[D]_0k_5[A]_0k_3[X]_0, \\ \Delta_{X_1^1X_2^0} &= k_1[D]_0k_5[A]_0\{k_2[D]_0 + k_4[A]_0\}[X]_0, \\ \Delta_{X_1^0X_2^0} &= k_3k_4[A]_0k_5[A]_0[X]_0. \end{aligned} \qquad (6.30)$$

Набор уравнений (6.28)—(6.30) для этой системы является фундаментальным, поскольку позволяет рассчитать наиболее важные характеристики системы, такие как степень восстановления различных переносчиков и стационарная скорость процесса.

Стационарная скорость переноса электронов равна

$$v_{ст} = \{k_5[X_1^1X_2^1]_{ст} + k_4[X_1^0X_2^1]_{ст}\}[A]_0. \qquad (6.31)$$

Из уравнений (6.28)—(6.30) следует, что стационарная скорость реакции как функция концентраций донора и акцептора электрона и констант скоростей элементарных стадий описывается уравнением

$$v_{ст} = \{k_4[A]_0 + k_2[D]_0\}[X]_0 \times$$

$$\times\left\{1 + \frac{k_2[D]_0}{k_5[A]_0} + \frac{k_2[D]_0}{k_3} + \frac{k_4[A]_0}{k_3} + \frac{k_4[A]_0}{k_1[D]_0}\right\}^{-1}. \qquad (6.32)$$

Проведем анализ полученного уравнения в предельных условиях.

1. Предположим, что реакция проводится при очень низких концентрациях донора ($[D]_0 \to 0$). В этих условиях скорость процесса равна $v_{ст} = k_1[D]_0[X]_0$. Скорость реакции в целом определя-

ется скоростью первой стадии, не зависит от концентрации акцептора и линейно зависит от концентрации донора электронов. Из этих данных может быть найдена константа k_1.

2. Реакция проводится при очень высокой концентрации донора ($[D]_0 \to \infty$). Уравнение (6.32) преобразуется к виду $v_{ст} = k_3 k_5 [A]_0 [X]_0 \times \times \{k_3 + k_5 [A]_0\}^{-1}$. В этих условиях скорость реакции не зависит от концентрации донора электронов. Зависимость скорости от концентрации акцептора имеет вид функции с насыщением. При насыщенных концентрациях акцептора скорость процесса определяется только константой скорости внутрикомплексного переноса электрона. Из экспериментальных данных, полученных в этих условиях, могут быть определены константы k_3 и k_5.

3. Реакция проводится при очень низких концентрациях акцептора ($[A]_0 \to 0$). Скорость реакции определяется скоростью переноса электрона к акцептору, не зависит от концентрации донора и линейно зависит от концентрации акцептора: $v_{ст} = k_5 [A]_0 [X]_0$. Из зависимости скорости реакции от концентрации $[A]_0$ может быть определена константа k_5.

4. Использование высоких концентраций акцептора ($[A]_0 \to \infty$) переводит систему в режим, при котором зависимость скорости от концентрации донора имеет вид $v_{ст} = k_1 k_3 [D]_0 [X]_0 / \{k_3 + k_1 [D]_0\}$. В этих условиях скорость процесса не зависит от концентрации акцептора. Из данных, полученных в этих условиях, могут быть найдены константы скорости k_1 и k_3.

Таким образом, при изучении кинетики электронного транспорта в условиях максимально низких или высоких концентраций донора или акцептора электронов могут быть определены константы k_1, k_3, k_5.

Важно подчеркнуть, что при высоких насыщающих концентрациях донора ($[D]_0 \to \infty$) и акцептора ($[A]_0 \to \infty$) скорость электронного транспорта определяет стадия переноса электрона между белковыми переносчиками: $v_{ст} = k_3 [X]_0$. В этих условиях скорость реакции не зависит ни от концентрации донора, ни от концентрации акцептора.

Представляет интерес, каким образом наличие электронов в электронно-транспортной цепи модифицирует кинетические свойства последней. В терминах констант скоростей этот вопрос формулируется следующим образом: как изменяется константа скорости акцептирования или донирования электронов в электронно-транспортной цепи в зависимости от того, окислен или восстановлен соседний (или соседние) переносчик. Степень влияния можно характеризовать отношением соответствующих констант скорости.

Возможны следующие случаи.

1. Восстановление переносчика X_2 электронно-транспортной цепи существенно ухудшает способности переносчика X_1 акцеп-

тировать электроны. В этом случае $k_2 \ll k_1$, фактор электронного влияния в цепи: $\alpha = k_2/k_1 \approx 0$. Восстановление последующего переносчика цепи блокирует вход электронов в цепь. Электронно-транспортная цепь работает в режиме, когда в системе локализуется всего лишь один электрон, последовательно переносимый от донора к акцептору. Уравнение скорости для этого случая имеет вид

$$v_{ст} = [X]_0 \left\{ \frac{1}{k_4[A]_0} + \frac{1}{k_3} + \frac{1}{k_1[D]_0} \right\}^{-1}. \qquad (6.33)$$

Зависимость $v_{ст}$ от $[D]_0$ линеаризуется в обратных координатах.

2. В случае если переносчики в электронно-транспортной цепи работают независимо друг от друга, т.е. свойства переносчика в цепи не зависят от того, окислен или восстановлен соседний переносчик, факторы электронного влияния равны единице: $\alpha = k_2/k_1 = 1$, $\alpha = k_5/k_4 = 1$. Уравнение скорости в этом случае имеет вид

$$v_{ст} = \{k_4[A]_0 + k_1[D]_0\}[X]_0 \times$$
$$\times \left\{ 1 + k_4[A]_0 \left(\frac{1}{k_3} + \frac{1}{k_1[D]_0} \right) + k_1[D]_0 \left(\frac{1}{k_3} + \frac{1}{k_4[A]_0} \right) \right\}^{-1}. \qquad (6.34)$$

Зависимость скорости от концентрации донора не линеаризуется в обратных координатах. Однако максимальная скорость, полученная экстраполяцией кривой к ординате, одинакова и в обоих случаях ($\alpha = 0$ и $\alpha = 1$) описывается выражением

$$V_m = k_3 k_4 [A]_0 [X]_0 / \{k_3 + k_4 [A]_0\}. \qquad (6.35)$$

Если кинетика реакции изучается по зависимости скорости процесса от концентрации донора при двух фиксированных концентрациях акцептора, из данных о максимальных скоростях можно найти параметры k_3 и k_4.

3. Может реализоваться случай, когда фактор электронного влияния существенно превышает единицу: $\alpha \gg 1$. Это означает, что восстановление переносчиков в цепи резко увеличивает скорость донирования электронов. При $\alpha \gg 1$ может наблюдаться весьма интересный эффект зависимости стационарной скорости процесса от квадрата концентрации донора. Действительно, из уравнения (6.35) следует, что если реализуются неравенства $k_3 \gg k_4[A]_0$, $k_3 \gg k_2[D]_0$ (скорость переноса электронов в цепи значительно превышает скорость донирования или акцептирования электронов из цепи), $k_5[A]_0 \gg k_2[D]_0$, $k_4[A]_0 \gg k_1[D]_0$, уравнение (6.34) приобретает вид

$$v_{ст} = k_1[D]_0[X]_0 + \{k_2 k_4 [X]_0 / (k_4 [A]_0)\}[D]_0^2. \qquad (6.36)$$

График зависимости скорости от концентрации донора имеет вид квадратичной параболы Если процесс проводится при низких концентрациях донора и высокой концентрации акцептора в условиях, когда дополнительно выполняется неравенство

$$k_4[A]_0 \gg k_2[D]_0, \tag{6.37}$$

уравнение скорости описывается квадратичной функцией от концентрации донора:

$$v_{ст} = [X]_0\{k_1k_2/(k_4[A]_0)\}[D]_0^2. \tag{6.38}$$

Важно подчеркнуть, что чисто квадратичная зависимость наблюдается только при выполнении неравенства (6.37). Если соотношение скоростей обратное: $k_2[D]_0 \gg k_4[A]_0$, зависимость скорости реакции от концентрации донора линейная. Соответствующие неравенства можно записать в виде

$$k_5[A]_0 \gg k_2[D]_0 \gg k_4[A]_0 \gg k_1[D]_0, \tag{6.39}$$

т.е. зависимость скорости от квадрата концентрации донора может наблюдаться только в условиях, когда $k_2 \gg k_1$, $k_5 \gg k_4$, факторы электронного влияния превышают единицу: $\alpha \gg 1$, $\beta \gg 1$.

Таким образом, второй порядок реакции по донору наблюдается, если скорость переноса электронов внутри цепи значительно превышает скорость акцептирования или донирования электронов. Необходимым условием являются высокая концентрация акцептора и высокая скорость акцептирования электронов из электронно-транспортной цепи. В этих условиях ($\alpha > 1$, $\beta > 1$) перенос одного электрона в цепи вызывает эффективную активацию цепи. Частица $X_1^1X_2^1$ разряжается несколько быстрее, чем частица $X_1^0X_2^1$, при этом акцептирование электронов частицей $X_1^0X_2^1$ также протекает быстрее. Увеличение концентрации донора в этих условиях в 10 раз увеличивает стационарную концентрацию реакционноспособных частиц $X_1^1X_2^1$ в 100 раз. Второй порядок реакции по донору означает, что с одной электронно-транспортной цепью на лимитирующей стадии эффективно взаимодействуют две молекулы донора. Акцептирование электрона приводит к его быстрому переносу на X_2. При этом облегчаются акцептирование второго электрона и передача электрона акцептору.

Аналогично квадратичную зависимость можно наблюдать и по акцептору электрона. Задолго до насыщения системы по донору и акцептору в условиях, когда справедливы неравенства

$$\begin{aligned} k_3 &\gg k_2[D]_0, \quad k_1[D]_0 \gg k_4[A]_0, \\ k_3 &\gg k_4[A]_0, \quad k_2[D]_0 \gg k_5[A]_0, \end{aligned} \tag{6.40}$$

скорость реакции зависит от квадрата концентрации акцептора

$$v_{ст} = k_5[A]_0[X]_0 + \{k_4k_5[X]_0/(k_2[D]_0)\}[A]_0^2. \tag{6.41}$$

Если справедливо неравенство $k_4[A]_0 \gg k_2[D]_0$ и неравенства (6.40) можно записать в общем виде:

$$k_1[D]_0 \gg k_4[A]_0 \gg k_2[D]_0 \gg k_5[A]_0, \qquad (6.42)$$

скорость реакции описывается уравнением

$$v_{ст} = \{[X]_0 k_4 k_5/(k_2[D]_0)\}[A]_0^2. \qquad (6.43)$$

Квадратичная зависимость по концентрации акцептора наиболее четко должна проявляться, когда факторы электронного влияния существенно меньше единицы: $k_1 \gg k_2$, $k_4 \gg k_5$.

Можно сделать и обратные выводы: если опыт показывает, что скорость реакции зависит от квадрата концентрации донора, то фактор электронного влияния больше или равен единице; если скорость реакции зависит от квадрата концентрации акцептора, фактор меньше или равен единице. Таким образом, по зависимости скорости реакции от концентрации донора или акцептора можно оценить степень влияния окисления — восстановления переносчика на свойства соседнего переносчика цепи. При этом для цепи, состоящей из двух переносчиков электрона, можно наблюдать зависимости скорости реакции от квадрата концентрации донора или акцептора. Последнее свойство электронно-транспортной цепи позволяет отличить процесс переноса электронов в цепи переносчиков с их гомогенным распределением от процесса переноса в цепи структурносвязанных переносчиков. Второй порядок реакции по донору или акцептору может наблюдаться в специфических условиях только для переноса электронов в цепи структурносвязанных переносчиков.

Окисление — восстановление переносчиков в биологических электронно-транспортных цепях вызывает, как правило, существенные изменения в спектрах поглощения переносчиков. Поэтому уровни стационарных концентраций переносчиков электронно-транспортных цепей могут быть определены экспериментально. Наиболее хорошо разработана техника изучения стационарных состояний цитохромов. При этом регистрируется общая суммарная концентрация той или иной формы переносчика в цепях различной степени восстановления:

$$[X_1^j]_\Sigma = [X_1^j X_2^0] + [X_1^j X_2^1] = (\Delta_{X_1^j X_2^0} + \Delta_{X_1^0 X_2^1})/\Delta,$$

$$[X_2^j]_\Sigma = [X_1^0 X_2^j] + [X_1^j X_2^j] = (\Delta_{X_1^0 X_2^j} + \Delta_{X_1^j X_2^j})/\Delta.$$

Используя уравнения (6.29), (6.30), можно рассчитать стационарные значения степени восстановления различных переносчиков электронно-транспортной цепи.

Степень восстановления переносчика (доля восстановленных молекул переносчика), рассчитывается следующим образом:

$$P_{X_2^!} = \left\{1 + \frac{k_5[A]_0}{k_2[D]_0}\right\} \times$$

$$\times \left\{1 + \frac{k_5[A]_0}{k_2[D]_0} + \frac{k_5[A]_0}{k_3} + \frac{k_5[A]_0 k_4[A]_0}{k_2[D]_0 k_3} + \frac{k_5[A]_0 k_4[A]_0}{k_1[D]_0 k_2[D]_0}\right\}^{-1},$$

$$P_{X_1^!} = \left\{1 + \frac{k_5[A]_0}{k_3} + \frac{k_5[A]_0 k_4[A]_0}{k_2[D]_0 k_3}\right\} \times$$

$$\times \left\{1 + \frac{k_5[A]_0}{k_2[D]_0} + \frac{k_5[A]_0}{k_3} + \frac{k_5[A]_0 k_4[A]_0}{k_2[D]_0 k_3} + \frac{k_5[A]_0 k_4[A]_0}{k_1[D]_0 k_2[D]_0}\right\}^{-1}.$$

Отношение степеней восстановления переносчиков в стационарном состоянии равно

$$P_{X_2^!}/P_{X_1^!} = \left(\Delta_{X_1^! X_2^0} - \Delta_{X_1^! X_2^0}\right)\Big/\left(\Delta_{X_1^0 X_2^!} + \Delta_{X_1^! X_2^!}\right) =$$

$$= \left\{1 + \frac{k_5[A]_0}{k_2[D]_0}\frac{k_2[D]_0 + k_4[A]_0}{k_3}\right\}\left\{1 + \frac{k_5[A]_0}{k_2[D]_0}\right\}^{-1}.$$

Из этого уравнения следует, что при условии $k_2[D]_0 > k_3$ (или $k_4[A]_0 > k_3$) имеем $P_{X_1^!} > P_{X_2^!}$.

Таким образом, в условиях когда скорость донирования электронов в цепь или акцептирования электронов из цепи превышает скорость электронного транспорта между переносчиками, по степени восстановления переносчики располагаются в соответствии с последовательностью их действия в электронно-транспортной цепи. Наиболее четко это фиксируется, когда электронно-транспортная цепь работает в насыщении по донору и акцептору с максимальной скоростью. При высоких концентрациях донора и акцептора электронно-транспортная цепь работает с максимальной скоростью, которая определяется скоростью переноса между белковыми переносчиками электрона. Для структурносвязанных переносчиков этот процесс представляет собой внутрикомплексный перенос электрона. В процессе работы электронно-транспортной цепи при достаточно высоких концентрациях донора или акцептора степени восстановления переносчиков соответствуют последовательности действия переносчиков в электронно-транспортной цепи. Это важное свойство электронно-транспортной цепи, которое позволяет определить последовательность стадий переноса электрона.

Таким образом, при определенных условиях можно наблюдать высокий порядок скорости электронного транспорта по концентрации субстратов и высокую суммарную степень восстановления переносчиков электрона. При этом максимальный порядок скорости реакции по концентрации донора или степени восстановления переносчика соответствует числу переносчиков электронов,

образующих электронно-транспортную цепь. Это очень важный вывод, который позволяет на основе экспериментальных данных оценить число переносчиков электронно-транспортной цепи и определить порядок элементарных стадий переноса электрона.

Для электронно-транспортной цепи, состоящей из n переносчиков электронов X_1, ..., X_i, ..., X_n, экстраполяция полученных результатов приводит к уравнению $v_{ст} = a[D]_0^n$, которое справедливо при активации цепи переносом электронов в условиях, когда скорость акцептирования электронов из цепи существенно превышает скорость донирования их в цепь. Степень восстановления переносчика X_i рассчитывается по уравнению: $P_{X_i^!} = a_i[D]_0^{n-i+1}$ и зависимость скорости реакции от суммарной степени восстановления этого переносчика описывается уравнением

$$v_{ст} = aP_{X_i^!}^{n/(n-i+1)} \Big/ a_i^{n/(n-i+1)}. \qquad (6.44)$$

Таким образом, при данном числе переносчиков электронно-транспортной цепи можно получить определенную последовательность показателей степеней зависимости скорости процесса от степени восстановления того или иного переносчика. В табл. 6.1 приведены теоретические последовательности показателей степеней для электронно-транспортных цепей с различным числом переносчиков.

Приведенные данные демонстрируют тот факт, что максимально возможный порядок по степени восстановления последнего переносчика цепи соответствует числу переносчиков, объединенных в цепь, а для последнего переносчика цепи должна наблюдаться линейная зависимость скорости процесса от степени его восстановления.

Таблица 6.1

Теоретические последовательности порядков реакции по степеням восстановления переносчиков электрона для электронно-транспортных цепей с различным числом переносчиков

Число переносчиков в цепи	Порядок реакции по степеням восстановления соответствующих переносчиков
2	2; 1
3	3; 1,5; 1
4	4; 2; 1,33; 1
8	8; 4; 2,67; 2; 1,6; 1,33; 1,14; 1
9	9; 4,5; 3; 2,25; 1,8; 1,5; 1,29; 1,25; 1
10	10; 5; 3,33; 2,5; 2,0; 1,67; 1,43; 1,25; 1,11; 1
11	11; 5,5; 3,66; 2,75; 2,2; 1,83; 1,57; 1,38; 1,22; 1

Электронный транспорт в митохондриальной дыхательной цепи в стационарном режиме. Представляет интерес сопоставить полученные кинетические уравнения с реальными процессами функционирования цепей переноса электрона в биологических системах. Один из результатов проведенного анализа заключается в том, что в электронно-транспортных цепях структурносвязанных переносчиков в определенных условиях можно наблюдать высокий порядок реакции по концентрациям донора или акцептора. Такого рода явления действительно имеют место. Был описан эффект существенного увеличения стационарной скорости процесса при незначительном увеличении степени восстановления переносчиков электронно-транспортной цепи митохондрий. На основе описанных выше представлений это наблюдение получает молекулярно-кинетическое толкование.

На рис. 6.4, *а* представлены экспериментальные данные по исследованию стационарной скорости реакции переноса электронов от НАДН к кислороду с участием электронно-транспортной цепи субмитохондриальных частиц. Экспериментальные данные представлены как зависимость стационарной скорости процесса от степени восстановления различных переносчиков цепи. Эти данные удовлетворительно описываются степенными функциями вида

$$v_{ст\,i} = aP_{X_i}^m \qquad (6.45)$$

(сравните с уравнением (6.44)).

На рис. 6.4, *б* приведены результаты линеаризации экспериментальных данных в логарифмических координатах. Тангенс угла

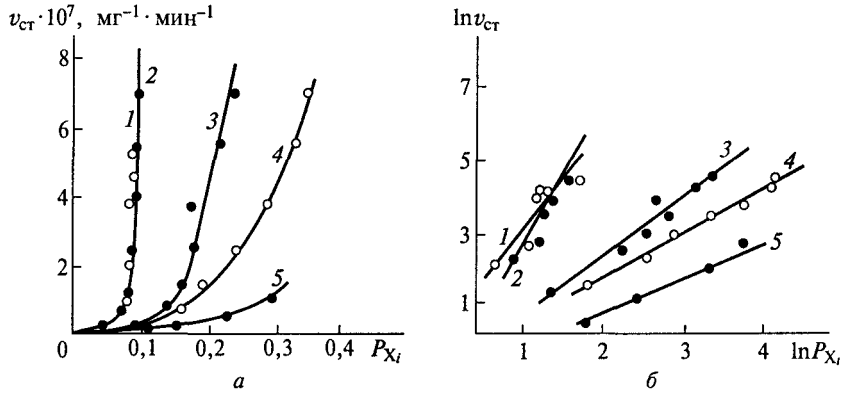


Рис. 6.4. Кинетика окисления НАДН кислородом в зависимости от степени восстановления переносчиков электронно-транспортной цепи митохондрий:

а — зависимость стационарной скорости окисления от степени восстановления цитохрома a_3 (*1*), *a* (*2*), *c* (*3*), c_1 (*4*), *b* (*5*); *б* — данные рис. 6 4, *а* представлены в логарифмических координатах

Таблица 6.2

Экспериментальные (m) и теоретические (n) значения порядка реакции для митохондриальной дыхательной цепи

Цитохром	m	$n = 11$	$n = 10$	$n = 9$
a_3	8,5 ± 2,0	11,0	10,0	9,0
a	5,5 ± 1,5	5,5	5,0	4,5
c	3,5 ± 0,7	3,66	3,3	3,0
c_1	2,6 ± 0,3	2,75	2,5	2,25
b	2,0 ± 0,3	2,2	2,0	1,8

наклона соответствует показателю степени m уравнения (6.45). Параметры m, полученные из данных рис. 6.4, *б* для различных переносчиков цепи, приведены в табл. 6.2. Видно, что показатели степенных зависимостей строго соответствуют последовательности стадий переноса электронов в электронно-транспортной цепи. Последовательность стадий была определена на основании данных по степени восстановления переносчиков в стационарном состоянии. В табл. 6.2 приведены также теоретические последовательности показателей степеней для цепей с числом переносчиков 9, 10, 11. Экспериментально наблюдаемая последовательность хорошо согласуется с теоретически предсказанной. Эти данные позволяют приближенно оценить общее число участников электронно-транспортной цепи, которое составляет 8—12. Таким образом, кинетическая модель удовлетворительно описывает стационарную кинетику электронного транспорта в митохондриях.

На основании изложенных выше результатов можно сделать следующие выводы о механизме действия электронно-транспортной цепи митохондрий.

1. Переносчики электронов в цепи объединены в структуры, функционирующие как индивидуальные цепи переноса электронов. Это следует из того факта, что в стационарных условиях удается наблюдать высокий порядок реакции по степени восстановления переносчиков. Число переносчиков в одной цепи около 8—12. Этот вывод согласуется с общими представлениями о функционировании электронно-транспортной цепи митохондрий.

2. Фактор электронного влияния в цепи существенно превышает единицу. Как следует из проведенного выше анализа, если частично восстановленная цепь акцептирует электроны быстрее, чем исходная, можно ожидать степенных зависимостей скорости реакции от степени восстановления переносчиков. Электронно-транспортная цепь как бы «активируется» восстановлением переносчиков цепи. Каков физический механизм этого эффекта? Каким образом образование пула электронов в электронно-транс-

портной цепи приводит к увеличению кинетических донорно-акцепторных свойств системы? Можно представить себе несколько механизмов этого явления. В общем случае активация связана, повидимому, с комплексом структурных изменений электронно-транспортной цепи при восстановлении переносчиков. Появление в системе некомпенсированных электронов вызывает сильную поляризацию среды. На этом основаны современные представления о механизме реакций переноса электрона в растворах. В полимерной белковой среде это может вызвать специфические термодинамически невыгодные конформационные изменения, приводящие к состояниям, которые обладают сравнительно большими временами релаксации в исходное состояние. В этой ситуации могут возникнуть условия, обеспечивающие перенос нескольких (или потока) электронов, прежде чем цепь релаксирует в исходное состояние за счет теплового движения. Можно думать, что активация электронно-транспортной цепи «заселением» ее электронами есть проявление особенностей процессов переноса электронов в полимерных средах.

* * *

Для того чтобы усовершенствовать ум, надо больше размышлять, чем заучивать.

Декарт

Не всякая сущность поддается своему выраженню в слове, есть сущности, о которых другому нельзя словами дать понятие, если он не имел лично в этой сущности опыта.

М. Пришвин

В этой главе ферменты рассмотрены как катализаторы электрохимических реакций. При адсорбции (иммобилизации) некоторых окислительно-восстановительных ферментов на границе раздела фаз электронный проводник (электрод)/ионный проводник (раствор электролита) можно наблюдать мощные эффекты ускорения (в 10^{10}—10^{15} раз) электрохимических реакций. Фермент катализирует реакции превращения субстратов, и необходимые для этой реакции электроны (или электронные вакансии) он черпает из матрицы электронного проводника. «Мертвая» (с точки зрения возможностей переноса электронов из молекулы водорода на проводник) поверхность углерода при адсорбции на ней молекулы фермента гидрогеназы начинает активно проводить электроны, осуществляя как реакции ионизации водорода, так и обратный процесс — получение молекулы водорода из протонов и электронов. Аналогично молекула кислорода под действием иммобилизованной синей медьсодержащей оксидазы (лакказы) восстанавливается до воды, используя электроны, которые поступают из мат-

рицы проводника на молекулу кислорода через активный центр фермента. При биоэлектрокатализе имеет место прямой электрический контакт между проводником и активным центром фермента. Какова физическая сущность этого контакта? Как он может быть реализован с учетом того, что белковая молекула диэлектрик, т. е. изолятор, а активный центр локализован внутри белковой глобулы? Ответ на этот вопрос прост. Сопряжение ферментативной и электродной стадий реакции осуществляется за счет туннельного транспорта электронов. Теоретические расчеты и экспериментальные данные показывают, что на расстоянии до 1—1,5 нм скорость туннельного переноса электронов превышает скорость ферментативной реакции и в этих условиях может наблюдаться ускорение электродной реакции ферментом.

Феномен биоэлектрокатализа иллюстрирует возможности химического подхода, который позволяет выйти за рамки свойств системы, определенных природой. Действительно, в природе нет электронных проводников с иммобилизованными на них ферментами. Химик создает искусственные системы и наблюдает в этих системах необычные реакции, которых нет в природе. Феномен биоэлектрокатализа обеспечил новые возможности в понимании механизмов ферментативных реакций. Использование формальных методов электрохимической кинетики позволило «подсчитать» число переносимых электронов на лимитирующей стадии процесса, что позволило построить экспериментально обоснованную модель действия фермента. Биоэлектрокатализ, позволивший соединить ферментативные и электрохимические процессы, стал основой различного рода инженерных решений, таких как электрохимические биосенсоры, электрохимические генераторы электричества и др.

В природных биологических системах широко представлен другой феномен, связанный с процессами переноса электронов, — транспорт электронов между белковыми переносчиками. Биоэнергетические механизмы (фотосинтез, аэробное дыхание) обеспечиваются белками-переносчиками электронов, образующими цепи переноса электронов. Это своего рода проводящие электроны частицы, но «работающие» на совершенно других принципах, чем классические электронные проводники типа металлов. Перенос электронов представляет собой химическую реакцию, протекающую с относительно небольшой скоростью, при этом электрон локализуется на вполне определенной частице как донора электрона, так и акцептора. Методы химической кинетики позволяют адекватно описать поведение такого рода электрических проводников, локализованных в биологических мембранах.

Глава 7

СКОРОСТИ ЭЛЕМЕНТАРНЫХ СТАДИЙ В ФЕРМЕНТАТИВНОМ КАТАЛИЗЕ

Всякая экономия в конечном итоге сводится к экономии времени.

К. Маркс

7.1. Равновесные и кинетические стадии ферментативных реакций

Ферментативные реакции представляют собой сложные цепи перестройки исходных субстратов в конечные продукты с участием большого числа относительно короткоживущих промежуточных соединений. Кинетический анализ механизма той или иной реакции приводит к схеме, составленной из элементарных стадий. Ясно, что некоторые стадии ферментативного механизма протекают быстро, некоторые — относительно медленно. Рассмотрим особенности лимитирующих и нелимитирующих стадий в ферментативном катализе.

Некоторые стадии ферментативных реакций протекают так быстро, что за несколько микросекунд устанавливается равновесие между компонентами процесса. Характеристические времена лимитирующих стадий составляют $\sim 10^{-3}$ с, поэтому быстрые обратимые стадии можно считать равновесными. В равновесном режиме, как правило, протекает комплексообразование активных центров с субстратами ферментативной реакции (см. ниже). Равновесный режим характерен также для реакций переноса протона. Реакции переноса протона с участием O-, S-, N-кислот и оснований протекают в диффузионно-контролируемом режиме с константой скорости $\sim 10^{10}$ л/(моль · с), поэтому при анализе стационарной кинетики эти стадии можно описать константой равновесия. В равновесном режиме могут протекать структурные конформационные изменения активного центра фермента.

Очевидно, что лимитирующей стадии могут предшествовать равновесные процессы; за лимитирующей стадией могут следовать быстрые релаксационные изменения. Важным является следующее положение: лимитирующая стадия реакции «чувствует» равновесные процессы, предшествующие ей, и не зависит от последующих равновесных стадий. Проиллюстрируем это свойство кинети-

ки последовательных каталитических реакций, анализируя три простейшие кинетические схемы, отличающиеся последовательностью кинетических и равновесных стадий.

Схема 1. Равновесная стадия предшествует лимитирующей. Рассмотрим схему

$$E + S \underset{}{\overset{K_S}{\rightleftharpoons}} X_1 \overset{K}{\rightleftharpoons} X_2 \xrightarrow{k} E + P$$

где K_S — константа диссоциации фермент-субстратного комплекса; K — константа равновесия некоего процесса изменения интермедиата X_1; k — константа скорости лимитирующей стадии. Уравнение для начальной скорости для этой схемы формально эквивалентно уравнению Михаэлиса

$$v_0 = \frac{\dfrac{k}{1+K} E_0 S_0}{\dfrac{K_S K}{1+K} + S_0}.$$

Определяемые из эксперимента константы $k_{кат}$ и K_M включают константу равновесия процесса трансформации X_1. Характер этого процесса (термодинамически выгодного или невыгодного) будет отражаться на экспериментально определяемой каталитической константе либо на константе Михаэлиса.

Случай 1. Трансформация X_1 в X_2 термодинамически выгодна. Тогда $K = X_1/X_2 \ll 1$, $X_2 \gg X_1$ и, значит, $k_{кат} = k$, $K_M = K_S/K$. Наличие термодинамически выгодного превращения X_1 в X_2 не влияет на каталитическую константу скорости, а приводит к «улучшению» эффективной константы Михаэлиса.

Случай 2. Трансформация X_1 в X_2 термодинамически невыгодна. Тогда $K = X_1/X_2 \gg 1$, $X_1 \gg X_2$ и, значит, $k_{кат} = k/K$, $K_M = K_S$. Наличие такой стадии не влияет на константу Михаэлиса, но приводит к уменьшению наблюдаемой каталитической константы скорости.

Схема 2. Равновесная стадия между двумя кинетическими. В этом случае экспериментально определяемые константы $k_{кат}$ и K_M включают константу равновесия этой стадии. Рассмотрим схему

$$E + S \overset{K_S}{\rightleftharpoons} X_1 \xrightarrow{k_1} X_2 \underset{k_{-eq}}{\overset{k_{eq}}{\rightleftharpoons}} X_3 \xrightarrow{k_2} E + P$$

где k_1, k_2 — константы скорости соизмеримых кинетических процессов; k_{eq}, k_{-eq} — константа скорости соответственно прямой и обратной реакции быстрой равновесной стадии.

Решение системы уравнений, описывающих кинетическую схему, дает уравнение типа Михаэлиса, где

$$k_{кат} = \frac{k_1}{1 + \dfrac{k_1}{k_2}(1+K)}, \quad K_M = \frac{K_S}{1 + \dfrac{k_1}{k_2}(1+K)}.$$

В зависимости от термодинамических параметров перехода $X_2 \rightleftarrows X_3$ этот процесс может оказывать (или не оказывать) влияние на кинетику реакции в стационарном режиме.

Случай 1. Образование X_3 термодинамически выгодно. Тогда $K = X_2/X_3 \ll 1$, $X_3 \gg X_2$ и, значит, $k_{кат} = k_1/(1 + k_1/k_2)$, $K_M = K_S/(1 + k_1/k_2)$.

Таким образом, равновесие $X_2 \rightleftarrows X_3$ не оказывает влияния на кинетические параметры реакции.

Случай 2. Образование X_3 термодинамически невыгодно. Тогда $K = X_2/X_3 \gg 1$, $X_2 \gg X_3$ и, значит, $k_{кат} = k_1/(1 + k_1K/k_2)$, $K_M = K_S/(1 + k_1K/k_2)$.

В этих условиях равновесие «ухудшает» каталитическую константу и «улучшает» эффективную константу Михаэлиса.

Схема 3. Равновесная стадия следует за лимитирующей. Рассмотрим схему

$$E + S \overset{K_S}{\rightleftarrows} X_1 \xrightarrow{k} X_2 \underset{k_{-eq}}{\overset{k_{eq}}{\rightleftarrows}} E + P$$

где K_S — константа диссоциации фермент-субстратного комплекса; k — лимитирующая константа скорости; k_{eq}, k_{-eq} — константа скорости соответственно прямой и обратной реакции быстрой равновесной стадии.

Если K_S и K соизмеримы, при небольшой степени превращения ($P \ll S$, $X_1 \ll X_2$) уравнение для скорости имеет вид

$$v_0 = \frac{kE_0S_0}{K_S + S_0},$$

т.е. последующий быстрый равновесный процесс не влияет на кинетику реакции. Этот же вывод качественно следует из теории переходного состояния. Строение активированного комплекса, которое определяет его энергию, зависит от предыстории образования комплекса и не зависит от строения частиц, возникающих после перехода через самый высокий энергетический барьер.

Если из экспериментальных данных найдены константы скорости прямых и обратных реакций, определены константы равновесия быстрых обратимых стадий, то можно вычислить свободные энергии образования промежуточных соединений и рассчитать свободные энергии активации на отдельных стадиях реакции. При этом необходимо использовать уравнения связи константы равновесия с изменением свободной энергии процесса и уравнение связи константы скорости реакции со свободной энергией активации реакции

$$\Delta G = -RT\ln K, \tag{7.1}$$

$$k = \frac{k_BT}{h}\exp\left[-\frac{\Delta G}{RT}\right]. \tag{7.2}$$

Последнее уравнение получено из теории переходного состояния.

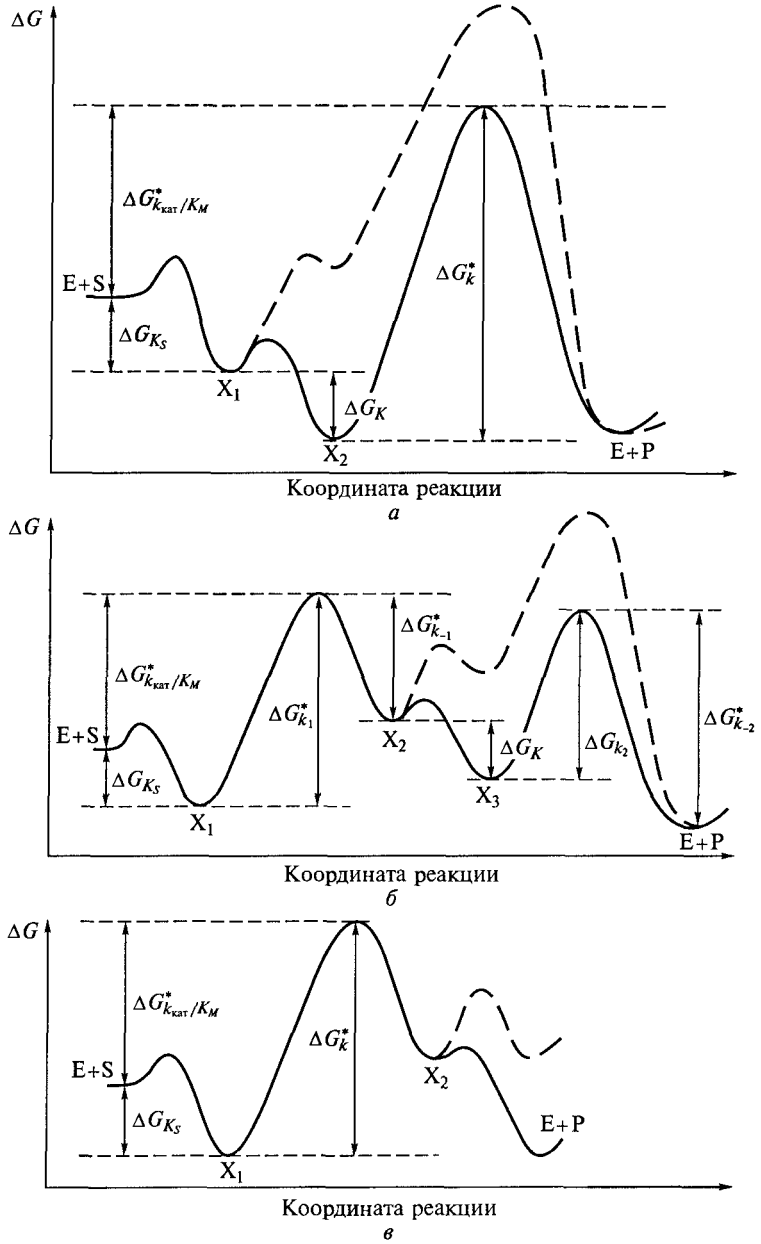


Рис. 7.1. Профили изменения свободной энергии по координате ферментативной реакции с промежуточными равновесными быстрыми стадиями:

а — равновесная стадия предшествует лимитирующей; *б* — равновесная стадия между двумя кинетическими; *в* — равновесная стадия следует за лимитирующей (пунктирная линия показывает путь реакции для случая, когда равновесная стадия термодинамически невыгодна)

На рис. 7.1 схематично приведены профили изменения свободной энергии по координате реакции для всех трех рассмотренных выше случаев, отличающихся положением быстрой равновесной стадии в последовательности стадий превращения исходного субстрата в конечный продукт. Пунктиром показаны случаи, когда быстрое взаимное превращение интермедиатов термодинамически невыгодно.

Из рис. 7.1, *в* видно, что быстрая равновесная стадия после кинетической стадии никаким образом не влияет на общий энергетический барьер реакции.

Для того чтобы рассчитать энергетический профиль реакции, надо знать константы равновесия и константы скоростей прямых и обратных стадий каталитического процесса.

Известно, что многие каталитические реакции с участием гидролитических ферментов протекают с переносом ацильной группы на активный центр фермента с промежуточным образованием ацилфермента:

$$E + S \overset{K_S}{\rightleftharpoons} ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} EA \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} EP \rightleftharpoons E + P$$

С использованием различных методов из экспериментальных данных были определены все кинетические и термодинамические параметры системы — K_S, k_2, k_3, а также вычислены константы скоростей обратных реакций k_{-2} и k_{-3}. На основании этих данных можно рассчитать энергетический профиль реакции. Для реакции гидролиза метилового эфира N-фенилаланина под действием α-химотрипсина значения кинетических и термодинамических параметров приведены в табл. 7.1.

Рассчитанные таким образом профили свободных энергий приведены на рис. 7.2. За точку отсчета принято состояние свободного фермента и субстрата. При расчете в соответствии с уравнениями (7.1) и (7.2) следует принять, что RT = 2,51 кДж, kT/h = $= 6{,}2 \cdot 10^{-12}$ $с^{-1}$ при температуре 25 °С.

Таблица 7.1

Расчет профиля свободной энергии в реакции гидролиза метилового эфира N-фенилаланина под действием α-химотрипсина

Параметр	ΔG^* ($\Delta G°$), кДж/моль
$K_S = 7{,}9 \cdot 10^{-3}$ моль/л	–12,2
$k_2 = 165$ $с^{-1}$	58,3
$k_{-2} = 540$ $с^{-1}$	61,3
$k_3 = 530$ $с^{-1}$	61,3
$k_{-3} = 167$ $с^{-1}$	58,3

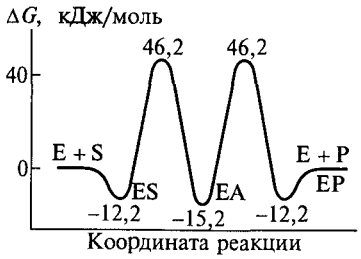


Рис. 7.2. Профиль изменения свободной энергии фермент-субстратного взаимодействия по координате реакции гидролиза метилового эфира N-ацетилфенилаланина

Минимумы на энергетическом профиле (см. рис. 7.2) соответствуют соединениям ES, EA, EP, максимумы — переходным состояниям соответствующих стадий.

Энергетические профили — удобный метод представления экспериментальных данных, позволяющий объяснить многие закономерности, наблюдаемые при исследовании ферментативных реакций. В частности, энергетические профили используются при выяснении природы специфичности ферментов (см. гл. 9).

7.2. Лимитирующие стадии ферментативных реакций

Постараемся ответить на вопрос: какими кинетическими параметрами характеризуются типичные стадии ферментативных реакций.

Зависимость начальной скорости большинства изученных ферментативных процессов в стационарном по концентрации промежуточных соединений режиме описывается уравнением Михаэлиса $v_0 = V_m S_0/(K_M + S_0)$. Эта зависимость отражает участие в ферментативных превращениях лабильных промежуточных соединений фермента с субстратом. Выше рассмотрена стационарная кинетика ферментативного процесса с участием n промежуточных соединений:

$$E + S \overset{K_S}{\rightleftharpoons} X_1 \xrightarrow{k_2} X_2 \xrightarrow{k_3} \ldots \xrightarrow{k_i} X_i \xrightarrow{k_{i+1}} \ldots \xrightarrow{k_n} X_n \xrightarrow{k_{n+1}} E + P$$

Для простоты предполагается, что первая стадия реакции имеет обратимый характер, последующие стадии практически необратимы.

Как было показано ранее, начальная стационарная скорость реакции равна

$$v_0 = k_{кат} E_0 S_0/(K_M + S_0),$$

где

$$k_{кат} = \left[\sum_{i=2}^{n+1} \frac{1}{k_i}\right]^{-1}, \qquad (7.3)$$

$$K_M = \frac{K_S}{k_2}\left[\sum_{i=2}^{n+1}\frac{1}{k_i}\right]^{-1}. \qquad (7.4)$$

Параметр $k_{кат}$ часто называют числом оборотов фермента, поскольку он характеризует число каталитических циклов, совершаемых одним активным центром фермента в единицу времени.

Если первая стадия реакции также является практически необратимой:

$$E + S \xrightarrow{k_1} X_1 \xrightarrow{k_2} X_2 \ldots \xrightarrow{k_i} X_i \ldots \xrightarrow{k_n} X_n \xrightarrow{k_{n+1}} E + P$$

константа $k_{кат}$ рассчитывается по уравнению (7.3), а K_M равна

$$K_M = \left[k_1\sum_{i=2}^{n+1}\frac{1}{k_i}\right]^{-1}.$$

Уравнения (7.3), (7.4) отражают важное свойство реакции с участием промежуточных соединений. Кинетику процесса в стационарном режиме определяет самая медленная стадия процесса. Действительно, если какая-либо элементарная стадия цепи превращений субстрата в конечный продукт является самой медленной и характеризуется наименьшей константой скорости $k_j \ll k_i$, $i = 2, \ldots, n$, $i \neq j$, уравнения (7.3), (7.4) приобретают вид

$$k_{кат} = k_i, \quad K_M = K_S k_i/k_2.$$

Таким образом, если наименьшей скоростью обладает вторая стадия реакции, экспериментально определяемые параметры выражаются уравнениями: $k_{кат} = k_2$, $K_M = K_S$; если лимитирующая третья стадия — $k_{кат} = k_3$, $K_M = K_S(k_3/k_2)$; если лимитирующая четвертая стадия — $k_{кат} = k_4$, $K_M = K_S(k_4/k_2)$ и т.д.

Если константы скоростей двух процессов соизмеримы $k_i \sim k_j$, кинетические параметры ферментативной реакции можно рассчитать по уравнениям

$$k_{кат} = \frac{k_i k_j}{k_i + k_j}, \quad K_M = \frac{K_S}{k_2}\frac{k_i k_j}{k_i + k_j}.$$

Например, для трехстадийного процесса кинетические параметры равны

$$k_{кат} = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3}, \quad K_M = \frac{K_S k_3}{k_2 + k_3}.$$

Обычно для ферментативных реакций с участием химически родственных субстратов лимитирующей является одна и та же стадия. Например, при катализе α-химотрипсином гидролиза сложноэфирных субстратов производных аминокислот практически для всех изученных субстратов лимитирующей стадией является ста-

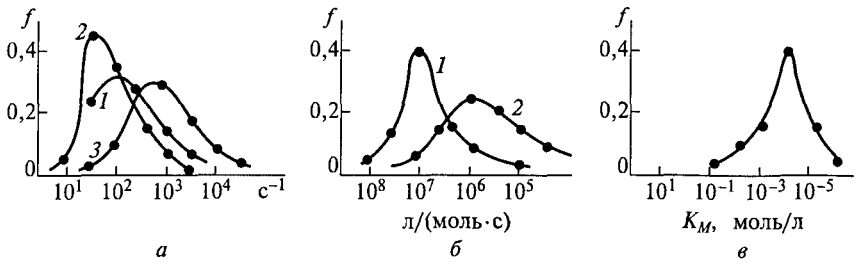


Рис. 7.3. Плотность распределения числа ферментов по кинетическим параметрам:

а — константы скорости реакции первого порядка $k_{кат}$ (*1*), k_{-1} (*2*), $k_{конф}$ (*3*); *б* — константы скорости реакции второго порядка k_1 (*1*), $k_{кат}/K_M$ (*2*); *в* — константа Михаэлиса

дия гидролиза промежуточного ацилфермента (k_3), при гидролизе всех аминов и анилидов — его образование (k_2).

Интересно проанализировать численные значения каталитических констант скорости и констант Михаэлиса различных ферментов с тем, чтобы оценить эффективность ферментативного катализа. В настоящее время имеются многочисленные данные о параметрах V_m, K_M и при известной концентрации фермента — о константе $k_{кат}$.

На рис. 7.3 показана плотность распределения числа ферментов по параметрам $k_{кат}$, K_M, $k_{кат}/K_M$. Эти кривые отражают распределение ферментов по группам с приблизительно одинаковыми параметрами. По форме полученные кривые близки к нормальному логарифмическому распределению. По каталитической эффективности ферменты могут отличаться более чем в 10^6 раз. Константы $k_{кат}$ изменяются в диапазоне $1 - 10^5$ $с^{-1}$. При этом практически отсутствуют ферменты, имеющие $k_{кат} = 10^4$ $с^{-1}$ (и выше). Наиболее широкое распространение получили ферменты, лимитирующая стадия реакций с участием которых имеет порядок 10^2 с. Аналогичный вид имеет распределение ферментов по константе K_M. Этот параметр изменяется в интервале $10^{-7} - 10^{-2}$ моль/л. Плотность распределения имеет максимум при $K_M \sim 10^{-4}$ моль/л.

Параметр $k_{кат}/K_M$ для различных ферментов меняется в диапазоне $10^1 - 10^{10}$ л/(моль · с). При этом наиболее распространены ферменты с $k_{кат}/K_M$, равным 10^5 л/(моль · с).

Таким образом, «типичный» фермент имеет $k_{кат} = 10^2 - 10^3$ $с^{-1}$. Эти значения характеризуют лимитирующую стадию процесса. Видно, что эти константы для ферментов весьма велики. Существующий энергетический барьер 42 — 72 кДж/моль обусловлен, по-видимому, рядом физико-химических эффектов. Остальные стадии процесса превращения субстрата на активном центре фер-

мента протекают быстрее, в большинстве случаев скорости мономолекулярных стадий многостадийных ферментативных процессов превышают $10^2 - 10^3$ $с^{-1}$.

7.3. Бимолекулярные стадии ферментативных реакций

Для бимолекулярных стадий ферментативного процесса на основе изучения стационарной кинетики можно оценить нижние пределы констант скоростей: $k_1 \geq V_m/(E_0K_M) = k_{кат}/K_M$. Для некоторых реакций минимальное значение константы скорости бимолекулярной стадии, оцененное по данным стационарной кинетики, приближается к пределу, предсказанному теорией для реакций, контролируемых диффузией реагентов.

Диффузионно-контролируемые стадии ферментативных реакций. В теории химических реакций, скорость которых контролируется диффузией реагентов, в качестве исходной модели было принято, что реакция протекает при каждом столкновении двух сферических молекул А и В, имеющих соответственно радиус R_1 и R_2 и коэффициент диффузии D_1 и D_2. В этом случае частота соударений молекул будет определяться диффузионным потоком, например, молекулы В к молекуле А в сферический объем, ограниченный суммой радиусов молекул. Если содержание компонентов выражать в молях, объем — в литрах, коэффициент диффузии — в квадратных сантиметрах на секунду, радиус — в сантиметрах, константа скорости диффузионно-контролируемой реакции будет иметь вид

$$k_{диф} = 4\pi(R_1 + R_2)(D_1 + D_2)N/1000. \qquad (7.5)$$

Таким образом, используя известные коэффициенты диффузии и радиусы молекул, можно вычислить константу скорости диффузионно-контролируемой реакции. В первом приближении коэффициент диффузии можно оценить, используя уравнение Стокса:

$$D_1 = \frac{k_BT}{6\pi\eta R_1}, \quad D_2 = \frac{k_BT}{6\pi\eta R_2}, \qquad (7.6)$$

где k_B — константа Больцмана; T — абсолютная температура; η — вязкость раствора. Подставляя эти уравнения в (7.5), получим

$$k_{диф} = \frac{2RT}{3000\eta}\left(2 + \frac{R_1}{R_2} + \frac{R_2}{R_1}\right). \qquad (7.7)$$

Из уравнения (7.7) следует, что при данной температуре константа $k_{диф}$ определяется вязкостью растворителя и отношением радиусов реагирующих молекул. При изменении радиусов молекул константа скорости диффузионно-контролируемой реакции

будет оставаться постоянной при сохранении постоянным отношения их радиусов.

Зависимость константы $k_{диф}$ от температуры определяется в основном зависимостью от температуры вязкости растворителя. Эта зависимость для многих жидкостей имеет вид: $\eta = A\exp[\varphi/(RT)]$, где φ для многих растворителей изменяется в интервале 4,2—20 кДж/моль. Эта величина показывает, что вязкость и константа $k_{диф}$ сравнительно слабо зависят от температуры. Энергия активации такого рода реакций обычно отвечает диапазону 4—20 кДж/моль.

Коэффициент диффузии является фундаментальной характеристикой вещества и мерой тепловой подвижности его в данной среде. В соответствии с уравнением Стокса должна соблюдаться обратно пропорциональная зависимость коэффициентов диффузии и $V^{1/3}$ (V— молярный объем). В общем случае это не так. Обнаружены отклонения от указанной зависимости. Это, разумеется, связано с тем, что геометрия реальных молекул в растворе существенно отличается от сферической.

Существуют эмпирические корреляционные уравнения, связывающие коэффициент диффузии с молекулярной массой M или молярным объемом V вещества:

$$D = A/(M^{1/3} - B), \quad D = a/(V^{1/3} - B).$$

Эти уравнения были проверены на большом числе природных органических соединений: аминокислотах, пептидах, углеводах. Эмпирические уравнения хорошо описывают экспериментальные данные. С учетом экспериментально найденных для водных растворов параметров A и B эмпирические уравнения Лонгсворта имеют вид

$$D = 11{,}6 \cdot 10^{-6}/(M^{1/3} - 1{,}89), \quad D = 10{,}77 \cdot 10^{-6}/(V^{1/3} - 1{,}45)$$

(размерность D — квадратный сантиметр на секунду).

Таким образом, коэффициенты диффузии веществ могут быть оценены с точностью до 5 %. Для веществ молекулярной массой около 100 коэффициент диффузии имеет порядок 10^{-6} см^2/с. При радиусе реакции 0,5 нм в соответствии с уравнением (7.7) константа скорости диффузионно-контролируемой реакции равна ~10^{10} л/(моль · с).

Поскольку реакционноспособным на белковой глобуле является небольшой участок, называемый активным центром, рассматривалась диффузия субстрата в полусферический объем, определяемый «радиусом» активного центра и реагирующей молекулы. Константа скорости диффузионно-контролируемой реакции в этом случае рассчитывается по уравнению

$$k_{диф} = 2\pi N/[1000(R_S + R_a)(D_S + D_E)], \qquad (7.8)$$

где R_a — радиус активного центра; D_E — коэффициент диффузии белка; R_S, D_S — соответственно радиус субстрата и его коэффициент диффузии. Очевидно, что поскольку свободная диффузия компонентов в активный центр со стороны белковой глобулы невозможна, поток диффузии субстрата направлен в полусферу, ограниченную суммой радиусов R_S и R_a, и соответственно скорость реакции уменьшается в два раза.

Для ферментативной реакции, протекающей между белком и низкомолекулярным соединением, константа скорости будет определяться в основном диффузионной подвижностью низкомолекулярного субстрата, поскольку в уравнение для константы скорости входит сумма коэффициентов диффузии компонентов. Другими словами, активный центр практически неподвижен с точки зрения диффузии субстратов.

При разумных предположениях о размерах активного центра фермента и при использовании реальных коэффициентов диффузии низкомолекулярных веществ в водном растворе можно оценить константы скорости бимолекулярных стадий ферментативных реакций. Стадии, константы скорости которых лежат в диапазоне $10^8 - 10^{10}$ л/(моль · с), можно считать диффузионно-контролируемыми.

В настоящее время при использовании методов «быстрой кинетики» были непосредственно изменены константы скорости бимолекулярных процессов образования промежуточных соединений для большого числа ферментативных систем. Функции плотности распределения констант k_1 и k_{-1} приведены на рис. 7.3. Аналогично по бимолекулярному механизму протекают реакции переноса электрона во многих ферментативных системах.

Таким образом, теория диффузионно-контролируемых реакций в ряде случаев удовлетворительно описывает кинетику некоторых быстрых стадий ферментативных реакций.

Эффективность комплексообразования при гормон-рецепторном и фермент-субстратном взаимодействиях. Взаимодействия белок — органический лиганд — важный момент двух биохимических явлений — ферментативного катализа и гормон-рецепторного взаимодействия. Представляет интерес сравнить количественные характеристики этих процессов.

В настоящее время для многих гормонов и их аналогов измерены равновесные константы диссоциации комплексов со специфическими рецепторами $R + H \overset{K}{\rightleftharpoons} RH$.

Для анализа общей эффективности процессов воспользуемся процедурой, неоднократно используемой нами, — построим функцию плотности распределения констант. С этой целью разобъем константы на группы с приблизительно одинаковым (в пределах одного порядка) значением константы, подсчитаем число элемен-

тов в каждой группе и нормируем это число к общему числу используемых значений констант в целой выборке. Полученное число будет характеризовать вероятность значений той или иной константы диссоциации комплекса. Найденная плотность распределения констант диссоциации комплексов рецепторов с гормонами и их аналогами приведена на рис. 7.4. Видно, что наиболее вероятны значения констант диссоциации, имеющие порядок 10^{-10}—10^{-9} моль/л. Для характеристики комплексообразования при взаимодействии субстрата с ферментом можно воспользоваться значениями констант Михаэлиса, определенными из зависимости скорости реакции от концентрации субстрата. Для сравнения на рис. 7.4 приведена плотность распределения констант Михаэлиса в ферментативном катализе. Среднее значение K_M равно 10^{-4} моль/л. Видно, что взаимодействие гормон—рецептор намного эффективнее. Физиологические ответы, вызванные образованием комплекса гормон—рецептор, наблюдаются при концентрациях гормона, соизмеримых с константой диссоциации комплекса, т.е. при концентрациях 10^{-10}—10^{-9} моль/л. Ферментативные реакции *in vivo* и *in vitro* идут с заметными скоростями при концентрациях субстратов (метаболитов), соизмеримых с K_M, т.е. при концентрациях на 5—6 порядков выше.

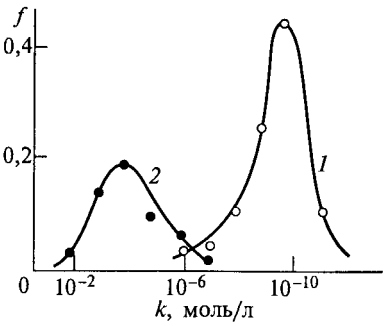


Рис. 7.4. Плотность распределения равновесных констант диссоциации (*1*) комплексов гормон—рецептор и констант Михаэлиса (*2*)

Таким образом, гормон-рецепторные взаимодействия по сравнению с фермент-субстратными энергетически значительно сильнее. В среднем комплексообразование гормона с рецептором характеризуется изменением свободной энергии 58 кДж/моль, в то время как образование комплексов активного центра фермента с субстратом протекает с изменением свободной энергии менее чем 25 кДж/моль.

Кинетические барьеры комплексообразования в ферментативных реакциях. Бимолекулярные стадии ферментативных реакций, константы скорости которых лежат в диапазоне 10^8—10^{10} л/(моль·с), попадают в разряд реакций, контролируемых диффузией реагентов в растворе. Как видно из рис. 7.3, в большинстве случаев константы скорости образования фермент-субстратных комплексов существенно ниже этого предела. В ряде случаев наблюдается высокая чувствительность этой константы скорости к структуре органического лиганда. Так, введение в аспарагиновую кислоту метильной группы почти в 10^4 раз уменьшает константу скорости

комплексообразования этого субстрата с активным центром аспартатаминотрансферазы. При переходе от профлавина к родамину 6G процесс комплексообразования лиганда с активным центром α-химотрипсина замедляется почти в 10^6, в то время как константа равновесия изменяется лишь в 2—4 раза. В связи с этим интересно отметить, что аналогичное резкое изменение константы скорости образования молекулярных комплексов при изменении структуры лиганда было найдено при исследовании модельной системы взаимодействия некоторых азокрасителей с циклодекстранами. При замещении водорода в третьем положении в 4-оксифенилазо-1-нафталин-4-сульфоне на этильную группу константа скорости комплексообразования уменьшается более чем в 10^3 раз при сохранении неизменной константы равновесия процесса. Такого рода соединения представляют собой молекулярные комплексы включения.

Эффекты существенного уменьшения константы скорости образования фермент-субстратного молекулярного комплекса по сравнению с диффузионно-контролируемым предельным значением и чувствительности константы скорости комплексообразования к структуре лиганда наблюдаются для многих ферментативных реакций. Для объяснения этих эффектов предложено два принципиально различающихся механизма.

Первый механизм предполагает наличие жесткой конформации связывающего центра, находящегося на поверхности белковой глобулы. В этом случае малое значение константы скорости следует объяснить стерическими затруднениями при образовании комплекса со сложноорганизованной структурой активного центра. Необходимость ориентации лиганда при образовании комплекса должна приводить к малому значению предэкспоненциального множителя в выражении для константы скорости процесса. Что касается энергии активации, то ее значение должно быть мало, как и для всех процессов, контролируемых диффузией.

Альтернативный механизм комплексообразования более сложен. Он исходит из модели активного центра, расположенного внутри белковой глобулы. Возможность достижения субстратом или эффектором центра комплексообразователя связана с конформационными изменениями активного центра в переходном состоянии комплексообразования. Образовавшийся комплекс представляет собой фактически соединение включения. Известно, что конформационные изменения в белках характеризуются, как правило, значительными изменениями энтальпии. Поэтому следует ожидать, что такому механизму комплексообразования присущи высокие значения энергии активации.

Выбор между альтернативными механизмами может быть сделан на основе изучения температурной зависимости кинетики комплексообразования Известны примеры, показывающие, что

механизм комплексообразования, обладающий характерными чертами механизма включения, может иметь место. Так, энергия активации комплексообразования родамина 6G с активным центром химотрипсина равна 71 ± 4 кДж/моль, в то время как энергия активации процессов, контролируемых диффузией, определяется в основном температурной зависимостью коэффициентов диффузии и не превышает 8—12 кДж/моль. Это является свидетельством в пользу механизма, связывающего энергетический барьер комплексообразования с термодинамически невыгодной конформационной перестройкой активного центра в переходном состоянии образования комплекса.

7.4. Конформационные изменения в ферментативных реакциях

Как известно, белковые молекулы могут обладать набором конформационных состояний. Если конформационные изменения затрагивают активный центр фермента, это может повлиять на кинетику ферментативной реакции. Во многих случаях связывание фермента с субстратом или ингибитором протекает по двухстадийному механизму:

$$E + S \rightleftharpoons X_1 \rightleftharpoons X_2 \qquad (7.9)$$

Поскольку при образовании фермент-субстратных или фермент-ингибиторных комплексов не происходит образования ковалентной связи, вторая стадия реакции представляет собой некоторое конформационное изменение первично образовавшегося комплекса. Этот факт представляет собой, по-видимому, одно из наиболее строгих доказательств существования конформационных изменений активного центра фермента, сопровождающих ферментативный катализ.

Конформационные изменения во многих случаях протекают достаточно быстро (10^{-4}—10^{-3} с), быстрее чем лимитирующая стадия катализа. Однако в некоторых случаях это довольно медленные процессы. Можно полагать (и на этом основана одна из существующих теорий ферментативного катализа), что конформационные изменения в некоторых случаях могут являться лимитирующей стадией ферментативного превращения (см. рис. 7.3, *а*).

Конформационные изменения при образовании комплексов белок—органический лиганд. Динамика конформационных изменений, сопровождающих комплексообразование белков с лигандами, субстратами, ингибиторами, регуляторами, в ряде случаев детально исследована методом температурного скачка. Рассмотрим кинетическое поведение системы, описываемой схемой (7.9) в условиях, близких к равновесию.

В общем случае схему процесса можно представить в виде

$$L + Q \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} LQ \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftarrows}} LQ' \qquad (7.10)$$

Кинетически двухстадийность проявляется в том, что изменения концентраций компонентов описываются двухэкспоненциальной функцией. Переход $LQ \rightleftarrows LQ'$ не связан с образованием каких-либо ковалентных связей и представляет собой конформационное изменение комплекса LQ.

Кинетика процесса, представленного схемой (7.10), описывается системой уравнений

$$\begin{cases} \dfrac{dQ}{dt} = -k_1 LQ + k_{-1}[LQ], \\ \dfrac{d[LQ]}{dt} = k_1 LQ - (k_{-1} + k_2)[LQ] + k_{-2}[LQ'], \\ Q_a = Q + [LQ] + [LQ'], \\ L_a = L + [LQ] + [LQ']. \end{cases} \qquad (7.11)$$

Из уравнений материального баланса следует, что $\Delta L = \Delta Q$, $\Delta[LQ'] = -\Delta Q - \Delta[LQ]$. Если перейти к новым переменным ΔQ и $\Delta[LQ]$, система уравнений преобразуется к виду

$$\begin{aligned} \frac{d\Delta Q}{dt} &= a_{11}\Delta Q + a_{12}\Delta[LQ] + C_1, \\ \frac{d\Delta[LQ]}{dt} &= a_{21}\Delta Q + a_{22}\Delta[LQ] + C_2. \end{aligned} \qquad (7.12)$$

Здесь

$$\begin{aligned} a_{11} &= -k_1(Q_p + L_p), \quad a_{12} = k_{-1}, \\ a_{21} &= k_1(Q_p + L_p) - k_{-2}, \quad a_{22} = -(k_{-1} + k_{-2} + k_2), \end{aligned} \qquad (7.13)$$

Q_p, L_p — равновесные значения концентрации свободных центров комплексообразователя и лиганда соответственно; C_1, C_2 — константы.

Линеаризация системы уравнений (7.12) оказалась возможной, поскольку смещение от состояния равновесия невелико ($\Delta Q \ll Q_p$, $\Delta L \ll L_p$, $\Delta[LQ] \ll [LQ]_p$, $\Delta[LQ'] \ll [LQ']_p$). Интегрирование системы уравнений приводит к следующему результату:

$$\Delta Q = C_{11}\exp(\lambda_1 t) + C_{12}\exp(\lambda_2 t) + C_1', \qquad (7.14)$$

$$\Delta[LQ] = C_{21}\exp(\lambda_1 t) + C_{22}\exp(\lambda_2 t) + C_2', \qquad (7.15)$$

где C_{11}, C_{12}, C_{21}, C_{22}, C_1', C_2' — постоянные; λ_1, λ_2 — корни характеристического уравнения:

$$\begin{vmatrix} a_{11}-\lambda & a_{12} \\ a_{21} & a_{22}-\lambda \end{vmatrix} = 0. \qquad (7.16)$$

Корни квадратного уравнения (7.16) даны иррациональной функцией

$$\lambda_{1,2} = \frac{a_{11}+a_{22}}{2} \pm \sqrt{\left(\frac{a_{11}-a_{22}}{2}\right)^2 - (a_{11}a_{22}+a_{21}a_{12})}. \qquad (7.17)$$

Из экспериментальных данных можно найти два времени релаксации τ_1 и τ_2, которые связаны с корнями характеристического уравнения соотношением

$$\tau_1 = -\frac{1}{\lambda_1}, \quad \tau_2 = -\frac{1}{\lambda_2}.$$

Кинетические зависимости, описываемые суммой двух экспоненциальных членов вида

$$X = C_1 \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) + C_2 \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right), \qquad (7.18)$$

на практике встречаются достаточно часто. Поэтому целесообразно остановиться на том, как исходя из зависимости $X(t)$ определить параметры τ_1, τ_2, C_1, C_2. Обычно поступают следующим образом. Если показатели экспонент в уравнениях (7.14), (7.15) отличаются более чем в 10 раз, каждую экспоненту можно рассмотреть независимо и определить значение τ_1 и τ_2. Если же τ_1 и τ_2 соизмеримы, удобно применить приближенный метод. С этой целью зависимость $X(t)$ строят в полулогарифмических координатах. Из линейной части кривой при достаточно больших временах, когда первым (более «быстрым») экспоненциальным членом можно пренебречь, по тангенсу угла наклона определяется время τ_2, по отрезку, отсекаемому на оси ординат, — константа C_2. Показатель второй экспоненты находят по тангенсу угла наклона графика зависимости $\ln|X - C_2\exp(-t/\tau_2)|$ от t в соответствии с уравнением (рис. 7.5):

$$\ln\left|X - C_2 \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right)\right| = \ln C_1 - \frac{t}{\tau_2}. \qquad (7.19)$$

Аналогично можно провести анализ зависимостей вида

$$Y = C_1\exp(-t/\tau_1) + C_2\exp(-t/\tau_2) + C',$$

учитывая, что при $t \to \infty$ имеем $C' = Y$.

Вернемся к анализу системы (7.12). Из соотношений (7.13) видно, что хотя времена релаксаций и определяются элементарными константами, однако в силу иррациональности функции

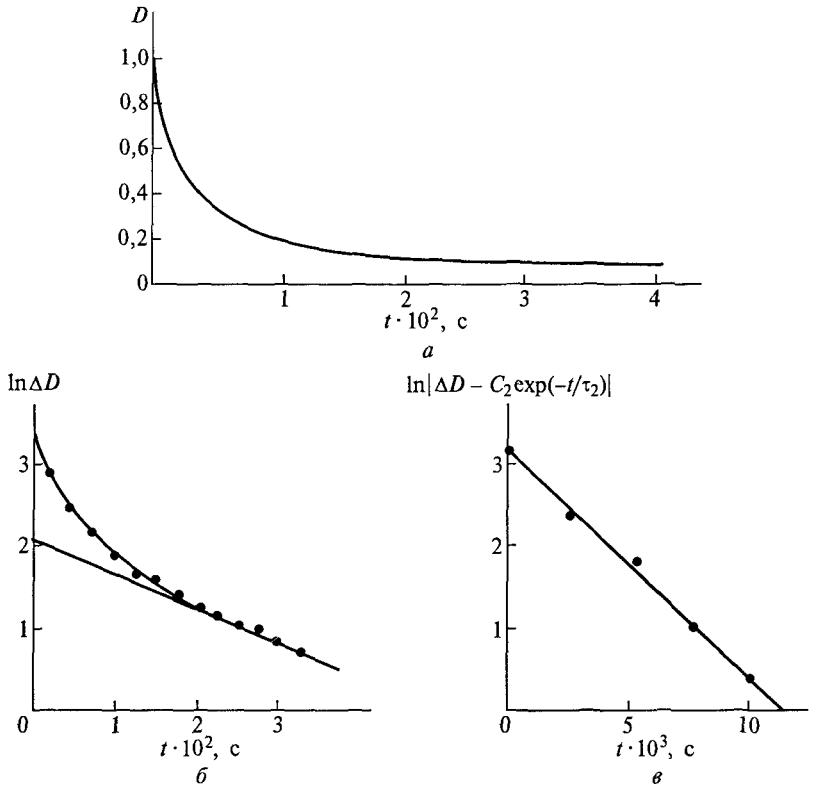


Рис. 7.5. Кинетика фотохромного превращения 2-(2′,4′-динитробензил)-пиридина в присутствии α-химотрипсина:

а — изменение во времени оптической плотности; *б*, *в* — данные рис. 7.5, *а* представлены в полулогарифмических координатах

(7.17) непосредственное вычисление элементарных констант по времени релаксации затруднено. Исключение составляют некоторые частные случаи, когда времена релаксации существенно различаются (см. ниже). При обработке экспериментальных результатов, описываемых суммой двух экспонент и уравнениями (7.14), (7.15), удобно воспользоваться тем, что корни квадратного уравнения λ_1 и λ_2 связаны соотношениями

$$\lambda_1 + \lambda_2 = -(a_{11} + a_{22}) = k_1(Q_p + L_p) + (k_{-1} + k_2 + k_{-2}), \quad (7.20)$$

$$\lambda_1\lambda_2 = a_{11}a_{22} + a_{12}a_{21} = (k_1k_2 + k_1k_{-2})(Q_p + L_p) + k_{-1}k_{-2}. \quad (7.21)$$

Экспериментальное изучение системы α-химотрипсин — профлавин методом температурного скачка показало, что кинетика процесса описывается двумя соизмеримыми экспоненциальными членами, т. е. двумя временами релаксаций. На рис. 7.6 приведена

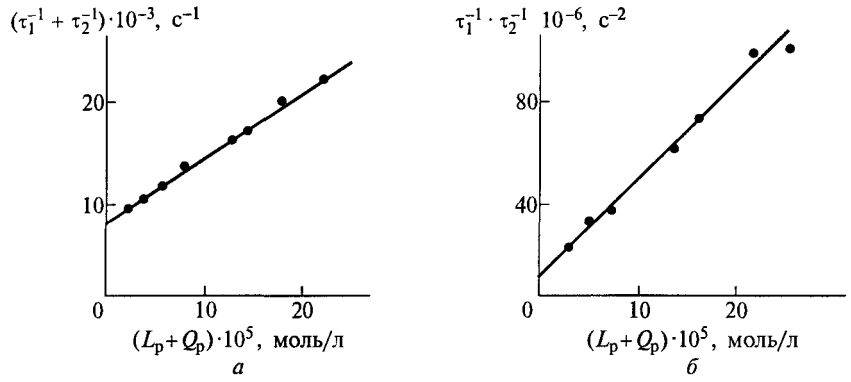


Рис. 7.6. Зависимость времени релаксации $(\tau_1^{-1} + \tau_2^{-1})$ (*а*) и $\tau_1^{-1}\tau_2^{-1}$ (*б*) от суммы равновесных концентраций α-химотрипсина и профлавина в реакции образования комплекса

зависимость функции $(\tau_1^{-1} + \tau_2^{-1})$ от суммы равновесных концентраций фермента и красителя. По тангенсу угла наклона графика этой зависимости определяется константа скорости k_1; отрезок, отсекаемый на оси ординат, дает сумму констант $(k_{-1} + k_2 + k_{-2})$. Соответственно из зависимости функции $\tau_1^{-1}\tau_2^{-1}$ от суммы равновесных концентраций фермента и красителя определяются параметры $k_1k_2 + k_1k_{-2}$ (по тангенсу угла наклона) и $k_{-1}k_{-2}$ (по отрезку, отсекаемому на оси ординат). Таким образом, из экспериментальных данных рис. 7.6 получена система четырех уравнений (параметры прямых) с четырьмя неизвестными (константы скорости k_1, k_{-1}, k_2, k_{-2}). Решение этой системы уравнений приводит к значениям: $k_1 = (0{,}63 \pm 0{,}13)\cdot 10^8$ л/(моль · с), $k_{-1} = 1200 \pm 600$ с$^{-1}$, $k_2 = 520 \pm 350$ с$^{-1}$, $k_{-2} = 7040 \pm 350$ с$^{-1}$. Таким образом, конформационное изменение первичного комплекса протекает достаточно быстро ($\sim 10^{-4}$ с) и является термодинамически невыгодным ($K = k_{-2}/k_2 \approx 14$).

Возникает вопрос: какова глубина наблюдаемых конформационных изменений, затрагивают ли они всю молекулу белка или небольшой участок в районе активного центра? Чтобы ответить на эти вопросы, нужно исследовать изменения объемов системы в процессе образования комплекса.

Из теории переходного состояния следует, что константа скорости какого-либо процесса связана с изменением давления в системе следующим соотношением:

$$\frac{\partial \ln k}{\partial p} = -\frac{\Delta V^{\neq}}{RT}, \qquad (7.22)$$

где $\Delta V^{\neq}$ — изменение объема при переходе исходных веществ в активированное состояние. Значение $\Delta V^{\neq}$ может быть найдено из

зависимости константы скорости реакции от давления. Для этого необходимо знать константу скорости реакции, по крайней мере, при двух значениях давления. Для этих экспериментов была использована методика температурного скачка, позволяющая проводить кинетические исследования при различных внешних давлениях, и исследована кинетика комплексообразования хромофорной метки бромфенолового синего с β-лактоглобулином, который представляет собой протеин молока молекулярной массой 17 750. Бромфеноловый синий является хромофорной меткой β-лактоглобулина, он связывается с белком в стехиометрии 1 : 1, при этом наблюдаются существенные изменения в спектрах красителя. Кинетика комплексообразования характеризуется двумя временами релаксации. Первый быстрый процесс заканчивается за несколько миллисекунд, второй — за сотни миллисекунд. Это существенно упрощает кинетический анализ, поскольку при интерпретации быстрого процесса нет необходимости учитывать второй — более медленный процесс, а при анализе медленного процесса «быстрая» реакция заканчивается, доходит до равновесия и может быть охарактеризована константой равновесия. Если реакцию проводят в большом избытке белка $Q_a \gg L_a$, кинетику процесса описывают схемой (7.10), из которой следуют уравнения для «быстрой» релаксации

$$1/\tau_1 = k_{-1} + k_1 Q_a \tag{7.23}$$

и для «медленной» релаксации

$$1/\tau_2 = k_{-2} + k_2 K_{a1} Q_a/(1 + K_{a1} Q_a), \tag{7.24}$$

где $K_{a1} = [LQ]/[L][Q]$ — константа ассоциации первичного комплекса, имеющая размерность обратной концентрации.

Общая константа связывания, определяемая из экспериментов, проведенных в равновесных условиях, рассчитывается по уравнению $K_a = K_{a1}(1 + K_{a2})$.

На рис. 7.7 приведены зависимости времени «быстрой» релаксации от концентрации белка при двух значениях давления. Из этих данных в соответствии с уравнением (7.23) были найдены константы k_1 и k_{-1}. Константы k_2 и k_{-2} были определены из зависимости $1/\tau_2$ от $K_{a1}Q_a/(1 + K_{a1}Q_a)$ (см. уравнение (7.24) и рис. 7.8)).

В табл. 7.2 приведены найденные значения элементарных констант скорости и равновесия процесса (7.10), вычисленные с учетом соотношений (7.23), (7.24) и экстраполированные к нулевому давлению, а также значения объемов активации. На основе найденных значений констант можно вычислить изменения свободной энергии и изменения объемов при образовании комплекса белок—краситель (рис. 7.9).

Из полученных экспериментальных данных следует, что конформационные изменения на стадии $LQ \rightleftarrows LQ'$ имеют локаль-

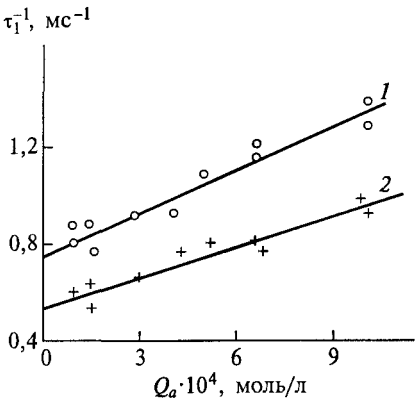


Рис. 7.7. Зависимость времени «быстрой» релаксации от концентрации β-лактоглобулина в реакции комплексообразования с бромфеноловым голубым при давлении p = 12 (*1*), 300 (*2*) атм

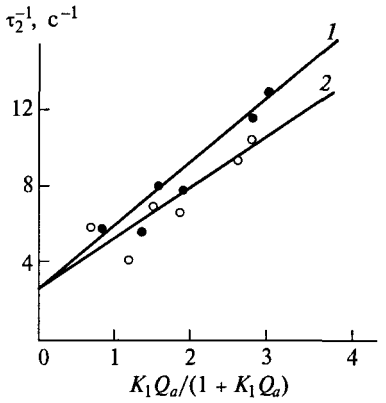


Рис. 7.8. Зависимость времени «медленной» релаксации от концентрации белка в реакции комплексообразования β-лактоглобулина с бромфеноловым голубым при давлении p = 18 (*1*), 210 (*2*) атм

ный характер и не вызывают большой реорганизации белковой молекулы. Как на стадии активации, так и в равновесном состоянии изменение объема системы в 10^3 раз меньше молярного объема белка. Конформационные изменения приводят к увеличению объема, и при этом комплекс становится более прочным ($K_{a2} > 1$).

Конформационные изменения, индуцированные структурными особенностями лиганда. Одна из наиболее привлекательных гипотез, объясняющих специфичность действия биополимерных катализаторов, связана с конформационными изменениями белка. Это гипотеза индуцированного соответствия (см. гл. 9). Специфиче-

Таблица 7.2

Кинетические и термодинамические параметры процесса комплексообразования бромфенолового синего с β-лактоглобулином

Параметр	$\Delta V^{\neq}$ ($\Delta V°$), см^3/моль
$k_{-1} = 7{,}6 \cdot 10^2$ с$^{-1}$	26
$k_1 = 6{,}4 \cdot 10^5$ л/(моль · с)	34
$K_{a1} = 8{,}4 \cdot 10^2$ л/моль	8
$k_{-2} = 2{,}2$ с$^{-1}$	3
$k_2 = 39{,}0$ с$^{-1}$	12
$K_{a2} = 17{,}7$	9

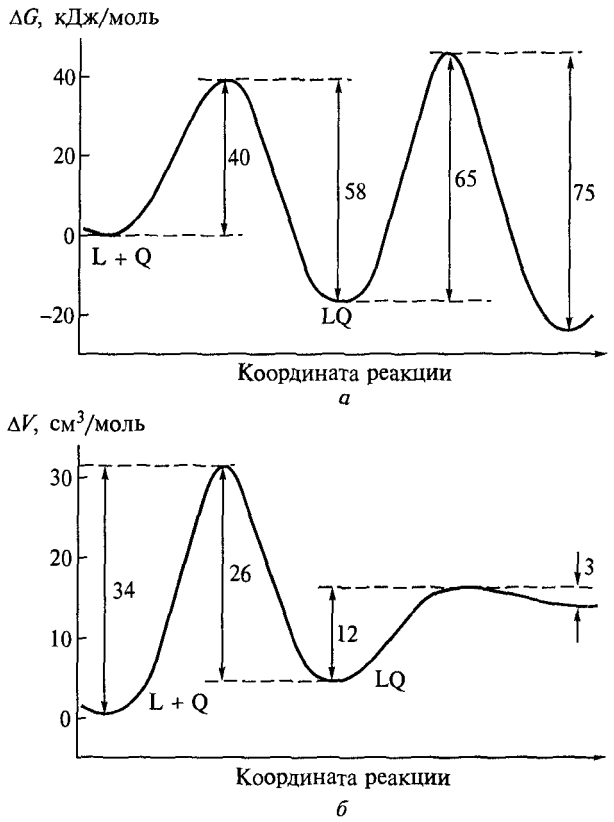


Рис. 7.9. Изменение свободной энергии (*а*) и молярного объема (*б*) системы в ходе реакции образования комплекса бромфенолового голубого с β-лактоглобулином

ский субстрат, связываясь с активным центром, вызывает конформационные изменения, формирующие активный центр и обеспечивающие функционирование сложноорганизованного активного центра. Неспецифический субстрат, лишенный необходимых «рычагов» воздействия на белковую молекулу, не способен осуществить необходимую конформационную перестройку, и реакция с его участием протекает существенно медленнее, если протекает вообще.

Получены экспериментальные данные, показывающие, что в некоторых случаях конформационные изменения в белке, возникающие при связывании органических лигандов (субстратов, кофакторов, ингибиторов), зависят от структуры лиганда. В качестве примера рассмотрим динамику связывания с апоферментом флаводоксина из азотобактера — кофактора флавинмононуклеотида (ФМН) (см. гл. 8).

Флавинмононуклеотид образует комплекс с апоферментом обратимо без образования ковалентной связи. Кофактор можно химически модифицировать или получить его аналоги. Рассмотрим, как изменения в структуре кофактора влияют на его взаимодействие с апоферментом. Исследования в равновесных условиях показали, что наличие 5-фосфатной группы в кофакторе существенно увеличивает ассоциацию кофактора с апоферментом. Исследования были проведены с использованием методов спектрофотометрии, спектрофлуориметрии, кругового дихроизма. Полученные результаты указывают на то, что фосфатная группа ФМН индуцирует в белке реорганизацию, которая облегчает процесс связывания кофактора. Кинетическое поведение систем, содержащих и не содержащих фосфатную группу, отличается кардинальным образом. Аналоги ФМН (рибофлавин и его производные), отличающиеся от ФМН отсутствием фосфатной группы, образуют комплекс с апоферментом по одностадийному механизму. Кинетика процесса характеризуется одним временем релаксации, анализ зависимости которого от равновесных концентраций компонентов позволяет найти константы k_1 и k_{-1}. Кинетика связывания ФМН представляет собой более сложный процесс и характеризуется двумя временами релаксации. Процесс описывается схемой (7.10), где вторая стадия представляет собой конформационное изменение первичного комплекса. Из данных по зависимости $(\tau_1^{-1}+\tau_2^{-1})$ и $\tau_1^{-1}\tau_2^{-1}$ от суммы равновесных концентраций белка и кофактора найдены константы скорости всех элементарных реакций. По аналогичному двухстадийному механизму протекает связывание с активным центром 5-деазофлавинмононуклеотида, содержащего фосфатную группу и отличающегося от ФМН замещением азота на углерод по пятому положению. Таким образом, проведенные кинетические эксперименты прямо показывают, что фосфатная группа в ФМН индуцирует конформационное изменение в активном центре фермента, сопровождающееся упрочнением связи белок—кофактор.

Роль конформационных изменений в катализе ферментами. Практически для всех хорошо изученных ферментов характерна двухстадийность при связывании субстрата с активным центром фермента.

На рис. 7.10 приведена кинетическая схема действия рибонуклеазы А, исследованная методом «остановленная струя—температурный скачок». Реакция, катализируемая этим ферментом, включает переэтерификацию 3′,5′-динуклеотида с образованием циклического 2′,3′-циклофосфата, после чего следует гидролиз циклического фосфата с образованием 3′-нуклеотида. Для каждого класса субстратов (3′,5′-динуклеотид, 2′,3′-циклофосфат, 3′-нуклеотид) реакция включает бимолекулярную стадию образования первичного комплекса (стадии *1*, *1′*, *1″*), за которой следует ста-

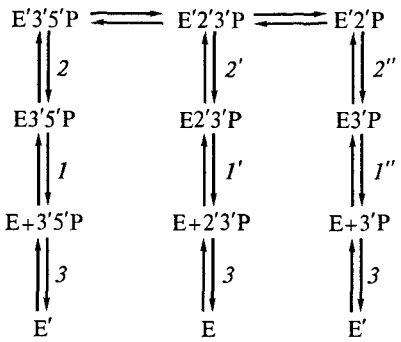


Рис. 7.10. Кинетическая схема действия рибонуклеазы А:

стадии *1*, *1′*, *1″* — комплексообразование субстрата с активным центром; *2*, *2′*, *2″* — конформационные изменения фермент-субстратного комплекса; *3* — конформационные изменения свободной формы фермента

дия его изомеризации (стадии *2*, *2′*, *2″*). Кроме того, исследование свободного фермента показало, что белок существует в двух конформациях (стадия *3*).

Детальное исследование кинетики действия аспартатаминотрансферазы показало, что кинетическая схема реакции включает стадию конформационного изменения фермент-субстратного комплекса, следующего за сорбцией субстрата.

При катализе α-химотрипсином при комплексообразовании субстратов с активным центром фермента наблюдаются заметные изменения в спектрах при длинах волн, отвечающих поглощению белка. Аналогичные изменения регистрируются при образовании некоторых ацилферментов. В механизме гидролиза амидов стадия образования ацилферментов является лимитирующей ($k_2 \ll k_3$). С использованием комбинированного метода «остановленная струя — температурный скачок» показано, что в реакции гидролиза амида N-фуроилакрилоил-L-триптофана образование реакционноспособного фермент-субстратного комплекса протекает через стадию метастабильного промежуточного соединения:

$$E + S \underset{k_1}{\overset{K_S}{\rightleftharpoons}} ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} ES' \longrightarrow E + P$$

Здесь $K_S = 6 \cdot 10^7$ л/(моль · с); $k_1 = 10^4$ с$^{-1}$; $k_2 = 1{,}5$ с$^{-1}$; $k_{-2} = 10^4$ с$^{-1}$.

Конформационное изменение является несколько термодинамически невыгодным ($K_a = [ES']/[ES] \sim 0{,}05$). В настоящее время проведено много измерений констант скоростей конформационных изменений белков, сопровождающих каталитические превращения. На основе этих данных можно сделать статистический анализ с целью выявления типичных характеристик процесса. На рис. 7.3 приведена кривая плотности распределения констант скорости конформационных изменений $k_{конф}$. Максимум плотности распределения отвечает 10^3 с$^{-1}$. Видно, что кривая плотности распределения весьма близка к кривой распределения констант скоростей лимитирующих стадий. Можно полагать, что в некоторых случаях скорость конформационных изменений определяет скорости ферментативных реакций.

Однако в большинстве случаев конформационные изменения протекают быстрее и предшествуют лимитирующей стадии. Качественно роль конформационных изменений в катализе ферментами очевидна. Ферментативные реакции протекают по сложным механизмам с перераспределением большого числа связей. Такого рода процессы не могут протекать в одну стадию. Механизмы действия ферментов включают образование и расход большого числа метастабильных интермедиатов. Фермент обеспечивает путь реакции с наименьшими энергетическими и энтропийными затратами. Механизм действия фермента можно сравнить с работой станка с программным управлением, действующим на молекулярном уровне, при этом конформационные изменения обеспечивают выполнение этой программы. В терминах химической кинетики это означает, что за счет конформационных изменений в исходном состоянии обеспечивается структура, близкая к переходному состоянию. Конформационные изменения «продвигают» реагенты по пути реакции. На рис. 7.11 приведены энергетические профили перехода системы из молекулярного состояния А (потенциальная энергия молекулы показана сплошной линией) в молекулярное состояние В (потенциальная энергия дана пунктирной линией). Образование конформера, по структуре близкого к переходному состоянию или продукту реакции, способно заметно уменьшить потенциальный барьер реакции. При этом понижение барьера тем существеннее, чем ближе структура конформера к переходному состоянию или продукту реакции.

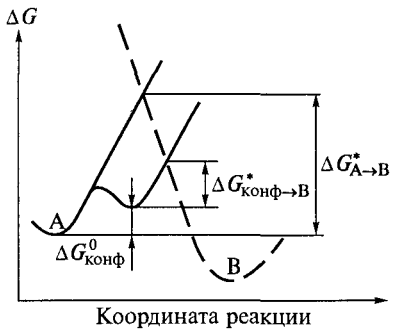


Рис. 7.11. Изменение свободной энергии перехода молекулы из состояния А в состояние В, сопровождающееся конформационным превращением, по координате реакции

Стадии переноса протона. Характерная особенность ферментативных реакций — участие сильных кислот и оснований в качестве каталитически активных групп многих ферментов. Закономерности кислотно-основного катализа в ферментах рассмотрены в гл. 8. Поскольку кислотно-основной катализ связан с элементарными стадиями переноса протона, эти реакции играют большую роль в ферментативном катализе.

Благодаря классическим работам М. Ейгена механизм реакций протонов с основаниями и ионов гидроксила с кислотами в настоящее время хорошо изучен. Основной вывод заключается в том, что для обычных кислот и оснований, включающих атомы кисло-

рода, серы, азота, реакции протонов с основаниями и ионов гидроксила с кислотами не зависят от основности или кислотности реагентов и представляют собой процессы, контролируемые диффузией ($k \approx 10^{10}$ л/(моль · с)). Соответственно константы скорости обратных реакций могут быть рассчитаны по известным константам равновесия. В ряде случаев стадии переноса протонов могут быть лимитирующими стадиями процесса.

Поскольку каталитически активная группа в процессе реакции должна подвергаться как протонированию, так и депротонированию, реакции переноса протонов в определенной мере ограничивают эффективность кислотно-основного катализа. Действительно, процессы, которые имеют место, можно записать в виде

$$BH^+ \rightleftharpoons B + H^+ \qquad (7.25)$$

$$B + H_2O \rightleftharpoons BH^+ + OH^- \qquad (7.26)$$

где B — компонент активного центра фермента, участвующий в переносе протонов.

Обратные стадии этих реакций контролируются диффузией реагентов, поэтому константы скоростей прямых реакций можно представить в виде $10^{10}K_a$ $с^{-1}$ и $10^{10}(K_w/K_a)$ л/(моль · с), где K_a — константа кислотной диссоциации BH^+, $K_w = 10^{-14}$ — константа ионизации воды. Константа скорости процесса имеет максимальное значение $\sim 10^3$ $с^{-1}$ при $K_a \approx 10^{-7}$ моль/л. Действительно, если $K_a < 10^{-7}$ моль/л, константа скорости диссоциации кислоты BH^+ (реакция (7.25)) становится меньше 10^3 $с^{-1}$; если $K_a > 10^{-7}$ моль/л, константа скорости гидролиза основания (реакция (7.26)) становится меньше 10^3 $с^{-1}$. Таким образом, максимальное значение константы скорости кислотно-основного катализа с участием воды составляет 10^3 $с^{-1}$. Этот вывод может быть использован для объяснения максимальных скоростей ферментативного катализа. Значение 10^3 $с^{-1}$ является характерным для каталитических констант многих ферментов (см. рис. 7.3). Кроме того, оптимальное значение pK_a, равное ~ 7, необходимое для эффективного катализа, соответствует pK_a имидазольной группы остатка гистидина. (Как известно, гистидин найден в активных центрах многих ферментов.) Рассмотренный пример иллюстрирует эффективность ферментативного катализа, однако показывает границы его возможностей.

* * *

То, что я понял, — прекрасно, из этого я заключаю, что и остальное, чего я не понял, — тоже прекрасно.

Сократ

Взаимодействие субстрата с активным центром фермента и последующее образование продукта — сложный многостадийный

химический процесс. Анализ кинетики ферментативных реакций показывает, что каталитический цикл состоит из отдельных стадий, первая из которых бимолекулярная реакция субстрата с активным центром. Аналогичный процесс комплексообразования имеет место при образовании комплексов фермент — ингибитор, лиганд — рецептор. С точки зрения химической кинетики бимолекулярная стадия взаимодействия субстрата с активным центром должна быть связана с частотой соударений субстрата с мишенью — активным центром. Если бы каждое соударение приводило к образованию комплекса, процесс должен был бы характеризоваться константой скорости $\sim 10^{10}$ л/(моль·с). Это значение характерно для диффузионно-контролируемых реакций, каждое столкновение реагентов в которых приводит к образованию продукта. Так, например, реагирует протон с ионом гидроксила, кислоты с основаниями.

Измерение константы скорости бимолекулярных стадий в реальных фермент-субстратных и фермент-ингибиторных реакциях показало, что эти процессы характеризуются существенно более низкими константами скорости. Обычно константы скорости реакции на стадии комплексообразования в $10^3 - 10^4$ раз ниже диффузионно-контролируемого предела. Существенное уменьшение константы скорости бимолекулярного взаимодействия может быть обусловлено несколькими причинами. Возможно, образование комплекса требует особой ориентации субстрата относительно сорбционных групп активного центра. В результате не все столкновения субстрата с активным центром будут приводить к образованию комплекса, а лишь некоторые из них. Другими словами, в этом случае будем иметь очень малый стерический фактор, существенно уменьшающий константу скорости реакции.

Анализ показывает, что снижение скорости образования фермент-субстратного комплекса может быть вызвано фактором, имеющим другую физико-химическую природу. Активные центры ферментов расположены, как правило, внутри белковой глобулы. Поэтому проникновение субстрата в активный центр станет возможным только при условии некоторой структурной перестройки части белковой глобулы. Эта структурная перестройка называется конформационным изменением белковой молекулы. Раздвижение полипептидной цепи, обеспечивающее доступ субстрата к центру комплексообразования, связано с разрушением некоторых нековалентных связей в белке и тем самым с преодолением некоторого энергетического барьера. На это указывают такие экспериментальные данные, как высокие энергии активации стадии образования комплексов белков с органическими лигандами типа субстратов или ингибиторов.

Имеются прямые кинетические экспериментальные свидетельства, что комплексообразование включает предварительную ста-

дию конформационных изменений части белковой структуры. Методами релаксационной кинетики показано, что образованию комплекса фермент — субстрат или фермент — ингибитор предшествует стадия конформационных изменений белка. Тонкая конформационная перестройка активного центра в процессе каталитического цикла — отличительная черта ферментативного катализа. Анализ значений констант скоростей такого рода процессов показывает, что конформационные изменения не являются быстрыми. В ряде случаев константы скоростей этих процессов приближаются к значениям, характерным для лимитирующих стадий каталитического цикла. Известны экспериментальные данные, свидетельствующие, что скорости и равновесия конформационных изменений зависят от структурных особенностей лиганда (субстрата или ингибитора).

Лимитирующие стадии каталитического цикла характеризуются константой скорости первого порядка и легко определяются из экспериментальных данных. Константа $k_{кат}$, найденная из данных по стационарной кинетике реакции по значению V_m, характеризует лимитирующую стадию каталитического цикла. Все остальные возможные мономолекулярные стадии трансформации субстрата протекают быстрее, чем процесс, характеризуемый $k_{кат}$. Каковы реальные значения $k_{кат}$, наблюдаемые в эксперименте? Анализ значений $k_{кат}$ показывает, что это они лежат в относительно узком диапазоне вокруг значения 10^2 $с^{-1}$. Это означает, что каждый активный центр фермента в среднем за 10^{-2} с совершает полный цикл, начиная с сорбции субстрата, заканчивая десорбцией продукта, при этом ряд стадий протекают быстро, некоторые стадии идут в равновесном режиме. Однако существует, как правило, одна стадия, определяющая скорость всего каталитического цикла, и эта лимитирующая стадия характеризуется константой скорости 10^2—10^3 $с^{-1}$. Неизвестны ферменты, имеющие значения $k_{кат}$ порядка 10^5 $с^{-1}$ и выше.

Отметим несколько физических процессов, которые можно рассматривать как процессы, определяющие скорость каталитического цикла. Один из этих процессов обсуждался выше — конформационные изменения активного центра, сопровождающие катализ. В рамках каталитического цикла конформационные изменения белка, связанные с разрушением или образованием одной или нескольких водородных, ионных или гидрофобных связей, могут создать кинетический барьер для реакции в целом. Даже в том случае, если на какой-либо стадии эти конформационные изменения термодинамически выгодны, необходимость возвращения активного центра в исходное состояние для следующего каталитического акта может обусловливать возникновение кинетического барьера. Если обратиться к статистике констант скоростей, то можно наблюдать, что функции плотности распределе-

ния констант скоростей конформационных изменений ($k_{конф}$) и констант скоростей лимитирующих стадий ($k_{кат}$) заметно перекрываются. Другим фактором, определяющим скорость каталитического цикла, может быть перенос протона. Ферменты используют кислотно-основной катализ в качестве главного химического механизма ускорения реакций (см. гл. 8). Этот механизм активации предполагает участие в реакции кислот и оснований, использующих стадии переноса протона. Простые кинетические оценки показывают, что эти стадии, если они протекают в циклическом режиме, лимитированы константами скорости 10^3 $с^{-1}$. Это значение согласуется с наиболее часто наблюдаемыми значениями констант $k_{кат}$. Однако в большинстве случаев лимитирующая стадия — наиболее сложная химическая реакция, протекающая с участием сорбционных и каталитических групп активного центра. Стадии конформационных изменений и переноса протонов обеспечивают необходимые структурные и энергетические условия, благоприятствующие понижению свободной энергии активации на этой наиболее сложной химической стадии.

Что же является движущей силой каталитического процесса? За счет чего происходит отбор субстрата определенной структуры из возможных аналогов? В следующих главах читатель найдет ответы на эти вопросы.

Глава 8

ХИМИЯ КАТАЛИТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

Самым непонятным в нашем мире является то, что он все-таки понятен.

А. Эйнштейн

Все должно быть по возможности простым, но не больше.

А. Эйнштейн

8.1. Химические реакции, катализируемые ферментами. Классификация ферментов

Ферментативный катализ отличается от катализа традиционными химическими катализаторами.

Ферменты — очень эффективные катализаторы. По сравнению со свободно протекающими реакциями или реакциями с участием простых химических катализаторов, таких как, например, кислоты, скорость процессов под действием ферментов увеличивается примерно в 10^{12} раз (табл. 8.1). Если ферментативная реакция протекает в течение 1 с, то на аналогичный процесс с участием протонов потребуется в 10^{12} раз больше времени, т.е. 30 000 лет. Другими словами, 10^{-11} М раствор фермента эквивалентен по реакционной способности 10 М раствору кислоты. Очевидно, что ферменты определяют реальные временные характеристики биохимических процессов.

Большое разнообразие ферментов и многообразие реакций, катализируемых ферментами, потребовало проведения классифика-

Таблица 8.1

Значения константы скорости второго порядка реакции гидролиза мочевины и аденозинтрифосфата (АТФ), катализируемой традиционным катализатором H_3O^+ и ферментами

Реагент	Катализатор	Температура, °С	k_2, моль/(л · с)
Мочевина	H_3O^+	62	$7{,}4 \cdot 10^{-7}$
Мочевина	Уреаза	21	$5{,}0 \cdot 10^{6}$
АТФ	H_3O^+	40	$4{,}7 \cdot 10^{-6}$
АТФ	Миозин*	25	$8{,}2 \cdot 10^{6}$

* Белок, отвечающий за мышечное сокращение.

ции ферментов. В настоящее время известно более 3700 ферментов, различающихся по реакциям, которые они катализируют. В 1961 г. Международный биохимический союз принял классификацию и номенклатуру ферментов, которые являются общепринятыми в настоящее время.

В качестве признака классификации ферментов принят тип катализируемой химической реакции. Ферменты были разделены по этому признаку на классы и далее на подклассы в зависимости от природы функциональных групп субстрата, участвующего в превращении. В свою очередь подклассы делятся на подподклассы в зависимости от природы фермента.

Все известные ферменты были классифицированы на шесть классов: 1 — оксидоредуктазы, 2 — трансферазы, 3 — гидролазы, 4 — лиазы, 5 — изомеразы, 6 — лигазы (или синтетазы). Название класса в большинстве случаев указывает на тип реакции, в которой участвует тот или иной фермент.

Например, лиазы — это ферменты, которые катализируют отщепление от субстрата той или иной группы негидролитическим путем с образованием двойных связей. В обратном процессе лиазы катализируют присоединение по двойным связям. Ферменты класса лигазы (или синтетазы) катализируют присоединение двух молекул друг к другу, сопряженное с расщеплением нуклеозидтрифосфатов.

Номенклатура фермента складывается из нумерации класса, подкласса, подподкласса. Таким образом, первое число показывает, к какому классу из шести перечисленных выше относится данный фермент. Второе число характеризует природу функциональных групп субстрата. Например, в оксидоредуктазах это группа, подвергающаяся окислению; трансферазах — переносимая группа; гидролазах — связь, подвергающаяся гидролизу; лиазах — связь, подвергающаяся реакции; изомеразах — тип реакции изомеризации; лигазах — связь, образующаяся в результате реакции. Дополнительную информацию о химической реакции, в которой участвует фермент, дает третье и четвертое число.

Далее приведена классификация ферментов.

Класс 1. Оксидоредуктазы.

1.1. Действуют на CH—OH-группу доноров.

1.1.1. Акцептором служит никотинамидадениндинуклеотид ($НАД^+$) или никотинамидадениндинуклеотидфосфат ($НАДФ^+$).

1.1.2. Акцептором служит цитохром.

1.1.3. Акцептором служит O_2.

.....

1.1.99. Используют другие акцепторы.

1.2. Действуют на альдегидную или кетонную группу доноров.

1.2.1. Акцептором служит НАД$^+$ или НАДФ$^+$.
1.2.2. Акцептором служит цитохром.
1.2.3. Акцептором служит O_2.
.....
1.2.99. Используют другие акцепторы.
1.3. Действуют на CH—CH-группу доноров.
1.3.1. Акцептором служит НАД$^+$ или НАДФ$^+$.
1.3.2. Акцептором служит цитохром.
1.3.3. Акцептором служит O_2.
.....
1.3.99. Используют другие акцепторы.
1.4. Действуют на CH—NH_2-группу доноров.
1.4.1. Акцептором служит НАД$^+$ или НАДФ$^+$.
1.4.2. Акцептором служит цитохром.
1.4.3. Акцептором служит O_2.
.....
1.4.99. Используют другие акцепторы.
1.5. Действуют на C—NH-группу доноров.
1.5.1. Акцептором служит НАД$^+$ или НАДФ$^+$.
1.5.2. Акцептором служит цитохром.
1.5.3. Акцептором служит O_2.
1.6. Используют в качестве донора НАД · H_2 или НАДФ · H_2.
1.6.1. Акцептором служит НАД$^+$ или НАДФ$^+$.
1.6.2. Акцептором служит цитохром.
1.6.3. Акцептором служит O_2.
1.6.4. Акцептором служит дисульфидное соединение.
1.6.5. Акцептором служит хинон или родственное соединение.
.....
1.6.9. Используют другие акцепторы.
1.7. Используют в качестве доноров другие азотистые соединения.
.....
1.7.3. Акцептором служит O_2.
.....
1.7.99. Используют другие акцепторы.
1.8. Действуют на серасодержащие группы доноров.
1.8.1. Акцептором служит НАД$^+$ или НАДФ$^+$.
1.8.2. Акцептором служит цитохром.
1.8.3. Акцептором служит O_2.
1.8.4. Акцептором служит дисульфидное соединение.
1.8.5. Акцептором служит хинон или родственное соединение.
1.8.6. Акцептором служит азотистая группа.
1.9. Действуют на группы гема доноров.
.....

1.9.3. Акцептором служит O_2.

.....

1.9.6. Акцептором служит азотистая группа.

1.10. Используют в качестве доноров дифенолы и родственные им соединения.

.....

1.10.3. Акцептором служит O_2.

.....

1.11. Используют в качестве акцептора H_2O_2.

.....

1.98. Ферменты, использующие в качестве восстановителя H_2.

1.99. Прочие ферменты, использующие в качестве окислителя O_2.

1.99.1. Гидроксилазы.

1.99.2. Оксигеназы.

Класс 2. Трансферазы.

2.1. Переносят одноуглеродные группы.

2.1.1. Метилтрансферазы.

2.1.2. Трансферазы оксиметильных, формильных и родственных им групп.

2.1.3. Карбоксил- и карбамоилтрансферазы.

2.2. Переносят альдегидные или кетонные остатки.

2.3. Ацетилтрансферазы.

.....

2.3.2. Аминоацилтрансферазы.

.....

2.4. Гликозилтрансферазы.

2.4.1. Гексозилтрансферазы.

2.4.2. Пентозилтрансферазы.

2.5. Переносят алкильные или родственные им группы.

2.6. Переносят азотистые группы.

2.6.1. Аминотрансферазы.

2.6.2. Амидинотрансферазы.

2.6.3. Оксиминотрансферазы.

2.7. Переносят группы, содержащие фосфор.

2.7.1. Фосфотрансферазы со спиртовой группой в роли акцептора.

2.7.2. Фосфотрансферазы с карбоксильной группой в роли акцептора.

2.7.3. Фосфотрансферазы с азотистой группой в роли акцептора.

2.7.4. Фосфотрансферазы с фосфатной группой в роли акцептора.

2.7.5. Фосфотрансферазы, катализирующие реакции кажущегося внутримолекулярного переноса.

2.7.6. Пирофосфаттрансферазы.

2.7.7. Нуклеотидилтрансферазы.
2.7.8. Переносят другие замещенные фосфатные группы.
2.8. Переносят группы, содержащие серу.
2.8.1. Сульфидтрансферазы.
2.8.2. Сульфотрансферазы.
2.8.3. КоА-трансферазы.

Класс 3. Гидролазы.
3.1. Действуют на сложноэфирные связи.
3.1.1. Гидролазы эфиров карбоновых кислот.
3.1.2. Гидролазы тиоловых эфиров.
3.1.3. Гидролазы фосфомоноэфиров.
3.1.4. Гидролазы фосфодиэфиров.
3.1.5. Гидролазы трифосфомоноэфиров.
3.1.6. Гидролазы сульфоэфиров.
3.2. Действуют на гликозильные соединения.
3.2.1. Гидролазы гликозидов.
3.2.2. Гидролазы N-гликозильных соединений.
3.2.3. Гидролазы S-гликозильных соединений.
3.3. Действуют на эфирные связи.
3.3.1. Гидролазы тиоэфиров.
.....
3.4. Действуют на пептидные связи (пептид-гидролазы).
3.4.1. α-Аминопептид-аминоацидогидролазы.
3.4.2. α-Карбоксипептид-аминоацидогидролазы.
3.4.3. Дипептидгидролазы.
3.4.4. Пептид-пептидогидролазы.
3.5. Действуют на C—N-связи, отличные от пептидных связей.
3.5.1. В линейных амидах.
3.5.2. В циклических амидах.
.....
3.5.99. В других соединениях.
3.6. Действуют на кислотноангидридные связи.
3.6.1. В фосфорилсодержащих ангидридах.
.....
3.7. Действуют на C—C-связи.
3.8. Действуют на связи с участием галогенов.
3.8.1. В соединениях со связью углерод — галоген.
3.8.2. В соединениях со связью фосфор — галоген.
3.9. Действуют на P—N-связи.

Класс 4. Лиазы.
4.1. Углерод — углерод-лиазы.
4.1.1. Карбокси-лиазы.
4.1.2. Альдегид-лиазы.
4.1.3. Лиазы кетокислот.

4.2. Углерод — кислород-лиазы.
4.2.1. Гидролиазы.
.....
4.2.99. Прочие углерод — кислород-лиазы.
4.3. Углерод — азот-лиазы.
4.3.1. Аммиак-лиазы.
4.3.2. Амидин-лиазы.
4.4. Углерод — сера-лиазы.
4.5. Углерод — галоген-лиазы.

Класс 5. Изомеразы.
5.1. Рацемазы и эпимеразы.
5.1.1. Действуют на аминокислоты и их производные.
5.1.2. Действуют на оксикислоты и их производные.
.....
5.2. *Цис-транс*-изомеразы.
5.3. Внутримолекулярные оксидоредуктазы.
5.3.1. Катализируют взаимопревращения альдоз и кетоз.
5.3.2. Катализируют взаимопревращения кетонных и енольных групп.
5.3.3. Перемещают C=C-связи.
5.4. Внутримолекулярные трансферазы.
5.4.1. Переносят ацильные группы.
.....
5.4.99. Переносят другие группы.
5.5. Внутримолекулярные лиазы.

Класс 6. Лигазы.
6.1. Образуют C—O-связи.
6.1.1. Лигазы, образующие аминоацил-тРНК.
.....
6.2. Образуют C—S-связи.
6.2.1. Кислотно-тиоловые лигазы.
.....
6.3. Образуют C—N-связи.
6.3.1. Кислотно-аммиачные лигазы (амидсинтетазы).
6.3.2. Кислотно-аминокислотные лигазы (пептидсинтетазы).
6.3.3. Цикло-лигазы.
6.3.4. Прочие C—N-лигазы.
6.3.5. C—N-лигазы с глутамином в роли N-донора.
6.4. Образуют C—C-связи.

В рамках применяемой номенклатуры каждый фермент получает название, состоящее из названия субстрата, типа катализируемой реакции, оканчивающегося на «аза». Кроме того, употребляются и тривиальные названия, ставшие общепринятыми.

Далее в качестве примера приведены названия и классификационные номера некоторых ферментов.

1.1.1.1 — алкоголь: $НАД^+$-оксидоредуктаза, алкогольдегидрогеназа;

1.1.1.27 — L-лактат: $НАД^+$-оксидоредуктаза, лактатдегидрогеназа;

1.1.3.4 — β-D-глюкоза: O_2-оксидоредуктаза, глюкозоксидаза;

1.1.3.6 — холестерол: O_2-оксидоредуктаза, холестеролоксидаза;

1.11.1.6 — H_2O_2: H_2O_2-оксидоредуктаза, каталаза;

1.11.1.7 — донор: H_2O_2-оксидоредуктаза, пероксидаза;

1.98.1.1 — H_2: ферредоксин-оксидоредуктаза, гидрогеназа;

2.6.1.12 — L-аланин: 2-оксокислота аминотрансфераза, L-аланин-кетокислота аминотрансфераза;

3.1.1.1 — гидролаза эфиров карбоновых кислот, карбоксилэстераза;

3.2.1.1 — α-1,4-глюкан-4-глюканогидролаза;

3.2.1.4 — β-1,4-глюказы-4-глюконогидролаза, целлюлаза;

3.2.1.23 — β-D-галактозид-галактогидролаза, β-галактозидаза;

3.4.4.1 — пептид-пептидгидролаза, пепсин;

3.4.4.4 — пептид-пептидгидролаза, трипсин;

3.4.4.5 — пептид-пептидгидролаза, химотрипсин;

4.2.1.1 — карбонат-гидролиаза, карбоангидраза;

5.3.1.1 — D-глицеральдегид-3-фосфат-кетол-изомераза, триозофосфатизомераза;

6.1.1.1 — L-тирозин-тРНК-лигаза (АМФ), тирозил-тРНК-синтетаза.

8.2. Активные центры ферментов

В основе катализа лежит представление о том, что каталитический цикл осуществляется совокупностью атомов, которые составляют так называемый активный центр. Для ферментов под активным центром понимают совокупность фрагментов аминокислот, осуществляющих связывание (сорбцию) субстрата, его химическую активацию и превращение. Активный центр белковой молекулы фермента имеет сложную конфигурацию; он включает как полярные (гидрофильные), так и неполярные (гидрофобные) группы.

Представление об активном центре сформировалось в результате анализа данных по ингибированию реакций и химической модификации белковой молекулы. Необратимые ингибиторы блокируют каталитическую активность фермента, осуществляя химическую модификацию одной из групп, участвующих в каталитическом превращении субстрата. Обратимые ингибиторы, образуя комплекс с функциональной группой белка, вызывают либо

существенное изменение свойств этой группы (неконкурентные ингибиторы), либо конкурентно блокируют сорбцию (комплексообразование) субстрата в области каталитического центра.

В качестве примера рассмотрим протеолитический фермент — α-химотрипсин, гидролизующий белки, пептиды, синтетические эфирные и амидные субстраты. Трехстадийная кинетика действия этого фермента обсуждается выше. Представление о структуре активного центра α-химотрипсина сформировалось на основе следующих фактов.

1. Фенилметансульфанил фторид и диизопропилфторфосфат являются необратимыми ингибиторами α-химотрипсина, модифицирующими гидроксильную группу серина-195 (см. подразд. 2.4).

2. Протоны являются неконкурентными ингибиторами α-химотрипсина, блокирующими каталитическую активность функциональной группы, реакция протонирования которой характеризуется константой равновесия $pK_a \sim 7$, что типично для протонирования имидазольной группы гистидина. Был синтезирован специфический ингибитор фермента — аналог субстрата, селективно алкилирующий имидазольную группу гистидина-57 (см. подразд. 2.4).

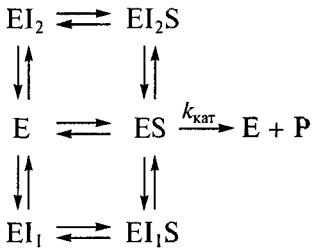
3. Ароматические спирты, ароматические соединения являются обратимыми ингибиторами α-химотрипсина. Оказалось, что эффективность ингибирования для определенных структур строго коррелирует с гидрофобностью молекулы. Эти данные свидетельствуют о том, что активный центр содержит гидрофобную область, осуществляющую «экстракцию» гидрофобных частей молекулы субстрата и, по-видимому, ориентацию последнего относительно каталитически активных групп (серин-195, гистидин-57).

Таким образом, очевидно, что активный центр α-химотрипсина представляет собой микрогетерогенную систему, включающую как гидрофильные, так и гидрофобные группы аминокислот. Это характерно и для других ферментов.

Активный центр фермента осуществляет две функции: сорбцию субстрата (комплексообразование субстрата с ферментом) и химическое превращение субстрата. Эти функции реализуются различными группами (участками) активного центра. Условно в активном центре можно выделить сорбционный и каталитический подцентры (участки). На это указывают следующие независимые данные.

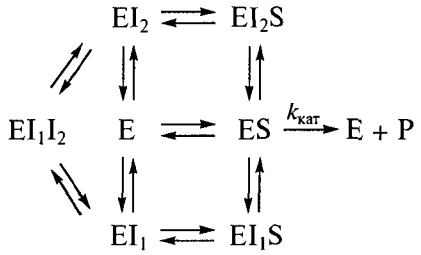
1. Кинетические закономерности ингибирования. Подтверждением существования сорбционного и каталитического участков активного центра может служить кинетическая теория двухкомпонентного ингибирования. Можно представить себе два предельных случая:

1) ингибиторы I_1 и I_2 конкурируют друг с другом, при этом не происходит образования тройного комплекса EI_1I_2:



(8.1)

2) ингибиторы взаимодействуют с различными участками активного центра, не конкурируя друг с другом; это приводит к образованию тройного комплекса EI_1I_2:



(8.2)

Анализ показывает, что кинетические схемы (8.1) и (8.2) могут быть дискриминированы на основе изучения зависимости скорости реакции от концентрации ингибиторов. Для случая взаимозависимых конкурирующих ингибиторов (схема (8.1)) графики зависимости скорости реакции от концентрации ингибитора представлены на рис. 8.1. Для случая взаимонезависимого неконкурентного ингибирования (схема (8.2)) типичные зависимости скорости от концентрации ингибиторов приведены на рис. 8.2. Аналогичный алгоритм дискриминации моделей был описан выше для двухсубстратных ферментативных реакций (дискриминация пинг-понг-механизма и механизма образования тройного комплекса).

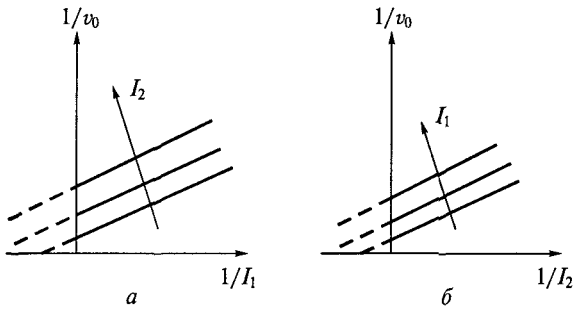


Рис. 8.1. Двухкомпонентное ингибирование ферментативных реакций, случай взаимозависимых конкурирующих ингибиторов:

а — I_2 = const; *б* — I_1 = const

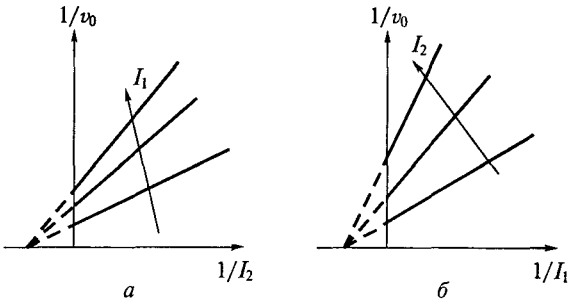


Рис. 8.2. Двухкомпонентное ингибирование ферментативных реакций, случай взаимонезависимых неконкурирующих ингибиторов:
а — I_1 = const; *б* — I_2 = const

Для α-химотрипсина было проведено исследование двухкомпонентного ингибирования с использованием борной кислоты (электрофильный компонент, образующий комплекс с имидазольной группой активного центра) и ароматических спиртов (гидрофобный компонент, образующий комплекс с гидрофобной областью — «гидрофобным карманом» — активного центра). Оказалось, что борная кислота и ароматические спирты — взаимонезависимые неконкурирующие ингибиторы фермента. Это говорит о том, что сорбция субстрата и его каталитическое превращение протекают разобщенно и осуществляются различными подцентрами активного центра.

2. Сайт-специфический мутагенез. Новые возможности идентификации групп, входящих в активные центры ферментов, появились с развитием техники сайт-специфического мутагенеза (см. гл. 10). Для ферментов, экспрессию генов которых можно организовать с использованием генно-инженерных конструкций типа плазмид, оказалась возможной замена отдельных аминокислот на уровне ДНК с последующей экспрессией и изучением каталитических свойств получаемых белков (см. гл. 10). Это позволяет получить важную информацию об участии той или иной аминокислоты данного фрагмента полипептидной цепи в каталитическом акте. Однако в этом случае при интерпретации результатов необходима известная осторожность, поскольку в белках имеется большое число аминокислот, формирующих структуру активного центра, но не принимающих непосредственного участия в акте катализа (см. далее).

3. Структура ферментов на атомарном уровне. Окончательная информация о структуре активного центра может быть получена методом рентгеноструктурного анализа (исследование кристаллов) и спектроскопии ядерного магнитного резонанса высокого разрешения (исследование растворов). Для идентификации групп, принимающих участие в катализе, обычно используют комплексо-

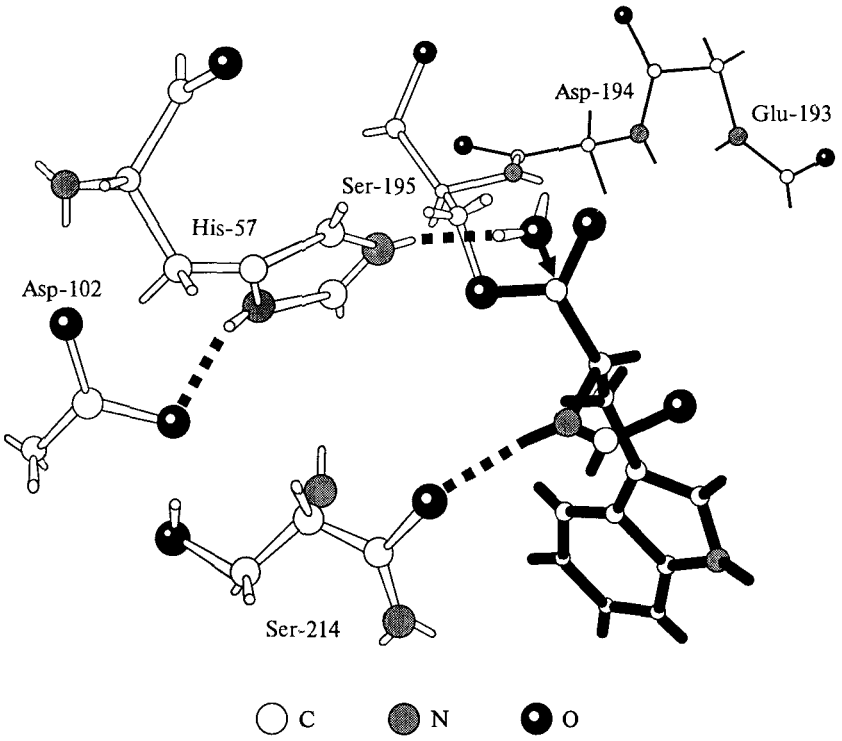


Рис. 8.3. Фрагмент структуры α-химотрипсина

образование ферментов с ингибиторами или малореакционноспособными аналогами субстратов.

На рис. 8.3 показано строение активного центра α-химотрипсина. Это малореакционноспособный ацилфермент, гидроксильная группа Ser-195 которого ацилирована индолилакрилоильным остатком. Хорошо идентифицируются Ser-195, His-57, Asp-102, связанные в комплексе водородной связью с His-57. Гидрофобную область фермента образуют аминокислотные остатки вокруг Thr-213 и Ser-214. Видно, что активный центр формируется из остатков аминокислот (His-57, Asp-102, Ser-195), распределенных по всей полипептидной цепи; это является общим правилом.

8.3. Структура активных центров ферментов. Биоинформатика

Последовательность аминокислот определяет структуру и свойства каждого белка. В настоящее время становится очевидным, что при большой (практически бесконечной) вариабельности белков

некоторые элементы структуры являются консервативными, и эти элементы в значительной степени определяют функцию белковой молекулы. Это особенно характерно для белков, выполняющих каталитическую функцию. Например, для гидролаз, составляющих около трети всех известных ферментов (приблизительно 1100 из 3700), типов структур каталитических центров всего четыре (см. далее).

Структура активного центра фермента складывается из двух составляющих:

1) сорбционный подцентр, ответственный за связывание, фиксацию и ориентацию субстратов; свойства этого центра определяют специфичность действия фермента (см. гл. 9);

2) каталитический подцентр, осуществляющий химическое превращение молекул субстрата и использующий для этих целей, как правило, общий кислотно-основной катализ.

Чтобы ответить на вопросы: какие химические структуры образуют каталитический центр, каким образом аминокислоты, расположенные на разных, зачастую удаленных друг от друга участках полипептидной цепи, находят друг друга и формируют уникальную структуру — используют методы биоинформатики.

Можно ожидать, что в рамках одного суперсемейства сорбционный подцентр, отвечающий за специфичность фермента, может быть представлен многими вариантами структуры белка, соответствующими вариантам структур субстратов. В то же время каталитические подцентры, число типов которых весьма ограничено, представляются консервативными (незаменимыми) элементами структуры. Для подтверждения этого положения был использован биоинформационный подход, основанный на сравнении последовательностей аминокислот в белках, объединенных в одно крупное семейство.

Был проведен анализ результатов выравнивания последовательностей аминокислот нескольких больших семейств ферментов, представленных в базе данных HSSP (http://www.sander.embl-heidelberg.de/hssp/). Выбор семейств ферментов был сделан на основании следующих критериев:

1) число анализируемых представителей семейства должно быть более 100; это должно обеспечить статистическую достоверность результатов;

2) для анализа следует выбирать семейства ферментов различных классов (оксидоредуктазы, гидролазы, изомеразы и т.д.);

3) по возможности следует выбирать ферменты, для которых установлена структура активных центров и с высокой степенью достоверности изучен механизм катализа.

Обычно результаты выравнивания представляют в виде таблиц при наложении последовательности аминокислот белков на последовательность, взятую в качестве базовой. Консервативные эле-

менты последовательности выявляют сравнением. Очевидно, что этот метод становится малоинформативным и в высшей степени неудовлетворительным при сравнении более чем 3—5 белков. Его можно автоматизировать, характеризуя количественно консервативность положения аминокислот в последовательности. Одним из количественных критериев консервативности положения каждой аминокислоты в последовательности аминокислот белка может служить энтропия Шеннона (см. гл. 3).

В теории информации энтропия Шеннона является одной из наиболее важных функций. Эта функция была введена как мера степени неопределенности, характеризующая то или иное событие, имеющее определенную вероятность. При этом информацию можно рассматривать как меру количества неопределенности, которая уточняется после получения сообщения. Формально количество информации определяется как разность значений информационной энтропии до и после совершения опыта (получения сообщения). Использование информационной энтропии (энтропии Шеннона) позволяет сравнивать родственные белки с различной последовательностью аминокислот. Процедура выравнивания последовательностей аминокислот относительно какого-либо реперного белка представляет собой наложение последовательностей друг на друга и в результате выявление гомологичных участков и вставок или делеций (см. гл. 3). При сравнении большого числа белков можно с высокой точностью рассчитать вероятность нахождения той или иной аминокислоты в каждой позиции последовательности. Эта вероятность определяется как относительная частота появления аминокислоты j в позиции i. Для каждой позиции в последовательности аминокислот белка для всех 20 аминокислот может быть вычислена энтропия Шеннона: $H_j = -\sum_i (p_{ji} \log_2 p_{ji})$. Важной особенностью этой функции является то, что она близка к нулю для событий с высокой вероятностью ($p_{ji} = 1$), так же как для событий с низкой вероятностью ($p_{ji} \approx 0$). Поэтому в результате вычисления энтропии Шеннона могут быть обнаружены позиции в последовательности аминокислот белка, которые являются общими (абсолютно консервативными) для данной j-й аминокислоты для всего большого семейства белков. Это позиции, вероятность появления в которых данной аминокислоты близка к единице, в то время как вероятность появления всех остальных аминокислот близка к нулю. Высокие значения энтропии Шеннона характерны для позиций с высокой вариабельностью аминокислот, низкие — для аминокислот, позиции которых в последовательности консервативны. В пределе при $p_{ji} = 1$ (абсолютная консервативность) имеем $H_i > 0$.

С использованием энтропии Шеннона были проанализированы суперсемейства белков, базовыми для которых являются сле-

дующие ферменты: трипсин, химотрипсин, субтилизин, липаза, цитохром-*c*-оксидаза, пепсин, пепсиноген, енолаза, лактатдегидрогеназа, ДНКаза, аминоацил-тРНК-синтетаза, лизоцим. Семейства объединяют белки различной структуры и происхождения. Например, анализируемое семейство трипсина состоит из более чем 500 белков, включающих такие ферменты, как химотрипсин, калликреин, плазмин, гипостатин, нейропсин, факторы коагуляции крови IX и X, протеаза агрегации тромбоцитов, активатор роста гепатоцитов, эластаза, трансмембранная триптаза, тромбин и многие другие.

В качестве примера на рис. 8.4—8.6 приведены данные по энтропии Шеннона для множественного выравнивания белков семейств трипсина, субтилизина и липазы.

Видно, что большинство позиций аминокислот в полипептидной цепи характеризуются высоким уровнем вариабельности (энтропия Шеннона больше единицы). Это означает, что для функционирования фермента не важно, какая аминокислота занимает данную позицию. В то же время имеются позиции аминокислот, которые характеризуются абсолютным минимумом энтропии Шеннона ($H \leq 0{,}1$). Вероятность нахождения определенной аминокислоты в этих позициях практически равна единице, т.е. для всего семейства белков данную позицию занимает одна и та же аминокислота. Таких позиций относительно немного. Так, для семейства трипсина (см. рис. 8.4) таких позиций всего лишь 13 (5,6 %) из более чем 230, для семейства субтилизина — 8 (3 %) из 270, для семейства липазы — 20 (6 %) из 330, для семейства пепсина — 15 (4,5 %) из 330. Эти позиции и отвечающие им аминокислоты назовем *консервативными*. Ясно, что они играют особую роль в функционировании белка. Что же это за аминокислоты и какова их роль?

Анализ позволяет выявить следующие закономерности.

1. Аминокислоты, образующие каталитически активный центр, всегда являются консервативными при сравнении последовательностей аминокислот в ферментах. Известно, что каталитический центр кислых протеаз типа пепсина включает в себя две карбоксильные группы аспарагиновой кислоты Asp-32 и Asp-215. Эти аспарагиновые кислоты являются консервативными при сравнении последовательностей аминокислот белков семейства пепсина, и их позиции характеризуются минимальным значением энтропии Шеннона.

Приведенные на рис. 8.4—8.6 семейства трипсина, субтилизина и липазы содержат в качестве каталитически активной группировки триаду аминокислот Ser—His—Asp, осуществляющую перенос протона (charge relay system) и каталитическую активацию воды по нуклеофильному механизму. В последовательностях, представленных на рис. 8.4—8.6, это аминокислоты Ser-177, His-40,

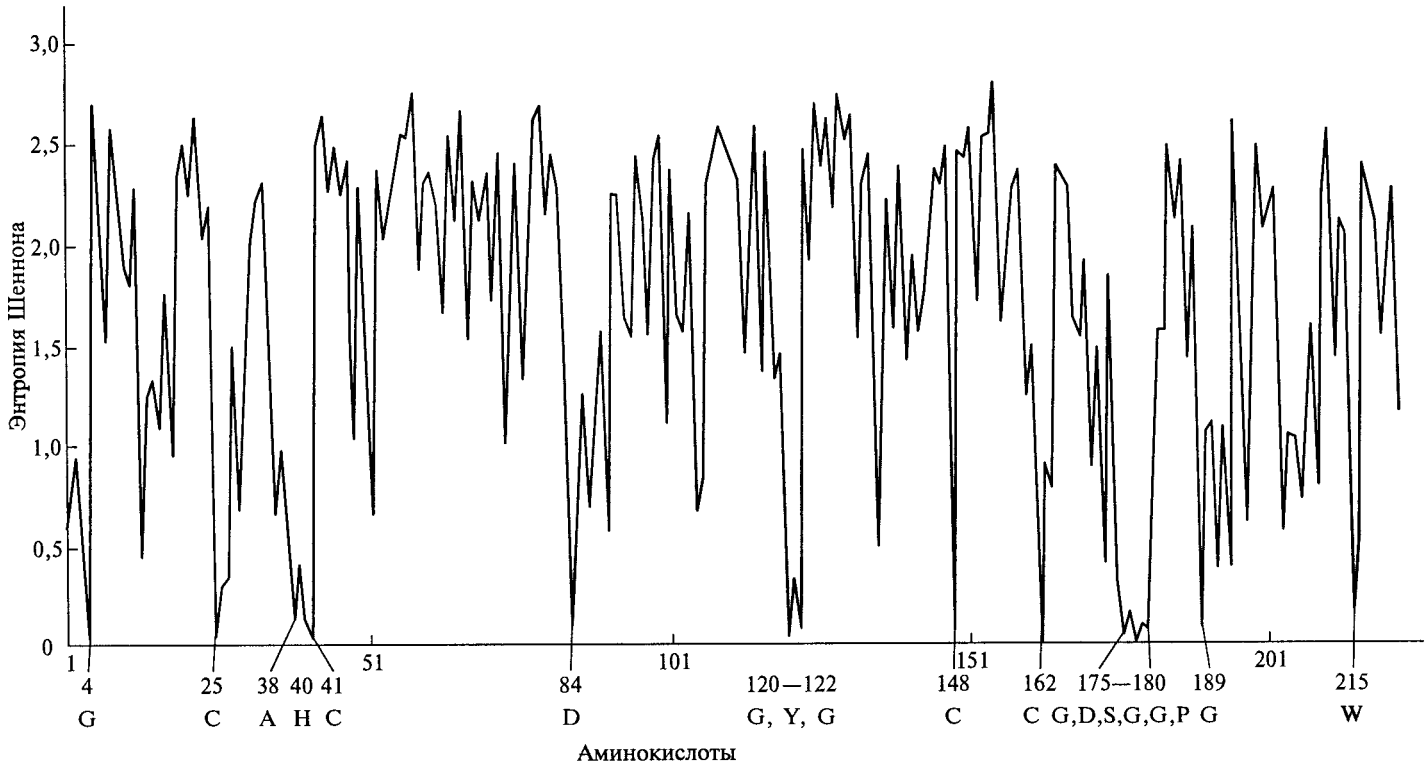


Рис. 8 4. Энтропия Шеннона, рассчитанная для позиций множественного выравнивания 500 гомологичных белков семейства трипсина относительно трипсина

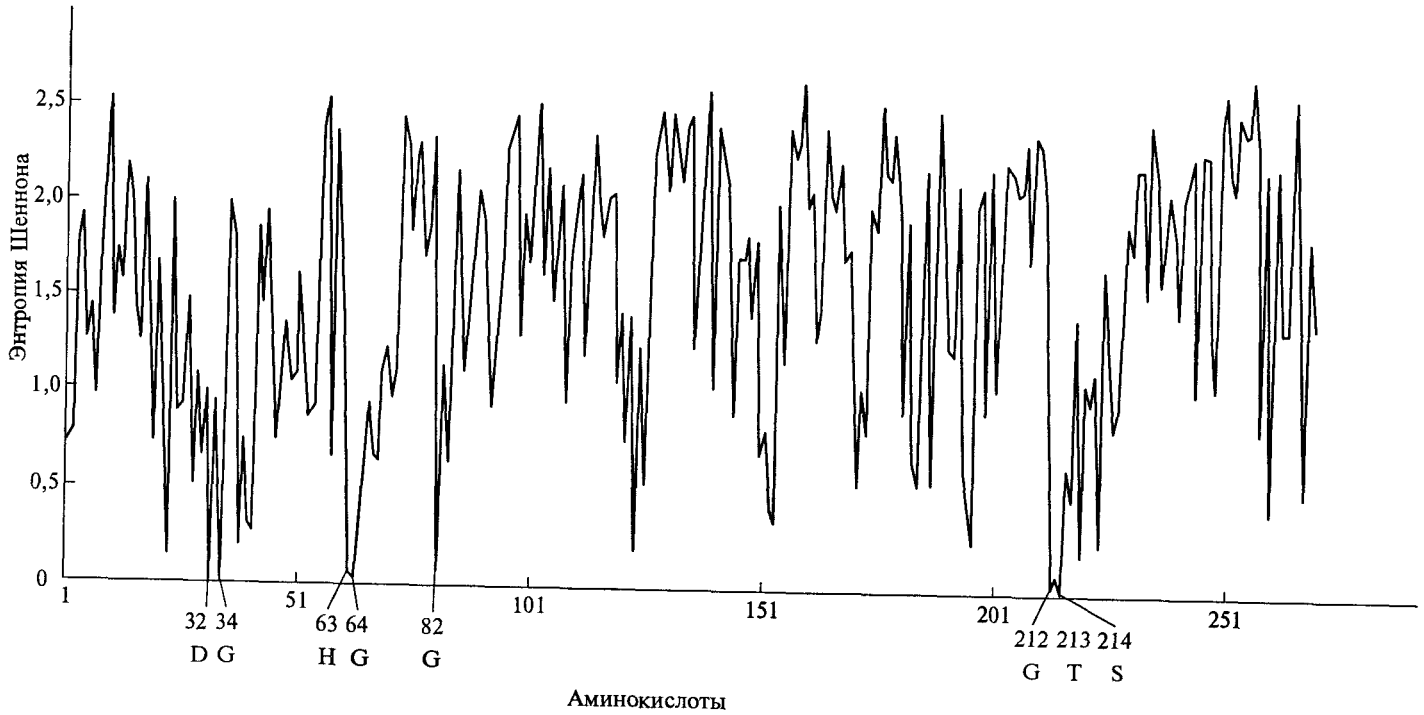


Рис. 8.5. Энтропия Шеннона, рассчитанная для позиций множественного выравнивания 300 гомологичных белков семейства субтилизина относительно субтилизина

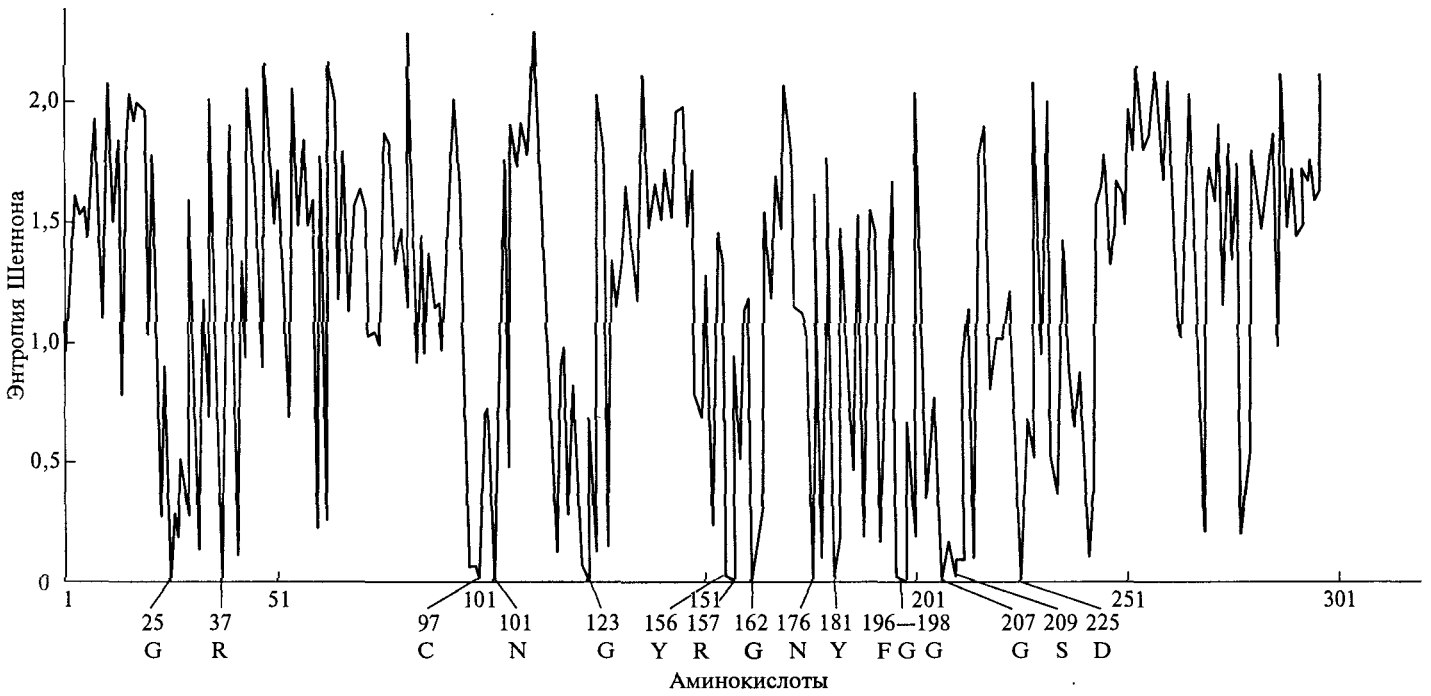


Рис. 8.6. Энтропия Шеннона, рассчитанная для позиций множественного выравнивания 150 гомологичных белков семейства липазы относительно липазы

Asp-84 (семейство трипсина); Ser-214, His-63, Asp-32 (семейство субтилизина).

2. Глицин и аспарагиновая кислота наиболее часто встречаются как абсолютно консервативные аминокислоты при сравнении последовательностей аминокислот в ферментах. Для статистического анализа была использована большая выборка семейств, представляющих ферменты различных классов. Исследуемая выборка семейств ферментов (трипсин, субтилизин, липаза, алкогольдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа, цитохром-*c*-оксидаза, пепсин/пепсиноген, енолаза, лизоцим, щелочная фосфатаза, аминоацилтРНК-синтетаза, ДНКаза) включала в себя 2281 белок и представленные в 749 252 позициях аминокислоты. Можно полагать, что полученные результаты в определенной степени характеризуют ферментативный катализ в целом. Неожиданным результатом анализа является то, что часто встречающейся, наиболее консервативной аминокислотой при сравнении последовательностей аминокислот в ферментах является глицин. На второй позиции стоит аспарагиновая кислота, при этом в сумме глицин и аспарагиновая кислота составляют примерно 50 % всех консервативных аминокислот.

Был проведен рейтинг аминокислот по проявлению консервативности в изученных семействах. С этой целью для каждой аминокислоты была определена частота ее появления как консервативного элемента ($H_j = 0$) с нормировкой на общее число консервативных позиций для всех аминокислот в исследованных семействах. Рейтинг консервативности аминокислот представлен на рис. 8.7, *а*. Для сравнения на рис. 8.7, *б* приведена частота появления аминокислот в природе. Видно, что это две совершенно разные функции. Наиболее частым компонентом в белках является лейцин. Наиболее частым консервативным элементом структуры ферментов является глицин. Видно, что глицин, аспарагиновая кислота, цистеин, пролин и гистидин являются наиболее часто встречающимися консервативными аминокислотами в структуре ферментов. Эти аминокислоты составляют примерно 70 % всех консервативных элементов. Метионин и изолейцин практически никогда не бывают консервативными.

Наиболее консервативные аминокислоты можно разделить на две принципиально разные группы:

1) аминокислоты, участвующие в элементарных актах активации молекул субстрата в качестве кислот и оснований (аспарагиновая кислота и гистидин);

2) аминокислоты, формирующие геометрию активного центра (глицин, цистеин, пролин).

Таким образом, статистический анализ показывает, что каталитическую функцию фермента и архитектуру активного центра формирует небольшая, но определенная часть аминокислот строго фиксированных позиций цепи. Эти аминокислоты можно вы-

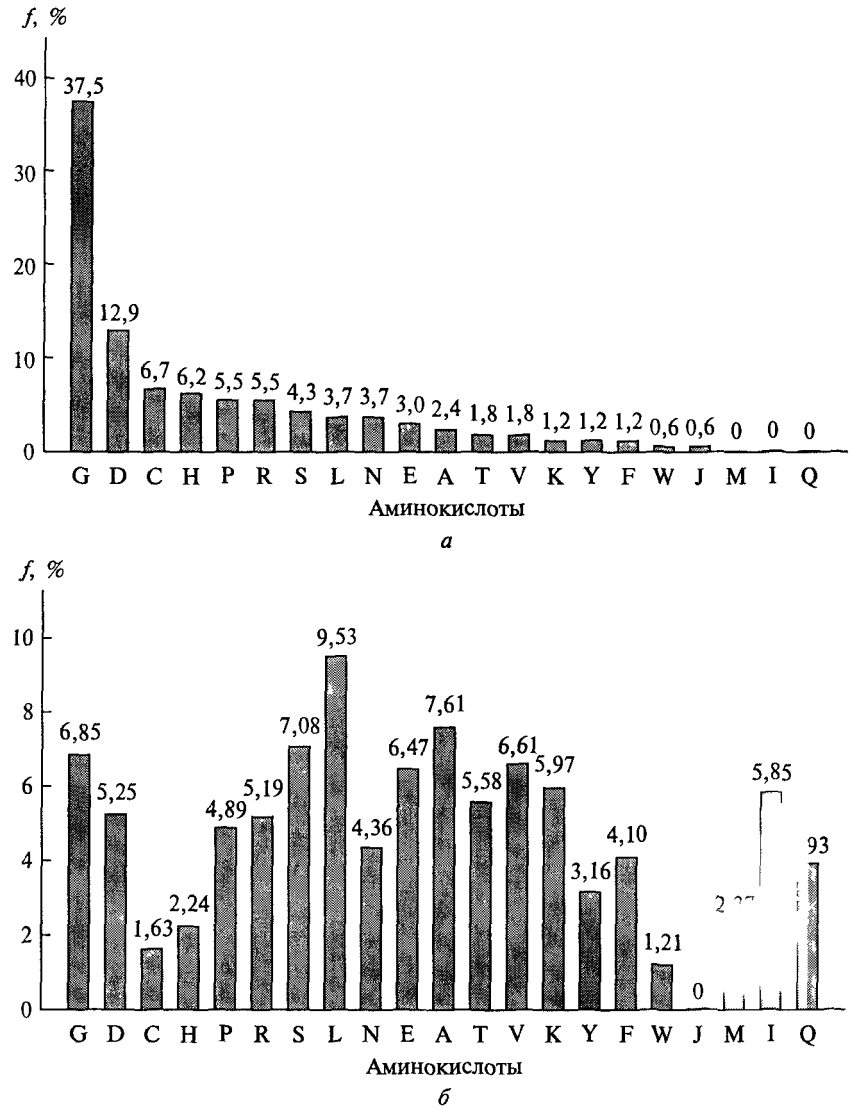


Рис. 8.7. Частота *f* появления аминокислот как консервативных элементов в структуре ферментов (*а*) и в природе (*б*)

явить при сравнении однотипных по структуре ферментов, выполняющих одну и ту же функцию. Характерные для данного семейства ферментов консервативные аминокислоты являются либо кислотами или основаниями, формирующими каталитический центр, либо важными структурообразующими аминокислотами, формирующими структуру белка в целом.

8.4. Кислоты и основания в ферментативном катализе

Рассмотрим роль консервативных аминокислот в катализе.

Аспарагиновая кислота и гистидин — наиболее часто используемые агенты в процессах активации молекул в ферментативном каталитическом цикле. Очевидно, что каталитическая функция аспарагиновой кислоты и гистидина в активных центрах ферментов связана с их кислотно-основными свойствами. В каталитической химии роль кислот и оснований удобно обсуждать с использованием следующей терминологии.

Специфический кислотный катализ — катализ, протекающий с участием ионов водорода.

Специфический основной катализ — катализ, протекающий с участием ионов гидроксила.

Общий кислотный катализ — процесс, в котором каталитическое превращение обеспечивается кислотой, являющейся электрофильным агентом.

Общий основной катализ — процесс, в котором каталитическое превращение обеспечивается основанием как нуклеофильным агентом.

Карбоксильная группа аспарагиновой кислоты в протонированной форме может выступать как кислота — донор протона. Это ярко выраженный электрофильный агент. В депротонированной форме карбоксильная группа является сильным основанием — акцептором протонов или сильным нуклеофильным агентом — донором электронов. Имидазольная группа гистидина — нуклеофильный агент, способный вовлекать в процесс катализа неподеленную электронную пару атома азота.

Представления о роли кислот и оснований в органическом катализе являются следствием ряда наблюдений, показывающих, что при постоянной концентрации ионов H^+ и OH^- (специфических кислот и оснований) скорость реакции зависит от концентрации компонентов буфера, являющихся общими кислотами и основаниями. Одним из первых на это явление обратил внимание И. Бренстед (1924 г.). В общем случае наблюдаемую константу скорости $k_{набл}$ процесса можно представить в виде

$$k_{набл} = k_{раст} + k_{H^+}[H^+] + k_{OH^-}[OH^-] + k_{BH^+}[BH^+] + k_B[B], \quad (8.3)$$

где константа $k_{раст}$ характеризует скорость процесса с участием раствора; k_{H^+}, k_{OH^-} — константа скорости процесса под действием специфического кислотного и основного катализатора соответственно; k_{BH^+}, k_B — константа скорости процесса под действием общекислотного и общеосновного катализатора соответственно.

И. Бренстед обнаружил, что константы k_{BH^+} и k_B являются функциями кислотности или основности катализатора, которые характеризуются показателями pK_a кислоты или основания. Типич-

ная зависимость Бренстеда для реакции гидролиза приведена на рис. 8.8. Зависимости такого типа описываются уравнением Бренстеда:

$$\lg k_B = \lg k_{0B} + \beta(pK_a), \quad \lg k_{HA} = \lg k_{0A} + \alpha(pK_a). \qquad (8.4)$$

Коэффициенты α и β называются коэффициентами Бренстеда, они изменяются от 0 до 1. В первом приближении коэффициенты α и β рассматриваются как степень переноса протона в переходном состоянии реакции.

Зависимости Бренстеда показывают, что термодинамические характеристики реакции (в данном случае pK_a) влияют на кинетические характеристики процесса (в данном случае на константу $k_{набл}$). Это характерно для многих процессов. Объяснение такого рода наблюдениям может быть представлено следующим образом (рис. 8.9). Химическая реакция представляет собой переход молекул из энергетического состояния, характеризуемого линией *1*, в состояние, описываемое линией *2* (или *3*). Видно, что для более термодинамически выгодного процесса, отвечающего переходу системы в состояние *3* ($\Delta G' < 0$), энергия активации ниже ($\Delta G^*_{1\to3} < \Delta G^*_{1\to2}$).

В катализе ферментами кислоты и основания, входящие в активные центры, играют принципиально важную роль, активируя субстраты. При этом в случае реакции с участием двух субстратов возможна активация реакционных центров обоих субстратов.

Можно представить несколько схем активации.

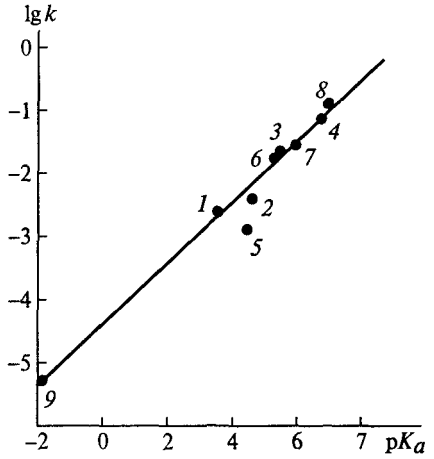


Рис. 8.8. Зависимость Бренстеда для константы скорости реакции гидролиза этилдихлорацетата, катализируемой муравьиной (*1*), уксусной (*2*), янтарной (*3*), фосфорной (*4*) кислотой, анилином (*5*), пиридином (*6*), γ-метилпиридином (*7*), имидазолом (*8*), H_2O (*9*)

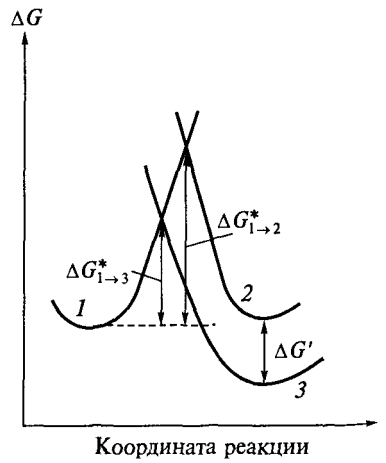
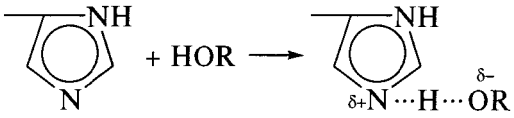


Рис. 8.9. Энергетическая диаграмма системы, объясняющая связь термодинамических и кинетических параметров реакции

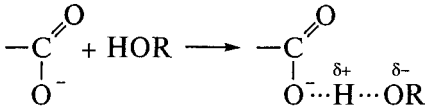
1. Имидазольная группа выступает как нуклеофильный агент:



(8.5)

На реакционном центре индуцируется отрицательный заряд δ–.

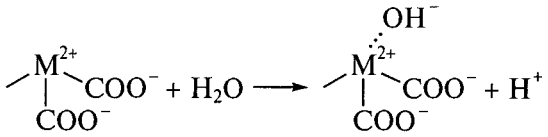
2. Карбоксильная группа выступает как нуклеофильный агент:



(8.6)

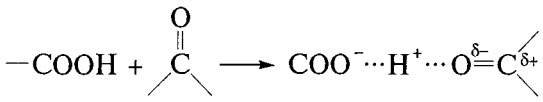
Ионы металлов (Zn^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}), находящиеся в активных центрах ферментов в виде комплексов с карбоксильными группами аспарагиновой или глутаминовой кислот, могут участвовать в каталитическом цикле как общие кислоты.

3. Электрофильная активация воды ионом металла M^{2+} путем замещения протона в молекуле воды и образования реакционноспособного и подвижного иона гидроксила:

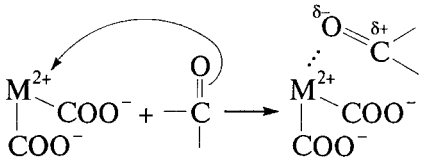


(8.7)

4. Электрофильная активация реакционного центра может проходить как под действием карбоксильной группы — донора протона, так и под действием иона металла:



(8.8)



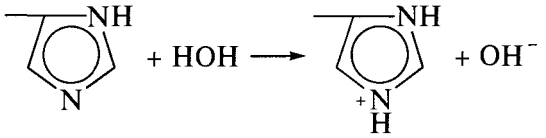
(8.9)

Эта реакция приводит к дефициту электронной плотности на реакционном центре.

Приведенные схемы активации молекул с помощью кислот и оснований обеспечивают бóльшую долю механизмов, протекающих в каталитическом подцентре активных центров. Зачастую вместо воды выступают другие реакционные частицы. Однако в большинстве случаев каталитический акт включает процесс нуклеофильно-электрофильной активации молекул.

Представленные выше механизмы активации реагентов основаны на классических положениях органической химии, восходящих к представлениям И. Бренстеда. В переходном состоянии на реакционных центрах индуцируется избыточный положительный δ+ или отрицательный δ– заряд. Степень смещения электронной плотности, индуцируемой нуклеофильным или электрофильным агентом, зависит от силы кислоты или основания. Степень переноса заряда в первом приближении может быть охарактеризована коэффициентом Бренстеда. При $\alpha = 1$ ($\beta = 1$) заряд полностью переносится на активирующую частицу и существенным образом увеличивается реакционная способность активного центра фермента.

Для гидролитических реакций стадии активации воды при нуклеофильном катализе в предельном случае могут быть представлены в виде



(8.10)

$$-COO^- + HOH \longrightarrow -COOH + OH^-$$

Реакционная способность воды при ее диссоциации с образованием гидроксильных ионов возрастает в 10^7 раз. Если представить себе, что электрофильная активация реакционного центра, протекающая по механизмам (8.8), (8.9), также в $10^6 — 10^7$ раз увеличивает реакционную способность активного центра, в первом приближении можно объяснить высокую эффективность ферментативного катализа и его способность в $10^{12} — 10^{13}$ раз увеличивать скорость реакции (см. табл. 8.1).

Вопрос о степени переноса заряда в переходном состоянии ферментативных реакций до конца не изучен. Не ясно, индуцируется ли в молекуле воды мощный дипольный момент или в каком-то состоянии реакционноспособная частица представлена сольватированным и относительно стабилизированным гидроксильным ионом. Однако очевидно, что активация происходит в реакционных центрах определенным образом ориентированных и фиксированных друг относительно друга молекул. Это обеспечивает высокие эффекты ускорения реакций.

Таким образом, кислоты и основания, входящие в активные центры ферментов, — главная движущая сила, обеспечивающая эффективную активацию субстратов и высокие скорости реакций. Как следует из изложенного выше, наиболее часто в ферментах в качестве таких активаторов выступают карбоксильная группа аспарагиновой или глутаминовой кислоты и имидазольная группа гистидина.

Можно дать несколько советов исследователю, изучающему механизм действия каталитического центра того или иного фермента. В первую очередь необходимо идентифицировать кислоты и основания (электрофильные и нуклеофильные агенты), составляющие каталитический центр. Комбинация механизмов активации, представленная схемами (8.5)—(8.10), позволяет объяснить эффективность большинства (если не всех) известных ферментативных реакций. Выше представлен один из алгоритмов идентификации каталитически активных групп активного центра. Если известна последовательность аминокислот в белке, методами биоинформатики можно найти группу белков (ферментов), гомологичных данному белку. Проведенная процедура сравнения и расчет энтропии Шеннона позволяют обнаружить позиции аминокислот с высокой степенью консервативности (см. выше). Консервативные аминокислоты представляют собой фрагменты, обеспечивающие активацию субстратов и тем самым определяющие механизм каталитического действия.

8.5. Каталитические центры гидролаз. Молекулярные механизмы действия

Используемый биоинформационный подход выявил особую роль аспарагиновой кислоты и гистидина в функционировании активных центров ферментов. Рассмотрим эту роль более подробно, анализируя механизмы действия гидролаз. Выбор гидролаз обусловливается тем, что, с одной стороны, гидролазы представляют собой наиболее многочисленный класс ферментов (около трети всех известных ферментов); с другой стороны, молекулярные механизмы катализа гидролазами наиболее изучены. Для большинства гидролаз идентифицированы группы, составляющие каталитически активные центры, и созданы обоснованные представления о взаимодействии этих групп в механизме каталитического цикла.

По структуре активных центров и механизму действия гидролазы условно можно разделить на четыре основных типа.

1. Гидролазы, содержащие в активном центре аспарагиновую или глутаминовую кислоту (лизоцим-пепсиновый тип).

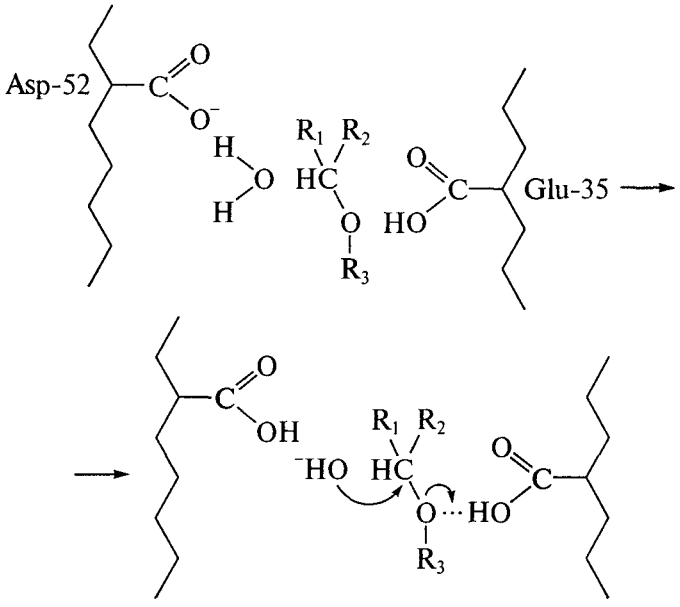
2. Гидролазы, содержащие в активном центре гидроксильную группу серина, треонина или цистеина и цепь переноса протонов, активирующую эту группу (тип химотрипсина); гидролазы, использующие имидазольную группу непосредственно для активации воды (тип панкреатической рибонуклеазы).

3. Гидролазы, использующие комплексы Zn^{2+} или Co^{2+} для активации воды и субстрата (тип щелочной фосфатазы, карбоксипептидазы А или органофосфатгидролазы).

4. Гидролазы, использующие ионы Mg^{2+} или Mn^{2+} для активации воды и субстрата (тип пирофосфатазы).

Анализ механизмов катализа обнаруживает, что в большинстве типов каталитических центров аспарагиновая кислота и гистидин играют принципиально важную роль. Проиллюстрируем механизмы катализа гидролазами на ряде схем.

Гидролазы лизоцим-пепсинового типа. Каталитический центр ферментов этого типа содержит две или несколько карбоксильных групп. В эту группу входят ферменты, расщепляющие как сложные эфиры, амиды, так и простые эфирные (гликозидные) связи. Обычно скорость реакции с участием ферментов этой группы имеет оптимальное значение при относительно низких значениях pH. Типичными представителями этой группы являются пепсин и лизоцим. Протонированная карбоксильная группа принимает участие в активации субстрата в качестве кислоты, депротонированная — в качестве основания при активации воды. В данном случае имеет место механизм согласованного действия двух карбоксильных групп, выступающих в качестве нуклеофила (активатора воды) и электрофила (активатора субстрата). В лизоциме карбоксильная группа Glu-35 в протонированной форме активирует реакционный центр, путем донирования протона индуцирует дефицит электронной плотности. Карбоксильная группа Asp-52 в депротонированной форме активирует воду по механизму общего основного катализа, приближая реакционную способность воды к реакционной способности гидроксильного иона:



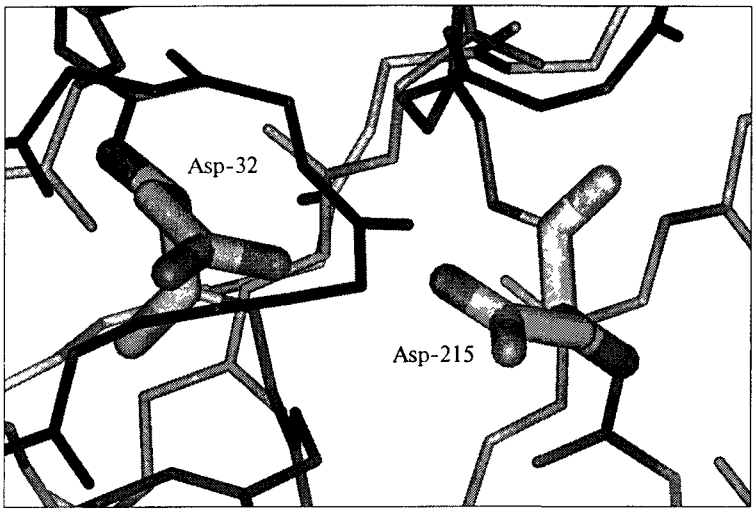
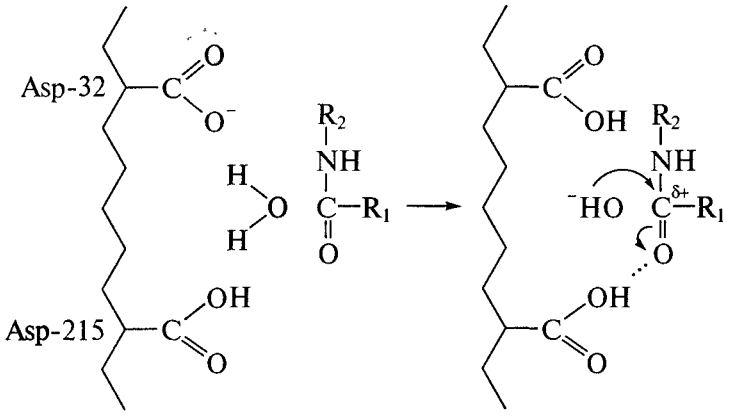


Рис. 8.10. Активный центр пепсина

Реакции этого класса осуществляются при согласованном действии двух карбоксильных групп, одна из которых в депротонированной форме выступает в качестве нуклеофильного активатора воды, другая в протонированной форме работает как электрофильный активатор субстрата. В аспартильных протеазах, типичным представителем которых является пепсин, процессы, происходящие в активном центре (рис. 8.10), можно представить в виде схемы:



Гидролазы химотрипсинового типа. Типичным представителем этого типа ферментов является химотрипсин, трипсин (сериновые протеазы) и папаин (цистеиновая протеаза). Механизм катализа этими ферментами включает промежуточное ацилирование

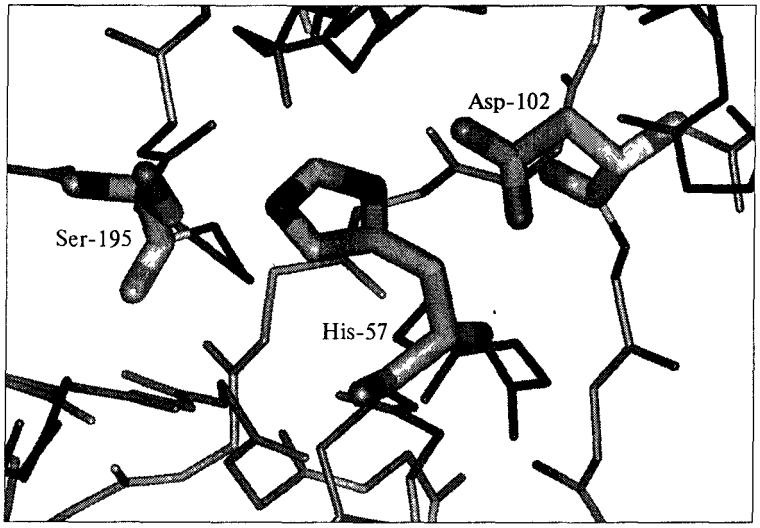
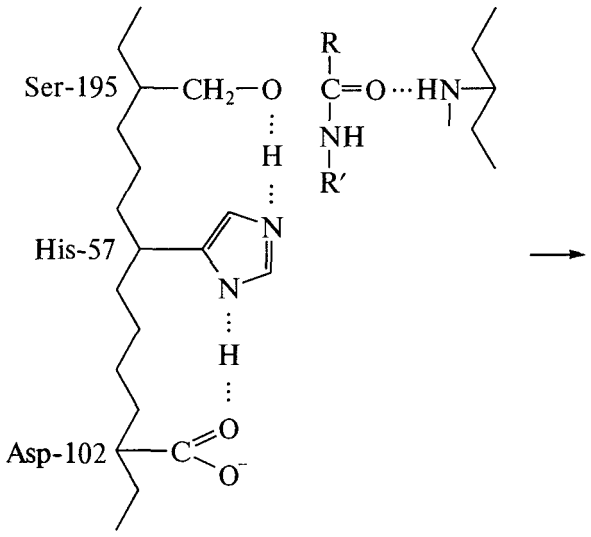
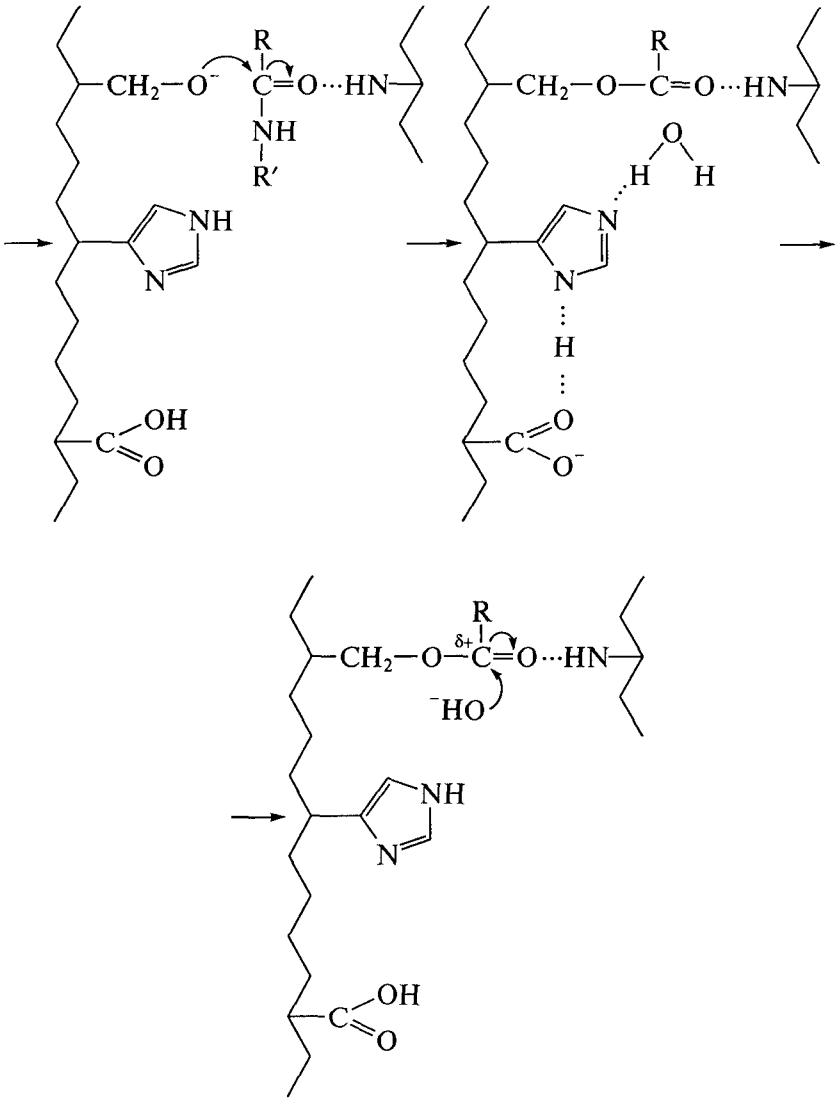


Рис. 8.11. Активный центр α-химотрипсина

гидроксильной или цистеиновой группы активного центра с образованием ацилферментных интермедиатов. В гидролазах химотрипсинового типа идентифицируется цепь переноса протона с участием карбоксильной группы, принимающей участие в активации воды, или гидроксильной группы серина на стадии ацилирования.

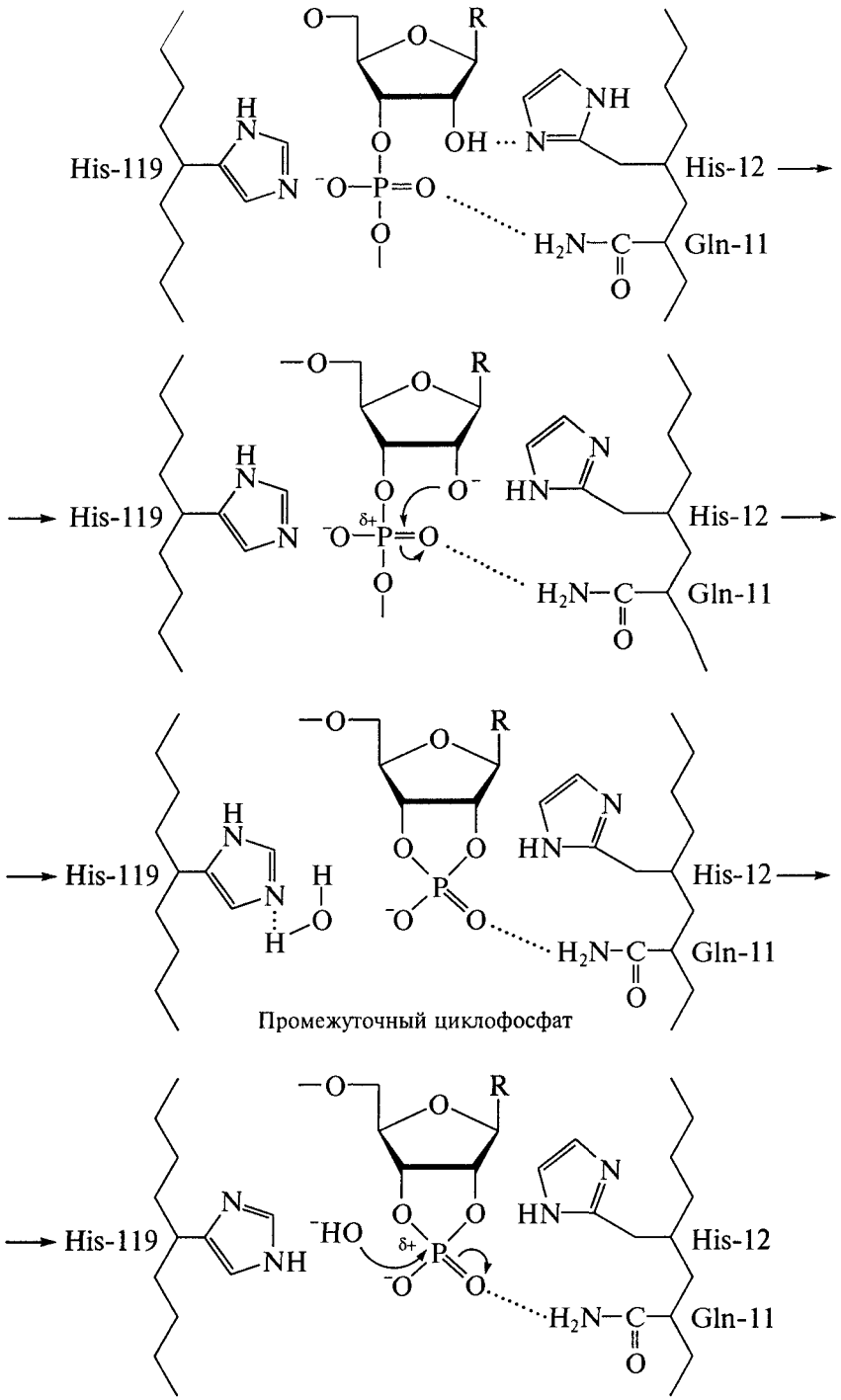
Для α-химотрипсина (рис. 8.11) активация воды осуществляется имидазолом His-57, связанным водородной связью с Asp-102:





Активация гидроксильной группы серина и воды приводит к процессам переноса протона с участием имидазола и карбоксильной группы. Следует отметить, что для активных центров ферментов весьма характерно изоморфное замещение каталитических групп на родственные им по структуре. Так, серин иногда может быть замещен на треонин без существенного изменения в механизме катализа.

Механизм катализа панкреатической рибонуклеазой (рис. 8.12) обеспечивается согласованным взаимодействием имидазольных групп двух гистидинов:


His-119
His-12
Gln-11
Промежуточный циклофосфат

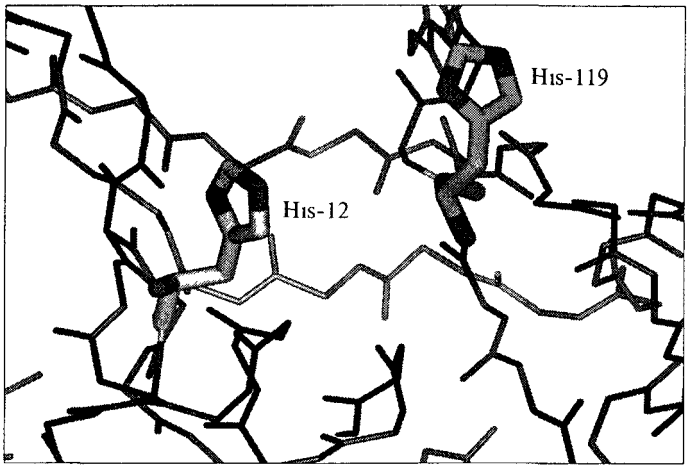


Рис. 8.12. Активный центр рибонуклеазы

Имидазольная группа His-12 активирует гидроксильную группу углевода путем переноса протона на стадии образования промежуточного циклофосфата. Имидазольная группа His-119 участвует в активации воды на стадии гидролиза циклофосфата.

Гидролазы типа щелочной фосфатазы или органофосфатгидролазы. Активные центры ферментов этой группы содержат ионы металлов (Zn^{2+}, Co^{2+} или Ni^{2+}), образующие комплексы с белком весьма

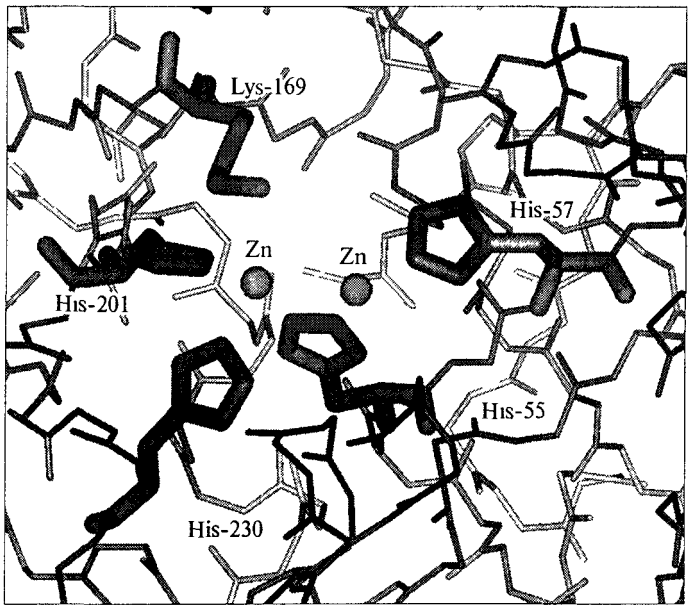
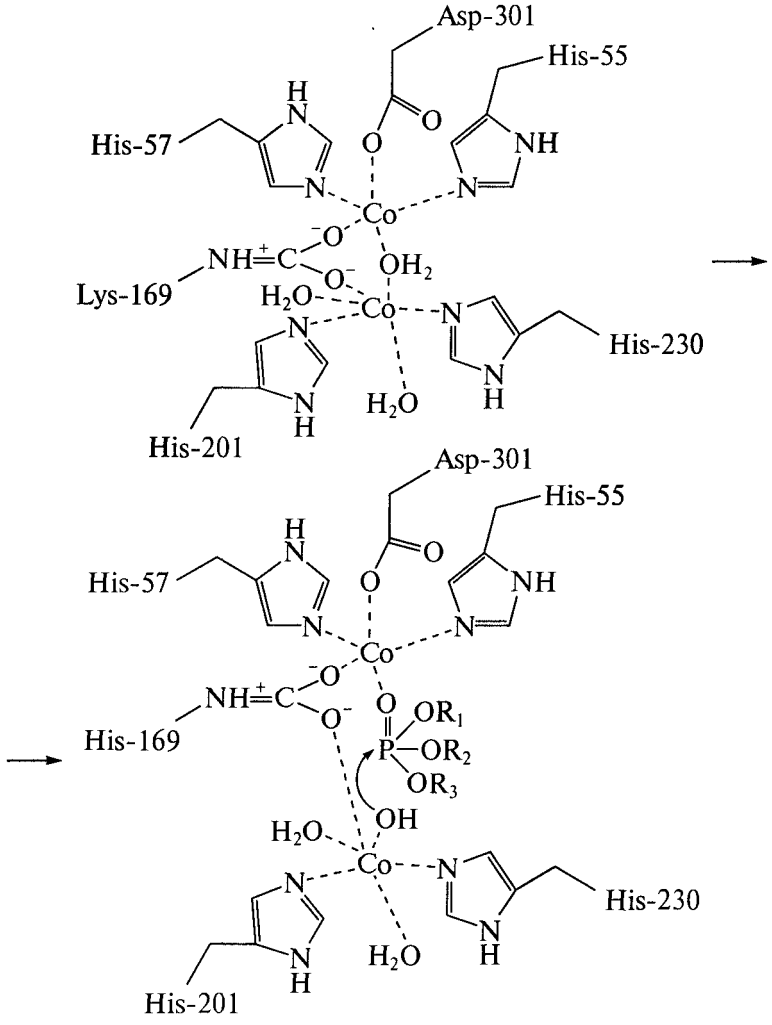


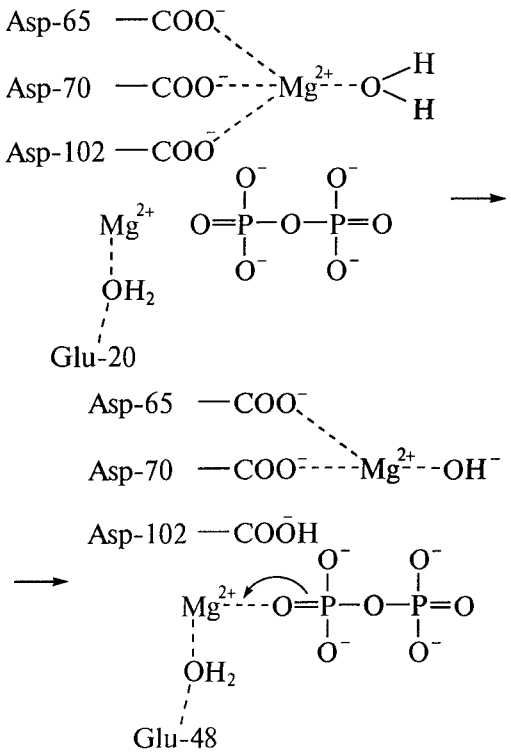
Рис 8 13 Активный центр органофосфатгидролазы

унифицированной структуры. В качестве лигандов выступают имидазольная группа гистидина и карбоксильные группы аспарагиновой или глутаминовой кислоты. Типичными представителями этой группы ферментов являются карбоксипептидаза А и термолизин.

Как известно, ионы металлов в активных центрах ферментов могут осуществлять функцию электрофильного агента, активирующего реакционный центр, а также функцию электрофильного активатора воды — генератора гидроксильных ионов (см. выше). Примером может служить органофосфатгидролаза (рис. 8.13) — фермент, катализирующий гидролиз фосфорорганических пестицидов, а также боевых отравляющих веществ типа зарин, зоман и ви-газ. Гидролиз под действием ферментов этого типа протекает согласованно с участием двух комплексов Zn^{2+} или Co^{2+} по схеме



Гидролазы типа пирофосфатазы (Mg^{2+}-, Mn^{2+}-зависимые гидролазы). Комплекс металла в активном центре гидролаз действует как сильный электрофильный агент, активирующий субстрат путем индуцирования на реакционном центре дефицита электронной плотности. Кроме того, комплекс металла может участвовать в электрофильной активации воды. Такая функция катионов металлов обнаружена при анализе механизма катализа Mg^{2+} (Mn^{2+})-зависимых ферментов, в частности неорганической пирофосфатазы (рис. 8.14). Субстрат фиксируется в активном центре фермента множеством ионных связей с участием положительно заряженных групп белка Lys-103, Arg-78, Lys-56. Основные каталитические процессы происходят, по-видимому, с участием двух других ионов металла — Mg^{2+} или Mn^{2+}. Лигандами высокоаффинного центра комплексообразования Mg^{2+} (или Mn^{2+}) являются карбоксильные группы Asp-65, Asp-70 и Asp-102, а также три молекулы воды. Низкоаффинный центр для металла образуется молекулами воды и карбоксильной группой Glu-20. Комплекс формально является положительно заряженным. Оправданным представляется предположение, что высокоаффинный центр выполняет функции электрофильного активатора воды (генератора гидроксильных ионов), а низкоаффинный — электрофильного агента, активатора субстрата:



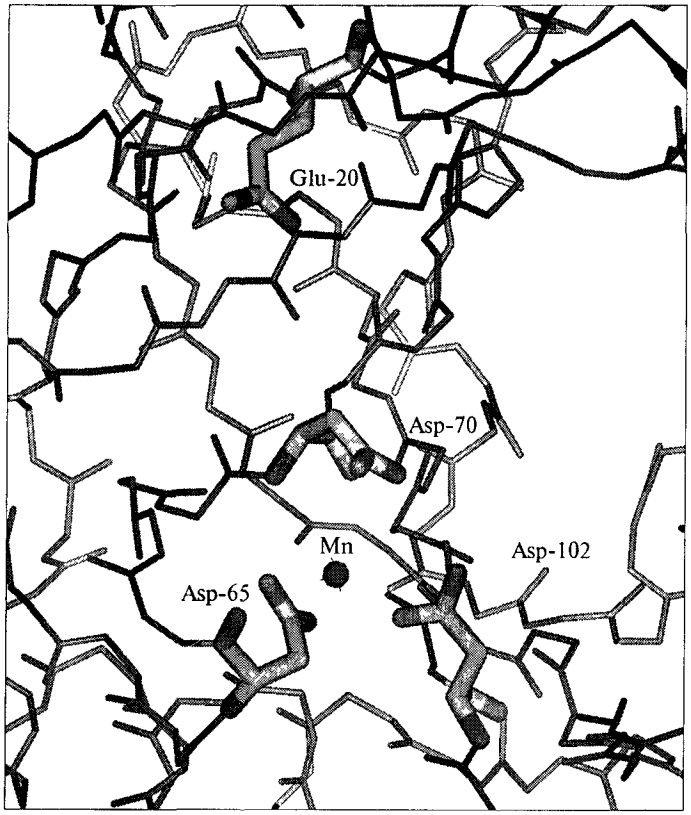


Рис. 8.14. Активный центр пирофосфатазы

Приведенные примеры демонстрируют определенную роль аспарагиновой кислоты и гистидина в механизме действия ферментов. Основным принципом функционирования активных центров ферментов является согласованное действие нуклеофильных и электрофильных компонентов активного центра, позволяющее ускорить реакцию во много раз. Очевидно, что аспарагиновая кислота играет принципиально важную роль в этих процессах. Ионизированная карбоксильная группа аспарагиновой кислоты или, реже, глутаминовой кислоты является мощным нуклеофильным реагентом и играет важную роль в активации молекул воды и процессах переноса протона. Аспарагиновая кислота также играет особую роль в формировании комплексов металлов, образующих активный центр ферментов. В протонированной форме карбоксильная группа аспарагиновой кислоты является донором протонов, выполняя, таким образом, роль электрофильного агента.

8.6. Глицин, цистеин и пролин как структурообразующие аминокислоты

Роль глицина в формировании и функционировании активных центров не столь очевидна, как роль аспарагиновой кислоты. Глицин в силу особенностей его строения не участвует в химических актах активации молекул в каталитическом цикле. Не обладая заместителем у α-атома углерода, глицин лишен выраженной химической функции. Тем не менее наличие глицина в структуре белка весьма важно. Так, сайт-специфическая замена глицина в консервативных позициях на любую из аминокислот приводит, как правило, к полной потере (или существенному снижению) активности фермента.

По-видимому, глицин в консервативных позициях принципиально важен по следующим причинам.

1. Являясь уникальной аминокислотой с наиболее энергетически облегченным вращением вокруг связей C—N и C—C полипептидной цепи, глицин может играть роль узловой точки, обеспечивающей возможность изменения направления полипептидной цепи при «сборке» аминокислотных остатков в активный центр. Таким образом, наличие консервативных глицинов позволяет объяснить структурный парадокс ферментативного катализа, когда одинаковые активные центры «собираются» из абсолютно разных полипептидных цепей. Общим для этих цепей являются наличие глицина в консервативных позициях и возможность стабилизации «собранной» структуры, например, за счет дисульфидных связей (цистеин также проявляет высокую степень консервативности, занимая третью позицию в рейтинге консервативности).

Интересно отметить, что фрагменты глицина в консервативных позициях в ферментах, как правило, сильно «вывернуты» по углу ψ (вращение по связи C—C в аминокислоте). На рис. 8.15 приведена карта Рамачандрана, где точками показаны значения φ и ψ для консервативных глицинов для большой группы ферментов. Видно, что значения углов для связи C—N произвольные и варьируются от –180° до +180°, в то время как значения углов для связей C—C группируются вокруг значений, отвечающих предельно «вывернутым» углам.

2. Глицин в консервативных позициях может играть роль конформационных «шарниров», обеспечивая возможность «сборки» активного центра и известную конформационную подвижность. Подтверждением этому служит то, что во многих случаях вблизи каталитически активных групп можно обнаружить глицин в консервативных позициях. Например, для гидролаз различных семейств консервативными являются следующие мотивы: Asp-215—X—Gly-217 (пепсин); Asp-170—X—X—Gly-173 (термолизин); Asp-32—X—Gly-34, His-63—Gly-64, Gly-219—X—Ser-221 (субтилизин);

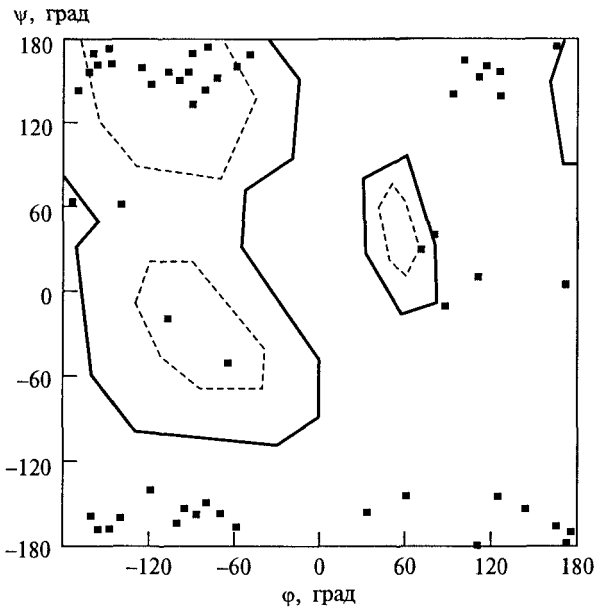


Рис. 8.15. Карта Рамачандрана для консервативных глицинов некоторых ферментов (α-химотрипсина, пепсина, субтилизина, термолизина, липазы, ДНК-полимеразы, цитохром-*c*-оксидазы, лактатдегидрогеназы) с известной структурой активного центра. Пунктирные линии отвечают минимальному значению энергии; сплошные линии — среднему значению энергии

Gly-173—X—Ser-177 (трипсин); His-76—Gly-77, Ser-153—X—Gly-155, Gly-175—X—Asp-177 (липазы). Здесь X — произвольная аминокислота. Аминокислоты Asp, Ser, His в указанных ферментах входят в структуру активных центров.

Интересно отметить, что для некоторых активных центров значения углов φ и ψ для аминокислот, входящих в каталитический активный центр, выходят за рамки энергетически «релаксированных». Это, например, следует из построения карты Рамачандрана для аминокислот, составляющих активный центр химотрипсина (His-58, Asp-102, Ser-195). Активный центр этого фермента конформационно напряжен (значения φ и ψ отвечают энергетически невыгодной области).

Превращение исходного субстрата в конечные продукты в ферментативном катализе сопряжено с участием большого числа интермедиатов с отличной от исходного субстрата структурой. Глицины активного центра могут играть роль «релаксирующих» элементов, конформационно подстраивая активный центр для следующего элементарного акта.

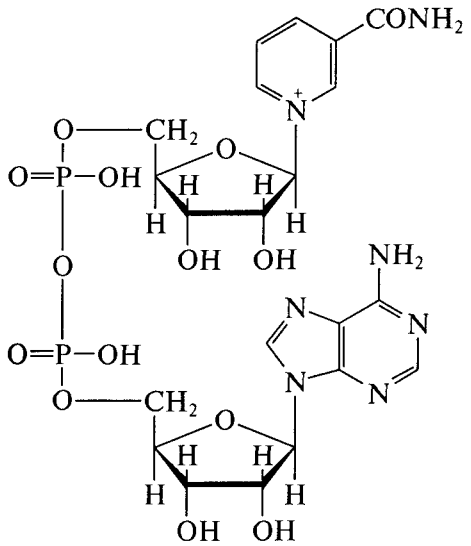
Существенную роль в формировании архитектуры активного центра играют цистеин и пролин (соответственно четвертая и пя-

тая позиция в рейтинге консервативности аминокислот). Пролин, как известно, является уникальной аминокислотой, разворачивающей полипептидную цепь. Роль цистеина заключается, по-видимому, в том, что необходимая конфигурация активного центра, складывающаяся из различных, часто очень удаленных друг от друга участков полипептидной цепи, фиксируется химической связью в виде дисульфидного мостика. Для многих ферментов это завершает формирование архитектуры активного центра.

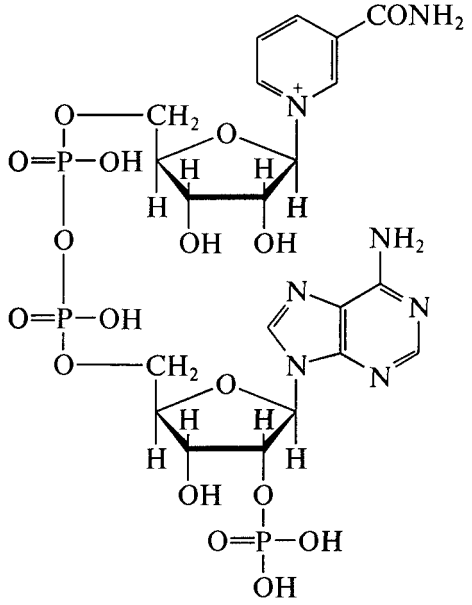
8.7. Оксидоредуктазы

Кислоты и основания, прежде всего аспарагиновая, глутаминовая кислоты и гистидин, играют основополагающую роль в активации молекул всех классов ферментов. Кислоты и основания как нуклеофильные и электрофильные агенты существенным образом увеличивают реакционную способность тех или иных группировок и способствуют перераспределению электронной плотности в молекулах реагирующих веществ. Рассмотрим особенности каталитического действия ферментов для классов, отличных от гидролаз.

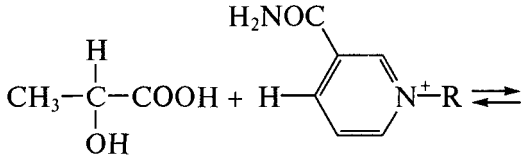
НАД$^+$-зависимые дегидрогеназы. Лактатдегидрогеназа. Важно отметить, что структурные элементы, составляющие каталитические центры гидролаз, обнаруживаются в активных центрах других классов ферментов. Например, очень часто цепь переноса заряда, включающую пару имидазол—карбоксильная группа, обнаруживают в активных центрах оксидоредуктаз. На примере лактатдегидрогеназы рассмотрим, как осуществляется электрофильно-нуклеофильный катализ для ферментов с участием в качестве кофактора никотинамидадениндинуклеотида (НАД$^+$):



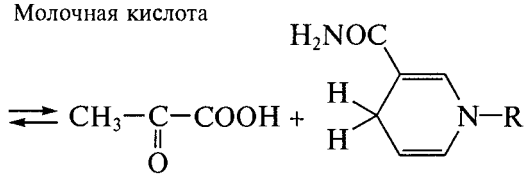
и никотинамидадениндинуклеотидфосфата ($НАДФ^+$):



Дегидрогеназы, использующие $НАД^+$ в качестве кофактора, осуществляют обратимое окисление — восстановление органических молекул, при этом в качестве донора (акцептора) гидрид-иона выступает кофактор. В случае лактатдегидрогеназы реакцию можно представить в виде



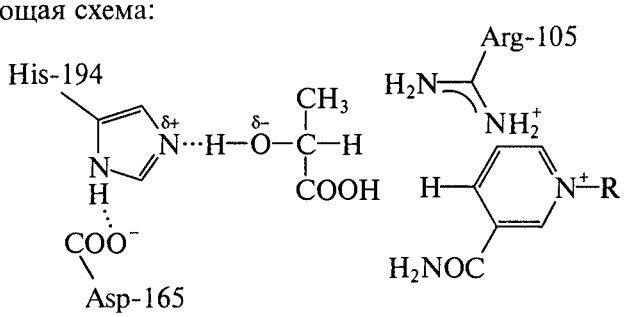
Молочная кислота



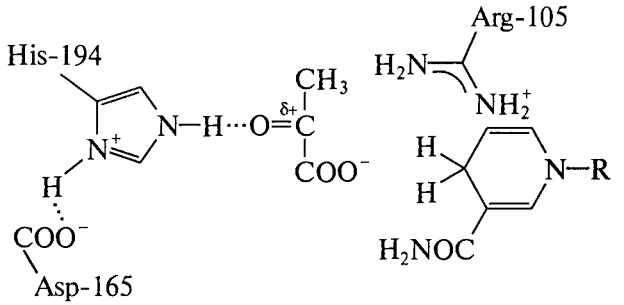
Пировиноградная кислота

Молочная кислота (Lac) превращается в пировиноградную (Pyr), при этом происходит переход окисленной формы $НАД^+$ в восстановленную НАДН. Редокс-компонентом кофактора является пиридиновая группа амида никотиновой кислоты. Реакция протекает через образование тройного комплекса Lac · $НАД^+$ · E или в обратном направлении — Pyr · НАДН · E. Данные по выравниванию белков, обладающих лактатдегидрогеназной активностью,

представлены на рис. 8.16. В качестве базовой последовательности выбрана лактатдегидрогеназа мышц. Каталитически активные группы фермента представлены Asp-165, His-194, Arg-105. Все эти аминокислоты являются консервативными ($H \approx 0$) в первичных последовательностях аминокислот в лактатдегидрогеназе. Молочная или пировиноградная кислоты фиксируются в активном центре с помощью положительного заряда аргинина-168. Участниками каталитического процесса являются протон-транспортная цепь His-195—Asp-165 и электрофильная группировка Arg-105. Можно представить себе несколько схем активации молекулы молочной кислоты под действием этих нуклеофильных и электрофильных агентов. Один из наиболее вероятных механизмов представляет следующая схема:



Перенос протона по водородной связи между имидазольной группой His-194 и гидроксильной группой молочной кислоты индуцирует на реакционном центре отрицательный заряд, что способствует переносу гидрид-иона на молекулу $НАД^+$. Электрофильным посредником в этом переносе является положительно заряженная гуанидиновая группировка Arg-105. Активация молекулы пировиноградной кислоты (обратная реакция) происходит по схеме:



В этом случае имидазол His-194 выступает как донор протона (электрофильный агент), индуцируя на реакционном центре положительный заряд, что обеспечивает перенос на атом углерода отрицательно заряженного гидрид-иона от НАДН. Каталитический транспорт гидрид-иона, как и в случае окисления молочной кислоты, обеспечивает положительно заряженная группировка Arg-105.

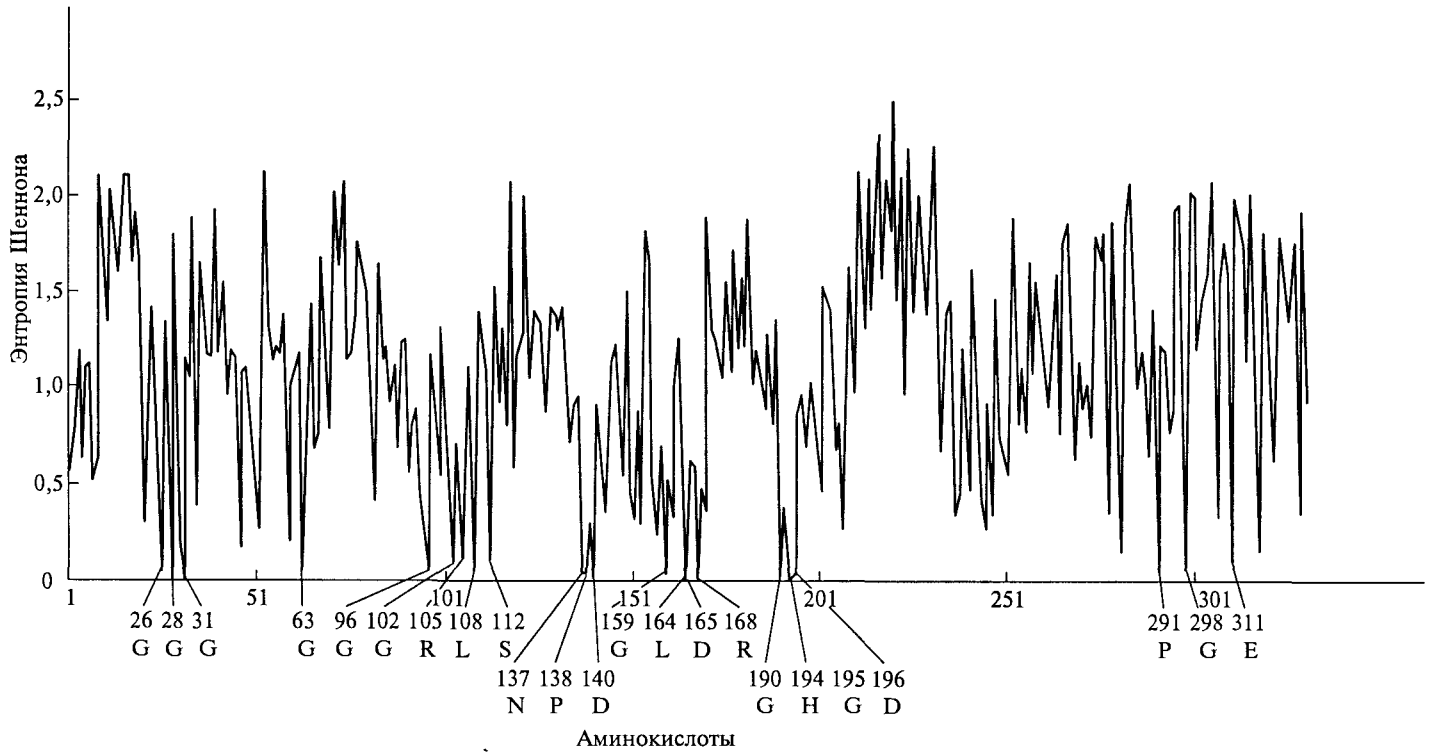
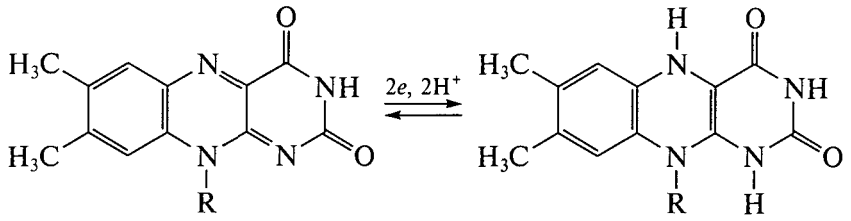


Рис. 8.16. Энтропия Шеннона, рассчитанная для позиций множественного выравнивания 150 гомологичных белков семейства лактатдегидрогеназы относительно лактатдегидрогеназы

Лактатдегидрогеназа является одним из представителей большой группы $НАД^+$-зависимых (или $НАДФ^+$-зависимых) дегидрогеназ. В эту группу входят более двухсот ферментов, обеспечивающих протекание большого числа окислительно-восстановительных реакций в организме. Наиболее известны такие ферменты этой группы, как алкогольдегидрогеназа, ацетальдегиддегидрогеназа, формиатдегидрогеназа и др.

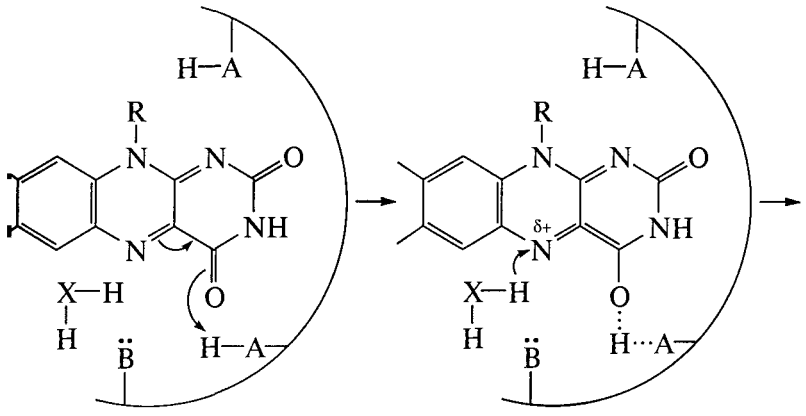
Флавинзависимые оксидоредуктазы. Окислительно-восстановительными компонентами многих ферментов являются флавины: флавинмононуклеотид (ФМН) или флавинадениндинуклеотид (ФАД). Редокс-процессы с участием этих кофакторов приводят к окислению — восстановлению флавиновой группировки:

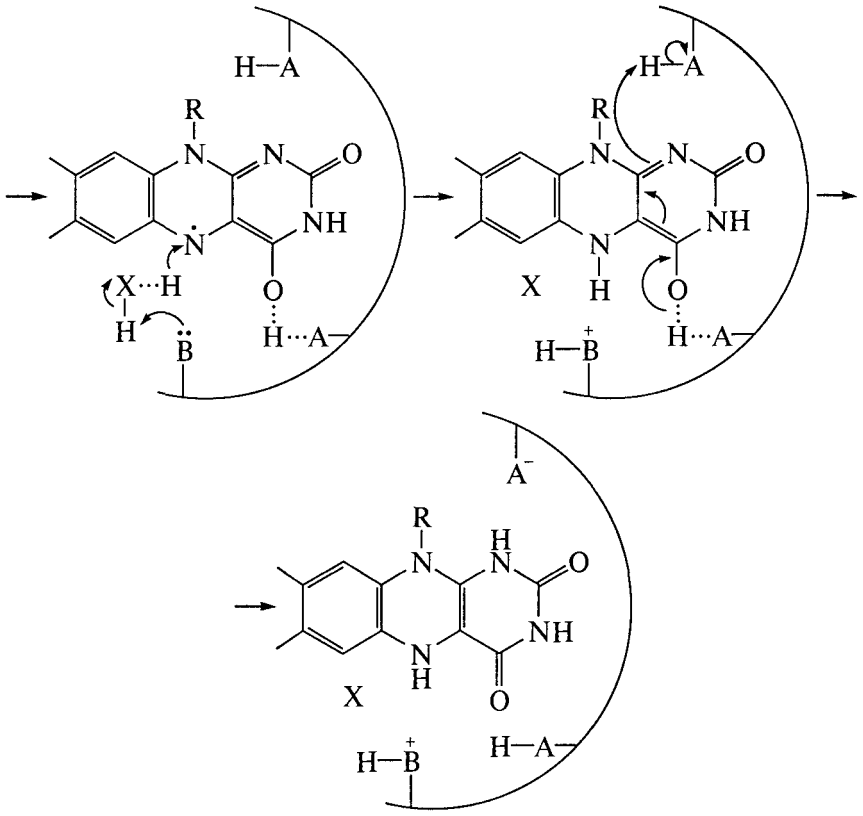


Флавинзависимые ферменты, так же как и $НАД^+$-, $НАДФ^+$-зависимые ферменты, катализируют большую группу окислительно-восстановительных реакций. Наиболее известными ферментами этого класса являются оксидазы, например глюкозоксидаза. В этой реакции глюкоза является донором двух атомов водорода, акцептором — кислород:

$$Глюкоза + O_2 \longrightarrow Глюконолактон + H_2O_2$$

Продуктами реакции являются глюконолактон и пероксид водорода. Глюконолактон неферментативно быстро гидролизуется с образованием глюконовой кислоты. Восстановление кофактора флавиновых ферментов происходит по схеме





Участниками процесса со стороны белковой глобулы являются основание В и кислоты АН. Основание В активирует донор водорода, передавая электронную плотность на реакционноспособный атом субстрата. Это увеличивает реакционную способность и обеспечивает перенос водорода. Две кислотные группировки АН являются электрофильными активаторами кофактора. Действуя согласованно, кислоты поляризуют систему сопряженных связей кофактора, создавая избыточный положительный заряд на атоме азота и кислорода, что обеспечивает перераспределение связей во флавиновой группировке.

Пероксидазы. Простагландин-Н-синтаза. Пероксидазы представляют собой большую группу окислительно-восстановительных ферментов, использующих в качестве субстрата пероксид водорода. Пероксидазы хорошо представлены в растениях, бактериях, грибах, в клетках млекопитающих. Принципиальную роль пероксидазы играют в развитии неспецифического иммунного ответа, генерируя в макрофагах и нейтрофилах сильные реакционноспособные окислители, уничтожающие чужеродные для организма

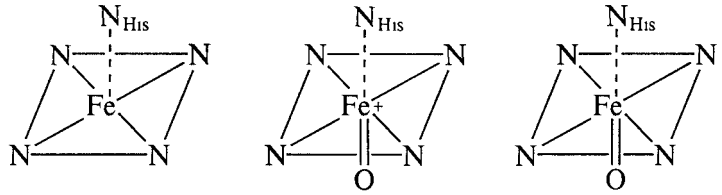
агенты. Наиболее известна и хорошо изучена пероксидаза, выделяемая из корней хрена.

Кинетическая схема действия пероксидаз включает образование нескольких реакционноспособных интермедиатов:

$$E + H_2O_2 \longrightarrow X_1 \xrightarrow[DH\ \ D^0]{} X_2 \xrightarrow[DH\ \ D^0]{} E$$

где E — свободная форма фермента (феррипероксидаза), X_1 — соединение I (λ_{max} = 410, 655 нм); X_2 — соединение II (λ_{max} = 420, 527, 554 нм); DH — субстрат — донор электронов или гидрид-ионов.

В качестве простатических групп в пероксидазах выступает гемин-железо(III)-протопорфириновый комплекс. Белковым лигандом железа в фермент-геминовом комплексе выступает имидазольная группа гистидина. Конфигурации комплексов железа(III) с протопорфирином для различных состояний активного центра пероксидазы имеют вид



Исходный комплекс Соединение I Соединение II

На рис. 8.17 показано строение активных центров трех пероксидаз, выделяемых из различных источников: цитохром-*c*-пероксидазы из клеток животных (*а*), пероксидазы из арахиса (*б*), грибной пероксидазы, окисляющей лигнин (*в*). Видно, что эти активные центры имеют много общего. При этом, как и в случае гидролитических реакций, нуклеофильные и электрофильные компоненты активного центра играют принципиально важную роль в структуре каталитического центра и, как следствие, особую роль в катализе.

Лигандом иона Fe^{3+} является имидазольная группа гистина (см. His-175, рис. 8.17, *а*; His-184, рис. 8.17, *б*; His-176, рис. 8.17, *в*). Положительно заряженный ион железа(III), представляющий собой мощный электрофильный агент, взаимодействует с неподеленной электронной парой азота имидазольной группы, образуя прочную координационную связь. Имидазольная группа образует также водородную связь с карбоксильной группой аспарагиновой кислоты (см. Asp-235, рис. 8.17, *а*; Asp-246, рис. 8.17, *б*; Asp-238, рис. 8.17, *в*). При этом имидазол является, как и в случае гидролаз, посредником при переносе электронной плотности от отрицательно заряженной карбоксильной группы к иону металла.

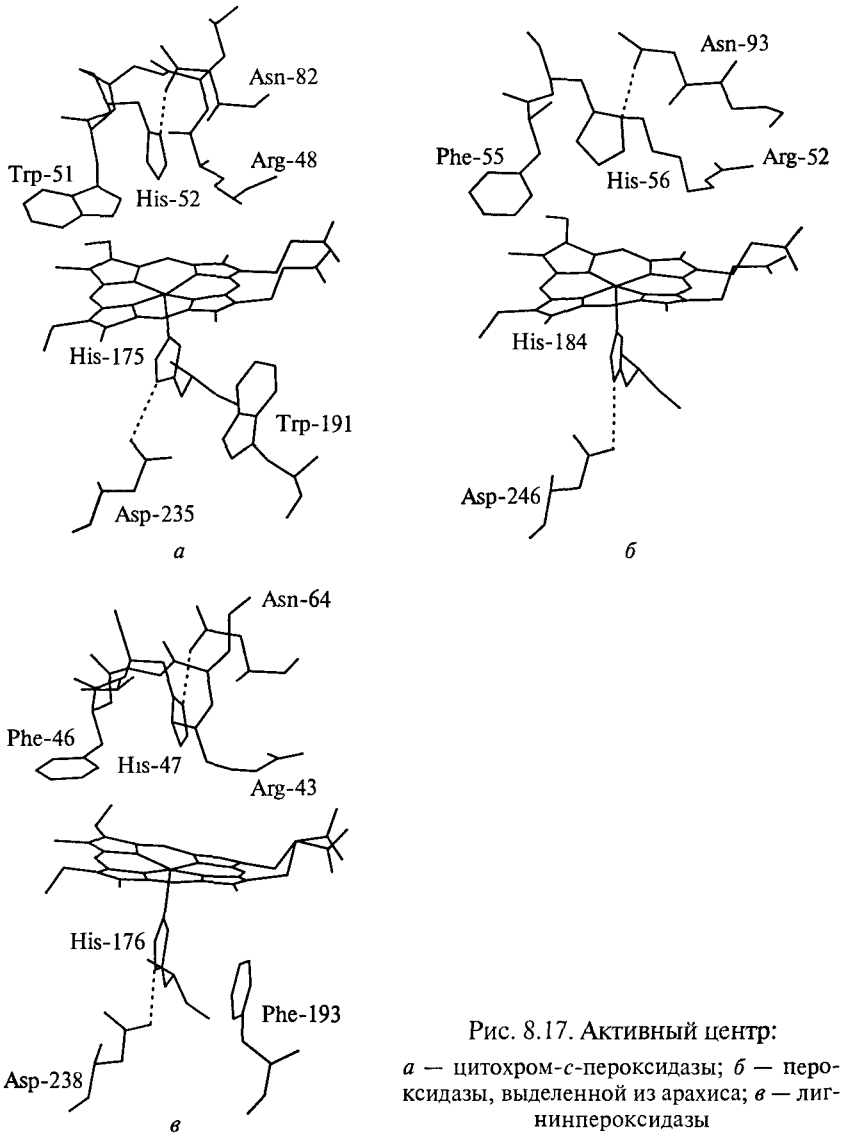


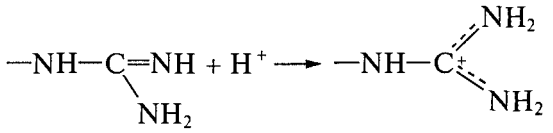
Рис. 8.17. Активный центр:

а — цитохром-*с*-пероксидазы; *б* — пероксидазы, выделенной из арахиса; *в* — лигнинпероксидазы

Как в случае триады сериновых протеаз и дегидрогеназ (см. выше), в активном центре пероксидаз действует мощный нуклеофильный агент — структурно организованная пара имидазольная группа гистидина — карбоксильная группа аспарагиновой кислоты. Этот нуклеотидный агент подает электронную плотность к реакционному атому железа, обеспечивающему каталитическое действие фермента.

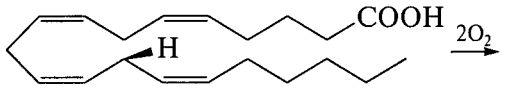
Важным участником каталитического цикла является имидазольная группа гистидина (см. His-52, рис. 8.17, *а*; His-56, рис. 8.17, *б*; His-47, рис. 8.17, *в*). Возможно, эта группа играет роль акцептора протона на стадии активации пероксида, тем самым существенным образом увеличивает окислительную способность пероксидазы. Кроме того, имидазольная группа может играть роль донора протона на стадии образования молекулы воды.

Пероксидазы в качестве компонента активного центра имеют гуанидиновую группировку аргинина (см. Arg-48, рис. 8.17, *а*; Arg-52, рис. 8.17, *б*; Arg-43, рис. 8.17, *в*). Как известно, гуанидиновая группа аргинина имеет весьма оригинальную электронную структуру:

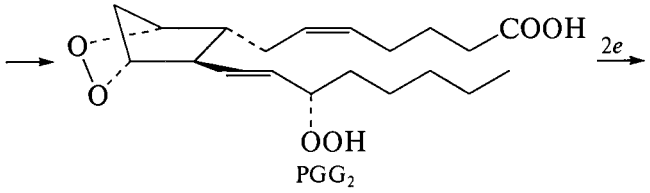


В протонированной форме оба атома азота эквивалентны, и, таким образом, в случае гуанидиновой группы аргинина имеем эффективный электрофильный агент с делокализованным положительным зарядом. Эта группа может играть важную роль при переносе электронов или гидрид-ионов от субстрата — донора электрона — к иону железа(III) в процессе восстановления соединений I и II. Важно отметить, что гуанидиновая группа играет такую же роль в механизме действия пероксидаз, как и в случае дегидрогеназ (см. выше).

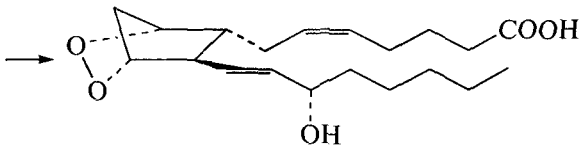
К пероксидазам близки ферменты, способные использовать в качестве субстрата органические перекиси. Большое значение в молекулярной физиологии животных и человека имеют эндопероксидпростагландинсинтазы. Другие употребляемые названия этого фермента — простагландин-Н-синтаза (PGH-синтаза) или циклооксигеназа. Активный центр фермента осуществляет очень сложную последовательность реакций превращения полиненасыщенной жирной арахидоновой кислоты в промежуточный простагландин H_2:



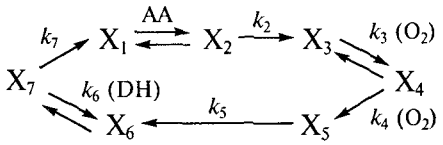
Арахидоновая кислота



PGG_2



Каталитический цикл осуществляется с участием четырех субстратов: арахидоновой кислоты, двух молекул кислорода и восстановителя — донора электронов. Химическое превращение включает присоединение молекулы кислорода, изомеризацию углеводородной цепи с образованием пятичленного цикла, образование гидроперекиси (PGG_2) и восстановление гидроперекисной группировки до оксигруппы с образованием PGH_2. Физиологически фермент чрезвычайно важен. Известно, что бóльшая часть используемых в медицинской практике противовоспалительных препаратов, таких как аспирин, анальгин, индометацин, ибупрофен и др., представляют собой эффективные ингибиторы этого фермента (см. подразд. 4.6). Формально-кинетическое исследование зависимости стационарной скорости реакции от концентрации всех четырех субстратов привело к кинетической схеме:



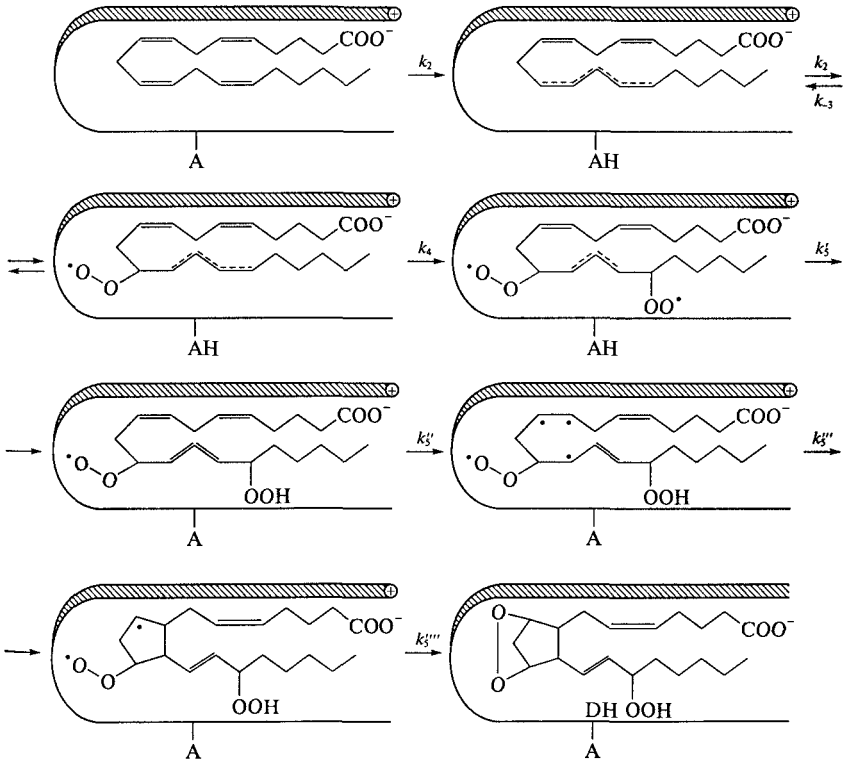
Процесс является четырехсубстратным (арахидоновая кислота, две молекулы кислорода, донор электронов). Схема включает четыре стадии ввода субстратов в каталитическом цикле. Из кинетических данных следует, что стадии ввода в реакцию арахидоновой кислоты и кислорода, кислорода и донора электронов, донора электронов и арахидоновой кислоты разделены необратимыми стадиями.

Имеющиеся в литературе сведения о структурных изменениях, сопровождающих переход арахидоновой кислоты в простагландин H_2, при сопоставлении их с кинетическими результатами позволяют представить молекулярную модель действия PGH-синтазы. Первым шагом в активации арахидоновой кислоты является комплексообразование молекулы субстрата с активным центром фермента. Важную роль в этом процессе играют гидрофобные взаимодействия и наличие карбоксильной группы ненасыщенной кислоты. Арахидоновая кислота электростатически взаимодействует с положительно заряженной гуанидиновой группой Arg-120 активного центра фермента.

Интересная информация о механизме окисления арахидоновой кислоты получена при использовании изотопно-замещенных производных субстрата. Была использована, в частности, кислота, атом H у 13-го атома углерода которой замещен на тритий.

Стереоспецифический в L-конформации атом водорода при 13-м атоме С отщепляется до стадии ввода кислорода с образованием стабильного радикала С(13). При этом наблюдается существенный изотопный эффект. Возможно, что процесс переноса атома водорода является лимитирующей стадией всей реакции, и максимальная скорость, наблюдаемая при «насыщении» фермента всеми субстратами, будет характеризовать элементарный акт переноса атома водорода от атома С(13), связанного с ферментом арахидоновой кислоты. Дальнейшие реакции представляют собой атаку и присоединение молекулы кислорода по 11-му положению, присоединение второй молекулы кислорода к атому С(15), изомеризацию двойной связи в 13-м положении, образование связи С—С между С(8) и С(12) и внутримолекулярную атаку кислородным радикалом по С(9). Эти быстрые радикальные процессы могут идти самопроизвольно без участия молекулы белка.

Наиболее вероятную последовательность превращений арахидоновой кислоты в активном центре фермента иллюстрирует схема



Стадия, характеризуемая константой k_2, представляет собой удаление атома водорода от арахидоновой кислоты эндогенным акцептором. Эта стадия инициирует дальнейшую перестройку мо-

лекулы арахидоновой кислоты. Важно подчеркнуть, что из кинетических данных следует, что присоединение молекул кислорода происходит упорядоченно: между первой равновесной стадией и второй бимолекулярной стадией могут происходить перенос протонов, конформационные изменения активного центра, но не могут протекать такие необратимые реакции, как изомеризация углеводородного скелета, образование новых С—С-связей.

На приведенной схеме превращения, следующие за стадиями присоединения кислорода, охарактеризованные константами скорости k_5', k_5'', k_5''', k_5'''', представляют собой внутримолекулярные перегруппировки, которые, по-видимому, протекают относительно быстро. В уравнение скорости эти константы будут входить в виде суммы обратных констант, и на кинетику может оказывать влияние лишь один наиболее медленный процесс.

Конечным продуктом цепи превращений является комплекс промежуточного простагландина G_2 с активным центром фермента. Этот комплекс может диссоциировать, и в отсутствие в системе донора электронов DH наблюдают появление этого гидроперекисного производного в растворе. Это соединение удалось выделить и охарактеризовать. В присутствии доноров электронов происходит быстрое восстановление гидроперекисной группы с образованием конечного продукта — простангландина H_2.

Принципиальным в выяснении механизма действия PGH-синтазы является вопрос: что же служит первичным акцептором атома водорода при атоме углерода в 13-м положении, инициирующим последующую сложную цепь радикальных реакций и перестройку углеводородного скелета молекулы. Ответ на этот вопрос дает сравнение PGH-синтаз с пероксидазами.

Простагландин-Н-синтаза обладает ярко выраженной пероксидазной активностью. В присутствии перекиси водорода можно наблюдать каталитическое окисление всех субстратов — доноров электронов или атома водорода, характерных для пероксидаз (см. выше).

Каталитически активные группы, осуществляющие этот сложный цикл превращений, представлены на рис. 8.18, 8.19. Как было отмечено выше, арахидоновая кислота фиксируется в активном центре путем электростатического взаимодействия с положительно заряженной гуанидиновой группой Arg-120. Структура гема и его окружения в случае PGH-синтазы является типичной для пероксидаз. Принципиальное отличие заключается в том, что в случае PGH-синтазы донором атома водорода, необходимого для восстановления гема в каталитическом цикле, является внутримолекулярный внутрибелковый донор — Tyr-385. Образовавшийся за счет отрыва атома водорода (или электрона с последующим отщеплением протона) активный тирозильный радикал способен компенсировать свою ненасыщенную валентность путем отщепления атома водорода от атома углерода в 13-м положении

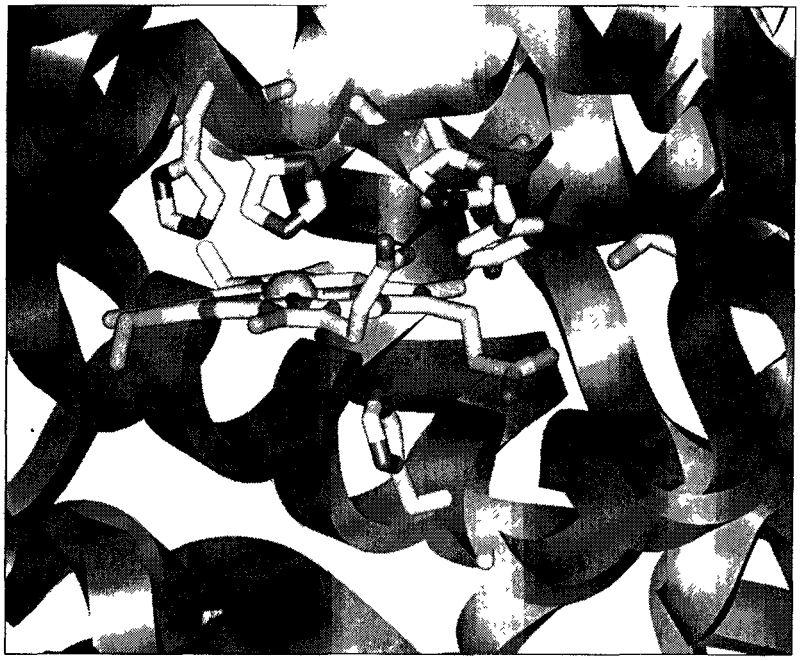


Рис. 8.18. Белковая структура и активный центр простагландин-Н-синтазы

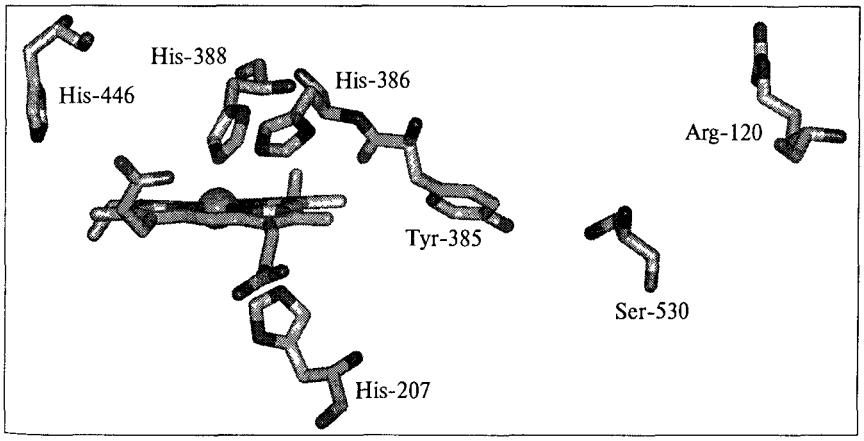


Рис. 8.19. Функциональные группы, входящие в активный центр простагландин-Н-синтазы

арахидоновой кислоты. Далее последовательно протекают все стадии превращения полиненасыщенной кислоты в простагландин PGG_2, представленные выше. Известно, что промежуточный метастабильный простагландин G_2 способен покинуть активный

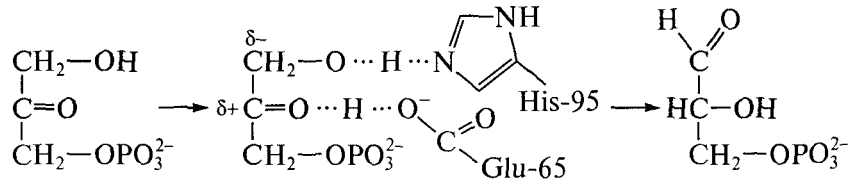
центр фермента и может быть выделен как химическое соединение. Его дальнейшая трансформация в PGH_2 осуществляется геминовым центром по классической пероксидазной реакции. При этом донором водорода является независимый восстановитель DH. Если его не добавлять в реакционную смесь, реакция останавливается на гидроперекисном простагландине PGH_2. В случае проведения реакции с H_2O_2 и донором водорода тот же активный центр осуществляет классическую пероксидазную реакцию.

Из сравнения рис. 8.17 и 8.19 видно, что каталитический центр PGH-синтазы мало отличается от каталитического центра пероксидазы. Имидазольная группа His-388, по-видимому, акцептирует протон от гидроперекиси, увеличивая тем самым окислительную реакционную способность гидроперекиси. Основное отличие заключается в том, что вместо аргинина в случае PGH-синтазы имеем функциональную группу имидазола-386. Возможно, что имидазол в протонированной форме может играть роль электрофильного внутримолекулярного медиатора переноса электрона от донора к иону железа.

8.8. Изомеразы. Триозофосфатизомераза

Изомеризацию молекул, которую осуществляют ферменты класса изомераз, так же как и во всех рассмотренных выше случаях, инициируют кислоты и основания, входящие в каталитический центр фермента. Классическим примером является механизм действия триозофосфатизомеразы. Ферменты этого типа участвуют в процессе гликолиза и представляют собой весьма эффективные катализаторы изомеризации, характеризующиеся $k_{кат} = 10^3\ с^{-1}$ и выше. Каталитически важные группировки активного центра фермента представлены остатками Glu-165 и His-95.

Механизм активации включает согласованное действие His-95 как основания и Glu-165 как кислоты. Процесс изомеризации можно представить следующим образом:



Кислоты и основания действуют по механизму «тяни — толкай». Имидазольная группа донирует электронную плотность, индуцируя на одном атоме углерода отрицательный заряд δ–; в то же время кислота донирует протон по пути образования водородной связи, индуцируя на втором атоме углерода положительный заряд δ+. Это обеспечивает очень высокие скорости катализа.

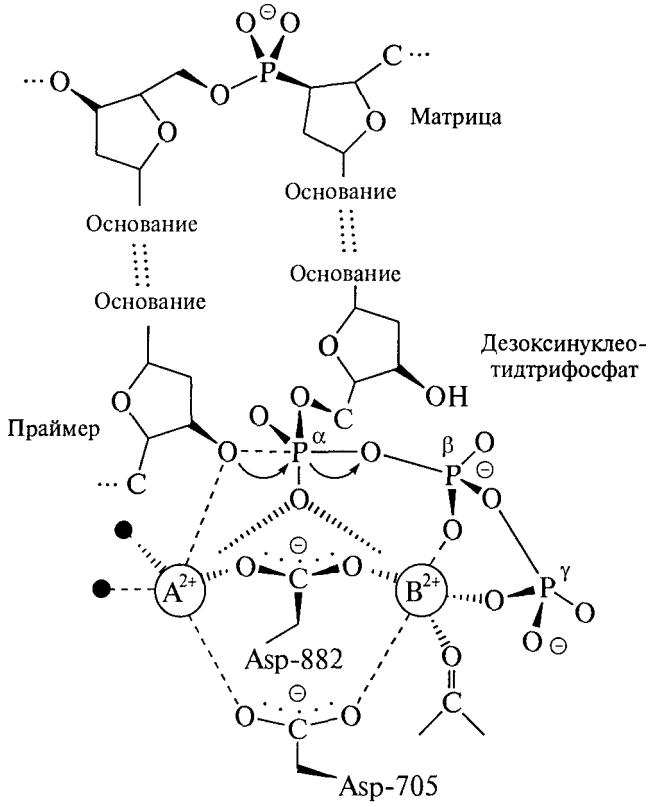
8.9. Трансферазы. ДНК-полимераза

ДНК-полимеразы — ключевые ферменты репликации ДНК, осуществляющие синтез дочерней цепи нуклеиновой кислоты, комплементарной исходной. В химическом смысле ДНК-полимеразы переносят дезоксирибонуклеотид-5′-трифосфаты на оксигруппу 3′-концевой рибозы растущей полинуклеотидной цепи. Субстратами фермента являются матричная одноцепочечная ДНК, праймер, комплементарно сорбированный на матрице и предоставляющий для реакции 3′-гидроксильную группу, набор нуклеозидтрифосфатов. Схему реакции можно представить в виде

$$...pdX_t dX_{t+1}—OH + pppX_{t+2}—OH \longrightarrow$$
$$\longrightarrow ...pdX_t dX_{t+1} dX_{t+2}—OH + P_2O_7^{4-}$$

где $...pdX_t dX_{t+1}—OH$ — растущая цепь нуклеиновой кислоты; $pppX_{t+2}—OH$ — нуклеозидтрифосфат.

Согласно классификации ферментов ДНК-полимеразы являются трансферазами. Суть протекающих в активном центре ДНК-полимеразы процессов позволяет понять схема:



Показана полинуклеотидная цепь исходной одноцепочечной ДНК (матрица). Праймер образует высокоспецифичный комплекс с матрицей за счет комплементарных взаимодействий между пиримидин-пуриновыми основаниями. Праймер, как правило, представляет собой довольно длинную полинуклеотидную цепь, включающую десять (и выше) оснований, что делает комплекс между матрицей и праймером высокоспецифичным и прочным. (На схеме изображен лишь последний фрагмент праймера, предоставляющий для реакции 3′-гидроксильную группу дезоксирибозы.) Нуклеозидтрифосфат селектируется и ориентируется за счет комплементарного взаимодействия между основаниями матрицы и нуклеотидом.

Химический процесс заключается в фосфорилировании 3′-гидроксильной группы праймера α-фосфатом нуклеозидтрифосфата (показаны атомы фосфора α, β, γ).

Ключевыми компонентами активного центра ДНК-полимераз являются комплексы ионов металлов A^{2+}, B^{2+} (Mg^{2+} или Mn^{2+}) с карбоксильными группами аспарагиновой кислоты Asp-705 и Asp-882.

Ион металла A^{2+} активирует реакционный центр (α-фосфат) по электрофильному механизму, индуцируя на реакционном центре избыточный положительный заряд. Второй ион металла B^{2+} активирует гидроксильную группу дезоксирибозы, в конце концов замещая ион водорода на ион металла. Образовавшийся нуклеофил атакует атом фосфора, осуществляя нуклеофильное замещение. В результате образуется фосфодиэфирная связь и отщепляется пирофосфат-ион.

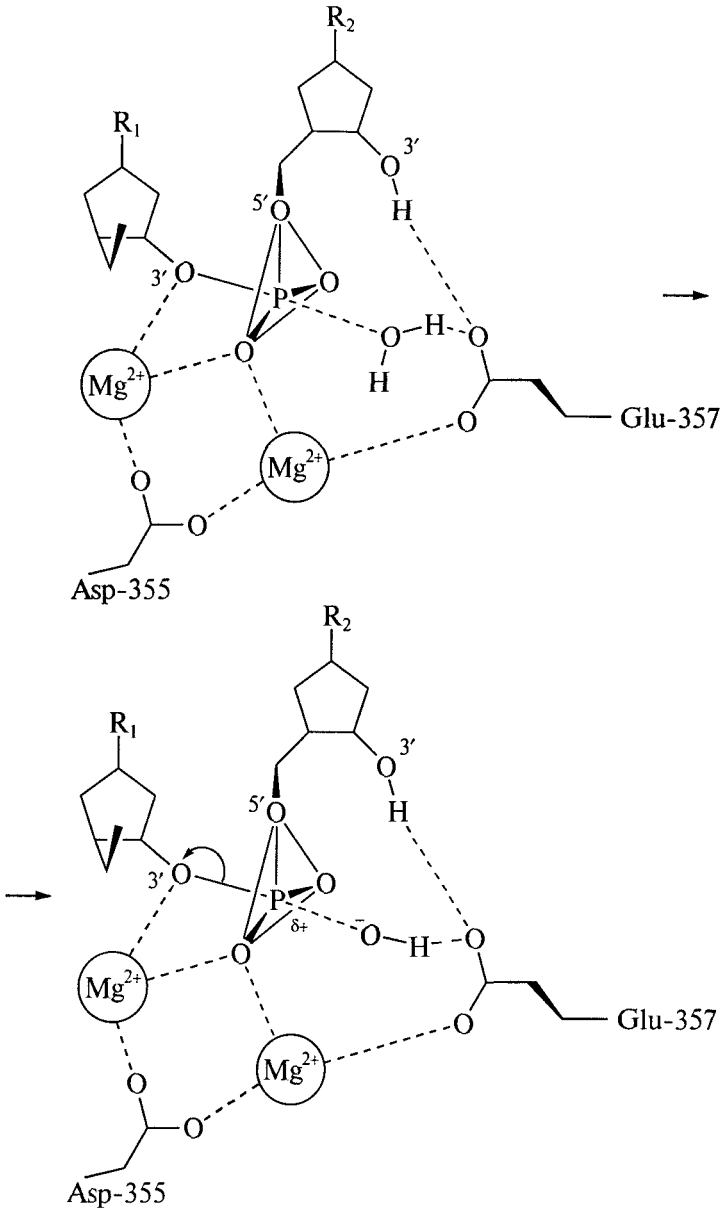
Если читатель внимательно прочел раздел этой главы, посвященный гидролазам, он с некоторым удивлением обнаружил, что аналогичный механизм приведен выше при обсуждении механизма действия гидролаз пирофосфатного типа. Аналогично работают гидролазы, осуществляющие гидролиз нуклеиновых кислот (ДНКазы).

Активный центр фермента, синтезирующего ДНК, — ДНК-полимеразы — в высокой степени гомологичен активному центру нуклеазы — фермента, гидролизующего ДНК. Структурно активные центры ферментов очень близки.

В ДНК-полимеразе происходит активация реакционного центра нуклеофила теми же функциональными группами, что и в пирофосфатазе и экзонуклеазе. Однако вместо активации воды путем замещения протона в ДНК-полимеразе активируется гидроксильная группа сахара. Нуклеофильная атака по реакционному центру фосфатной группы обеспечивает продолжение цепи ДНК.

Каталитический центр одной из экзонуклеаз, гидролизующих ДНК, представляет собой комплекс ионов магния, сформиро-

ванный с участием карбоксильных групп аспарагиновой и глутаминовой кислот:



Таким образом, в этом случае имеем пример весьма простого перехода от ферментов, гидролизующих отдельные связи, к ферментам, образующим эти связи. Структурного замещения воды на

другой возможный нуклеофил достаточно для создания активного центра, способного провести синтетическую реакцию.

Отметим, что многие гидролазы являются синтетазами при введении в реакцию дополнительного нуклеофильного реагента. Так, пептидазы часто используются для синтеза пептидной связи, гликозидазы — для синтеза гликозидов. Переход от нуклеаз к ДНК-полимеразам является примером этого свойства ферментативного катализа.

8.10. Многоэлектронные процессы в активных центрах ферментов

Кислоты и основания, составляющие активные центры ферментов, являются главными агентами, обеспечивающими активацию тех или иных связей в молекулярных субстратах ферментативной реакции. Однако известны и другие структурные образования, формирующие активные центры ферментов и обеспечивающие высокую эффективность ферментативного катализа. В ряде случаев для протекания реакций с высокой скоростью ферменты должны катализировать необычные химические превращения, в результате которых предотвращается образование энергетически невыгодных интермедиатов.

Классическими примерами в этой области представляются нитрогеназы и синие медьсодержащие оксидазы.

Нитрогеназа. Биологическое восстановление азота осуществляется сложным белковым комплексом, включающим как белки — переносчики электронов, так и белки — катализаторы гидролиза АТФ.

Процесс восстановления азота сопровождается гидролизом АТФ и образованием молекулярного водорода:

$$N_2 + 8H^+ + 8e + 16АТФ \xrightarrow{\text{Нитрогеназа}}$$
$$\longrightarrow 2NH_3 + H_2 + 16АДФ + 6P_2O_7^{2-}$$

Оставляя в стороне сложный вопрос о роли гидролиза АТФ в этом процессе, рассмотрим особенности окислительно-восстановительных процессов.

Для того чтобы восстановить молекулу азота до двух молекул аммиака, необходимо ввести в молекулу азота 6 электронов и 6 протонов. Очевидно, что это предполагает некоторую последовательность стадий и образование возможных промежуточных полувосстановленных форм. Расчеты показывают, что образование некоторых интермедиатов термодинамически невыгодно, и неблагоприятная энергетика их образования не может быть компенси-

рована взаимодействием с компонентами активного центра. Высокий термодинамический барьер образования интермедиатов в этом случае должен приводить к низким скоростям реакции (рис. 8.20).

Очевидно, для того чтобы избежать одноэлектронного восстановления и образования термодинамически неблагоприятных интермедиатов, ферментативный катализ должен использовать атомы, имеющие такую конфигурацию, которая обеспечит возможность многоэлектронного восстановления.

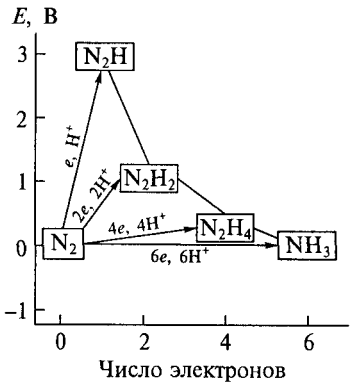


Рис. 8.20. Термодинамика образования промежуточных соединений в реакциях восстановления молекулярного азота

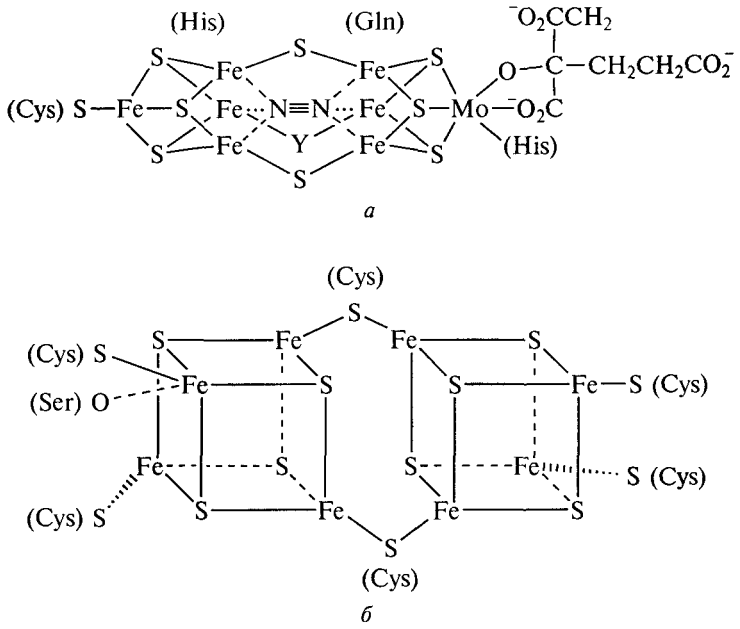
Нитрогеназная ферментная система состоит из двух базовых белков, большого Mo-Fe-белка (молибденферредоксина) и малого Fe-белка (азоферредоксина). В природе имеются также нитрогеназы, содержащие ванадий. Mo-Fe-белок содержит два типа редокс-центров, Fe-Mo-кофактор и железо-серный кластер. Fe-Mo-кофактор содержит один атом Mo и 6—8 атомов железа, 8—10 атомов серы. В состав Fe-Mo-кофактора входит один остаток гомолимонной кислоты. Второй компонент Mo-Fe-белка представляет собой кластер 4Fe : 4S. Структура Fe-Mo-кофактора и железо-серного кластера нитрогеназы представлена на рис. 8.21. На рис. 8.21, *а* приведена также предполагаемая структура комплекса кофактора с молекулой азота.

Возможны несколько механизмов восстановления азота активным центром нитрогеназы. Наиболее вероятно, что восстановленный Mo-Fe-белок переносит электрон на диазотидные связи азота, связанного с Fe-Mo-кофактором. Поливалентные состояния Fe-Mo-кофактора способны аккумулировать несколько электронов, обеспечив, в конечном итоге, шестиэлектронное восстановление молекулы азота. В соответствии с предполагаемой схемой электроны последовательно переносятся на комплекс азота N≡N с Fe-Mo-кофактором, при этом стабилизирующим фактором на каждой стадии является присоединение протона:

$$(Fe, Mo) \xrightarrow{N_2} (Fe, Mo)\cdots(N\equiv N) \xrightarrow{e,\ H^+} (Fe, Mo)—N=NH \xrightarrow{e,\ H^+}$$

$$\rightarrow (Fe, Mo)=N—NH_2 \xrightarrow{e,\ H^+} (Fe, Mo)—NH—NH_2 \xrightarrow{e,\ H^+}$$

$$\rightarrow (Fe, Mo)\cdots NH_2—NH_2 \xrightarrow{2e,\ 2H^+} (Fe, Mo) + 2NH_3$$



а

б

Рис. 8.21. Структура Fe-Mo-кофактора (*а*) и железо-серного кластера (*б*), входящих в активный центр нитрогеназы

Предполагается, что на последней стадии возможно двухэлектронное восстановление гидразина в аммиак. Это позволяет избежать образования наиболее термодинамически невыгодного интермедиата.

Возможен также механизм восстановления азота до аммиака, состоящий из трех двухэлектронных стадий. В этом случае фермент мог бы выбрать путь реакции через наиболее термодинамически выгодные промежуточные соединения:

$$(Fe, Mo) \xrightarrow{N_2} (Fe, Mo)\cdots(N\equiv N) \xrightarrow{2e,\ 2H^+}$$

$$\rightarrow (Fe, Mo)=N-NH_2 \xrightarrow{2e,\ 2H^+} (Fe, Mo)\cdots N-NH_2 \xrightarrow{2e,\ 2H^+}$$

$$\rightarrow (Fe, Mo) + NH_3$$

Реальный механизм восстановления азота до сих пор не установлен. Однако обе схемы реакции с высокой степенью вероятности предполагают наличие стадии двухэлектронного переноса электронов.

Системы биологического восстановления азота не являются единственными системами, в которых возможны двухэлектронные стадии восстановления молекулы. Имеются экспериментальные дан-

ные, показывающие, что восстановление кислорода в режиме безрадикальных процессов также протекает с участием двухэлектронных стадий. Рассмотрим ферменты этого типа более подробно.

Ферменты реакций восстановления кислорода до воды (лакказа, аскорбатоксидаза, цитохром-*с*-оксидаза). В настоящее время известно много ферментов, активирующих молекулярный кислород. Отличительной чертой этих ферментов является участие в механизме катализа ионов меди, входящих в активные центры ферментов. Некоторые ферменты способны четырехэлектронно восстанавливать кислород до воды без промежуточного образования перекиси водорода. В качестве примера можно привести цитохром-*с*-оксидазу, лакказы, аскорбатоксидазу, церрулоплазмин; это так называемые синие медьсодержащие ферменты.

Важной чертой механизма действия синих медьсодержащих оксидаз является возможность и необходимость синхронного переноса нескольких электронов в одном элементарном акте катализа. Этот феномен представляется весьма интересным и требует тщательного экспериментального и теоретического анализа.

Наиболее детально в настоящее время исследованы медьсодержащие оксидазы, получившие название лакказы. Это обобщающее тривиальное название выделяемых из различных источников ферментов, окисляющих фенолы и ароматические диамины молекулярным кислородом. Кроме ароматических спиртов и аминов субстратами лакказ могут быть также неорганические ионы.

Медьсодержащая оксидаза — цитохром-*с*-оксидаза — играет ключевую роль в механизме дыхания и биоэнергетике животных и человека. Это терминальный фермент дыхательной электронно-транспортной цепи митохондрий, осуществляющий восстановление кислорода до воды.

Многолетние биохимические исследования лакказ из различных источников показали, что активный центр фермента содержит четыре иона меди(II), существенно различающиеся по свойствам и роли в механизме действия фермента.

Спектры поглощения иона меди(II) первого типа характеризуются наличием интенсивных полос в области 600—700 нм, что объясняет синюю окраску белка. В табл. 8.2 приведены спектральные характеристики иона меди(II) первого типа лакказ, выделенных из разных организмов. Интересно отметить, что интенсивность полос поглощения в спектрах «синего» иона меди(II) в лакказах в области 600 нм существенно выше, чем в спектрах обычных низкомолекулярных комплексов меди(II).

Ионы меди первого типа в лакказе и других медьсодержащих оксидазах могут быть обнаружены с помощью спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Необычные параметры спектра ЭПР «синего» иона меди обусловлены, вероятно, тем, что координационный полиэдр иона Cu^{2+} в лакказах имеет тетра-

Таблица 8.2

Спектральные характеристики иона меди первого типа лакказ, выделенных из разных организмов

Фермент	Длина волны, нм	Коэффициент экстинкции, моль$^{-1}$ · см$^{-1}$
Лакказа (*Polyporos versicolor*)	300	30 000
	440	800
	610	4600
	720	2000
Лакказа (*Rhus vernicifera*)	320, 450	2600
	614	5200
	788	900
Лакказа (*Rhus sussedena*)	325, 455	3200
	610	4500
	770	1200

эдрическое строение, а не квадратно-плоскостное. Такое предположение объясняет необычность спектров ЭПР, оптическую активность, высокий окислительно-восстановительный потенциал системы.

В спектрах ионов меди второго типа в области 600 нм также имеется полоса с коэффициентом экстинкции 300—400 моль$^{-1}$ · см$^{-1}$, что существенно ниже коэффициентов экстинкции соответствующих полос в спектрах поглощения «синего» иона. Ионы второго типа, так же как и первого, могут быть обнаружены методом ЭПР. При этом параметры спектров ЭПР аналогичны параметрам низкомолекулярных комплексов меди(II). Ионы меди второго типа, так же как и ионы первого типа, необходимы для проявления каталитической активности фермента. Важно подчеркнуть, что классические ингибиторы лакказ (ионы фтора, азид- и цианид-ионы) образуют комплексы с ионами меди второго типа и тем самым блокируют ферментативную активность.

Помимо ионов меди(II) первого и второго типа лакказа содержит два иона меди, которые в спектрах ЭПР не проявляются. Это так называемые ионы третьего типа. Причины отсутствия в спектрах ЭПР сигнала, обусловленного ионами третьего типа, могут быть различными. Наиболее вероятной причиной является сильное взаимодействие между двумя ионами Cu^{2+}, приводящее к спариванию спинов электронов. Было проведено исследование окисленной формы лакказы *P. versicolor* в отсутствие кислорода и показано, что диамагнитная форма меди находится в белке в виде димера Cu^{2+}—Cu^{2+} со спаренными спинами электронов. Объединение двух ионов меди в биядерный комплекс позволяет функционировать ему как двухэлектронному донор-акцептору электронов.

Ионы меди(II) в лакказе микробного происхождения имеют необычно высокие значения окислительно-восстановительного потенциала (E_0). При pH 5,5 окислительно-восстановительный потенциал ионов Cu^{2+} первого типа равен +0,785 В, ионов третьего типа равен +0,782 В. При этом окислительно-восстановительный потенциал ионов меди третьего типа зависит от окружения ионов меди второго типа. Присоединение фторид-иона к Cu^{2+} смещает окислительно-восстановительный потенциал на 0,21 В. Это указывает на наличие структурной и функциональной связи между ионами меди второго и третьего типа. Существует экспериментальное свидетельство в пользу того, что ионы второго типа участвуют в связывании кислорода. Структура одной из синих медьсодержащих оксидаз — аскорбатоксидазы — приведена на рис. 8.22. На рис. 8.23 показан активный центр лакказы. Основными лигандами ионов меди в активных центрах синих оксидаз являются имидазольные группы гистидина (см. рис. 8.23). Активный центр этих ферментов насыщен этими ароматическими основаниями.

Детальное исследование спектров ЭПР лакказы показало, что одним из лигандов ионов меди второго типа является вода, которая может быть замещена ионом фтора, что ведет к ингибированию каталитической активности.

Последовательность и характер электронных переходов в процессе восстановления кислорода лакказой — принципиальный вопрос молекулярного механизма действия фермента. Восстановление кислорода до двух молекул воды требует переноса четырех электронов. Лакказа содержит четыре иона меди, способных из-



Рис. 8.22. Белковая структура и активный центр синей медьсодержащей аскорбатоксидазы

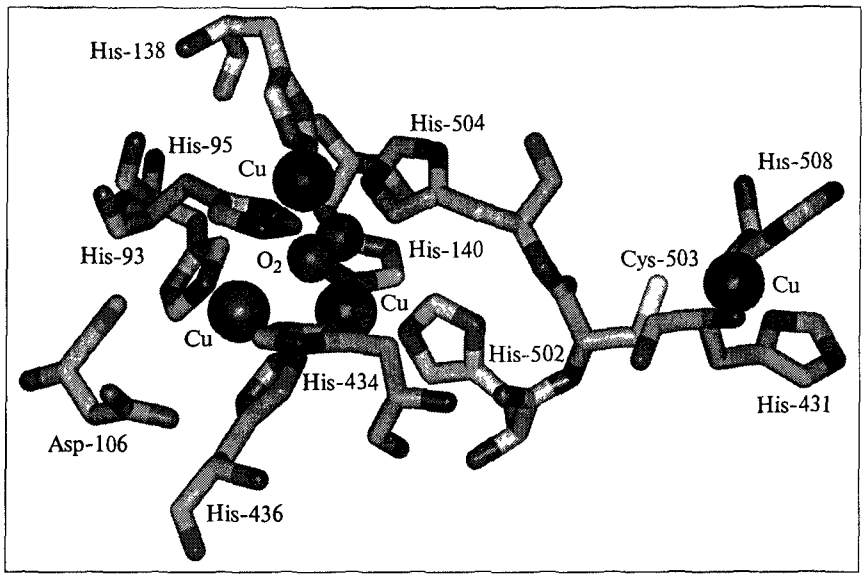


Рис. 8.23. Активный центр лакказы

менять свою валентность, и было бы логично предположить, что восстановленные ионы меди, объединенные в комплексы в активном центре фермента, способны синхронно или последовательно восстанавливать молекулу кислорода.

Первоначальная гипотеза основана на представлении об эквивалентности ионов меди и синхронном восстановлении кислорода. Детальное исследование, проведенное в лаборатории профессора Б. Мальмстрема, показало, что ионы меди не эквивалентны и существенно отличаются в структурно-функциональном отношении. При обсуждении механизмов реакций полезно обратиться к термодинамическим данным, характеризующим образование возможных промежуточных соединений. Анализ показывает, что образование некоторых интермедиатов термодинамически невыгодно, что делает маловероятным их участие в механизме каталитических превращений. Из термодинамики реакций следует, что одноэлектронное восстановление кислорода с образованием супероксид-радикала (E_0(pH 7) = −0,45 В)) практически невозможно при использовании таких классических субстратов лакказы, как феррицианид-ион (E_0 = +0,36 В) или гидрохинон (E_0 = +0,69 В). Поэтому было предположено, что механизм катализа лакказой включает два последовательных элементарных акта переноса двух электронов. При изучении кинетики реакций, катализируемых лакказой, методом остановленной струи сделаны важные наблюдения, имеющие большое значение при анализе механизма восстановле-

ния кислорода. Обнаружено промежуточное соединение активного центра лакказы с кислородом, которое представляет собой одно из полувосстановленных состояний кислорода. При смешивании лакказы, содержащей полностью восстановленные ионы меди, с кислородом сравнительно быстро осуществляется перенос на кислород трех электронов с участием ионов меди первого и третьего типа, при этом ион меди второго типа остается в восстановленном состоянии. Анализ спектров ЭПР образовавшегося промежуточного соединения кислорода с активным центром показывает, что интермедиат — это не что иное, как частица EO^-, прочно связанная с активным центром фермента. Этот факт противоречит гипотезе двух последовательных элементарных актов двухэлектронных переходов.

Существенный вклад в выяснение механизма действия медьсодержащих оксидаз внесли исследования электрохимической кинетики действия лакказы. Основы метода и результаты исследования электрохимической кинетики действия лакказы приведены в гл. 6. Оказалось, что ионы меди(II) активного центра лакказы в комплексе с молекулой кислорода способны быстро и эффективно обмениваться электронами с электродом. Это позволило провести детальное электрохимическое исследование и определить число переносимых электронов на различных стадиях процесса и предложить экспериментально обоснованную кинетическую схему действия катализатора. В соответствии с данными по кинетике действия фермента в растворе восстановление молекулярного кислорода до воды без промежуточного образования перекиси водорода происходит по схеме:

$$E + O_2 \rightleftharpoons EO_2$$

$$EO_2 + e \xrightarrow{\text{Быстро}} EO_2^-$$

$$EO_2^- + H^+ \xrightleftharpoons{pK\ 5{,}5} EO_2^-H^+$$

$$EO_2^-H^+ + H^+ \xrightleftharpoons{pK\ 5{,}5} EO_2^-H_2^{2+}$$

$$EO_2^-H_2^{2+} + 2e \longrightarrow EO^- + H_2O$$

$$EO^- + H^+ \xrightleftharpoons{pK\ 5{,}5} EO^-H^+$$

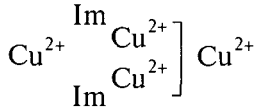
$$EO^-H^+ + H^+ \xrightleftharpoons{pK\ 5{,}5} EO^-H_2^{2+}$$

$$EO^-H_2^{2+} \longrightarrow (EO^-H_2^{2+})$$

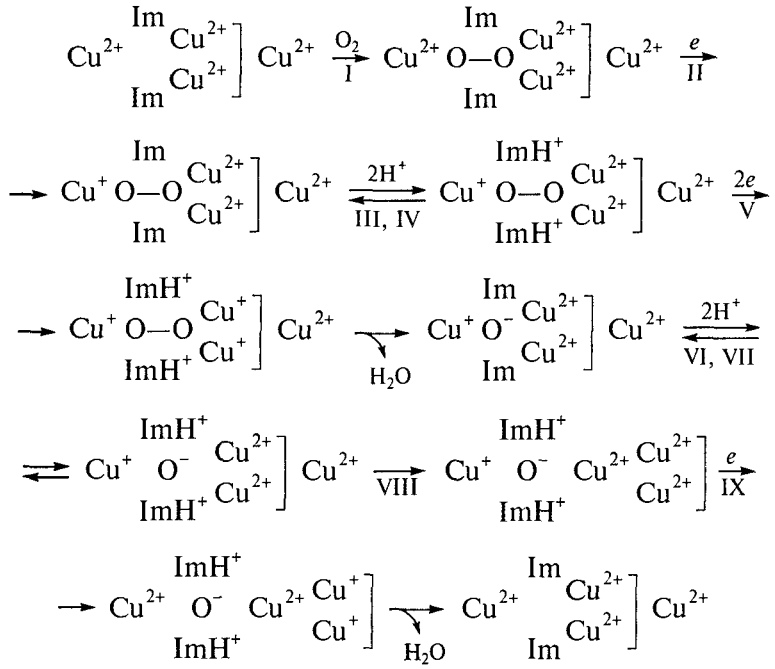
$$(EO^-H_2^{2+}) + e \xrightarrow{\text{Быстро}} E + H_2O$$

Полученные результаты при сопоставлении с данными по составу и структуре активного центра лакказы позволяют предложить молекулярный механизм восстановления кислорода с помощью фермента.

Известно, что активный центр лакказы включает четыре иона меди трех типов (см. рис. 8.23). При этом два иона меди объединены и могут представлять собой двухэлектронный донор-акцептор. В механизме катализа участвуют две ионогенные группы с близкими значениями $pK_a \approx 5{,}5$. Из структурных данных ясно, что этими ионными группами являются имидазольные группы (Im) гистидина His-60 и His-448 (см. рис. 8.23). Структуру активного центра можно представить в виде



Возможная схема молекулярных превращений, происходящих в активном центре лакказы в процессе каталитического акта восстановления кислорода, соответствующая кинетической схеме, имеет вид



Стадия II (одноэлектронное восстановление активного центра фермента) необходима, вероятно, для того, чтобы сделать более прочным комплекс кислорода с активным центром. Стадии III, IV

и VI, VII — это стадии протонирования оснований, входящих в активный центр фермента. Два одинаковых, симметричных и синхронно работающих имидазола в механизме катализа оксидазой играют принципиально важную роль. С одной стороны, они в протонированной форме облегчают перенос электронов с донора (электрода) на двухэлектронный акцептор, с другой — ускоряют электронный транспорт и являются донорами двух протонов на стадии образования воды.

Из кинетических данных следует, что механизм катализа включает образование промежуточной частицы типа EO^- (стадия V). Данная частица была зарегистрирована в независимых экспериментах при анализе спектров ЭПР фермента (см. выше).

Стадия VIII отвечает некоторому структурному изменению активного центра фермента. Возможно, эта стадия представляет собой конформационное изменение, сопровождаемое стереохимической заменой двухэлектронного акцептора на одноэлектронный в непосредственной близости от активированного атома кислорода.

Сопоставление кинетических данных со структурными позволяет для каждой из форм активного центра, представленных на схеме, предложить свою собственную молекулярную структуру.

Наиболее важными в структуре активного центра являются два иона меди, объединенные в одну электронную систему, способную при восстановлении принять два электрона и передать их молекуле кислорода с быстрым протонированием, приводящим к образованию молекулы воды. В данном механизме не участвует супероксид-радикал как термодинамически крайне невыгодный интермедиат. Также очень важно, что восстановление кислорода идет до воды без образования пероксида кислорода.

Таким образом, специфические структуры, сформировавшиеся в процессе эволюции ферментов, способные осуществить двухэлектронные процессы окисления—восстановления, позволяют избежать образования термодинамически невыгодных интермедиатов.

* * *

> Но все-таки, что же было дальше-то в Москве после того, как в субботний вечер на закате Воланд покинул столицу, исчезнув вместе со своей свитой с Воробьевых гор?
>
> *М. Булгаков*

Читатель, изучив данную главу, должен получить представление о том, как работают ферменты и на чем основана их феноменальная каталитическая активность. Как всегда бывает, очень сложное, на первый взгляд, явление основано на простых взаимодействиях.

Химические события, приводящие к гигантским ускорениям химических реакций, происходят на небольшом участке белковой молекулы, определяемом как активный центр фермента. Это относительно небольшое число функциональных групп аминокислот, собранных в ансамбль. В полипептидной цепи эти аминокислоты удалены друг от друга. Ансамбль аминокислот представляет собой специфическим образом собранные в пространстве функциональные группы, способные осуществить активацию молекулы и организовать эффективное образование продуктов из исходных веществ.

Что представляют собой эти каталитически активные группы и каким образом эти группы, отвечающие различным участкам белковой молекулы, собираются в активный центр?

Информацию о структуре активных центров получают различными методами. Однако наиболее полные сведения могут быть получены методами рентгеноструктурного анализа и спектроскопии ядерного магнитного резонанса. Эти методы позволяют изучить структуру белков на атомарном уровне.

Возникает вопрос, как, имея трехмерную структуру белка, образованного десятками тысяч атомов, выявить активный центр. В ряде случаев природа сама дает нам великолепную подсказку. Многие ферменты содержат в качестве простетической группы или кофактора хорошо идентифицируемые молекулярные образования или характерные ионы металлов. Например, многие редокс-ферменты содержат гемин. Функциональные группы, окружающие гемин, можно рассматривать как группы, осуществляющие элементарные акты катализа. В случае если таких специфических кофакторов или ионов металла в белке нет, на помощь приходят методы химической модификации. Особенно эффективны методы химической модификации с реагентами, позволяющими направить реагент-модификатор в активный центр. Для этого модификатор нужно включить в специфический ингибитор или аналог субстрата (см. подразд. 2.3).

Полезная информация о группах, составляющих активный центр, может быть получена из данных рентгеноструктурного анализа или спектроскопии ЯМР при изучении комплексов ферментов и специфических ингибиторов или аналогов субстрата.

Активный центр фермента — это, как мы знаем, по крайней мере два функционально различных участка. В активном центре имеются группы, отвечающие за сортировку или комплексообразование субстрата, а также группы, ответственные за элементарные стадии активации отдельных связей и катализ.

И все-таки, каким образом можно выявить каталитически активные группы?

Рекомендуемый нами подход основан на применении методов биоинформатики. Сравнение и «выравнивание» последовательно-

стей аминокислот в больших массивах родственных ферментов обнаруживают ряд позиций аминокислот, которые воспроизводятся для всех представителей этого семейства. Наиболее удобно это сравнение белков провести с использованием статистической информационной характеристики — энтропии Шеннона. Если энтропия Шеннона для данной аминокислоты в данной позиции равна нулю (или приближается к нулю), это говорит о том, что данная аминокислота в данной позиции играет особую роль в функционировании белков этого семейства.

Оказалось, что бóльшую часть аминокислот в последовательности можно заменить другими аминокислотами, и это не скажется на свойствах белка как катализатора данной реакции. Это позиции аминокислот с высокой энтропией Шеннона ($H \geq 0{,}5$). Позиции аминокислот с высокой энтропией — это статистический шум, в рамках которого практически не важно, какая аминокислота занимает данное место. Однако существуют позиции (их относительно немного), которым отвечает строго определенная аминокислота. Эта позиция характеризуется энтропией Шеннона ($H \approx 0$).

Оказалось, что группы, составляющие каталитически активный центр, всегда принадлежат аминокислотам полипептидной цепи, которые характеризуются $H \approx 0$. Активному центру отвечают строго определенные аминокислоты, расположенные в строго определенных позициях. Эти аминокислоты и определяют природу данного фермента. Если их заменить на какую-либо другую аминокислоту, функционирующий активный центр получить не удастся, а возможно, эти аминокислоты не удастся даже собрать в единую структуру. «Подписью» или «отпечатком пальцев» данного семейства ферментов является линейная запись позиций консервативных аминокислот.

Анализ ферментов всех классов показал, что наиболее часто консервативной аминокислотой является глицин. По рейтингу консервативности аминокислоты располагаются в следующем ряду: глицин — аспарагиновая кислота — цистеин — пролин — гистидин — аргинин — глутаминовая кислота. Это наиболее важные аминокислоты в ферментативном катализе. Очевидно, что функционально значимые аминокислоты можно разделить на две подгруппы: 1) кислоты и основания (аспарагиновая кислота, гистидин, аргинин, глутаминовая кислота); 2) структурообразующие аминокислоты (глицин, цистеин, пролин).

Таким образом, активные центры ферментов формируются из кислот и оснований (электрофильных и нуклеофильных агентов), а для того чтобы активный центр был образован аминокислотами, расположенными на разных участках полипептидной цепи, необходимо наличие в определенных позициях структуроформирующих аминокислот — глицина и пролина, обеспечивающих

возможность поворота цепи, и цистеина, необратимо фиксирующего необходимую конформацию цепи.

Во всех типах активных центров кислоты и основания как нуклеофильные и электрофильные агенты играют определяющую роль. Суть элементарных каталитических стадий, осуществляемых этими агентами, заключается в поляризации связей и индуцировании на реакционных центрах избыточных положительных или отрицательных зарядов. Зачастую активация идет по водородной связи с частичным или полным переносом протона. Результатом такого локального переноса протона является изменение реакционной способности активного центра. Классическим примером является сравнение реакционной способности воды и гидроксильного иона, спирта и алкоксильного иона. Реакционная способность при переходе к депротонированной системе возрастает в 10^7 раз. Если по данному механизму происходит активация как реагента, так и реакционного центра, можно ожидать увеличения реакционной способности в 10^{12}—10^{13} раз (см. начало данной главы).

Природа сформировала активные центры ферментов из ограниченного числа компонентов. Как видим, бóльшая часть активных центров ферментов всех классов сформирована из аспарагиновой и глутаминовых кислот, из гистидина и аргинина, из ионов нескольких металлов. Как следствие, число типов каталитических центров невелико. Например, для гидролаз, составляющих около трети всех известных ферментов, можно идентифицировать всего четыре основные типа структуры. Поэтому найденные эффективные комбинации каталитических групп, характерные для одних реакций, природа активно использует для организации каталитических центров других типов реакций. Весьма показателен переход от гидролитических к синтетическим реакциям (см. выше).

Полипептидная цепь обеспечивает организацию каталитических групп в активные центры. Как известно, в растворе практически исключены трехмолекулярные реакции и реакции более высоких порядков. Если проанализировать механизм любой ферментативной реакции (см. выше), то окажется, что в реакции участвуют четыре (или пять) остатков различных аминокислот, организованных в полипептидную цепь. Ферментативный катализ не использует сильных химических агентов; компоненты, составляющие активные центры, — это относительно слабые кислоты и основания. Однако они хорошо организованы в пространстве и, как следствие, весьма эффективны.

Феномен ферментативного катализа — прекрасный пример того, как правильная организация весьма ограниченного по свойствам материала обеспечивает практически неограниченные возможности.

Глава 9

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

> Это привело нас к гипотезе, что для осуществления реакции между ферментами и субстратами должно существовать сходство их молекулярных конфигураций. Чтобы сделать эту мысль яснее, я использовал картину замка́ и ключа.
>
> *Э. Фишер*

9.1. Специфичность как особое свойство ферментов

Ферменты как катализаторы химических реакций обладают уникальным свойством — способностью действовать только на молекулы определенной структуры или на очень небольшое число одинаковых по строению молекул. Это свойство ферментов определяют как специфичность их действия. *Специфичность* действия ферментов — это, по сути, способность фермента осуществлять выбор субстрата данной структуры из большой совокупности близких по строению веществ. Очевидно, что этот выбор определяется рядом взаимодействий субстрата с группами активного центра белка и обусловлен определенными физико-химическими процессами. По специфичности — способности «выбирать» субстрат подходящей структуры — ферменты значительно отличаются от обычных химических катализаторов. Эта способность ферментов является абсолютно необходимой, поскольку позволяет упорядочить метаболизм клетки и избежать образования ненужных побочных продуктов. Таким образом, специфичность ферментов является основой организации многостадийных химических реакций в живых системах. Информация, заложенная в структуре узнающего субстрат активного центра фермента, является фактором, определяющим специфичность действия ферментов. Способность ферментов осуществлять химические реакции с субстратом определенной структуры является неоценимой для химии при использовании ферментов в практических целях.

Способность ферментов «выбирать» субстраты определенной структуры поразительная. Сравним относительные скорости окисления различных D-альдогексоз кислородом под действием глюкозооксидазы из *Penicillium* (за единицу принята скорость окисления природного субстрата — β-D-глюкозы). Относительная ско-

рость реакции окисления D-маннозы $9{,}8 \cdot 10^{-3}$, α-D-глюкозы $6{,}4 \cdot 10^{-3}$, D-альтрозы $1{,}6 \cdot 10^{-3}$, D-галактозы $1{,}4 \cdot 10^{-3}$; D-фруктоза не окисляется.

Таким образом, изомерные углеводы окисляются кислородом под действием глюкозооксидазы (если вообще окисляются) в 10^2—10^3 раз медленнее, чем β-D-глюкоза.

Возникает вопрос, какие физико-химические параметры следует сравнивать при анализе специфичности действия ферментов. Наиболее простым представляется сравнение скоростей реакций при заданных концентрациях фермента и субстрата. Недостатком такого подхода является то, что наблюдаемая скорость реакции может определяться различными лимитирующими стадиями для разных субстратов (см. гл. 4), а это может приводить к ошибкам в интерпретации результатов. Кроме того, различная реакционная способность субстратов может проявляться как на стадии максимальной скорости (различные значения $k_{кат}$), так и на стадии образования фермент-субстратного комплекса (разные значения K_M). Поэтому более правильным и наиболее часто используемым при сравнении реакционной способности различных субстратов является применение параметров $k_{кат}$ и K_M или их отношения $k_{кат}/K_M$.

В том случае, если кинетический механизм действия фермента известен и имеется информация об элементарных стадиях, использование для сравнения реакционной способности констант скоростей элементарных стадий приводит к достоверным и безошибочным выводам.

При обсуждении реакционной способности субстратов различной структуры представляется целесообразным выделять две группы эффектов.

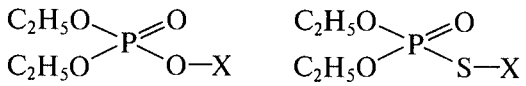
1. Заместитель, непосредственно связанный с реакционным центром, может оказывать влияние на электронные свойства реакционного центра и тем самым на реакционную способность субстрата. Эти эффекты могут быть интерпретированы в рамках классических представлений органической химии (см. далее).

2. Способность фермента «выбирать» нужный ему субстрат определяется «узнаванием» структурных фрагментов субстрата, непосредственно не связанных с реакционным центром. Реакционная способность субстратов может различаться в 10^3—10^6 раз. Эта удивительная способность ферментов, определяемая как специфичность, и является предметом анализа химической энзимологии.

9.2. Электронное влияние заместителей на реакционный центр

Реакционная способность субстрата в значительной степени зависит от структуры и электронных свойств заместителей, окру-

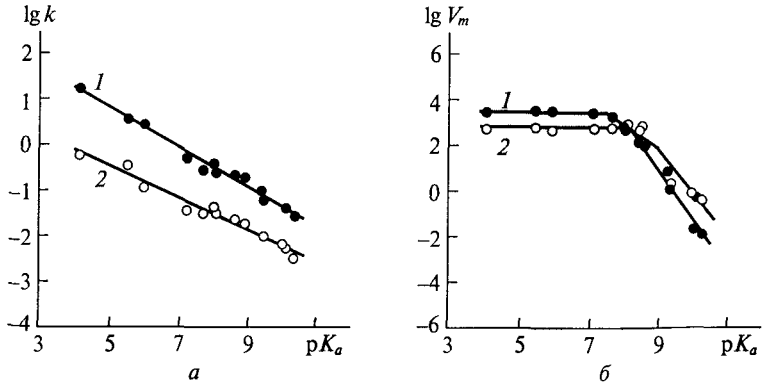
жающих реакционный центр. Рассмотрим эти эффекты на примере реакций гидролиза триэфиров фосфорной кислоты под действием органофосфатгидролазы. Химический механизм катализа этих ферментов обсуждался в гл. 8. В качестве субстратов использовались соединения



Фосфаты Тиофосфаты

Гидролиз идет по связи P—OX или P—SX. Варьирование структуры заместителей X существенно сказывается на реакционной способности субстратов. Функциональные группы должны определенным образом влиять на распределение электронной плотности в молекуле субстрата. Электрофильные заместители оттягивают на себя электронную плотность, индуцируя на реакционном центре избыточный положительный заряд. Электронодонорные заместители действуют противоположным образом.

Варьируя природу уходящей группы, можно определенным образом повлиять на реакционную способность субстрата. Особенно это характерно для щелочного гидролиза (рис. 9.1, *а*). Видно, что чем более сильной кислотой является уходящая группа, тем большей реакционной способностью обладает субстрат. Рисунок 9.1, *а* показывает, что эта закономерность в логарифмических координатах может быть описана линейной функцией. Электрофильные заместители увеличивают реакционную способность субстрата при нуклеофильной атаке водой путем индуцирования на атоме фосфора избыточного положительного заряда. В случае ферментатив-



. 9.1. Зависимость реакционной способности фосфатов (*1*) и тиофосфатов (*2*) от pK_a уходящей группы:

щелочной гидролиз; *б* — ферментативный гидролиз с участием органофосфатгидролазы

ного гидролиза картина сложнее. Имеется область значений pK_a 4—8 уходящей группы, где реакционная способность субстрата не зависит от природы заместителя. Вместе с тем существуют субстраты (pK_a 8—11), для которых можно наблюдать строгую линейную корреляцию между pK_a уходящей группы и реакционной способностью субстрата. С точки зрения механизма реакции в случае исследованных реакционных систем происходит смена лимитирующей стадии. Для субстратов, уходящая группа которых характеризуется pK_a 4—8, имеется общая лимитирующая стадия, отличная от прямой атаки нуклеофила на реакционный центр. Вместе с тем для субстратов, уходящая группа которых имеет pK_a 8—11, реакционная способность определяется электронными характеристиками уходящей группы.

При наличии линейной корреляции между реакционной способностью и кислотностью уходящей группы экспериментальные данные могут быть описаны уравнением Гаммета

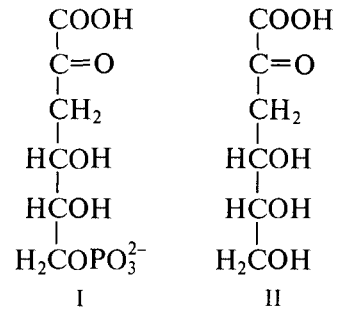
$$\lg k = \lg k_0 + \rho\sigma,$$

где k — константа скорости реакции; k_0, ρ — постоянные кинетические параметры реакции, характерные для данной серии структур. Реакционная способность заместителя может быть охарактеризована константой Гаммета σ, которая вычисляется по уравнению $\sigma = pK_0 - pK$. Здесь K_0 — константа кислотной ионизации кислоты, выбранной в качестве стандартной; K — константа кислотной ионизации кислоты с заместителем.

Уравнение Бренстеда, уравнение Гаммета (и родственные уравнения типа уравнения Тафта) линейно связывают свободную энергию активации, характеризуемую логарифмом константы скорости, с равновесными термодинамическими параметрами заместителя, в данном случае константами диссоциации соответствующих кислот. Зная значение ρ в уравнении Гаммета, можно предсказать, как изменяется реакционная способность субстрата в зависимости от структуры заместителя.

Таким образом, если заместитель непосредственно связан с реакционным центром субстрата, его влияние может быть описано в рамках классических представлений органической химии. Однако в большинстве случаев выбор субстрата по реакционной способности осуществляется за счет «узнавания» ферментом функциональных фрагментов субстрата, удаленных от реакционного центра.

Можно привести много примеров, когда реакционную способность субстрата определяет фрагмент молекулы, удаленный от реакционного центра. Например, фермент 2-кето-3-дезокси-6-фосфоглюконоальдолаза катализирует реакцию с фосфорилированным субстратом (I) в 10^4 раз эффективнее, чем с его нефосфорилированным аналогом (II):



I II

Это особенно очевидно при исследовании серии субстратов, отличающихся длиной алифатического углеводородного фрагмента. Например, на рис. 9.2 приведены данные о реакционной способности амидазы и бутирил-СоА-синтетазы. Скорость реакции выражена относительно скорости, полученной с наилучшим субстратом. Видно, что при определенной длине углеводородного фрагмента субстраты проявляют ничтожно малую активность. При достижении некоторого критического размера углеводородного фрагмента реакционная способность субстратов резко увеличивается и проходит через максимум.

Аналогичную зависимость можно наблюдать для α-химотрипсина. На рис. 9.3 приведены данные по реакционной способности различных ацетилхимотрипсинов в реакции гидролиза промежуточного ацилфермента (константа скорости k_3). Ацилферменты были получены ацилированием Ser-195 производными алифатических карбоновых кислот. На оси ординат отложена не просто длина углеводородного фрагмента молекулы, а его гидрофобность, характеризующаяся константой Ганша π (см. гл. 3). Видно, что до определенного уровня гидрофобности ацильного фрагмента реакционная способность субстрата не зависит от структуры углево-

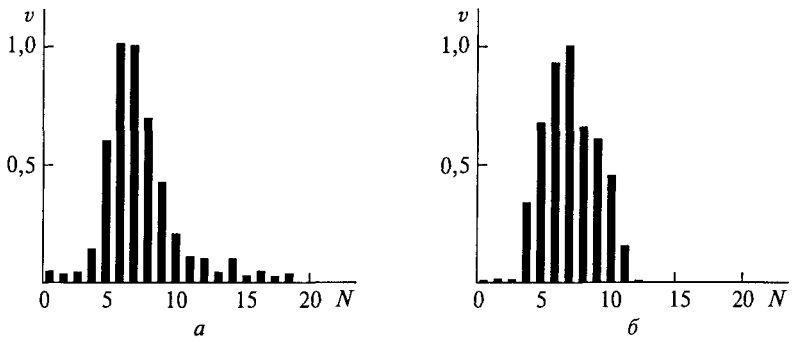


Рис. 9.2. Относительная скорость v реакции, катализируемой амидазой (*а*) и бутирил-СоА-синтазой (*б*), для субстратов, отличающихся числом N атомов углерода в углеводородном фрагменте

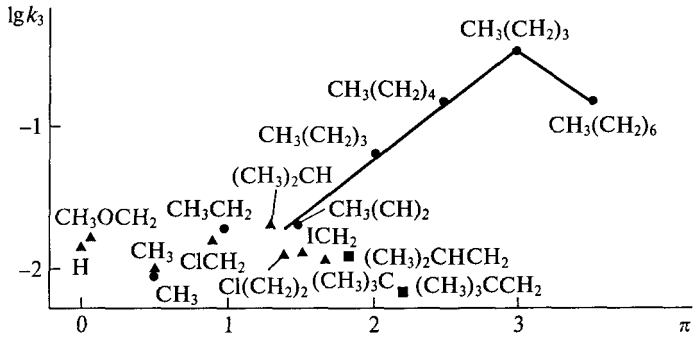


Рис. 9.3. Зависимость реакционной способности ацилхимотрипсинов от гидрофобности ацильной группы

дородного фрагмента; далее наблюдается линейный рост с появлением каждой CH_2-группы, при этом график проходит через максимум. В этом случае простыми электронными индукционными эффектами заместителя изменение реакционной способности объяснить нельзя. В основе действия ферментов лежат другие механизмы увеличения (или уменьшения) реакционной способности субстрата.

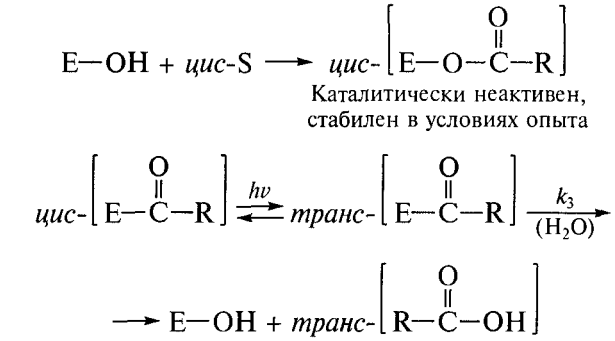
В настоящее время существуют несколько качественных и количественных концепций, объясняющих специфичность ферментов. Концепции являются в значительной степени комплементарными и взаимодополняющими. Каждая из них находит экспериментальное подтверждение.

9.3. Концепция стерического соответствия «ключ — замóк»

Активные центры ферментов имеют сложную конфигурацию. При взаимодействии субстрата с активным центром фермента необходимо, чтобы они структурно друг другу соответствовали. Э. Фишер первый отметил соответствие структуры субстрата и активного центра фермента, проводя аналогию с замкóм и ключом. Активный центр фермента имеет структуру более или менее жесткой матрицы. Эта матрица содержит группы, расположенные определенным образом и способные взаимодействовать с субстратом. При этом необходимо определенное соответствие между структурами активного центра и субстрата. Рассмотрим проявление этого соответствия на примере *транс*-специфичности активного центра α-химотрипсина.

Реакционная способность ацилферментных производных α-химотрипсина в реакции гидролиза (стадия деацилирования) зави-

сит от структуры ацильного фрагмента субстрата. В зависимости от строения ацильного фрагмента скорость гидролиза ацилферментов различается более чем в 10^4 раз, в то время как в реакции щелочного гидролиза эти различия невелики. Структура активного центра фермента задает необходимые пространственные соотношения, определяющие реакционную способность ацилфермента. Наиболее ярко это проявляется в эффекте *транс*-специфичности α-химотрипсина. Исследовалась реакционная способность *цис*- и *транс*-производных β-арилакриловых кислот в реакции гидролиза под действием α-химотрипсина. Было обнаружено, что в то время как ацилферментное промежуточное соединение, образуемое *транс*-стереоизомером кислоты, гидролизуется в течение 1 мин, ацилфермент в *цис*-стереоформе представляет собой практически стабильный, каталитически неактивный продукт. При облучении каталитически неактивного производного α-химотрипсина ультрафиолетовым светом можно полностью восстановить исходную активность катализатора (рис. 9.4). Процесс протекает по схеме



Здесь E—OH — каталитически активная форма α-химотрипсина.

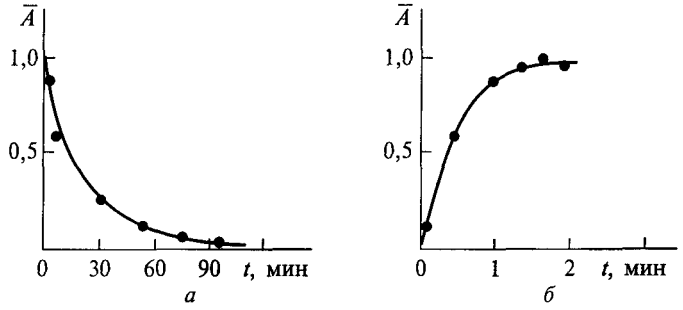


Рис. 9.4. Изменение относительной каталитической активности α-химотрипсина в процессе инкубации (*а*) его с *п*-нитрофениловым эфиром *цис*-4-нитрокоричной кислоты и восстановление активности фермента (*б*) при облучении его ультрафиолетом

Цис- и *транс*-изомеры ацилферментов коричной и нитрокоричной кислот были выделены в индивидуальном виде, изучены их спектральные характеристики, исследован процесс *цис-транс*-фотоизомеризации циннамоильных групп в активном центре α-химотрипсина, исследована кинетика гидролиза с образованием активного катализатора. В табл. 9.1 приведены кинетические характеристики *цис-* и *транс*-изомеров субстратов в реакции ацилирования (k_2/K_s) и деацилирования образующихся ацилферментов. Видно, что *транс*-стереоизомеры в 10^3—10^4 раз более реакционноспособны, чем соответствующие *цис*-формы. Наблюдаемое различие в реакционной способности следует отнести за счет специфической организации активного центра фермента. Константы скорости щелочного гидролиза этиловых эфиров стереоизомерных форм коричной кислоты отличаются незначительно ($k_{транс}/k_{цис}$ = 1,5—2). Показано, что если нативную структуру активного центра α-химотрипсина нарушить, поместив ацилфермент в 8 М раствор мочевины, константы скорости деацилирования *цис-* и *транс*-форм ацилферментов станут практически одинаковыми.

Транс-специфичность α-химотрипсина объясняется стерическими эффектами. В *цис*-конформации ацилфермента в нативном состоянии белка каталитически активный имидазол гистидина-57 находится в непосредственной близости от *цис*-хромофорной метки. Это следует из анализа зависимости спектра поглощения *цис*-4-нитроциннамоил-α-химотрипсина от показателя pH. Спектр поглощения *цис*-4-нитроциннамоильной группы изменяется в зависимости от pH. Эта группа характеризуется pK_a, совпадающим с pK_a имидазольной группы активного центра. В этом случае 4-нитроцинноамоильная группа выступает как хромофорная метка активного центра α-химотрипсина. Данные рентгеноструктурного

Таблица 91

Стереоспецифичность α-химотрипсина в реакциях с различными субстратами

Параметр	*Цис*-изомер	*Транс*-изомер
Циннамоилимидазол		
k_3, $с^{-1}$	$6{,}0 \cdot 10^{-6}$	$9{,}0 \cdot 10^{-3}$
п-Нитрофениловый эфир 4-нитрокоричной кислоты		
k_2/K_s, л/(моль · с)	$1{,}2 \cdot 10^2$	$6{,}0 \cdot 10^5$
k_3, $с^{-1}$	$1{,}7\ 10^{-5}$	0,42
п-Нитрофениловый эфир индолилакриловой кислоты		
k_2/K_s, л/(моль · с)	0,61	650

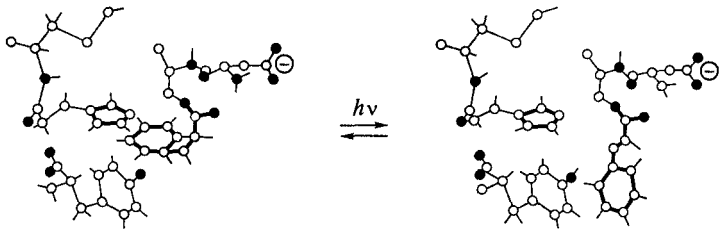


Рис. 9.5. *Цис-транс*-изомеризация циннамоил-α-химотрипсина

анализа *транс*-индолилакрилоид-α-химотрипсина подтверждают стерический характер *транс*-специфичности α-химотрипсина. На рис. 9.5 изображен фрагмент активного центра α-химотрипсина, показана конформация циннамоильной метки в *цис*-конформации. Видно, что бензольное кольцо оказывается в непосредственной близости от имидазольного кольца гистидина-57. Циннамоильная группа в *цис*-конформере может препятствовать участию в реакции каталитически важной имидазольной группы или разрушать необходимое для катализа пространственное соответствие между имидазолом гистидина-57 и карбоксильной группой аспарагиновой кислоты-102. Таким образом, *транс*-специфичность действия α-химотрипсина объясняется тем, что в *цис*-ацилферменте каталитическая реакция пространственно затруднена боковой группой субстрата.

9.4. Концепция индуцированного соответствия

Как известно, структуры белка и активных центров не являются абсолютно жесткими; допускаются определенные структурные изменения, которые определяются как конформационные изменения белка или активных центров. Конформационная подвижность активного центра позволяет объяснить природу специфичности ферментов. Впервые эта гипотеза была высказана К.Лейдлером при исследовании зависимости скорости ферментативной реакции от давления. В законченной и известной форме концепция индуцированного соответствия (induced fit) была сформулирована Д. Кошландом (1959 г.).

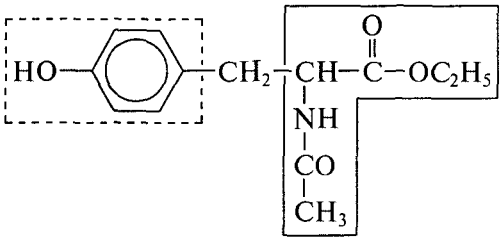
Согласно концепции индуцированного соответствия в исходном состоянии активный центр фермента, состоящий из остатков нескольких аминокислот, находится в «разобранном» виде. Взаимодействие и комплексообразование с субстратом приводит к изменению взаимной ориентации компонентов активного цент-

ра, в результате активный центр приобретает реакционноспособную конфигурацию. Движущей силой, обеспечивающей конформационные изменения, является энергия комплексообразования фермента с субстратом. При этом специфический высокореакционноспособный субстрат способствует формированию реакционноспособной конфигурации атомов активного центра. Менее специфический субстрат не способен индуцировать в ферменте необходимые структурные изменения.

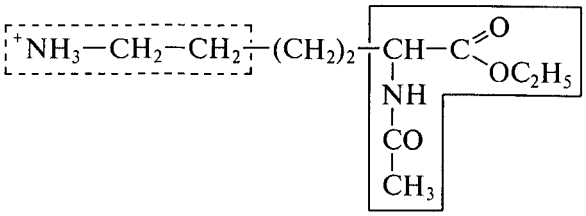
Эта очень красивая концепция находит как кинетические, так и структурные экспериментальные подтверждения. Конформационные изменения белка можно регистрировать прямыми физическими методами. Наиболее часто для этих целей используется спектроскопия ядерного магнитного резонанса или спектроскопия кругового дихроизма. Так, изучение креотинкиназы показало, что структура активного центра изменяется при взаимодействии фермента со специфическим субстратом. При изучении взаимодействия фосфоглюкомутазы со специфическими субстратами, такими как глюкозо-1-фосфат, глюкозо-6-фосфат, наблюдаются структурные изменения активного центра. В то же время «неспецифические» соединения, такие как неорганический фосфат или глицерофосфат, существенных изменений не вызывают. Рентгеноструктурные исследования также обнаруживают заметные структурные изменения белка при комплексообразовании его с субстратами. Так, при изучении карбоксипептидазы А было показано, что остатки двух аминокислот — тирозила и глутаминовой кислоты — при связывании субстрата перемещаются на 1,5 и 0,2 нм соответственно.

Кинетические исследования также подтверждают концепцию индуцированного соответствия. Сборка специфического субстрата из независимых фрагментов вызывает в ряде случаев существенное увеличение его реакционной способности.

Рассмотрим структуру специфических субстратов α-химотрипсина и трипсина. Высокой реакционной способностью ($k_{кат}$ ~ 190 $с^{-1}$) обладает, например, этиловый эфир N-ацетил-L-тирозина:



Для трипсина наибольшую реакционную способность проявляет производное L-лизина:



Фрагмент этих субстратов — N-ацетил-L-глицин (отмечен сплошной рамкой) — является слабореакционноспособным субстратом как α-химотрипсина, так и трипсина. Однако если в смесь, в которой идет реакция гидролиза этилового эфира N-ацетил-L-глицина под действием α-химотрипсина добавить фрагмент специфичного субстрата, например фенол (отмечен пунктирной рамкой), реакционная способность неспецифического субстрата возрастает в несколько раз. Фенол и другие гидрофобные молекулы, такие как алифатические спирты, являются активаторами гидролиза неспецифического субстрата.

Аналогичная картина имеет место в случае действия на этот субстрат трипсина. Добавление в реакционную среду этиламина (отмечен пунктирной рамкой) увеличивает скорость гидролиза субстрата почти в 10 раз.

Наблюдаемые эффекты находят объяснение в рамках следующей кинетической схемы:

$$\begin{array}{ccccc} E & \overset{K_S}{\rightleftharpoons} & ES & \xrightarrow{k_{кат}} & E + P \\ \uparrow\downarrow K_A & & \uparrow\downarrow \alpha K_A & & \\ AE & \rightleftharpoons & AES & \xrightarrow{\beta k_{кат}} & E + P + A \end{array}$$

Сорбция субстрата на активном центре фермента (комплекс ES) допускает образование комплекса с молекулой активатора (AES). При этом реакционная способность конфигурации атомов в тройном комплексе (аналоге специфического субстрата) существенно выше ($\beta \gg 1$), чем в исходном комплексе ES (комплексе с неспецифическим субстратом). Взаимодействие с недостающим фрагментом специфического субстрата вызывает конформационные изменения, приводящие к повышению реакционной способности. Конформационные изменения белка, индуцированные связыванием с субстратом, зафиксированы прямыми кинетическими методами (см. подразд. 7.4).

9.5. Концепция напряжений и деформаций

Взаимодействие фермента с субстратом сопровождается образованием большого числа связей даже в том случае, если актив-

ный центр фермента довольно жесткий, а геометрия субстрата не вполне соответствует геометрии активного центра. Сорбция субстрата в этом случае может вызывать искажения структуры молекулы субстрата (изменение длин связей, углов от наиболее к менее термодинамически выгодным) и тем самым создавать напряжение в молекуле. С термодинамической точки зрения энергия сорбции (комплексообразования) расходуется непосредственно на создание в молекуле субстрата деформаций. Если эти деформации приближают структуру молекулы субстрата к структуре переходного состояния, возникшее напряжение или деформация должны приводить к ускорению реакции.

Фермент взаимодействует с субстратом с образованием комплекса ES, переходящего в напряженный комплекс ES′:

$$\begin{array}{ccccc} S + E & \overset{K_1}{\rightleftharpoons} & ES & \xrightarrow{k_1} & E + P \\ \uparrow\downarrow & & \uparrow\downarrow K_2 & & \\ S' + P & \rightleftharpoons & ES' & \xrightarrow{k_2} & E + P \end{array}$$

Очевидно, что напряженная деформированная форма субстрата может находиться в свободном состоянии (форма S′) в растворе, однако термодинамически это очень невыгодно. Напряженный фермент-субстратный комплекс обладает повышенной реакционной способностью (константа скорости k_2). Процесс деформации субстрата термодинамически невыгоден $K_2 = [ES]/[ES'] > 1$.

На рис. 9.6 приведена энергетическая диаграмма системы, в которой протекает реакция, сопровождаемая деформацией молекулы субстрата. Показаны уровни свободной энергии исходной системы, фермент-субстратных комплексов ES и ES′ и активированного состояния $ES^{\neq}$. Свободные энергии образования комплексов равны ΔG_1, ΔG_2. Эти энергии могут быть рассчитаны из констант равновесия K_1 и K_2. Свободные энергии активации $\Delta G_1^{\neq}$, $\Delta G_2^{\neq}$ могут быть рассчитаны в соответствии с теорией переходного состояния из кинетических констант k_1 и k_2 (см. подразд. 4.1). Видно, что переход субстрата в напряженную конфигурацию термодинамически невыгоден и сопровождается повышением свободной энергии на ΔG_2. В предположении, что переход фермент-субстратного комплекса из состояния ES в состоя-

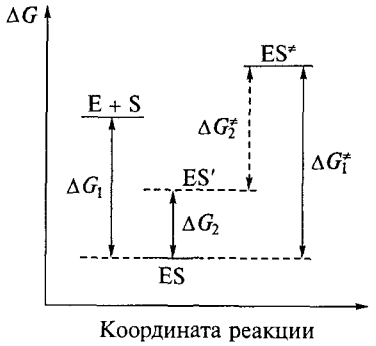


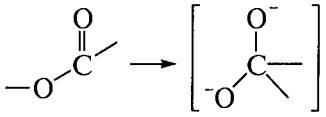
Рис. 9.6 Энергетическая диаграмма системы, участвующей в ферментативной реакции, которая сопровождается деформацией молекулы субстрата

ние ES′ приближает структуру системы к переходному состоянию, активационный барьер понижается на $\Delta G_2^{\neq} = (\Delta G_1^{\neq} - \Delta G_2)$ — свободную энергию, затраченную на создание напряжений и деформаций. Для серии субстратов с родственной структурой это должно приводить к закономерности «худшее связывание — лучший катализ». Известны экспериментальные данные, подтверждающие концепцию напряжений и деформаций. Иногда эту концепцию называют концепцией «дыбы».

Примером, демонстрирующим, что белки используют этот механизм ускорения химической реакции за счет сорбции, является наличие каталитической активности у антител. Каталитически активные антитела — абзимы — являются идеальной иллюстрацией концепции напряжений и деформаций и представляют собой продукт интеллектуального вмешательства в конструирование биологических систем.

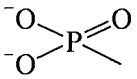
Идея создания антител, обладающих каталитической активностью, принадлежащая Л. Полингу, была развита В. Джинксом и его последователями. Суть подхода заключается в следующем. Для некоторых реакций (правда, их число весьма ограничено) можно иметь стабильные вещества, приближающиеся по структуре к переходному состоянию. Если получить антитела (иммунокомпетентные белки, ответственные за специфический иммунитет) к аналогам переходного состояния, можно ожидать, что, связывая исходные субстраты и приближая их по структуре к переходному состоянию, антитела будут обладать каталитической активностью и ускорять выбранную химическую реакцию. Идея блестяще подтвердилась.

Как известно, в гидролитических реакциях с участием карбонильного атома углерода переходное состояние имеет геометрию тетраэдра:

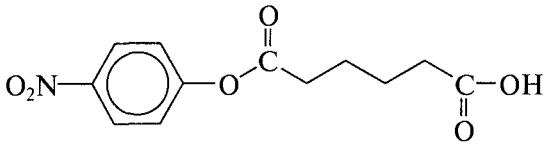


Переходное состояние

Аналогом переходного состояния можно считать фосфонаты:

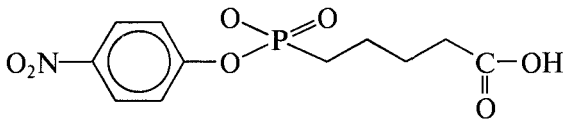


Были исследованы реакции гидролиза *п*-нитрофениловых эфиров дикарбоновых кислот:



I

Аналогом переходного состояния были выбраны аналогичные фосфонаты:



II

Были получены антитела для соединения II. Способ получения антител заключается в иммунизации животных с последующим отбором клонов. Удалось получить антитела, обладающие заметной каталитической активностью в реакции гидролиза соединения I.

Таким образом, только за счет сорбционных взаимодействий с субстратом и создания его напряженных и деформированных конфигураций белковая молекула может обеспечить ускорение химической реакции.

9.6. Двухцентровая модель. Комплексообразование активного центра с нереакционными фрагментами субстрата как фактор ускорения реакции

Как следует из рассмотренного выше, белковая молекула может реализовать несколько механизмов выбора структуры субстрата и обеспечить специфическому субстрату высокую реакционную способность. Проанализированные выше концепции (стерического и индуцированного соответствия, напряжений и деформаций молекулы субстрата) дают представление о различных механизмах реализации специфичности действия ферментов.

Рассмотрим количественные аспекты специфичности и природы ускорения ферментами химических реакций.

Активные центры ферментов представляют собой структурно неоднородные образования, осуществляющие два последовательных процесса:

1) сорбцию, фиксацию субстрата, ориентацию его относительно каталитических групп;

2) акт химического превращения субстрата под действием электрофильных и нуклеофильных агентов.

Анализ показывает, что эти два процесса осуществляются двумя структурно и функционально различными компонентами активного центра, которые условно могут быть представлены как сорбционный (комплексообразующий) и каталитический подцентры активного центра. Этот вывод следует из анализа структуры субстратов, для которых во многих случаях центр «узнавания» ферментом и реакционный центр, на котором происходит хими-

ческое превращение субстрата, удалены друг от друга. Кроме того, кинетические данные показывают, что для ферментов могут быть подобраны взаимонезависимые ингибиторы, блокирующие каталитическую активность путем взаимодействия с различными участками активного центра. При этом оба ингибитора способны разместиться без конкуренции на функциональных участках активного центра (см. подразд. 4.6).

Представление о двухцентровой природе активных центров ферментов легло в основу теории, объясняющей способность ферментов «выбирать» молекулы более реакционноспособных субстратов.

Как известно, комплексообразование фермента с субстратом происходит за счет относительно слабых, но кинетически быстро проявляющихся сил (сил гидрофобного и электростатического взаимодействия, водородных связей (см. подразд. 3.1)). Эти взаимодействия осуществляются относительно быстро, так что в большинстве случаев комплексообразование можно рассматривать как равновесный процесс.

Пусть активный центр А—С фермента состоит из двух функционально различных участков: каталитического С и сорбционного А. В структуре субстрата можно выделить два участка: реакционный X, претерпевающий химическое превращение, и химически инертный R, способный образовать комплекс с сорбционным участком активного центра. Специфический субстрат может быть представлен как $X—R_s$, неспецифический — $X—R_n$. Различие структуры участков R_s и R_n состоит в том, что участок R_s способен эффективно взаимодействовать с сорбционным центром А фермента, в то время как структурные особенности участка R_n не позволяют это сделать.

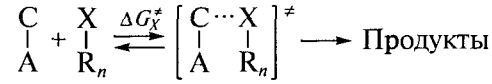
Рассмотрим реакцию фермента со специфическим $X—R_s$ и неспецифическим $X—R_n$ субстратами в рамках теории абсолютных скоростей реакций.

Для специфического субстрата фермент-субстратный комплекс и переходное состояние можно представить в виде

$$\begin{matrix} C & X \\ | & | \\ A & R_s \end{matrix} + \begin{matrix} & \\ & \end{matrix} \underset{}{\overset{\Delta G_S}{\rightleftharpoons}} \begin{matrix} C & X \\ | & | \\ A\cdots & R_s \end{matrix} \overset{\Delta G_X^{\neq}}{\rightleftharpoons} \left[\begin{matrix} C\cdots X \\ | \quad | \\ A\cdots R_s \end{matrix}\right]^{\neq} \longrightarrow \text{Продукты}$$

Комплексообразование как равновесный процесс описывается константой равновесия K_S и свободной энергией комплексообразования $\Delta G_S < 0$. Химическая реакция протекает через переходное состояние, которому предшествует равновесное образование связи $A\cdots R_s$.

Для неспецифического субстрата активационный процесс может быть представлен схемой без взаимодействия R_n с сорбционным центром:



Если принять, что взаимодействие каталитического участка С с реакционным участком X субстрата для обоих случаев происходит одинаково, то особенность структуры переходного состояния в первом случае заключается в образовании дополнительной связи A··· R_s. Это должно приводить к стабилизации указанного переходного состояния и, естественно, к уменьшению свободной энергии активации каталитического процесса. Энергетические уровни состояний системы для двух рассматриваемых случаев приведены на рис. 9.7. Предполагается, что структура связи в переходном состоянии C···X для обоих путей реакции одинакова. Соответственно образование активированного комплекса в обоих случаях характеризуется одинаковой свободной энергией активации $\Delta G_X^{\neq}$. Активационный барьер реакции при переходе от исходного субстрата к активированному комплексу не зависит от пути реакции.

Тогда для специфического субстрата получим

$$\Delta G_{R_s}^{\neq} = \Delta G_X^{\neq} - \Delta G_{R_s},$$

для неспецифического субстрата

$$\Delta G_{R_n}^{\neq} = \Delta G_X^{\neq}.$$

Уменьшение свободной энергии активации в случае специфического субстрата по сравнению с неспецифическим равно

$$\Delta G' = \Delta G_{R_s}^{\neq} - \Delta G_{R_n}^{\neq} = -\Delta G_{R_s},$$

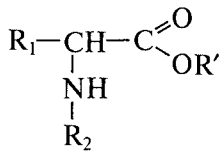
т.е. активационный барьер реакции для специфического субстрата ниже на величину свободной энергии сорбции нереакционной части субстрата в фермент-субстратном комплексе.



Рис. 9.7. Энергетическая диаграмма системы, участвующей в ферментативной реакции со специфическим и неспецифическим субстратами

Таким образом, простое кинетико-термодинамическое рассмотрение ферментативной реакции в рамках двухцентровой модели предсказывает, что должна существовать корреляция между способностью субстрата образовывать внутримолекулярный комплекс с сорбционным подцентром активного центра и его реакционной способностью. Это предсказание было проверено для ряда ферментов и блестяще подтвердилось. Наиболее полная картина получена для α-химотрипсина. Для этого фермента была исследована реакционная способность субстратов различной структуры как на стадии образования ацилфермента, так и на стадии деацилирования (см. анализ кинетической схемы действия серийных протеаз в гл. 4).

Для α-химотрипсина, как и для многих других ферментов, известно большое количество модельных субстратов. В частности, исследована кинетика гидролиза эфиров N-ацилированных L-аминокислот:



где R_1 — боковая группа аминокислоты; R_2 — N-ацильный заместитель; R′ — заместитель уходящей группы. Выбор субстрата ферментом осуществляется за счет взаимодействий боковой группы R_1 аминокислоты и N-ацильного заместителя R_2 с группами сорбционного подцентра активного центра. Рассмотрим физическую картину выбора более подробно.

Влияние природы аминокислоты (фрагмента R_1). Гидрофобная экстракция фрагмента субстрата. В табл. 9.2 приведены кинетические экспериментальные данные по ферментативному ($k_{кат}/K_M$) и щелочному k_{OH} гидролизу субстратов, отличающихся структу-

Таблица 9.2

Кинетические параметры реакции гидролиза метиловых эфиров N-ацетил-L-аминокислот

Аминокислота	$k_{кат}/K_M$, л/(моль · с)	k_{OH}, л/(моль · с)
Глицин	0,126	2,48
Аланин	1,78	1,31
α-Аминомасляная	21,1	0,71
Норвалин	355	0,58
Норлейцин	3000	0,51
Фенилаланин	104 000	1,94

рой радикала R_1. Видно, что в то время как скорости реакций щелочного гидролиза субстратов в представленном ряду изменяются незначительно и несистематически, скорость реакции ферментативного гидролиза эфиров при переходе от глицина к фенилаланину возрастает в 10^5 раз. При этом наблюдается систематический рост константы $k_{кат}/K_M$ с увеличением длины радикала R_1 на одну группу CH_2 и соответственно с увеличением гидрофобности заместителя. Возникла гипотеза, что это систематическое изменение реакционной способности связано с гидрофобностью радикала R_1, т.е. с его возможностью быть «экстрагированным» в гидрофобную микрофазу активного центра. Действительно, если построить график зависимости $\lg(k_{кат}/K_M)$ от константы гидрофобности π Ганша (см. гл. 3), будет получена строгая линейная корреляция. Тангенс угла наклона графика равен 2.

В соответствии с двухцентровой моделью в указанном ряду субстратов α-химотрипсина происходит сорбция реакционноспособного фрагмента субстрата «узнающим» участком активного центра за счет гидрофобных взаимодействий и в результате снижения активационного барьера реакции. Напомним, что кинетический механизм ферментативной реакции включает равновесную стадию образования комплекса (K_S), стадии ацилирования Ser-195 (k_2) и гидролиза ацилфермента (k_3):

$$E + S \overset{K_S}{\rightleftharpoons} ES \xrightarrow{k_2} EA \xrightarrow{k_3} E + P$$

Изучение влияния гидрофобности радикала R_1 на реакционную способность субстрата для всех стадий реакции (рис. 9.8) показало, что с ростом гидрофобности заместителя увеличивается сорбция субстрата, растут его ацилирующая способность (k_2) и реакционная спо-

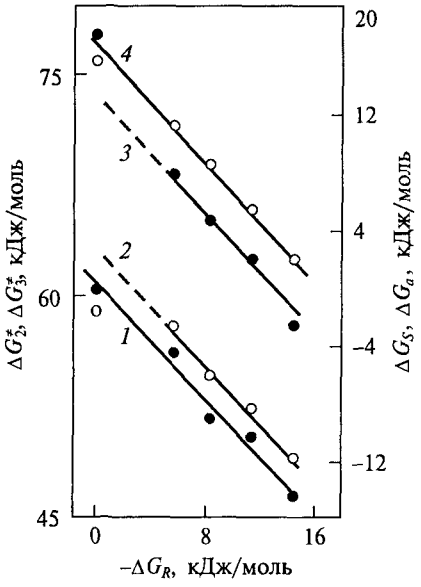


Рис. 9.8. Изменение свободной энергии образования фермент-субстратного комплекса ΔG_S (*1*), ацил-фермента ΔG_a (*2*), свободной энергии активации каталитических стадий ацилирования $\Delta G_2^{\neq}$ (*3*) и деацилирования $\Delta G_3^{\neq}$ (*4*) на различных стадиях реакции с участием α-химотрипсина в зависимости от гидрофобности радикалов R_1 различных соединений алифатической и ароматической природы

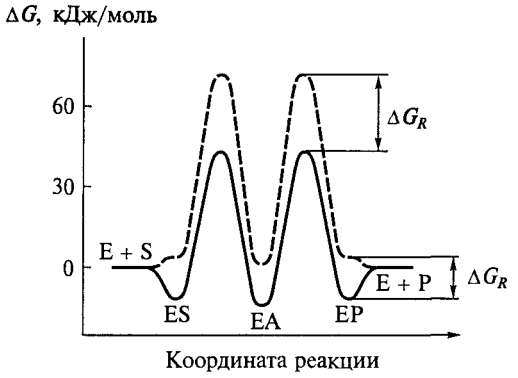


Рис. 9.9. Изменение свободной энергии системы по координате реакции химотриптического гидролиза метилового эфира N-ацетилфенилаланина (сплошная линия) и метилового эфира N-ацетилглицина (пунктирная линия)

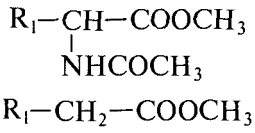
собность ацилфермента в реакции деацилирования (k_3). Тангенсы углов наклона представленных зависимостей близки к единице. Напомним, что логарифмы параметров K_S, k_2, k_3 линейно связаны со свободными энергиями образования фермент-субстратного комплекса или со свободными энергиями активации химических стадий процесса.

Таким образом, в случае α-химотрипсина имеем идеальный пример использования гидрофобной сорбции фрагмента субстрата для снижения активационного барьера химической стадии процесса.

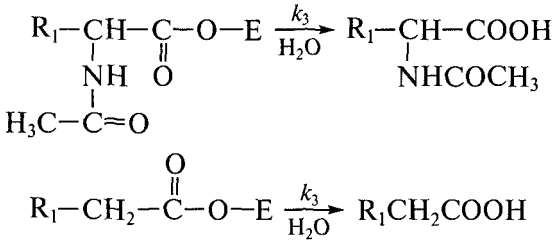
Зная константы скоростей и равновесий, можно построить профили изменения свободных энергий для ферментативного превращения субстрата по координате реакций. Для гидролиза метиловых эфиров N-ацетилфенилаланина и N-ацетилглицина такого рода энергетическая диаграмма представлена на рис. 9.9. Условно принято, что для обоих субстратов исходные состояния одинаковые. Различие в свободной энергии активации на химических стадиях ацилирования и деацилирования для двух разных субстратов достигает 30,2 кДж/моль, что соответствует различию в реакционной способности в 10^5 раз.

Влияние N-ацетильной группы субстрата (фрагмента NHR_2). Фиксация фрагмента водородной и гидрофобными связями. Другой важный фрагмент в молекуле специфического субстрата — N-ацетильная группа. Она находится в непосредственной близости от реакционного центра. Поэтому фиксация N-ацетильного фрагмента должна приводить к ориентации и «замораживанию» реагирующей карбонильной группы относительно нуклеофила Ser-195. N-ацетильный фрагмент вносит заметный вклад в увели-

чение реакционной способности субстрата. Было проведено сравнение реакционной способности двух наборов субстратов, содержащих и не содержащих N-ацетильный фрагмент:



При этом строение фрагмента R_1 варьировалось. На стадии деацилирования имеем дело с ацетилферментами следующей структуры:



Оказалось, что для всех изученных субстратов вклад N-ацетильной группы в реакционную способность одинаков. Это говорит о том, что N-ацетильная группа вносит постоянный вклад (10,9 кДж/моль) в стабилизацию переходного состояния. Это дает ускорение реакции для N-ацетильных производных приблизительно в 100 раз. Что обеспечивает такое снижение активационного барьера? Анализ структуры ацилферментов показывает, что фиксация NHR_2-фрагмента субстрата происходит за счет образования водородных связей с Ser-214 активного центра. Оказалось, что гидрофобность N-ацетильного фрагмента также оказывает влияние на его реакционную способность (рис. 9.10). По-видимому, фиксация этого фрагмента в активном центре фермента имеет сложную природу и происходит как за счет образования водородных связей, так и за счет гидрофобного взаимодействия. Этот вывод находит подтверждение при рассмотрении трехмерной структуры активного центра.

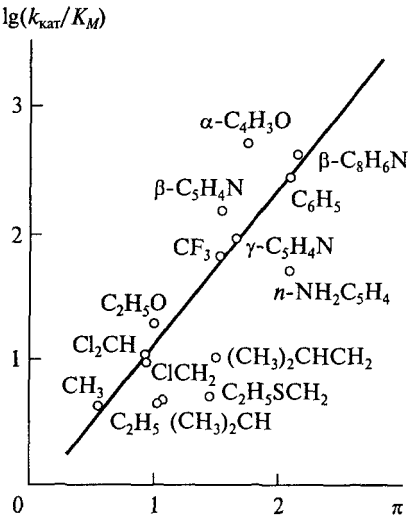


Рис. 9.10. Влияние гидрофобности N-ацильной группы на реакционную способность субстратов α-химотрипсина

Важным результатом изложенных выше работ является возможность предсказания реакционной способности субстратов различной структуры на основе данных по гидрофобности R_1 и оценки вклада N-ацильной группы.

Были предложены простые корреляционные уравнения, которые связывают реакционную способность субстрата с гидрофобностью его фрагментов:

стадия связывания субстрата

$$-\lg K_S = (1{,}0 \pm 0{,}1)\pi_{R_1} + (1{,}3 \pm 0{,}2)\pi_{R_2} - (1{,}15 \pm 0{,}05);$$

стадия ацилирования

$$\lg k_2 = (1{,}2 \pm 0{,}1)\pi_{R_1} - (0{,}7 \pm 0{,}1)\pi_{R_2} + (0{,}1 \pm 0{,}05);$$

стадия деацилирования

$$\lg k_3 = (1{,}1 \pm 0{,}05)\pi_{R_1} - (0{,}85 \pm 0{,}05);$$

стадия ацилирования свободного фермента

$$\lg(k_2/K_S) = (2{,}2 \pm 0{,}1)\pi_{R_1} + (0{,}6 \pm 0{,}1)\pi_{R_2} - (1{,}1 \pm 0{,}1),$$

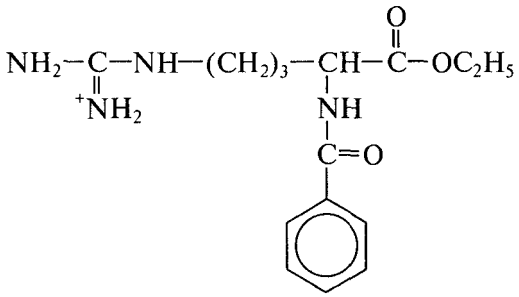
где π_{R_1}, π_{R_2} — показатель гидрофобности фрагмента R_1 и R_2 соответственно.

Таким образом, зная гидрофобность фрагментов субстрата, можно предсказать реакционную способность субстратов на всех стадиях процесса. Было показано, что теоретические оценки и экспериментальные значения k_2, k_3 и K_S удовлетворительно согласуются. Следует отметить, что на стадии ацилирования (константа k_2) гидрофобность фрагмента R_2 играет отрицательную роль (см. корреляционные уравнения). Это объясняется, по-видимому, тем, что гидрофобное связывание фрагмента R_2 в фермент-субстратном комплексе непродуктивно, т.е. гидрофобные взаимодействия не сохраняются при переходе системы в активированный комплекс. (Под продуктивным связыванием понимают способ фиксации субстрата в активном центре фермента, который сохраняется в переходном состоянии реакции на той или иной стадии процесса.) В то же время гидрофобное взаимодействие фрагмента R_2 упрочняет фермент-субстратный комплекс (константа K_S) и практически не влияет на скорость реакции процесса деацилирования (константа k_3).

Проведенный анализ показывает, что переход системы в активированный комплекс сопряжен с конформационной реорганизацией активного центра. При этом на каждой химической стадии процесса фрагменты структуры субстрата взаимодействуют с «узнающими» участками активного центра различным образом. Этот вывод подтверждается при анализе природы специфичности другого важного протеолитического фермента — трипсина.

Трипсин: роль электростатических взаимодействий. Специфическими субстратами трипсина являются производные лизина и

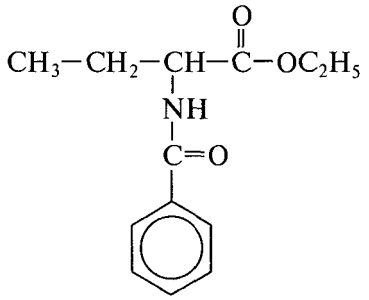
аргинина, несущие положительный заряд, удаленный от реакционного центра на шесть атомов углерода. Например, наибольшей реакционной способностью обладают синтетические субстраты: этиловый эфир N-бензоиларгинина и этиловый эфир N-бензоиллизина. Для этилового эфира N-бензоиларгинина:



получены следующие параметры: $K_S = 2{,}2 \cdot 10^{-3}$ моль/л; $k_2 = 2 \cdot 10^4$ с$^{-1}$; $k_3 = 23{,}5$ с$^{-1}$.

В то же время фермент трипсин эффективно гидролизует и большинство гидрофобных субстратов α-химотрипсина. Например, для этилового эфира N-бензоиламиномасляной кислоты параметры процесса гидролиза равны $K_S = 2{,}3 \cdot 10^{-3}$ моль/л, $k_2 = 0{,}45$ с$^{-1}$, $k_3 = 1{,}3$ с$^{-1}$. Показано, что образование фермент-субстратного комплекса полностью определяется гидрофобными взаимодействиями. Стадии деацилирования ацилферментов, образуемых незаряженными субстратами, протекают с приблизительно одинаковыми скоростями. Введение в субстрат фрагмента, содержащего положительный заряд, в 10^2—10^3 раз увеличивает скорость стадии образования ацилфермента (k_2).

На рис. 9.11 показано изменение свободной энергии по координате реакции гидролиза этилового эфира N-бензоил-L-аргина и его аналога, не содержащего положительно заряженного фрагмента субстрата, — этилового эфира N-бензоил-L-аминомасляной кислоты:



Оба соединения образуют комплекс с субстратом приблизительно одинаковой устойчивости. Однако специфический субстрат

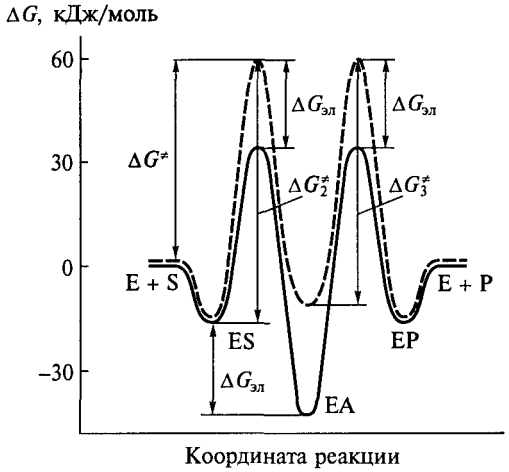


Рис. 9.11. Изменение свободной энергии системы по координате реакции триптического гидролиза этилового эфира N-бензоил-L-аргинина (сплошная линия) и этилового эфира N-бензоил-L-аминомасляной кислоты (пунктирная линия)

ацилирует активный центр трипсина с заметно меньшей энергией активации $\Delta G' = 17{,}6$ кДж/моль. Это значение соответствует энергии электростатического взаимодействия. Известно, что в активном центре трипсина имеется отрицательно заряженная карбоксильная группа аспарагиновой кислоты. Стадии деацилирования для обоих субстратов протекают через примерно одинаковые энергетические барьеры. При этом специфический субстрат деацилируют из более глубокой энергетической ямы. Это говорит о том, что электростатическое взаимодействие в исходном состоянии ацилфермента для специфического субстрата сохраняется.

Как показывают кинетические данные, электростатическое взаимодействие заряженного фрагмента с анионным центром в фермент-субстратном комплексе не реализовано. На стадии ацилирования наблюдается стабилизация переходного состояния за счет электростатических взаимодействий. Это говорит о том, что данный переход сопряжен с конформационным изменением, т.е. с некоторым неравновесным структурным изменением фермент-субстратного комплекса с дислокацией заряженного фрагмента субстрата и образованием ионной пары с анионным центром фермента.

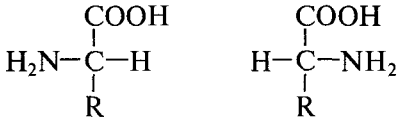
Таким образом, в фермент-субстратном комплексе субстрат связан непродуктивно, и продуктивное связывание субстрата реализуется в процессе перехода в активированный комплекс. Можно утверждать, что специфическое «узнавание» ферментом субстрата объясняется весьма простыми физико-химическими при-

чинами — ориентированной фиксацией фрагментов субстрата на сорбционном подцентре активного центра. В этом процессе участвуют разнообразные силы, характерные для белковых молекул: водородные связи, электростатические взаимодействия ионных пар, гидрофобная экстракция — «вытеснение» водой неполярных гидрофобных молекул друг к другу. Это слабые, но быстро протекающие взаимодействия. Эти взаимодействия формируют конфигурацию атомов, близкую по структуре к переходному состоянию Вместе с тем особенностью белковых молекул как катализаторов химических реакций является участие в механизме структурных перестроек конформационных изменений фермент-субстратных комплексов или интермедиатов. Действительно, все рассмотренные выше концепции, объясняющие специфичность ферментов (концепция напряжений и деформаций, концепция стерического и индуцированного соответствия, ориентирующей сорбции), в той или иной мере используют представление о структурной перестройке реагирующих частиц в процессе каталитического цикла. Необходимость такого рода изменений конформации субстрата, фермент-субстратного комплекса или промежуточных соединений вытекает из простых физических представлений. Ферментативная реакция — это сложный процесс с участием большого числа атомных ядер. Такого рода процессы не могут произойти в рамках одного элементарного акта. Поэтому ферменты вынужденно организуют процесс с участием последовательности метастабильных промежуточных соединений, живущих в интервале времени 10^{-9}—10^{-3} с. Каждое промежуточное соединение — это измененное структурное образование, требующее адекватного взаимодействия с белковой глобулой. Белковая молекула вынуждена подстраиваться под изменения структуры реагентов, реализуя структурные переходные или конформационные изменения. Часто эти конформационные изменения направлены на облегчение протекания следующей или лимитирующей каталитической стадии.

9.7. Стереоспецифичность ферментов

Принципиально важный феномен, определяемый фундаментальными свойствами ферментов, связан с явлением стереоспецифичности. Наличие в молекулах субстратов асимметрических атомов углерода, имеющих четыре различных заместителя, приводит к появлению стереоизомеров. Наиболее часто биохимия имеет дело со стереоизомерами аминокислот. Для того чтобы определить конфигурацию стереоизомеров, нужно расположить аминокислоту таким образом, чтобы карбоксильная группа оказалась вверху, а радикал R — внизу. В соответствии с правилами, предложенными Э. Фишером, аминокислота имеет L-конфигурацию, если амино-

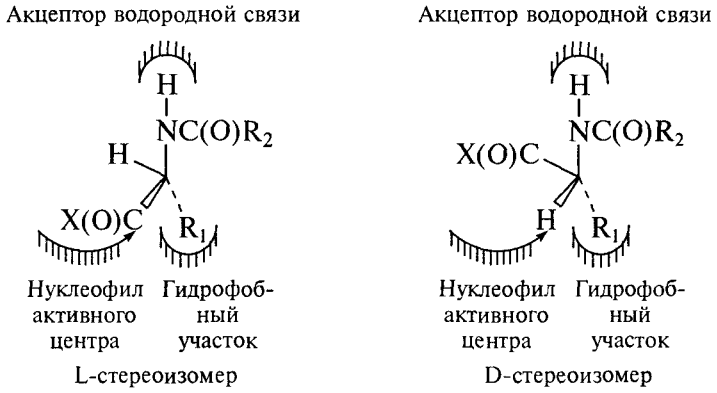
группа расположена слева, а атом водорода — справа. D-конфигурация аминокислоты характеризуется противоположным расположением групп



L-аминокислота D-аминокислота

Для описания стереоизомеров используют термины: «асимметрический центр», «хиральный центр», «хиральность» (хиральность означает принадлежность правому или левому).

Сами белки построены из оптически активных L-изомеров аминокислот. Ферменты, работающие с аминокислотами, весьма эффективно отличают D- и L-стереоизомеры аминокислот и, как правило, осуществляют реакции с одним из стереоизомеров. Природу стереоспецифического действия ферментов рассмотрим на примере протеолитических ферментов α-химотрипсина и трипсина. Как было отмечено выше, структуры этих ферментов содержат два принципиально важных фрагмента — радикал R_1, определяющий природу аминокислоты, и N-ацильный заместитель. Качественное объяснение стереоспецифичности ферментов основано на том, что связывание этих фрагментов с сорбционными участками активного центра для L- и D-конфигурации аминокислоты должно приводить к различному расположению реакционного центра (карбоксильного атома углерода) относительно нуклеофильного реагента — гидроксильной группы серина:

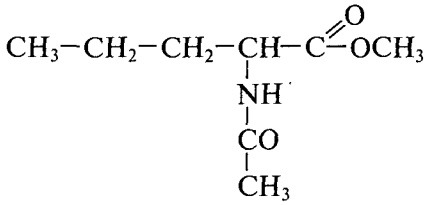


L-стереоизомер D-стереоизомер

Фиксация радикала R_1 в «гидрофобном кармане» α-химотрипсина и N-ацильной группы за счет водородной связи и гидрофобных взаимодействий приводит к тому, что карбоксильная группа в случае L-стереоизомера находится в зоне действия атакующего нуклеофила. Для D-стереоизомера реакционный центр субстрата

удален от нуклеофильного агента. По-видимому, для гидролиза D-стереоизомерных производных аминокислот необходима переориентация фрагмента R_1 и N-ацильного фрагмента, при этом N-ацильная группа должна взаимодействовать с «гидрофобным карманом» сорбционного центра.

Количественная оценка реакционной способности L- и D-стереизомера получена для метилового эфира N-ацетилнорвалина:



Изменение свободной энергии по координате реакции для D- и L-изомеров приведено на рис. 9.12. Видно, что D-стереоизомер субстрата (пунктирная линия) связывается с ферментом несколько прочнее, чем L-изомер. Однако на стадии ацилирования (k_2) реакционная способность различается в 7400 раз, а на стадии деацилирования (k_3) в 100 раз. Анализ природы стереоспецифичности приводит к выводу о возможности непродуктивного связывания субстрата в активном центре. В случае непродуктивного связывания субстрат образует нереакционноспособный комплекс с «узнающими» подцентрами активного центра, тем самым резко уменьшает реакционную способность последнего.

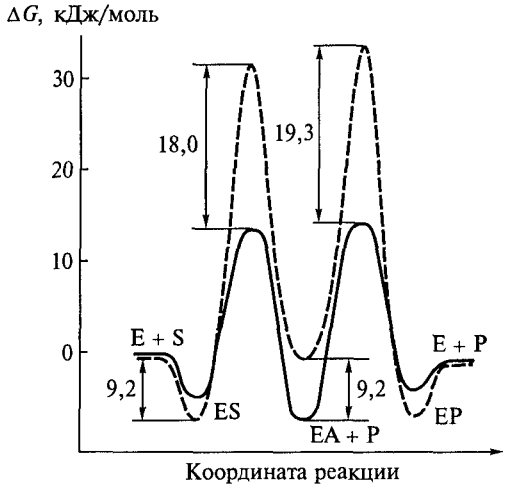


Рис. 9.12. Изменение свободной энергии системы по координате реакции химотриптического гидролиза для L-стереоизомера (сплошная линия) и D-стереоизомера (пунктирная линия) N-ацетилнорвалина

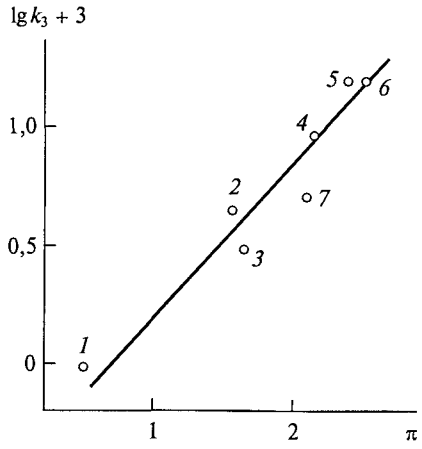


Рис. 9.13. Зависимость константы скорости ацилирования α-химотрипсина от гидрофобности N-ацетил (*1*), N-никотинил (*2*), N-изоникотинил (*3*), N-бензоил (*4*), N-тетрагидрофурил (*5*), N-тиофенил (*6*), N-*о*-аминобензоил (*7*) производных D-аланина

Рассмотренная модель позволяет сделать заключение, что увеличение гидрофобности N-ацильной части субстрата и тем самым увеличение ее способности к взаимодействию с гидрофобной областью, ответственной за продуктивное связывание, должно приводить к росту реакционной способности D-изомеров субстрата. Этот вывод подтвержден экспериментально. На рис. 9.13 приведена зависимость константы скорости ацилирования α-химотрипсина N-ацилированными производными D-аланина от гидрофобности N-ацильного заместителя. Видно, что соблюдается строгая линейная корреляция. Данный эксперимент является подтверждением рассмотренной выше концепции, объясняющей стереоспецифичность ферментов.

9.8. Специфичность ферментов: молекулярное приближение

Представленные выше механизмы выбора ферментом субстратов находят прямое подтверждение при рассмотрении трехмерных моделей белков и их активных центров. Проанализируем некоторые хорошо изученные ферментные системы.

Сериновые протеазы. Ферменты, содержащие в качестве нуклеофильного реагента гидроксильную группу серина, формирующую в процессе катализа лабильный интермедиат в виде ацилфермента, образуют большое семейство, имеющее общие генетические корни. Это следует из анализа первичной последовательности аминокислот полипептидной цепи. Во-первых, эти белки имеют высокую степень гомологии (30 % и выше), т.е. значительное число позиций аминокислот совпадает (см. гл. 3). Во-вторых, для этих белков может быть построено филогенетическое дерево, т.е. белки могут быть объединены в определенные кластерные группы, и последние могут быть расположены в последовательности по принципу минимальных замен.

Как известно, сериновые протеазы характеризуются различной специфичностью, что позволяет разделить их на группы в классификации ферментов (см. выше). Химотрипсин гидролизует пептидные связи преимущественно гидрофобных ароматических и алифатических аминокислот. Трипсин способен расщеплять полипептидную цепь по положительно заряженным аминокислотам лизину и аргинину, эластаза — по лейцину, валину, аланину.

Для анализа из базы данных SWISSPROT были выбраны протеазы химотрипсиновой, трипсиновой и эластазной специфичности, охарактеризованные по последовательности аминокислот и третичной структуре. Всего в группе оказалось 25 белков. Ферменты, выделенные из различных биологических источников (органов человека, мыши, крысы, свиньи, птицы), имеют различные последовательности аминокислот в полипептидной цепи, но все последовательности оказались родственными. Все белки образуют филогенетическое дерево (рис. 9.14). Концы ветвей филогенетического дерева — это анализируемые белки. Пересечения отдельных ветвей — гипотетические белковые структуры, мутации которых обеспечивают переход от одного белка к другому. Видно, что, во-первых, все белки имеют гипотетического общего предшественника (центральная точка). Во-вторых, все белки распадаются на три главные ветви в соответствии с их специфичностью.

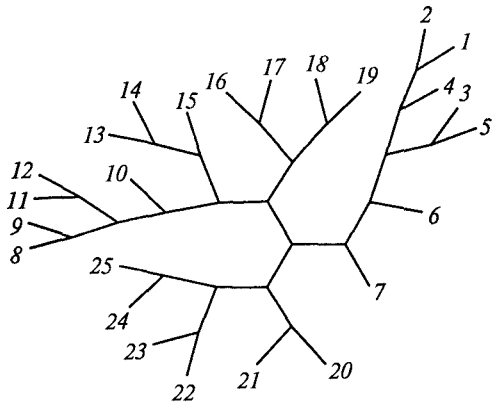


Рис. 9.14. Филогенетическое дерево сериновых протеаз:

1 — β-химотрипсин человека; *2* — химотрипсин-2 *Canfa*; *3* — β-химотрипсин быка; *4* — β-химотрипсин крысы; *5* — α-химотрипсин быка; *6* — α-химотрипсин *Gadmo*; *7* — химотрипсин-L человека; *8* — трипсин-2 быка; *9* — трипсин-2 *Canfa*; *10* — трипсин-1 человека; *11* — трипсин-1 крысы; *12* — трипсин-2 крысы; *13* — трипсин-1 *Canfa*; *14* — трипсин-1 быка; *15* — трипсин-P свиньи; *16* — трипсин-2 *Xenla*; *17* — трипсин-1 *Xenla*; *18* — трипсин-1 курицы; *19* — трипсин-2 курицы; *20* — β-эластаза-3 человека; *21* — α-эластаза-3 человека; *22* — эластаза-2 мыши; *23* — эластаза-2 крысы; *24* — эластаза-2 свиньи; *25* — α-эластаза-2 человека

Первую ветвь образуют химотрипсины, вторую — трипсины, третью — эластазы.

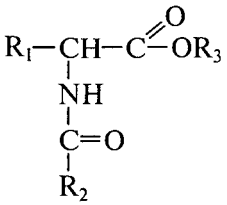
Центр «узнавания» субстрата (или сорбционный центр) представляет собой «карман» или углубление на белковой глобуле. Каталитически активные группировки Ser-195, His-57 и Asp-102 (нумерация аминокислот дана по α-химотрипсину) находятся в центре белковой молекулы. Сорбционный центр образован участками белковой глобулы Ser-179—Ser-190—Cis-191—Met-192, Val-213—Ser-214—Trp-215—Gly-216, Thr-224—Pro-225—Gly-226—Val-227—Tyr-228 (нумерация дана по α-химотрипсину).

Оказалось, что центры сорбции субстрата довольно консервативны и относительно небольшое число мутаций в сорбционном центре обеспечивает изменение специфичности и переход белка от одного ферментативного типа к другому. На рис. 9.15 приведены все 25 белков, образующих филогенетическое дерево, представленное на рис. 9.14. Видно, что сорбционный центр образуют небольшие полипептидные цепочки, аминокислоты которых занимают консервативные позиции 189—193, 213—216 и 224—228.

```
    189     193              213    216   224     228
1   ASGVSSCMGDSGGPLVCQKD-GAWTLVGIVSWGS--GTCSTSTPGVYARVTKLIPWVQQILQAN-
2   ASGVSSCMGDSGGPLVCQKD-GAWTLVGIVSWGS--DTCSTSSPGVYARVTKLIPWVQKILAAN-
3   ASGVSSCMGDSGGPLVCQKN-GAWTLAGIVSWGS--STCSTSTPAVYARVTALMPWVQETLAAN-
4   ASGVSSCMGDSGGPLVCQKD-GVWTLAGIVSWGS--GVCSTSTPAVYSRVTALMPWVQQILEAN-
5   ASGVSSCMGDSGGPLVCKKN-GAWTLVGIVSWGS--STCSTSTPGVYARVTALVNWVQQTLAAN-
6   AAGASSCMGDSGGPLVCQKA-GSWTLVGIVSWGS--GTCTPTMPGVYARVTELRAWVDQTIAAN-
7   GAGASSCQGDSGGPLVCQKG-NTWVLIGIVSWGT--KNCNVRAPAVYTRVSKFSTWINQVIAYN-
8   EGGKDSCQGDSGGPVACNG-----QLQGIVSWGY--GSAQKGKPGVYTKVCNYVDWIQETIAANS
9   EGGKDSCQGDSGGPVVCNG-----ELQGIVSWGY--GSAQKNKPGVYTKVCNFVDWIQETIAANS
10  EGGKDSCQGDSGGPVVCNG-----QLQGVVSWGD--GSAQKNKPGVYTKVYNYVKWIKNTIAANS
11  EGGKDSCQGDSGGPVVCNG-----QLQGIVSWGY--GSALPDNPGVYTKVCNFVGWIQDTIAAN-
12  EGGKDSCQGDSGGPVVCNG-----ELQGIVSWGY--GSALPDNPGVYTKVCNYVDWIQDTIAAN-
13  EGGKDSCQGDSGGPVVCNG-----ELQGVVSWGA--GSAQKGKPGVSPKVCKYVSWIQQTIAAN-
14  EGGKDSCQGDSGGPVVCSG-----KLQGIVSWGS--GSAQKNKPGVYTKVCNYVSWIKQTIASN-
15  EGGKDSCQGDSGGPVVCNG-----QLQGIVSWGY--GSAQKNKPGVYTKVCNYVNWIQQTIAAN-
16  AGGKDSCQGDSGGPVVCNG-----QLQGVVSWGY--GSAQRNYPGVYTKVCNFVTWIQSTISSN-
17  EGGKDSCQGDSGGPVVCNG-----QLQGVVSWGY--GSAMRNYPGVYTKVCNYNAWIQNTIAAN-
18  NGGKDSCQGDSGGPVVCNG-----QLQGIVSWGI--GSAQKGYPGVYTKVCNYVSWIKTTMSSN-
19  NGGKDSCQGDSGGPVVCNG-----QLQGFVSWGI--GSAQKGYPGVYTKVCNYVSWIKTTMSSN-
20  D-IRSGCNGDSGGPLNCPTEDGGWQVHGVTSFVSAFGCNTRRKPTVFTRVSAFIDWIEETIASH-
21  Y-IRSGCNGDSGGPLNCPTEDGGWQVHGVTSFVSGFGCNFIWKPTVFTRVSAFIDWIEETIASH-
22  DGVTSSCNGDSGGPLNCRASNGQWQVHGIVSFGSSLGCNYPRKPSVFTRVSNYIDWINSVMARN-
23  DGVTSSCNGDSGGPLNCQASNGQWQVHGIVSFGSTLGCNYPRKPSVFTRVSNYIDWINSVIAKN-
24  DGIISSCNGDSGGPLNCQGANGQWQVHGIVSFGSSLGCNYYHKPSVFTRVSNYIDWINSVIANN-
25  DGVISSCNGDSGGPLNCQASDGRWQVHGIVSFGSSLGCNYYHKPSVFTRVSNYIDWINSVIANN-
```

Рис. 9.15. «Выравнивание» сериновых протеаз (химотрипсина, трипсина, эластазы) в области «узнающего» субстратного центра. Индексация ферментов проведена в соответствии с базой данных SWISSPROT. Аминокислоты, составляющие сорбционный центр, выделены жирным шрифтом. Источники ферментов *1*—*25* приведены в подписи к рис. 9.14

На рис. 9.15 эти участки полипептидной цепи выделены жирным шрифтом. Напомним, что субстраты для обсуждаемых ферментов имеют следующую структуру:



Как известно, N-ацильный фрагмент субстрата фиксируется в активном центре за счет образования водородной связи с Ser-214, а также за счет гидрофобных взаимодействий радикала R_2. Для всех субстратов сериновых протеаз как природных, так и синтетических на основе аминокислот этот фрагмент субстрата одинаков. Как следствие, для семейства сериновых протеаз этот участок полипептидной цепи предельно консервативен. Для всех химотрипсинов и трипсинов это участок VSWG. Для эластаз происходит изоморфное замещение триптофана на фенилаланин, и у части эластаз Gly-216 замещен на Val, Val-213 замещен на Thr. Действительно, центр фиксации N-ацильного фрагмента и радикала R_2 субстрата представлен гидрофобной областью, содержащей также Ser-214, способный образовывать водородные связи.

«Узнавание» и выбор субстратов обсуждаемыми протеазами происходит за счет взаимодействия с белком радикала R_1. Переход от специфичности α-химотрипсина к трипсину осуществляется за счет введения в «узнающий» центр анионного фрагмента путем замены Ser-189 на Asp-189. Это главная мутация, обеспечивающая изменение специфичности. Переход от трипсина к эластазам обеспечивается обратной заменой аспарагиновой кислоты на серин. По этому центру связывания трипсины отличаются от химотрипсинов замещением Met-192 на глутамин; в эластазах эта аминокислота заменена на аспарагиновую.

Главный «гидрофобный карман», в котором фиксируется фрагмент R_1 для химотрипсина и ряда субстратов трипсина и эластазы, образует, по-видимому, участок цепи 225—228. Для всех ферментов это мотив Pro-225—Gly-226—Val-227—Tyr-228 с изоморфной заменой Tyr на Phe для эластаз. Для эластаз также характерно ограничение «гидрофобного кармана» введением положительного заряда Lys в позицию 224.

Следует отметить две особенности формирования сорбционного центра обсуждаемых ферментов.

1. Сорбционные подцентры группируются вокруг аминокислот, формирующих структуру белка и являющихся консервативными для всего семейства. В данном случае это Gly-193, Gly-216 и Pro-225.

2. Консервативные мотивы полипептидной цепи, образующие сорбционные подцентры, содержат глицин (Gly-193, Gly-216). Как известно, глицин обеспечивает подвижность относительно связей C—N и C—C полипептидной цепи (см. выше), а значит, конформационную подвижность активного центра и возможность его структурной адаптации к различным субстратам и интермедиатам в процессе катализа.

Фосфотриэстеразы (органофосфатгидролазы). Интерес к этому классу ферментов, гидролизующих триэфиры (или их аналоги) фосфорной кислоты, в последнее десятилетие существенным образом возрос из-за их способности гидролизовать боевые отравляющие вещества (зарин, зоман, ви-газ) и фосфорорганические пестициды.

Наиболее полно изучен фермент из почвенных бактерий *Pseudomonas*. Для этого фермента известна первичная, вторичная и пространственная структура. Поиск в геномных базах данных гомологов этого фермента позволил получить серию последовательностей аминокислот, обладающих высокой гомологией. Филогенетическое дерево, построенное по процедуре, описанной выше для сериновых протеаз, изображено на рис. 9.16. Процедура поиска гомологов была проведена по всей совокупности расшифрованных последовательностей и геномов. Видно, что данный фермент имеет большое число родственников в биологическом мире и его гомологи представлены в геномах бактерий, животных и

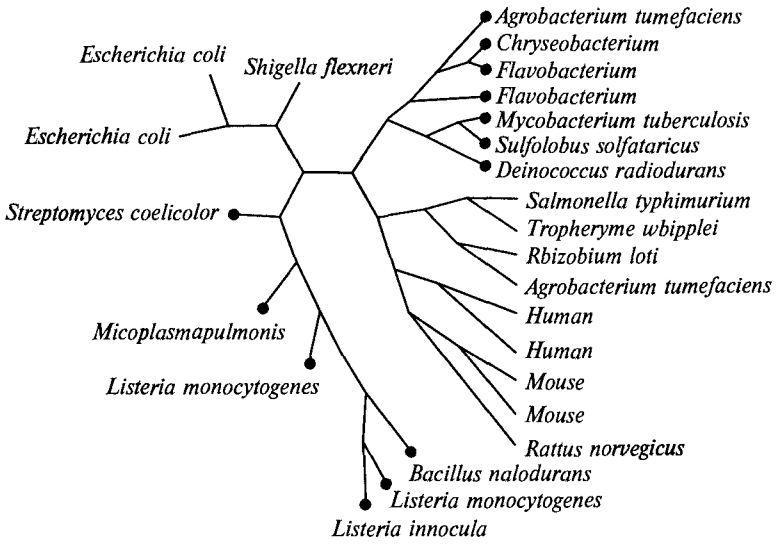


Рис. 9.16. Филогенетическое дерево белков, родственных органофосфатгидролазе, обнаруженных в геномах различных организмов

человека. Бóльшая часть обнаруженных последовательностей представлена в форме виртуального транслятора, т.е. лишь в виде последовательностей нуклеотидов в геномах, и не описана как физически выделенные и идентифицированные белки. Лишь для трех бактерий (*Pseudomonas*, *Flavibacterium*, *Micobacterium tuberalosis*) экспериментально показано, что белки обладают фосфотриэстеразной активностью. Каталитический центр фермента образуют ионы Zn^{2+} или Co^{2+}, объединенные в биядерный комплекс. «Сборку» биядерного комплекса осуществляет Lys-169 (нумерация дана по фосфотриэстеразе из бактерии *Pseudomonas*). Наличие этого остатка является необходимым для формирования каталитического центра, осуществляющего электрофильную активацию субстрата и электрофильную активацию воды (см. гл. 8). На рис. 9.16 точками обозначены белки, имеющие соответствующие лизиновые остатки в нужном положении. Бóльшая часть белков, содержащих Lys-169, не описана как ферменты, обладающие фосфотриэстеразной активностью, однако с высокой степенью надежности можно прогнозировать ее наличие.

Центры связывания металла (His-55, His-57, Lys-169, His-201, His-230) в высшей степени консервативны. Также абсолютно необходимым является наличие в 56-м положении карбоксилсодержащей аминокислоты (допускается изоморфная замена глутаминовой кислоты на аспарагиновую). Важно отметить наличие консервативного Gly-229, помогающего каталитически важному остатку гистидина His-230.

«Гидрофобный карман», фиксирующий гидрофобные фрагменты субстрата, показан на рис. 9.17. Эта область также консервативная, ее образуют Leu-271, Leu-272, Trp-302, Leu-303, Phe-306, Met-317. Видно, что шесть алифатических и ароматических аминокислот образуют гидрофобную микрофазу, которая может эффективно экстрагировать и фиксировать алифатические фрагменты субстратов.

Аминоацил-тРНК-синтетазы. «Узнавание» аминокислот важно как на стадии деструкции — гидролиза белков, так и на стадии их синтеза. Ключевыми ферментами в синтезе белков, обеспечивающими соответствие между аминокислотой и соответствующим ей кодоном, являются аминоацил-тРНК-синтетазы. Эти ферменты относятся к классу синтетаз (6-й класс в классификации ферментов) и катализируют реакцию присоединения аминокислоты к тРНК с соответствующим кодоном. Присоединение идет по 3′-оксигруппе тРНК и сопряжено с гидролизом АТФ:

$$\text{тРНК—OH} + NH_3^+\text{—CHR—}COO^- + \text{АТФ} \longrightarrow$$
$$\longrightarrow \text{тРНК—O—}\underset{\underset{O}{\|}}{C}\text{—}CH_2\text{—R—}NH_3^+ + \text{АМФ} + P_2O_7^{4-}$$

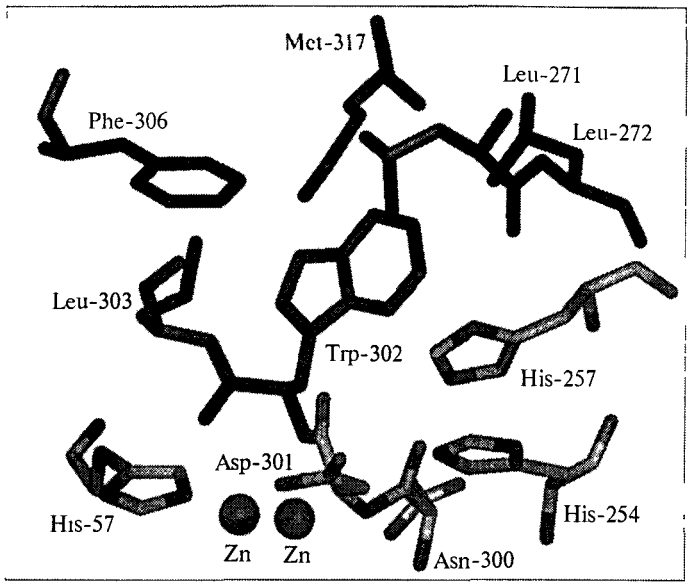


Рис. 9.17. «Гидрофобный карман» активного центра органофосфатгидролазы

Для каждой аминокислоты существует набор тРНК с соответствующими кодонами. Это ключевая реакция в биосинтезе белка, поскольку она является единственной в механизме биосинтеза, определяющей соответствие структуры аминокислоты и кодона. Специфичность аминоацил-тРНК-синтетазы достаточно высокая и определяется теми же кинетико-термодинамическими законо-

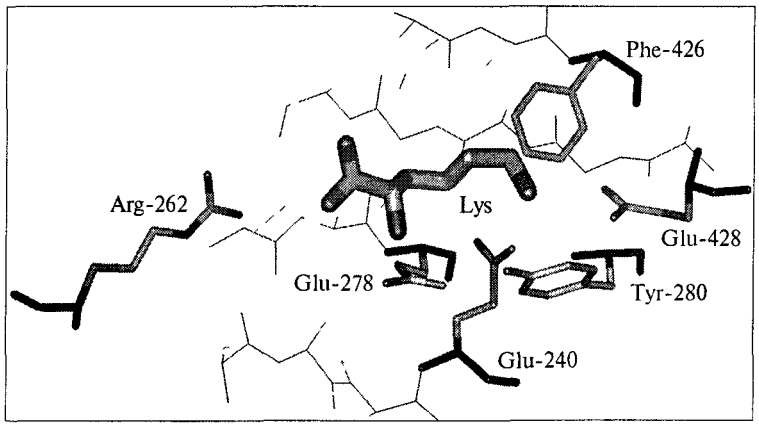


Рис. 9.18. Центр связывания L-лизина в L-лизил-тРНК-синтетазе, выделенной из бактерии *E. coli*

мерностями и набором взаимодействий, что и в случае ферментов гидролиза белков.

Рассмотрим, как аминоацил-тРНК-синтетаза, специфичная по лизину и соответствующей тРНК, «узнает» аминокислоту лизин. Структура комплекса L-лизина с аминоацил-тРНК-синтетазой представлена на рис. 9.18. Видно, что ε-аминогруппа аминокислоты взаимодействует с карбоксильной группой Glu-428, образуя прочную ионную пару. Взаимодействие происходит в гидрофобной среде, образуемой ароматическими кольцами Phe-473 и Tyr-280. α-Аминогруппа субстрата также связана с карбоксильной группой Glu-278 за счет электростатических сил. Этот фрагмент субстрата является общим для всех аминокислот. Поэтому для любой аминоацил-тРНК-синтетазы вблизи заряженной аминогруппы можно обнаружить заряженную карбоксильную группу, осуществляющую электростатическое связывание фрагмента субстрата.

Таким образом, двухточечная фиксация аминокислоты электростатическими взаимодействиями обеспечивает расположение реакционноспособной карбоксильной группы в нужной области активного центра.

* * *

Зачем же ты, бродяга, на базаре смущал народ, рассказывая про истину, о которой ты не имеешь представления?

М. Булгаков

Специфичность действия является принципиально важным свойством ферментов, обеспечивающим возможность проведения химических реакций в биологических системах с наименьшими потерями. Для объяснения способности выбирать молекулы определенной структуры было создано несколько модельных представлений, каждое из которых нашло экспериментальное подтверждение. Количественное подтверждение получила двухцентровая модель, связывающая выбор субстрата со специфической фиксацией его сорбционным центром фермента. По-видимому, механизмы выбора субстрата многообразны и каждый вносит определенный вклад в специфичность действия фермента.

Главный вывод из изложенного заключается в том, что для обеспечения специфичности ферменты используют весь набор «слабых», но «быстрых» взаимодействий (образование водородных, гидрофобных связей, ионных пар) для фиксации фрагментов субстрата и ориентации его относительно каталитически активных групп, приближая структуру субстрата к структуре переходного состояния. Слабого взаимодействия (8—25 кДж/моль) достаточно для того, чтобы фермент выбрал один из субстратов, обеспечив ему в 10^2—10^{11} раз бóльшую реакционную способность.

Важно отметить, что относительно небольшие изменения структуры сорбционного центра могут вызвать существенные изменения специфичности фермента. Так, всего лишь одна мутация — замена серина в 189-й позиции на аспарагиновую кислоту — обеспечивает перевод протеиназы из химотрипсинового ряда в трипсиновый.

Специфичность действия ферментов важна как в гидролитических, так и в синтетических реакциях. Особенно она существенна, когда ферменты участвуют в реакциях модификации генетического материала. На специфичности действия ферментов основана одна из самых интересных областей современной науки и технологии — генетическая инженерия.

Глава 10

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ ФЕРМЕНТОВ

> Мы не могли не осознавать, что специфическое спаривание оснований, постулированное нами, подразумевает наличие какого-то механизма копирования генетического материала.
>
> Если известен точный порядок оснований в одной из цепей, то можно записать и порядок оснований в другой, поскольку спаривание оснований специфично. Таким образом, одна цепь является комплементом другой; именно это свойство наводит на мысль, что ДНК может удваивать саму себя.
>
> *Дж. Уотсон, Ф. Крик*

10.1. Выделение и амплификация гена. Библиотека генов

К семидесятым годам прошлого столетия в основном сформировались представления о механизмах записи и молекулярного считывания генетической информации. Многочисленные исследования показали, что информация о структуре белка закодирована в двухцепочечных молекулах ДНК. Размножение (копирование) этой информации связано с процессами *репликации* — перехода двухцепочечной ДНК в две одноцепочечные субъединицы и достраивания вторых цепей на матрице первых. Процесс синтеза белка включает стадию *транскрипции* — синтеза молекулы матричной РНК (мРНК), комплементарной молекуле ДНК. Синтез белка осуществляется специализированной молекулярной машиной — *рибосомой*, при этом последовательность аминокислот полипептидной цепи задается последовательностью нуклеотидов матричной РНК. Этот процесс получил название *трансляции*. В генетическом коде каждой аминокислоте соответствует *кодон* — триплет (или группа триплетов) нуклеотидов (см. гл. 2). Соответствие между аминокислотой и кодоном обеспечивается группой высокоспецифических ферментов — аминоацил-тРНК-синтетазами. Ферменты этого типа способствуют химическому взаимодействию между транспортной РНК (тРНК) и аминокислотой с образованием аминоацил-тРНК. На рибосоме происходит комплементарное присоединение аминоацил-тРНК к мРНК на основе нуклеотид-нуклеотидного узнавания и образование пептидной связи. Процесс синтеза пептидной связи идет с расходом общего энергетического посредника — АТФ. Синтезированная полипептидная цепь удаляется с рибосомы, образуя вторичную, третичную структуру, т. е. формируя структуру белка. Ограничение полипептидной цепи от начала (N-конца) до С-конца осуществляется с помощью стоп-кодонов (UAA, UAG, UGA).

Вся эта, на первый взгляд, довольно сложная, но стройная система процессов приводит к *экспрессии* генетической информации по принципу один ген — один белок.

Последовательности генов организованы в *геномы*. Возникают в высшей степени интригующие вопросы: возможен ли перенос гена или группы генов из организма одного вида в организм другого вида; возможна ли экспрессия этих генов и к каким результатам это приведет. Ответы на эти вопросы и составляют основу новой области знания, получившей название *генетической инженерии*. Довольно быстро были разработаны методы специфической идентификации гена, методы «разрезания» и «склеивания» ДНК с помощью ферментов (получения рекомбинантных ДНК), созданы генетические конфигурации, обеспечивающие введение новой генетической информации в клетки и высокую эффективность экспрессии новых генов. Для химической энзимологии существенным было создание методов сайт-специфического мутагенеза, т.е. создание возможности замены одной аминокислоты на другую в полипептидной цепи. Разработанные методы стали использоваться в первую очередь для получения и исследования ферментов. Развитие генетической инженерии (или технологии рекомбинантных ДНК) привело к тому, что генетическая инженерия стала рядовым методом химической энзимологии.

Источником ДНК для генно-инженерных операций являются геномы различных организмов. Геном может быть превращен в *библиотеку генов* путем ферментативного гидролиза ДНК или РНК и включения полученных фрагментов в соответствующие *векторы*. Различают две основные разновидности библиотек генов: геномные библиотеки и библиотеки кДНК. Геномные библиотеки получают путем расщепления геномной ДНК с помощью гидролаз рестриктазного типа (см. далее) с последующим включением полученных фрагментов в циклические генетические конфигурации типа плазмид, фаговых векторов и др. (см. ниже). Получение библиотек кДНК предполагает промежуточную стадию обратной трансформации генетической информации, записанной на мРНК, в форму ДНК с помощью фермента — обратной транскриптазы. Библиотеки кДНК включают не весь геном, а только активированные гены, которые хорошо экспрессируются и дают относительно высокий уровень мРНК. В этом случае из клетки выделяют фракцию мРНК, с помощью фермента «обратная транскриптаза» на матрице мРНК синтезируют фрагменты ДНК, строго соответствующие структуре белков, и включают полученные гены в плазмидные или фаговые векторы. Библиотека генов в форме кДНК является предельно удобной, поскольку исключает все возможные балластные структуры, представленные в геноме, например интроны. Дело в том, что в процессе транскрипции (синтеза мРНК с матрицы ДНК) происходит исключение интронов, и ген получается в чистом виде.

Полученный набор векторов с включенным в них искомым геном вводится в клетки, и отбор нужной клетки, экспрессирующей тот или иной ген, проводится в процессе клонирования.

В том случае, если имеется информация о первичной структуре искомого белка (или его близкого гомолога), применяют более эффективный метод, основанный на *амплификации гена* с помощью ДНК-полимеразы. Существенный прогресс в этой области был достигнут при открытии и исследовании ДНК-полимераз из термофильных микроорганизмов. Обладая высокой термостабильностью, ДНК-полимераза термофилов допускает нагревание образца фермента до температуры 80—90 °С. В этих условиях двухцепочечные фрагменты ДНК «плавятся» и переходят в одноцепочечную форму. Фермент ДНК-полимераза осуществляет синтез второй цепи ДНК на матрице первой. Таким образом, в рамках одного цикла нагревание—охлаждение—синтез происходит получение из одной молекулы ДНК двух копий. При повторном цикле число копий N растет в геометрической прогрессии: $N = 2^n$, где n — число циклов. Реакция получила название *полимеразной цепной реакции.* Особенность этой реакции заключается в том, что в результате реакции удается увеличить число копий искомого гена в десятки тысяч раз и тем самым использовать для дальнейших генно-инженерных операций значительное количество ДНК. Это особенно важно, когда в исходном образце генетического материала очень мало.

ДНК-полимераза не способна работать с «чистого листа». Она только продолжает двойную цепь, ей необходима комплементарная «затравка», т.е. наличие двойной цепи на фрагменте амплифицируемой ДНК (см. разд. 8.9). Это дает возможность из гигантской смеси генов, представленных во фрагментированном геноме, выбрать нужный. Если имеется информация о последовательности аминокислот в искомом белке или соответственно информация о последовательности нуклеотидов в гене, выбор нужного белка осуществляют с использованием *праймеров* — одноцепочечных фрагментов ДНК, соответствующих началу и концу полипептидной цепи. Добавляя в реакционную среду праймеры, создают условия для комплексообразования праймеров с искомой фракцией ДНК, это обеспечивает точку начала и окончания работы ДНК-полимеразы. Технологический прием, основанный на использовании термостабильной ДНК-полимеразы, революционизировал методы выделения генов и молекулярно-генетический анализ.

Применение термостабильной ДНК-полимеразы из термофильных бактерий *Thermus aquaticus* позволяет провести много циклов амплификации при однократном введении фермента. Смесь ДНК, дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, избытка праймеров и ДНК-полимеразы нагревают до температуры плавления ДНК и образования одноцепочечных форм. Затем смесь охлаждают, достигая комплексообразования праймеров, так называемого «отжига», с од-

ноцепочечными формами ДНК. Далее температуру поднимают для оптимального синтеза второй цепи. Цикл повторяют многократно в течение нескольких часов. Таким образом получаются микрограммовые количества копий ДНК из единственной молекулы.

10.2. Ферменты — инструменты генетической инженерии

Успехи генетической инженерии стали возможны благодаря изучению ферментов, позволяющих проводить химические операции с генетическим материалом. В генетической инженерии используется большая группа ферментов, способных гидролизовать, «разрезать» молекулы ДНК и РНК по специфическим центрам, «сшивать» фрагменты нуклеиновых кислот с образованием фосфодиэфирных связей, проводить полимеризацию нуклеотидов на матрице одноцепочечной ДНК или РНК. Совокупность этих свойств ферментов позволяет манипулировать ДНК, проводить ее модификацию.

Рестриктирующие эндонуклеазы (рестриктазы). Это гидролазы, способные специфически сорбироваться на определенных последовательностях двухцепочечных молекул ДНК и гидролизовать определенные связи. Ферменты «узнают» короткие нуклеотидные последовательности ДНК и гидролизуют фосфодиэфирные связи в области этих последовательностей. Физико-химический принцип «узнавания» молекул белками изложен в гл. 9.

В настоящее время известно около 400 ферментов типа рестриктаз (табл. 10.1), способных расщеплять молекулу ДНК примерно в 90 различных центрах узнавания.

Ферменты выделяют из различных бактерий, что отражено в их названиях. Фермент *Eco*RI получен из *E. coli* K12; *Hae*II, *Hae*III — из *Haemophilus aegyptius*; *Bam*H — из *Bacillus amyloliquefaciens* (штамм H) и т.п.

Классическим примером рестриктаз является эндонуклеаза *Eco*RI. Этот фермент гидролизует ДНК в тех местах, где встречается последовательность 5′—GAATTC—3′. Эта последовательность является *палиндромной*, т.е. в обеих цепях точно напротив друг друга находятся одинаковые последовательности, читаемые в разных направлениях:

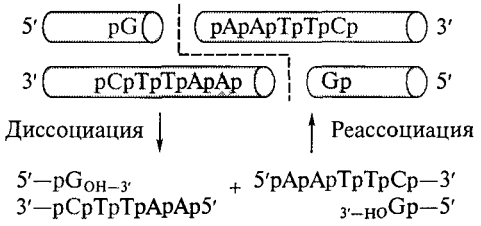


Таблица 10.1

Обозначения рестриктазных центров некоторых наиболее используемых ферментов

Рестриктирующая эндонуклеаза	Обозначение	Рестриктирующая эндонуклеаза	Обозначение
*Alu*I	*A*I	*Kpn*I	*K*
*Ava*I	*A*	*Mbo*I	*M*I
*Bam*HI	*B*	*Msp*I	*M*
*Bcl*I	*Bc*	*Pst*I	*P*
*Bgl*II	*B*2	*Pru*I	*Pu*
*Cla*I	*C*	*Sac*I	*Sc*
*Eco*RI	*E*	*Sau*3A	*S*3
*Eco*RII	*E*2	*Sma*I	*Sm*
*Eco*RV	*E*5	*Sph*I	*Sp*
*Hae*II	*He*	*Tag*I	*T*
*Hae*III	*Ha*	*Xba*I	*X*
*Hind*III	*H*	*Xma*III	*Xm*
*Hpa*I	*H*I		

Разрезание молекулы ДНК происходит в два этапа. Вначале гидролизуется одна цепь, потом — другая. Как видно, продуктами реакции являются два двухцепочечных фрагмента с комплементарными одноцепочечными концами 5′—AATT—3′. Одноцепочечные концы такого типа называют «липкими». Фрагменты, полученные в результате действия *Eco*RI из двух разных ДНК, могут соединиться водородными связями и в дальнейшем могут образовать химическую связь под действием лигазы. Эндонуклеаза *Eco*RI представляет димер, который имеет молекулярную массу 31 000. Белок образует комплекс с центром ДНК протяженностью около десяти пар, внутри этой последовательности находится специфический центр узнавания. Каталитический центр фермента образован комплексом ионов Mg^{2+} с карбоксильными группами аспарагиновой кислоты. Тип активного центра ферментов этого класса описан в гл. 8. Центр сорбции в активном центре фермента формируется аргинином и глутаминовой кислотой, образующими водородные связи с основаниями в специфическом центре рестрикции.

Большой набор рестриктаз обеспечивает возможность выбора при формировании различных «липких» концов. В табл. 10.2 представлена группа рестриктаз, разрезающих палиндромные последовательности с образованием «липких» концов. Результатом действия эндонуклеаз является 5′-концевой фосфомоноэфир и 3′-концевой гидроксил.

Таблица 10.2

Некоторые рестриктирующие эндонуклеазы, разрезающие палиндромные последовательности с образованием «липких» концов (центры разрезания показаны стрелками)

Фермент	Центр узнавания и разрезания	Фермент	Центр узнавания и разрезания
*Bam*HI	5′—G↑GATCC— —CCTAG↓G—5′	*Hpa*II	5′—C↑CGG— —GGC↓C—5′
*Bcl*I	5′—T↑GATCA— —ACTAG↓T—5′	*Mbo*I, *Sau*3A	5′—↑GATC— —CTAG↓—5′
*Bgl*I	5′—GCCNNNN↑NGGC— —CGGN↓NNNNCCG—5′	*Msp*I	5′—C↑CGG— —GGC↓C—5′
*Cla*I	5′—AT↑CGAT— —TAGC↓TA—5′	*Not*I	5′—GC↑GGCCGC— —CGCCGG↓CG—5′
*Eco*RI	5′—G↑AATTC— —CTTAA↓G—5′	*Pst*I	5′—CTGCA↑G— —G↓ACGTC—5′
*Hae*II	5′—RGCGC↑Y— —Y↓CGCGR—5′	*Tag*I	5′—T↑CGA— —AGC↓T—5′
*Hind*III	5′—A↑AGCYT— —TYCGA↓A—5′	*Xma*I	5′—C↑CCGGG— —GGGCC↓C—5′
*Hinf*I	5′—G↑ANTC— —CTNA↓G—5′		

В генетической инженерии также применяются рестриктазы, разрезающие фосфодиэфирную связь в середине «узнаваемой» последовательности. В результате возникают фрагменты ДНК с «тупыми» двухцепочечными концами (табл. 10.3).

Применение эндонуклеаз различной специфичности обеспечивает возможность разрезания молекулы ДНК на фрагменты различной длины. Полученные фрагменты могут быть разделены методом электрофореза, выделены и на следующем этапе включены в различные рекомбинантные ДНК-конструкции. Сшивку различных фрагментов ДНК осуществляют ферменты, получившие название лигаз.

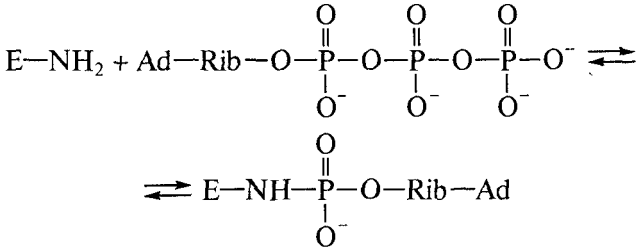
ДНК-лигазы. Объединение различных фрагментов ДНК *in vitro* осуществляют с помощью лигаз. В случае если фрагменты ДНК имеют «липкие» концы, два одноцепочечных участка могут обра-

Таблица 10.3

Некоторые рестриктирующие эндонуклеазы, разрезающие палиндромные последовательности с образованием «тупых» концов (центры разрезаиия показаны стрелками)

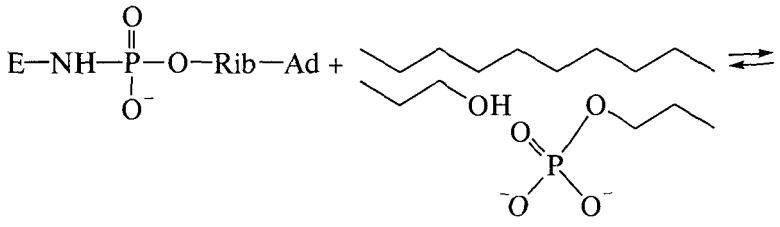
Фермент	Центр узнавания и разрезания	Фермент	Центр узнавания и разрезания
*Alu*I	5′—AG↓CT— —TC↑GA—5′	*Hpa*I	5′—GTT↓AAC— —CAA↑TTG—5′
*Hae*III	5′—GG↓CC— —CC↑GG—5′	*Sma*I	5′—CCC↓GGG— —GGG↑CCC—5′

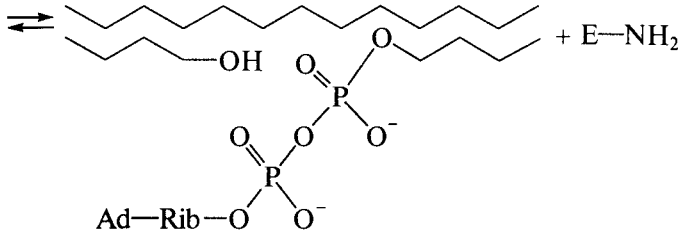
зовывать комплекс за счет комплементарных взаимодействий с помощью водородных связей. Комплекс может быть трансформирован в прочную химическую связь под действием ДНК-лигазы. Фермент катализирует образование фосфодиэфирных связей между соединенными нуклеотидами. Поскольку процесс является обратным гидролизу и в водной среде термодинамически невыгоден, реакция идет с расходом АТФ (иногда НАД$^+$). Схема процесса приведена ниже. Каталитически важной группой является E—NH_2-группа лизина. На первой стадии процесса происходит аденилирование активного центра:



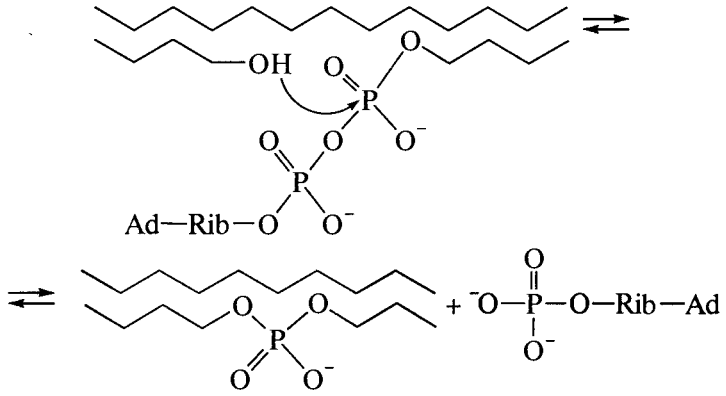
Здесь Rib — остаток рибозы; Ad — аденин.

На второй стадии фермент проводит *транс*-аденилирование с переносом нуклеотида на фосфатную группу и образованием макроэргической связи дифосфата:



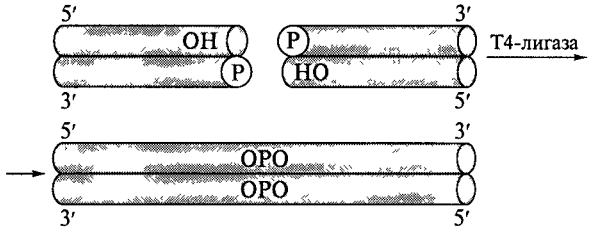


На третьей стадии происходит образование фосфодиэфирной связи и химическое сшивание фрагментов ДНК:



Таким образом, на формирование каждой связи затрачивается энергия гидролиза одной молекулы АТФ.

Существуют лигазы, способные провести сшивку двух фрагментов ДНК с «тупыми» концами. Наиболее известна в этом плане ДНК-лигаза фага Т4, соединяющая «тупые» концы двуцепочечной ДНК:



В каждой из цепей образуется новая фосфодиэфирная связь.

ДНК-полимеразы. Эти ферменты осуществляют синтез второй молекулы ДНК на матрице первой. Необходимым условием реакции является наличие праймера, комплементарного 3′-концу полимерной цепи. Фермент достраивает вторую цепь, имея дуплекс в качестве «затравки» реакции.

По химической природе процессы, проходящие в активном центре ДНК-полимераз, представляют собой реакции, обратные гид-

ролизу. Каталитические центры ферментов по химической природе и структуре организации аналогичны соответствующим Mg^{2+}-, Mn^{2+}-зависимым гидролазам (см. гл. 8). Активация фосфатного центра осуществляется по электрофильному механизму, аналогично активируется и 3′-гидроксильная группа сахара. (В случае гидролаз по этому же механизму происходит активация молекулы воды.) Кроме того, ДНК-полимеразы проявляют (3′→5′)- и (5′→3′)-гидролазные (экзонуклеазные) активности. Для ДНК-полимеразы, выделенной из бактерии *Escherichia coli* (ДНК-полимераза I), показано, что полимеразную и (3′→5′)-экзонуклеазную активность обеспечивает большая субъединица фермента, (5′→3′)-экзонуклеазную активность — малая.

РНК-зависимые ДНК-полимеразы (обратные транскриптазы). Выше обсуждалось, что получение библиотеки кДНК (перевод информации с матричных РНК на молекулярные структуры ДНК) осуществляется с помощью ферментов — обратных транскриптаз. Эти ферменты были выделены из РНК-содержащих вирусов. Ферменты синтезируют комплементарную цепь ДНК на матрице РНК. Так же, как и в случае ДНК-полимераз, необходим праймер, обеспечивающий наличие 3′-гидроксильной группы, с которой образуется фосфодиэфирная связь. Обычно на концах мРНК эукариотических организмов находится участок полирибоадениловой кислоты. Это позволяет использовать в качестве обобщенного праймера короткую цепочку полидезоксириботимидиновой кислоты.

10.3. Векторы

Для того чтобы записанная в ДНК информация нашла свое молекулярное выражение и экспрессировалась в виде белка, были созданы специальные генетические конструкции, получившие название векторов.

Наиболее развита генетическая инженерия бактерий, при этом бактерия *E. coli* является абсолютным рекордсменом по популярности в генетической инженерии. Для генетической инженерии бактерии используют ряд векторов.

Плазмиды. Это циклические ДНК, передаваемые клетками друг другу в рамках конъюгационного процесса. Бактериальные плазмиды были открыты, когда было обнаружено, что клетки способны передавать друг другу фактор устойчивости к антибиотикам. Было показано, что устойчивые к антибиотикам клетки содержат генетические элементы, не связанные с хромосомной ДНК. Эти элементы способны реплицироваться (размножаться) в клетке, увеличивая число своих копий. Число копий может достигать 10—100 плазмид на клетку. Процессы транскрипции (синтез мРНК) и

Таблица 10.4

Гены устойчивости к аитибиотикам

Антибиотики*	Кодируемый фермент	Реакция модификации
Ампициллин (*amp*)	β-Лактамаза	Гидролиз связи C—N в β-лактамном кольце
Стрептомицин (*str*)	Стрептомицинфосфотрансфераза (стрептомицинаденилатсинтетаза)	Фосфорилирование (аденилирование) OH-группы стрептомицина
Хлорамфеникол (*cam*)	Хлорамфениколацилтрансфераза	Ацетилирование хлорамфеникона с участием ацетил-CoA
Канамицин (*kan*)	Канамицилацетилтрансфераза	N-ацетилирование
Неомицин (*neo*)	Аминогликозидфосфотрансфераза	O-фосфорилирование

* В скобках дано общепринятое обозначение.

трансляции (синтез белка с матрицы мРНК) для плазмид проходят независимо от процессов с хромосомной ДНК.

Устойчивость к антибиотикам связана с наличием в плазмиде гена фермента, разрушающего тот или иной антибиотик. Гены устойчивости к антибиотикам возникли, по-видимому, в процессе эволюции и обеспечивают клеткам, несущим этот ген, возможность расти на средах, содержащих тот или иной антибиотик или их композицию. В табл. 10.4 приведены гены устойчивости к антибиотикам и химические реакции модификации антибиотиков, уничтожающие их антимикробную активность. Природные плазмиды содержат от одного до нескольких генов устойчивости к антибиотикам (рис. 10.1).

Плазмиды, изначально найденные в природе и выделенные из клеток бактерий, были модифицированы, укорочены, реконструированы и приспособлены для репликации эффективной экспрессии чужеродного гена.

Идеальный плазмидный вектор для введения чужеродного гена и последующего клонирования (см. ниже) должен быть построен из минимально необходимого количества ДНК и должен реплицироваться по принципу ослабленного контроля. Ослабленный контроль предполагает, что плазмиды в клетке-хозяине должны иметь возможность размножаться путем репликации. Число копий плазмид в хорошем векторе может достигать нескольких тысяч, в то время как строгий контроль за репликацией плазмид приводит к наличию в клетке всего 1—5 копий.

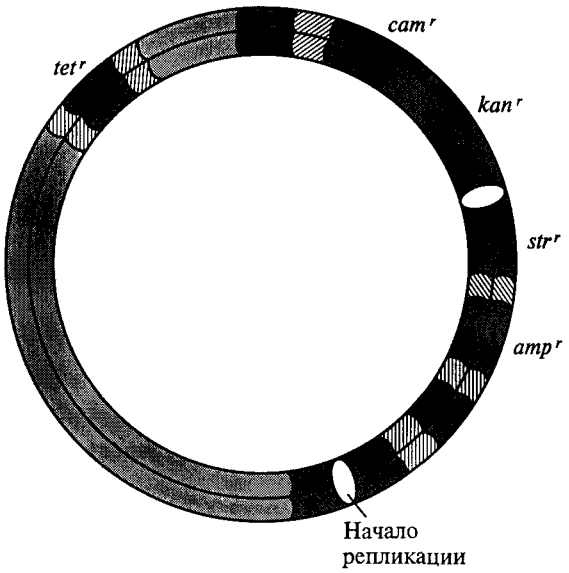


Рис. 10.1. Схематическое изображение плазмиды. Указаны гены устойчивости к антибиотикам (см. табл. 10.4; *tet* — ген устойчивости к тетрациклину)

Идеальный плазмидный вектор содержит один, а лучше два селектирующих маркера. Селектирующими маркерами являются гены устойчивости к антибиотикам. Наличие селектирующего маркера позволяет отобрать клетки (клоны), прошедшие стадию трансфекции, т.е. клетки, содержащие плазмиду, несущую вводимый чужеродный ген и ген устойчивости к антибиотику. После введения плазмид в клетки их размножение ведут в присутствии антибиотика, что позволяет выявить трансформированные вектором клетки.

Идеальный плазмида-вектор должен содержать лишь один центр рестрикции той или иной специфической рестриктазой (см. выше). Это позволяет разрезать кольцевую ДНК плазмиды по этому центру с последующим введением чужеродного гена и лигированием. Рестриктазами различной специфичности молекула ДНК может быть разрезана на отдельные фрагменты, которые можно разделить по размерам с помощью гель-электрофореза.

Таким образом, процессы разрезания ДНК проводят с помощью гидролитических ферментов рестриктаз, последующее сшивание различных участков рекомбинантной ДНК осуществляют лигазы. Центры рестрикции маркируют, обозначая рестриктазы. На рис. 10.2 схематически показаны природные плазмиды pNB1 и pNB2, выделенные из термофильных микроорганизмов. Плазмида

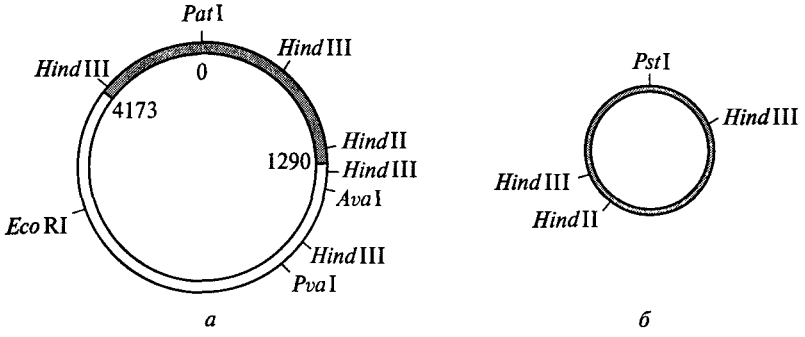


Рис. 10.2. Плазмиды pNB1 (*а*) и pNB2 (*б*), выделенные из термофильных микроорганизмов

pNB2 является уменьшенной дочерней частью pNB1. Видно, что pNB1 содержит большое число центров рестрикции.

Существенную роль в работе плазмид играют процессы регуляции транскрипции. Современные векторы на основе плазмид содержат область промотора. *Промотор* — это нуклеотидная последовательность, с которой связывается РНК-полимераза в процессе транскрипции. Эффективная экспрессия чужеродного гена предполагает эффективный процесс транскрипции, который начинается при связывании РНК-полимеразы с областью промотора. Регуляция экспрессии также включает стадию индуцирования синтеза. В этом случае промоторная область блокируется белком-репрессором. Репрессор прочно связывается с областью инициации транскрипции, конкурентно вытесняя РНК-полимеразу. Для индукции экспрессии в систему вводят низкомолекулярные индукторы. Распространенными являются *lac*-репрессоры. Индуктор прочно связывается с репрессором, вытесняя его из области связывания РНК-полимеразы.

При использовании в структуре плазмиды двух селектирующих маркеров (двух генов — ферментов, разрушающих антибиотики) чужеродный ген обычно вставляют в область одного из селектирующих маркеров. Это позволяет «отфильтровать» эффективно трансформированные клетки от клеток, получивших плазмиды без вставки, и от клеток, не получивших плазмиду вообще.

Действительно, после генетической модификации с помощью рестрикции, введения в ДНК чужеродного гена и лигирования в системе имеются как модифицированные плазмиды, обеспечивающие устойчивость к одному из антибиотиков, так и немодифицированные плазмиды, обеспечивающие устойчивость к обоим антибиотикам. При выращивании клеток на средах с одним и двумя антибиотиками можно выделить клетки, получившие чужеродную вставку.

Таблица 10.5

Некоторые наиболее употребляемые векторы для модификации *E. coli*

Шифр вектора	Контроль репликации	Число пар нуклеотидов	Селектирующие маркеры и уникальные центры рестрикции*
pSC101	Строгий	8700	Устойчивость к тетрациклину (*Hind* III, *Bam* I, *Sal* I)**, *Eco*RI
pUC7	Ослабленный	2700	Ампициллин (*Eco*RI, *Bam*HI, *Hinc* II, *Pst* I)
pMB9	Ослабленный	5500	Тетрациклин (*Hind* III, *Bam* HI, *Sal* I); колицин (*Eco*RI, *Hpa*I, *Sma*I)
pBR322	Ослабленный	4362	Тетрациклин (*Hind* III, *Bam* HI, *Sal* I); ампициллин (*Pst* I, *Pvu* I), *Eco*RI, *Ava*I, *Pvu* II, *Cla*I

* Центры рестрикции обозначены по специфичности рестриктаз (см. табл. 10.1).

** В скобках указаны центры рестрикции, находящиеся внутри селектирующего маркера.

В табл. 10.5 приведены некоторые плазмидные векторы, наиболее часто употребляемые при генно-инженерных модификациях бактерии *E. coli.*

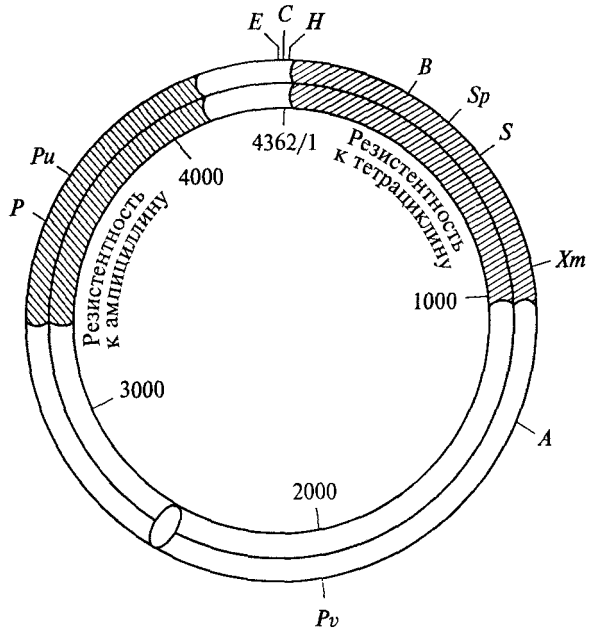


Рис. 10.3. Плазмида pBR322

На рис. 10.3 представлена структура плазмидного вектора pBR322. Показаны центры рестрикции (см. табл. 10.1), каждый из которых встречается только один раз. Вставка может быть осуществлена как в область чувствительности к тетрациклину (центры *B*, *Sp*, *S*, *Xm*), так и в область чувствительности к ампициллину (центры *P*, *Pu*).

Фаговые векторы. Значительное развитие получили векторы на основе вирусов бактерий — бактериофагов (фагов). Фаги представляют собой молекулы ДНК, упакованные в белковую оболочку, несущие гены структурных вирусных белков (капсидные белки), ферментов, участвующих в репликации ДНК, и литических ферментов, обеспечивающих разрушение (лизис) инфицированных клеток. В геноме фагов существуют необязательные частицы, которые могут быть удалены и заменены на чужеродные гены. Преимуществом векторов на основе бактериофагов является высокая эффективность переноса рекомбинантных ДНК в клетки хозяина, а также высокая эффективность размножения фаговых ДНК (большое число копий). Наибольшее распространение получили векторы на основе фагов λ и M13. Векторы получены на основе модификаций геномов дикого типа. На рис. 10.4 приведены

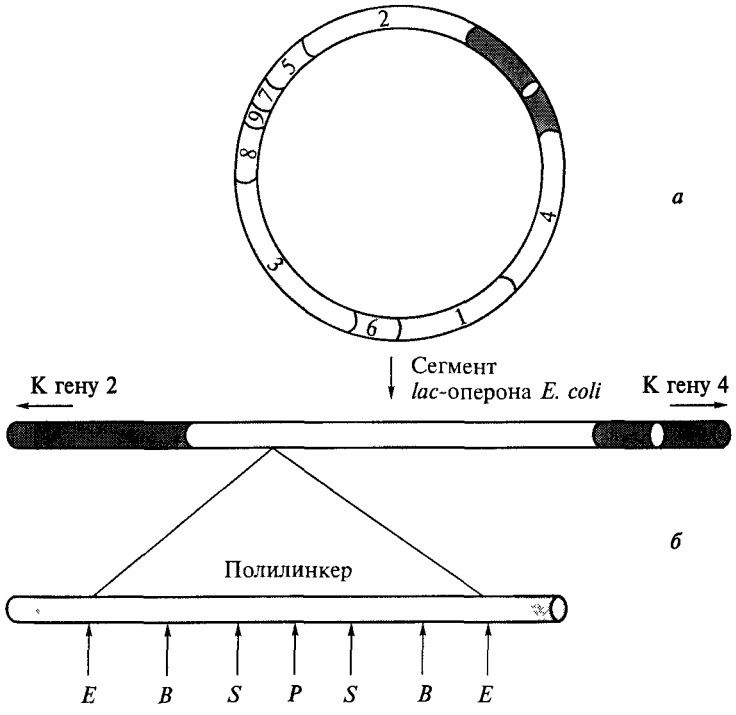


Рис. 10.4. Геном фага M13 (*а*) и типичный вектор (*б*), сконструированный на его основе

геном фага M13 (*а*) и типичный вектор (*б*), сконструированный на его основе. Цифрами отмечены различные гены. Гены 2, 5 отвечают за репликацию; остальные определяют образование, сборку капсида. В геном вектора встроен сегмент длиной 42 пары нуклеотидов, так называемый *полилинкер*, или мультиклонирующий сайт, для включения фрагментов ДНК с соответствующими «липкими» концами. Полилинкер содержит несколько центров узнавания для уникальных рестриктирующих эндонуклеаз.

Уникальной особенностью векторов на основе фага M13 является возможность получения одноцепочечных циклических ДНК. Двухцепочечные рекомбинантные ДНК при формировании зрелых фаговых частиц превращаются в одноцепочечные. Это свойство векторов данного типа было использовано при создании методологии сайт-направленного мутагенеза — специфической замене одной аминокислоты в полипептидной цепи (см. далее).

Поскольку каждый из векторов плазмидного или фагового типа имеет преимущества и недостатки, были сконструированы гибридные векторы, обладающие преимуществами того и другого вектора. *Космиды* — векторы, использующие эффективный плазмидный тип репликации и способные упаковываться *in vitro* в оболочки частиц фага λ. Это обеспечивает им высокую степень трансформации клеток. *Фагмиды* — гибриды между плазмидой и фагом, содержащие гены, необходимые для литической инфекции, и линеаризованную плазмиду. Фагмиды часто содержат ген температурочувствительного репрессора — белка, инактивирующегося при повышенной температуре. В этом случае фагмида реплицируется как плазмида при низкой температуре и как фаг при высокой.

Таким образом, в арсенале исследователей, работающих в области генетической инженерии, имеются большой набор ферментов, специфически модифицирующих ДНК, и особые методы введения чужеродного гена в клетку, обеспечивающие его эффективную экспрессию.

10.4. Кинетика репликации плазмид

Плазмида, попадающая в клетку-хозяин и придающая ей новые свойства, является нестабильным образованием. Возможна ее деструкция под действием различных нуклеаз. Кроме того, на стабильность гена оказывает влияние динамика роста и эволюции всей клеточной популяции, несущей плазмиды. Все эти процессы развиваются во времени. Рассмотрим кинетические закономерности переходных процессов репликации плазмид при периодическом культивировании клеток микроорганизмов и потери плазмид в процессе роста клеточной популяции.

Переходные процессы при периодическом культивировании. Рассмотрим плазмиды растущих популяций *E. coli* двух типов, отличающиеся кинетическим поведением. В растущих популяциях бактерий, содержащих природные или искусственно сконструированные плазмиды, наблюдаются специфические динамические эффекты. В зависимости от фазы роста клетки-хозяина и от скорости ее деления можно наблюдать существенные изменения числа копий плазмид. При этом возникают следующие вопросы: как изменяется число копий плазмид в процессе роста клеточной популяции и какого рода регуляторные процессы проявляются при этом. Качественные ответы на эти вопросы можно найти в литературе. Попробуем ответить на эти вопросы количественно, используя кинетический подход.

Определение числа копий плазмид в растущих популяциях различных штаммов *E. coli* показало, что существенной особенностью поведения таких систем является следующее: число плазмид на клетку не является постоянным, а закономерно изменяется в процессе роста популяции. При этом все наблюдаемые случаи могут быть разделены на два типа — монофазные и двухфазные процессы. В первом случае клетки временно теряют некоторое количество плазмид. Второй случай более сложен: уменьшение числа копий плазмиды на начальном этапе процесса в последующем сопровождается ее гиперпродукцией (через 4—6 ч после инокуляции концентрация плазмид существенно превышает исходное стационарное значение).

Возникает вопрос: что определяет тип поведения системы — природа плазмид или природа клеток-хозяев. Для ответа на этот вопрос были проведены следующие эксперименты. Плазмиды с различным репликоном (pMM24 и pUC12, pACYC177 и pGEM2) были введены в один и тот же бактериальный штамм *E. coli* jM109:

$$\text{pMM24} \rightarrow \textit{E. coli}\ \text{jM109} \leftarrow \text{pUC12}$$

$$\text{pACYC177} \rightarrow \textit{E. coli}\ \text{jM109} \leftarrow \text{pGEM2}$$

Было также исследовано кинетическое поведение одних и тех же плазмид, введенных в различные бактериальные штаммы (*E. coli* jM109 и *E. coli* pR13, *E. coli* C600 и *E. coli* jM109):

$$\textit{E. coli}\ \text{jM109} \leftarrow \text{pMM24} \rightarrow \textit{E. coli}\ \text{pR13}$$

$$\textit{E. coli}\ \text{C600} \leftarrow \text{pACYC177} \rightarrow \textit{E. coli}\ \text{jM109}$$

Поведение различных плазмид неодинаково. Однако плазмиды, имеющие одинаковый репликон *Col*E1 (pMM24, pUC12, pGEM2), кинетически идентичны. Таким образом, не природа клетки-хозяина, а структура репликона плазмиды определяет тип кинетического поведения. Этот вывод подтверждается экспери-

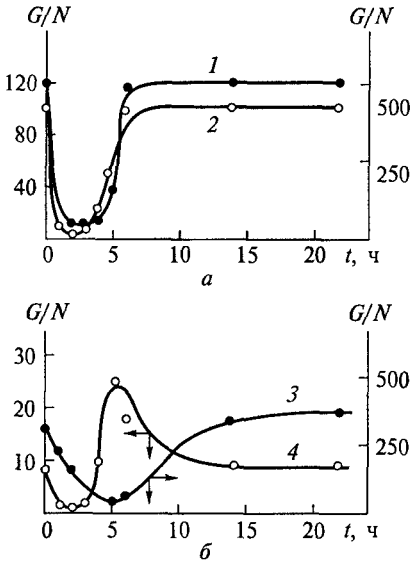


Рис. 10.5. Изменение во времени числа копий различных плазмид, введенных в *E. coli* (штамм jM109):

а — pMM24 (*1*), pUC12 (*2*);
б — pGEM2 (*3*), pACYC177 (*4*)

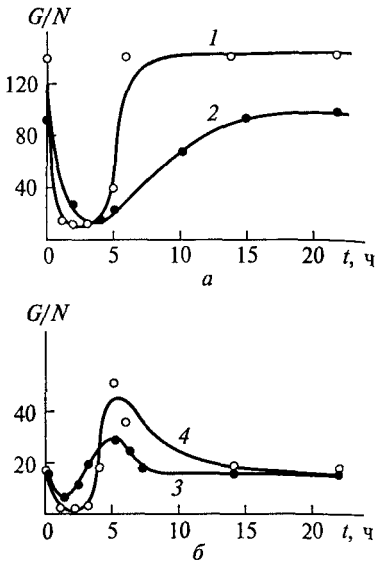


Рис. 10.6. Изменение во времени числа копий различных плазмид, введенных в *E. coli*:

а — штамм jM109: pMM24 (*1*), штамм pR13: pMM24 (*2*); *б* — штамм jM109: pACYC177 (*3*), штамм C600: pACYC177 (*4*)

ментами по кинетике изменения числа копий одной и той же плазмиды в различных штаммах.

На рис. 10.5 показано изменение во времени числа копий плазмид с различным репликоном, введенных в бактериальный штамм *E. coli* jM109. Данные на рис. 10.6 получены при введении плазмид с различным репликоном в разные штаммы *E. coli*.

Таким образом, в процессе репликации плазмид при росте популяции *E. coli* наблюдаются, по крайней мере, два типа кинетического поведения плазмид, при этом кинетика регулируется природой репликона. Плазмиды, содержащие репликон *Col*E1, характеризуются кинетическим поведением первого типа. В то время как плазмиды, содержащие репликон p15A, обнаруживают второй тип кинетического поведения, который характеризуется временным обеднением клеток плазмидами с последующей их гиперпродукцией.

Кинетическое описание репликаций плазмид первого типа. Как видно из приведенных выше экспериментальных данных, существует категория плазмид, характеризующихся наличием минимума на кривой изменения числа копий в процессе роста клеточной

популяции. Предположим, что наблюдаемое поведение объясняется различными значениями кинетических параметров, характеризующих рост клетки и плазмиды. Действительно, если удельная скорость репликации плазмид меньше скорости роста клеток или удельная скорость инактивации роста для плазмиды выше, чем соответствующий параметр для клеток, можно ожидать обеднения клеток плазмидами в процессе роста клеточной популяции.

Для кинетического описания процесса воспользуемся следующим подходом. Скорость роста числа клеток N может быть выражена уравнением

$$\frac{dN}{dt} = \mu(t)N.$$

Удельную скорость роста можно представить в виде

$$\mu(t) = \mu_0 f(t),$$

где μ_0 — начальная удельная скорость роста; $f(t)$ — управляющая функция.

Сопоставление этого уравнения с экспериментальными данными показывает, что в большинстве случаев управляющую функцию можно представить в виде $f(t) = \exp(-\lambda t)$, где λ имеет размерность константы скорости первого порядка и фактически является удельной скоростью инактивации клеток. Начальная удельная скорость роста μ_0 является функцией начальных условий, в частности начальной концентрации субстрата. Обсуждаемый подход приводит к следующим уравнениям:

$$\ln\frac{N}{N_0} = \frac{\mu}{\lambda}[1 - \exp(-\lambda t)],$$
$$N = N_0 \exp\left\{\frac{\mu}{\lambda}[1 - \exp(-\lambda t)]\right\}, \qquad (10.1)$$

где N_0 — начальная концентрация клеток.

Качественное и количественное сопоставление уравнений (10.1) с экспериментом показывает, что эти уравнения удовлетворительно описывают экспериментальные данные по кинетике роста клеточных популяций. Действительно, как следует из рис. 10.7, 10.8, накопление клеток может быть представлено в полулогарифмических координатах возрастающей экспоненциальной функцией с насыщением (уравнение (10.1)).

Для кинетического описания воспользуемся уравнением (10.1) и предположим, что кинетические параметры роста числа клеток и репликации плазмид могут отличаться. Для популяции клеток имеем

$$\frac{d\ln N}{dt} = \mu_c \exp(-\lambda t),$$

где μ_c — начальная удельная скорость роста числа клеток.

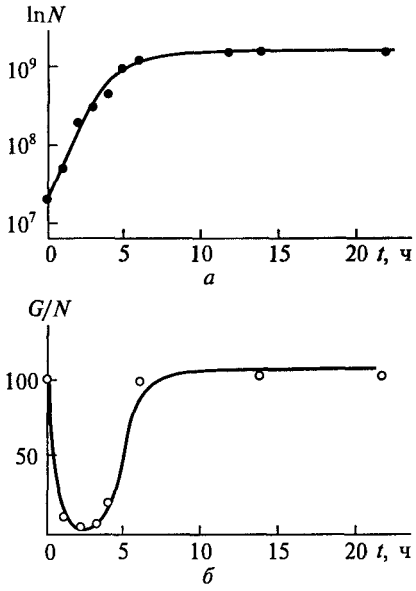


Рис. 10.7. Изменение во времени числа клеток (*а*) и числа копий плазмиды pUC12 (*б*) в процессе роста *E. coli* (штамм jM109)

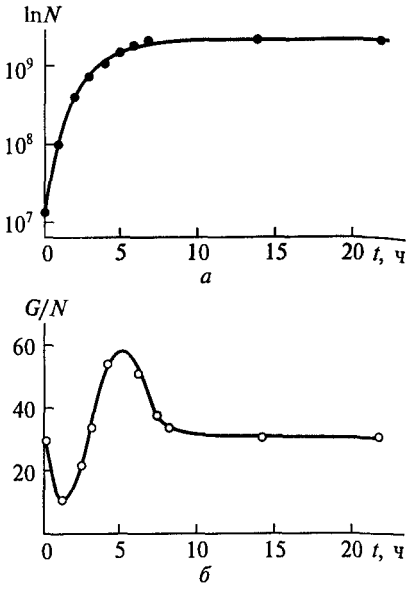


Рис. 10.8. Изменение во времени числа клеток (*а*) и числа копий плазмиды pACYC177 (*б*) в процессе роста *E. coli* (штамм C600)

Можно предположить, что кинетика репликации популяции плазмид описывается аналогичным уравнением

$$\frac{d\ln G}{dt} = \mu_p \exp(-\alpha_p t),$$

где G — концентрация плазмид в популяции; μ_p — удельная скорость репликации плазмид; α_p — удельная скорость инактивации репликации плазмид.

Тогда

$$N = N_0 \exp\left\{\frac{\mu_c}{\lambda}\left[1 - \exp(-\lambda t)\right]\right\},$$
$$G = G_0 \exp\left\{\frac{\mu_p}{\alpha_p}\left[1 - \exp(-\alpha_p t)\right]\right\}, \qquad (10.2)$$

где N_0, G_0 — начальная концентрация клеток и плазмид соответственно.

По определению число копий плазмиды равно $n = G/N$, что приводит к уравнению

$$n = \frac{G_0}{N_0} \exp\left\{\frac{\mu_p}{\alpha_p}\left[1 - \exp(-\alpha_p t)\right] - \frac{\mu_c}{\lambda}\left[1 - \exp(-\lambda t)\right]\right\}. \qquad (10.3)$$

Параметр $G_0/N_0 = n_0$ представляет собой число копий плазмиды в начальный момент времени. При бесконечно большом времени процесса имеем

$$n_\infty = n_0 \exp\left[\frac{\mu_p}{\alpha_p} - \frac{\mu_c}{\lambda}\right].$$

При многократном пересеве культуры система находит устойчивый режим, при котором начальное и конечное число копий плазмиды совпадают: $n_\infty = n_0$. Это соответствует условию $\mu_p/\alpha_p = \mu_c/\lambda$, которое приводит к уравнению

$$\frac{n}{n_0} = \exp\left\{\frac{\mu_c}{\lambda}\left[\exp(-\lambda t) - \exp(-\alpha_p t)\right]\right\}. \qquad (10.4)$$

На практике, как правило, реализуется случай, характеризуемый этим уравнением. Это видно, например, из рис. 10.5—10.8, т.е. начальное число копий плазмид и число копий при бесконечно большом времени практически совпадают.

Проанализируем поведение систем, кинетика которых описывается уравнением типа (10.4). На рис. 10.9 представлены рассчитанные по (10.4) кривые при варьировании параметров λ, μ_c и α_p. Как видно из рис. 10.9, *а*, соотношение параметров λ и α_p определяет, будет ли на кривой $n/n_0 = f(t)$ наблюдаться максимум или минимум. При $\alpha_p = \lambda$ число копий плазмиды во времени не меняется (см. рис. 10.9, *а*, линия *4*). При $\alpha_p < \lambda$ на кривой должен наблюдаться минимум (линии *5*—*8*); при $\alpha_p > \lambda$ можно ожидать прохождения кривой через максимум (линии *1*—*3*).

Таким образом, соотношение параметров α_p и λ определяет отношение удельных скоростей роста клеток и плазмид. Минимум на кинетических кривых будет наблюдаться, если $\alpha_p/\lambda < 1$ или $\mu_p < \mu_c$, т.е. если удельная скорость репликации плазмид меньше удельной скорости роста клеток. В этом случае на начальном этапе развития процесса скорость роста клеток превышает скорость репликации плазмид и при этом происходит уменьшение числа плазмид в клетках. В дальнейшем этот процесс компенсируется относительно более медленным процессом инактивации роста плазмид ($\alpha_p < \lambda$), что на более поздней стадии развития культуры выводит число копий на исходный уровень.

Взаимоотношения клетка-хозяин—плазмида в кинетическом плане характеризуется некоторым законом: $\mu_c\alpha_p = \mu_p\lambda = \text{const}$. Относительно низкие удельные скорости репликации плазмид компенсируются относительно низкими удельными скоростями их

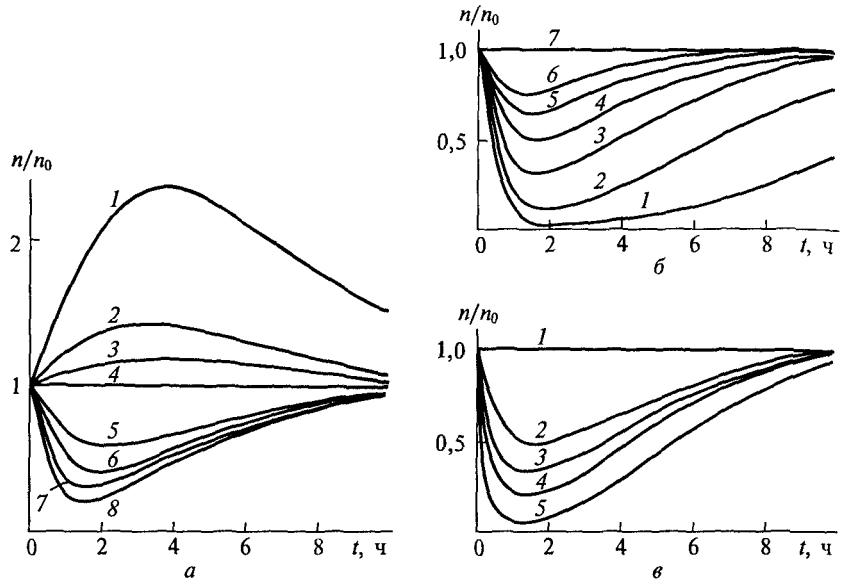


Рис. 10.9. Результаты расчета по уравнению (10.4) изменения во времени числа копий плазмид:

а — μ_c = 1,4 $ч^{-1}$, α_p = 0,4 $ч^{-1}$, λ = 0,2 (*1*), 0,3 (*2*), 0,35 (*3*), 0,4 (*4*), 0,6 (*5*), 0,8 (*6*), 1,0 (*7*), 1,4 (*8*) $ч^{-1}$; *б* — μ_c = 1,4 $ч^{-1}$, λ = 1,0 $ч^{-1}$, α_p = 0,2 (*1*), 0,3 (*2*), 0,4 (*3*), 0,5 (*4*), 0,6 (*5*), 0,7 (*6*), 1,0 (*7*) $ч^{-1}$; *в* — λ = 1,4 $ч^{-1}$, α_p = 0,4 $ч^{-1}$, μ_c = 0 (*1*), 0,8 (*2*), 1,1 (*3*), 1,5 (*4*), 2,5 (*5*) $ч^{-1}$

инактивации. Это обеспечивает равенство начального и конечного значений числа копий плазмиды при периодическом культивировании клеток-хозяев с чужеродным генетическим материалом. Из рис. 10.9, *б*, *в* видно, что чем меньше значение удельной скорости инактивации плазмид и чем больше удельная скорость роста клеток при прочих равных параметрах, тем глубже минимум на кинетических кривых $n/n_0 = f(t)$ роста клеточной популяции.

Таким образом, качественное сравнение теоретических кривых (см. рис. 10.9) с экспериментальными (см. рис. 10.5—10.8) показывает, что предложенная выше кинетическая модель адекватно описывает поведение плазмид первого типа в растущей клеточной популяции.

Кинетическое описание репликации плазмид второго типа. Кинетика репликации плазмид второго типа существенно сложнее. Кинетические кривые в этом случае характеризуются двумя экстремумами (см. рис. 10.5, 10.6, 10.8). Для кинетического описания такого рода процессов можно воспользоваться представлением о двухстадийном характере репликации плазмид в клетках. Следует заметить, что подобные представления, постулирующие двухстадийность процесса, часто используются при кинетическом опи-

сании роста клеточных популяций, например при наличии ярко выраженного периода индукции. Адекватной аппроксимацией подобных процессов является двухэкспоненциальная функция, моделирующая удельную скорость роста клеточной популяции.

Таким образом, если представить, что процесс репликации плазмид сопряжен с накоплением некоторого важного метаболита или компонента репликационного комплекса, то дифференциальное уравнение для концентрации плазмид G можно модифицировать следующим образом:

$$\frac{d\ln G}{dt} = \mu_p \exp(-\alpha_p t)[1 - \exp(-\beta t)], \qquad (10.5)$$

где член $[1 - \exp(-\beta t)]$ характеризует кинетику образования активного репликационного комплекса.

В рамках данного приближения параметр β имеет смысл константы скорости первого порядка, характеризующей кинетику активирующего систему процесса. По физическому смыслу активирующий процесс можно рассматривать как адаптацию системы к новым условиям среды (синтез фермента или ферментативной системы) или элиминирование (во времени) из системы репрессора репликации.

Из уравнения (10.5) следует, что управляющую функцию можно представить в виде

$$f(t) = \exp(-\alpha_p t) - \exp(-\gamma t),$$

где $\gamma = \beta - \alpha_p$.

По физическому смыслу процесс адаптации системы, характеризуемый параметром β, протекает быстрее процесса инактивации роста, так что $\beta > \alpha_p$, $\gamma > 0$. Таким образом, в отличие от систем, кинетика которых описывается экспоненциальной функцией, наблюдаемая удельная скорость репликации плазмид как функция времени ведет себя по-другому: сначала возрастает, достигает максимума и затем падает до нуля. Время достижения максимума для наблюдаемой удельной скорости репликации равно

$$\tau_n = \ln\frac{\gamma}{\alpha_p}(\gamma - \alpha_p)^{-1}.$$

Интегрирование уравнения (10.5) дает зависимость следующего вида:

$$\ln\frac{G}{G_0} = \left[\frac{\mu_p}{\beta}\exp(-\gamma t) - 1\right] + \frac{\mu_p}{\alpha_p}\left[1 - \exp(-\alpha_p t)\right].$$

Таким образом, зависимость числа плазмид в популяции от времени отражает функция

$$G = G_0 \exp\left\{\left[\frac{\mu_p}{\gamma}\exp(-\gamma t) - 1\right] + \frac{\mu_p}{\alpha_p}\left[1 - \exp(-\alpha_p t)\right]\right\}, \qquad (10.6)$$

тогда

$$n = n_0 \exp\left\{\frac{\mu_p}{\gamma}\left[\exp(-\gamma t) - 1\right] + \frac{\mu_p}{\alpha_p}\left[1 - \exp(-\alpha_p t)\right] + \frac{\mu_c}{\lambda}\left[\exp(-\lambda t) - 1\right]\right\}, \qquad (10.7)$$

$$\ln\frac{n}{n_0} = \frac{\mu_p}{\gamma}\left[\exp(-\gamma t) - 1\right] + \frac{\mu_p}{\alpha_p}\left[1 - \exp(-\alpha_p t)\right] + \frac{\mu_c}{\lambda}\left[\exp(-\lambda t) - 1\right]. \qquad (10.8)$$

Из экспериментальных данных следует, что число копий плазмид в начальный и конечный момент времени совпадает. Это налагает жесткое условие на соотношение параметров:

$$\frac{\mu_p}{\gamma} + \frac{\mu_c}{\lambda} = \frac{\mu_p}{\alpha_p}. \qquad (10.9)$$

На рис. 10.10 представлены экспериментальные данные по изменению во времени числа копий плазмиды pACYC177 штамм *E. coli* jM109 и теоретическая кривая, рассчитанная по уравнению (10.7). Как видно, результаты расчета и эксперимента удовлетворительно согласуются.

Таким образом, качественные отличия в поведении плазмид первого и второго типов обусловлены различными кинетическими законами репликации: кинетика процессов с участием плазмид второго типа характеризуется наличием периода индукции.

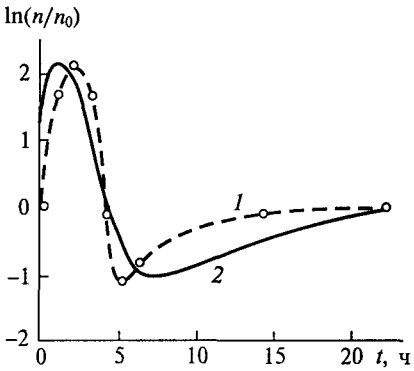


Рис. 10.10. Сопоставление экспериментальных данных (*1*) и результатов расчета (*2*) по уравнению (10.7) изменения во времени числа копий плазмид pACYC177 в *E. coli* (штамм jM109) при $\lambda = 0{,}5$ ч$^{-1}$, $\alpha_p = 0{,}5$ ч$^{-1}$, $\gamma = 0{,}3$ ч$^{-1}$

Потеря плазмид клетками-хозяевами в процессе роста клеточной популяции. Важной особенностью кинетического поведения микробных культур, несущих плазмиды, является потеря последних клетками-хозяевами и соответственно потеря закодированной в них информации, в том числе о чужеродных генах. Этот процесс имеет важное значение как с точки зрения понимания фундаментальных основ экс-

прессии гена, так и с точки зрения практического использования генно-инженерных продуцентов. Потеря микробной популяцией заданного ей чужеродного гена в ряде случаев ограничивает биотехнологическое использование этих микроорганизмов и заставляет искать пути, исключающие этот процесс.

Сравнение скоростей роста плазмидсодержащих (р+) и плазмиднесодержащих (р–) клеток показывает, что в условиях отсутствия селектирующих факторов (например, антибиотиков, подавляющих рост (р–)-клеток) (р+)-клетки растут заметно медленнее. Например, сравнение удельных скоростей роста *E. coli* W3101 в (р+)- и (р–)-штаммах обнаруживает, что (р–)-клетки растут с удельной скоростью 1,65 $ч^{-1}$; клетки, содержащие плазмиду pBR328, растут с удельной скоростью 1,51 $ч^{-1}$, клетки, содержащие плазмиду pBR325, — со скоростью 1,42 $ч^{-1}$.

Уменьшение скорости роста клеточной популяции при введении плазмид обусловлено, по-видимому, следующими причинами. Первая причина заключается в том, что вынужденная необходимость синтезировать белки, не участвующие в ее собственном метаболизме, является дополнительной нагрузкой для клетки, вызывающей замедление роста. Вторая фундаментальная причина, приводящая к уменьшению скорости роста (р+)-клеток, — это конкуренция хромосомной и плазмидной ДНК за компоненты, необходимые для протекания их процессов репликации. Действительно, имеются экспериментальные данные, которые показывают, что чем больше в клетке плазмид, тем меньше удельная скорость роста популяции. Рассмотрим простейшую кинетическую модель, из которой следует, что конкуренция между хромосомными генами и плазмидами за факторы репликации должна приводить к замедлению роста (р+)-клеток. Кинетическую схему такого процесса можно представить в следующем виде:

$$\begin{aligned} P + A &\underset{}{\overset{K_P}{\rightleftharpoons}} PA \xrightarrow{k_P} 2P \\ C + A &\overset{K_C}{\rightleftharpoons} CA \xrightarrow{k_C} 2C \end{aligned} \qquad (10.10)$$

где A — фактор, участвующий в репликации плазмидной и хромосомной ДНК; P, C — специфический центр комплексообразования фактора A с плазмидой и хромосомой соответственно; PA, CA — соответствующие комплексы; K_P, K_C — соответствующие константы связывания; k_P, k_C — эффективная константа скорости репликации плазмиды и хромосомы соответственно.

В режиме, при котором фактор A является лимитирующим, уравнение для скорости роста клеток будет иметь вид

$$v_0 = \frac{k_C A_0 C_0}{K_C}\left[1 + \frac{P_0}{K_P} + \frac{C_0}{K_C}\right]^{-1}. \qquad (10.11)$$

Видно, что скорость роста клеток в соответствии с уравнением (10.11) должна падать с увеличением концентрации плазмидных центров, связывающих фактор А, т.е. уменьшаться с ростом числа плазмид в клетке.

Меньшая скорость роста (р+)-клеток по сравнению с (р–)-клетками будет приводить к вытеснению из популяции клеток, несущих плазмидные гены. Это один из наиболее мощных факторов, определяющих нестабильность плазмидного гена. Другой существенный фактор связан с процессами мутационного характера, приводящими к удалению плазмид в силу специфической или неспецифической деструкции. Проведем кинетический анализ процессов, приводящих к потере плазмидного гена, с целью выяснения причины явления. Кинетическая схема имеет вид

$$\begin{array}{l} N_p \xrightarrow{\mu_p} 2N_p \\ N_p \xrightarrow{k} N_n \xrightarrow{\mu_n} 2N_n \end{array} \qquad (10.12)$$

где N_p — клетки, несущие плазмидный ген; N_n — клетки, потерявшие плазмиду; μ_p, μ_n — удельная скорость роста (р+)- и (р–)-клеток соответственно. Процесс мутации (р+)-клеток в (р–)-клетки характеризуется константой скорости первого порядка k.

Система дифференциальных уравнений, описывающая кинетику процессов (10.12), имеет вид

$$\frac{dN_p}{dt} = \mu_p N_p - kN_p,$$
$$\frac{dN_n}{dt} = \mu_n N_n + kN_n.$$

Решением системы являются функции

$$N_p = N_{p0}\exp[(\mu_p - k)t], \qquad (10.13)$$

$$N_n = \left[N_{n0} + \frac{kN_{p0}}{\mu_n + k - \mu_p}\right] \times \qquad (10.14)$$
$$\times \exp\left[\mu_n t - \frac{kN_{p0}}{\mu_n + k - \mu_p}\right] \exp[(\mu_p - k)t].$$

Экспериментальные данные представляют, как правило, в форме доли клеток, несущих (или не несущих) плазмиды, в общей популяции клеток. По определению эта доля составляет

$$\eta_p = \frac{N_p}{N_n + N_p}, \qquad (10.15)$$
$$\eta_n = \frac{N_n}{N_n + N_p}.$$

Подстановка функций (10.13), (10.14) в уравнения (10.15) приводит к следующему выражению:

$$\eta_p = \frac{N_{p0}\exp\left[(\mu_p - k)t\right]}{(N_{n0}+\beta)\exp(\mu_n t - \beta)\exp\left[(\mu_p - k)t\right] + N_{p0}\exp\left[(\mu_p - k)t\right]},$$
$$\eta_n = \frac{(N_{n0}+\beta)\exp(\mu_n t - \beta)\exp\left[(\mu_p - k)t\right]}{(N_{n0}+\beta)\exp(\mu_n t - \beta)\exp\left[(\mu_p - k)t\right] + N_{p0}\exp\left[(\mu_p - k)t\right]}. \quad (10.16)$$

где $\beta = \dfrac{kN_{p0}}{\mu_n + k - \mu_p}$.

Рассмотрим более подробно зависимость от времени доли (p+)-клеток. Первое уравнение (10.16) можно преобразовать к виду

$$\eta_p = \frac{1}{1 - \dfrac{k}{\Delta\mu + k} + \left(\dfrac{N_{n0}}{N_{p0}} + \dfrac{k}{\Delta\mu + k}\right)\exp\left[(\Delta\mu + k)t\right]}, \quad (10.17)$$

где $\Delta\mu = \mu_n - \mu_p$.

Уравнения (10.16), (10.17) описывают также зависимость доли (p+)- и (p–)-клеток от числа генераций. На рис. 10.11 приведены кривые, рассчитанные по уравнению (10.17) при варьировании параметров $\Delta\mu$ и k. Как следует из этих данных, вид функции определяется соотношением этих параметров. При $\Delta\mu > k$ на кривых наблюдается индукционный период. При $\Delta\mu < k$ кривые вырожда-

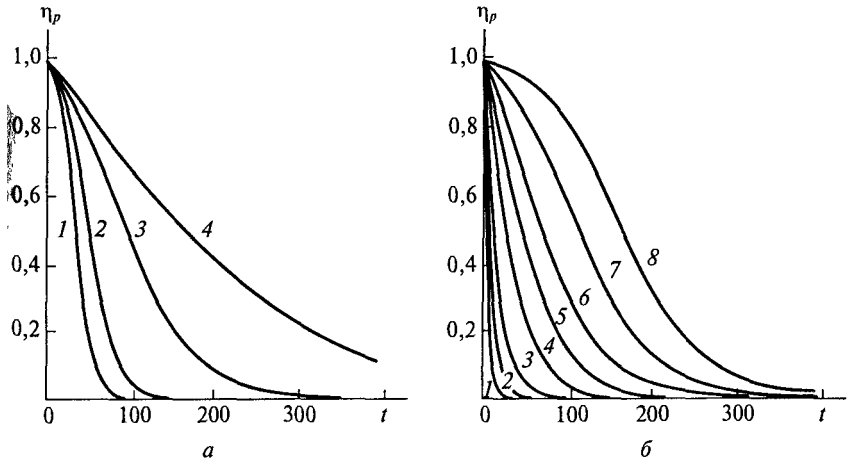


Рис. 10.11. Результаты расчета по уравнению (10.17) изменения во времени доли (p+)-клеток:

а — $k = 0{,}003$, $N_{n0}/N_{p0} = 0{,}001$, $\Delta\mu = 0{,}1$ (*1*), 0,6 (*2*), 0,03 (*3*), 0,05 (*4*); *б* — $\Delta\mu = 0{,}02$, $N_{n0}/N_{p0} = 0{,}001$, $k = 0{,}2$ (*1*), 0,08 (*2*), 0,05 (*3*), 0,015 (*4*), 0,01 (*5*), 0,005 (*6*), 0,002 (*7*), 0,0005 (*8*)

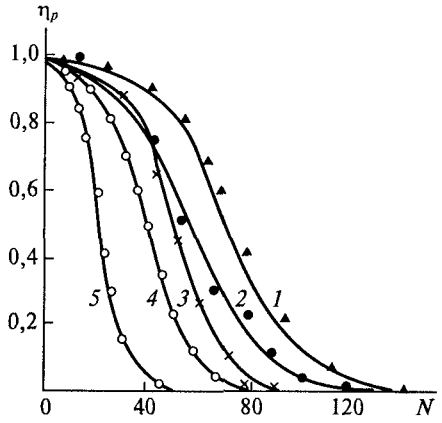


Рис. 10.12. Экспериментальная зависимость доли (p+)-клеток от числа N генераций популяции для плазмиды pBOE106 растущей популяции *E. coli* (штамм MC100) при температуре 27 (*1*), 30 (*2*), 32 (*3*), 33 (*4*), 34 (*5*) °C

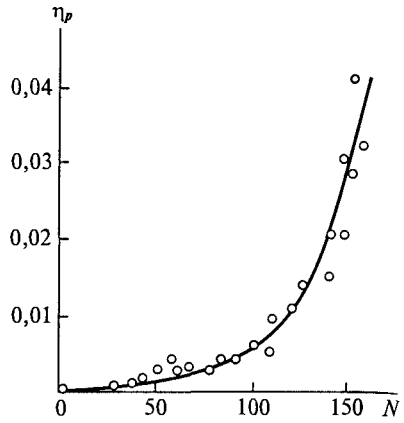


Рис. 10.13. Экспериментальная зависимость доли (p−)-клеток от числа N генераций популяции для плазмиды pMC169 растущей популяции *E. coli* (штамм B377)

ются в зависимость, близкую к экспоненциальной, при этом кинетика процесса определяется константой k и становится нечувствительной к изменениям параметра $\Delta\mu$.

Рисунок 10.11, *б* иллюстрирует зависимость η_p при различных значениях k. При больших значениях константы скорости спонтанного мутационного процесса доля (p+)-клеток экспоненциально падает. Отношение N_{p0}/N_{n0} определяет значение η_p в начальный момент времени и вид кинетической кривой. При $N_{p0}/N_{n0} \ll 1$ имеем $\eta_{p0} \approx 1$. Заметное отклонение η_{p0} от единицы показывает, что в популяции микроорганизмов существенную долю составляют (p−)-клетки.

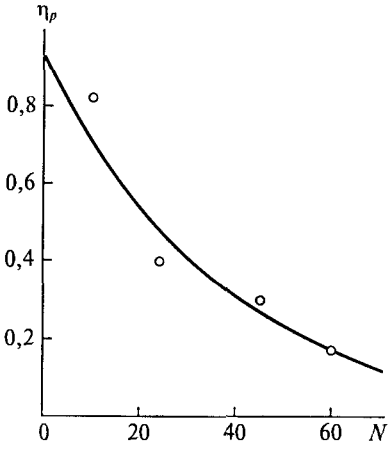


Рис. 10.14. Экспериментальная зависимость доли (p+)-клеток от числа N генераций популяции для плазмиды BOE147 растущей популяции *E. coli* (штамм MC1000)

Сопоставление результатов расчета по уравнениям (10.16), (10.17) с экспериментальными данными приведено на рис. 10.12—10.14. Видно, что теоретические кривые и данные эксперимента удовлетворительно согласуются.

Проведенный кинетический анализ позволяет дать следующие

рекомендации для повышения устойчивости плазмидного чужеродного гена.

1. Рекомендуется использовать приемы селективного подавления роста (р–)-клеток. Такой подход является классическим, широко применяется при селекции микроорганизмов и связан, как правило, с введением в плазмиду фактора устойчивости к среде (устойчивости к антибиотику, утилизации ключевого метаболита и др.). Действительно, из уравнения (10.16) следует, что при селективном подавлении роста (р–)-клеток имеем $\mu_n = 0$, $\eta_p = 1$ во всем временно́м интервале.

2. Стабилизация гена может быть обеспечена за счет регулирования температурного режима роста популяции. Как видно из рис. 10.12, значение $\Delta\mu$ закономерно уменьшается с понижением температуры роста. Таким образом, для стабилизации роста популяции с плазмидами культивирование следует проводить при возможно низких температурах, обеспечивающих тем не менее жизнеспособность клеточной популяции.

3. Качественно изменить кинетическое поведение плазмидонесущей микробной популяции может метод иммобилизации клеток. При иммобилизации клеток, как правило, замедляется их рост, что может приводить к ситуациям, при которых $\Delta\mu = 0$. Время работы плазмидного гена в этих условиях увеличивается.

10.5. Трансформация, трансфекция. Клоны и клонирование

Процесс введения вектора в клетку называют *трансфекцией*. Для этих целей необходимо применить один из методов, позволяющих довольно большой молекуле циклической ДНК проникнуть в клетку. Обычно трансфекцию осуществляют, предварительно обработав клетки концентрированным раствором хлорида кальция или хлорида рубидия. В этих условиях нарушается целостность клеточной мембраны, что увеличивает вероятность введения вектора в клетку. Для этих целей также применяют электропорацию — проникновение плазмид в клетку сквозь мембрану под действием электрического поля. Для больших клеток, например ооцитов, введение ДНК может быть осуществлено механически с помощью иглы. Клетки, получившие новый ген, называются трансформированными. В ряде случаев, особенно при использовании векторов на основе фагов, чужеродный ген может быть встроен в центральный геном организма и наследоваться при каждом делении клетки.

Однако вероятность трансформации клетки с помощью того или иного вектора намного меньше единицы. В смеси после проведения операции трансфекции имеется большое число нетрансформированных клеток. Необходимо отделить клетки, несущие но-

вый ген, от массы исходных клеток. Этот отбор осуществляют с помощью процедуры *клонирования*. *Клон* — это популяция клеток (вирусов, организмов), произошедшая из одного репродуцирующего (размножающегося) организма. Все члены клона являются потомками одной клетки и, по существу, ее точными копиями.

В целях выделения клонов бактериальных клеток, несущих нужный исследователю ген, проводят разреженный посев клеток таким образом, что они образуют отдельные колонии (бляшки, просветы), которые хорошо видны. Для отделения клеток, прошедших трансформацию, от нетрансформированных культивирование ведут на средах, содержащих антибиотики (см. выше). В том случае, если вектор содержит параллельный ген устойчивости к антибиотику, клоны дают только трансформированные клетки.

Полученный клон переносят в среды, предназначенные для эффективного размножения клеток, и получают их большую популяцию.

Таким образом, из одной или нескольких трансформированных клеток удается получить популяции, включающие $10^5 - 10^6$ клеток в 1 мл среды.

10.6. Оптимизация экспрессии и выделение генно-инженерных белков

Подбор вектора, обеспечивающего высокоэффективную репликацию генетической информации, соответствующего промотора, обеспечивающего интенсивный процесс транскрипции с синтезом соответствующей мРНК, и клетки-хозяина с развитым рибосомальным аппаратом дает возможность получить исключительно высокие концентрации искомого белка или фермента. Так, в ряде случаев удается до 10—15% всего белка клетки иметь в форме генно-инженерного белка.

Трудности, которые в ряде случаев предстоит преодолевать исследователю, заключаются в том, что биосинтез целевого белка идет так быстро и концентрации получаемого белка настолько высоки, что белок не успевает пройти стадию образования вторичной и третичной структуры (фолдинга) и может агрегировать, образуя неструктурированные комплексы между полипептидными цепями. Эти агрегаты образуют собственную фазу и называются *тельцами включения*. В тельцах включения белки не имеют сформированной структуры и поэтому не обладают физиологической активностью, а ферменты не образуют активные центры и не обладают ферментативной активностью. Разработано несколько подходов, позволяющих управлять процессом.

Рефолдинг. Можно осуществить процесс рефолдинга белка. С этой целью белки телец включения помещают в растворы, разруша-

ющие неспецифические комплексы полипептидных цепей, прежде всего разрушающие водородные и гидрофобные связи. Это могут быть добавки органических растворителей, мочевины или хлорида гуанидина. Затем мягким удалением денатурирующего агента добиваются рефолдинга молекулы, т.е. образования необходимой вторичной и третичной структуры.

Использование шаперонов. В клетках хозяина имеются специальные белки — шапероны, ответственные за исправление ошибок сворачивания полипептидной цепи. Это большие белковые образования, способные за счет водородных, гидрофобных и ионных связей разрушить комплексы полипептидных цепей и, пропустив их сквозь себя, создать необходимую вторичную структуру.

Полученные генно-инженерные белки выделяют из клетки традиционными для биохимии и биотехнологии методами (осаждение, хроматография, электрофорез, аффинная хроматография). Методология генетической инженерии внесла свой вклад и в эту область. В последнее время стал распространенным метод включения в ген целевого белка участка, позволяющего провести аффинную хроматографию. Например, присоединение к N- или С-концу белка полигистидинового участка позволяет провести высокоэффективную очистку белка в одну стадию с использованием носителя на основе ионов никеля.

10.7. Сайт-направленный мутагенез

Особую роль в химии ферментов играет метод сайт-специфического (сайт-направленного) мутагенеза. Метод позволяет заменить одну аминокислоту в полипептидной цепи на любую другую из 20 природных аминокислот. Этим методом получена исключительно важная информация о роли той или иной аминокислоты в катализе.

Существуют несколько подходов, позволяющих провести сайт-направленную замену аминокислоты. Наибольшее распространение получил метод, основанный на замене аминокислоты в праймере для ДНК-полимеразы. Схема метода представлена на рис. 10.15. В качестве основы вектора используют двухцепочечную форму ДНК фага М13 (см. выше). В данном случае используется способность двухцепочечных рекомбинантных ДНК на основе фага М13 превращаться в одноцепочечные ДНК в фаговых частицах.

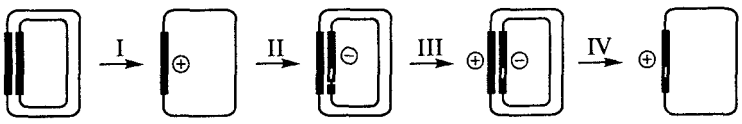


Рис. 10.15. Схема сайт-направленного мутагенеза

Образование зрелых частиц фага приводит к возникновению одноцепочечных кольцевых молекул ДНК (плюс-цепь) (стадия I). На стадии II происходит синтез минус-цепи с измененной одной аминокислотой, кодон которой вводится в виде праймера, содержащего кодон замещенной аминокислоты. На стадии III образуется замкнутая репликативная форма, содержащая запланированную мутацию. Последующее введение полученного вектора в бактериальную клетку позволяет получить кольцевую ДНК, несущую мутацию на выбранном участке гена (стадия IV).

Зрелые частицы фага содержат одноцепочечную кольцевую нить, которую можно достроить до двухцепочечной, используя в качестве праймера ДНК-полимеразы полинуклеотид с заменой кодона одной аминокислоты на кодон другой аминокислоты.

Первая стадия процесса — получение одноцепочечной формы ДНК фага M13. ДНК получается в форме плюс-цепи. С помощью ДНК-полимеразы минус-цепь может быть достроена до кольцевой молекулы. Если в качестве праймера (стадия «отжига») будет использован полинуклеотид с заменой одного кодона на другой, продуктом реакции полимеризации будет кольцевая ДНК со специфической заменой целевой аминокислоты. Двухцепочечную ДНК вводят в бактериальные клетки, которые производят плюс-цепь с запланированной мутацией. Экспрессия полученного фагового вектора приводит к появлению белка с локальной (направленной, специфической) заменой одной аминокислоты на другую.

В последнее время широкое распространение получил метод сайт-направленного мутагенеза с использованием полимеразной цепной реакции. Суть метода заключается в том, что для полимеразной реакции используются праймеры, содержащие одну или несколько нуклеотидных замен, приводящих к замене соответствующего кодона в гене. Продуктом амплификации с использованием таких праймеров является фрагмент гена, содержащий замену кодона (аминокислотную замену в белке) в строго определенном положении. Полноразмерный ген собирается методами лигирования.

* * *

> Не нужно быть беспочвенным оптимистом, чтобы верить, что через пятьдесят лет «биологический код» — химическая зашифровка наследственных свойств — будет расшифрован и прочитан. С этого момента человек станет полным властелином живой материи.
>
> *В.А.Энгельгардт (1957)*

Генетическая инженерия — это шаг вперед в развитии химической энзимологии. Методы генетической инженерии сделали доступными для ученых большинство белков и ферментов, которые

ранее выделяли из органов и тканей человека. Полученные методами генетической инженерии и сайт-направленного мутагенеза, белки являются новыми искусственными образованиями, не имеющими аналогов в природе. Это позволяет получать белки с новыми свойствами. Сайт-направленный мутагенез дает возможность определить роль каждой аминокислоты в каталитическом акте. Данный подход позволяет изменить структуру активного центра, оптимизировать кинетические параметры реакции по тому или иному субстрату, тем самым направленно изменить специфичность фермента, его стабильность, устойчивость к денатурирующим агентам. Все это обеспечивает условия для создания качественно новых биокатализаторов и биокаталитических систем.

Глава 11

ГЕТЕРОГЕННЫЕ КАТАЛИЗАТОРЫ НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ И КЛЕТОК

> Большие размеры свинцовых камер, в которых готовится 60 % серная кислота, расходуя при этом азотную кислоту, и необходимость дальнейшего ее сгущения до содержания 97 % H_2SO_4 не только усложняют, но и удорожают ее производство, а поэтому исследования *Филиппса* (1831), *Велера* (1852), *Винклера* (1875) и др. над образованием серного ангидрида (из SO_2 и кислорода) при содействии контакта с платиною, окисями железа, хрома и др. послужили исходом для развития **контактного способа** производства серной кислоты, что увенчалось полным успехом только в самом конце XIX века...
>
> *Д.И.Менделеев*

11.1. Методы иммобилизации. Носители

Процесс создания гетерогенных катализаторов путем связывания ферментов с носителями различной химической природы получил название *иммобилизация*. При иммобилизации водорастворимый фермент переходит в нерастворимую форму, превращаясь таким образом из гомогенного катализатора в гетерогенный. В результате такого превращения катализатор приобретает принципиально новые свойства.

Иммобилизованные ферменты, как и все гетерогенные катализаторы, можно легко отделить от продукта реакции, что является существенным шагом к технологизации каталитического процесса. Это позволяет проводить реакции в специальных технологических устройствах — химических реакторах. При этом фермент используется многократно, что весьма важно, особенно когда речь идет о белковых катализаторах.

Иммобилизация ферментов приводит, как правило, к росту их устойчивости против тепловой денатурации. Это не менее важное свойство, которое приобретают многие ферменты после иммобилизации.

Образование дополнительных связей белок—носитель позволяет направленно влиять на химическое окружение белковой молекулы и в известных пределах изменять кинетические характеристики ферментативной реакции. В результате иммобилизации ферменты становятся более защищенными, что позволяет проводить химические реакции с участием ферментов в органических растворителях.

Насколько известно, первой целенаправленной работой по созданию системы носитель—химически связанный фермент была

работа Д. Кэмпбелла по ковалентной иммобилизации ферментов на целлюлозу (1951 г.). С этого момента отмечается лавинообразный рост числа работ в этой области, и в настоящее время известны тысячи систем, в которых различные ферменты превращаются в гетерогенные катализаторы в результате химических реакций с разными носителями.

Рассмотрим основные методы получения гетерогенных катализаторов на основе ферментов и проанализируем, как при этом изменяются свойства ферментов и кинетика реакций с их участием.

Для того чтобы твердое тело служило идеальным носителем для иммобилизации ферментов, оно должно отвечать следующим требованиям.

Носитель должен быть абсолютно нерастворимым, химически стойким в воде и не подверженным биологическому разрушению. Носитель должен иметь высокую емкость по ферменту, т.е. обладать высокой внутренней поверхностью и проницаемостью для фермента в процессе иммобилизации. Носитель должен быть высокопроницаемым для субстрата и продуктов реакции, т.е. должен создавать минимальные диффузионные затруднения для достижения субстратом активного центра фермента. Носитель должен быть механически прочным в условиях гидродинамических потоков, обеспечивающих транспорт субстратов и продуктов. Носитель должен обеспечивать возможность протекания раствора субстрата через слой катализатора. В большинстве случаев это означает, что носитель может быть относительно легко превращен в гранулы или другие частицы, желательно одинаковые по форме и размеру. Принципиально важно то, что носитель должен иметь химически активные группы, обеспечивающие химическое связывание (хемосорбцию) фермента с поверхностью носителя.

Видно, что к идеальному носителю предъявляется много требований, и часто эти требования противоречат друг другу. Однако в настоящее время могут быть получены носители и созданы методы иммобилизации фермента, обеспечивающие успешное решение большинства практических задач.

Для химического связывания белка с носителями используется большой арсенал методов, некоторые из них описаны в гл. 2.

Применяемые носители можно разделить на два больших класса — природные и синтетические.

В качестве *природных* носителей наиболее часто используют полисахариды:

производные целлюлозы — поли-1,4-β-D-глюкопиранозил-D-глюкопиранозы;

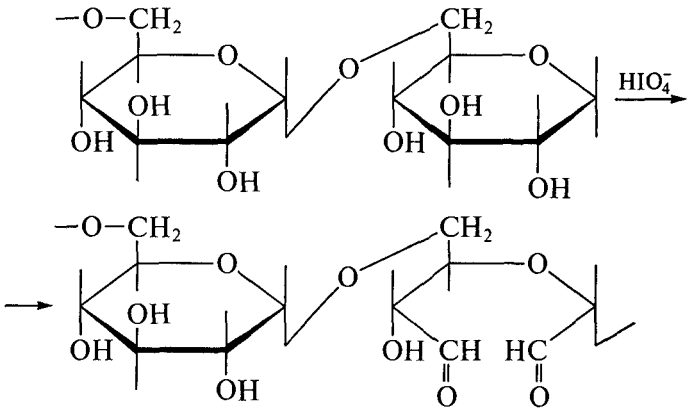
производные декстрана — поли-1,6-α-D-глюкопиранозил-D-глюкопиранозы;

производные агарозы — поли-β-галактопиразонил-3,6-ангидро-α-L-галактопиранозы.

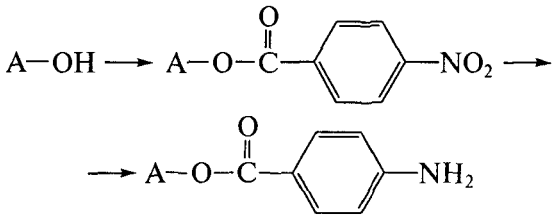
Гидроксильные группы полисахаридов позволяют провести химическую модификацию, ввести различные функциональные группы и связать белок либо путем реакции с функциональной группой белка, либо с помощью бифункционального реагента (см. гл. 2).

Полисахариды имеют различные модификации. Целлюлоза может применяться в форме порошков, текстильной ткани, бумаги и др. Декстраны и агарозы могут быть обработаны эпихлоргидрином или диэпоксидами с образованием макропористых частиц. Сшитые декстраны выпускаются под названием сефадексы, сшитые агарозы — под названием сефарозы.

Химия активации полисахаридов весьма разнообразна. Окислением на поверхности полисахаридного носителя можно индуцировать образование альдегидных групп, образующих с белком на последующей стадии основания Шиффа:



Традиционным методом является прививка на полимер аминогруппы, например реакцией с хлорангидридами ароматических кислот, содержащих нитрогруппы, с последующим восстановлением нитрогрупп:



Связь с белком осуществляется через диазотирование аминогруппы с последующим азосочетанием либо путем использования сшивающих агентов типа диальдегидов (см. гл. 2). На целлюлозные носители, сефадексы и сефарозы было введено большое количество ионообменных групп, таких как $-SO_3^-$, $-COO^-$, $-\overset{+}{N}H(C_2H_5)_2$,

$-PO_3^{2-}$ и др., обеспечивающих возможности ионообменной хроматографии белков и их иммобилизации за счет образования ионных и ковалентных связей между белком и носителем.

В качестве природных носителей могут быть использованы белки, например гели желатины или коллаген.

Большое разнообразие носителей, приближающихся по свойствам к идеальным, обеспечивают *синтетические* полимерные материалы. С помощью синтетических полимеров ферменты могут быть иммобилизованы путем:

сорбции с образованием ионных, водородных, гидрофобных связей;

образования ковалентных связей фермент—носитель;

включения в водопроницаемые гели (гидрогели);

включения в микрокапсулы — сферические полые частицы микронного размера.

Традиционные синтетические ионообменные смолы, применяемые для ионообменной хроматографии, например Dowex или Amberlit, могут быть эффективно использованы как носители для иммобилизованных ферментов. Основой большинства полимеров этого класса являются сополимеры стирола с дивинилбензолом, которые могут быть модифицированы путем введения заряженных групп, таких как аминогруппа, четвертичные аммониевые основания, сульфогруппа, остаток фосфорной кислоты. Поскольку фермент удерживается на поверхности носителя ионными связями, применение такого рода иммобилизованных ферментов невозможно в средах с высокой ионной силой (см. гл. 3).

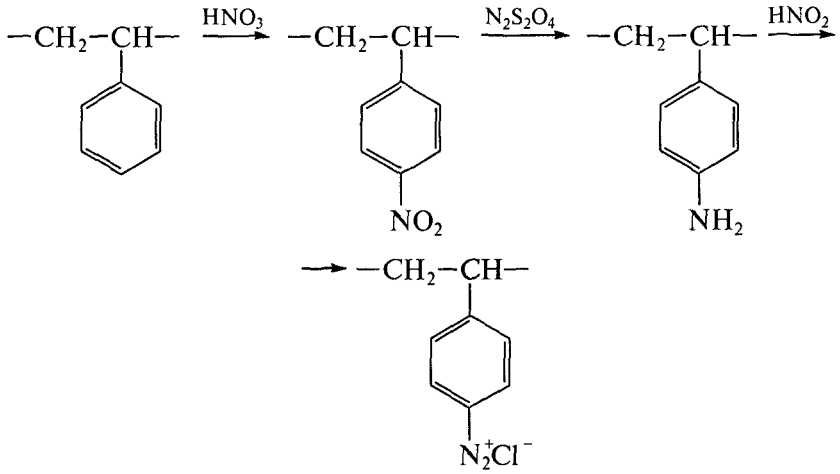
Практически все полимерные материалы могут быть химически модифицированы введением функциональной группы, с участием которой удобно связывать фермент с носителем с образованием прочной, устойчивой в любых средах ковалентной связи.

В качестве примера рассмотрим иммобилизацию ферментов на полиамидных волокнах типа нейлона. Частичный гидролиз соляной кислотой приводит к возникновению на поверхности материала свободных аминогрупп:

$$-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-NH- \xrightarrow{+H_2O} -COO^- + NH_2-$$

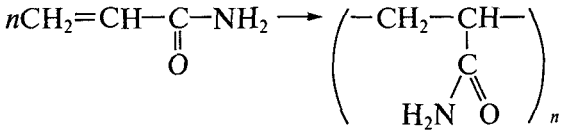
Обработка носителя глутаровым диальдегидом как бифункциональным сшивающим агентом позволяет ввести на поверхность носителя альдегидную группу, с которой эффективно связываются аминогруппы иммобилизуемого фермента с образованием шиффовых оснований (см. гл. 2). «Закрепление» связи осуществляется путем восстановления азометиновой связи восстановителями типа боргидрида натрия. Нейлон в такого рода процессах может быть использован в виде ткани, гранул, сеток, трубок и т. п.

В качестве другого примера рассмотрим иммобилизацию ферментов на полистирольных носителях. Подготовка матрицы для иммобилизации ферментов может быть осуществлена по следующей схеме:



Введенная в полимер азогруппа может вступать в реакции азосочетания с ароматическими аминокислотами, необратимо фиксируя белок на поверхности носителя.

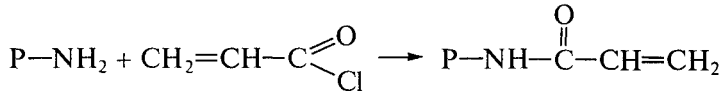
Очень удобен метод иммобилизации ферментов путем включения белка в матрицы полимерных водопроницаемых гелей. Наибольшее распространение получили гели на основе полиакриламида:



Полимеры получают радикальной полимеризацией в присутствии сшивающего агента — N,N′-метилен-*бис*-акриламида, обеспечивающего образование связей между полимерными цепями. В зависимости от концентрации акриламида и доли введенного сшивающего агента получают гели различной плотности. Фермент при этом оказывается включенным в матрицу полимера, потеряв способность к диффузионной подвижности.

Для химической фиксации фермента в полимере может быть использована реакция модификации аминогрупп с введением в белок ненасыщенных связей, способных участвовать в процессе полимеризации.

Например, аминогруппы белка могут быть модифицированы галогенангидридами ненасыщенных кислот:



Акриламид является лишь одним из представителей производных акриловой кислоты, находящих применение при иммобилизации ферментов путем включения их в гидрогели. Перспективным носителем для иммобилизованных ферментов является поли-N-изопропилакриламид (см. подразд. 11.4).

Ферменты могут быть переведены в гетерогенное состояние путем включения их в микрокапсулы, образуемые полупроницаемыми полимерными оболочками. Оболочка непроницаема для фермента, находящегося внутри полой сферы, но проницаема для растворов субстрата и продуктов.

Разработаны два основных способа получения микрокапсул с иммобилизованным ферментом.

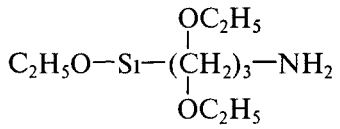
1. *Межфазная полимеризация.* В этом случае полимерная пленка образуется путем полимеризации мономеров на границе раздела фаз. При этом готовят тонкодисперсные эмульсии водного раствора фермента, содержащие водорастворимый мономер в органической фазе. Введение в систему органорастворимого второго мономера инициирует процесс образования полимерной пленки на границе раздела фаз. Таким образом получают, например, микрокапсулы, покрытые полиамидными полупроницаемыми оболочками.

2. *Межфазная коацервация.* В этом случае полупроницаемая оболочка полых сфер образуется за счет осаждения органорастворимого полимера на границе раздела фаз вода—органический растворитель. Примером такого рода микрокапсул являются сферы, получаемые путем осаждения коллоидной системы на частицах эмульсии воды в органических растворителях.

Аналогом микрокапсулирования является включение ферментов в липосомы. Липосомы — это система концентрических бислойных замкнутых липидных мембран. Процесс инкапсулирования ферментов в липосомы заключается в диспергировании липидной пленки в присутствии раствора фермента. При этом происходит захват молекулы фермента в сферические полые частицы, самопроизвольно образующиеся при диспергировании бислойной липидной мембраны.

Для иммобилизации ферментов используют неорганические материалы: кварц, стекло, силикагели, оксид алюминия, каолин, оксиды металлов и др. Для создания электронопроводящих систем с использованием ферментов применяют углерод и его многочисленные производные (графит, сажу, стеклоуглерод, графитированные ткани и др.). Иммобилизацию проводят за счет адсорбции или путем хемосорбции с участием функциональных групп, прививаемых на поверхность носителей.

Например, для введения аминогрупп в носители на основе кремнезема (стекло, пористое стекло, силохромы и др.) используют γ-аминопропилтриэтоксисилан



Реагент встраивается в кристаллическую решетку кремнезема, свободная аминогруппа остается на поверхности. С помощью бифункциональных агентов эта группа обеспечивает хемосорбцию белка (см. гл. 2).

11.2. Иммобилизованные клетки микроорганизмов

Для многих биокаталитических процессов весьма удобным оказалось использование в качестве катализатора клеток микроорганизмов. В этом случае, как и в случае ферментов, имеется ряд преимуществ при переходе от растущей суспензии клеток к гетерогенным катализаторам на основе иммобилизованных клеток.

Если сравнивать ферменты и клетки, содержащие эти ферменты, то с технологической точки зрения иммобилизованные клетки в ряде случаев предпочтительнее. Прежде всего, отсутствует трудоемкая и дорогостоящая стадия выделения ферментов. Методами генной инженерии (см. гл. 10) можно получать клетки с исключительно высоким содержанием необходимого фермента. В клетках ферменты часто, но не всегда, гораздо стабильнее, чем в растворе или даже на матрице после их иммобилизации. В ряде случаев, когда в иммобилизованном состоянии сохраняются метаболизм и биосинтез белка, иммобилизованные клетки способны регенерировать ферменты и тем самым поддерживать высокий уровень активности в течение продолжительного времени.

И, наконец, при иммобилизации клетки сохраняют основной набор биохимических систем, в частности системы регенерации кофакторов, что обеспечивает возможность проведения многоступенчатых ферментных процессов. Это позволяет реализовать сложные многостадийные синтезы с участием большого числа ферментов. Данные преимущества обусловили большой интерес к иммобилизации клеток и созданию на этой основе гетерогенных катализаторов.

Разработано несколько методов иммобилизации клеток микроорганизмов.

Условно эти методы можно разделить на три категории:

1) иммобилизация за счет физической сорбции на поверхности носителя;

2) химическая иммобилизация за счет образования ковалентных связей между носителем и компонентами клетки;

3) включение в природные и синтетические гидрогели.

В первом случае клетки сорбируются на поверхность твердого материала с образованием различного рода нековалентных связей. Метод отличается исключительной простотой, однако не позволяет получать большую плотность заселения поверхности и тем самым ведет к относительно невысоким каталитическим активностям.

Химическая иммобилизация клеток предполагает использование различных химических бифункциональных агентов. Это дает возможность получить системы с высокой каталитической активностью. Однако используемые реагенты обычно токсичны для клетки, что ведет к потери клетками механизмов биосинтеза белка и регенерации кофакторов. В частности, для иммобилизации клеток широко используется процесс включения их в полиакриламидные гели. Однако процесс радикальной полимеризации, протекающий при образовании полимерного геля, идет с участием свободных радикалов, что приводит к гибели клеток, при этом сохраняется значительная доля ферментативной активности, что для экспериментатора в ряде случаев является целью иммобилизации. Однако ожидать от клетки в этом состоянии способности проводить многостадийные синтезы не приходится.

Эффективные методы получения «живых» иммобилизованных клеток связаны с процессами включения их в природные и синтетические гели путем перевода раствора полимеров в твердую фазу за счет фазового перехода. Растворы многих природных и некоторых синтетических полимеров при охлаждении образуют устойчивые водопроницаемые гели. При этом клетки, которые представляют собой частицы размером 1 мкм и выше, оказываются «арестованными» в матрице геля. Гели, как правило, обеспечивают высокий уровень диффузии субстратов и продуктов и полную невозможность для клеток покинуть матрицу геля. Процесс иммобилизации происходит в мягких условиях, и клетки сохраняют основные физиологические функции, такие как возможность дыхания (для аэробных организмов) и синтеза АТФ, способность к биосинтезу белка и регенерации ферментов, способность к регенерации кофакторов и осуществлению многоступенчатых синтетических процессов.

В качестве природных гелеобразователей используют полисахариды, такие как агар, карагеннан, желатина. Синтетическим полимерным материалом, обладающим аналогичными свойствами, является поливиниловый спирт определенной молекулярной массы. Поливиниловый спирт образует так называемые криогели, возникающие при охлаждении раствора полимера за счет процессов криоструктурирования.

Процесс иммобилизации клетки в криогели весьма прост и проходит без участия каких-либо токсичных химических агентов. На первом этапе получают суспензию клеток в растворе полимера, на втором этапе путем понижения температуры осуществляют процесс криоструктурирования с образованием гелевой структуры. Возникающие водопроницаемые гели характеризуются устойчивостью до температуры 70—80 °С, высокой емкостью (до 10 % массы в криогелях может составлять масса клеток), высокой проницаемостью для субстратов и продуктов реакции. В процессе замораживания геля возникают микрокристаллы льда, которые при оттаивании формируют структуру пор.

Полученные таким образом гетерогенные катализаторы обладают феноменальной стабильностью и способны сохранять каталитическую активность в течение нескольких лет. Это связано, по-видимому, с возможностями биосинтеза и регенерации ферментов.

11.3. Иммобилизованные ферменты: новые свойства

В результате иммобилизации на носителе фермент оказывается прочно фиксированным в новой для него химической среде. Эта среда может существенно отличаться от природной среды, окружающей фермент в клетке. Зачастую это отражается на параметрах ферментативной реакции: под влиянием носителя изменяются локальные концентрации субстрата, ионов водорода, а также кофакторов.

Носитель, обладая отличными от воды физико-химическими свойствами, может концентрировать возле ферментов или, наоборот, отталкивать от них компоненты ферментативного процесса, влияя на равновесное распределение веществ между раствором и матрицей. Особенно ярко это проявляется в случае ионов водорода при иммобилизации ферментов на матрицах, несущих электростатические заряды.

Как известно, для всех ферментов скорости реакций в той или иной степени зависят от концентрации ионов водорода (см. подразд. 4.4). Заряженные носители могут электростатически влиять на концентрацию протонов в области активного центра фермента и тем самым изменять скорость реакции.

Если носитель заряжен положительно, то он будет отталкивать протоны, уменьшая концентрацию ионов водорода в области активного центра. Наоборот, отрицательно заряженная матрица концентрирует ионы водорода. Это не может не сказаться на скорости ферментативной реакции, изменяя наблюдаемую зависимость скорости реакции от показателя pH.

Рассмотрим количественные характеристики этого влияния. Коэффициент распределения ионов водорода P_{H^+} между раствором и окружением фермента может быть представлен в виде

$$P_{H^+} = \frac{[H^+]_m}{[H^+]_0} = \exp\left[-\frac{e\psi}{k_B T}\right], \qquad (11.1)$$

где $[H^+]_m$ — концентрация ионов водорода на носителе в области активного центра; $[H^+]_0$ — концентрация ионов водорода в растворе; e — заряд электрона; ψ — электростатический потенциал заряда на носителе; k_B — константа Больцмана; T — абсолютная температура.

Разность значений pH в области активного центра и в растворе равна

$$\Delta(pH) = (pH)_m - (pH)_0 = 0,43\frac{e\psi}{k_B T},$$

где $(pH)_m$ — значение pH в области активного центра; $(pH)_0$ — показатель pH раствора.

Константа диссоциации ионогенной группы фермента, определяющая его активность: $BH^+ \rightleftharpoons B + H^+$ представлена уравнением

$$K_0 = \frac{[B][H^+]_0}{[BH^+]}.$$

В случае иммобилизованного фермента

$$K_m = \frac{[B][H^+]_m}{[BH^+]}.$$

В соответствии с (11.1) имеем

$$K_m = \frac{[B]}{[BH^+]}[H^+]_0 \exp\left(-\frac{e\psi}{kT}\right)$$

или

$$K_m = K_0 \exp\left(-\frac{e\psi}{kT}\right),$$

т.е. наблюдаемое значение константы диссоциации ионогенной группы будет отличаться от истинного значения константы при действии фермента в растворе на множитель $\exp\left(-\frac{e\psi}{kT}\right)$, описывающий электростатическое взаимодействие ионов водорода с носителем.

Если носитель заряжен положительно $\psi > 0$, то в соответствии с (11.1) получим

$$[H^+]_m = [H^+]_0 \exp\left(-\frac{e\psi}{kT}\right).$$

Таким образом, $[H^+]_m < [H^+]_0$, т.е. концентрация ионов водорода на носителе ниже, чем в растворе. Это означает, что среда функционирования фермента более основная. Носитель отталкивает протоны от активного центра фермента. Соответственно если носитель заряжен отрицательно $\psi < 0$, то $[H^+]_m > [H^+]_0$, а значит, концентрация ионов водорода в зоне действия активного центра выше, чем в растворе, т.е. среда функционирования активного центра более кислая.

Предполагается, что истинные значения констант диссоциации ионогенной группы фермента в растворе и в иммобилизованном состоянии одинаковы. Экспериментатор измеряет концентрацию ионов водорода в растворе и на основании этого рассчитывает константу диссоциации $K_{набл}$.

Видно, что если носитель заряжен положительно $\psi > 0$, то имеем $K_{набл} < K_0$, $pK_{набл} > pK_0$. В случае положительно заряженной матрицы для иммобилизованного фермента наблюдаемое значение pK смещается в область более низких значений. Соответственно если $\psi < 0$ (матрица заряжена отрицательно), то $K_{набл} > K_0$, $pK_{набл} < pK_0$; $pK_{набл}$ для иммобилизованного фермента увеличивается.

Сделанные выводы подтверждаются большим числом экспериментальных данных. Так, для α-химотрипсина в случае нативного фермента в растворе pK_a имидазольной группы гистидина составляет $6{,}7 \pm 0{,}2$. При иммобилизации на полианионном носителе pK_a равно $7{,}82 \pm 0{,}05$, т.е. фермент работает в более щелочных условиях. При иммобилизации α-химотрипсина на поликатионном носителе наблюдаемое значение pK_a составляет $6{,}10 \pm 0{,}05$.

Использование матриц, несущих электростатические заряды, позволяет регулировать скорость ферментативных реакций, варьируя pH, и проводить ферментативные процессы в областях pH, не характерных для нативных ферментов. pH-оптимумы скоростей ферментативных реакций соответствуют ионизации ионогенных групп, участвующих в кислотно-основных каталитических процессах в активных центрах ферментов. Колоколообразные графики зависимости скорости реакции от pH указывают на то, что активный центр участвует в процессе, по крайней мере, в трех формах:

$$EH^+ \overset{K_1}{\rightleftharpoons} E \overset{K_2}{\rightleftharpoons} E^-$$

одна из которых (нейтральная E) является каталитически активной (см. гл. 4).

Заряженные матрицы позволяют смещать ферментативную реакцию в кислую или щелочную область. На рис. 11.1 представлены зависимости скорости ферментативной реакции с участием нативного и иммобилизованного α-химотрипсина от показателя pH. Видно, что нативный фермент каталитически наиболее активен в

области pH 7—9, иммобилизованный на анионных полимерах (сополимере малеинового ангидрида и этилена, полиглутаминовой кислоте) — в области pH 8—10,5. Иммобилизация на положительно заряженном полимере (полиорнитине) позволяет использовать фермент при pH < 5,0.

Важно отметить, что влияние матрицы может быть существенным и позволит смещать наблюдаемое значение pH на 2—2,5 единицы, что соответствует уменьшению локальной концентрации ионов водорода на два порядка. Однако в силу электростатической природы эффектов это проявляется лишь при низкой ионной силе раствора.

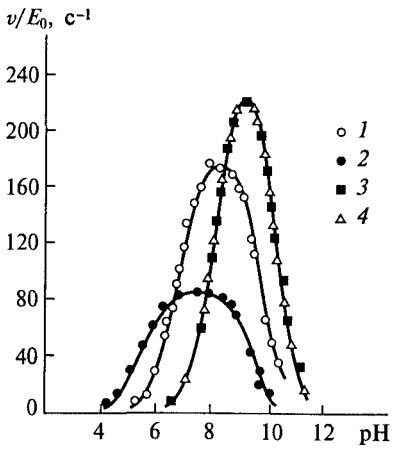


Рис. 11.1. Зависимость скорости реакции с участием α-химотрипсина, свободного (*1*) и иммобилизованного в полиэлектролитной матрице из полиорнитина (*2*), сополимера малеинового ангидрида и этилена (*3*), полиглутаминовой кислоты (*4*)

Описанные выше эффекты изменения pH-профилей скоростей ферментативных реакций имеют равновесную природу и обусловлены равновесным влиянием матрицы на распределение ионов водорода в системе раствор—область активного центра. Наблюдаемые pH-профили скоростей также могут смещаться за счет кинетических эффектов. В случае если продуктом реакции является сильная кислота или основание и реакция на поверхности носителя протекает довольно быстро, может реализоваться ситуация, когда скорость диффузии кислоты или основания будет меньше скорости ферментативной реакции. В этом случае в области активного центра в диффузионном слое могут возникать стационарные концентрации кислот или оснований, существенно отличающиеся от их значений в растворе. Физико-химическая природа такого рода эффектов рассмотрена в гл. 12.

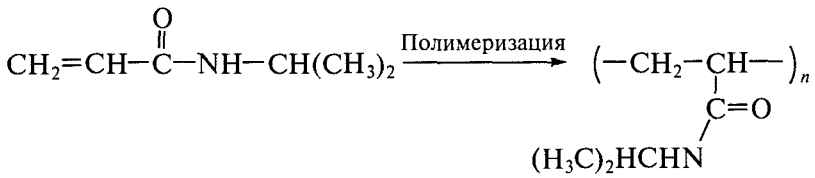
11.4. Регулирование активности иммобилизованного фермента фазовым переходом носителя

Весьма необычные феномены регуляции каталитической активности ферментов наблюдаются при иммобилизации ферментов на носители, претерпевающие фазовый переход (коллапс) при изменении температуры. Известно, что скорости ферментативных реакций, как и скорости обычных химических реакций, увеличи-

ваются с ростом температуры, и зависимость скорости реакции от температуры обычно описывается уравнением Аррениуса (см. гл. 4).

Однако при иммобилизации ферментов на некоторые полимерные носители можно наблюдать зависимости скорости реакции от температуры совершенно другого характера: в определенном интервале температуры скорость ферментативной реакции может уменьшаться с ростом температуры.

Классическим примером носителей, обнаруживающих такие необычные свойства, являются матрицы на основе N-изопропилакриламида. Известно, что полимеры на основе акриламида весьма часто применяются при иммобилизации ферментов. N-изопропилакриламид отличается от «классического» акриламида тем, что в амидную группировку введен изопропильный заместитель:



Это замещение коренным образом изменяет свойства полимера и иммобилизованного на нем фермента.

На рис. 11.2 приведена зависимость каталитической активности α-химотрипсина от температуры в свободной (кривая *1*) и иммо-

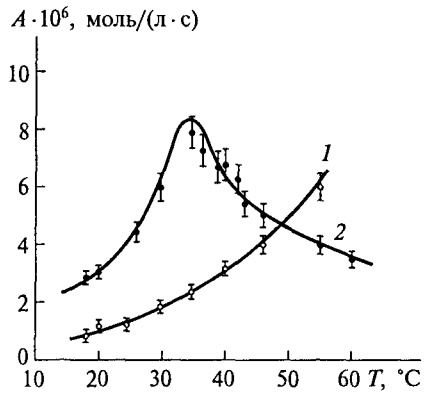


Рис. 11.2. Температурная зависимость каталитической активности α-химотрипсина для свободного фермента (*1*) и фермента, иммобилизованного в гель поли-N-изопропилакриламида (*2*)

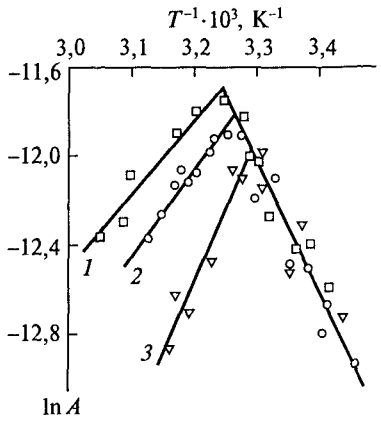


Рис. 11.3. Температурная зависимость в аррениусовских координатах каталитической активности α-химотрипсина, иммобилизованного в гель состава метилен-*бис*-акриламид : N-изопропилакриламид 1 : 7500 (*1*), 1 : 750 (*2*), 1 : 75 (*3*)

билизованной форме (кривая *2*). Видно, что, в то время как активность свободного фермента экспоненциально увеличивается во всем диапазоне исследованных температур (18—60 °С), активность иммобилизованного фермента растет лишь до температуры 30—35 °С, затем начинает экспоненциально падать. На кривой зависимости скорости реакции от температуры наблюдается излом. Особенно это хорошо видно при представлении экспериментальных данных в координатах Аррениуса (рис. 11.3). Оказалось, что температура, отвечающая излому, зависит от жесткости геля, количества внутримолекулярных сшивок, коррелирующих с содержанием сшивающего агента N,N′-метилен-*бис*-акриламида (см. рис. 11.3).

Исследование этого феномена показало, что регуляция активности фермента связана с фазовым переходом полимерного геля. При температурах 30—35 °С гель претерпевает структурную перестройку, в результате резко уменьшается его степень гидратации (коллапс). Вытеснение воды и существенная гидрофобизация среды при высоких температурах отражается на каталитической активности фермента. Эффекты регуляции полностью обратимы. Уменьшение температуры восстанавливает каталитическую активность фермента.

Аналогичные эффекты наблюдаются для многих ферментов. Температурный коллапс поли-N-изопропилакриламида влечет за собой снижение активности иммобилизованных в гель ферментов, связанное с уменьшением каталитической константы скорости. Поскольку наблюдаемые эффекты коррелируют со степенью гидратации полимерного геля, т.е. с изменением гидрофобности среды, можно полагать, что локальная гидрофобизация среды влияет на структуру белка и уменьшает его каталитическую активность.

11.5. Стабилизация ферментов при иммобилизации

При иммобилизации часто наблюдают эффекты стабилизации ферментов против тепловой денатурации. Объяснить этот факт можно следующим образом. Инактивация ферментов под действием тепла или денатурирующих агентов, таких как мочевина или гуанидилхлорид, связана с разрушением в белке многих внутримолекулярных связей. Это приводит к разворачиванию белковых молекул и увеличению их объема. Очевидно, что белки можно стабилизировать, если жестко закрепить нативную структуру дополнительными внутримолекулярными связями или связями белка с носителем.

Такой способ часто приводит к положительным результатам. В качестве примера рассмотрим стабилизацию α-химотрипсина, иммобилизованного в полиакриламидный гель путем сополимеризации с ферментом, модифицированным акрилоилхлоридом. Пе-

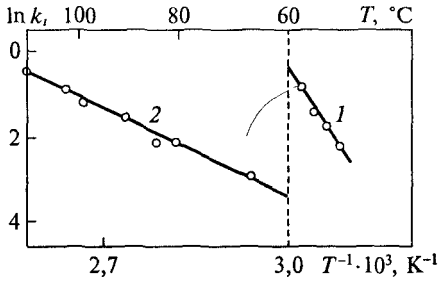


Рис. 11.4. Температурная зависимость константы скорости термоинактивации свободного (*1*) и иммобилизованного (*2*) α-химотрипсина в аррениусовских координатах

ред иммобилизацией фермент обрабатывали акрилоилхлоридом, обеспечивая введение в белковую молекулу непредельной связи, способной участвовать в реакции радикальной полимеризации. Далее исследовали кинетику инактивации свободного и иммобилизованного фермента при различных температурах.

Кинетика инактивации описывается уравнением первого порядка (см. гл. 4):

$$A(t) = A_0 \exp[-k_i(T)t]. \qquad (11.2)$$

Константа скорости инактивации k_i фермента зависит от температуры. Эта зависимость в координатах Аррениуса приведена на рис. 11.4. Данные для свободного фермента представлены линией *1*, а для иммобилизованного — линией *2*. При температуре 60 °С свободный фермент инактивируется настолько быстро, что экспериментальное изучение кинетики процесса затруднено. Иммобилизованный фермент при этом стабилен. Константы скорости инактивации свободного и иммобилизованного фермента при температуре 60 °С различаются на три порядка. Увеличение температуры для иммобилизованного фермента увеличивает скорость его инактивации (см. рис. 11.4, линия *2*). Однако лишь при температуре 110 °С скорость инактивации иммобилизованного фермента становится соизмеримой со скоростью инактивации свободного фермента при 60 °С.

Иммобилизация ферментов не является приемом, всегда приводящим к стабилизации фермента. На стабильность того или иного фермента влияют много факторов, и методы его стабилизации, как правило, связаны с поиском условий и проведением большого числа экспериментов. Так, на рис. 11.5 приведены данные по инактивации свободной и иммобилизованной пероксидазы. Кинетика процесса описывается уравнением (11.2), данные приведены в полулогарифмических координатах. Видно, что фермент нестабилен (прямая *1*). Простая иммобилизация на Br—CN-активированной сефарозе (прямая *2*) не приводит к стабилизации фермента. Более того, иммобилизация дестабилизирует фермент (тангенс угла наклона прямой *2* приблизительно в 2 раза больше, чем

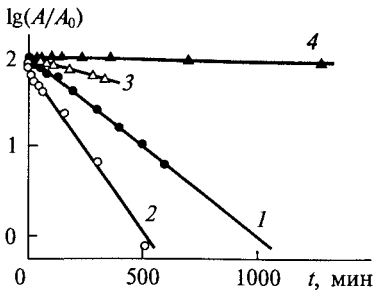


Рис. 11.5. Кинетика термоинактивации пероксидазы в полулогарифмических координатах при pH 7,0 и температуре 56 °С:

1 — нативная; *2* — иммобилизованная на Br—CN-активированной сефарозе; *3* — иммобилизованная на альбумин-сефарозе; *4* — олигомеры пероксидаза—альбумин, иммобилизованные на Br—CN-активированной сефарозе

прямой *1*). Стабилизация фермента потребовала дополнительных усилий. К сефарозе ковалентно присоединили альбумин, а затем на альбуминсефарозе глутаровым диальдегидом иммобилизовали пероксидазу (прямая *3*). Наиболее существенный эффект стабилизации был достигнут, когда на предварительной стадии получали олигомеры пероксидазы с альбумином, которые затем иммобилизовали на Br—CN-активированной сефарозе (прямая *4*).

* * *

Всегда найдутся эскимосы, которые выработают для жителей Конго рекомендации, как вести себя при самой страшной жаре.

С.Е.Лец

Любой химик знает, что гетерогенный катализатор лучше гомогенного, так как в первом случае легко отделить продукты реакции от катализатора. Данное не очень существенное, на первый взгляд, свойство гетерогенно-каталитической системы придает ей колоссальные преимущества: это делает каталитический процесс технологичным.

В случае ферментов химическая энзимология умеет легко превращать водорастворимые белки в гетерогенные катализаторы. Химия белковой молекулы, химия природных и неприродных носителей обеспечили эту область сотнями и тысячами возможностей. Получение иммобилизованного фермента — в настоящее время достаточно тривиальная операция. Однако кто-то когда-то сделал первый шаг, и этот шаг был нетривиальным. Первым исследователям не было очевидным, что совмещение «живого» катализатора с «мертвой» подложкой может привести к каким-то результатам. Результаты же оказались в высшей степени положительными. Кроме получения преимуществ гетерогенного катализатора ферменты приобрели новые свойства. Оказалось, что можно повлиять на зависимость скорости ферментативной от показателя pH, увеличить стабильность катализатора и защитить его от

инактивирующего влияния тепла или денатурирующего агента. Это обеспечило активное развитие области и создание основы получения иммобилизованных ферментов и их использования во многих реакциях.

Однако за новые качества нужно платить. В данном случае платой является зависимость кинетики реакций от процессов массопереноса и диффузионного торможения. Процессы массопереноса и диффузии в жидкостях протекают относительно медленно. Они проявляются на границе раздела фаз жидкость—твердое тело (внешняя диффузия) и при переносе вещества в грануле катализатора (внутренняя диффузия). Оказалось, что эти процессы можно количественно описать и предсказать их влияние на скорости реакций.

Результатом этого этапа работы стала возможность априорной оценки каталитической эффективности системы, т. е. степени использования каталитических возможностей фермента в той или иной системе. Теоретические расчеты и простые эксперименты позволяют выявить, в какой — кинетической (в которой лимитирует ферментативная реакция) или диффузионной (в которой лимитирует массоперенос) области работает катализатор. Во многих случаях положительным свойством системы является возможность использования катализатора в строго диффузионном режиме, обеспечивающем предельно допустимые скорости реакций. Очевидно, что все это позволяет предложить обоснованные рекомендации для конструирования хорошего катализатора для конкретной реакции (см. эпиграф).

Богатый набор методов химической модификации ферментов и их иммобилизации, широкий выбор носителей, условий и химических агентов при иммобилизации ферментов в большинстве случаев позволяют получать ферменты, достаточно стабильные с практической точки зрения.

Таким образом, химическая энзимология создала целый арсенал методов, позволяющих перевести фермент из раствора на носитель, что обеспечило широкие возможности практического использования ферментов.

Глава 12

МАКРОКИНЕТИКА РЕАКЦИЙ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ ФЕРМЕНТАМИ

Математика — это искусство называть разные вещи одним и тем же именем.

А. Пуанкаре

12.1. Внешнедиффузионные эффекты

Принципиальной особенностью систем, в которых работают ферменты в иммобилизованном состоянии, является их гетерогенный характер. В таких системах на кинетику процесса определенное влияние оказывает массоперенос (в том числе за счет диффузии) субстратов и продуктов реакции. Если скорости ферментативных реакций высокие, а диффузия затруднена, скорость реакции в целом будет зависеть от скорости диффузии реагентов.

Массообмен играет важную роль в гетерогенно-каталитических реакциях, в электрохимических процессах, поэтому проблемам массопереноса в химических системах в течение многих лет уделялось большое внимание. Впервые количественный анализ явлений массопереноса в химических реакциях был сделан В. Нернстом, Е. Тиле и Я. Зельдовичем. В ферментативном катализе проблемы диффузионного массопереноса начали привлекать внимание исследователей в связи с изучением кинетики действия ферментов, иммобилизованных на твердых матрицах.

Наиболее распространенный метод иммобилизации ферментов заключается в образовании прочной химической связи между молекулой белка и какой-либо функциональной группой, локализованной на поверхности твердого носителя. При иммобилизации ферментов на твердых носителях возникает гетерогенная система, многие свойства которой определяются процессами массопереноса субстратов. Если фермент локализован на поверхности носителя и сам носитель непроницаем для субстрата, могут возникнуть условия, в которых скорость каталитического превращения будет зависеть от массопереноса вещества из жидкости к поверхности частицы. Такие системы обычно называют системами с внешней диффузией реагентов, в отличие от систем, в кото-

рых необходимо учитывать процесс диффузии компонентов внутри твердого носителя.

Эффекты, связанные с влиянием внешнедиффузионного переноса субстрата на скорости реакций, катализируемых иммобилизованными ферментами, наблюдаются в большом числе экспериментальных работ. Так, в ряде исследований реакций с иммобилизованными ферментами в реакторах колонного типа обнаружено, что скорость реакции увеличивается с ростом скорости потока. Было также показано, что скорость реакции зависит от эффективности перемешивания раствора для многих реакций в реакторах с перемешиванием. Влияние внешнедиффузионного переноса на скорость ферментативной реакции обнаружено при исследовании кинетики действия фермента, иммобилизованного на внутренней поверхности нейлоновых трубок, через которые прокачивался раствор субстрата.

В настоящей главе рассматриваются следующие вопросы: каковы количественные закономерности, наблюдаемые в такого рода системах; чем регулируется переход из кинетической области в диффузионную; какие количественные параметры реакции можно оценить из экспериментальных данных.

Приближенная оценка границы кинетической и диффузионной областей в неподвижной жидкости. Обычно реакции, катализируемые иммобилизованными ферментами, проводят при низких скоростях растворов субстратов. Например, при исследовании реакций с иммобилизованным фицином процесс изучали в реакторе колонного типа диаметром 1 см с максимальной скоростью введения раствора субстрата 200 мл/ч, это соответствует примерно $7 \cdot 10^{-2}$ см^3/с. В гидродинамическом смысле в этих условиях раствор субстрата по свойствам близок к практически неподвижной жидкости. При низких скоростях раствора субстрата в первом приближении массоперенос субстрата к поверхности носителя с иммобилизованным ферментом можно рассматривать как диффузионный перенос в неподвижной жидкости. В этих условиях можно приближенно оценить диффузионный поток субстрата к поверхности с иммобилизованным ферментом. В том случае, когда экспериментально наблюдаемая скорость реакции, пересчитанная на единицу потока, близка к предельному теоретическому значению диффузионного потока, можно утверждать, что реакция контролируется диффузией. Если экспериментальное значение потока существенно ниже теоретического, реакция протекает в кинетической области.

Рассмотрим поток субстрата к гранулам носителя, на поверхности которого иммобилизован фермент. Предполагается, что гранулы имеют сферическую форму радиусом R. Если форма гранулы отличается от сферической, в первом приближении можно ввести понятие эффективного радиуса, который равен радиусу сфе-

ры, поверхность которой эквивалентна поверхности данной частицы. Поток субстрата к поверхности сферической частицы равен

$$j_{\text{макс}} = 4\pi RDS_0,$$

где R — радиус сферической гранулы; D — коэффициент диффузии гранулы; S_0 — начальная концентрация субстрата. Этот поток будет соответствовать потоку субстрата к одной сферической частице при условии, что субстрат на поверхности расходуется полностью. Число N сферических частиц в 1 л раствора будет равно $N = 3D/(4\pi R^3\rho)$, где ρ — плотность носителя.

Таким образом, общую максимальную диффузионную скорость процесса в единице объема можно рассчитать по уравнению

$$v_{\text{макс}}^{\text{диф}} = j_{\text{макс}} N = 3nDS_0/(1000\rho R^2),$$

где n — концентрация носителя, г/л. Это максимальная скорость, которая может быть реализована в системе и которая определяется диффузией субстрата. Эта скорость прямо пропорциональна концентрации субстрата, его коэффициенту диффузии и обратно пропорциональна квадрату радиуса частиц с иммобилизованным ферментом. Очевидно, что чем выше дисперсность системы, тем более высокие скорости могут быть реализованы в диффузионном режиме.

Максимальную теоретическую скорость $v_{\text{макс}}^{\text{диф}}$ можно сравнить с экспериментально измеряемой скоростью реакции, которая равна

$$v_{\text{эксп}} = \frac{V'_m S_0}{K'_M + S_0}.$$

Здесь и далее штрих при K'_M и V'_m введен для того чтобы обозначить параметры фермента в иммобилизованном состоянии, которые в общем случае могут отличаться от параметров свободного фермента в растворе.

Введем безразмерное отношение

$$\chi = \frac{v_{\text{эксп}}}{v_{\text{макс}}^{\text{диф}}} = \frac{1000\rho R^2 V'_m}{(K'_M + S_0)3nD}. \qquad (12.1)$$

Это отношение является критерием, который позволит определить, в какой — кинетической или диффузионной — области работает система. Если $\chi \ll 1$, система работает в кинетическом режиме; если $\chi \approx 1$ — в диффузионном. При этом чем выше V'_m, тем выше вероятность того, что реакция контролируется диффузией субстрата.

Рассмотрим некоторые экспериментальные данные. В табл. 12.1 приведены экспериментально найденные значения V'_m и K'_M для трех систем с иммобилизованными ферментами. Согласно рекомендациям Международной комиссии по номенклатуре иммобилизованных ферментов значения V'_m принято выражать в микро-

Таблица 12.1

Кинетические параметры некоторых реакций с участием иммобилизованных ферментов

№	Система	V'_m, мкмоль/(мин · мг)	K'_M, ммоль/л
1	Амилоглюкозидаза — ДЕАЕ-целлюлоза*	0,05	1,4
2	Химотрипсин — карбоксиметилцеллюлоза	0,5	5
3	Химотрипсин — ДЕАЕ-целлюлоза	12	5

* ДЕАЕ-целлюлоза — диэтиламиноэтилцеллюлоза.

молях субстрата, конвертируемого в течение одной минуты одним миллиграммом иммобилизованного фермента.

На рис. 12.1 приведены рассчитанные по уравнению (12.1) значения критерия χ как функции концентрации субстрата для кинетических параметров, приведенных в табл. 12.1, для всех трех систем при $\rho \approx 1$ г/см^3, коэффициенте диффузии субстратов $8 \cdot 10^{-6}$ см^2/с, эквивалентном радиусе частиц носителя 20 мкм. На рис. 12.1 заштрихована область $0{,}1 < \chi < 10$, в которой реакция протекает в диффузионном режиме. Поскольку параметры, входящие в уравнение (12.1), взяты произвольно, эта область довольно широкая. Из данных, приведенных на рис. 12.1, видно, что для третьей системы с высоким значением V'_m вплоть до концентрации субстрата 0,1 моль/л реакция протекает в диффузионном режиме. Для второй системы переход из диффузионной области в кинетическую происходит при концентрации субстрата 0,01 моль/л. Первая система, которая имеет низкое значение V'_m, при всех концентрациях субстрата работает в кинетическом режиме.

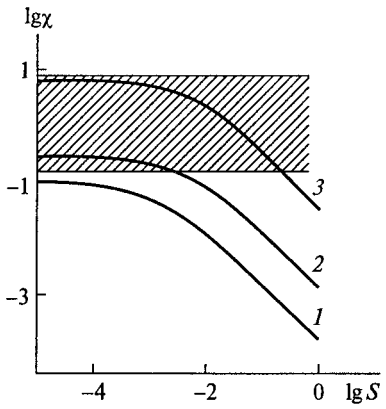


Рис. 12.1. Зависимость критерия χ от концентрации субстрата для реакции, катализируемой иммобилизованными ферментами:

1 — аминоглюкозидазой на диэтилцеллюлозе; *2* — химотрипсином на карбоксиметилцеллюлозе; *3* — химотрипсином на диэтиламиноэтилцеллюлозе

Данный анализ, не требующий сложных вычислений, весьма полезен для выяснения, в какой области — кинетической или диффузионной — работает система.

Диффузионный слой на границе твердое тело — движущаяся жидкость. Рассмотрим системы, в которых раствор субстрата нельзя считать неподвижным относитель-

но поверхности твердого тела. В этих условиях фундаментальную роль играют свойства жидкости на границе твердое тело — движущийся растворитель. Исследование различных свойств такого рода границы раздела фаз составляет предмет физико-химической гидродинамики. Далее изложены основные представления о свойствах пограничного диффузионного слоя.

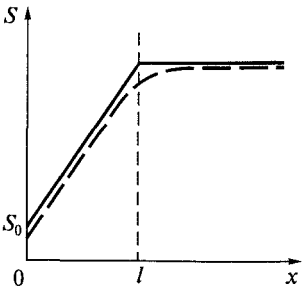


Рис. 12.2. Профиль распределения концентрации субстрата в гетерогенной реакции по Нернсту (сплошная линия) и результаты точного гидродинамического расчета (пунктирная линия)

Качественные представления о закономерностях гетерогенных реакций в условиях внешнедиффузионного переноса вещества были сформулированы В. Нернстом. Рассмотрим равнодоступную поверхность, находящуюся в контакте с движущейся жидкостью. Равнодоступной считается поверхность, транспорт вещества к которой эквивалентен во всех точках поверхности. При этом, естественно, безразлично, перемещается ли жидкость относительно неподвижной поверхности твердого тела или, наоборот, движется твердое тело относительно жидкости. Согласно представлениям В. Нернста вблизи поверхности твердого тела, находящегося в потоке жидкости, существует неперемешиваемый слой, внутри которого жидкость считается неподвижной и перенос вещества к поверхности твердого тела осуществляется только за счет молекулярной диффузии. Перемешивание жидкости приводит к тому, что концентрация вещества за пределами неперемешиваемого слоя постоянная. Если на поверхности вещество S расходуется за счет какой-либо гетерогенной реакции, то его концентрация вблизи поверхности будет отлична от концентрации в объеме. Схематично профиль распределения концентрации вещества S в рамках модели Нернста показан на рис. 12.2.

Математически модель Нернста для одномерного случая формируется следующим образом. В пределах диффузионного слоя толщиной l_N перенос вещества к поверхности твердого тела описывается уравнением диффузии при следующих граничных условиях: при $x \geq l_N$ имеем $S = S_l$; при $x = 0$ — $S = S_0$. Градиент вещества при линейном распределении его по толщине слоя равен

$$dS/dx = (S_l - S_0)/l_N.$$

Соответственно поток вещества к поверхности твердого тела описывается уравнением

$$j = -D(dS/dx) = D\frac{S_l - S_0}{l_N}. \qquad (12.2)$$

Уравнение (12.2) часто используется для интерпретации экспериментальных результатов. Например, уравнение описывает концентрационную поляризацию идеальных электродов в электрохимических системах. Толщина неперемешиваемого слоя, вычисленная по уравнению (12.2), в обычных условиях перемешивания составляет 10^{-5}—10^{-3} см. Диффузионная модель Нернста приближенная. Для одного частного случая — системы, включающей вращающийся в жидкости диск, анализ гидродинамических уравнений допускает точное аналитическое решение. Диффузия к равнодоступной поверхности диска, вращающегося в жидкости, описывается уравнением, аналогичным (12.2), где $l_N = l_d$ — толщина диффузионного слоя — эффективный параметр, имеющий размерность длины, введенный при точном аналитическом решении гидродинамической задачи.

Для конвективной диффузии к равнодоступной поверхности вращающегося диска может быть проведен точный количественный расчет профиля концентраций диффундирующего компонента. Если ввести безразмерную переменную

$$C = \frac{S_l - S}{S_l - S_0},$$

то в модели Нернста граничные условия будут формулироваться следующим образом: при $x \geq l_N$ имеем $C = 0$; при $x = 0$ — $C = 1$. Поскольку для вращающегося диска можно принять $l_N = l_d$, появляется возможность сопоставить точный профиль концентрации, полученный при решении гидродинамической задачи, с приближенным профилем, рассчитанным согласно Нернсту. На рис. 12.2 приведены данные о распределении концентрации субстрата вблизи поверхности с диффузионным слоем. Сплошная линия соответствует модели Нернста, пунктирная — более точному расчету профиля концентраций. Видно, что различия между приближенным и точным решением существуют, но они не существенны.

Кинетика реакций с участием иммобилизованных ферментов с учетом эффектов диффузионного слоя. Рассмотрим особенности системы с ферментом, иммобилизованным на поверхности носителя, в движущейся жидкости. Предполагается, что поверхность является однородной и равнодоступной. В этом случае поток субстрата к поверхности может быть описан уравнением (12.2), где $l_N = l_d$ — эффективная толщина диффузионного слоя. Поскольку размер молекул ферментов существенно меньше l_d, неоднородностями, которые возникают на поверхности при иммобилизации ферментов, практически можно пренебречь.

В стационарном состоянии поток субстрата к поверхности катализатора равен его потоку на поверхности. Если концентрация фермента выражена в молях на квадратный сантиметр, баланс потоков описывается уравнением

$$D(S_l - S_0)/l_d = j(E_s, S_0), \qquad (12.3)$$

где E_s — поверхностная концентрация фермента; S_0 — концентрация субстрата у поверхности.

В предположении, что кинетика ферментативной реакции описывается уравнением Михаэлиса, уравнение (12.3) может быть представлено в форме

$$D(S_l - S_0)/l_d = k'_{\text{кат}} E_s S_0/(K'_M + S_0), \qquad (12.4)$$

где $k'_{\text{кат}}$, K'_M — соответственно эффективная каталитическая константа и эффективная константа Михаэлиса реакции для иммобилизованного фермента.

Уравнение (12.4) позволяет вычислить концентрацию субстрата у поверхности как функцию концентрации субстрата в объеме, поверхностной концентрации фермента, кинетических параметров фермента и диффузионных характеристик системы D и l_d. Решение квадратного уравнения (12.4) относительно S_0 приводит к равенству

$$S_0 = \frac{S_l - k'_{\text{кат}} E_s l_d/D - K'_M}{2} + \sqrt{\left(\frac{S_l - k'_{\text{кат}} E_s l_d/D - K'_M}{2}\right)^2 + K'_M S_l}. \qquad (12.5)$$

Выбор знака корня уравнения сделан на основе следующего неравенства: $S_l > S_0 > 0$.

Представляет интерес проанализировать зависимость S_0/S_l от кинетических и диффузионных характеристик системы. Зависимость относительной концентрации субстрата в поверхностном слое определяется двумя безразмерными параметрами S_l/K'_M и θ:

$$S_0/S_l = \frac{1 - \frac{K'_M}{S_l}(1+\theta)}{2} + \sqrt{\left(\frac{1 - \frac{K'_M}{S_l}(1+\theta)}{2}\right)^2 + \frac{K'_M}{S_l}}.$$

Введенный безразмерный параметр θ равен

$$\theta = k'_{\text{кат}} l_d E_s/(K'_M D). \qquad (12.6)$$

Анализ показывает, что значение параметра θ определяет, в какой области — диффузионной или кинетической — работает система.

1. Если $\theta \ll 1$, т.е. если относительно мал кинетический параметр $k'_{\text{кат}}/K'_M$, или мала поверхностная концентрация фермента E_s, или мала толщина диффузионного слоя l_d, справедливо $S_0/S_l = 1$. В этих условиях вне зависимости от концентрации субстрата в объе-

ме его концентрация на поверхности носителя равна объемной концентрации. Диффузионные эффекты не влияют на кинетику процесса, система работает в кинетическом режиме.

2. Если $\theta \gg 1$, получим

$$S_0/S_l = \frac{1 - \frac{K'_M}{S_l}\theta}{2} + \sqrt{\left(\frac{1 - \frac{K'_M}{S_l}\theta}{2}\right)^2 + \frac{K'_M}{S_l}}.$$

В зависимости от значения K'_M/S_l отношение S_0/S_l может быть равно или намного меньше единицы. При $K'_M \approx S_l$ имеем $S_0/S_l \approx 1/\theta \ll 1$. Однако если $K'_M/S_l \ll 1$, так что $(K'_M/S_l)\theta \ll 1$, тогда $S_0/S_l \to 1$.

Таким образом, необходимым и достаточным условием того, что фермент будет работать в строго диффузионном режиме, является выполнение соотношения

$$\theta = \frac{k'_{\text{кат}} E_s l_d}{S_l D} \gg 1.$$

На рис. 12.3 приведена зависимость S_0/S_l от K'_M/S_l при различных фиксированных значениях параметра θ. Видно, что с увеличением K'_M/S_l (при уменьшении S_l) отношение S_0/S_l выходит на предельный уровень:

$$\lim_{S_l \to 0} \frac{S_0}{S_l} = \frac{1}{1+\theta}.$$

Таким образом, параметр θ и отношение K'_M/S_l регулируют кинетическое поведение системы. В зависимости от этих параметров ферментативная реакция может протекать как в кинетическом ($S_0/S_l \approx 1$), так и в диффузионном ($S_0/S_l \ll 1$) режиме.

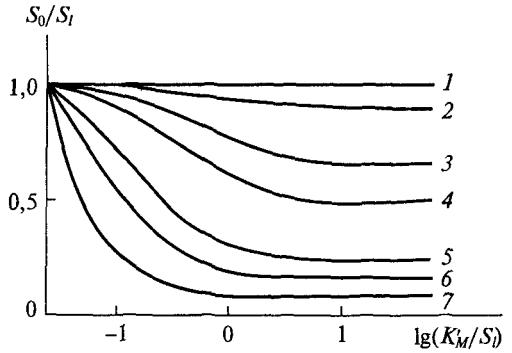


Рис. 12.3. Зависимость отношения поверхностной и объемной концентраций субстрата от безразмерной константы Михаэлиса при θ = 0,01 (*1*), 0,1 (*2*), 0,5 (*3*), 1 (*4*), 3 (*5*), 5 (*6*), 10 (*7*)

При известных параметрах θ и K'_M концентрация субстрата у поверхности носителя может быть рассчитана по уравнению

$$\frac{S_0}{K'_M} = \frac{\frac{S_l}{K'_M} - (1+\theta)}{2} + \sqrt{\left(\frac{\frac{S_l}{K'_M} - (1+\theta)}{2}\right)^2 + \frac{S_l}{K'_M}}.$$

Соответственно может быть вычислен относительный поток продукта (или скорость реакции):

$$\frac{j}{j_{\text{макс}}} = \frac{k'_{\text{кат}} E_s}{1 + \left\{\frac{S_l/K'_M - (1+\theta)}{2} + \sqrt{\left[\frac{S_l/K'_M - (1+\theta)}{2}\right]^2 + \frac{S_l}{K'_M}}\right\}^{-1}}. \quad (12.7)$$

На рис. 12.4 представлена зависимость потока продукта от объемной концентрации субстрата в безразмерных координатах при различных значениях параметра θ. Максимальный поток равен $j_{\text{макс}} = k'_{\text{кат}} E_s$. В отличие от обычной реакции, протекающей по механизму Михаэлиса, зависимость $j(S_l)$ не линеаризуется в обратных координатах (см. рис. 12.4):

$$\frac{j}{j_{\text{макс}}} = \frac{1}{1 + \left\{\frac{S_l/K'_M - (1+\theta)}{2} + \sqrt{\left[\frac{S_l/K'_M - (1+\theta)}{2}\right]^2 + \frac{S_l}{K'_M}}\right\}^{-1}}.$$

Из рис. 12.4 видно, что при высоких значениях S_l/K'_M реакция протекает в кинетическом режиме и поток продукта приближается к максимальному значению; при низких концентрациях субстрата реакция переходит в диффузионную область.

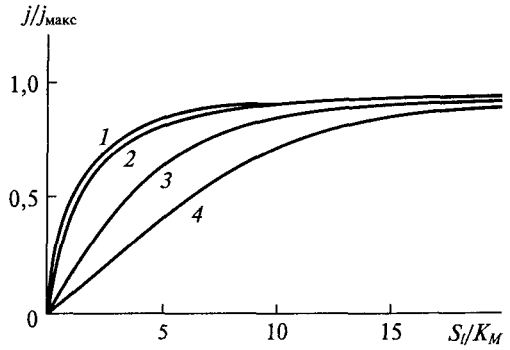


Рис. 12.4. Зависимость потока продукта от объемной концентрации субстрата в обратных координатах при θ = 0,1 (*1*), 1 (*2*), 5 (*3*), 10 (*4*)

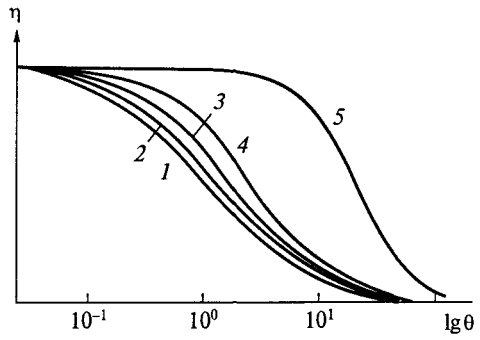


Рис. 12.5. Численный расчет фактора эффективности η как функции параметра θ при S_l/K'_M = 0,1 (*1*), 0,2 (*2*), 0,5 (*3*), 1 (*4*), 10 (*5*)

Очевидно, что в условиях, когда кинетика процесса определяется диффузией субстрата у поверхности носителя, каталитическая эффективность системы уменьшается. Интересно оценить фактор эффективности каталитической системы с внешнедиффузионными ограничениями. Фактор эффективности равен отношению потоков продукта в условиях протекания ферментативной реакции с субстратом концентрации S_0 к потоку, который мог бы реализоваться в отсутствие диффузионных ограничений:

$$\eta = \frac{j(S_0)}{j(S_l)} = \frac{S_0/S_l + S_0/K'_M}{1 + S_0/K'_M}. \qquad (12.8)$$

На рис. 12.5 приведены результаты численного расчета фактора эффективности как функции параметра θ при различных значениях отношения S_l/K'_M. Видно, что с увеличением θ (увеличением концентрации E_s, увеличением толщины диффузионного слоя, уменьшением коэффициента диффузии субстрата) эффективность действия системы уменьшается. Особенно это сказывается при низких значениях S_l/K'_M. В этих условиях фактор эффективности обратно пропорционален параметру θ: η = 1/θ. Отметим также, что использование высоких концентраций субстрата может перевести систему в кинетический режим, при котором фактор эффективности близок к единице.

Определение кинетических параметров системы из экспериментальных данных. В экспериментальных работах по стационарной кинетике ферментативных реакций обычно исследуется зависимость скорости процесса от концентрации субстрата. Для гетерогенной системы с внешнедиффузионными ограничениями из исследования зависимости скорости реакции от концентрации субстрата при варьировании последней в широких пределах также могут быть определены кинетические характеристики процесса

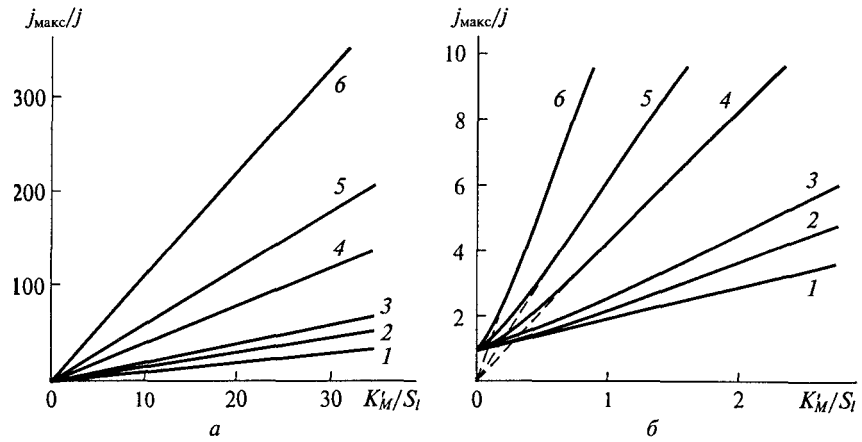


Рис. 12.6. Зависимость потока продукта от концентрации субстрата в обратных координатах при $\theta = 0{,}01$ (*1*), 0,5 (*2*), 1 (*3*), 3 (*4*), 5 (*5*), 10 (*6*): *а* — $0 < K'_M/S_l < 30$; *б* — $0 < K'_M/S_l < 3$

$V'_m(j_{макс})$, K'_M и θ. При этом следует иметь в виду, что поверхностная и объемная концентрации фермента и соответственно поток j и скорость реакции связаны соотношениями $E_0 = (A/V)E_s$, $v = j(A/V)$, где A — площадь поверхности носителя с ферментом; V — объем системы.

На рис. 12.6 приведены теоретические зависимости $j(S_l)$ в обратных координатах. В кинетической области при высоких концентрациях субстрата могут быть определены кинетические параметры действия фермента V'_m и K'_M. В диффузионной области зависимость между j^{-1} и S_l^{-1} линейная и проходит через начало координат:

$$v^{-1}_{S_l \to 0} = (1 + \theta) K'_M / V'_m .$$

По тангенсу угла наклона графика этой зависимости может быть найден параметр θ при известных значениях V'_m и K'_M. Таким образом, экспериментально могут быть определены все кинетические параметры системы V'_m (или $k'_{кат}$) и θ.

В качестве иллюстрации рассмотрим экспериментальные данные работы, в которой изучено кинетическое поведении щелочной фосфатазы, иммобилизованной на коллоидной мембране, в условиях, когда на кинетику процесса оказывает влияние внешнедиффузионный перенос субстрата. На поверхности мембраны была сорбирована щелочная фосфатаза. На рис. 12.7 приведена зависимость скорости реакции от концентрации субстрата в обратных координатах. Значения скорости отнесены к максимальной скорости, экспериментально определенной при высоких насыщающих концентрациях субстрата. Необходимо отметить, что для

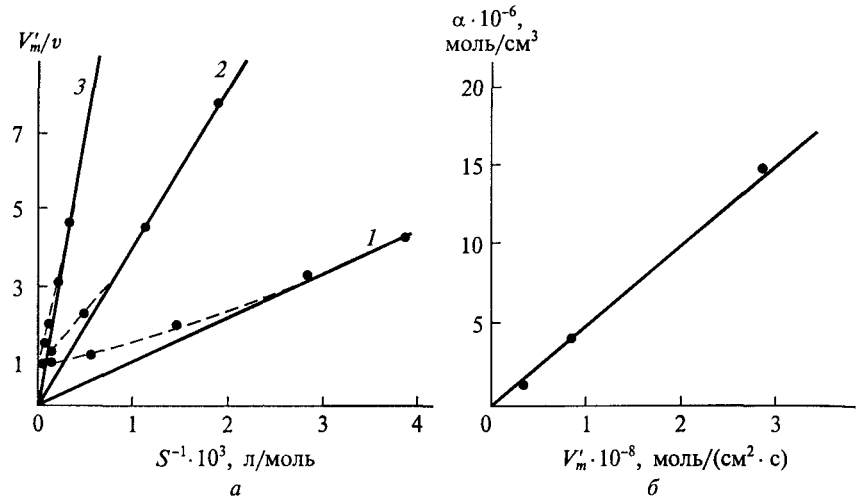


Рис. 12.7. Определение кинетических и диффузионных характеристик иммобилизованной щелочной фосфатазы:

а — зависимость обратной относительной скорости от обратной концентрации субстрата (линии *1*—*3* отличаются значением поверхностной концентрации фермента и соответственно максимальными скоростями (см. рис. 12.7, *б*); *б* — зависимость $\alpha(V'_m)$, рассчитанная по уравнению (12.9)

систем с диффузионными ограничениями значения V'_m определяются, как правило, существенно более точно, чем K'_M, поскольку на V'_m не действуют диффузионные и другие осложняющие эффекты, например ингибирование продуктом.

Как видно из рис. 12.7, экспериментальные данные (точки) не линеаризуются в обратных координатах. При низких концентрациях субстрата асимптотические прямые проходят через начало координат, при этом тангенс угла наклона прямых связан с кинетическими и диффузионными параметрами системы:

$$\alpha = d\left(\frac{V'_m}{v}\right)\Big/ d(S^{-1}) = K'_M(1+\theta).$$

Если параметр $\theta \gg 1$, должна наблюдаться линейная зависимость между параметром α и максимальной скоростью реакции:

$$\alpha = (l_d/D)V'_m. \qquad (12.9)$$

Экспериментально наблюдаемая зависимость, полученная из данных рис. 12.7, *а*, приведена на рис. 12.7, *б*. При известном коэффициенте диффузии D может быть найдена толщина l_d диффузионного слоя. Если принять, что коэффициент диффузии *п*-нитрофенилфосфата в условиях эксперимента равен $5\cdot 10^{-6}$ см^2/с, из данных, приведенных на рис. 12.7, следует, что толщина диффу-

зионного слоя равна 25 мкм. Это соответствует независимым экспериментальным данным, полученным в аналогичных условиях. Важно подчеркнуть, что при определении l_d не использовались константы Михаэлиса, которые, как правило, определяются с большой ошибкой.

Часто при исследовании реакций, которые протекают в смешанном режиме, точность эксперимента не позволяет последовательно проследить нелинейность зависимости $v^{-1}(S^{-1})$ при переходе из кинетической в диффузионную область. Внешне кривые $v(S)$ для кинетического и диффузионного случаев похожи. Часто при анализе кинетических зависимостей в переходной и даже в диффузионной области используют обратные координаты. Очевидно, что при этом определяемые параметры V'_m и K'_M не имеют физического смысла, поскольку найденное таким образом значение $K'_{M\text{эф}}$ является функцией параметров массопереноса.

Истинные значения константы Михаэлиса могут быть определены для системы с небольшим значением θ при повышенных концентрациях субстрата. Если вернуться к данным рис. 12.7 и принять, что константа $K'_M = 2{,}5 \cdot 10^{-4}$ моль/л, определенная из начального участка кривой *1* (верхний предел K'_M), имеет одинаковое значение для всех трех кривых, вычисленные по уравнению (12.6) значения параметра θ для систем с различной поверхностной концентрацией фермента соответственно равны $\theta_1 = 3{,}5$, $\theta_2 = 15$, $\theta_3 = 60$. Таким образом, для систем, отвечающих линиям *2*, *3* (см. рис. 12.7, *а*), при концентрации субстрата 10^{-3} моль/л (и менее) щелочная фосфатаза работает в строго диффузионном режиме. Значения фактора эффективности работы катализатора в этих условиях чрезвычайно малы и равны соответственно 0,067 и 0,017. Приведенные экспериментальные данные иллюстрируют тот факт, что система может работать в строго диффузионном режиме при концентрациях субстрата, существенно превышающих константу Михаэлиса.

В ряде случаев при оценке работы каталитической системы принципиально важно иметь ответ на вопрос: в какой области — диффузионной или кинетической — работает данная система. Это можно сделать, основываясь на следующих критериях.

1. График зависимости скорости реакции от концентрации субстрата в случае кинетики с внешнедиффузионным торможением имеет характерный вид (см. рис. 12.6). Таким образом, если экспериментально зарегистрированы такого вида кинетические зависимости, можно сделать вывод о том, что на кинетику реакции оказывает влияние диффузия. При анализе кинетических данных необходимо иметь в виду, что обработка экспериментальных результатов проводится с использованием уравнений, которые справедливы только для равнодоступных поверхностей. При этом не учитывается наличие слоя, который образует фермент на поверхности носителя, и принимается, что кинетика ферментативной

реакции описывается простейшим уравнением типа уравнения Михаэлиса. При изучении конкретных систем необходимо проверять, выполняются ли перечисленные условия. При несоответствии характеристик системы указанным выше требованиям необходимо проведение полного кинетического анализа.

2. В условиях, когда реакция проводится в строго диффузионном режиме, экспериментально определяемая скорость процесса в определенном диапазоне не должна зависеть от концентрации фермента и факторов, влияющих на его активность, таких как показатель pH, наличие ингибиторов и т. п. Согласно уравнению (12.7) при $\theta \gg 1$ скорость процесса (поток продукта) не зависит от концентрации фермента и описывается уравнением $j/j_{макс} = DS_l/l_d$. В этих условиях увеличение концентрации фермента не должно приводить к изменению скорости процесса. Однако существенное уменьшение концентрации активного фермента, например за счет ингибирования, может перевести систему из диффузионной области в кинетическую.

3. В режиме, контролируемом диффузией, на скорость процесса должны оказывать влияние факторы, изменяющие толщину диффузионного слоя, такие как, например, скорость раствора субстрата, скорость вращения мешалки. В некоторых случаях может быть проведен строгий теоретический анализ влияния гидродинамических характеристик системы на толщину l_d (см. далее анализ системы с вращающимся диском). В ряде случаев качественным критерием работы системы в диффузионном режиме является зависимость скорости реакции (или константы Михаэлиса) от скорости субстрата. Например, на рис. 12.8 представлена зависимость эффективного значения $K'_{Mэф}$ от скорости раствора субстрата в колонке с иммобилизованным фицином для реакции гидролиза бензоиларгинилэтилового эфира. Видно, что при низких скоростях с увеличением толщины диффузионного слоя эффективная константа Михаэлиса реакции растет. Увеличение скорости раствора субстрата выводит систему на кинетический режим. Таким образом, зависимость эффективной константы Михаэлиса от гидро-

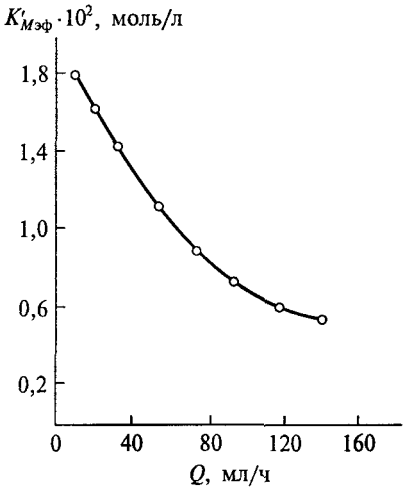


Рис. 12.8. Зависимость эффективной константы Михаэлиса реакции гидролиза бензоиларгинилэтилового эфира от скорости раствора в колонке с иммобилизованным на карбоксиметилцеллюлозе фицином

динамических характеристик среды также может служить критерием того, что система работает в диффузионной области.

Оценка диффузионного модуля θ. Любая система при изменении концентрации субстрата в широком диапазоне может существовать в одной из трех областей:

1) в кинетической области, которая реализуется при высоких концентрациях субстрата;

2) в переходной области;

3) в диффузионной области, где скорость процесса контролируется массопереносом субстрата к поверхности носителя с ферментом.

Для равнодоступной поверхности концентрация субстрата, при которой система будет работать в диффузионном режиме, определяется значением параметра θ. При высоких значениях θ диффузионная кинетика может реализоваться и при концентрациях субстрата, существенно превышающих K'_M. Например, при θ = 100 система работает практически в диффузионном режиме при $S_l/K'_M = 10$. Поэтому крайне важным является оценка значений θ, которые могут реализоваться в системах с иммобилизованными ферментами. Как следует из уравнения (12.6), для того чтобы оценить параметр θ, необходимо знать кинетический параметр ферментативной реакции $k'_{кат}/K'_M$, поверхностную концентрацию фермента E_s, коэффициент диффузии субстрата D и толщину пограничного диффузионного слоя l_d.

Оценка параметра $k'_{кат}/K'_M$. В настоящее время имеются многочисленные данные о значениях $k'_{кат}/K'_M$, полученных из результатов экспериментов по стационарной кинетике ферментативных реакций. Отношение $k'_{кат}/K'_M$ изменяется в широких пределах; кроме того, значения $k'_{кат}/K'_M$ зависят от условий проведения эксперимента (показателя pH, ионной силы раствора, температуры) и специфичности используемого субстрата. Условно все ферменты можно разделить на три основные группы:

1) малоактивные ($k'_{кат}/K'_M < 10^4$ л/(моль · с));

2) активные ($k'_{кат}/K'_M = 10^4 — 10^7$ л/(моль · с));

3) высокоактивные ($k'_{кат}/K'_M > 10^7$ л/(моль · с)).

Оценка поверхностной концентрации фермента при монослойном заполнении. Иммобилизация ферментов на поверхность носителя может быть осуществлена различными способами. Обычно методы химической сшивки фермента с поверхностью не позволяют получить концентрацию фермента, превышающую монослойное заполнение поверхности белком. То же самое относится и к поверхностной неспецифической сорбции ферментов. Представляет интерес оценить поверхностную концентрацию фермента в предположении, что на поверхности образуется монослой. Очевидно, что поверхностная концентрация при монослойном заполнении будет зависеть от размера белковой глобулы. Если белок

занимает на поверхности площадь 5×5 нм, то его концентрация составляет $4 \cdot 10^{12}$ молекул на 1 см^2 или $6{,}6 \cdot 10^{-12}$ моль/см^2. Это значение будет использоваться при оценке параметра θ в системе с монослойным заполнением поверхности. Очевидно, что рассчитано оно приблизительно и может изменяться в зависимости от размеров белковой глобулы.

Оценка толщины пограничного диффузионного слоя. В настоящее время точный теоретический расчет макрокинетических характеристик систем с внешнедиффузионным переносом сделан лишь для диска, вращающегося в жидкой среде. В гидродинамическом отношении вращающийся диск — истинно равнодоступная поверхность, наиболее простая система, для которой существует строгое аналитическое решение гидродинамической задачи.

Толщина диффузионного слоя для вращающегося диска равна

$$l_d = 1{,}61 \frac{D^{1/3} \nu^{1/6}}{\sqrt{\omega}}, \qquad (12.10)$$

где D — коэффициент диффузии; ν — вязкость жидкости; ω — угловая скорость вращения диска. В этих условиях удельный поток будет равен

$$j_{уд} = \frac{D^{2/3} S_0 \sqrt{\omega}}{1{,}61 \nu^{1/6}},$$

т.е. скорость диффузионно-контролируемой реакции должна линейно зависеть от $\sqrt{\omega}$. Уравнение (12.10) можно переписать в виде

$$l_d = 1{,}61 (D/\nu)^{1/3} (\nu/\omega)^{1/2}. \qquad (12.11)$$

Параметр ν/D, который получил название числа Шмидта (Sc), является характеристикой среды, в которой происходит диффузия реагента. Для водных растворов, в которых протекают реакции с иммобилизованными ферментами, коэффициенты диффузии реагентов имеют порядок $5 \cdot 10^{-5}$ см^2/с, кинематическая вязкость $5 \cdot 10^{-2}$ см/с. Соответственно число Шмидта равно приблизительно 10^3. Тогда согласно уравнению (12.11) при скорости вращения диска ω = 1, 10, 100, 1000 об/с толщина диффузионного слоя составит l_d = 150, 50, 15, 5 мкм соответственно.

Обычные условия проведения ферментативной реакции в перемешиваемом растворителе соответствуют, по-видимому, скорости вращения диска 1—100 об/с. Это дает диапазон толщины диффузионного слоя 15—150 мкм (см., например, проведенный выше анализ экспериментальных данных по кинетике действия иммобилизованной щелочной фосфатазы).

Если принять, что в условиях эксперимента l_d = 50 мкм, то для трех групп ферментов, обладающих разной реакционной способностью, можно получить следующие значения параметра θ

при монослойном заполнении поверхности ферментом (предполагается, что коэффициент диффузии субстрата равен примерно $5 \cdot 10^{-6}$ см^2/с):

1) ферменты первой группы при концентрациях субстратов, соизмеримых с константой Михаэлиса, работают в строго диффузионном режиме: $k'_{кат}/K'_M \geq 10^7$ л/(моль·с), $\theta \gg 1$; существенное уменьшение концентрации фермента (вплоть до концентрации, соответствующей 2%-му заполнению поверхности) заметно не повлияет на скорость процесса;

2) ферменты второй группы, имеющие кинетические параметры в промежуточной области: $10^4 \leq k'_{кат}/K'_M \leq 10^7$ л/(моль·с), в зависимости от условий эксперимента могут проводить реакцию как в диффузионном, так и в кинетическом режиме;

3) ферменты третьей группы вследствие низкого значения $k'_{кат}/K'_M \leq 10^4$ л/(моль·с), $\theta \leq 0{,}07$ при любой концентрации субстрата работают в кинетическом режиме; при монослойном заполнении поверхности невозможно реализовать условия, в которых реакция протекала бы в диффузионной области.

12.2. Внутридиффузионные эффекты

В подразд. 12.1 рассмотрена кинетика гетерогенных реакций, когда основное сопротивление массопереносу обеспечивает диффузионный слой, возникающий на границе раздела фаз твердое тело—движущаяся жидкость. В данном разделе будет проанализирована кинетика в условиях, когда скорость реакции определяется массопереносом внутри частицы катализатора. Для протекания реакции необходимо, чтобы исходные реагенты достигли поверхности частицы катализатора, продиффундировали внутрь нее, а продукты реакции были удалены из пор или с поверхности катализатора. Такой обмен осуществляется посредством диффузии реагентов между катализатором и контактирующим с ним раствором. В некоторых случаях наблюдаемая скорость реакции определяется скоростью диффузии. С увеличением активности катализатора и диффузионного сопротивления в частице катализатора растет влияние на скорость процесса диффузионных факторов. При этом реальная скорость реакции становится меньше потенциально возможной, и для оптимизации процесса необходимо установить взаимосвязь между массопереносом и истинной кинетикой реакции.

Один из наиболее распространенных способов иммобилизации ферментов — включение их в гели различной полимерной природы. При катализе ферментами, включенными в такие гели, сопротивление массообмену между окружающим раствором и внутренними областями геля обусловлено диффузией через неподвижную жидкость, заполняющую поры геля. Если фермент иммобилизован в

частицах высокопористого материала, диффузионный массоперенос субстрата и продуктов реакции происходит в порах носителя.

Кинетические параметры ферментативных реакций определяются обычно линеаризацией экспериментальных данных в координатах Лайнуивера—Берка. Экспериментальные данные, полученные для иммобилизованных ферментов, зачастую не линеаризуются в координатах Лайнуивера—Берка, даже если истинная ферментативная кинетика подчиняется уравнению Михаэлиса. Теоретические исследования показывают, что эффекты массопереноса могут вызвать искривление кривой, делая ее выпуклой или вогнутой по отношению к оси абсцисс. Таким образом, графическая процедура, обычно применяемая при анализе кинетики растворимых ферментов, может дать ошибочные результаты в приложении к иммобилизованным ферментам. Поэтому для правильной интерпретации экспериментальных данных необходимо учитывать эффекты, связанные с процессами массопереноса. Несмотря на весьма сложный характер взаимодействия между диффузией и реакцией, некоторые конкретные случаи поддаются математическому анализу, и могут быть получены аналитические выражения для скорости реакции, в которые входят кинетические, диффузионные и равновесные параметры описываемой системы.

Из общих соображений для химической реакции с внутридиффузионным торможением, так же как и для случая с внешней диффузией, можно выделить следующие области протекания процесса.

1. Кинетическая область. Истинная кинетика реакции будет проявляться всякий раз, когда скорости химических взаимодействий будут невелики, что приведет к незначительному градиенту концентраций, являющемуся движущей силой диффузионного потока. Профиль концентрации субстрата в частице катализатора в стационарном состоянии представлен на рис. 12.9, *а*. Скачок концентрации на границе раздела раствор—частица катализатора обусловлен эффектом распределения вещества между фазами.

2. Внутридиффузионная область. При высокой активности фермента субстрат будет расходоваться в приповерхностных слоях частицы катализатора, а глубинные области будут обеднены субстратом. В стационарном состоянии профиль концентрации субстрата должен выглядеть примерно так, как показано на рис. 12.9, *б*. Во внутридиффузионной области роль диффузионных эффектов можно характеризовать коэффициентом эффективности η, который представляет собой отношение наблюдаемой скорости реакции к ее значению, достигаемому в предположении о доступности для реагентов всех внутренних областей катализатора, когда локальные концентрации субстрата в глубинных частях катализатора такие же, как и в приповерхностных слоях.

Очевидно, что в зависимости от условий проведения эксперимента реакция может протекать как в кинетическом, так и в диффузи-

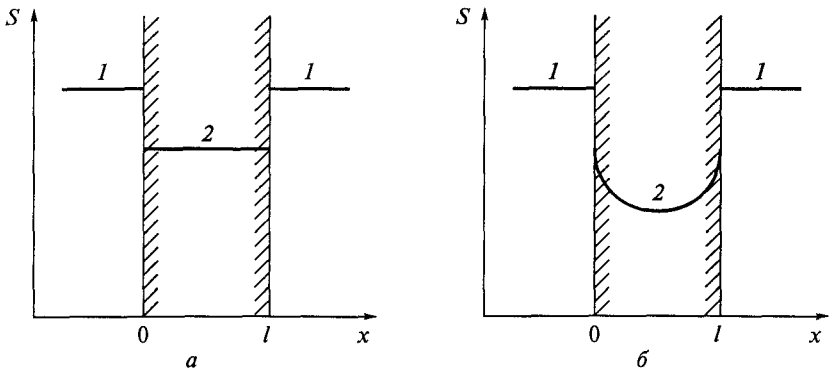


Рис. 12.9. Профили концентрации субстрата в омывающей частицу катализатора жидкости S_0 (*1*) и концентрации субстрата по толщине пластины S (*2*) для различных областей протекания реакций:

а — кинетическая область; *б* — внутридиффузионная область

онном режиме; при этом между ними существует переходная область. Задача кинетического исследования процесса на основе анализа фундаментальных уравнений физической и химической кинетики сводится к установлению соотношений между скоростью химической реакции и макрокинетическими параметрами системы.

Для описания работы системы с иммобилизованным ферментом в гетерогенных условиях требуется совместное решение уравнений материального баланса для системы в целом и уравнений, описывающих одновременное протекание массопереноса в результате диффузии и химической реакции. Так как нас интересует влияние внутренней диффузии, не будем учитывать внешнедиффузионный массоперенос (об этом шла речь в предыдущем разделе) и будем лишь иметь в виду, что концентрация субстрата на внутренней поверхности катализатора определенным образом и однозначно связана с концентрацией субстрата в омывающей частицы жидкости, тем более что во многих реакционных системах имеется возможность устранить влияние внешнедиффузионного сопротивления путем интенсификации перемешивания в реакторе. В последнем случае связь между концентрацией субстрата в омывающем растворе и концентрацией субстрата на внутренней поверхности катализатора определяется соотношением

$$S_0 = PS_i, \qquad (12.12)$$

где S_i — концентрация субстрата на внутренней поверхности катализатора; P — коэффициент распределения субстрата между фазами.

Для математического описания гетерогенно-каталитической системы необходимо принять следующие допущения.

1. Диффузия субстрата внутри матрицы может быть описана законом Фика с эффективным коэффициентом диффузии $D_{эф}$ (в дальнейшем он будет обозначаться D), не зависящим от концентрации и усредненным по всей частице, без учета того, что в частице могут быть поры и непроницаемые участки.

2. Отсутствуют специфические взаимодействия между субстратом и пористым носителем.

3. Скорость ферментативной реакции описывается уравнением Михаэлиса

$$v = -dS/dt = V'_m S/(K'_M + S), \qquad (12.13)$$

где v — скорость реакции; S — локальная концентрация субстрата в частице катализатора; t — время; V'_m, K'_M — кинетические константы иммобилизованного фермента, которые предполагаются постоянными по всей частице.

Рассматриваться будет решение стационарной задачи, когда увеличение концентрации субстрата в элементе объема катализатора за счет диффузии компенсируется расходом его в результате ферментативной реакции (рис. 12.10).

Скорость изменения концентрации субстрата за счет диффузии в элементе объема частицы катализатора на глубине dx выражается следующим дифференциальным уравнением диффузии в неподвижной среде (второй закон Фика):

$$dS/dt = D\Delta S, \qquad (12.14)$$

где Δ — оператор Лапласа.

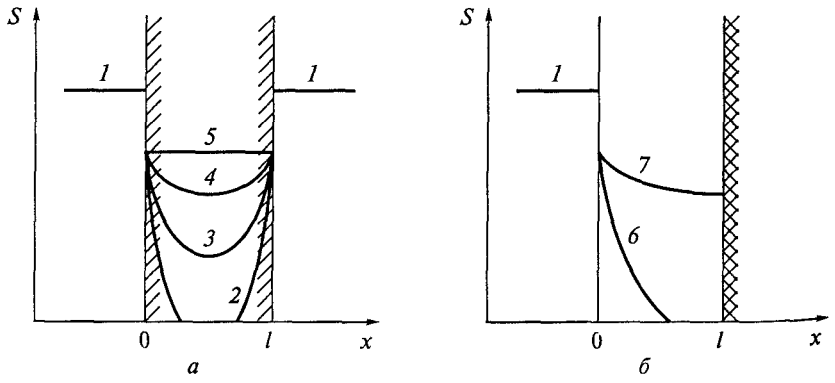


Рис. 12.10. Профили концентрации субстрата в омывающей частицу катализатора жидкости S_0 (*1*) и концентрации субстрата S_i (*2*— *7*) в мембране:

а — *2* — $t = 0$, *3* — $t > 0$, *4* — стационарное состояние при наличии ферментативной реакции, *5* — стационарное состояние в отсутствие ферментативной реакции; *б* — *6* — общий случай (граничные условия (12.28), (12.29)), *7* — полубесконечный случай (граничные условия (12.28)—(12.30))

Скорость изменения концентрации субстрата за счет ферментативной реакции задается уравнением (12.13).

В стационарном режиме процесса превращение субстрата в частице катализатора будет характеризоваться следующим уравнением материального баланса:

$$D\Delta S - \frac{V'_m S}{K'_M + S} = 0. \qquad (12.15)$$

В ряде частных случаев, а именно: для плоской мембраны, стержня и сферы — уравнение (12.15) упрощается и задача становится одномерной:

$$D\left(\frac{d^2S}{dx^2} + \frac{n}{x}\frac{dS}{dx}\right) - \frac{V'_m S}{K'_M + S} = 0, \qquad (12.16)$$

где $n = 0, 1, 2$ для мембраны, стержня и сферы соответственно; x — координата по толщине мембраны или радиуса стержня (или сферы). Таким образом, в математическом смысле задача сводится к решению дифференциального уравнения типа (12.15) и анализу полученных решений.

Кинетика реакций с внутридиффузионным торможением для плоской мембраны. Рассмотрим пористую матрицу в форме мембраны толщиной l с равномерно распределенным в ней ферментом. Одна поверхность мембраны непроницаема для субстрата, на другой — поддерживается постоянная концентрация S_l (см. рис. 12.10, *б*).

Для мембраны дифференциальное уравнение материального баланса имеет вид

$$D\frac{d^2S}{dx^2} = \frac{V'_m S}{K'_M + S}. \qquad (12.17)$$

Для решения задачи необходимо использовать граничные условия:

$$x = 0: \quad S = S_l; \qquad (12.18)$$

$$x = l: \quad dS/dx = 0. \qquad (12.19)$$

Второе условие может быть более «жестким»:

$$x = l: \quad S \to 0, \ (dS/dx \to 0). \qquad (12.20)$$

По физическому смыслу это так называемый полубесконечный случай, когда реакция протекает фактически в узкой приповерхностной области мембраны. В этой области концентрация субстрата уменьшается практически до нуля, и основной объем мембраны каталитически неактивен. Граничное условие (12.20) должно выполняться для довольно толстых мембран с низкой проницаемостью и высокой активностью фермента, когда скорость ре-

акции велика по сравнению со скоростью диффузии (математически это соответствует полубесконечной по толщине мембране).

Уравнение (12.17) можно решать как относительно концентрации S (в этом случае будет получен профиль концентраций субстрата в мембране), так и относительно dS/dx для определения суммарного потока продукта. В стационарном состоянии поток продукта равен потоку субстрата в мембрану:

$$j = -AD\left.\frac{dS}{dx}\right|_{x=0}, \tag{12.21}$$

где j — поток субстрата; A — площадь мембраны.

Нас интересует, как влияет диффузия субстрата внутри матрицы на скорость ферментативной реакции. При этом удобно ввести фактор эффективности, который равен

$$\eta = \frac{v_{\text{набл}}}{v_0}, \tag{12.22}$$

где v_0 — скорость реакции в отсутствие внутридиффузионных ограничений, когда концентрация субстрата по всей частице катализатора равна S_l ($S(x) = S_l$).

С учетом (12.13) можно записать

$$v_{\text{набл}} = \eta\frac{V'_m S_l}{K'_M + S_l}. \tag{12.23}$$

Для решения задачи перейдем к безразмерным координатам:

$$z = \frac{x}{l}, \quad n = \frac{S}{S_l}. \tag{12.24}$$

Уравнение (12.17) примет следующий вид:

$$\frac{d^2n}{dz^2} - l^2\frac{V'_m}{DK'_M}\frac{n}{1 + n\dfrac{S_l}{K_M}} = 0. \tag{12.25}$$

Константы удобно объединить в следующие безразмерные комплексы:

$$\Phi = l\sqrt{\frac{V'_m}{DK'_M}}, \quad \gamma = \frac{K'_M}{S_l}, \tag{12.26}$$

где Φ — модифицированный концентрационно-независимый диффузионный модуль Тиле; γ — безразмерная константа Михаэлиса.

В безразмерном виде уравнение (12.25) запишется следующим образом:

$$\frac{d^2n}{dz^2} - \Phi^2\frac{n\gamma}{n + \gamma} = 0 \tag{12.27}$$

с граничными условиями:

$$z = 0: \quad n = 1; \tag{12.28}$$

$$z = 1: \quad dn/dz = 0; \tag{12.29}$$

$$z = 1: \quad n \to 0 \ (dn/dz \to 0). \tag{12.30}$$

Уравнение (12.27) представляет собой дифференциальное уравнение второго порядка. Решение этого уравнения с граничными условиями (12.28), (12.29) можно получить только путем численного интегрирования. Аналитические решения могут быть получены для двух крайних случаев: $K'_M \ll S$ и $K'_M \gg S$.

1. Рассмотрим случай, когда ферментативная реакция имеет нулевой порядок относительно субстрата: $K'_M \ll S_l$ (или $\gamma \ll n$). При этих условиях уравнение (12.27) преобразуется к виду

$$\frac{d^2n}{dz^2} = \Phi^2\gamma. \tag{12.31}$$

Интегрирование уравнения (12.31) с граничными условиями (12.28), (12.29) в соответствии с уравнением (12.21) дает соотношение

$$j = AD\frac{S_l}{l}\Phi^2\gamma. \tag{12.32}$$

Поток продукта в отсутствие внутридиффузионных ограничений будет равен

$$j_{\text{макс}} = Alv_0 = AlV'_m\frac{S_l}{K'_M + S_l} = \frac{AD}{l}\Phi^2\frac{S_l}{1+\gamma};$$

для случая $S \gg K'_M$ получим

$$j_{\text{макс}} = A\frac{D}{l}\Phi^2 S_l.$$

Таким образом, при работе системы в этом режиме фактор эффективности равен единице: $\eta = 1$, т.е. при выполнении по всей толщине мембраны условия $K'_M \ll S_l$ эффективность работы будет максимальной.

2. Рассмотрим случай, когда ферментативная реакция имеет первый порядок по субстрату: $K'_M \gg S$ (или $n \ll \gamma$). Дифференциальное уравнение (12.27) при условии принимает следующий вид:

$$\frac{d^2n}{dz^2} - \Phi^2 n = 0. \tag{12.33}$$

Уравнение (12.33) представляет собой линейное дифференциальное уравнение второго порядка с постоянными коэффициентами; решение его имеет вид

$$n = A_1 \exp(K_1 z) + A_2 \exp(K_2 z), \qquad (12.34)$$

где K_1, K_2 — корни характеристического уравнения $K^2 - \Phi^2 = 0$.

Коэффициенты A_1 и A_2 рассчитываются из граничных условий (12.28), (12.29):

$$A_1 = \frac{e^{-\Phi}}{e^{\Phi} + e^{-\Phi}}, \quad A_2 = \frac{e^{\Phi}}{e^{\Phi} + e^{-\Phi}}. \qquad (12.35)$$

После подстановки (12.35) в уравнение (12.34) и дифференцирования получаем

$$\frac{dn}{dz} = \Phi \frac{e^{\Phi z} + e^{-\Phi z}}{e^{\Phi} + e^{-\Phi}} - \Phi e^{-\Phi z},$$

$$j = AD\frac{S_i}{l}\Phi \frac{e^{\Phi z} + e^{-\Phi z}}{e^{\Phi} - e^{-\Phi}} = AD\frac{S_i}{l}\Phi \operatorname{th}\Phi.$$

Таким образом, для случая $K'_M \gg S$ находим фактор эффективности $\eta = \operatorname{th}(\Phi)/\Phi < 1$.

Полубесконечное приближение. Точное аналитическое решение уравнения (12.27) без ограничений, налагаемых на концентрацию субстрата, возможно с граничными условиями (12.28), (12.30), т.е. в полубесконечном приближении.

Используя подстановку $p = dn/dz$, понижаем порядок уравнения (12.27) и для новых переменных p и n получаем следующее уравнение:

$$p\frac{dp}{dn} = \Phi^2 \frac{n\gamma}{n + \gamma}.$$

Интегрирование с граничными условиями (12.28), (12.30) приводит к уравнениям

$$\left.\frac{dn}{dz}\right|_{z=0} = -\left\{2\Phi^2\gamma\left[1 + \gamma \ln\frac{\gamma}{1+\gamma}\right]\right\}^{1/2},$$

$$j = AD\frac{S_i}{l}\Phi\left\{2\gamma\left[1 + \gamma \ln\frac{\gamma}{1+\gamma}\right]\right\}^{1/2}$$

или

$$j = A\sqrt{2DV'_m}\left(S_i + K'_M \ln\frac{K'_M}{K'_M + S_i}\right).$$

Важно подчеркнуть, что для полубесконечного случая наблюдаемый поток продукта не зависит от толщины мембраны. Это может служить экспериментальным подтверждением справедливости полубесконечного приближения. Фактор эффективности для полубесконечного приближения выражается следующим образом:

$$\tilde{\eta} = \frac{\sqrt{2}(1+\gamma)}{\Phi}\left[\gamma^{-1} - \ln\left(1+\gamma^{-1}\right)\right]^{1/2}. \qquad (12.36)$$

Знак тильда указывает, что решение получено с использованием полубесконечного приближения (граничного условия (12.30)).

Полубесконечное приближение реализуется для систем с ферментами, иммобилизованными в мембране довольно большой толщины. В этом случае при проведении процесса фактически в строго диффузионном режиме уравнение может быть использовано для определения кинетических параметров иммобилизованного фермента.

На рис. 12.11 приведена диаграмма, на которой показана область (заштрихована), в которой расхождение между полубесконечным решением и результатами точного численного расчета с использованием граничных условий (12.28), (12.29) не превышает 1 %.

Следует указать на асимптотическое поведение фактора эффективности η. Можно найти его предельные значения при больших и малых значениях поверхностной концентрации субстрата γ^{-1}. В случае если $\gamma^{-1} < 1$, получим $\tilde{\eta} = [1 + 2/(3\gamma)]/\Phi$. В пределе же (при $\gamma^{-1} \to 0$) получается асимптотическое выражение для фактора эффективности для реакций первого порядка (с константой скорости первого порядка V'_m/K'_M): $\lim\limits_{\gamma^{-1}\to 0} \tilde{\eta} = 1/\Phi$.

Для случая $\gamma^{-1} \gg 1$ получается приближенное выражение для фактора эффективности, соответствующее реакции нулевого порядка: $\tilde{\eta} \approx \sqrt{2\gamma}/\Phi$.

Эти выражения являются весьма приближенными, поэтому при необходимости пользоваться полубесконечным решением рекомендуется проводить расчеты по уравнению (12.36).

Форма кривых в координатах Лайнуивера — Берка полностью определяется значениями диффузионного модуля и безразмерной константы Михаэлиса. При относительно низких концентрациях субстрата (больших значениях γ) кривая в координатах Лайнуивера — Берка асимптотически стремится к прямой линии, наклон которой, однако, намного круче,

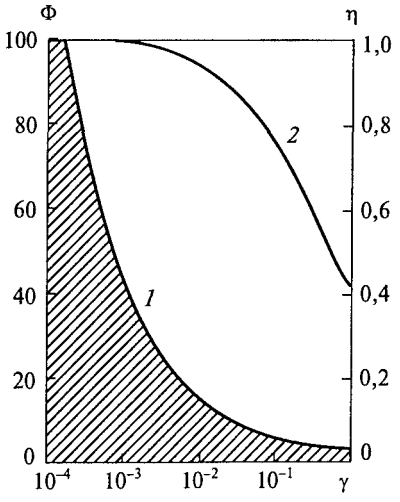


Рис. 12.11. Зависимость диффузионного модуля Тиле Ф (*1*) и фактора эффективности η (*2*) от безразмерной константы γ Михаэлиса

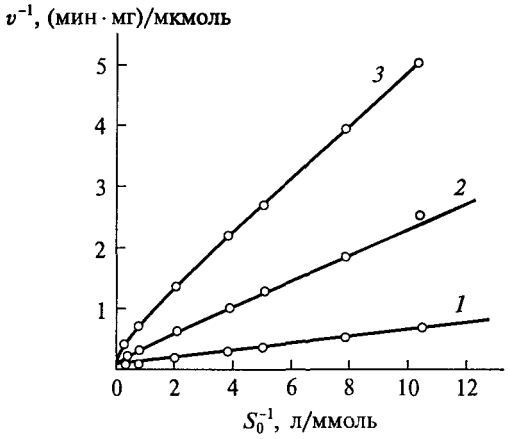


Рис. 12.12. Кинетические кривые в координатах Лайнуивера — Берка для реакции с участием иммобилизованной β-галактозидазы для слоя геля толщиной 120 (*1*), 420 (*2*), 1030 (*3*) мкм при $D = (3{,}7 \pm 0{,}3) \cdot 10^{-6}$ см^2/с; $P = 0{,}89 \pm 0{,}01$

чем был бы в отсутствие диффузионных торможений. С увеличением концентрации субстрата кривая изгибается, становится вогнутой к оси абсцисс, причем такой характер кривой будет проявляться тем в большем интервале, чем больше модуль Тиле Ф.

На рис. 12.12, 12.13 представлены кинетические кривые, полученные при изучении катализа иммобилизованной β-галакто-

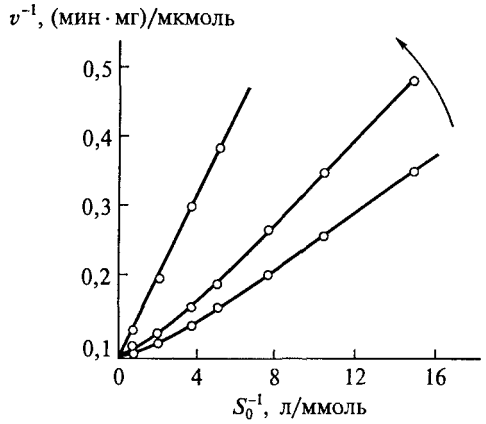


Рис. 12.13. Кинетические кривые в координатах Лайнуивера — Берка для реакции с участием иммобилизованной β-галактозидазы для слоя геля толщиной 110 мкм при концентрации фермента 0,50 (*1*), 0,17 (*2*), 0,10 (*3*) мг/мл; $D = (3{,}7 \pm 0{,}3) \cdot 10^{-6}$ см^2/с; $P = 0{,}89 \pm 0{,}01$ (стрелка показывает направление увеличения Ф)

видазой. Из рис. 12.12 видно, что с увеличением толщины мембраны (с ростом модуля Тиле) кривизна линии заметно увеличивается. При высоких концентрациях субстрата кривые в координатах Лайнуивера — Берка меняют свой характер: после точки перегиба кривые становятся выпуклыми к оси абсцисс (см. рис. 12.13); фактор эффективности в этой области стремится к единице, и кривая асимптотически приближается к прямой, которая соответствует кинетической области работы иммобилизованного фермента. Интервал концентраций, в котором находится выпуклый участок кривой Лайнуивера — Берка, тем уже, чем больше модуль Ф.

Исследование безразмерных комплексов значительно упрощает анализ кинетических данных; они зачастую служат хорошей характеристикой области протекания процесса.

В 1939 г. Е. Тиле и Я. Зельдович независимо друг от друга опубликовали первые работы, в которых фактор эффективности представлялся как функция безразмерного модуля, который объединял такие важные параметры системы, как константа скорости, коэффициент диффузии, размер частиц катализатора.

Модуль Тиле в первоначальном виде был предложен для реакций первого порядка. Для реакций любого порядка модуль Тиле можно рассчитать по формуле

$$\Phi' = l\sqrt{\frac{kS_l^{r-1}}{D}}, \qquad (12.37)$$

где r — порядок реакции; k — константа скорости реакции; l — геометрическая характеристика частицы катализатора.

Модуль Тиле — необходимая характеристика системы. Наряду с безразмерной константой Михаэлиса модуль Тиле позволяет определить, в каком режиме — кинетическом или диффузионном — протекает данная реакция. Чем выше модуль Тиле, тем сильнее влияние на скорость реакции диффузионного массопереноса. Фактор эффективности каталитической системы при использовании любого из рассматриваемых приближений обратно пропорционален модулю Тиле (см. выше). Модуль Тиле позволяет оценить фактор эффективности системы (рис. 12.14).

Основным недостатком модулей Ф′ и Ф является то, что формулы для их расчета содержат истинные константы скорости V'_m/K'_M, значения которых, как правило, неизвестны. Поэтому на практике для анализа экспериментальных данных пользуются безразмерными параметрами, в которые не входят кинетические константы. Общий вид диффузионного модуля при этом сохраняется аналогичным модулю Тиле:

$$\varphi = l\sqrt{\frac{v}{DS_l}}. \qquad (12.38)$$

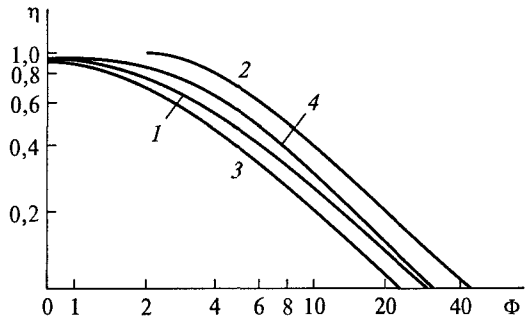


Рис. 12.14. Зависимость фактора эффективности реакции с участием фермента, гомогенно распределенного в матрице, от модуля Тиле:
1 — $r = 1$ (сфера); *2* — $r = 0$ (сфера); *3* — $r = 2$ (сфера); *4* — $r = 1$ (плоская мембрана)

Все величины, входящие в формулу (12.38), могут быть получены из эксперимента. Между модулями Ф и φ в зависимости от кинетики реакции имеется определенная взаимосвязь, анализируя которую можно определять необходимые параметры (фактор эффективности работы катализатора, кинетические константы иммобилизованного фермента).

Понятие фактора эффективности очень полезно для описания влияния внутренней диффузии. На практике часто возникает необходимость определения эффективности работы частицы катализатора при неизвестных кинетических параметрах фермента. Простейший метод определения фактора эффективности — измерение скорости реакции на частицах разных размеров. Признаком того, что фактор эффективности стремится к единице, является независимость скорости реакции, отнесенной к единице объема катализатора, от размера частиц. Этот метод надежен, но не применим в случаях, когда невозможно сильно уменьшить размеры частиц и достичь фактора эффективности, равного единице.

* * *

> Есть два основополагающих педагогических закона: один общий, другой частный. Согласно общему каждый студент, если постарается, достигнет того, чего хочет. Согласно же частному каждый студент в отдельности является исключением из закона общего.
>
> *Шарль О'Тан*

Оптимизация свойств гетерогенного катализатора на основе иммобилизованного фермента предполагает учет процессов массопереноса субстрата в зону действия фермента. Ферментативные

реакции протекают в вязкой среде, в которой процессы диффузии субстратов и продуктов сильно затруднены. В этом случае диффузионные процессы массопереноса могут быть фактором, определяющим реальную скорость процесса. В случае иммобилизованных ферментов можно выделить два основных типа гетерогенных катализаторов: 1) фермент иммобилизован на поверхности твердого тела; 2) фермент включен в водопроницаемый гель или высокопористую частицу.

В первом случае массоперенос субстрата связан с проникновением его диффузионным путем через слой неперемешивающейся жидкости на границе раздела фаз твердое тело — движущаяся жидкость. Это системы с так называемой внешней диффузией.

Во втором случае имеет место распределение фермента по частице катализатора и массоперенос осуществляется по объему частицы катализатора. Это системы с внутренней диффузией.

Как в первом, так и во втором случае применение методов кинетического описания с учетом стадий диффузионного переноса дает удовлетворительное согласие с экспериментальными данными. Следует учитывать, что это математическое описание имеет приближенный характер. Однако в большинстве случаев и не требуется более точного описания с учетом многообразных усложняющих реакцию процессов.

Зачастую главным является вопрос: в какой области — кинетической (в этом случае лимитирующей является ферментативная реакция) или диффузионной (в этом случае лимитирующим является массоперенос) — протекает реакция с участием иммобилизованного фермента. Ответ на этот вопрос может дать оценочный теоретический расчет или проведение дополнительного эксперимента. Как для внешнедиффузионного процесса, так и для процесса с внутренней диффузией может быть проведена оценка соответствующего диффузионного модуля (θ — для внешней диффузии, Φ — для внутренней). Если значение модуля много меньше единицы, лимитирующей стадией является ферментативная реакция, если существенно больше единицы — диффузионный массоперенос. Простым экспериментальным критерием может служить зависимость наблюдаемой скорости реакции от концентрации фермента. В любой системе линейный участок зависимости характерен для ферментлимитируемой области. Увеличение концентрации фермента может перевести систему в режим, при котором рост концентрации фермента не вызывает увеличения скорости реакции. Это область концентраций фермента, в которой скорость реакции контролируется диффузионным массопереносом. В этих условиях не имеет смысла увеличивать концентрацию фермента и для ускорения реакции следует применять методы, оказывающие влияние на диффузионный массоперенос.

Глава 13

РЕАКТОРЫ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ ФЕРМЕНТАМИ

Самые удачные опыты окажутся бесполезными, если экспериментатору не удастся надлежащим образом обработать полученные данные.

Э. Гуггенгейм

13.1. Особенности кинетики ферментативных реакций в открытых системах

Экспериментальное изучение и практическое использование иммобилизованных ферментов связано с применением различного рода опытных и промышленных реакторов. Оптимизация реакторов и их описание для определения кинетических параметров ферментов составляют основу современных знаний по кинетике действия ферментов в открытых системах.

Реакции иммобилизованных ферментов проводят, как правило, в водных растворах с теплоемкостью. Обычно реакции с участием ферментов не сопровождаются значительными тепловыми эффектами. Поэтому при анализе кинетических закономерностей в ферментативных реакторах используются, как правило, модели «идеальных» реакторов. В моделях «идеальных» реакторов не учитываются осложняющие факторы, такие как, например, тепловыделение, градиенты концентрации на поверхности частиц катализатора и др.

Для исследования кинетики действия ферментов в открытых системах обычно применяются следующие модели реакторов.

1. Проточный безградиентный реактор (проточный реактор идеального перемешивания) представляет собой замкнутый объем, содержащий фермент, куда с постоянной скоростью подается раствор субстрата и откуда отводится раствор продукта и непрореагировавшего субстрата. Существенная особенность реактора — идеальное перемешивание компонентов реакции, обеспечивающее отсутствие градиентов концентраций веществ внутри реакционного объема. Для этой цели реакторы с иммобилизованными ферментами обычно снабжаются механической мешалкой, осуществляющей перемешивание фермента и субстрата по всему объему реактора.

2. Проточный реактор идеального вытеснения — объем, равномерно заполненный ферментом, в который с постоянной скоростью подается раствор субстрата. При этом в стационарном состоянии устанавливается постоянный градиент концентрации субстрата и продукта реакции, который определяется скоростью подачи раствора субстрата.

3. Мембранный реактор — замкнутый объем с ферментом, массоперенос субстрата в который осуществляется путем диффузии через полупроницаемую мембрану постоянной толщины.

Для проведения реакции с иммобилизованными ферментами используют также реакторы других типов, например трубчатые реакторы, в которых ферменты иммобилизованы на внутренней поверхности полого капилляра.

Рассмотрим некоторый элементарный объем, в котором протекает катализируемая ферментом химическая реакция. Если субстрат ферментативного превращения помимо химической реакции способен по какому-либо закону обмениваться веществом с окружающей средой, скорость изменения его концентрации описывается дифференциальным уравнением

$$\frac{dS}{dt} = -\left(\frac{dS}{dt}\right)_E - \left(\frac{dS}{dt}\right)_{\text{обм}}, \qquad (13.1)$$

где $(dS/dt)_E$ — скорость ферментативной реакции; $(dS/dt)_{\text{обм}}$ — скорость обмена веществом. Это уравнение является следствием уравнения материального баланса. Как скорость ферментативной реакции, так и скорость обмена веществом являются функциями концентрации субстрата в данном элементарном объеме.

Участие в механизмах ферментативных реакций промежуточных соединений для большинства ферментов в растворе приводит к следующей зависимости стационарной скорости реакции от концентрации субстрата (уравнение Михаэлиса):

$$\left(\frac{dS}{dt}\right)_E = v_E = k_{\text{кат}} \frac{E_0 S}{K_M + S}. \qquad (13.2)$$

Параметры $k_{\text{кат}}$ и K_M имеют эффективный характер, поскольку включают константы скоростей элементарных химических актов многостадийного ферментативного процесса (см. гл. 4). Для ферментов в гетерогенных системах, если процесс протекает в кинетическом режиме, зависимость скорости реакции от концентрации субстрата будет иметь тот же вид. Однако в гетерогенных системах расчет параметров $k'_{\text{кат}}$ и K'_M в большинстве случаев осложнен кинетическими или равновесными эффектами влияния матрицы на микроокружение активных центров ферментов, например эффектами, обусловленными распределением субстрата между раствором и матрицей или изменением pH.

Как показано выше, при влиянии на кинетику процесса диффузионного массопереноса субстрата зависимость скорости реакции от концентрации субстрата в растворе имеет более сложный характер. В предельных случаях, когда фермент работает в строго диффузионном режиме, скорость реакции для систем с внешнедиффузионным переносом равна

$$v = \beta S_l, \tag{13.3}$$

где β — коэффициент массопереноса; для систем с внутридиффузионным массопереносом в полубесконечном приближении

$$v = \frac{A\sqrt{2DE}}{V}\left(S_0 + K'_M \ln\frac{K'_M}{K'_M + S_0}\right), \tag{13.4}$$

где A — площадь поверхности частицы; V — объем.

В строго диффузионном режиме зависимость (13.4) может быть аппроксимирована линейной функцией

$$v = A\sqrt{2DE}\,\frac{S_0}{V}. \tag{13.5}$$

Таким образом, в строго диффузионном режиме для анализа кинетики реакций можно использовать уравнения (13.3)—(13.5). В переходной области зависимости скорости реакции от концентрации субстрата имеют более сложный характер, и для анализа кинетики реакций в общем случае необходимо использовать ЭВМ.

В данной главе кинетика ферментативных реакций в открытых системах анализируется для наиболее важного случая, когда ферментативная реакция протекает в кинетическом режиме. При этом в качестве уравнения скорости (если отсутствуют осложняющие кинетику эффекты влияния субстрата или продукта) использовано уравнение (13.2), где значения $k'_{кат}$ и K'_M — кинетические параметры ферментативной реакции в гетерогенной системе.

Скорость обмена субстрата с окружающей средой, входящая в уравнение (13.1), в общем случае может быть произвольной функцией концентрации субстрата. Рассмотрим системы, в которые субстрат вводится с постоянной объемной скоростью:

$$U = \frac{dV}{dt}. \tag{13.6}$$

При этом наиболее важными являются два частных случая.

1. Введение субстрата происходит за счет вытеснения эквивалентного элементарного объема из реакционной зоны, при этом условии получим

$$\left(\frac{dS}{dt}\right)_{обм} = \frac{UdS}{dV}. \tag{13.7}$$

Дифференциальное уравнение, описывающее кинетику процесса в соответствии с (13.6), (13.2), (13.7), принимает вид

$$\frac{dS}{dt} = \frac{V'_m S}{K'_M + S} + \frac{UdS}{dV}. \qquad (13.8)$$

Это уравнение проточного реактора идеального вытеснения.

2. Если концентрация субстрата S_0 по всему объему V постоянна и введение субстрата в реакционную зону осуществляется с постоянной объемной скоростью U, скорость обмена субстрата с окружающей средой описывается уравнением

$$\left(\frac{dS}{dt}\right)_{\text{обм}} = \frac{U}{V}(S_0 - S). \qquad (13.9)$$

При этом условии отсутствуют градиенты концентрации субстрата внутри объема V. Это может быть достигнуто либо путем эффективного конвективного перемешивания, либо (в случае микрореакторов) путем эффективного диффузионного перемешивания (так называемый случай бесконечных коэффициентов диффузии). В соответствии с (13.1) и (13.9) дифференциальное уравнение проточного реактора идеального перемешивания имеет вид

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{V'_m S}{K'_M + S} + \frac{U}{V}(S_0 - S). \qquad (13.10)$$

Аналогичное уравнение описывает микрореакторы с диффузионным переносом через полупроницаемую мембрану

$$\frac{dS}{dt} = \frac{V'_m S}{K'_M + S} + \frac{DA}{lV}(S_0 - S), \qquad (13.11)$$

где A — площадь поверхности мембраны; V — объем мембранного реактора; D — коэффициент диффузии субстрата в мембране; l — толщина мембраны.

13.2. Проточный реактор идеального вытеснения

Стационарная кинетика. Реакторы с вытеснением колонного типа широко используются при проведении и исследовании реакций с иммобилизованными ферментами. В этих условиях было изучено поведение амилазы, пепсина, рибонуклеазы и карбоксипептидазы, лактатдегидрогеназы, β-галактозидазы, α-аминооксидазы, глюкоамилазы, фицина, аминоацилазы, амилглюкозидазы и многих других ферментов.

Для анализа изменения во времени концентрации субстрата в реакторе идеального вытеснения необходимо решить дифферен-

циальное уравнение (13.8) с соответствующими начальными и граничными условиями.

Рассмотрим стационарный случай, соответствующий условиям, в которых концентрация субстрата в данном элементарном объеме не изменяется во времени ($dS/dt = 0$). При этом справедливо равенство

$$U\frac{dS}{dV} = -\frac{V'_m S}{K'_M + S}. \qquad (13.12)$$

В процессе работы реактора устанавливается постоянный градиент концентрации субстрата по объему реактора. В качестве иллюстрации рассмотрим систему, представляющую собой объем постоянного сечения A длиной l. Примером может служить колонка постоянного диаметра, равномерно заполненная носителем с иммобилизованным ферментом. В этом случае уравнение (13.12) может быть представлено в виде

$$C\frac{dS}{dx} = -\frac{V'_m S}{K'_M + S}, \qquad (13.13)$$

где $C = U/A$ — линейная скорость раствора субстрата в колонке; x — координата по длине колонки. Уравнение (13.13) может быть проинтегрировано и найдено распределение стационарной концентрации по длине колонки (профиль концентрации). Поскольку при интегрировании зависимость $S(x)$ будет задана в неявном виде, рассмотрим два частных случая:

1) пусть $S \gg K'_M$, в этом случае концентрация субстрата линейно уменьшается по длине колонки по закону

$$S = S_0 - \frac{V'_m x}{C}; \qquad (13.14)$$

2) пусть $S \ll K'_M$, в этом случае стационарная концентрация субстрата уменьшается по длине колонки по экспоненциальному закону

$$S = S_0 \exp\left(-\frac{V'_m}{K'_M C} x\right). \qquad (13.15)$$

В общем случае профиль концентрации субстрата складывается из линейного, переходного и экспоненциального участков. На рис. 13.1 приведены расчетные данные по исследованию реакции гидролиза *п*-нитроанилида N-глутарил-α-фенилаланина в колонке с иммобилизованным α-химотрипсином при различных линейных скоростях раствора в колонке.

Если стационарное состояние с постоянным во времени градиентом S устанавливается во всем объеме реактора, уравнение (13.12) с разделяющимися переменными может быть проинтегрировано по всему объему:

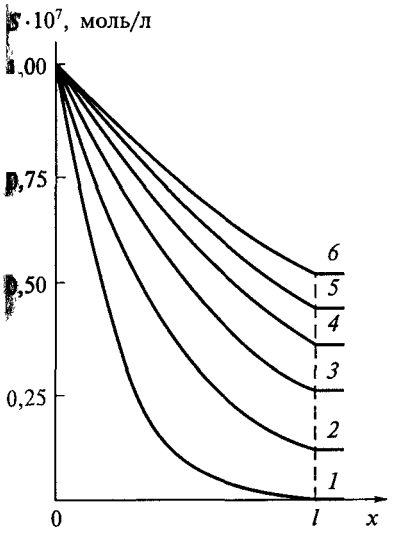


Рис. 13.1. Профили концентрации субстрата по длине колонки идеального вытеснения при скорости раствора субстрата 100 (*1*), 200 (*2*), 300 (*3*), 400 (*4*), 500 (*5*), 600 (*6*) см³/ч

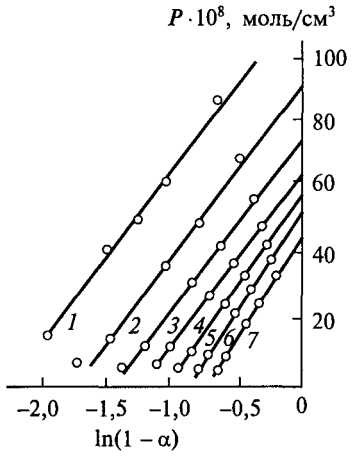


Рис. 13.2. Зависимость выхода продукта P в колонном реакторе от параметра $\ln(1-\alpha)$ в реакции гидролиза *п*-нитроанилида N-глутарил-L-фенилаланина при скорости раствора субстрата 50 (*1*), 70 (*2*), 90 (*3*), 110 (*4*), 130 (*5*), 150 (*6*), 180 (*7*) см³/ч

$$-\int_{S_0}^{S}\frac{K'_M+S}{V'_m S}dS=\frac{1}{U}\int_0^V dV. \qquad (13.16)$$

Решение этого уравнения имеет вид

$$S_0-S-K'_M\ln\frac{S}{S_0}=\frac{V'_m}{V}. \qquad (13.17)$$

При анализе кинетики действия ферментов в открытых системах удобно ввести новую переменную

$$\alpha=\frac{S_0-S}{S_0}, \qquad (13.18)$$

которая представляет собой степень конверсии субстрата. С учетом (13.18) уравнение (13.17) приобретает вид

$$\alpha\frac{S_0}{K'_M}-\ln(1-\alpha)=\frac{V'_m V}{K'_M U}. \qquad (13.19)$$

В соответствии с уравнением (13.19) должна наблюдаться линейная зависимость между α и $\ln(1-\alpha)$. При этом тангенс угла

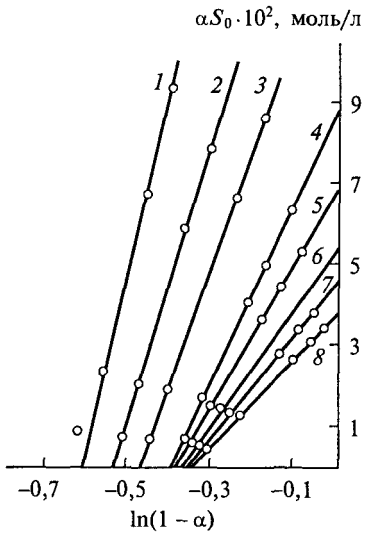


Рис. 13.3. Кинетика реакции гидролиза этилового эфира N-бензоил-L-аргинина под действием иммобилизованного фицина в колонном реакторе при скорости раствора субстрата 20 (*1*), 30 (*2*), 40 (*3*), 60 (*4*), 80 (*5*), 100 (*6*), 120 (*7*), 140 (*8*) см^3/ч

наклона графика этой зависимости дает значение K'_M/S_0; отрезок, отсекаемый на оси ординат, — $V'_m V S_0 U$. Из этих данных можно определить значения V'_m и K'_M. В большинстве случаев такого рода зависимости действительно имеют место.

На рис. 13.2 приведены экспериментальные данные для реакции гидролиза *п*-нитроанилида N-глутарил-L-фенилаланина под действием α-химотрипсина при различных скоростях ввода субстрата в колонку. В условиях эксперимента определяемые значения V'_m и K'_M сравнительно слабо зависят от линейной скорости потока. В ряде случаев эти зависимости выражены более явно.

На рис. 13.3 представлены результаты экспериментального исследования гидролиза этилового эфира N-бензоил-L-аргинина под действием фицина, иммобилизованного на карбоксиметилцеллюлозе, в колонном реакторе. Наблюдаемая зависимость K'_M от скорости раствора интерпретируется как проявление диффузионного сопротивления, характерного для катализа иммобилизованными ферментами.

Важно уметь рассчитывать степень конверсии α субстрата в реакторе при известных кинетических параметрах K'_M, V'_m и макрокинетических характеристиках — объемной скорости потока U и объеме системы V. Поскольку степень конверсии связана с этими параметрами в виде неявной функции (13.19), это определение может быть сделано лишь численно. При этом полезным представляется ввести безразмерный модуль χ:

$$\chi = \frac{K'_M}{V'_m}\frac{U}{V}, \qquad (13.20)$$

который по физическому смыслу в первом приближении представляет собой отношение времени протекания ферментативной реакции к времени контакта субстрата с ферментом. На рис. 13.4, *а* приведена зависимость степени конверсии от модуля χ при раз-

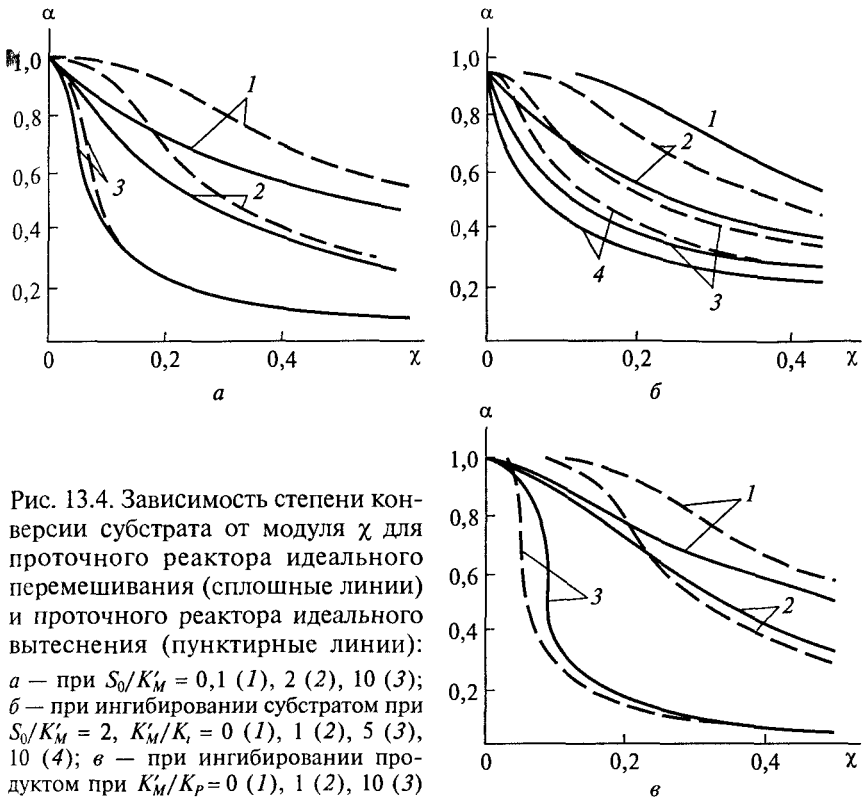


Рис. 13.4. Зависимость степени конверсии субстрата от модуля χ для проточного реактора идеального перемешивания (сплошные линии) и проточного реактора идеального вытеснения (пунктирные линии): *а* — при S_0/K'_M = 0,1 (*1*), 2 (*2*), 10 (*3*); *б* — при ингибировании субстратом при S_0/K'_M = 2, K'_M/K_i = 0 (*1*), 1 (*2*), 5 (*3*), 10 (*4*); *в* — при ингибировании продуктом при K'_M/K_P = 0 (*1*), 1 (*2*), 10 (*3*)

личных отношениях S_0/K'_M. Видно, что при увеличении χ степень конверсии субстрата уменьшается; при больших значениях S_0/K'_M это уменьшение становится заметнее. Для получения высоких степеней конверсии необходимо использовать низкие концентрации субстрата и проводить реакцию при низких значениях модуля χ ($\chi < 0{,}1$).

В ряде случаев кинетика ферментативных реакций осложняется ингибированием реакции избытком субстрата или продукта.

Ингибирование субстратом. Случай ингибирования избытком субстрата описывает кинетическая схема:

$$\begin{gathered} E + S \underset{}{\overset{K_M}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_{кат}} E + P \\ ES + S \overset{K_i}{\rightleftharpoons} ES_2 \end{gathered} \qquad (13.21)$$

Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата в этом случае описывается уравнением

$$-\left(\frac{dS}{dt}\right)_E = \frac{V'_m}{1 + \frac{K'_M}{S} + \frac{S}{K_i}}, \qquad (13.22)$$

где K_i — константа ингибирования субстратом.

Подстановка этого уравнения в уравнение (13.8) и интегрирование при $dS/dt = 0$ приводит к выражению

$$\frac{S_0}{K'_M} - \ln(1-\alpha) + \frac{1}{2}\left(\frac{S_0}{K'_M}\right)^2 \frac{K'_M}{K_i}(2\alpha - \alpha^2) = \frac{V'_m}{K'_M}\frac{V}{U}. \qquad (13.23)$$

Ингибирование продуктом. Кинетическая схема реакции при конкурентном ингибировании продуктом имеет вид

$$\begin{gathered} E + S \overset{K_M}{\rightleftharpoons} ES \xrightarrow{k_{кат}} E + P \\ E + P \overset{K_P}{\rightleftharpoons} EP \end{gathered} \qquad (13.24)$$

В соответствии с этой схемой скорость реакции описывается уравнением

$$\frac{dP}{dt} = \frac{V'_m S}{K'_M\left(1 + \frac{P}{K_P} + S\right)}, \qquad (13.25)$$

где K_P — константа ингибирования продуктом.

Интегрирование уравнения с учетом соотношения (13.25) и уравнения материального баланса приводит к следующему выражению:

$$\alpha\left(1 + \frac{K'_M}{K_P}\right)\frac{S_0}{K'_M} - \left(1 + \frac{S_0}{K'_M}\right)\frac{K'_M}{K_P}\ln(1-\alpha) = \frac{V'_m}{K'_M}\frac{V}{U}. \qquad (13.26)$$

Зависимости степени конверсии субстрата от модуля χ для проточного реактора идеального вытеснения при ингибировании субстратом или продуктом приведены на рис. 13.4, *б*, *в*.

13.3. Проточный реактор идеального перемешивания

Реакторы этого типа широко применяются при проведении реакций с участием иммобилизованных ферментов и в некоторых случаях имеют преимущество перед реакторами колонного типа. Так, эксплуатация колонного реактора требует повышения давления вводимого раствора субстрата. Кроме того, колонные реакторы мало пригодны для проведения реакций с образованием сильных кислот или оснований. Эти реакции могут сопровождаться нежелательными градиентами показателя pH по длине колонны.

Стационарные состояния реактора были исследованы в реакции ферментативного разложения мочевины. Реактор идеального перемешивания использовали для проведения реакций с иммобилизованной аминоглюкозидазой, глюкоамилазой и многими другими ферментами. Широкое распространение получили также реакторы с ультрафильтрованием (мембранные реакторы). Последние можно рассматривать как некоторую модификацию проточного реактора идеального перемешивания, в котором перенос субстрата в реактор осуществляется через полупроницаемую мембрану. Реакторы с ультрафильтрованием были использованы для непрерывного гидролиза сахарозы под действием инвертазы, для гидролиза целлюлозы в глюкозу под действием целлюлазы и др.

Если в реакционный сосуд постоянного объема V с объемной скоростью U подается реагент концентрацией A_0, то изменение числа молей компонента А в реакторе в условиях идеального перемешивания в соответствии с уравнением (13.1) описывается следующим дифференциальным уравнением:

$$\frac{dA}{dt} = \frac{U}{V}(A_0 - A) + v_{\text{обр}} - v_{\text{р}}, \tag{13.27}$$

где $v_{\text{обр}}$ — скорость образования вещества А в реакторе; $v_{\text{р}}$ — скорость расходования вещества А в результате реакции.

Это уравнение — основное дифференциальное уравнение, описывающее изменение концентрации реагирующего вещества в реакторе идеального перемешивания. Оно учитывает не только скорости химических превращений компонента А, но и обмен веществом с окружающей средой. Вид выражений для $v_{\text{обр}}$ и $v_{\text{р}}$, входящих в уравнение (13.27), определяется механизмом реакций в соответствии с законами химической кинетики. По механизму Михаэлиса уравнения, описывающие изменения концентраций субстрата и продукта в реакторе, имеют следующий вид:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{U}{V}(S_0 - S) - \frac{V'_m S}{K'_M + S}, \tag{13.28}$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{V'_m S}{K'_M + S} - \frac{U}{V}P. \tag{13.29}$$

Дифференциальное уравнение (13.28) можно решить численно или аналитически относительно функции $S(t)$. Подстановка этой функции в уравнение (13.29) и интегрирование полученного дифференциального уравнения позволяют найти зависимость концентрации продукта от времени.

При анализе кинетических закономерностей в реакторах идеального перемешивания необходимо достаточно точно знать удельную объемную скорость введения реагентов (параметр U/V). Эту величину можно вычислить из объемной скорости введения

реагентов и объема реактора. Однако в ряде случаев целесообразно определить значение U/V из независимого кинетического эксперимента. Наиболее просто это можно сделать, если в начальный момент времени ввести в реактор какое-либо вещество, которое в условиях опыта не подвергается химическому превращению. Кинетика расходования этого вещества в реакторе будет описываться уравнением

$$\frac{dA}{dt} = -\frac{U}{V}A, \tag{13.30}$$

интегрирование которого приводит к соотношению

$$A = A_0 \exp\left(-\frac{U}{V}t\right). \tag{13.31}$$

Представление уравнения (13.31) в полулогарифмических координатах позволяет определить удельную скорость подачи исходных веществ в систему.

Стационарная кинетика. При непрерывном введении в реактор субстрата через некоторое время в реакторе устанавливается стационарная концентрация всех компонентов реакции. При $t \to \infty$ при насыщающей концентрации субстрата концентрации продукта и субстрата стремятся к стационарным значениям:

$$S_{ст} = S_0, \tag{13.32}$$

$$P_{ст} = \frac{V'_m}{U/V}. \tag{13.33}$$

В другом частном случае (при низких концентрациях субстрата) стационарные концентрации субстрата и продукта равны

$$S_{ст} = S_0\left[1 + \frac{V'_m/K'_M}{U/V}\right]^{-1}, \tag{13.34}$$

$$P_{ст} = S_0\left[1 + \frac{U/V}{V'_m/K'_M}\right]^{-1}. \tag{13.35}$$

Условие стационарности ($dS/dt = 0$) позволяет свести исходное дифференциальное уравнение к алгебраическому выражению

$$\frac{U}{V}(S_0 - S_{ст}) = \frac{V'_m S_{ст}}{K'_M + S_{ст}}. \tag{13.36}$$

В результате решения уравнения (13.36) относительно $S_{ст}$ имеем

$$S_{ст} = \frac{S_0 - K'_M - \dfrac{V'_m}{U/V}}{2} + \sqrt{\frac{\left(S_0 - K'_M - \dfrac{V'_m}{U/V}\right)^2}{4} + S_0 K'_M}. \tag{13.37}$$

Анализ уравнения (13.37) для таких частных случаев, как насыщающие ($S_0 \gg K'_M + V'_m/(U/V)$) и низкие ($S_0 \ll K'_M$) концентрации субстрата приводит к уравнениям (13.32) и (13.34) соответственно.

При промежуточных значениях S_0, когда начальная концентрация субстрата соизмерима с K'_M, стационарная концентрация субстрата в реакторе является сложной функцией кинетических параметров ферментативной реакции, а также удельной объемной скорости потока U/V (уравнение (13.37)). Тем не менее искомые величины V'_m и K'_M могут быть определены при исследовании зависимости стационарной концентрации субстрата в реакторе как от скорости введения реагента, так и от начальной концентрации субстрата (рис. 13.5):

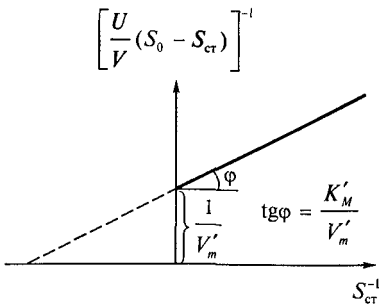


Рис. 13.5. Определение параметров V'_m и K'_M на основании данных по стационарному состоянию проточного реактора идеального перемешивания (по уравнению (13.38))

$$\left[\frac{U}{V}(S_0 - S_{ст})\right]^{-1} = \frac{1}{V'_m} + \frac{K'_M}{V'_m}\frac{1}{S_{ст}}. \qquad (13.38)$$

Выражение для стационарной концентрации продукта вытекает из уравнения (13.29), если учесть, что $S_{ст} = S_0 - P_{ст}$, и предположить, что $dP/dt = 0$:

$$\left[\frac{U}{V}P_{ст}\right]^{-1} = \frac{1}{V'_m} + \frac{K'_M/V'_m}{S_0 - P_{ст}}. \qquad (13.39)$$

Как видно из (13.39), искомые значения V'_m и K'_M могут быть найдены путем исследования зависимости стационарной концентрации продукта от U/V и S_0.

В условиях стационарности степень конверсии субстрата не зависит от времени. Уравнение (13.36) можно представить в виде

$$\alpha\frac{S_0}{K'_M} + \frac{\alpha}{1+\alpha} = \frac{V'_m}{K'_M}\frac{U}{V} = \frac{1}{\chi}. \qquad (13.40)$$

На рис. 13.4, *а* в соответствии с уравнением (13.39) приведена зависимость степени конверсии α от модуля χ при заданных значениях соотношения S_0/K'_M. Модуль χ имеет то же значение, что и для реактора идеального вытеснения (уравнение (13.20)). Видно, что степень конверсии субстрата существенно уменьшается с увеличением скорости подачи раствора при данном значении S_0/K'_M, а также с увеличением отношения S_0/K'_M при заданной скорости раствора субстрата.

Ингибирование субстратом. Для случая ингибирования субстратом (схема (13.21)) стационарное состояние реактора описывается уравнением

$$\alpha\frac{S_0}{K'_M}+\frac{\alpha}{1-\alpha}+\left(\frac{S_0}{K'_M}\right)^2\frac{K_i}{K'_M}(\alpha-\alpha^2)=\frac{V'_m}{K'_M}\frac{U}{V}. \qquad (13.41)$$

На рис. 13.4, *б* показана зависимость степени конверсии от скорости раствора при разных соотношениях константы ингибирования и константы Михаэлиса. Видно, что степень конверсии субстрата быстро уменьшается с увеличением отношения K'_M/K_i.

Показано (см. ниже), что при ингибировании субстратом в проточном реакторе идеального перемешивания возможно более чем одно стационарное состояние (т. е. более чем один набор параметров, при которых $dS/dt = 0$). Неустойчивые стационарные состояния относятся преимущественно к низким значениям отношения K'_M/S_0 и наблюдаются в области $\alpha = 50-100\,\%$.

Ингибирование продуктом. Стационарное состояние реактора при ингибировании продуктом описывает уравнение

$$\alpha\frac{S_0}{K'_M}+\frac{\alpha}{1-\alpha}+\frac{S_0}{K'_M}\frac{K'_M}{K_P}\frac{\alpha^2}{1-\alpha}=\frac{V'_m}{K'_M}\frac{V}{U}. \qquad (13.42)$$

Вычисленная в соответствии с этим уравнением зависимость степени конверсии от скорости раствора показана на рис. 13.4, *в*. Как и при ингибировании субстратом, наблюдается существенное уменьшение степени конверсии субстрата с увеличением скорости раствора и отношения K'_M/K_P.

13.4. Сравнение эффективности проточных реакторов

Уравнения, описывающие кинетику ферментативных реакций в двух «идеальных» реакторах (проточном реакторе идеального смешения и проточном реакторе идеального вытеснения), приведены в табл. 13.1. Для сравнения здесь также даны уравнения, описывающие кинетику реакций в периодическом непроточном реакторе идеального перемешивания. Интересно отметить, что уравнения для проточного реактора идеального вытеснения аналогичны уравнениям для периодического реактора, в которых переменная t заменена на параметр V/U (эффективное время контакта). Как следует из данных, представленных в табл. 13.1, кинетика реакций в проточных реакторах определяется модулем χ (правые части всех кинетических уравнений равны $1/\chi$).

На рис. 13.4 сравнивается зависимость степени конверсии субстрата от скорости раствора субстрата в отсутствие ингибирования (*а*), при ингибировании субстратом (*б*) и продуктом (*в*) для двух

Таблица 13.1

Кинетические уравнения ферментативных реакций в реакторах различного типа

Реактор	Уравнение	Решение	Ингибирование субстратом	Ингибирование продуктом
Периодический	$-\frac{dS}{dt} = \frac{V'_m S}{K'_M + S}$	$\alpha\frac{S_0}{K'_M} - \ln(1-\alpha) = \frac{V'_m}{K'_M} t$	$\alpha\frac{S_0}{K'_M} - \ln(1-\alpha) + \frac{1}{2}\left(\frac{S_0}{K'_M}\right)^2 \frac{K_i}{K'_M}(2\alpha - \alpha^2) = \frac{V'_m}{K'_M} t$	$\alpha\left(1 - \frac{K'_M}{K_P}\right)\frac{S_0}{K'_M} - \left(1 + \frac{S_0}{K'_M}\right)\frac{K'_M}{K_P}\ln(1-\alpha) = \frac{V'_m}{K'_M} t$
Проточный идеального перемешивания	$\frac{dS}{dt} = -\frac{V'_m S}{K'_M + S} + \frac{U}{V}(S_0 - S)$	$\alpha\frac{S_0}{K'_M} + \frac{\alpha}{1+\alpha} = \frac{V'_m}{K'_M}\frac{V}{U}$	$\alpha\frac{S_0}{K'_M} + \frac{\alpha}{1-\alpha} + \left(\frac{S_0}{K'_M}\right)^2 \times \frac{K_i}{K'_M}(\alpha - \alpha^2) = \frac{V'_m}{K'_M}\frac{V}{U}$	$\alpha\frac{S_0}{K'_M} + \frac{\alpha}{1-\alpha} + \frac{S_0}{K'_M} \times \frac{K'_M}{K_P}\frac{\alpha^2}{1-\alpha} = \frac{V'_m}{K'_M}\frac{V}{U}$
Проточный идеального вытеснения	$\frac{dS(S + K'_M)}{V'_m S} = -\frac{dV}{U}$	$\alpha\frac{S_0}{K'_M} - \ln(1-\alpha) = \frac{V'_m}{K'_M}\frac{V}{U}$	$\alpha\frac{S_0}{K'_M} - \ln(1-\alpha) + \frac{1}{2}\left(\frac{S_0}{K'_M}\right)^2 \frac{K_i}{K'_M}(2\alpha - \alpha^2) = \frac{V'_m}{K'_M}\frac{V}{U}$	$\alpha\left(1 - \frac{K'_M}{K_P}\right)\frac{S_0}{K'_M} - \left(1 + \frac{S_0}{K'_M}\right)\frac{K'_M}{K_P}\ln(1-\alpha) = \frac{V'_m}{K'_M}\frac{V}{U}$

проточных реакторов: идеального перемешивания (сплошные линии) и идеального вытеснения (пунктирные линии). Как следует из рис. 13.4, *а*, для данной скорости раствора степень конверсии субстрата в реакторе вытеснения всегда выше, чем в реакторе перемешивания. Однако чем выше отношение S_0/K'_M, тем меньше различия между двумя типами реакторов. Аналогичная зависимость наблюдается и при ингибировании продуктом (см. рис. 13.4, *в*). При ингибировании реакции субстратом (см. рис. 13.4, *б*) при низких скоростях раствора реактор вытеснения дает бóльшую степень конверсии. В общем случае может быть показано, что при $S_0 < S_{макс}$ ($S_{макс}$ — концентрация субстрата, при которой наблюдается максимальная скорость V'_m реакции) реактор вытеснения всегда приводит к большей степени конверсии. При $S_0 > S_{макс}$ реактор перемешивания может давать степень конверсии больше, чем реактор вытеснения (см. рис. 13.4, *б*).

Таким образом, используя уравнения, приведенные в табл. 13.1, при известных кинетических параметрах V'_m и K'_M и макрокинетических характеристиках U и V можно численным путем рассчитать степень конверсии субстрата. В ряде случаев важна приближенная оценка модуля χ. Как следует из данных, приведенных на рис. 13.4, степень конверсии уменьшается с увеличением χ. Для оценки можно использовать то обстоятельство, что при $\chi < 0{,}05$ степень конверсии для всех типов реакторов близка к единице.

Проведенный выше кинетический анализ действия ферментов в открытых системах основан на ряде предпосылок, главной из которых является предположение о протекании ферментативной реакции в кинетическом режиме. Как известно, для реакций с иммобилизованными ферментами это не всегда имеет место (см. выше). Эффекты массопереноса субстрата в наибольшей степени должны проявляться для реакторов идеального вытеснения, особенно при низких скоростях потока. Так, при исследовании реакции с участием иммобилизованной амилоглюкозидазы было проведено сравнение реакторов различного типа. Оказалось, что в отличие от теоретического предсказания реактор

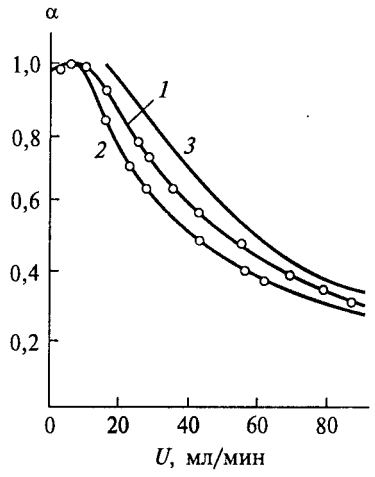


Рис. 13.6. Зависимость степени конверсии мальтозы в глюкозу от скорости раствора субстрата в реакторе идеального перемешивания (*1*) и реакторе идеального вытеснения (*2*, *3*). Линии *1*, *2* — экспериментальные данные; *3* — результаты расчета по уравнению (13.19)

идеального вытеснения характеризуется меньшей эффективностью. На рис. 13.6 приведена экспериментальная зависимость степени конверсии мальтозы в глюкозу от скорости раствора субстрата, полученная для реакторов двух типов. Для сравнения показана кривая *3*, рассчитанная по уравнению (13.19) для реактора идеального вытеснения при использовании независимым способом определенных параметров V'_m и K'_M. Во всем диапазоне исследованных скоростей в реакторе идеального перемешивания обеспечивается бóльшая степень конверсии. Это обстоятельство должно учитываться при работе с конкретными иммобилизованными ферментами.

13.5. Множественность стационарных состояний открытых систем

Открытые системы с ферментами имеют ряд особенностей, связанных со специфическими регуляторными возможностями на макрокинетическом уровне. Интерес к задачам такого характера обусловлен проблемами регулирования в биологических системах. Один из подходов к объяснению ряда регуляторных процессов, характерных для биологических систем, связан с возможностью реализации в системах нескольких дискретных стационарных состояний.

Проиллюстрируем это на примере наиболее полно исследованной в теоретическом плане системы с ферментативной реакцией, ингибируемой избытком субстрата. В соответствии со схемой (13.21) в стационарном состоянии для ряда открытых систем справедливо равенство

$$\beta(S_0 - S_{ст}) = V'_m\left(1 + \frac{K'_M}{S_{ст}} + \frac{S_{ст}}{K_i}\right)^{-1}, \qquad (13.43)$$

где β — параметр U/V для реактора с перемешиванием, или параметр $DA/(Vl)$ для мембранного микрореактора, или параметр D/l для системы с внешнедиффузионным торможением. Уравнение (13.43) кубическое относительно стационарной концентрации субстрата. При решении этого уравнения могут быть получены три корня, соответствующие различным стационарным концентрациям субстрата. Это означает, что при данных значениях кинетических параметров системы V'_m, K'_M, K_i могут иметь место три различных стационарных состояния, характеризующихся разными значениями $S_{ст}$.

Этот нетривиальный эффект, имеющий определенное биологическое значение, подвергся в литературе тщательному обсужде-

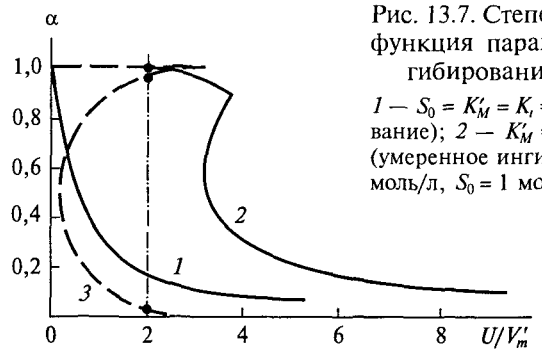


Рис. 13.7. Степень конверсии субстрата как функция параметра U/V'_m реакции с ингибированием избытком субстрата:

1 — $S_0 = K'_M = K_i = 0{,}1$ моль/л (слабое ингибирование); *2* — $K'_M = K_i = 0{,}1$ моль/л, $S_0 = 1$ моль/л (умеренное ингибирование); *3* — $K'_M = K_i = 0{,}01$ моль/л, $S_0 = 1$ моль/л (сильное ингибирование)

нию. Возможность образования множественных стационарных состояний в ферментативных системах в реакторе идеального перемешивания проиллюстрируем на следующем примере.

На рис. 13.7 приведена зависимость степени конверсии субстрата от параметра U/V'_m при различных значениях K_i, K'_M. Для системы $K_i = 0{,}1$ моль/л (линии *1*, *2*) возможно лишь одно стационарное состояние. В случае $K_i = 0{,}01$ моль/л (линия *3*) при $U/V'_m = 2$, например, могут быть реализованы три стационарных состояния, характеризующихся различными значениями степени конверсии. Анализ устойчивости стационарных состояний показал, что устойчивы два крайних состояния, а среднее состояние неустойчиво.

Наиболее интересными представляются регуляторные особенности такой системы. Система способна при незначительном изменении параметра U/V'_m (изменение скорости ввода субстрата или активности фермента) существенно изменить стационарную концентрацию субстрата. Так, для кривой *3* на рис. 13.7 при $U/V'_m = 3{,}0$ система функционирует со степенью конверсии 0,99, при этом изменение скорости ввода субстрата (например, за счет диффузии) на 15 % вызывает уменьшение степени конверсии до 0,01. Очевидно, что это один из возможных механизмов регулирования метаболизма по принципу «все или ничего», «открыт — закрыт». В то же время в этой системе могут реализоваться условия, в которых система способна поддерживать практически постоянную концентрацию субстрата при изменении скорости ввода субстрата или активности фермента в широком диапазоне. Так, в условиях, соответствующих кривой *2*, реактор обеспечивает степень конверсии 0,9 — 1,0 при вариации параметра U/V'_m в диапазоне от 0 до 3,7.

Множественность стационарных состояний системы объясняет ряд гистерезисных явлений, наблюдаемых при катализе реакций иммобилизованными ферментами в системах, открытых в диффузионном отношении. Достижение того или иного стационарного состояния определяется направлением перехода системы (уменьшением параметра или его увеличением). Рисунок 13.8 иллюстри-

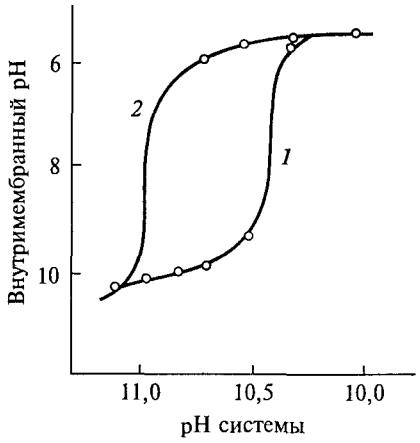


Рис. 13.8. Изменение внутримембранного показателя pH в зависимости от pH системы в ходе реакции гидролиза этилового эфира N-бензоиларгинина, катализируемой папаином, иммобилизованным в мембране на pH-чувствительном электроде:

1 — увеличение pH системы; *2* — уменьшение pH системы

рует гистерезисный эффект, наблюдаемый в реакции гидролиза этилового эфира бензоиларгинина папаином, иммобилизованным в мембране на поверхности pH-чувствительного стеклянного электрода. Стационарное значение pH на поверхности электрода зависит от направления изменения внешнего pH (*1* — увеличение, *2* — уменьшение). Таким образом в указанного рода системах реализуется элементарная ячейка «памяти».

* * *

Пока математический закон отражает реальную действительность, он не точен; как только математический закон точен, он не отражает реальную действительность.

А. Эйнштейн

Создание реакторов с иммобилизованными ферментами — необходимый шаг к технологизации биокаталитического процесса. Экономические преимущества, обеспечиваемые реакторами различных типов, основаны на возможности многократного использования фермента и существенного упрощения стадии выделения продукта, поскольку отделение продукта от фермента происходит за счет удерживания фермента в реакторе. Главной экономической характеристикой реактора является его производительность на единицу объема в единицу времени.

Химическая энзимология обеспечена разнообразными реакторами различных типов. Наибольшее применение находят безградиентные реакторы периодического типа, проточные колонные реакторы вытеснения, проточные безградиентные реакторы, мембранные реакторы, полые волокна с иммобилизованными на стенках ферментами.

Количественно наиболее простыми соотношениями описываются проточные реакторы идеального вытеснения и проточные безградиентные реакторы. Теория реакторов позволяет связать такой важный параметр, как степень конверсии субстрата с кинетическими характеристиками фермента и скоростью подачи в реактор субстрата.

При заданных параметрах процесса теоретически реактор идеального вытеснения (колонка) по степени конверсии субстрата имеет преимущества перед реактором идеального перемешивания. Однако на практике это наблюдается не всегда. Наличие эффектов ингибирования продуктом или субстратом, возникновение неконтролируемых градиентов pH могут существенно изменить характеристики процесса. Тем не менее теоретические расчеты являются полезным инструментом для химика, решающего задачу технологизации ферментативного процесса.

Глава 14

ИНЖЕНЕРНАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ

> Корень погибели политически столь сильных классических народов Греции и Рима, без всякого сомнения, должно искать в том презрительном отношении, которое они имели к промышленному труду. При всех недостатках китайского строя он успел уцелеть многие тысячелетия по той причине, что в Китае промышленность занимала всегда почетное положение, привлекала к себе, а не отталкивала.
>
> *Д. И. Менделеев*

14.1. Современные методы конструирования ферментов с необходимыми свойствами

Большое разнообразие реакций, катализируемых ферментами, доступность их как химических объектов, глубокое понимание механизмов действия ферментов и возможности варьирования их свойств, основанные на современных методах химической энзимологии, молекулярной биологии и генетической инженерии, позволяют использовать ферменты для решения многих задач промышленности, сельского хозяйства, экологии, медицины.

Область химической энзимологии, направленная на решение многообразных практических задач, получила название *инженерной энзимологии.*

В рамках химической энзимологии были созданы разнообразные методы, позволяющие существенным образом изменять структуру и свойства белковых молекул. Эти методы основаны как на возможностях химической модификации белка, так и на достижениях молекулярной биологии, генетической и белковой инженерии.

Химическая модификация. Белковая молекула как объект, обладающий большими химическими возможностями, может быть легко химически модифицирована (см. гл. 2). Как следствие, в практике инженерной энзимологии используют разнообразные методы и приемы, позволяющие изменить химическую природу тех или иных групп белка и придать ему новые свойства. Химическую модификацию белка используют для изменения заряда белковой молекулы, что позволяет варьировать электрофоретическую подвижность белка и часто его устойчивость к тепловой денатурации. Химическая модификация бифункциональными химическими системами, например диальдегидами, приводит к образованию внутримолекулярных связей и позволяет изменить картину инактива-

ции фермента. Те же бифункциональные реагенты могут быть использованы для иммобилизации фермента на различные носители и превращения его в гетерогенный катализатор (см. гл. 2, 7). Наконец, химическая модификация позволяет изменить отношение белка к тем или иным растворителям. Например, гидрофобизация позволяет белкам проникать сквозь липидные мембраны. Методами химической модификации можно обеспечить возможность включения белков в мембраны и даже транслокации через мембраны. Так, водорастворимые ферменты трипсин и α-химотрипсин были модифицированы хлорангидридом стеариновой кислоты. Реакция модификации представляет собой ацилирование свободных групп белка. При этом молекула белка существенно гидрофобизуется и приобретает мембранотропные свойства. Экспериментально было показано, что модифицированные таким образом белки способны проникать в мембранные системы и проходить через биологические мембраны. Данный подход обеспечивает возможность доставки белковых (ферментных) лекарственных препаратов в клетки-мишени.

Комбинаторные методы, генетическая и белковая инженерия, методы направленной эволюции. Традиционным методом модификации структуры белка на клеточном уровне является неспецифический мутагенез с последующим отбором мутантов с необходимыми характеристиками для того или иного фермента. В последние годы появились более направленные методы.

Детальное знание структуры ферментов, относительно простые процедуры выделения гена фермента, развитие методов генетической инженерии белков (см. гл. 10) обеспечили возможность существенной модификации ферментов с получением белков с новыми свойствами. Используемые в этой области методы условно можно разделить на две группы:

1) методы, основанные на статистической замене аминокислот с последующим отбором мутантов (комбинаторные методы);

2) рациональные методы, использующие сведения о третичной структуре фермента и позволяющие направленно изменять те или иные фрагменты белковой молекулы.

Использование комбинаторных методов, основанных на создании большого массива возможных вариантов структур, особенно эффективно в случае модификации ферментов на уровне гена. Суть подходов, получивших название направленной эволюции, заключается в проведении случайных замен на уровне генов с последующим отбором мутантных вариантов, отвечающих цели улучшения свойств фермента. Методы проведения случайной замены разнообразны. Они включают «перетасовку» фрагментов ДНК, укорачивание гена по отдельным фрагментам, наращивание цепи со случайными ошибками. Существенное развитие и применение нашли методы генерации библиотеки ДНК с использованием поли-

меразной цепной реакции с применением ДНК-полимераз с пониженной точностью выбора нуклеотидтрифосфатов (см. гл. 10). В этом случае копию гена, подлежащего случайным изменениям, берут в качестве основы, используют случайный набор праймеров и ДНК-полимераз с пониженной точностью. Результатом полимеразной цепной реакции является большой набор родственных молекул ДНК, содержащих значительное число мутаций.

Полученные в результате этих процедур библиотеки ДНК вводят в вектора, например плазмиды, и трансформируют библиотекой плазмид клетки. Последующий скрининг колоний по тому или иному признаку позволяет отобрать клетки, содержащие ферменты с нужным свойством.

В качестве критерия отбора нужного клона могут быть выбраны термостабильность, изменение специфичности, т.е. сродства к данному субстрату, изменение характера зависимости скорости реакции от показателя pH.

Отобранный ген и соответственно белок могут быть подвергнуты повторному раунду мутагенеза и селекции, и тем самым может быть проведено дальнейшее улучшение характеристик фермента. Число ферментов, модифицированных методами направленной эволюции, непрерывно увеличивается. Наиболее известны работы, выполненные в этом направлении группой Ф. Арнольд.

Часто направленную эволюцию применяют для улучшения термостабильности белков. Так, методами молекулярной эволюции с помощью случайного мутагенеза термостабильность бактериальной протеазы — субтилизина была увеличена в 1200 раз. Этими же методами удалось получить фермент, способный проводить реакцию в растворе, содержащем 85 % диметилформамида. В лаборатории Ф. Арнольд методология направленной эволюции была использована для улучшения экспрессии синей медьсодержащей оксидазы, лакказы *Myceliophthora thermophilica* в дрожжах. Свойства этого фермента и механизм катализа обсуждаются в подразд. 8.7. Уровень экспрессии каталитической активности фермента в дрожжах удалось увеличить в 170 раз.

Методами направленной эволюции удается вмешаться в участки активного центра, определяющие специфичность фермента. Одна из первых работ в этой области была выполнена в лаборатории В. Штемлера (1997 г.). Как известно, ферменты, гидролизующие галактозиды, обладают побочной фукозидазной активностью. С использованием метода перетасовки ДНК удалось существенно повлиять на соотношение β-галактозидазой и β-фукозидазной активностей.

Методами статистического мутагенеза и направленной эволюции можно изменять стереоселективность ферментативных реакций. Наиболее часто для разделения рацемических смесей используют протеазы или липазы. В частности, для целей разделения

рацематов жирных кислот был применен статистический мутагенез липазы из *Pseudomonas aeroginosa*. Фермент данного типа осуществляет расщепление *п*-нитрофениловых эфиров 2-метилдеканоата с селективностью лишь 2 % в пользу S-конфигурации. Введением мутаций с использованием ДНК-полимеразы с пониженной точностью в ген фермента удалось за 4 раунда селекции увеличить энантиоселективность фермента до 80 %.

Рациональные подходы основаны на анализе трехмерной структуры белка с выявлением перспективных замен, способных существенным образом повлиять на свойства активного центра фермента или белка в целом. В качестве примера можно привести работы, выполненные В.Тишковым по изменению специфичности формиатдегидрогеназы. Фермент данного штамма катализирует реакцию окисления формиата, используя в качестве кофактора $НАД^+$, и проявляет лишь следовую активность в присутствии $НАД^+$. Выбор замены был определен необходимостью введения групп, компенсирующих заряд фосфата, и создания пространства для фосфатной группы. Проведение всего лишь одной замены позволило существенно уменьшить реакционную способность $НАД^+$ и увеличить реакционную способность $НАДФ^+$.

Таким образом, в настоящее время созданы многообразные методы направленного изменения свойств белковой молекулы, позволяющие существенно улучшить ее характеристики как катализатора химической реакции. Эти методы включают как химическую модификацию молекулы, так и направленную модификацию ее структуры с введением изменений в ген белка. Это, безусловно, открывает новые возможности применения ферментов и обеспечивает развитие инженерной энзимологии. Можно ожидать, что в ближайшем будущем появятся методы создания искусственных ферментов, предназначенные для осуществления определенных реакций, даже тех, которых пока нет в природе.

14.2. Ферменты в нетрадиционных средах. Мицеллярная энзимология

Ферменты в естественных условиях работают в водной среде или на границе раздела фаз мембрана — водная среда. Развитие методов химической энзимологии привело к тому, что ферментам стали доступны любые среды. Химики «научили» ферменты проводить химические реакции в органических растворителях, в мицеллах, в твердых фазах, на границе раздела фаз металл — раствор электролита. Особый интерес представляет возможность осуществления ферментативных реакций в органических растворителях. Это связано с тем, что многие важные реакции термодинамически возможны лишь в системах с малым содержанием воды или

вообще в безводных средах. Это определяется растворимостью компонентов реакции и тем, что многие реакции синтеза являются, как правило, обратными реакциям гидролиза и могут протекать лишь в системах с незначительным содержанием воды, поскольку в воде равновесие сдвинуто в сторону исходных соединений.

Прямой переход от воды к органическому растворителю невозможен. В среде органического растворителя ферменты быстро денатурируют. Молекулы органического растворителя внедряются в молекулу белка, нарушая гидрофобные взаимодействия, стабилизирующие белковую глобулу. Как правило, это заканчивается денатурацией белка и полной потерей его каталитической активности. Структурные изменения белка зачастую сказываются не только на стабильности фермента, но и на его селективности.

Было развито несколько подходов, обеспечивших возможность проведения ферментативных реакций в органических растворителях.

1. Реакции можно провести в трехфазной системе вода—несмешивающийся с водой органический растворитель—твердый носитель в условиях, когда фермент защищен от органического растворителя твердой фазой. Для этого могут быть использованы иммобилизованные ферменты. Схематическое изображение такого рода системы приведено на рис. 14.1. Фермент локализован внутри пор носителя, насыщен водой, при этом отсутствует прямой контакт фермента с органической фазой.

2. В ряде случаев для реакций в водно-органических смесях могут быть использованы системы защиты фермента от растворителя с использованием полимерных покрытий.

3. Оригинальное и эффективное решение проблемы связано с включением ферментов в обращенные мицеллы, предложенное А. Левашовым и К. Мартинеком.

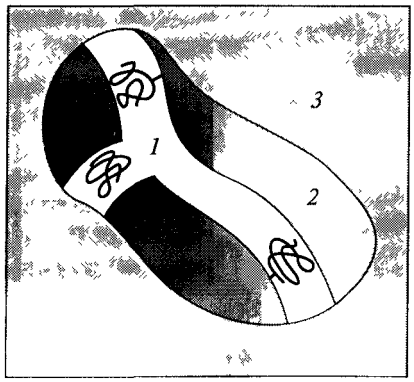


Рис. 14.1. Трехфазная система:

1 — пора с иммобилизованным ферментом, заполненная водой; *2* — твердая фаза; *3* — органический растворитель

Системы с органическими растворителями, содержащие ферменты, включенные в обращенные мицеллы, имеют много интересных особенностей. Поэтому остановимся на них более подробно.

Многие поверхностно-активные вещества образуют в органических растворителях, содержащих определенное количество воды, так называемые обращенные мицеллы. Полярные группы обращенных мицелл солюбилизируют и стабилизируют микрокапельки воды за счет взаимо-

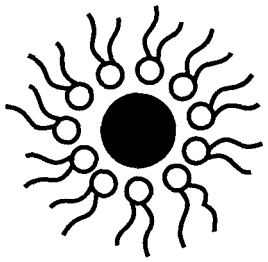


Рис. 14.2. Фермент в обращенной мицелле

действия аполярных гидрофобных частей детергента с органическим растворителем. Фермент может быть включен в водную фазу, соизмеримую с молекулой белка, «защищаясь» от органического растворителя молекулами воды и аполярными группами детергента. Схематически система с обращенными мицеллами и белком представлена на рис. 14.2. В качестве поверхностно-активных веществ могут быть использованы различные бифильные детергенты. Наибольшее распространение получил ди-(2-этил)-гексиловый эфир натриевой соли сульфоянтарной кислоты (тривиальное название — аэрозоль ОТ).

Солюбилизацию фермента в обращенные мицеллы проводят простым добавлением водного раствора фермента в раствор детергента в органическом растворителе. В результате получают оптически прозрачную систему, в которой фермент диспергирован на молекулярном уровне в органическом растворителе. Полученный микрогетерогенный раствор фермента в органическом растворителе позволяет проводить разнообразные химические реакции.

Созданные методики дают возможность солюбилизировать в органическом растворителе относительно большие количества белка вплоть до концентрации 1 мг/мл, что приблизительно соответствует концентрации 10^{-5} моль/л активных центров. Солюбилизированный фермент обладает следующими положительными свойствами.

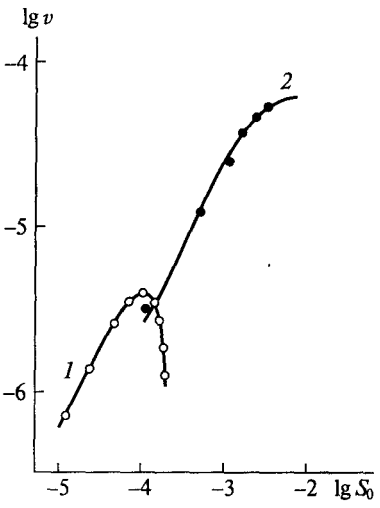


Рис. 14.3. Зависимость скорости пероксидазного окисления пирогаллола от концентрации субстрата в воде (*1*) и в октане (*2*) в системе обращенных мицелл аэрозоля ОТ

Фермент полностью сохраняет свою активность и специфичность. Включенный в мицеллу фермент защищен от разрушающего действия органического растворителя оболочкой из поверхностно-активного соединения. Более того, в некоторых случаях наблюдается повышение активности фермента в мицеллах по сравнению с активностью его раствора. Например, на рис. 14.3 приведена зависимость скорости пероксидазной реакции от концентрации субстрата для реакции в воде (кривая *1*) и в органическом растворителе с обращенными мицеллами (кривая *2*). На-

блюдаемая максимальная скорость в системе с обращенными мицеллами более чем в 10 раз выше. Это связано, по-видимому, с тем, что в случае обращенных мицелл не проявляется эффект ингибирования избытком субстрата (см. рис. 14.3, кривая *1*).

Каталитическую активность фермента можно регулировать, варьируя размер обращенной мицеллы. Размер обращенных мицелл зависит от содержания воды (соотношения вода : органический растворитель). Исследование зависимости абсолютной каталитической активности ферментов (параметра $k_{кат}$) от размера мицелл показало, что для каждого фермента характерен оптимальный размер мицеллы. На рис. 14.4 приведена зависимость константы $k_{кат}$ от содержания воды в системе вода — органический растворитель. Видно, что эта функция имеет максимум. Максимум соответствует оптимальному объему, занимаемому белковой глобулой. Природа эффекта связана с тем, что мицелла, по-видимому, способна «сжать» белковую молекулу, обеспечив оптимальное пространственное соответствие между каталитическими группами фермента.

В случае ферментов, обладающих четвертичной структурой, мицеллы способны «растащить» белковые комплексы на отдельные субъединицы. Это часто проявляется при изучении зависимости активности субъединичного фермента от соотношения вода : органический растворитель. Пример такого рода поведения белка с четвертичной структурой приведен на рис. 14.5. Видно, что зависимость имеет сложный характер и может быть интерпретирована

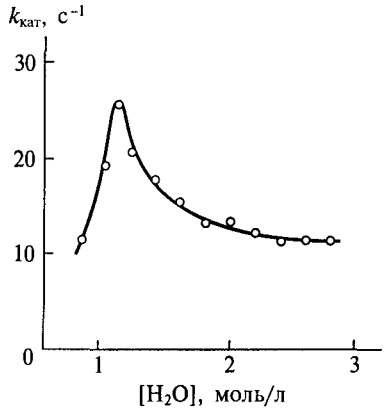


Рис. 14.4. Зависимость каталитической константы скорости реакции с участием α-химотрипсина от содержания воды в системе *н*-октанол — вода в присутствии 0,1 М раствора детергента АОТ

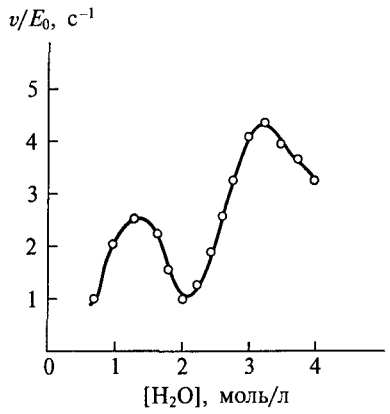


Рис. 14.5. Зависимость каталитической активности субъединичного фермента формиатдегидрогеназы от содержания воды в системе обращенных мицелл

как отражение вклада в каталитическую активность отдельных субъединиц.

Большое число экспериментов, выполненных с различными ферментами в разных условиях, показало, что стабилизация белков против разрушающего действия органического растворителя, сохранение активности и специфичности, колоколообразные зависимости каталитической активности от соотношения вода : органический растворитель характерны для большинства ферментов в обращенных мицеллах. Это направление химической энзимологии получило название мицеллярная энзимология.

14.3. Ферменты в органическом синтезе

Высокие скорости реакций и уникальная специфичность ферментов обусловливают интерес к созданию процессов органического синтеза на основе использования биокатализа. Возможности синтетической химии на основе ферментов определяются в первую очередь реакциями, обеспечивающими метаболизм клетки. Это большой набор реакций и соответствующих им ферментов. Современные методы работы с белковыми катализаторами позволяют изменить специфичность фермента, увеличить его термостабильность и провести реакции в среде, отличной от водной (см. выше). Это значительно расширяет синтетические возможности ферментативного катализа.

Вместе с тем существуют ограничения в использовании ферментов для целей синтетической химии. Эти ограничения связаны прежде всего с термодинамикой реакции. Ферменты как типичные катализаторы можно использовать лишь в случаях, когда образование желаемых продуктов термодинамически выгодно. В противном случае следует подумать о возможностях сдвига равновесия в нужную сторону. Типичным примером такого рода ситуации является использование гидролитических ферментов для синтетической реакции. Гидролазы представляют собой самый большой класс ферментов. Работы по использованию гидролаз в синтетических целях привели к положительным результатам. Однако главная трудность, с которой столкнулись исследователи, — это неблагоприятная термодинамика процесса. Действительно, синтез амидной, эфирной или ангидридной связи (в случае, например, АТФ) в водной среде сопряжен с образованием воды:

$$A + B \overset{K}{\rightleftharpoons} AB + H_2O$$

Константа равновесия

$$K = \frac{[AB][H_2O]}{[A][B]}$$

включает в себя концентрацию воды, которая в водном растворе исключительно высока — 55,5 моль/л. Следствием этого являются высокое значение константы равновесия и в большинстве случаев положительные значения свободной энергии реакции синтеза.

Было развито несколько методов, позволяющих повлиять на равновесие и обеспечить высокий выход целевого продукта в изначально неблагоприятных термодинамических условиях.

1. *Изменение ионного состояния реагентов.* Образование ионных форм реагентов и сольватирование ионов водой может существенно повлиять на общую свободную энергию реакции. Условно изменение свободной энергии процесса можно представить как сумму свободных энергий реакций неионизированных форм реагентов ΔG° и свободной энергии ионизации $\Delta G_{ион}$: $\Delta G = \Delta G^\circ + \Delta G_{ион}$. Для некоторых реакций гидролиза эфиров и амидов значения свободной энергии приведены в табл. 14.1. Видно, что значения $\Delta G_{ион}$ (pH 7) весьма велики и во многих случаях определяют термодинамическую возможность протекания процесса. Например, свободная энергия ионизации бензоилглицина составляет –49,2 кДж/моль, в то время как свободная энергия гидролиза неионизированной формы реагента составляет 20,6 кДж/моль. Суммарная свободная

Таблица 14.1

Значения свободной энергии (кДж/моль) реакций гидролиза некоторых эфиров и амидов

Соединение	ΔG (pH 7)	ΔG°	$\Delta G_{ион}$ (pH 7)
Этилацетат	–30,2	–17,6	–12,6
Ацетил-КоА	–34,9	–21,8	–13,1
Метиловый эфир N-ацетил-L-фенилаланина	–25,2	—	—
L-Глутамин	–14,3	13,9	–28,2
L-Аспаргин	–12,6	18,1	–30,7
Амид N-ацетилнитрофенилаланина	–8,6	26,3	–34,9
Гидроксиламин N-ацетилтирозина	–7,9	14,7	–22,6
Этиловый эфир N-ацетилфенилтирозина	–0,2	23,1	–23,3
Глицилглицин	–18,1	16,4	–34,5
Бензоилглицин	–28,6	20,6	–49,2
Бензилпенициллин	4,2	20,2	–16,0
Фенилацетилглицин	2,0	26,1	–24,1
Ацетил-L-метионин	–3,2	31,3	–34,5
Фенилацетил-L-аланин	1,7	40,2	–38,5

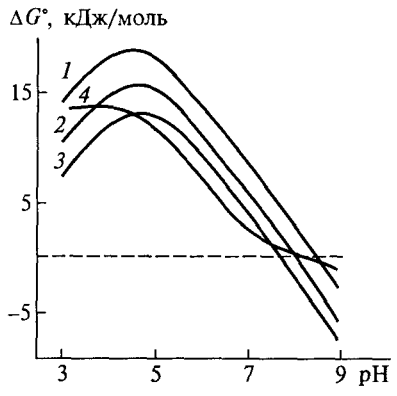


Рис. 14.6. Зависимость свободной энергии реакции гидролиза ряда β-лактамных антибиотиков от показателя pH:
1 — 7-аминодезацетоксицефалоспориновая кислота; *2* — бензилпенициллин; *3* — цефалотин, цефалоридин; *4* — ампициллин, цефалексин

энергия реакции, определяющая возможность протекания процесса при pH 7, отрицательная и составляет −28,6 кДж/моль.

Из данных табл. 14.1 видно, что существует большая разница в значениях свободных энергий реакций гидролиза эфиров и амидов. Значения ΔG° реакций гидролиза эфиров всегда отрицательные, в то время как ΔG° реакций гидролиза амидов — положительные. Лишь ионизация реагентов делает процесс гидролиза амидов термодинамически возможным. Соответственно в обратном процессе — процессе синтеза, картина обратная. Синтез амидных связей становится термодинамически возможным, когда реагенты удается перевести в неионную форму. Для этого, например, реакцию можно проводить при низких значениях pH, при которых карбоксильная группа протонирована. Действительно, образование различных амидных связей, в том числе и пептидной, удается провести при низких значениях pH. В качестве примера на рис. 14.6 приведены зависимости свободной энергии реакции гидролиза ряда β-лактамных антибиотиков от показателя pH. Видно, что во всех случаях при pH < 8 свободная энергия гидролиза положительная, т.е. свободная энергия обратного процесса — реакции синтеза амидной связи ядро—ацильный заместитель — отрицательная и, следовательно, процесс термодинамически благоприятен. Это обеспечило возможность получения большого набора синтетических β-лактамных антибиотиков с использованием пенициллинамидазы — фермента, гидролизующего природный антибиотик — бензилпенициллин.

2. *Перенос продукта в другую фазу.* Равновесие может быть сдвинуто в нужном направлении, если продукты реакции мало растворимы и выделяются в виде осадка. Часто это бывает при проведении реакций конденсации, например при синтезе пептидной связи:

$$R{-}COOH + NH_2{-}R' \rightleftharpoons RCONHR'\downarrow + H_2O$$

Выделение осадка сдвигает равновесие в нужную сторону.

Если продукты реакции представляют собой газообразное или низкокипящее соединение, существует возможность переноса продукта в газовую фазу. Например, реакции с участием форми-

атдегидрогеназы практически необратимы, поскольку продукт реакции CO_2 уходит в газовую фазу.

3. *Использование последовательных реакций.* Сдвиг равновесия может быть осуществлен за счет использования последовательных реакций, переводящих один из продуктов в другое соединение, термодинамически более предпочтительное. Действительно, для реакции $A + B \overset{K_1}{\rightleftharpoons} C + D$ в случае дополнительного процесса $D \overset{K_2}{\rightleftharpoons} F$ суммарная свободная энергия реакции будет равна $\Delta G_\Sigma = \Delta G_1 + \Delta G_2$, а общая константа равновесия составит $K_\Sigma = K_1 K_2$. Если реакция $D \rightleftharpoons F$ термодинамически выгодна ($\Delta G_2 < 0$), то это обеспечит сдвиг равновесия суммарной реакции в целом.

В синтетической ферментативной химии этот подход нашел применение при использовании систем регенерации кофакторов, таких как $НАД^+$, $НАДФ^+$, АТФ. Например, реакции с участием $НАД^+$-зависимых дегидрогеназ часто обратимы и протекают в равновесном режиме

$$A + НАДН + H^+ \rightleftharpoons НАД^+ + AH_2$$

Сдвиг равновесия в ту или иную сторону может быть осуществлен за счет дополнительной реакции. Например, очень удобной реакцией восстановления $НАД^+$ является реакция с участием формиатдегидрогеназы:

$$HCOO^- + НАД^+ \longrightarrow CO_2 + НАДН$$

Суммарный процесс восстановления А до AH_2, часто протекающий стереохимически, практически необратим:

$$A + HCOO^- + H^+ \longrightarrow AH_2 + CO_2$$

4. *Проведение реакции в однофазных водно-органических системах.* Как было отмечено выше, многие синтетические реакции с участием ферментов представляют собой процессы, обратные гидролизу. Продуктом реакции в этом случае является вода. Поэтому в водных растворах при содержании воды 55,5 моль/л термодинамический процесс синтеза затруднен. Добавление в систему органического растворителя может сдвинуть равновесие в благоприятную сторону. Действие органического растворителя приводит к положительным результатам за счет двух эффектов:

1) органический растворитель уменьшает концентрацию воды в системе и тем самым способствует сдвигу равновесия в сторону синтеза;

2) органический растворитель способствует смещению равновесия для субстратов с ионогенными группами в сторону неполярной формы.

В качестве примера рассмотрим синтез пептидной связи при нейтральных значениях pH. В случае взаимодействия кислоты и амина имеют место следующие равновесия:

$$\begin{array}{ccc} R_1COOH + NH_2R_2 & \overset{K}{\rightleftharpoons} & R_1CONHR_2 + H_2O \\ \uparrow\downarrow K_a \qquad & & \uparrow\downarrow K_b \\ R_1COO^- + NH_3R_2^+ & & \end{array}$$

С учетом ионизации кислоты и амина наблюдаемая константа равновесия как функция концентрации ионов водорода будет иметь вид

$$K_{\text{набл}} = \frac{K}{1 + \dfrac{K_a}{[H^+]} + \dfrac{[H^+]}{K_b} + \dfrac{K_a}{K_b}}.$$

Если в систему вводится органический растворитель в высокой концентрации, это отражается на значениях K_a и K_b, смещая равновесие в сторону незаряженных форм кислоты и амина. Так, если реакцию синтеза амидов проводить в 85%-м растворе бутандиона, выход продуктов увеличивается в 80 раз.

Основная трудность подхода заключается в том, что в средах с высоким содержанием органического растворителя, смешиваемого с водой, белковые молекулы, как правило, нестабильны и довольно быстро теряют каталитическую активность. Поэтому следует принять особые меры по стабилизации ферментов. Некоторые подходы, обеспечивающие положительные результаты, описаны в подразд. 14.2.

5. *Проведение реакции в двухфазных водно-органических системах.* Значительные возможности ферментативного органического синтеза связаны с использованием двухфазных систем вода — несмешивающийся с водой органический растворитель. Очевидно, что в этом случае равновесие и выход продуктов будут зависеть от коэффициентов распределения реагентов между водой и органическим растворителем, а также от соотношения объемов водной и органической фаз.

В простейшем случае для реакции типа А $\rightleftharpoons$ В имеем

$$K_{\text{эф}} = \frac{B_{\text{общ}}}{A_{\text{общ}}},$$

где $A_{\text{общ}}$, $B_{\text{общ}}$ — общая концентрация реагентов в системе. С учетом уравнений материального баланса

$$A_{\text{общ}}(V_{\text{вод}} + V_{\text{орг}}) = A_{\text{вод}}V_{\text{вод}} + A_{\text{орг}}V_{\text{орг}},$$
$$B_{\text{общ}}(V_{\text{вод}} + V_{\text{орг}}) = B_{\text{вод}}V_{\text{вод}} + B_{\text{орг}}V_{\text{орг}}$$

эффективная константа равновесия $K_{\text{эф}}$ как функция коэффициентов распределения веществ P_A и P_B между водой и органической фазой и соотношения объемов $\alpha = V_{\text{орг}}/V_{\text{вод}}$ будет иметь вид

$$K_{эф} = K_{вод}\frac{1+\alpha P_B}{1+\alpha P_A}$$

или

$$K_{эф} = K_{орг}\frac{1+1/(\alpha P_B)}{1+1/(\alpha P_A)}.$$

Здесь $P_A = A_{орг}/A_{вод}$, $P_B = B_{орг}/B_{вод}$, $K_{вод}$, $K_{орг}$ — константа равновесия в воде и органическом растворителе соответственно. Эффективная константа равновесия может быть существенно изменена, если вещество В лучше растворяется в органической фазе, чем в воде, и если при этом соотношение объемов двух фаз таково, что объем органической фазы существенно превышает объем водной.

Практически важным является случай, когда продуктом реакции является вода. Это реакции синтеза эфиров, амидов, пептидных связей и фосфодиэфирных связей:

$$A + B \rightleftharpoons C + H_2O$$

В этом случае эффективная константа равновесия зависит от концентрации воды

$$K_{эф} = \frac{A_{общ}B_{общ}}{C_{общ}[H_2O]}.$$

С учетом коэффициентов распределения и соотношения объемов органической и водной фазы выход продукта С будет определяться уравнением

$$C = C_{вод}\frac{(1+\alpha P_C)(1+\alpha)}{(1+\alpha P_A)(1+\alpha P_B)},$$

где $C_{вод}$ — концентрация продукта С в водной фазе; $P_C = C_{орг}/C_{вод}$.

Рассмотрим несколько типичных случаев (рис. 14.7). При расчете кривых, приведенных на рис. 14.7, принято, что $K_{вод} = 10$, т.е. процесс синтеза в водной среде термодинамически невыгоден.

1. Исходные вещества в водной и органической фазах распределяются одинаково $P_A = P_B = 1$, а вещество С предпочитает водную фазу $P_C = C_{орг}/C_{вод} = 0{,}1$, тогда выход продукта равен

$$C = C_{вод}\frac{1+\alpha P_C}{1+\alpha}.$$

При $\alpha \to \infty$ (переход к гидрофобной фазе) получим $C = C_{вод}P_C = 0{,}1\,C_{вод}$. В этом случае увеличение α (относительное уменьшение объема водной фазы) должно приводить к уменьшению выхода целевого продукта (см. рис. 14.7, линия *1*).

2. Продукты реакции равномерно распределены в водной и органической фазах ($P_C = 1$), а компоненты А и В существенно разли-

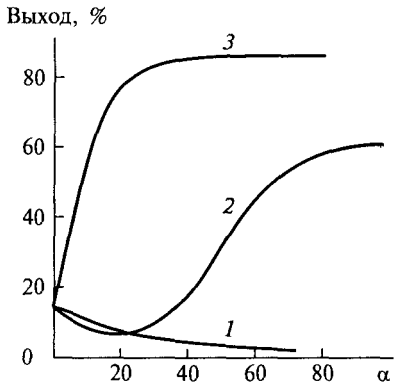


Рис. 14.7. Зависимость выхода продукта от соотношения объемов органической и водной фаз для реакции с образованием воды:

1 — $P_A = P_B = 1$, $P_C = 0{,}1$; *2* — $P_A = 10$, $P_B = 0{,}001$, $P_C = 1$; *3* — $P_A = P_B = 1$, $P_C = 50$

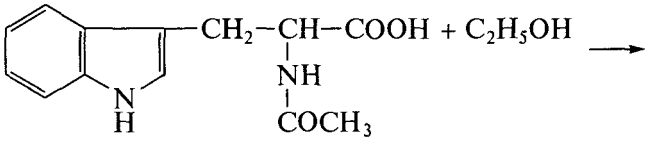
чаются по гидрофобности: $P_A = 10$ (бóльшая доля вещества А растворена в органической фазе), $P_B = 0{,}01$ (практически все вещество В растворено в воде). В этом случае зависимость выхода целевого продукта С от соотношения объемов органической и водной фаз имеет сложный характер (см. рис. 14.7, линия *2*). В некотором диапазоне значений α может наблюдаться уменьшение выхода продукта с увеличением относительного содержания органической фазы, в дальнейшем можно наблюдать существенное увеличение выхода.

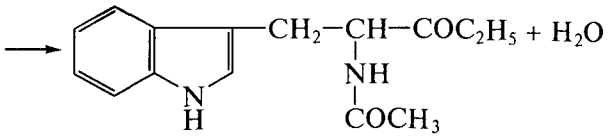
3. Реагенты А и В равномерно распределены в водной и органической фазах ($P_A = P_B = 1$), а продукт лучше растворим в органической среде ($P_C = 50$) (см. рис. 14.7). В этом случае можно ожидать существенного увеличения выхода продукта в двухфазной системе по сравнению с выходом продукта в воде. При $\alpha \to \infty$ имеем $C = C_{вод} P_C = 50 C_{вод}$.

Таким образом, существуют методы повышения выхода целевого продукта ферментативного синтеза даже в условиях, когда термодинамически реакция его не обеспечивает. Используемые подходы заключаются в переводе реагентов в другое ионное состояние, переносе продукта в другую фазу, использовании последовательных реакций, проведении реакций в водно-органических одно- или двухфазных системах. Все это обеспечивает многообразное применение ферментов в органическом синтезе.

Рассмотрим несколько примеров.

Синтез эфиров аминокислот. Как известно, эфирная связь термодинамически неустойчива в воде. Однако в двухфазных системах удается реализовать синтез эфиров аминокислот с высоким выходом, используя в качестве катализаторов ферменты, в нормальных условиях гидролизующие эти эфиры:



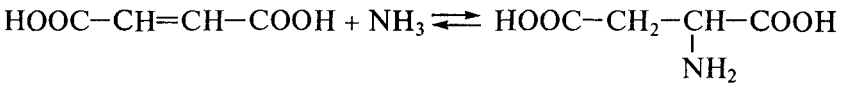


Катализатором является α-химотрипсин, выход около 100 %.

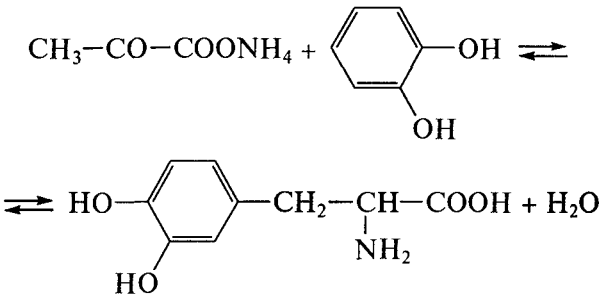
В аналогичных условиях происходит синтез пептидной связи с образованием пептидов.

Природные аминокислоты. Бóльшую часть природных аминокислот получают гидролизом белков с последующим выделением аминокислот. Однако некоторые аминокислоты представляют большую фармакологическую и пищевую ценность, и для их получения были разработаны специальные синтетические методы.

Аспарагиновая кислота является важным полупродуктом при получении широко используемого пептидного подсластителя — аспартама (см. ниже). Для синтеза аспарагиновой кислоты используют аспартатаммиаклиазу. Синтез ведут из фумаровой кислоты и аммиака:



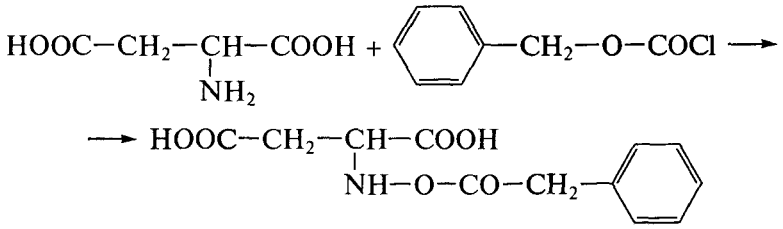
По аналогичной схеме промышленно синтезируется тирозин, диоксифенилтирозин, триптофан. Исходными субстратами являются фенолы и пируват аммония:



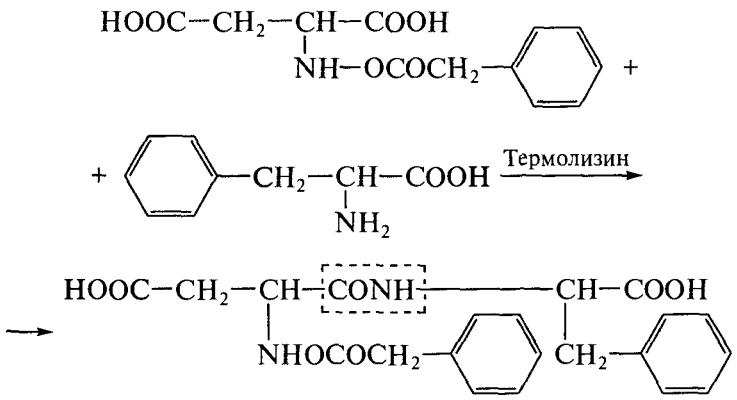
Реакция катализируется тирозинфеноллиазой. Процесс осуществляют как с использованием чистых ферментов, так и иммобилизованных клеток микроорганизмов.

Синтез аспартама. Аспартам — широко применяемый подсластитель, представляет собой дипептид аспарагиновой кислоты и фенилаланина. Промышленный синтез аспартама начинают с получения аспарагиновой кислоты путем ферментативного аминирования фумаровой кислоты (см. выше). Дальнейшая модификация аспарагиновой кислоты включает несколько стадий:

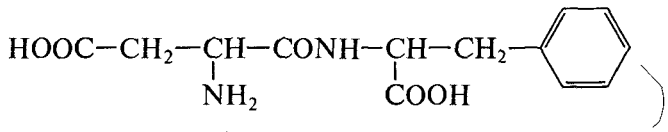
а) защита аминогруппы



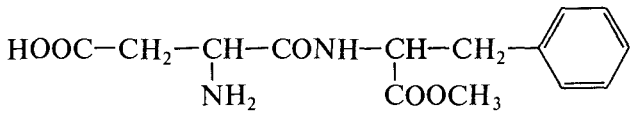
б) ферментативное образование пептидной связи, обычно для этого используют протеолитический фермент термолизин



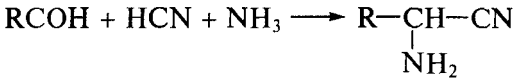
в) снятие защитной группы с образованием свободной аминогруппы аспарагиновой кислоты



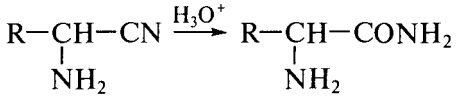
г) метилирование карбоксильной группы тирозина, конечным продуктом синтеза является аспартам



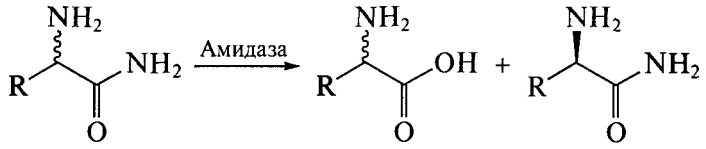
Неприродные (*непротеиногенные*) *аминокислоты.* Один из вариантов синтеза оптически чистых непротеиногенных аминокислот, которые не могут быть получены путем гидролиза белков, состоит в использовании стереоспецифических амидаз из различных источников. Синтез базовых структур может быть осуществлен с помощью реакции Штекера из альдегида соответствующей структуры, цианистого водорода и аммиака:



Продуктом реакции является нитрил соответствующей кислоты, который в кислой среде может быть гидролизован с получением смеси амидов аминокислоты:

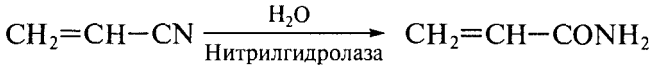


Амидаза гидролизует L-стереизомер, практически не затрагивая D-форму:



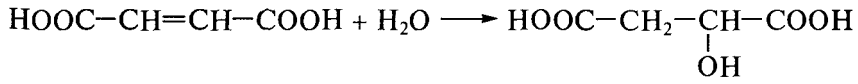
Разделение амида и кислоты не представляет больших сложностей. В последующей стадии D-форма амида может быть гидролизована до соответствующей аминокислоты.

Получение акриламида. Крупнотоннажный синтез мономера акриламида осуществляют с помощью фермента нитрилгидролазы. Исходным соединением является химически производимый акрилонитрил:



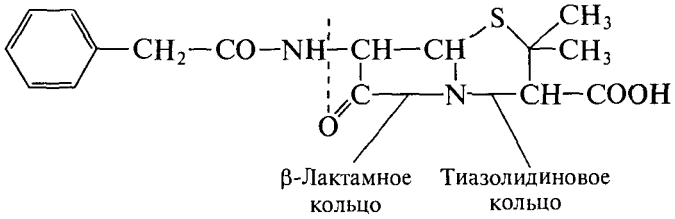
По сравнению с традиционным кислотным гидролизом ферментативный метод дает существенно более высокий выход целевого продукта в более чистой форме.

Синтез L-яблочной кислоты. L-Яблочную кислоту получают гидролизом фумаровой кислоты под действием фумаразы:



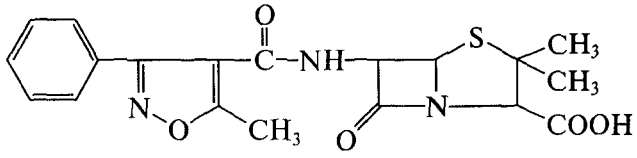
Реакцию проводят до установления в системе равновесия, при котором около 80 % фумаровой кислоты превращается в яблочную.

Синтез β-лактамных антибиотиков. β-Лактамные антибиотики представляют собой основной класс антибиотических препаратов, широко применяемых в настоящее время в борьбе с бактериальными инфекциями. Природный пенициллин — бензилпенициллин — производное фенилуксусной кислоты:

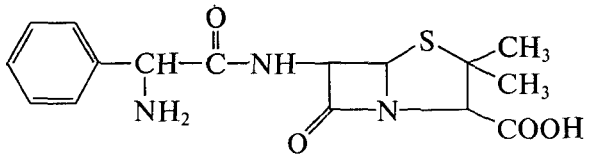


Современная химия пенициллинов включает стадию гидролиза амидной связи (пунктирная линия) с образованием 6-аминопенициллановой кислоты. Тиазолидиновое кольцо достаточно стабильно, в то время как β-лактамное кольцо (внутренний лактам) легко может быть гидролизовано. Получение 6-аминопенициллановой кислоты путем химического гидролиза невозможно, поскольку в первую очередь гидролизуется внутренний лактам. Процесс осуществляют с помощью пенициллинамидазы, специфически расщепляющей амидную связь. Полученную таким образом 6-аминопенициллановую кислоту на следующей стадии ацилируют заместителями, отличными от фенилуксусной кислоты, получая различные антибиотики с новыми свойствами.

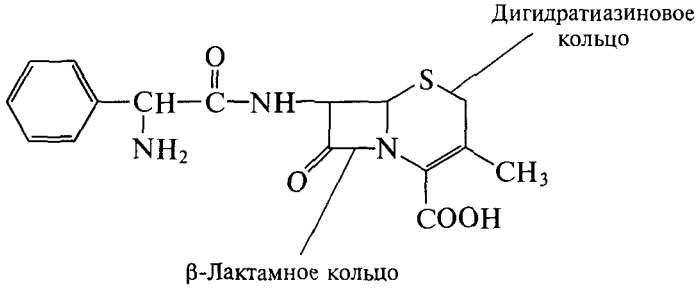
Часто применяемыми в настоящее время являются оксациллин



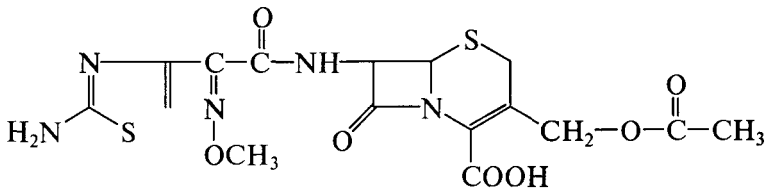
и ампициллин



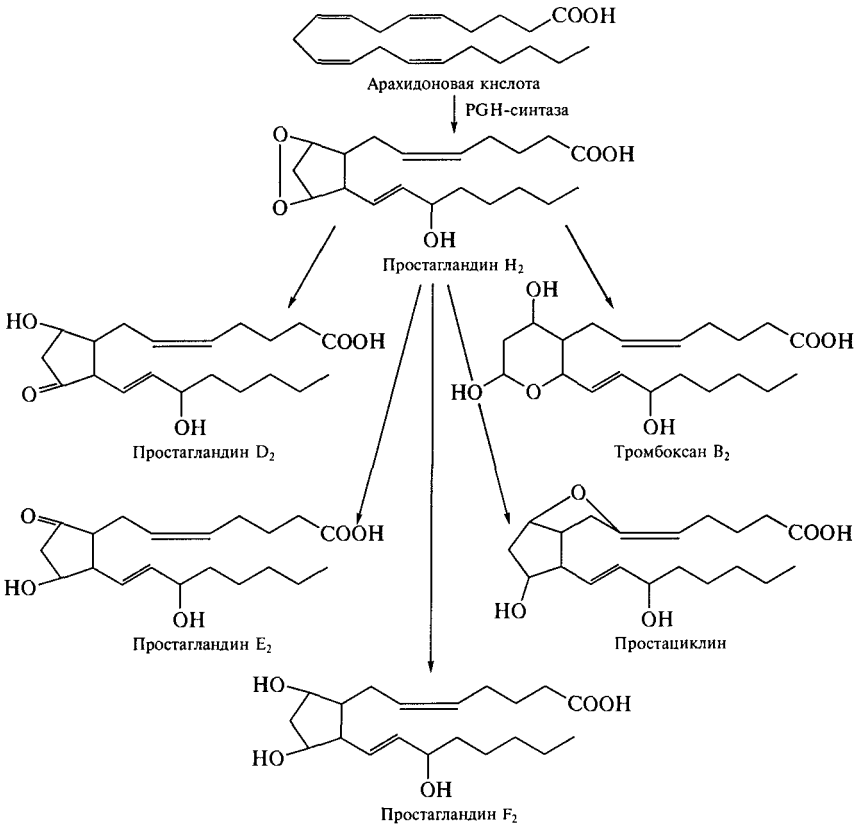
По аналогичной схеме получают антибиотики, ядром которых является 7-аминоцефаллоспорановая кислота: цефалексин



цефатоксим



Синтез простагландинов. Простагландины представляют собой регуляторы многих процессов в организме животных и человека. Химический синтез простагландинов — весьма сложная синтетическая задача. В то же время соединения этого класса относительно легко могут быть получены ферментативными методами из полиненасыщенных жирных кислот, например из арахидоновой. Процесс синтеза включает действие двух ферментов простагландин-Н-синтазы и простагландин-Н-конвертазы. Лимитирующим ферментом синтеза является простагландин-Н-синтаза. Механизм действия этого фермента подробно рассмотрен в гл. 8. Химическая схема процесса выглядит следующим образом:



Приведенные примеры демонстрируют возможности ферментов для целей тонкого органического синтеза.

14.4. Ферменты в аналитической химии

Ферментативный катализ внес существенный вклад в развитие аналитической химии сложных органических молекул. Традиционная аналитическая химия ограничивается, как правило, созданием методов обнаружения, идентификации и количественного определения относительно простых химических соединений. Использование ферментов для целей аналитической химии качественно изменило ситуацию. Доступными для идентификации и количественного определения стали сложные органические молекулы, белки, нуклеиновые кислоты. Высокая специфичность ферментов (см. гл. 9), их способность узнавать индивидуальные молекулы в сложных смесях обеспечили аналитическую химию новыми селектирующими агентами. Высокие скорости реакций, катализируемых ферментами, позволяют усилить химический сигнал и существенно повысить чувствительность анализа.

Ферменты в химическом анализе нашли широкое применение для решения разнообразных задач, включая анализ низкомолекулярных соединений в сложных биохимических смесях, количественный анализ белков в сложных белковых композициях, качественный и количественный анализ нуклеиновых кислот. Для проведения аналитической процедуры были разработаны несколько форматов, обеспечивающих высокую чувствительность и стандартизацию анализа. Наиболее известными и широко применяемыми аналитическими процедурами являются:

ферментативный анализ метаболитов;

анализ с использованием биосенсоров;

иммуноферментный анализ;

анализ нуклеиновых кислот с использованием полимеразной цепной реакции;

биолюминесцентный анализ.

Рассмотрим эти подходы более подробно.

Ферментативный анализ метаболитов. Основой аналитического подхода является способность ферментов избирательно взаимодействовать с одним или несколькими родственными соединениями на фоне большого числа разнообразных веществ. Этот подход используют при проведении клинического и биохимического анализа, при оценке качества окружающей среды. Применение ферментов позволяет селективно определять в разнообразных биологических жидкостях и тканях малые количества особо важных метаболитов, ингибиторов, лекарственных соединений, таких как аминокислоты, сахара, спирты, мочевина, мочевая кислота, хо-

лестерин, нуклеотиды, антибиотики. При этом используют разнообразные физико-химические методы: спектрофотометрию, спектрофлюорометрию, люминесцентный анализ, электрохимические методы.

Разработано несколько форматов анализа.

1. *Кинетический метод.* Зависимость скорости v ферментативной реакции, в которой искомое соединение выступает в качестве субстрата, от его концентрации S в большинстве случаев гиперболическая (см. гл. 3):

$$v = \frac{k_{кат} E_0 S}{K_M + S}.$$

Соответственно концентрация субстрата может быть определена по скорости ферментативной реакции

$$S = \frac{vK_M}{k_{кат} E_0 - v} = \frac{vK_M}{V_m - v}.$$

Очевидно, что наиболее удобной для анализа является область, в которой $v \ll V_m$ или $S \ll K_M$. В этом случае имеет место линейная зависимость концентрации определяемого субстрата от скорости реакции:

$$S = v\frac{K_M}{V_m} = \alpha v.$$

Параметр пропорциональности $\alpha = K_M/V_m$ может быть найден из калибровочной прямой или при использовании калибровочной концентрации S_0. Независимое измерение скорости v_0 при концентрации S_0 дает значение $\alpha = S_0/v_0$.

На линейном участке накопления продукта ($P \ll S$) концентрация продукта P может быть измерена при фиксированном времени реакции, что существенно упрощает процедуру анализа. Верхний предел обнаружения концентрации субстрата определяется константой Михаэлиса данного субстрата для данного фермента. Выше константы Михаэлиса скорость реакции слабо зависит или вообще не зависит от концентрации S. Предел обнаружения определяется тем, с какой чувствительностью измеряется скорость реакции. Чем более активен фермент (высокие $k_{кат}$) или чем бóльшую концентрацию фермента можно использовать (высокие значения E_0), тем ниже предел обнаружения концентрации субстрата. Для традиционного спектрофотометрического метода предел обнаружения составляет 10^{-6}—10^{-5} моль/л. Этого вполне достаточно для определения большинства метаболитов. (Для сравнения укажем, что концентрация глюкозы в крови изменяется в диапазоне 10^{-3}—10^{-2} моль/л.)

В случае анализа обратимого ингибитора обычно измеряют скорость реакции в отсутствие v_0 и в присутствии v_i ингибитора.

Концентрация ингибитора I в этом случае определяется уравнением

$$I = K_i\left(\frac{v_0}{v_i} - 1\right),$$

или

$$I = K_i \frac{\Delta v}{v_i},$$

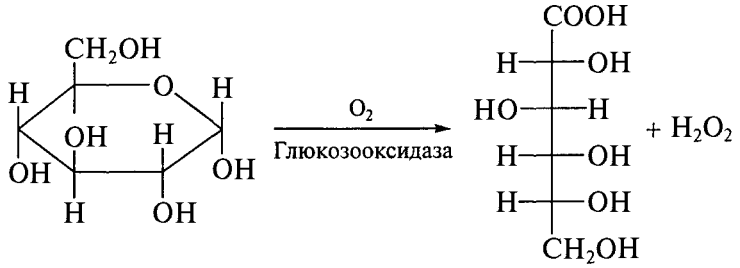
где Δv — изменение скорости реакции; K_i — константа равновесия реакции ингибирования.

В аналитической биохимии часто используют сопряженные ферментативные реакции, в которых продукт первой реакции является субстратом следующей. В большинстве случаев это делается, чтобы повысить точность анализа, например, за счет того, что продукт второй реакции обладает лучшими оптическими или люминесцентными характеристиками или обладает более высокой электрохимической активностью. Как правило, второй фермент берут в большом избытке, с тем чтобы вторая стадия не была лимитирующей.

2. *Метод титрования субстрата ферментом.* В некоторых случаях анализ можно упростить, если быстро перевести искомый субстрат в продукт реакции. Условием проведения анализа является использование избытка фермента, что позволяет осуществлять этот процесс за разумное время.

Ниже приведены наиболее популярные реакции, используемые для ферментативного анализа метаболитов.

Глюкоза. Наиболее часто для биохимического определения глюкозы используют глюкозооксидазу:



D-Глюкоза Глюконовая кислота

Продуктами реакции являются глюконовая кислота и пероксид водорода. Пероксид водорода можно определять электрохимически. Химически пероксид водорода определяют с помощью пероксидазы по окислению хромогенного субстрата:

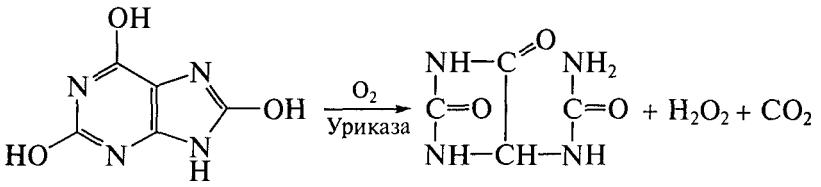
$$H_2O_2 + o\text{-Дианизидин} \longrightarrow \text{Краситель}$$

Мочевина. Индикаторная реакция — гидролиз мочевины под действием уреазы:

$$(NH_2)_2CO \xrightarrow{H_2O} 2NH_3 + CO_2$$

Продукты реакции определяют потенциометрическим методом с помощью электродов, чувствительных к аммиаку или CO_2.

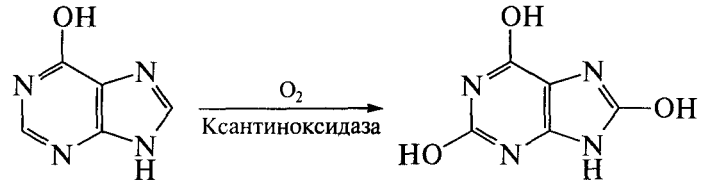
Мочевая кислота. Индикаторная реакция — окисление мочевой кислоты под действием уриказы:



Мочевая кислота (2,6,8-тригидроксипурин) Аллантоин (5-уреиндогидантоин)

Образовавшийся пероксид водорода определяют электрохимически или с помощью пероксидазы с использованием хромогенных субстратов.

Гипоксантин (ксантин). Для определения используют реакции окисления гипоксантина под действием ксантиноксидазы:

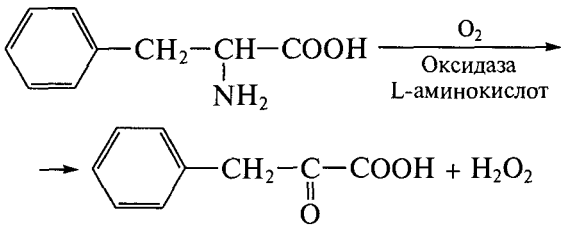


Гипоксантин (6-гидроксипурин) Мочевая кислота

Мочевую кислоту определяют с помощью уриказы (см. выше).

L-Аминокислоты. В качестве индикаторной используют реакцию окисления кислородом под действием оксидазы L-аминокислотой.

Для фенилаланина реакция протекает следующим образом:



Кетокислота

Пероксид водорода лучше всего определяется с помощью пероксидазы и хромогенного субстрата (см. выше).

Глутаминовая кислота. Индикаторная реакция — дезаминирование с помощью глутаматдегидрогеназы:

$$HOOC-CH_2-CH_2-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-COOH + НАД^+ \rightleftharpoons$$

$$\rightleftharpoons HOOC-CH_2-CH_2-\underset{\displaystyle O}{\underset{\|}{C}}-COOH + НАДН + NH_4^+$$

Продукты реакции можно определять либо по NH_4^+ с помощью аммоний-чувствительного электрода, либо спектрофотометрически по спектрам пары $НАД^+$/НАДН.

Молочная кислота. Определение может быть осуществлено с помощью лактатдегидрогеназы:

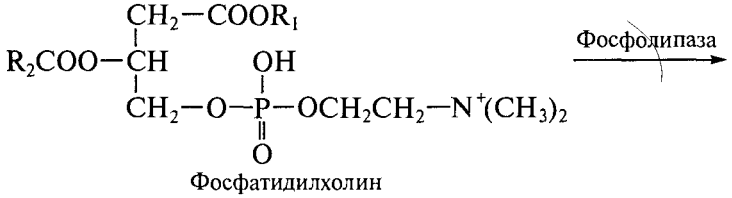
$$CH_3-\underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{CH}}-COOH + НАД^+ \rightleftharpoons CH_3-\underset{\displaystyle O}{\underset{\|}{C}}-COOH + НАДН$$

Муравьиная кислота. Аналогично определяют формиат по реакции с формиатдегидрогеназой:

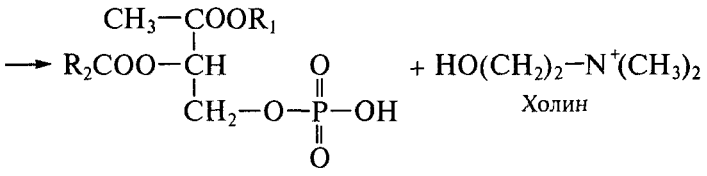
$$HCOOH + НАД^+ \rightleftharpoons CO_2 + НАДН$$

Гликоген. Полимер глюкозы предварительно расщепляют на мономеры с помощью амилоглюкозидазы с последующим определением глюкозы.

Фосфатидилхолин. Фосфолипиды этого класса наиболее удобно определять с использованием сопряженных реакций с участием фосфолипазы, холиноксидазы и пероксидазы:

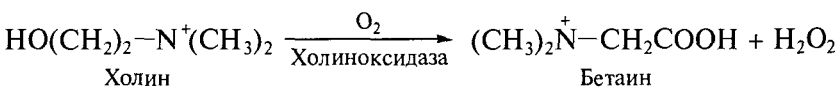


Фосфатидилхолин

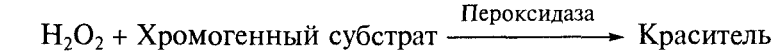


Холин

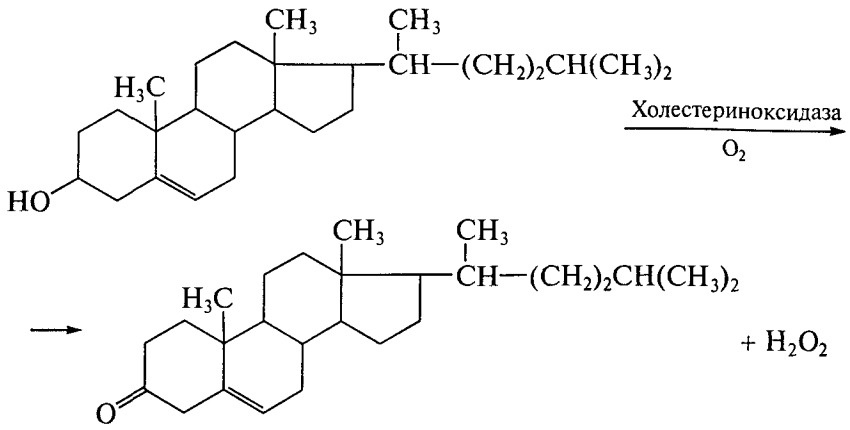
Фосфатидиловая кислота



Холин Бетаин



Холестерин. Определение ведут с помощью холестеринок-сидазы:



Пероксид водорода определяют с помощью одного из приведенных выше методов.

Биосенсоры. Это аналитические устройства, использующие биологические материалы для «узнавания» определенных молекул и выдающие информацию об их присутствии и количестве в виде электрического сигнала. Идея создания такого рода устройства возникла более 30 лет назад. Впервые ее высказали Л. Кларк и С. Лионс в 1967 г. Идея Л. Кларка состояла в использовании ферментного электрода, т. е. электрохимического датчика с иммобилизованным на его поверхности ферментом. За прошедшие десятилетия создано много систем, некоторые получили широкое распространение.

Большинство биосенсоров предназначены для анализа биологических жидкостей. Например, в крови находятся тысячи различных соединений. Задача заключается в том, чтобы быстро и эффективно определить концентрацию нужного соединения, например глюкозы. Для людей, страдающих диабетом, это жизненно важный клинический анализ. Биосенсоры обеспечивают такую возможность.

Принципы конструирования биосенсоров. Любой биосенсор состоит из двух принципиально важных функциональных элементов: биоселективной мембраны, использующей различные биологические структуры, и физического преобразователя сигнала (трансдьюсера), трансформирующего концентрационный сигнал в электрический. Для считывания и записи информации используют электронные системы усиления и регистрации сигнала. В качестве биоселективного материала используют все типы биологических структур: ферменты, антитела, рецепторы, нуклеиновые кислоты и даже живые клетки (рис. 14.8).

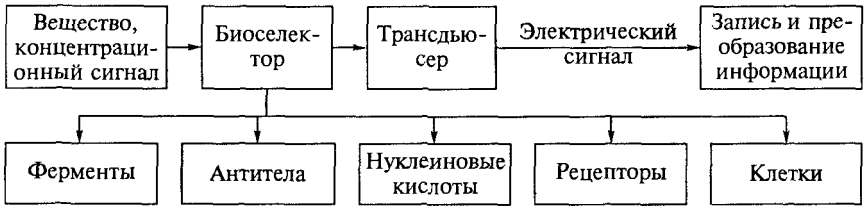


Рис. 14.8. Схема биосенсора

Трансдьюсерами могут быть электрохимические преобразователи (электроды), различного рода оптические преобразователи, гравитационные, калориметрические, резонансные системы. Все виды биоселективных элементов можно комбинировать с различными трансдьюсерами. Это создает большое разнообразие типов биосенсоров. Наибольшее развитие получили биосенсоры на основе ферментов и клеток.

Биосенсоры на основе ферментов. Сопряжение ферментативных и электрохимических реакций, происходящих на электропроводящих материалах, погруженных в раствор электролита, позволило разработать много биосенсоров для определения глюкозы, аминокислот, мочевой кислоты, молочного сахара, пирувата, мочевины и других метаболитов.

Первая система, предложенная Л. Кларком, использует электрод, измеряющий в диффузионно-контролируемом режиме количество поглощенного кислорода. Было применено большое число оксидаз, использующих кислород для селективного окисления углеводов, аминокислот, органических кислот.

Наиболее удобно измерять силу тока через поверхность ферментного электрода. Сила тока как скорость реакции может быть однозначно связана с концентрацией измеряемого компонента.

Простейшая конструкция ферментного биосенсора реализована для случая, когда субстрат либо продукт ферментативной реакции электрохимически активны, т.е. способны быстро и (желательно) обратимо окисляться или восстанавливаться на электроде при наложении на него соответствующего потенциала. Например, биосенсор на глюкозу основан на реакции окисления с участием глюкозоксидазы

$$\text{Глюкоза} + O_2 \longrightarrow \text{Глюконолактон} + H_2O_2$$
$$\downarrow H_2O$$
$$\text{Глюконовая кислота}$$

с последующей регистрацией тока восстановления кислорода или перекиси водорода. Оба случая реализованы на практике. В электрохимических биосенсорах поток электронов через поверхность

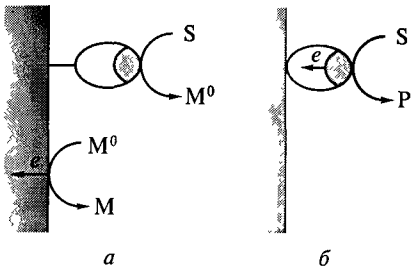


Рис. 14.9. Перенос электронов между активным центром фермента и электродом:

а — с участием медиаторов; *б* — прямой перенос

датчика линейно связан с концентрацией анализируемого вещества в растворе.

При адсорбции ферментов на твердых поверхностях (металлах, керамике, полимерах) они, как правило, сохраняют свою структуру и каталитическую активность. Фермент в режиме электрохимического биосенсора проявляет каталитическую активность, т. е. ускоряет процесс обмена электронами между субстратом и электродом.

Транспорт электронов может осуществляться различным образом (рис. 14.9).

1. Перенос электронов происходит с участием диффузионно-подвижного промежуточного низкомолекулярного переносчика электронов — медиатора. Схема процесса в этом случае имеет вид

$$S + E_{Ox} \longrightarrow P + E_{Red}$$

$$E_{Red} + M_{Ox} \longrightarrow E_{Ox} + M_{Red}$$

$$M_{Red} \xrightarrow{\text{Электрод}} M_{Ox} + e$$

где E_{Ox}, E_{Red} — соответственно окисленная и восстановленная форма активного центра фермента; M_{Ox}, M_{Red} — соответственно окисленная и восстановленная форма медиатора.

Медиатор должен быть специфическим субстратом фермента и, кроме того, электрохимически активным на электроде из данного материала. Медиаторный механизм транспорта электронов широко используется для проведения электрохимических ферментативных реакций.

2. Прямой перенос электронов происходит между электродом и активным центром фермента. Прямой перенос электронов обнаружен и исследован для лакказы, пероксидазы, гидрогеназы.

3. Перенос электронов между активным центром фермента, включенного в органические полимерные полупроводники, и доменами в полупроводнике.

При конструировании биосенсоров наибольшее применение нашел процесс электровосстановления перекиси водорода с помощью иммобилизованной пероксидазы. Приведем несколько примеров.

Определение ключевых метаболитов. Многие ферменты осуществляют оксидазную реакцию с различными веществами (глюкозой, аминокислотами) с образованием перекиси водорода (см. выше). В этом случае пероксидазный электрод преобразует концентрационный сигнал в электрический. При совместной иммобилизации двух ферментов — оксидазы и пероксидазы — происходят следующие процессы:

$$AH_2 + O_2 \xrightarrow{\text{Оксидаза}} A + H_2O_2$$

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{Пероксидаза}} H_2O + 2e$$

В условиях, когда лимитирующей является первая стадия, сила тока линейно связана с концентрацией метаболита AH_2.

Определение супертоксинов и боевых отравляющих веществ. Большая группа фосфорорганических соединений является сильными ядами, они блокируют в центральной нервной системе фермент ацетилхолинэстеразу. По аналогичному механизму действуют большинство пестицидов. Были разработаны биосенсоры высокой чувствительности для определения концентрации такого рода соединений, основанные на следующих ферментативных реакциях:

$$\text{Ацетилхолин} \xrightarrow{\text{Ацетилхолинэстераза}} \text{Холин} + \text{Уксусная кислота}$$

$$\text{Холин} + O_2 \xrightarrow{\text{Холиноксидаза}} H_2O_2 + \text{Оксихолин}$$

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{Пероксидаза}} H_2O + 2e$$

Ингибитор (зарин, зоман, ви-газ) блокирует активность ацетилхолинэстеразы, в конечном итоге уменьшая ток электронов через поверхность электрода. Чувствительность биосенсора составляет 10^{-12} моль/л нейротоксина.

Биосенсоры на основе клеток. Одно из достижений биотехнологии и биоинженерии связано с развитием методов включения живых клеток в полимеры и твердые носители различной природы и применением такого рода материалов для решения задач медицины, управляемого биосинтеза, анализа. С использованием живых иммобилизованных клеток создано много различных биосенсоров. Отметим несколько полезных свойств иммобилизованных клеток.

1. Клетки — доступный биологический материал. Используются клетки растений, животных, человека, но наибольшее применение нашли клетки микроорганизмов, которые культивируются, легко воспроизводятся и поддерживаются в чистой культуре. В от-

личие от ферментов при использовании клеток не требуются дорогостоящие стадии очистки.

2. Имеющиеся методы иммобилизации позволяют получить клетки, сохраняющие практически 100%-ю активность ферментов и способные функционировать длительные промежутки времени. Клетки сохраняют все наиболее важные структуры и проявляют большую стабильность. В некоторых случаях клетки сохраняют жизнеспособность и активность ферментных систем в течение нескольких лет.

3. Клетки сохраняют, как правило, все системы жизнеобеспечения, включая ферментные стадии регенерации кофакторов. Это позволяет проводить сложные последовательные реакции, осуществляя многостадийные процессы.

4. Для многих типов клеток, особенно микробных, разработаны эффективные методы генетических операций, позволяющие получать мутанты с высоким содержанием того или иного белка или фермента, что дает возможность оперировать с высокоэффективными каталитическими системами (см. гл. 6).

Особенности метаболизма клеток позволяют создавать биосенсоры как на индивидуальные молекулы, так и на широкие классы соединений, например на всю совокупность биологически поглощаемых веществ. Для создания клеточных биосенсоров, так же как и для ферментных, используются различные трансдьюсеры: электрохимические, включая амперометрические (детекторы кислорода, пероксида водорода, медиаторы), потенциометрические (pH-чувствительные и ионселективные электроды, pH-чувствительные полевые транзисторы), кондуктометрические, оптические, акустические, калориметрические.

Принципиальным вопросом при создании клеточных биосенсоров является метод иммобилизации клеток. Первоначально для иммобилизации клеток с сохранением их активности использовали материалы природного происхождения: желатину, агар, альгинат кальция, каррагенан. В последние годы разработаны методы включения живых клеток в синтетические полимерные гели. Особенно интересные и перспективные результаты получены с использованием так называемого метода криоиммобилизации клеток. Процедура иммобилизации включает получение суспензии клеток в растворе полимера, замораживание суспензии с получением криоструктурированных гелей, размораживание с образованием пористого, механически прочного материала, устойчивого до температуры 70—80 °С. Клетки, включенные в такого рода пористый материал, сохраняют активность и способны функционировать в течение нескольких месяцев.

Биосенсоры на основе клеток применяются для селективного определения фенолов, пролина, глутамина, тирозина, молочной и аскорбиновой кислот, глюкозы. Они позволяют анализировать

сульфат-ионы, ионы аммония, монометилсульфата. Уникальные возможности обеспечивают клеточные биосенсоры для экспресс-анализа качества воды и сточных вод. Разработан метод определения биологического потребления кислорода — суммарного содержания органических соединений, которые могут быть использованы микроорганизмами. Традиционный метод требует для получения данных нескольких суток. Биосенсор с иммобилизованными клетками позволяет получать эти же результаты в течение нескольких минут.

Биосенсоры как новые аналитические устройства, позволяющие получать и перерабатывать экспресс-информацию о химическом составе тех или иных объектов, в настоящее время интенсивно развиваются. Эти биоэлектронные устройства позволяют повысить качество медицинских анализов, контроля технологических процессов, оценки пищевых продуктов и окружающей среды.

Иммуноферментный анализ. Этот метод позволяет в режиме предельно высокой чувствительности определять белковые компоненты и низкомолекулярные соединения в сложных биохимических объектах.

Основой метода служит, с одной стороны, способность антител образовывать прочные специфические комплексы с анализируемым соединением, с другой стороны — способность ферментов проводить определенные химические реакции. Измеряемым параметром является активность (концентрация) маркерного фермента. Фермент является химическим усилителем сигнала. В результате ферментативной реакции в течение определенного времени с участием одного активного центра образуются $10^5—10^7$ молекул продукта. Это позволяет увеличить чувствительность анализа в $10^5—10^7$ раз и в результате обнаруживать ультранизкие количества веществ. Иммуноферментный анализ применяется при диагностике в медицине, ветеринарии, при мониторинге объектов окружающей среды и т.д.

Селективными агентами иммуноферментного анализа являются антитела (иммуноглобулины). Антитела синтезируются в организме высших животных в ответ на появление чужеродного вещества — антигена. Антитела имеют одинаковую организацию вторичной, третичной структуры и различаются структурой вариабельного участка Fab-фрагмента, ответственного за комплексообразование с антигеном. Под антигеном понимают некоторую обобщенную структуру, против которой могут быть получены антитела. В качестве антигенов могут выступать клетки микроорганизмов, вирусы, белки и ряд низкомолекулярных агентов.

Антитела традиционно получают иммунизацией животных. Для этого в кровь животного вводят антиген в течение определенного времени, вызывая активацию лимфоцитов и синтез соответству-

ющего иммуноглобулина. В результате получают набор белковых молекул, обладающих способностью связывать антиген. Это так называемые поликлональные антитела. Связывание характеризуется определенным диапазоном констант комплексообразования.

Для целей иммуноферментного анализа большое развитие получили методы синтеза моноклональных антител, основанные на использовании гибридом. Гибридома — это гибрид иммуноглобулинпроизводящих клеток — В-лимфоцитов и опухолевых, раковых клеток, миеломных лимфоцитов (Г. Келер, К. Мильштейн, 1975 г.). В результате реакции гибридизации получаются антителопродуцирующие клеток, гибридомы, способные размножаться в системе *in vitro*. Гибридомная технология обеспечивает иммуноферментный анализ необходимым количеством антител, которые характеризуются узким распределением по константам комплексообразования с антигеном.

Физико-химической основой метода является исследование равновесия образования комплекса между антителом Ab и антигеном Ag:

$$Ab + Ag \rightleftharpoons Ab \cdot Ag$$

Если антитело «метится» ферментом за счет образования ковалентной связи между двумя белками, то по уровню связанного или свободного меченого антитела или антигена можно определить концентрацию антигена (клеток микроорганизма, вируса, белка, низкомолекулярного соединения).

Получение конъюгатов иммуноглобулина и фермента может быть осуществлено набором химических методов, многие из которых обсуждаются в гл. 2. Аналогичными способами получают конъюгаты между антигеном и ферментной меткой.

В качестве метки для иммуноферментного анализа используют различные ферменты. Критерием выбора является высокая каталитическая активность, стабильность, удобный метод мониторинга каталитической активности, высокий уровень сохранения активности в реакции конъюгирования с антителом. Чувствительность иммуноферментного анализа определяется константой диссоциации комплекса антиген—антитело и качеством реакции определения ферментативной активности.

Константы устойчивости комплексов антител с антигенами изменяются в диапазоне 10^{-12}—10^{-8} моль/л. Соответственно предел обнаружения фермента в хорошо подобранной фермент-субстратной реакции также высок. Так, в реакции гидролиза 2-нитрофенил-β-D-галактопиранозида под действием β-галактозидазы предел обнаружения составляет $1{,}8 \cdot 10^{-12}$ моль/л; при гидролизе 4-нитрофенилфосфата под действием щелочной фосфатазы — $2 \cdot 10^{-13}$ моль/л; при окислении люминола в присутствии *п*-иодфенола под действием пероксидазы — $2{,}5 \cdot 10^{-15}$ моль/л.

Разработано несколько форматов иммуноферментного анализа, позволяющих в результате исследования равновесия определить концентрацию искомого антигена. Широкое применение нашел метод твердофазного иммуноферментного анализа (Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)). В этом случае антитела иммобилизуются на твердой фазе, а меченый и немеченый антигены конкурируют за связывание с антителами. Измерение активности сорбированного фермента позволяет определить концентрацию антигена.

Возможны варианты гомогенного иммуноферментного анализа, при котором антитело закрывает активный центр фермента. Конкурентное введение антигена в анализируемый образец вызывает десорбцию комплекса фермент—антиген и позволяет измерить каталитическую активность, которая пропорциональна концентрации анализируемого соединения Ag:

$$\underset{\text{Каталитически неактивный комплекс}}{E\cdots Ab} + \underset{\text{Анализируемое вещество}}{Ag} \rightleftharpoons \underset{\text{Каталитически активный фермент}}{E} + Ag\cdots Ab$$

В табл. 14.2 приведены некоторые примеры использования иммуноферментного анализа и пределы обнаружения искомых антигенов.

Полимеразная цепная реакция. Использование ДНК-полимераз, способных проводить достройку второй полинуклеотидной цепи на матрице одноцепочечной ДНК, обеспечило уникальный по чувствительности и селективности метод обнаружения нуклеиновых кислот с определенной последовательностью нуклеотидов. Механизм действия ферментов этого типа описан в гл. 8. Качественный скачок в применении ДНК-полимераз связан с использованием термостабильных ДНК-полимераз термофильных микроорганизмов. Как известно, ДНК-полимеразы достраивают по-

Таблица 14.2

Пределы обнаружения некоторых веществ методом иммуноферментного анализа

Антиген	Фермент	Предел обнаружения, моль/л
Инсулин	β-Галактозидаза	$2{,}0 \cdot 10^{-12}$
Хориогонадотропин	Пероксидаза	$8{,}0 \cdot 10^{-11}$
Тироксин	Малатдегидрогеназа	$2{,}0 \cdot 10^{-7}$
Прогестерон	β-Галактозидаза	$1{,}6 \cdot 10^{-10}$
Вирус гепатита В	Пероксидаза	$9{,}0 \cdot 10^{-13}$

лимерную цепь нуклеиновой кислоты. Это обеспечивает селективность метода, поскольку идентификация искомого полинуклеотида идет с использованием праймера — олигонуклеотида, селективно связывающего небольшой участок полимерной цепи и превращающего на этом участке одноцепочечную ДНК в двухцепочечную. Далее ДНК-полимераза достраивает полинуклеотидную цепь до полной молекулы (см. гл. 4).

Использование термостабильной ДНК полимеразы позволило проводить реакцию в циклическом режиме, осуществляя «плавление» образовавшейся двухцепочечной ДНК с последующим процессом достройки молекул на вновь образовавшейся матрице. Таким образом, каждый цикл удваивает количество искомой полинуклеотидной цепи. Проводя 10—20 циклов, можно накопить количество ДНК, достаточное для прямого наблюдения за ДНК физико-химическими методами.

Методика является уникальной и обеспечивает возможность обнаружения малых количеств патогенных микроорганизмов, вирусов, выявления и идентификации генетических заболеваний.

Биолюминесцентный микроанализ. Наиболее чувствительными в биохимическом анализе являются методы, основанные на явлении биолюминесценции. Известны некоторые реакции, приводящие к образованию электронно-возбужденных состояний молекул, эмитирующих квант света. Наиболее популярными являются следующие реакции:

1) окисление люминола пероксидом водорода под действием пероксидазы

$$\text{Люминол} + H_2O_2 \xrightarrow{\text{Пероксидаза}} \text{Аминофталат} + N_2 + h\nu\ (\lambda = 425\ \text{нм})$$

2) окисление алифатических спиртов люциферазой светящихся бактерий с участием восстановленного флавинмононуклеотида (ФМН)

$$\text{ФМН} \cdot H_2 + \text{Деканаль} + O_2 \longrightarrow$$

$$\longrightarrow \text{ФМН} + \text{Декановая кислота} + h\nu\ (\lambda = 490\ \text{нм})$$

3) АТФ-зависимое окисление люциферина, катализируемое люциферазой светляков

$$\text{Люциферин} + \text{АТФ} + O_2 \longrightarrow \text{Оксилюциферин} + \text{АМФ} +$$

$$+ \text{Пирофосфат} + CO_2 + h\nu\ (\lambda = 560\ \text{нм})$$

Методами генетической инженерии получены мутантные формы фермента со смещенной полосой в спектре люминесценции до 610 нм. Последняя реакция обеспечивает высокочувствительный метод детекции живых клеток микроорганизмов. Высокий уровень АТФ является атрибутом активно метаболизирующих жи-

вых клеток. Разработанная методика обладает исключительной чувствительностью и позволяет обнаруживать в образце несколько клеток. Метод находит применение при санитарном контроле, контроле качества пищевых продуктов, в медицинском анализе, в нефтяной промышленности для контроля за биокоррозией и микробной модификацией нефтепродуктов.

14.5. Ферменты как лекарственные препараты

Ферменты играют ключевую роль в современной фармации. Значительная доля производимых в настоящее время лекарственных препаратов представляет собой регуляторы активности тех или иных ферментов. Достаточно напомнить многократно обсуждаемые в этой книге нестероидные противовоспалительные препараты, такие как аспирин, анальгин, бруфен, индометацин и др. Все эти соединения являются ингибиторами простагландин-Н-синтазы (о механизме действия этого фермента см. гл. 8).

В некоторых весьма важных случаях ферменты как белковые молекулы используются в качестве лекарственных препаратов. В медицине используются следующие ферменты.

1. *Ферменты коррекции пищеварения.* Липазы, протеазы из различных источников используются как дополнительные ферменты, облегчающие разложение жиров и белков на составные части в процессе пищеварения.

2. *Ферменты наружного применения.* На основе иммобилизованных протеаз различного происхождения созданы перевязочные материалы, улучшающие заживление ран.

3. *Тромболитические ферменты.* Существенный прогресс в лечении сердечно-сосудистых заболеваний связывают с применением ферментов, растворяющих фибриновые тромбы. Это направление обеспечивается большим набором протеолитических ферментов. Активация плазминогена на фибриновом сгустке обеспечивает основной естественный процесс тромболизиса. Созданы химически модифицированные по активному центру производные плазминогена, пролонгирующие действие фермента и регулирующие процесс тромболизиса. Для растворения фибриновых тромбов используются протеазы бактериального происхождения — стрептокиназа и стафилокиназа. Создание эффективных тромболитических агентов связывают с тканевым активатором плазминогена и протеолитическим ферментом — урокиназой. Получены генно-инженерные варианты урокиназы, и на этой основе создан фармакологический препарат.

4. *Ферменты противоопухолевой терапии.* Торможение роста опухолей в этом случае основано на селективной ферментативной модификации ряда аминокислот, используемых раковыми клет-

ками для пролиферации роста. Терапевтически значимыми ферментами этого направления являются лизиноксидаза, аспарагиназа и др.

Сдерживающим фактором широкого применения ферментов как медицинских препаратов является их иммуногенность. Многократное введение чужеродного белка в систему крови человека может вызвать синтез соответствующих антител и развитие иммунного ответа. Инженерная энзимология находит решение этой проблемы в использовании растворимых конъюгатов ферментов с синтетическими полимерами. Показано, что во многих случаях при соответствующем подборе полимера иммуногенность белка может быть существенно снижена.

14.6. Биокаталитические методы защиты окружающей среды

Проблема сохранения окружающей среды решается по двум направлениям:

1) создание новых технологических процессов с минимальным уровнем отходов *ксенобиотиков* — химических соединений, нарушающих равновесие процессов в природе и вызывающих гибель живых организмов;

2) разработка высокоэффективных процессов деструкции ксенобиотиков с образованием продуктов, нетоксичных для среды обитания.

Биокатализаторы в большинстве случаев способны обеспечить полную конверсию ксенобиотиков (пестицидов, препаратов бытовой химии, отходов промышленных производств и т. п.) в продукты, совместимые с окружающей средой.

Любой продукт, внесенный в окружающую среду, например в почву, претерпевает деструкцию во времени. Однако зачастую эти процессы протекают малоинтенсивно, по сложным динамическим законам. Поскольку на конечном этапе процессы деструкции идут под действием ферментов, их можно назвать *экобиокаталитическими*. Очевидно, что главной задачей экобиокатализа является исследование кинетики реакций деструкции ксенобиотиков с участием микроорганизмов и ферментов с целью их интенсификации.

Особенностью биокаталитических процессов в природе является то, что деструкция веществ, в конечном итоге, происходит до минеральных компонентов (CO_2, NH_3, H_3PO_4, H_2S и др.). Эти процессы можно назвать биоминерализацией вещества, и именно они представляют наибольший интерес. При этом процессы деструкции могут проходить как непосредственно в окружающей среде (биоминерализация выбросов нефти и нефтепродуктов), так и

в специальных аппаратах, обеспечивающих предельную полноту и интенсивность превращений (например, анаэробная деструкция отходов сельскохозяйственного производства или пищевой промышленности).

Особенности кинетики биокаталитических процессов. Анализ многочисленных экспериментальных данных позволяет выявить несколько типичных зависимостей изменения концентрации ксенобиотика во времени. Эти зависимости связаны с механизмом эволюции биокаталитической системы. Понимание механизмов позволяет сформировать оптимальную схему процесса. Наиболее важными представляются два механизма кинетического поведения биосистемы.

1. Процесс деструкции ксенобиотика осуществляется ферментными системами микроорганизма. При этом разложение ксенобиотика не связано с ростом популяции микроорганизма. Концентрация биокатализатора в течение определенного промежутка времени остается практически постоянной или изменяется несущественно. Это простейший случай превращения вещества S в продукт P: $S \xrightarrow{k} P$, который может быть описан кинетическим уравнением первого порядка

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{dP}{dt} = kS,$$

$$S = S_0 \exp(-kt), \quad P = S_0[1 - \exp(-kt)].$$

Наблюдаемая константа скорости k зависит от концентрации биокатализатора. На рис. 14.10 приведена кинетическая кривая разложения фосфорорганического боевого отравляющего вещества зомана почвенными микроорганизмами. Наблюдаемая константа скорости реакции равна 0,2 $ч^{-1}$, период разложения половины вещества равен $\tau = 0{,}69$ ($k = 3{,}45$ ч).

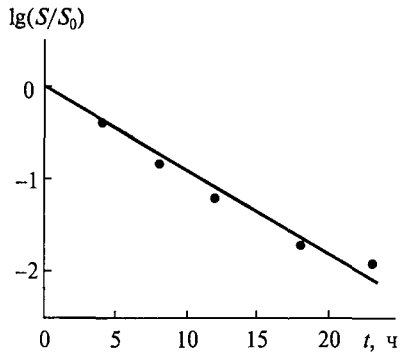


Рис. 14.10. Кинетика деструкции боевого отравляющего вещества зоман под действием почвенных микроорганизмов

Такого рода зависимости могут наблюдаться и в случае, когда процесс характеризуется малой скоростью роста микроорганизма при относительно высокой скорости потребления субстрата.

2. Процесс деструкции ксенобиотика является необходимым для развития популяции микроорганизма (например, разложение ксенобиотика необходимо для обеспечения микроорганизма углеродом, азотом или фосфором). В этом случае кинетика раз-

ложения вещества определяется кинетикой роста популяции микроорганизма и описывается уравнением

$$\frac{dM}{dt} = \mu M,$$

где $\mu = \mu_m S/(K_S + S)$ — уравнение Моно; M — количество микроорганизмов (микробной биомассы); μ — удельная скорость роста микроорганизма; S — концентрация субстрата (ксенобиотика); μ_m — максимальная удельная скорость роста микроорганизма; K_S — константа сродства микроорганизма к данному субстрату.

Предполагается, что количество прореагировавшего субстрата и прирост биомассы связаны линейным отношением $dM = -Y_S dS$, где Y_S — экономический коэффициент, отражающий долю субстрата, перешедшего в форму биомассы. Интегрирование этих уравнений при условии, что количество биомассы существенно превышает концентрацию субстрата, приводит к уравнению

$$\ln X - \frac{K_S}{S_0 + K_S}\ln(1 - aX) = \frac{\mu_m S_0}{S_0 + K_S}t,$$

где

$$X = \frac{M}{M_0}, \quad a = \frac{M_0}{Y_S S_0} = \frac{M_0}{M_m},$$

где M_0 — начальное количество биомассы; M_m — конечное количество биомассы.

Для перехода от кинетики роста клеток микроорганизма к кинетике изменения концентрации субстрата (ксенобиотика) необходимо использовать линейное соотношение

$$M = Y_S(S_0 - S) + M_0 \approx Y_S(S_0 - S).$$

Экспериментальные данные могут быть линеаризованы в рамках одного из приведенных уравнений

$$\frac{\ln(M/M_0)}{t} = \mu + \phi\frac{\ln(1 - M/M_m)}{t},$$

$$\frac{\ln(M/M_0)}{\ln(1 - M/M_m)} = \phi + \mu\frac{t}{\ln(1 - M/M_m)},$$

$$\frac{\ln(1 - M/M_m)}{\ln(M/M_0)} = \frac{1}{\phi} - \frac{\mu}{\phi}\frac{t}{\ln(M/M_0)},$$

где

$$\mu = \frac{\mu_m S_0}{K_S + S_0}, \quad \phi = \frac{K_S}{K_S + S_0}.$$

Также для анализа экспериментальных данных может быть использована разностная форма этих уравнений. Если при времени

$t = t_i$ и $t = t_j$ концентрации субстрата и продукта равны соответственно S_i и S_j, P_i и P_j, кинетические уравнения могут быть представлены в виде

$$\frac{\ln\dfrac{S_0 - S_i}{S_0 - S_j}}{t_j - t_i} = \mu + \phi\frac{\ln\dfrac{S_j}{S_i}}{t_j - t_i}, \qquad (14.1)$$

$$\frac{\ln\dfrac{P_i}{P_j}}{t_j - t_i} = \mu + \phi\frac{\ln\dfrac{P_m - P_i}{P_m - P_j}}{t_j - t_i},$$

где P_m — максимальная концентрация образовавшегося продукта.

В качестве примера на рис. 14.11 приведены кинетические данные по деградации 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты. Параметры кинетического процесса K_S и μ_m могут быть найдены при использовании следующих соотношений:

$$K_S = \frac{\phi}{1-\phi}S_0, \quad \mu_m = \frac{\mu}{1-\phi}.$$

Для данных, приведенных на рис. 14.11, получено $K_S = 20$ мг/г, $\mu_m = 0{,}2$ сут$^{-1}$.

При разложении высокотоксичных веществ растущими микробными популяциями, как правило, наблюдается эффект инги-

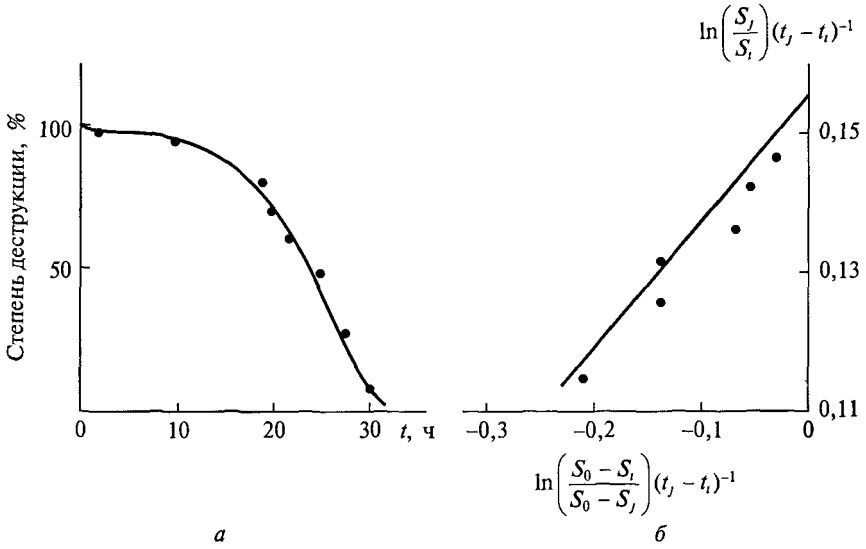


Рис. 14.11. Кинетика деструкции 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты:
а — исходные данные; *б* — данные рис. 14.11, *а* представлены в координатах уравнения (14.1)

бирования избытком субстрата. В этом случае удельная скорость роста микроорганизма является экстремальной функцией концентрации субстрата:

$$\mu = \frac{\mu_m S_0}{K_S + S_0\left(1 + \frac{S_0}{K_i}\right)},$$

где K_i — константа скорости ингибирования субстратом. При $S_0 \gg KV_i$ можно наблюдать уменьшение скорости роста микроорганизма и увеличение скорости деструкции поллютанта с ростом его концентрации:

$$\mu = \frac{\mu_m K_i}{S_0}.$$

Два отличающихся по кинетическим закономерностям механизма деструкции токсичных веществ определяют принципиально разные методы интенсификации процесса. На рис. 14.12 схематически приведены кинетические кривые деструкции ксенобиотика для двух рассмотренных выше предельных случаев. Очевидно, что если кинетика разложения связана с кинетикой роста популяции микроорганизма (см. рис. 14.12, *а*, линия *2*), интенсификация процесса может быть достигнута за счет увеличения скорости роста микроорганизма. В этом случае факторы, ускоряющие рост микроорганизмов (введение фосфора, азота, микроэлементов и др.), должны приводить к увеличению скорости процесса.

Если кинетика разложения ксенобиотика не связана с ростом популяции микроорганизма (протекает по экспоненциальному

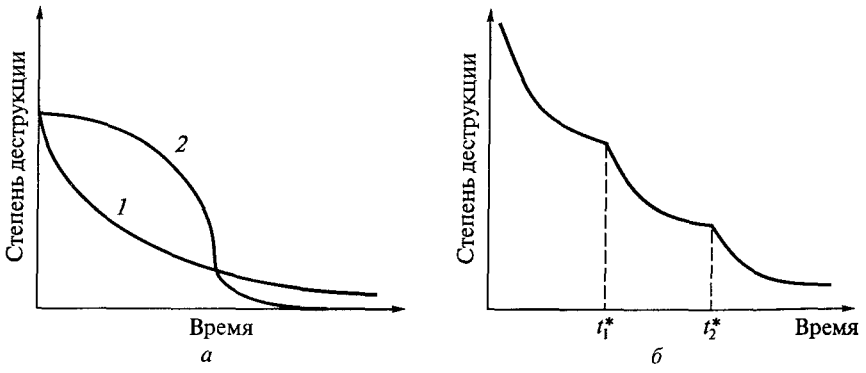


Рис. 14.12. Механизмы кинетики деструкции ксенобиотиков:

а — *1* — биокаталитическая экспоненциальная деструкция; *2* — биодеструкция, связанная с ростом микроорганизмов; *б* — ускорение биодеструкции путем введения дополнительной порции микроорганизма (t_1^*, t_2^* — моменты ввода микроорганизма)

Таблица 14.3

Содержание углеводородов в воде при очистке речной и озерной поверхности от нефти на одном из месторождений Западной Сибири

Очистка реки		Очистка озера	
Время, сут	Содержание углеводородов, мг/л	Время, сут	Содержание углеводородов, мг/л
0*	440	0*	151
14*	52	10	78
28*	0,04	24*	6,56
—	—	50	0,005

* Время введения культуры *Rhodococcus.*

закону (см. рис. 14.12, *а*, линия *1*)), процесс может быть интенсифицирован введением дополнительной порции микроорганизма (рис. 14.12, *б*).

Например, кинетика деструкции нефтяных выбросов под действием культуры *Rhodococcus* описывается экспоненциальной зависимостью. Поэтому для достижения высокой степени очистки водной поверхности или воды от загрязнения нефтью необходимо вводить в процесс биокатализатор несколько раз (табл. 14.3).

Видно, что двумя-тремя процедурами введения биокатализатора можно в течение месяца уменьшить содержание углеводородов в 10^4 раза.

Адаптация микроорганизма к ксенобиотику. При деструкции ксенобиотиков микроорганизмами часто наблюдается феномен адаптации микроорганизма к данному веществу. Это проявляется в том, что на первом этапе на кинетической кривой роста микроорганизма (или на кинетической кривой деструкции ксенобиотика) наблюдается период индукции (адаптации), иногда очень продолжительный. Последующий этап осуществляется очень быстро (без периода индукции) уже под действием адаптированных клеток.

Количественная теория исходит из представления о том, что в течение периода индукции происходит синтез необходимых ферментных систем с формированием соответствующего состояния клетки, способной активно расти в режиме деструкции ксенобиотика. Кинетическая схема процесса может быть представлена в виде

$$N \xrightarrow{k_a} N_a \xrightarrow{\mu} 2N_a,$$

где k_a — константа скорости процесса адаптации; μ — удельная скорость роста адаптированных клеток.

Зависимость числа клеток N в системе от времени может быть представлена функцией

$$\ln\frac{N_a}{N_0} = \mu + \ln\left\{\frac{k_a}{k_a+\mu}\left[1+\frac{\mu}{k_a}\exp(-k_a+\mu)t\right]\right\},$$

где N_0 — начальная концентрация клеток.

При большой продолжительности процесса кривая вырождается в линейную функцию от времени

$$\ln\frac{N_a}{N_0} = \mu t + \ln\frac{k_a}{k_a+\mu}.$$

Тангенс угла наклона графика этой зависимости равен удельной скорости роста клеток; отрезок, отсекаемый прямой на оси времени, равен периоду индукции

$$\tau = \frac{1}{\mu}\ln\left(1+\frac{\mu}{k_a}\right).$$

Таким образом, адаптация клеток в первом приближении проявляется в существенном уменьшении периода индукции. Как следует из приведенного уравнения, это может быть достигнуто в первую очередь увеличением удельной скорости роста микроорганизма.

Прием, который используется для адаптации клеток, заключается в выращивании клеток в присутствии ксенобиотика на средах с эффективным для данного микроорганизма субстратом (косубстратом).

Рассмотрим особенности этого подхода на примере биоминерализации продуктов химической нейтрализации иприта и 4-аминосалициловой кислоты. Один из подходов к уничтожению химического оружия заключается в использовании двухстадийной схемы, которая включает нейтрализацию активного агента химическими соединениями и последующую биодеградацию продуктов нейтрализации и избытка нейтрализатора.

Нейтрализация иприта этаноламином происходит по схеме

$$\underset{\text{Иприт}}{S(CH_2CH_2Cl)_2} \xrightarrow{HOCH_2CH_2NH_2} \underset{\text{Тиодигликоль}}{S(CH_2CH_2OH)_2} \xrightarrow{H_2O}$$

$$\rightarrow \underset{\text{Меркаптоэтанол}}{HSCH_2CH_2OH} + \underset{\text{Этиленгликоль}}{HOCH_2CH_2OH}$$

Таким образом, компонентами реакционной среды после химической нейтрализации иприта являются этаноламин, этиленгликоль, меркаптоэтанол и тиодигликоль. Каждое из этих соединений подвергается биоминерализации под действием анаэробного консорциума микроорганизмов (табл. 14.4).

Видно, что наибольшие трудности при анаэробной биоминерализации представляет тиодигликоль. Инкубация в течение 6 ме-

Таблица 14.4

Способность к биодеградации компонентов реакционной среды после химической нейтрализации иприта этаноламином

Вещество	Период индукции, сут	Время инкубации, сут	Степень деградации, %
Этаноламин	8	22	100
Меркаптоэтанол	0	55	30
Этиленгликоль	2	6	100
Тиодигликоль	52	185	42
Тиодигликоль + уксусная и пропионовая кислоты	0	32	100

сяцев приводит к конверсии всего 42 % вещества, при этом период индукции составляет почти два месяца.

Другой опыт по биодеградации тиодигликоля был поставлен с участием уксусной и пропионовой кислот как косубстратов процессов разложения. В табл. 14.4 приведены данные по биоминерализации тиодигликоля в присутствии косубстратов. Видно, что полное разложение вещества достигается за месяц, при этом период индукции отсутствует.

Ассоциации микроорганизмов. Реализация «невозможных» химических реакций. Природные процессы минерализации органических соединений, как правило, являются результатом действия не одного микроорганизма, а группы химически структурированных в симбиотическую ассоциацию микроорганизмов.

Наиболее подробно исследованы симбиотрофные ассоциации микроорганизмов, в рамках действия которых конечный продукт метаболизма одного микроорганизма является субстратом для другого. Один из наиболее ярких примеров — микробная анаэробная биоминерализация биомассы с образованием метана и углекислого газа. Последовательное действие микроорганизмов ассоциации является не просто необходимым условием последовательной деструкции веществ, приводящей к полной минерализации биомассы. Объединенные в ассоциацию микроорганизмы дают принципиально новое качественное состояние — в ассоциации протекают химические реакции, которые практически невозможны в одностадийный процессах. Микробная анаэробная ассоциация метангенерирующих бактерий — это яркий пример такого рода процессов.

Вода как окислитель связи углерод—углерод. Ответ на вопрос: может ли вода играть роль окислителя связи углерод—углерод при нормальных условиях в отсутствие радиационной активации — будет отрицательным.

Однако процессы

$$CH_3CH_2CH_2COOH + 2H_2O \longrightarrow 2CH_3COOH + 2H_2$$

$$CH_3CH_2OH + H_2O \longrightarrow CH_3COOH + 2H_2$$

протекают весьма эффективно в биокаталитических системах с участием ассоциаций микроорганизмов. Исследование анаэробного разложения масляной кислоты ассоциацией микробов показало, что на начальных этапах реакции масляная кислота практически стехиометрически превращается в две молекулы уксусной кислоты. Процесс протекает в строго анаэробных условиях и единственным источником необходимого количества атомов кислорода является вода. Окислительное расщепление связи С—С в анаэробных условиях стало возможным благодаря эффективному сопряжению двух принципиально различных стадий процесса — термодинамически невыгодного окисления алифатической кислоты водой и эффективного удаления образующегося водорода и уксусной кислоты действием метаногенных микроорганизмов.

Рассмотрим термодинамику процессов конверсии алифатических кислот с учетом стадий образования метана. Схему анаэробной конверсии алифатических кислот, содержащих n атомов углерода, в метан можно представить в виде

$$C_{n-1}H_{2n-1}COO^- + 2H_2O \rightleftarrows C_{n-3}H_{2n-5}COO^- + CH_3COO^- + 2H_2 + H^+,$$

$$\Delta G^\circ = 48{,}3 \text{ кДж/моль};$$

$$C_{n-3}H_{2n-5}COO^- + 2H_2O \rightleftarrows C_{n-5}H_{2n-9}COO^- + CH_3COO^- + 2H_2 + H^+,$$

$$\Delta G^\circ = 48{,}3 \text{ кДж/моль};$$

$$C_2H_5COO^- + 3H_2O \rightleftarrows CH_3COO^- + 3H_2 + HCO_3^- + H^+,$$

$$\Delta G^\circ = 76{,}3 \text{ кДж/моль};$$

$$CH_3COO^- + H_2O \rightleftarrows CH_4 + HCO_3^-, \quad \Delta G^\circ = -31{,}0 \text{ кДж/моль};$$

$$HCO_3^- + 5H^+ + 2H_2 \rightleftarrows CH_4 + 3H_2O, \quad \Delta G^\circ = -135{,}6 \text{ кДж/моль};$$

$$HCO_3^- + H^+ \rightleftarrows CO_2 + H_2O, \quad \Delta G^\circ = -4{,}8 \text{ кДж/моль}.$$

Суммарное уравнение:

$$C_nH_{2n-1}O_2^- + H^+ + {}^{(n-2)}/_2H_2O \rightleftarrows {}^{(3n-2)}/_4CH_4 + {}^{(2+n)}/_4CO_2$$

Как видно, при любом числе атомов углерода в алифатической кислоте конверсия кислоты в метан является термодинамически выгодным процессом, причем добавление к конвертируемой алифатической кислоте одной CH_2-группы приводит к дополнительному выигрышу в свободной энергии Гиббса около 2,65 кДж/моль. Если данные по ΔG° пересчитать на 1 моль образовавшегося мета-

на, то получим значение, не зависящее от количества атомов углерода в кислоте, равное 35,4 кДж/моль.

Таким образом, объяснение необычному действию воды как агента, осуществляющего окислительное расщепление связи С—С, связано с действием микроорганизма, эффективно поглощающего молекулярный водород. Этот процесс характеризуется наибольшей отрицательной свободной энергией реакции.

Кинетическая модель метаногенеза. Динамика процесса образования метана в результате анаэробной конверсии метангенерирующей ассоциацией микроорганизмов детально исследована экспериментально и теоретически. Исследование заключалось в экспериментальном изучении кинетики разложения исходного субстрата и многочисленных промежуточных веществ, а также динамики образования конечных продуктов — метана и диоксида углерода. В качестве исходных соединений были исследованы вещества разных классов: углеводы (целлюлоза, ксилан, глюкоманнан, галактоманнан, глюкоза, галактоза, манноза, ксилоза, арабиноза); аминокислоты и белки (альбумин, лизин, аланин, глутамин, аспарагин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота); алифатические спирты и кислоты (метанол, этанол, уксусная, пропионовая, масляная, изомасляная, валериановая, изовалериановая, капроиловая и каприловая кислоты); ароматические фосфорорганические соединения (*п*-нитрофенол, фенол, бензойная кислота, индиго, диэтилфосфорная кислота).

Для каждого соединения изучено изменение во времени концентрации всех низкомолекулярных компонентов. Типичные наблюдаемые зависимости приведены на рис. 14.13, 14.14.

Схема химических превращений веществ под действием ассоциаций микробов составлена исходя из предположения, что минимальное количество микроорганизмов, вовлеченных в процесс, равно четырем. Например, для глюкозы базовыми химическими реакциями являются

$$C_6H_{12}O_6 + H_2O \xrightarrow{X_1} C_2H_5OH + C_3H_7COOH + CO_2 + H_2$$

$$C_2H_5OH + H_2O \xrightarrow{X_2} CH_3COOH + 2H_2$$

$$C_3H_7COOH + 2H_2O \xrightarrow{X_2} 2CH_3COOH + 2H_2$$

$$CH_3COOH \xrightarrow{X_3} CH_4 + CO_2$$

$$4H_2 + CO_2 \xrightarrow{X_4} CH_4 + 2H_2O$$

где X_1—X_4 — соответствующие микроорганизмы. Микроорганизм X_1 осуществляет расщепление глюкозы с образованием алифатических спиртов и кислот, X_2 — β-окисление кислот и спиртов водой, X_3, X_4 — образование метана из уксусной кислоты и CO_2 соответственно.

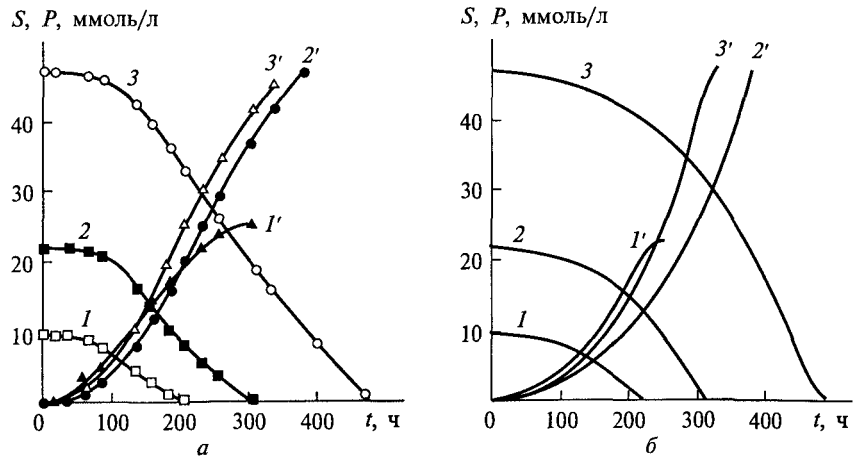


Рис. 14.13. Кинетика анаэробной конверсии масляной кислоты (*1*—*3*) и образования продукта конверсии — метана (*1'*—*3'*) при начальной концентрации масляной кислоты 10 (*1*, *1'*), 22 (*2*, *2'*), 47 (*3*, *3'*) ммоль/л:

а — экспериментальные данные; *б* — результаты расчета

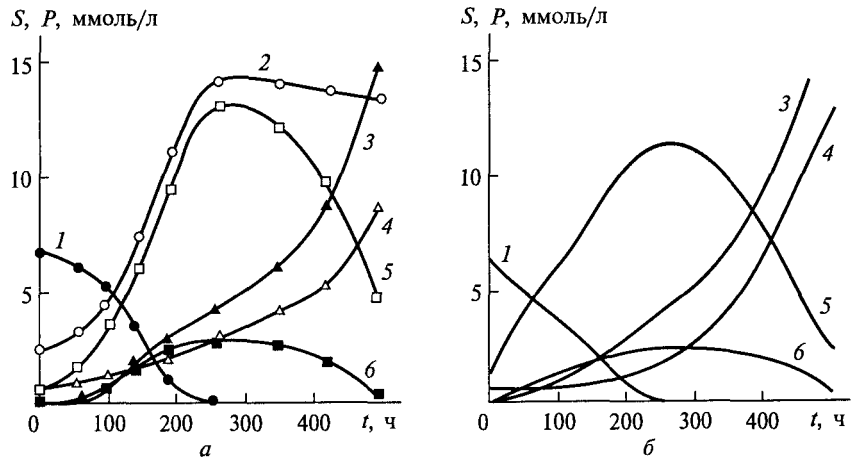


Рис. 14.14. Кинетика анаэробной конверсии лизина (*1*) и образования продуктов конверсии: аммиака (*2*), метана (*3*), диоксида углерода (*4*), уксусной кислоты (*5*), пропионовой кислоты (*6*):

а — экспериментальные данные; *б* — результаты расчета

В результате экспериментального и теоретического анализа удалось построить адекватную экспериментальным данным динамическую модель метаногенеза, а также получить численные характеристики (константы) отдельных стадий. Последние четыре ре-

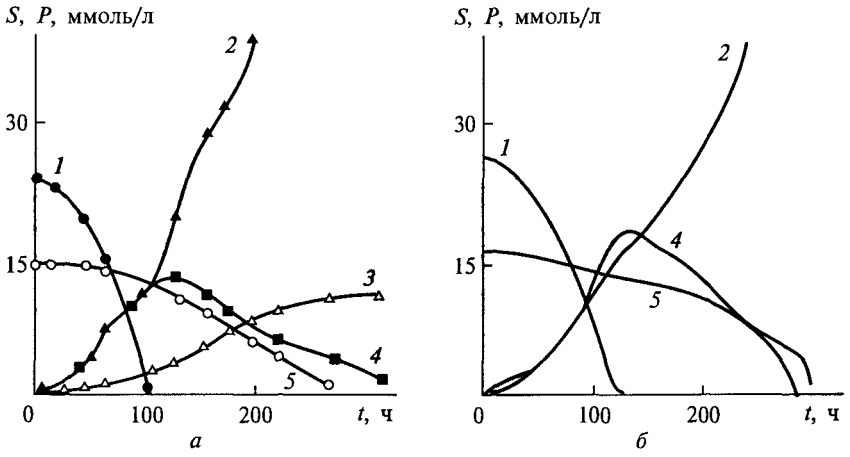


Рис. 14.15. Кинетика анаэробной конверсии смеси масляной кислоты и этанола (*1*) и образования продуктов конверсии: метана (*2*), диоксида углерода (*3*), уксусной кислоты (*4*), пропионовой кислоты (*5*):

а — экспериментальные данные; *б* — результаты расчета

акции схемы являются общими для любых веществ, подвергающихся метаногенезу. Модель позволяет предсказать динамику разложения различных веществ и их смесей (рис. 14.15), а также динамику образования промежуточных и конечных веществ при наблюдении за реакцией в течение небольшого периода времени в начале процесса.

* * *

Образование — это то, что остается после того, когда человек забыл все, чему его учили.

А. Эйнштейн

Глубокое понимание ферментов как химических объектов, широкая распространенность биокатализаторов и создание современных методов конструирования белковой молекулы обеспечили многообразные сферы применения ферментов. Методами химической модификации (см. гл. 2), генетической и белковой инженерии (см. гл. 10) создаются белковые катализаторы самых разнообразных химических реакций. Можно с уверенностью утверждать, что в недалеком будущем возникнут методы конструирования ферментов для любой химической реакции.

Заметным этапом в развитии инженерной энзимологии стало создание гетерогенных катализаторов на основе иммобилизованных ферментов (см. гл. 11). Не менее важным является освоение методов использования ферментов в нетрадиционных средах, та-

ких как органические растворители. Это существенно расширило область применения ферментов.

Сегодня ферменты используются при химическом синтезе сложных органических молекул, химическом анализе, в электрокатализе, фармацевтической индустрии, пищевой промышленности, бытовой химии, сельском хозяйстве, при решении проблем сохранения окружающей среды. Вклад ферментативного катализа в технологическое обеспечение общества в настоящее время сопоставим с вкладом классического химического катализа. Роль химической и инженерной энзимологии в будущем будет возрастать. Так что читателям этой книги предстоит еще многое сделать.

СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ

Абзим — антитело, обладающее каталитической активностью.

Автоиммунные заболевания — заболевания, вызванные реакцией иммунной системы, при которых происходит синтез антител на собственные белки (например, ревматоидный артрит).

Автокатализ — механизм «размножения» катализатора, в рамках которого образовавшийся катализатор активирует каталитически неактивный предшественник (например, система трипсиноген—трипсин).

Автотрофы — микроорганизмы, которые для своего роста нуждаются только в неорганических веществах.

Агароза — высокоочищенное производное агара, используемое в качестве носителя при электрофорезе и хроматографии.

Аглютинация — агрегация клеток, суспензированных в жидкости, под действием какого-либо агента.

Агонист — соединение (часто гормон или его аналог), которое связывается с рецептором и вызывает аналогичное гормону действие.

Активатор — вещество, увеличивающее скорость ферментативной реакции.

Активный транспорт — энергозависимый транспортный механизм, осуществляющий транспорт веществ против градиента концентрации.

Активный центр — область белковой глобулы, осуществляющая связывание (сорбционный подцентр) и химическую трансформацию (каталитический подцентр) субстрата.

Аликвота — представительный образец раствора фиксированной пропорции с основным.

Алкалоид — азотсодержащий продукт растительного происхождения, обычно обладающий фармакологической активностью (например, морфин, никотин, стрихнин).

Аллостерия, аллостерическая регуляция — модификация связывания или каталитических свойств белка за счет регулятора на центре, отличном от центра связывания лиганда или субстрата.

Альфа(α)-спираль — элемент вторичной структуры белка; правозакрученная спираль полипептидной цепи, в которой каждый амидный атом азота образует водородную связь с карбонильной группой четвертой аминокислоты.

Амплификация — увеличение количества какого-либо биохимического агента (например, увеличение количества ДНК с помощью полимеразной цепной реакции).

Амфолит — молекула, содержащая одновременно кислотную и основную группы (например, молекула аминокислоты).

Анаболизм — энергопоглощающий путь метаболизма, приводящий к синтезу макромолекул или их составных частей (например, гликонеогенезис, синтез жирных кислот).

Аналит — материал, подвергаемый анализу.

Антагонист — соединение (часто аналог гормона), которое связывается с рецептором, но не вызывает физиологического эффекта (см. агонист).

Антибиотик — природный, синтетический или полусинтетический продукт, ингибирующий рост бактерий.

Антиген (иммуноген) — вещество, вызывающее синтез антител, связывающих антиген.

Антигенная детерминанта (эпитон) — часть антигена, на которую направлено действие антитела.

Антикодон — последовательность из трех нуклеотидов в молекуле тРНК, комплементарная триплету мРНК (кодону), определяющая выбор аминокислоты в процессе рибосомного синтеза белка.

Антиметаболит — ингибитор ключевого фермента метаболизма.

Антиоксидант — химический поглотитель свободных радикалов кислорода (например, аскорбиновая кислота, α-токоферол, восстановленный глутатион и др.).

Антитело — молекула иммуноглобулина, образующая прочный специфический комплекс с другой (обычно чужеродной) молекулой, называемой антигеном.

Апоптоз — охарактеризованный по морфологическим признакам процесс программируемой смерти клетки.

Апротинин — панкреатический ингибитор протеиназ быка.

Аптамер — полинуклеотидный лиганд, селектированный на связывание с целевым белком или другим полимером.

АТФаза — фермент, гидролизующий АТФ.

Аффинная хроматография — разделение растворимых макромолекул с использованием в качестве стационарной фазы сорбента, специфически связывающего выделяемую молекулу.

Ацилфермент — промежуточное соединение в ферментативной реакции.

Бактериофаг — вирус, инфицирующий бактерии.

Белок теплового шока — белок, продуцируемый некоторыми клетками как результат воздействия температуры.

Бета(β)-структура (β-складка, β-тяж) — элемент вторичной структуры белка, в котором амидный атом азота одной части по-

липептида образует водородную связь с атомом кислорода карбонильной группы другой части полипептида.

Биолюминесценция — хемилюминесцентная эмиссия света живыми организмами на основе использования специфических ферментов.

Биоремедиация — процесс очистки окружающей среды от ксенобиотиков, основанный на использовании микроорганизмов.

Биосенсор — биоэлектронное аналитическое устройство, преобразующее концентрационный сигнал в электрический в режиме реального времени.

Блотинг — контактный перенос макромолекул из двумерной среды (например, из полиакриламидного геля) на поверхность более высокой аффинности (например, на нитроцеллюлозу или нейлон).

В-клетки (В-лимфоциты) — лимфоциты, которые могут быть активированы и переведены на стадию размножения (пролиферации) и которые способны синтезировать и секретировать иммуноглобулин G, связывающий антиген.

Вторичная структура белка — регулярные элементы структуры белковой молекулы, такие как α-спирали, β-листы.

Гаптен — низкомолекулярное вещество, само по себе не обладающее антигенной активностью, которое, однако, при присоединении к макромолекуле приобретает это свойство.

Ген смерти — ген, экспрессия которого ассоциируется с апоптозом, например ген Ca^{+}-зависимой эндонуклеазы, которая расщепляет экспонированные области хроматина, продуцируя фрагменты ДНК.

Гетеротрофы — микроорганизмы, которые для своего роста нуждаются в органических веществах.

Гибридома — клетка-продуцент моноклональных антител, гибрид клеток миеломы (раковых клеток) и лимфоцитов; способна размножаться как клетки миеломы и синтезировать антитела как лимфоциты.

Гидрофильный фрагмент — боковая группа аминокислоты, несущая заряд или содержащая полярную группу.

Гидрофобная связь — ассоциация неполярных групп, движущей силой образования которой является неблагоприятное взаимодействие молекул воды с неполярными группами.

Гистон — один из пяти белков, входящих в хроматин.

Гликозилирование — посттрансляционная модификация белка путем присоединения углеводных остатков.

Глюконеогенез — биосинтез глюкозы из молекул неуглеводной природы (например, аминокислот, молочной кислоты или глицерина).

Гомеостаз — саморегуляция организма, приводящая к установлению относительно постоянного внутреннего содержания.

Гомологичность — сходство структур белков по последовательности аминокислот.

Грамотрицательные бактерии — бактерии, имеющие две клеточные мембраны.

Грамположительные бактерии — бактерии, имеющие одну клеточную мембрану.

Декстран — разветвленный полисахарид микробного происхождения.

Денатурация — деструкция нормально структурированного биополимера (белка или нуклеиновой кислоты) с потерей его функциональных свойств.

Дендрограмма (филогенетическое дерево, эволюционное дерево) — реконструкция эволюционного сродства различных объектов, показывающая происхождение из общих предшественников.

Десенсетизация — потеря рецептором или ферментом чувствительности к лиганду.

Диализ — техника отделения макромолекул от низкомолекулярных веществ путем диффузии последних через полупроницаемую мембрану, например целлофан.

Диауксия — рост бактерий в две стадии, имеющий место, когда бактерия выращивается на среде с двумя источниками углерода.

Диафораза — оксидоредуктаза, переносящая электроны от НАДН к редокс-красителю или ферроцианиду калия.

Диоксигеназа — фермент, который восстанавливает молекулярный кислород с введением обоих атомов кислорода в субстрат (в отличие от монооксигеназы) (например, триптофандиоксигеназа).

Диффузии коэффициент — мера молекулярной подвижности вещества в растворе или геле за счет броуновского движения.

Докинг — компьютерное моделирование комплексообразования двух молекул.

Домен — область глобулярного белка, имеющая собственную третичную структуру.

Иммуноглобулин — один из белков крови, ответственный за «узнавание» чужеродного соединения.

Ингибитор — соединение, блокирующее ферментативную активность за счет взаимодействия с активным или аллостерическим центром белка.

Интерферон — белок, синтезируемый и секретируемый клеткой в ответ на вирусную инфекцию.

Интрон — включенная в ген последовательность нуклеотидов, не несущая генетической информации.

Калпаин — кальцийзависимая клеточная протеиназа, активная при нейтральных значениях pH.

Капсид — белок оболочки вируса.

Каскад — серия ферментативных реакций, на каждой стадии которых происходит превращение неактивного фермента в активный.

Катаболизм — энергопроизводящие пути метаболизма, при которых происходит деградация макромолекул или других соединений в CO_2, H_2O.

Катал — мера каталитической активности, соответствующая скорости конверсии 1 моля субстрата в течение 1 с.

Каталитическая константа скорости — константа скорости реакции первого порядка, которая описывает лимитирующую стадию каталитического цикла; определяется как отношение максимальной скорости реакции к концентрации активных центров.

Катепсин — эндопептидаза, обычно работающая при низких значениях pH.

кДНК — комплементарная ДНК; синтезируется обратной транскриптазой на матрице мРНК и поэтому не содержит интронов.

Клон — колония клеток, произошедших из одной родительской и поэтому генетически идентичных.

Кодон — последовательность из трех нуклеотидов, кодирующая одну аминокислоту.

Кодон-терминатор — полинуклеотидный триплет, сигнализирующий об окончании синтеза белка с С-конца.

Комбинаторный процесс — процесс описания или генерирования родственных молекул (например, нуклеиновых кислот, полипептидов, низкомолекулярных соединений), которые могут быть исследованы и отобраны по какому-либо желаемому свойству; коллекцию таких молекул называют комбинаторной библиотекой.

Конкурентное ингибирование — механизм ингибирования, при котором ингибитор конкурирует с субстратом за центр связывания на активном центре фермента.

Константа специфичности — наблюдаемая константа скорости реакции второго порядка; определяемая как отношение каталитической константы скорости к константе Михаэлиса.

Кофермент — косубстрат в некоторых ферментативных реакциях, который присутствует в ограниченном количестве *in vivo* и который требует регенерации за счет сопряженных реакций (например, коэнзим А, $НАД^+$, ФАД).

Культура клетки — техника выращивания *in vitro* генетически однородных клеток животных или растений, обычно на комплексной богатой среде.

Лак-оперон — структурные и ассоциированные регуляторные гены, контролирующие способность *E. coli* расти на лактозе.

$ЛД_{50}$ — доза токсичного агента, вызывающего смерть 50 % клеток или животных.

Лиаза — класс ферментов, обеспечивающих присоединение одного субстрата к двойной связи другого.

Лигаза — класс ферментов, обеспечивающих присоединение двух субстратов с использованием энергообеспечивающей реакции (обычно реакции гидролиза АТФ); фермент, осуществляющий легирование — присоединение 3′-конца одной полипептидной цепи к 5′-концу другой.

Лигнин — нерегулярный полимер древесных растений, образуемый окислением шикимовой кислоты с образованием С—С и С—О связей.

Лизат — продукт лизиса.

Лизис — разрушение стенки и мембраны клетки, за которым следует переход содержимого клетки в раствор.

Лизосома — клеточная визикула, содержащая гидролитические ферменты, активируемые при низком значении pH.

Липопротеин — комплекс липидов с белком, обеспечивающий транспорт липидов в крови.

Липосома — синтетическая визикула, образуемая дисперсией полярных липидов в водной среде.

Лок-аут — животные или растения, лишенные какого-либо специфического гена; используются для выяснения роли гена в биохимии и физиологии организма.

Макрофаг — вид фагоцитирующих клеток иммунной системы.

Максимальная скорость реакции — предельная скорость ферментативной реакции, наблюдаемая при насыщении фермента субстратом.

Митоген — соединение, индуцирующее клеточное деление.

Митоз — клеточное деление, приводящее к образованию дочерней клетки с полным набором хромосом родительской.

Митохондрия — органелла эукариотических клеток, ответственная за окислительное фосфорилирование, цикл трикарбоновых кислот, β-окисление.

Моноклональные антитела — иммуноглобулины, представляющие собой полностью идентичные молекулы — продукты секреции клеток клоном, имеющим одну клетку предшественника; обычно получают, используя гибридомы.

мРНК — РНК, содержащие кодированную информацию для синтеза белка.

Мутаген — соединение, которое вызывает мутацию химической модификацией основания ДНК.

Нейротрансмиттер — вещество, осуществляющее передачу сигнала от одной нервной клетки к другой в синапсе (например, ацетилхолин, дофамин, норадреналин).

Нуклеозид — пуриновое или пиримидиновое основание, связанное с остатком рибозы или дезоксирибозы.

Нуклеотид — нуклеозид, фосфорилированный одной, двумя или тремя фосфатными группами по 3′- или 5′-положению.

Нуклеофил — соединение или функциональная группа, способная притягивать к себе протон, ядро другого атома или положительно заряженную частицу.

Обратная транскриптаза — ДНК-полимераза, использующая РНК в качестве матрицы.

Олигомер — полимерная молекула с невысокой степенью полимеризации.

Онкобелок — продукт трансляции онкогена.

Онкоген — ген, присутствующий в нормальной клетке, активация которого ведет к трансформации клетки в раковую.

Оксидоредуктазы — класс ферментов, осуществляющих реакцию окисления одного субстрата за счет восстановления другого (например, дегидрогеназы, пероксидазы, оксидазы).

Оператор — участок ДНК, контролирующий транскрипцию путем связывания с репрессором или активатором.

Палиндром — сегмент двойной цепи полинуклеотида, в которой порядок оснований в одной цепи (читаемой от 5′ к 3′) тот же самый, что и в комплементарной антипараллельной цепи.

Пептидаза — фермент, расщепляющий пептидные связи в белках и пептидах.

Первичная структура — последовательность аминокислот в белке.

Пероксидаза — гем-зависимый фермент, окисляющий различные молекулы, использующий в качестве окислителя пероксид водорода.

Пиримидины — один из двух классов гетероциклических органических оснований, входящих в нуклеиновые кислоты (урацил и цитозин в РНК, урацил и тимин в ДНК).

Плазма — жидкая фаза цельной крови.

Плазмида — саморазмножающийся внехромосомный циклический элемент наследственности; используется в качестве вектора при введении новых генов в бактерии.

Полилинкер — короткий участок ДНК, содержащий несколько центров рестрикции; вводится в вектор для последующего использования при включении нужных фрагментов ДНК.

Полимеразная цепная реакция — техника амплификации нужных участков ДНК с помощью ДНК-полимеразы.

Праймер — олигонуклеотид, гибридизующийся с матрицей ДНК в полимеразной реакции.

Прион — белковый инфекционный агент, вызывающий дегенеративные нейрологические заболевания типа болезни Крейтцфельда—Джакоба.

Промотер — фрагмент двухцепочечной ДНК, регулирующий связывание и активность РНК-полимеразы.

Простагландин — производное арахидоновой кислоты, содержащее циклопентановое кольцо.

Протеинкиназа — фермент, использующий АТФ для фосфорилирования белков по гидроксильной группе серина, треонина или тирозина.

Протеома — (аналогично геному) обобщенный термин, описывающий белковое содержание клетки.

Пурины — один из двух классов гетероциклических органических оснований, входящих в нуклеиновые кислоты, большей частью аденин и гуанин.

Рацемическая смесь — смесь эквимолярных количеств двух энантиомеров.

Рекомбинация — природное или синтетическое получение ДНК из полинуклеотидов более чем одного организма.

Релаксация — изменение состояния системы при переходе к новому состоянию при быстром изменении внешних условий (скачок температуры, pH, давления).

Ренатурация — возвращение белка в нативную структуру из денатурированной.

Ренин — аспартатная протеиназа, секретируемая почками, осуществляющая конверсию ангиотензиногена в ангиотензин (не путать с реннином).

Реннин (химозин) — аспартатная протеиназа, секретируемая желудком новорожденных животных для сворачивания молока.

Репрессор — белок регуляции транскрипции, связывающийся с оператором и вызывающий репрессию.

Ретровирус — вирус с геномом РНК.

Рибозим — молекула РНК, обладающая каталитической активностью.

Рибосома — клеточная органелла, комплекс молекул РНК и белков, осуществляющий синтез белка на матрице мРНК.

рРНК — рибосомальная РНК.

Сайт-направленный (сайт-специфический) мутагенез — техника изменения гена с желаемой точечной мутацией; основана на замене одного кодона в полинуклеотидной цепи на другой.

Сериновые протеиназы — тип пептидаз, содержащих в активном центре гидроксильную группу серина (α-химотрипсин, субтилизин и др.).

Сплайсинг — процесс, в результате которого из последовательности полинуклеотида исключается интрон.

Субстрат — реагент в ферментативной реакции.

Субъединица — молекула белка, обладающая третичной структурой.

Транскрипция — синтез РНК с матрицы ДНК.

Трансляция — синтез белка на матрице мРНК.

Трансфераза — класс ферментов, осуществляющих перенос химической группы от одной молекулы к другой (например, киназа, фосфорилаза, трансаминаза).

Третичная структура — трехмерная структура белка.

Триплет — кодон аминокислоты, включающий три нуклеотида в генетическом коде.

тРНК — транспортные РНК, участвующие в выборе аминокислоты при биосинтезе белка, субстрат аминоацил-тРНК-синтетазы.

Фаг-бактериофаг — вирус, поражающий бактерии.

Фагмида — многофункциональный вектор, гибрид плазмиды и бактериофага, использующий многие полезные свойства обоих.

Фактор роста — белок, который связывается с рецепторами на клетках и ускоряет их размножение.

Фосфолипид — продукт ковалентного присоединения фосфорной кислоты к липиду (например, фосфоациллицерин, сфингомиелин).

Фототроф — организм, обеспечивающий себя энергией за счет света.

Хемотроф — микроорганизм, который получает энергию за счет химической реакции (обычно реакции окисления энергоемкого субстрата кислородом).

Химерные антитела (гуманицированные антитела) — гибридные иммуноглобулины, состоящие из части антитела человека и части антитела другого организма.

Хиральность — формальная ориентация в пространстве стереоизомеров.

Хлоропласт — органелла клеток зеленых растений, поглощающая свет и осуществляющая синтез АТФ.

Хроматин — комплекс ДНК с ассоциированными белками и клетками эукариотов.

Хромафор — химическая группа в молекуле или полимере, ответственная за поглощение видимого или ультрафиолетового света.

Цистрон — сегмент ДНК, который содержит всю информацию, необходимую для синтеза полипептидной цепи, включает как структурную (кодирующую) последовательность, так и регуляторную последовательность.

Четвертичная структура — организация в пространстве полипептидных субъединиц при формировании многосубъединичных белков.

Шаперон — многокомпонентная система, обеспечивающая правильное сворачивание (фолдинг) полипептидной цепи в белки.

Эйкозаноиды — класс соединений, включающий простагландины, тромбоксаны, лейкотриены; все соединения этого класса происходят от арахидоновой кислоты.

Экзопептидаза — пептидаза, которая расщепляет белок последовательно, начиная с N-концевой пептидной связи.

Экспрессионный вектор — плазмида или бактериофаг, используемый как переносчик генетической информации в клетку, в которой синтезируются кодированные белки.

Экспрессия — производство продукта гена (белка или РНК) с гена.

Электрофорез — техника разделения заряженных частиц в соответствии с их подвижностью в электрическом поле.

Эндонуклеаза рестрикции — представитель группы ферментов, расщепляющий внутренние фосфодиэфирные связи обоих цепей ДНК в области специфических нуклеотидных последовательностей.

Эндопептидаза — пептидаза, расщепляющая белок по внутренней белковой связи.

Эндоцитоз — процесс поглощения клеткой экстраклеточного материала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Березин И. В., Колесов А. А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. — М.: Изд-во МГУ, 1970.

Березин И. В., Мартинек К. Основы физической химии ферментативного катализа. — М.: Высш. шк., 1977.

Варфоломеев С. Д., Гуревич К. Г. Биокинетика. — М.: ФАИР-ПРЕСС, 1999.

Варфоломеев С. Д., Зайцев С. В. Кинетические методы в биохимических исследованиях. — М.: Изд-во МГУ, 1982.

Варфоломеев С. Д., Калюжный С. В. Биотехнология. Кинетические основы микробиологических процессов. — М.: Высш. шк., 1990.

Введение в прикладную энзимологию / Под ред. И. В. Березина, К. Мартинека. — М.: Изд-во МГУ, 1982.

Дамаскин Б. Б., Петрий О. А. Введение в электрохимическую кинетику. — М.: Высш. шк., 1975.

Дженкс В. Катализ в химии и энзимологии. — М.: Мир, 1972.

Диксон М., Уэбб Э. Ферменты: В 3 т. — М.: Мир, 1982.

Кнорре В. Г., Мызина С. Д. Биологическая химия. — М.: Высш. шк., 1992.

Ленинджер Д. Основы биохимии: В 3 т. — М.: Мир, 1985.

Мецлер Д. Биохимия: В 3 т. — М.: Мир, 1980.

Овчинников Ю. А. Биоорганическая химия. — М.: Просвещение, 1987.

Сингер М., Берн П. Гены — геномы: В 2 т. — М.: Мир, 1998.

Эмануэль Н. М., Кнорре Д. Г. Курс химической кинетики. — М.: Высш. шк., 1962.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие 3

Глава 1
ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ И ИССЛЕДОВАНИЯ ФЕРМЕНТОВ

Глава 2
ХИМИЯ БЕЛКА

2.1. Аминокислоты и пептидная связь 18
2.2. Модификация белков протонированием. Белки как полиэлектролиты 24
2.3. Химическая модификация аминокислот белков 27
2.4. Химическая модификация каталитически важных групп активного центра 39

Глава 3
СТРОЕНИЕ БЕЛКОВ

3.1. Молекулярные силы и взаимодействия 43
3.2. Первичная структура белков. Биоинформатика 57
3.3. Вторичная, третичная и четвертичная структура белков 61
3.4. Масс-спектрометрия биомакромолекул 66
3.5. Методы изучения структуры белков 68
3.6. Компьютерное молекулярное моделирование белков 71

Глава 4
КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА

4.1. Основные понятия химической кинетики 76
4.2. Стационарная кинетика ферментативных реакций. Кинетические схемы и механизмы 86
4.3. Нестационарная кинетика ферментативных реакций 102
4.4. Влияние температуры и показателя pH на скорость ферментативных реакций 106
4.5. Кинетика сопряженных ферментативных реакций. Полиферментные системы 110
4.6. Ингибирование ферментативных реакций 117

Глава 5
ИНАКТИВАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ

5.1. Схемы инактивации ферментов 129
5.2. Инактивация ферментов в процессе реакции 135
5.3. Инактивация ферментных систем 151

Глава 6
БИОЭЛЕКТРОКАТАЛИЗ. ЭЛЕКТРОННЫЙ ТРАНСПОРТ В БЕЛКОВЫХ СИСТЕМАХ

6.1. Ферменты как катализаторы электрохимических реакций 159
6.2. Кинетика электронно-транспортных процессов 168

Глава 7
СКОРОСТИ ЭЛЕМЕНТАРНЫХ СТАДИЙ В ФЕРМЕНТАТИВНОМ КАТАЛИЗЕ

7.1. Равновесные и кинетические стадии ферментативных реакций 186
7.2. Лимитирующие стадии ферментативных реакций 191
7.3. Бимолекулярные стадии ферментативных реакций 194
7.4. Конформационные изменения в ферментативных реакциях 199

Глава 8
ХИМИЯ КАТАЛИТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

8.1. Химические реакции, катализируемые ферментами. Классификация ферментов 214
8.2. Активные центры ферментов 220
8.3. Структура активных центров ферментов. Биоинформатика 224
8.4. Кислоты и основания в ферментативном катализе 233
8.5. Каталитические центры гидролаз. Молекулярные механизмы действия 237
8.6. Глицин, цистеин и пролин как структурообразующие аминокислоты 247
8.7. Оксидоредуктазы 249
8.8. Изомеразы. Триозофосфатизомераза 262
8.9. Трансферазы. ДНК-полимераза 263
8.10. Многоэлектронные процессы в активных центрах ферментов 266

Глава 9
СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

9.1. Специфичность как особое свойство ферментов 279
9.2. Электронное влияние заместителей на реакционный центр 280

9.3. Концепция стерического соответствия «ключ—замóк» 284
9.4. Концепция индуцированного соответствия 287
9.5. Концепция напряжений и деформаций 289
9.6. Двухцентровая модель. Комплексообразование активного центра с нереакционными фрагментами субстрата как фактор ускорения реакции 292
9.7. Стереоспецифичность ферментов 302
9.8. Специфичность ферментов: молекулярное приближение 305

Глава 10

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ ФЕРМЕНТОВ

10.1. Выделение и амплификация гена. Библиотека генов 314
10.2. Ферменты — инструменты генетической инженерии 317
10.3. Векторы 322
10.4. Кинетика репликации плазмид 328
10.5. Трансформация, трансфекция. Клоны и клонирование 341
10.6. Оптимизация экспрессии и выделение генно-инженерных белков 342
10.7. Сайт-направленный мутагенез 343

Глава 11

ГЕТЕРОГЕННЫЕ КАТАЛИЗАТОРЫ НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ И КЛЕТОК

11.1. Методы иммобилизации. Носители 346
11.2. Иммобилизованные клетки микроорганизмов 352
11.3. Иммобилизованные ферменты: новые свойства 354
11.4. Регулирование активности иммобилизованного фермента фазовым переходом носителя 357
11.5. Стабилизация ферментов при иммобилизации 359

Глава 12

МАКРОКИНЕТИКА РЕАКЦИЙ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ ФЕРМЕНТАМИ

12.1. Внешнедиффузионные эффекты 363
12.2. Внутридиффузионные эффекты 379

Глава 13

РЕАКТОРЫ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ ФЕРМЕНТАМИ

13.1. Особенности кинетики ферментативных реакций в открытых системах 392
13.2. Проточный реактор идеального вытеснения 395
13.3. Проточный реактор идеального перемешивания 400
13.4. Сравнение эффективности проточных реакторов 404
13.5. Множественность стационарных состояний открытых систем 407

Глава 14

ИНЖЕНЕРНАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ

14.1. Современные методы конструирования ферментов с необходимыми свойствами 411
14.2. Ферменты в нетрадиционных средах. Мицеллярная энзимология 414
14.3. Ферменты в органическом синтезе 418
14.4. Ферменты в аналитической химии 430
14.5. Ферменты как лекарственные препараты 444
14.6. Биокаталитические методы защиты окружающей среды 445

Словарь терминов 458

Список литературы 468

Учебное издание

Сергей Дмитриевич Варфоломеев

Химическая энзимология

Учебник

Редактор *И. Б. Ковалева*
Технический редактор *Е. Ф. Коржуева*
Компьютерная верстка: *Л. А. Вишнякова*
Корректоры *Н. А. Балашова, Л. В. Гаврилина*

Диапозитивы предоставлены издательством

Изд. № А-1297-I/2. Подписано в печать 29.10.2004. Формат 60×90/16.
Гарнитура «Таймс». Бумага тип. № 2. Печать офсетная. Усл. печ. л. 30,0.
Тираж 2000 экз. Заказ №14067.

Лицензия ИД № 02025 от 13.06.2000. Издательский центр «Академия».
Санитарно-эпидемиологическое заключение № 77.99.02.953.Д.004796.07.04 от 20.07.2004.
117342, Москва, ул. Бутлерова, 17-Б, к. 328. Тел./факс: (095)330-1092, 334-8337.

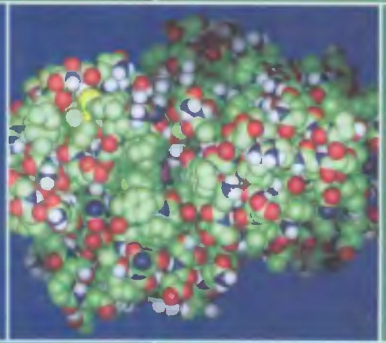
Отпечатано на Саратовском полиграфическом комбинате.
410004, г. Саратов, ул. Чернышевского, 59.

Высшее профессиональное образование

С. Д. Варфоломеев

ХИМИЧЕСКАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ

Учебник



Естественные науки

ACADEM'A