

УДК 577.325.2

## ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ КАТАЛИЗ (лекция по общей химии)

И.П. Черникович

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

*В лекции дана общая характеристика ферментов как природных катализаторов, изложены особенности их действия и кинетика катализа, роль в биологии и медицине.*

**Ключевые слова:** ферменты, особенности действия, катализ.

*A general characteristic of enzymes as natural catalysts is given in the lecture, the peculiarities of their action and catalysis kinetics, the role in biology and medicine are described.*

**Key words:** enzymes, peculiarities of action, catalysis.

Почти все химические реакции в живых организмах – каталитические. Биологический смысл этого вполне очевиден. Специфика внутренней среды клетки, где протекают многочисленные биохимические процессы, состоит в том, что она содержит весьма лабильные вещества, не допускающие присутствия «сильных» в химическом смысле реагентов (сильных кислот, оснований, окислителей, восстановителей и т.п.). В живых организмах невозможны жёсткие условия для химических реакций. Все процессы осуществляются при практически постоянной температуре, постоянном давлении, относительно невысоких концентрациях реагирующих веществ в нейтральной или близкой к нейтральной среде.

Вместе с тем, энергетические и материальные потребности организма весьма велики и покрываются за счёт пищи, состоящей из сравнительно устойчивых в химическом отношении веществ, часто с прочными связями, а также вдыхаемого с воздухом кислорода. Таким образом, в ходе возникновения и развития живых существ были востребованы и получили продолжение только те механизмы, которые обеспечивали высокую скорость осуществления биохимических процессов в относительно мягких условиях. По мере эволюции эта задача оказалась решённой путём создания биологических катализаторов – ферментов, способных высокоэффективно и специфически ускорять многочисленные и разнообразные по химической природе реакции, необходимые для сохранения и воспроизведения живого. Механизм этот возник, по видимому, на ранних этапах эволюции живой материи. Во всяком случае, фактически на всех известных человечеству уровнях эволюционного развития (от простейших форм живых организмов до высших, как в мире животных, так и в мире растений) без ферментативных процессов жизни не существует.

В связи с этим давно возникла проблема изучения механизма ферментативного катализа. С точки зрения биологии, познание сущности ферментативных реакций важно для понимания сложных процессов обмена веществ, их связи с физиологическими функциями организма и регуляции. Потребности современной медицины диктуют необ-

ходимость знания механизма ферментативных реакций для понимания природы нарушения биохимических процессов при заболеваниях и разработки методов ликвидации этих нарушений путём целенаправленного влияния на ход ферментативного катализа. Не менее важны закономерности ферментативного катализа и в фармакокинетике и токсикокинетике, занимающихся вопросами скоростей воздействия и выведения из организма лекарственных препаратов и ядовитых веществ.

### 1. Общая характеристика ферментов

К настоящему времени известно несколько тысяч ферментов, свыше тысячи из них получены в индивидуальном состоянии. **Ферментами (от лат. fermentum – закваска) называют синтезируемые клеткой белки, катализирующие протекающие в ней химические реакции, обеспечивающие в совокупности обмен веществ.** Регуляция обмена на уровне организма осуществляется путём регуляции скорости синтеза, концентрации и каталитической активности ферментов, выполняемой при участии генов. Для многих белков-ферментов сегодня выяснена аминокислотная последовательность, а самые известные из них расшифрованы с помощью рентгеноструктурного анализа до уровня полного пространственного строения.

Не все белки являются катализаторами реакций [4]. Ферментативные белки, как правило, имеют глобулярную структуру и относительную молекулярную массу от 10 тысяч до нескольких миллионов. Для них характерны те же физико-химические свойства, что и для белков, не наделённых каталитическими функциями. Молекулы ферментов представлены как простыми, так и сложными белками. В первом случае ферменты называют однокомпонентными, их глобулы состоят только из  $\alpha$ -аминокислотных остатков, во-втором – двухкомпонентными, включающими помимо белковой части небелковые вещества: ионы металлов или большие органические молекулы, такие как нуклеотиды или витамины.

Аминокислотная белковая часть двухкомпонентных ферментов называется **апоферментом**, а вместе с небелковой частью – **холоферментом**.

Небелковые компоненты, легко диссоциирующие из комплекса с ферментативным белком, получили название **коферментов** (кофакторов). Коферменты играют роль промежуточных переносчиков электронов, а также некоторых атомов или функциональных групп, которые в результате ферментативной реакции переносятся с одного соединения на другое. Некоторые коферменты очень прочно связаны с ферментативным белком; такой кофермент называют **протетической** группой фермента. Однако резкой границы между коферментами и протетическими группами не существует, степень прочности связи ферментативных белков с небелковыми компонентами широко варьирует.

Таким образом, функции коферментов и протетических групп следующие: 1) участие в акте катализа, 2) осуществление контакта между ферментативным белком и взаимодействующим реагентом, 3) стабилизация апофермента. Апофермент, в свою очередь, усиливает каталитическую активность небелковой части и, кроме того, определяет специфичность действия ферментов. Связывание белковой части фермента и небелковой осуществляется за счёт ионных, водородных связей, гидрофобных взаимодействий, реже – с помощью ковалентных связей.

Своё каталитическое действие ферменты проявляют в водных растворах и, следовательно, по этому признаку могут быть отнесены к гомогенным катализаторам. Однако при тщательном рассмотрении такое заключение не вполне точно. Дело в том, что ферменты – это белки с весьма большими молекулярными массами и, естественно, при обсуждении свойств многих из них мы вправе говорить о существовании в растворе ферментов поверхности (микроповерхности) раздела, характерной для гетерогенных катализаторов. Более того, каталитическая активность ферментов, как и гетерогенных катализаторов, определяется наличием на их поверхности особых участков ограниченного размера – активных центров, обладающих специфической реакционной способностью. Многие ферменты, например, ферменты переноса электронов в окислительно-восстановительных реакциях, ферменты, участвующие в биосинтезе белка и некоторые другие функционируют, будучи «вмонтированными» в сравнительно жёсткие структурные компоненты клетки, обладающие макроповерхностью раздела (митохондрии, рибосомы и т.п.). Таким образом, белки-ферменты характеризуются признаками как гомогенных, так и гетерогенных катализаторов.

Как катализаторы – вещества, ускоряющие реакции, ферменты имеют ряд **общих** свойств с химическими, небиологическими катализаторами [3]:

- они не входят в состав конечных продуктов реакции и выходят из реакции в первоначальном виде, т.е. не расходуются в процессе катализа;

- ферменты не могут возбудить реакции, противоречащие законам термодинамики. Они ускоряют только те реакции, которые могут протекать

и без них, – реакции, идущие со снижением свободной энергии;

- ферменты, как правило, не смещают положения равновесия реакции, а лишь ускоряют его достижение.

Помимо общих, для ферментов характерны и **специфические** свойства отличающие их от химических катализаторов и выражающие их биологическую природу [3]:

1. Одним из важнейших свойств ферментов как биокатализаторов является их **регулируемость**. Через регуляцию ферментативного аппарата осуществляется скоординированность всех метаболических процессов во времени и пространстве. Схематически можно выделить три усложняющихся «этажа» регуляции:

- автоматическая, при помощи механизмов, работающих на субклеточном уровне, когда регуляция активности осуществляется за счёт изменения в клетке концентрации субстратов, продуктов, активаторов и ингибиторов ферментов;

- регуляция при посредстве гормонов;

- нервная регуляция, обеспечивающая наиболее быструю и общую реакцию двух первых контрольных систем на те или иные воздействия. Такая многоступенчатость регуляции направлена на воспроизведение живой материи, поддержание постоянства внутриклеточной среды, на приспособление организма к меняющимся внешним условиям.

2. При ферментативных реакциях, в отличие от неферментативных, ферменты участвуют в малых количествах и наблюдается почти 100% выход целевых продуктов.

3. Ферменты проявляют максимальную эффективность только в мягких условиях [6], характеризующихся небольшим интервалом температур и значений pH (рис. 1 и 2).

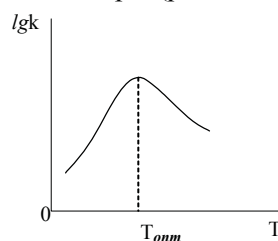


Рисунок 1 – Зависимость логарифма константы скорости ферментативной реакции от температуры

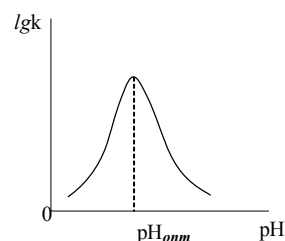


Рисунок 2 – Зависимость логарифма константы скорости ферментативной реакции от pH среды

Снижение активности фермента при температуре выше оптимальной (36,5°C) связано с тепловой денатурацией белка, которая наступает при 50-60°C, а в некоторых случаях и при 40°C. Понижение активности при значениях pH, отличающихся от оптимального значения, объясняется изменением степени ионизации фермента и, как следствие, изменением характера ион-ионных и других взаимодействий, обеспечивающих стабильность его третичной структуры. Для большинства фермен-

тов оптимальные значения pH совпадают с физиологическими значениями (7,3-7,4). Однако существуют ферменты, для нормального функционирования которых нужна сильноокислая (пепсин – 1,5-2,5) или достаточно щелочная (аргиназа – 9,5-9,9) среда.

4. Ферменты заставляют протекать реакции с огромными скоростями, недостижимыми в случае использования любых химических катализаторов. Так константа скорости разложения пероксида водорода ионами  $\text{Fe}^{2+}$  равна  $56 \text{ кмоль}/(\text{м}^2 \cdot \text{с})$ . Константа скорости этой реакции под действием катализатора, защищающей организм от губительного действия пероксида водорода,  $-3,5 \cdot 10^7$ , т.е. в присутствии фермента скорость увеличивается в миллион раз. Исследования показали, что 1 моль фермента может вызвать превращение 1000-100000 молей вещества (субстрата) в течение 1 секунды, что эквивалентно повышению скорости неферментативной реакции на 10-13 порядков. Такие ускорения связаны с тем, что ферменты резко снижают энергетические барьеры (энергию активации).

В табл. 1 в качестве примеров даны энергии активации для двух химических реакций, относящихся к разным типам, – окислительно-восстановительной реакции разложения пероксида водорода и гидролиза ацетилхолина, протекающих в отсутствие катализаторов, а также сопоставлены величины энергий активации при действии различных небиологических катализаторов и ферментов. Из приведенных данных следует, что, если катализаторы небиологической природы дают снижение энергии активации на 32-35 кДж, то ферментативный катализ характеризуется выигрышем энергии активации в 68-73 кДж.

Таблица 1 – Значения энергии активации разложения пероксида водорода и гидролиза ацетилхолина при действии химических катализаторов и ферментов

| Реакция                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Катализатор                       | Энергия активации, кДж/моль |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| $2\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$                                                                                                                                                                                                                                                               | Без катализатора                  | 68-72                       |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | $\text{I}^-$                      | 54                          |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | $\text{Fe}^{2+}$                  | 40,5                        |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Коллоидная Pt                     | 46,8                        |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Каталаза печени<br>Каталаза крови | 5,2<br>6,7                  |
| $  \begin{array}{c}  \text{O} \\  \parallel \\  (\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OC} \\    \\  \text{CH}_3  \end{array}  + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow  $ $  \begin{array}{c}  \text{O} \\  \parallel \\  (\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} + \text{CH}_3\text{COOH}  \end{array}  $ | Без катализатора                  | 84                          |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | $\text{H}_3\text{O}^+$            | 66,4                        |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | $\text{OH}^-$                     | 48,8                        |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Холинэстераза сыворотки крови     | 24 – 26                     |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Ацетилхолинэстераза эритроцитов   | 11,2 – 16,0                 |

5. Ферменты обладают высокой специфичностью. Различают два основных типа специфичности действия ферментов: **абсолютную** и **групповую**. Абсолютная характерна для большинства ферментов, когда фермент ускоряет превращение только одного вещества или одной пары субстратов (для бимолекулярной реакции) в соответствующие продукты. Например, амилаза, содержащаяся

в слюне, легко и быстро расщепляет крахмал, молекулы которого состоят из огромного числа одинаковых глюкозных звеньев, но не расщепляют сахарозу, содержащую в своём составе ту же глюкозу. Столь строгая специфичность нужна для того, чтобы из всей огромной массы веществ, присутствующих в организме, фермент мог катализировать только одну ему предназначенную реакцию. Без абсолютной специфичности существующая форма жизни оказалась бы невозможной, поскольку в клетке существуют различные функционально близкие субстраты, которые претерпевают совершенно различные типы превращений.

Абсолютная специфичность, как правило, включает в себя и **стереоспецифичность** – проявление каталитической активности только в отношении одного из стереоизомеров данного вещества. Если название фермента содержит буквы D- или L-, то всегда идёт речь об абсолютной стереоспецифичности. Это означает, что адсорбционный участок такого фермента строго соответствует (комплементарен) избранному субстрату. Важно отметить, что в таких случаях второй изомер либо вообще не способен соединиться с ферментом, либо, если такое связывание происходит, он является конкурентным ингибитором.

Менее многочисленная группа ферментов с групповой специфичностью обеспечивает превращение разных субстратов, но имеющих идентичные структурные фрагменты. Например, пищеварительные ферменты (пепсин, трипсин) расщепляют только пептидные связи не всегда близких по функциональному назначению белков. Алкогольдегидрогеназа катализирует окисление лишь алифатических спиртов до соответствующих альдегидов.

Ярко выраженная специфичность действия ферментов на строго определённые субстраты достигается за счёт строения их **активных центров**. **Активным центром фермента называют совокупность аминокислотных остатков, которые вступают в контакт с субстратом.** Согласно рентгеноструктурным данным, в большинстве случаев это трёхмерная структура часто имеющая форму щели или впадины в глобуле белка (рис. 3).

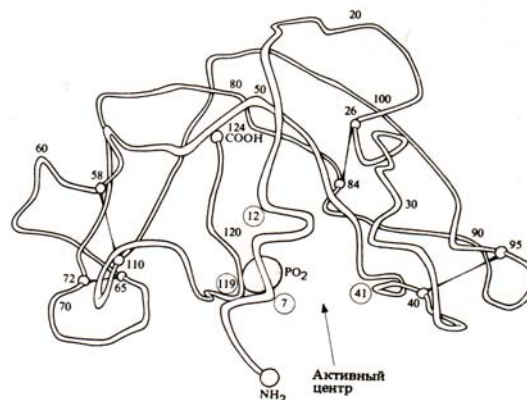


Рисунок 3 – Пространственное изображение активного центра рибонуклеазы. В его образовании участвуют аминокислотные остатки гистидина (12 и 84), а также лизина (7 и 41)

Обычно активный центр занимает относительно небольшую часть глобулы, т.е. как и в случае гетерогенного химического катализа в ферментативном катализе в превращении исходного субстрата принимает участие не вся полипептидная цепь белка, а только определённый участок. Причём, если в реакцию вовлекаются несколько аминокислотных остатков активного центра, то совсем не обязательно, чтобы они были расположены рядом в полипептидной цепи. Однако они непременно должны быть сближены пространственно, что обеспечивается спецификой трёхмерной структуры фермента. Отсюда ясно, почему денатурация белка инактивирует фермент. Причина состоит в том, что нарушение его трёхмерной структуры разобщает пространственно совмещённые остатки аминокислот.

При объяснении строгой специфичности биокатализаторов используют гипотезу Э. Фишера (1890) [2]. Согласно ей, между активным центром фермента и молекулой субстрата существует геометрическое соответствие по типу «ключ-замок» (рис. 4). Такая трактовка позволяет понять абсолютную специфичность ферментов.

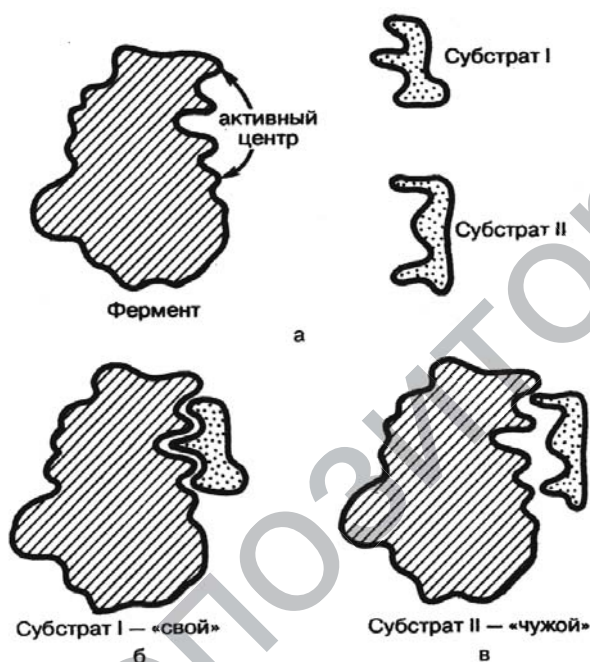


Рисунок 4 – Фишерова гипотеза «ключа и замка». а – молекула фермента и молекулы двух разных субстратов; б – фермент «распознал» свой субстрат: образовался фермент-субстратный комплекс; в – фермент не связывается с субстратом: геометрия субстрата не соответствует геометрии активного центра фермента

В 1959 г. новую интерпретацию гипотезы «ключа и замка» предложил Кошланд [2]. На основании более поздних данных, позволяющих считать ферменты и их активные центры физически более гибкими, чем это казалось вначале, он высказал мысль о динамическом взаимодействии между ферментом и субстратом. Исходя из этого представления, субстрат, соединяясь с ферментом, вы-

зывает определённые изменения в структуре последнего. Аминокислотные остатки, составляющие активный центр фермента, принимают при этом геометрически удобную форму, охватывая субстрат, что даёт возможность ферменту наиболее эффективным образом выполнять свою функцию (рис. 5). Эту гипотезу называют гипотезой индуцированного соответствия. Подходящей аналогией в этом случае может служить перчатка, которая при надевании на руку соответствующим образом изменяет свою форму. С выяснением отдельных деталей механизмов различных реакций в эту гипотезу вносятся уточнения. Выяснилось, например, что и молекулы субстрата в некоторых случаях несколько изменяют свою форму ещё до того, как вступить в соединение с ферментом.

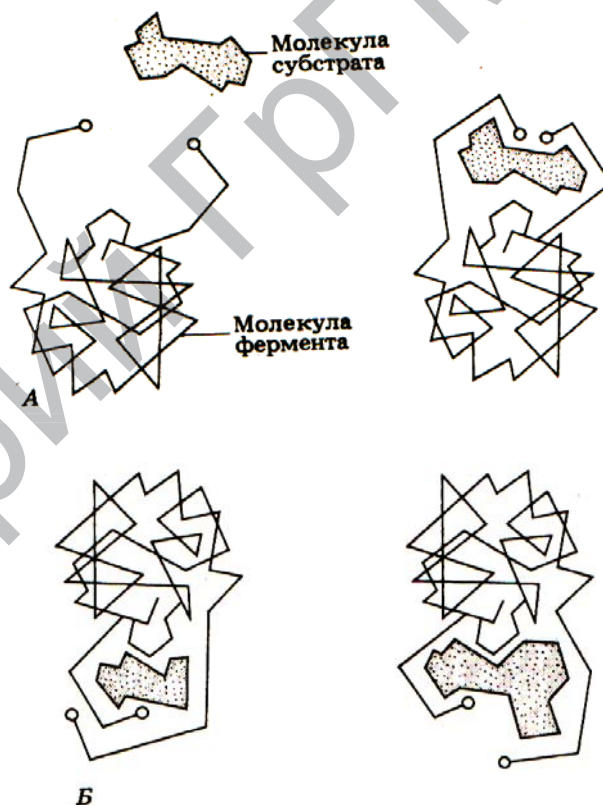


Рисунок 5 – Схема, иллюстрирующая кошландовскую гипотезу «индуцированного соответствия». А – соединяясь с ферментом, субстрат вызывает в нём изменение, в результате которого активные группы фермента сближаются; Б – более мелкие или более крупные молекулы не способны взаимодействовать с ферментом

Образовавшиеся продукты ферментативных процессов по форме уже не соответствуют активному центру. Поэтому они отделяются от него (поступают в окружающую среду), после чего освободившийся активный центр может принимать новые молекулы субстрата.

Активный центр неоднороден [1]. Условно в нём можно выделить два участка – связывающий (адсорбционный) и каталитический (рис. 6). Остатки аминокислот, образующие связывающий участок, обеспечивают удержание субстрата в активном центре. Именно «архитектура» связывающего уча-

стка активного центра фермента определяет его комплементарность структуре субстрата, т.е. строгий отбор субстрата и специфичность фермента. Взаимодействие между субстратом и связывающим участком активного центра осуществляется за счёт кооперативного действия сил различной природы. Это электростатические и водородные связи, гидрофобные и ван-дер-ваальсовы взаимодействия. Их сбалансированное воздействие приводит к сближению атакуемой связи субстрата с каталитическими группами фермента. Одновременно достигается фиксация субстрата и его оптимальная для разрыва и образования химических связей ориентация. Тщательная «подгонка» структуры субстрата к структуре участка катализа фермента в итоге даёт огромное возрастание скорости реакции.



Рисунок 6 – Модель молекулы фермента (третичная структура)

В каталитический участок фермента входят остатки аминокислот, непосредственно участвующие в катализе. Их называют каталитическими группами. В качестве каталитических обычно выступают **полярные** группы серина, цистеина, гистидина, тирозина и лизина. Они обеспечивают перераспределение электронных плотностей и перенос групп непосредственно в химическом акте катализа.

Важной структурной особенностью активного центра является большая вариация участков связывания, вызванная разнообразием способов укладки полипептидных цепей при построении самой глобулы белка, и высокая консервативность каталитических участков, т.е. однотипное строение активных групп. Каталитические участки способны по своей химической природе взаимодействовать с большим числом субстратов, превращая их в продукты, но участки связывания, выполняя роль селектора, предоставляют возможность контакта с каталитическим центром только немногим из субстратов.

Такое двухслойное строение активного центра, раздельное нахождение участков связывания и каталитических участков обеспечивает резкое увеличение эффективности катализа в глобуле фермента и указывает исследователям путь получения небиологических катализаторов с различными свойствами при одинаковом химическом составе и близком строении.

## 2. Кинетика ферментативных реакций

Общие принципы кинетики химических реакций применимы и к ферментативным реакциям, однако у последних имеется одна отличительная особенность, не свойственная обычным реакциям, протекающим в отсутствие ферментов. Особенность эта – явление **насыщения** субстратом [5]. На рис. 7 показано влияние концентрации субстрата на скорость ферментативного процесса  $S \rightarrow P$ , где  $S$  – субстрат,  $P$  – продукт. При низкой концентрации субстрата скорость реакции возрастает пропорционально содержанию субстрата, т.е. по отношению к субстрату реакция имеет первый порядок (нижняя линейная часть кривой,  $n = 1$ ). По мере увеличения концентрации субстрата скорость растёт всё медленнее и пропорциональность нарушается; в этой зоне концентраций мы имеем реакцию смешанного порядка (средний участок,  $n < 1$ ). При дальнейшем увеличении концентрации скорость становится постоянной, не зависящей от концентрации субстрата. В этой области по отношению к субстрату реакция приобретает нулевой порядок (верхняя часть кривой,  $n = 0$ ); происходит насыщение активных центров фермента субстратом. При этих условиях фактором, лимитирующим скорость, становится концентрация фермента (по катализатору ферментативные реакции имеют первый порядок,  $n = 1$ ).

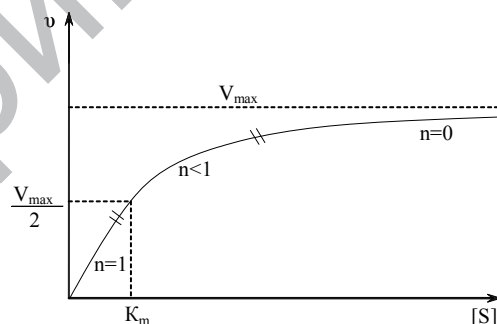
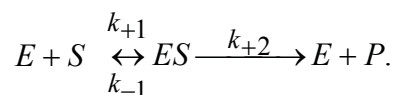


Рисунок 7 – Зависимость начальной скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата

Исследование эффекта насыщения привело Л. Михаэлиса и М. Ментен в 1913 г. к созданию общей теории действия ферментов и ферментативной кинетики. Согласно этой теории, на основе которой проводится всесторонний анализ ферментативных реакций, фермент  $E$  сначала реагирует с субстратом  $S$ , в результате чего образуется фермент-субстратный комплекс  $ES$ , который затем распадается на свободный фермент  $E$  и продукт (продукты)  $P$ :



Постулировано, что первый этап ферментативного процесса происходит быстро и обратимо, второй – медленно и необратимо.  $k_{+1}$ ,  $k_{+2}$  и  $k_{-1}$  – константы скоростей двух прямых и одной обратной реакций, соответственно.

В используемом уравнении  $[E]$  и  $[S]$  – общие первоначальные концентрации фермента и субстрата (как в свободной, так и в связанной формах),  $[ES]$  – концентрация фермент-субстратного комплекса, а разности  $[E] - [ES]$  и  $[S] - [ES]$  – концентрации свободных, не связанных в комплексе  $ES$ , фермента и субстрата. В связи с эффектом насыщения субстратом, скорость образования продукта (продуктов)  $P$  пропорциональна не концентрации субстрата  $S$ , а концентрации комплекса  $[ES]$ :

$$v = k_{+2}[ES].$$

Скорость имеет наибольшую величину при самой высокой концентрации комплекса  $[ES]$ , т.е. когда все активные центры фермента заняты. В этом случае

$$[ES] = [E]$$

и скорость максимальна:

$$V_{\max} = k_{+2}[E].$$

Последнее соотношение записывается в виде

$$k_{+2} = \frac{V_{\max}}{[E]}.$$

Так как фермент-субстратный комплекс диссоциирует, то распад комплекса  $ES$  на субстрат  $S$  и фермент  $E$  можно представить следующим выражением:

$$K_S = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{([E] - [ES])([S] - [ES])}{[ES]},$$

где  $[E] - [ES]$  и  $[S] - [ES]$  – концентрации свободных фермента и субстрата, соответственно.

Учитывая, что при насыщении субстратом концентрация комплекса пренебрежимо мала по сравнению с концентрацией субстрата, предыдущее выражение примет вид

$$K_S = \frac{([E] - [ES])([S])}{[ES]}.$$

Это соотношение позволяет получить величину концентрации комплекса  $[ES]$ .

Действительно

$$K_S \cdot [ES] = ([E] - [ES]) \cdot [S] = [E][S] - [S][ES].$$

Отсюда

$$K_S \cdot [ES] + [S][ES] = [E][S],$$

$$[ES](K_S + [S]) = [E][S],$$

$$K_S = \frac{([E] - [ES])([S])}{[ES]}.$$

Если значения, найденные для  $k_{+2}$  и  $[ES]$ , подставить в выражение для скорости ферментативной реакции

$$v = k_{+2}[ES],$$

то получим

$$v = \frac{V_{\max}}{[E]} \cdot \frac{[E][S]}{(K_S + [S])} = \frac{V_{\max}[S]}{K_S + [S]}.$$

Это и есть **уравнение Михаэлиса-Ментен**, выражающее количественное соотношение между скоростью ферментативной реакции и концентрацией субстрата  $[S]$  при условии, что обе константы  $V_{\max}$  и  $K_S$  известны.

Дальнейшими исследованиями было доказано, что уравнение Михаэлиса-Ментен приложимо только к начальному этапу ферментативного процесса, так как в нем не принимается во внимание влияние и взаимодействие с ферментом продуктов реакции, а поэтому исходное уравнение правильнее писать в виде [3, 7]



Последнее обстоятельство было учтено в уравнении, предложенном Д. Холдейном и Д. Бриггсом:

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

где  $K_m$  является (выраженной в молях на литр) **константой Михаэлиса**, равной

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}},$$

а так как

то

$$K_S = \frac{k_{-1}}{k_{+1}}, \quad K_m = K_S + \frac{k_{+2}}{k_{+1}}.$$

Таким образом, константа Михаэлиса всегда будет близка или больше константы диссоциации фермент-субстратного комплекса  $K_S$ . Численные значения  $K_m$  обычно лежат в пределах  $10^{-2}$ - $10^{-8}$ М, легко воспроизводятся и не зависят от концентрации фермента. В то же время  $K_m$  является функцией температуры, pH среды, зависит от присутствия других веществ, играющих роль ингибиторов или активаторов в клетке.

Физический смысл константы Михаэлиса становится понятным, когда  $x = 1/2V_{\max}$ ,

$$\frac{V_{\max}}{2} = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}.$$

Разделив обе части на  $V_{\max}$ , получим

$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_m + [S]},$$

откуда

$$K_m + [S] = 2[S],$$

$$K_m = [S].$$

Из последнего равенства вытекает, что константа  $K_m$  численно равна концентрации субстрата, при

которой скорость реакции составляет половину максимальной, т.е.  $x = V_{\max}/2$ . Это наглядно видно из графика в координатах ( $x$ ,  $[S]$ ), представленного на рис. 7.

Анализ уравнения Михаэлиса-Ментен позволяет объяснить многие проявляющиеся в опытах закономерности.

Если  $[S] \ll K_m$ , тогда

$$v = \frac{k_{+2}[E][S]}{K_m},$$

т.е. начальная скорость линейно зависит от концентрации субстрата, что подтверждает наблюдаемый в опытах первый порядок реакции по субстрату (рис. 7).

Если  $[S] \gg K_m$ , то из уравнения получаем

$$v = k_{+2}[E],$$

т.е. начальная скорость не зависит от концентрации субстрата, следовательно, порядок реакции по субстрату будет нулевой, по ферменту, как и в предыдущем случае, – первый, а сама скорость достигнет предельного значения,  $V_{\max}$ :

$$v = k_{+2}[E] = V_{\max}.$$

При приближении  $x$  к значению  $V_{\max}$  концентрация фермент-субстратного комплекса  $[ES] > [ES]_{\max}$ , что означает полное насыщение фермента субстратом.

Надо отметить, что кинетическое поведение большинства ферментов намного сложнее, чем это вытекает из идеализированной схемы, лежащей в основе уравнения Михаэлиса-Ментен. При выводе этого уравнения мы предполагали, что существует только один фермент-субстратный комплекс. В реальности, в большинстве ферментативных реакций, образуется по меньшей мере два или три таких комплекса, возникающих в определённой последовательности:



Число участвующих субстратов тоже, как правило, больше одного, что ещё более усложняет анализ. Тем не менее, при исследовании кинетики известных ферментативных реакций, отправной точкой всегда остается упрощённое, приведенное выше уравнение Михаэлиса-Ментен.

### 3. Роль ферментативного катализа в медицине

Ферментативный катализ имеет огромное значение во всех проявлениях жизни, где речь идёт о живых существах. Для повышения жизнедеятельности организма и улучшения обмена веществ создано много ферментных препаратов, используемых в качестве лекарственных средств. Широко известность получили ферментные препараты при нарушениях функции желудочно-кишечного тракта, связанные с недостаточной выработкой пищеварительных ферментов. Так, при некоторых формах гастрита используются препараты пепсин или панкреатин. Успешно применяются ферменты и в тех случаях, когда необходимо разрушить накопившиеся в большом количестве белковые образования (при ожогах, гнойных ранах, гнойно-воспалительных заболеваниях лёгких и т.д.). В этих случаях применяются протеолитические ферменты, приводящие к быстрому гидролизу белков и способствующие рассасыванию гнойных скоплений. Для лечения ряда инфекционных заболеваний используются препараты лизоцима, которые разрушают оболочку некоторых болезнетворных бактерий. Очень важны ферменты, которые рассасывают тромбы (сгустки крови внутри кровеносных сосудов). Это плазмин, содержащийся в крови; ферменты поджелудочной железы – трипсин и химотрипсин. На их основе, с разными добавками, созданы лекарственные белковые препараты – стрептокиназа, стрептаза и др., широко реализуемые в медицине.

#### Литература

1. Байрамов, В.М. Основы химической кинетики и катализа / В.М. Байрамов. – М.: Academia, 2003. – 252 с.
2. Грин, Н. Биология / Н. Грин, У. Стаут, Д. Тейлор. – М.: Мир, 1990. – С. 195-209.
3. Диксон, М. Ферменты: в 3 т. / М. Диксон, Э. Уэбб. – М.: Мир, 1982. – 1120 с.
4. Зеленин, К.Н. Химия / К.Н. Зеленин. – Санкт-Петербург: Специальная литература, 1997. – С. 101-106.
5. Келети, Т. Основы ферментативной кинетики / Т. Келети – М.: Мир, 1990. – С. 112-325.
6. Пузаков, С.А. Химия / С.А. Пузаков – М.: Медицина, 1995. – С. 182-206.
7. Стромберг, А.Г. Физическая химия / А.Г. Стромберг, Д.П. Семченко. – М.: Высшая школа, 1999. – 617 с.

Поступила 26.11.07