

**Химические основы биологических  
процессов**

**Кинетика ферментативных  
процессов**

**Тишков Владимир Иванович**

[zamdekana07@gmail.com](mailto:zamdekana07@gmail.com)

комната 210 корпуса кафедры химической энзимологии

# ОСНОВЫ КИНЕТИКИ

**Скорость реакции -**  
изменение концентрации исходного  
соединения [A] (убыль) или  
конечного продукта [P]  
(образование) во времени

$$v = -d[A]/dt = d[P]/dt$$

# Молекулярность и порядок реакции

## Молекулярность – количество молекул, участвующих в реакции

- мономолекулярная
- бимолекулярная
- тримолекулярная реакция

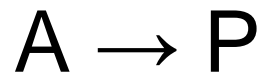
## Порядок реакции

- показатель степени при концентрации реагирующих веществ в уравнении скорости реакции
  - *общий порядок*
  - *порядок по одному из соединений*

# Порядок реакции

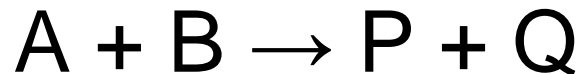
## Молекулярность и порядок реакции

Реакция первого порядка



$$v = k^*[A] = k^*([A_0] - [P])$$

Реакция второго порядка



$$v = k^*[A][B]$$



$$v = k^*[A]^2$$

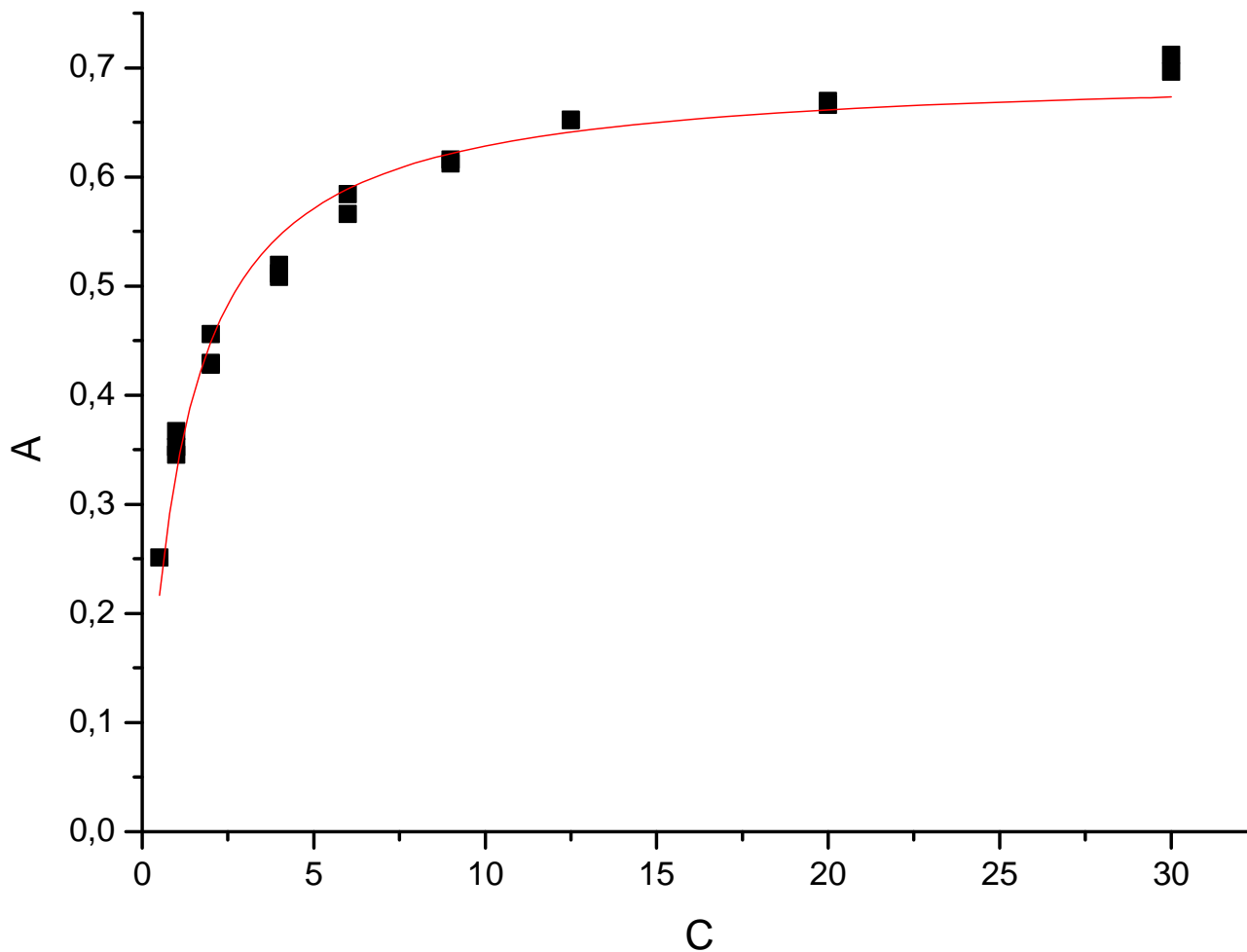
# Порядок реакции

## Молекулярность и порядок реакции

**Реакция нулевого порядка**  
скорость реакции не зависит от  
концентрации вещества 😊

**Молекулярность  $\neq 0$**

# Экспериментальный пример зависимости скорости реакции, катализируемой формиатдегидрогеназой, от концентрации формиат-иона



# **ФЕРМЕНТАТИВНАЯ КИНЕТИКА**

# ***Кинетика ферментативных реакций***

- ***«Кинетика – дисциплина таинственная и могущественная ...»***  
– Д. Кошланд мл.
- ***«Хорошо разбираясь в основах ферментативной кинетики можно с лёгкостью ориентироваться во всех вопросах этой науки.»***  
– Э. Корниш - Боуден



Э.Корниш-Боуден

**ОСНОВЫ  
ФЕРМЕНТАТИВНОЙ  
КИНЕТИКИ**

Перевод с английского и предисловие  
д-ра хим. наук **Б. И. Курганова**

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»  
МОСКВА 1979

*Athel Cornish-Bowden*

**Fundamentals of Enzyme Kinetics**

4<sup>th</sup>, completely revised and greatly enlarged edition

 **WILEY-BLACKWELL**

# **Катализ**

явление ускорения химического процесса в присутствии дополнительных соединений называют катализом, а само соединение - катализатором

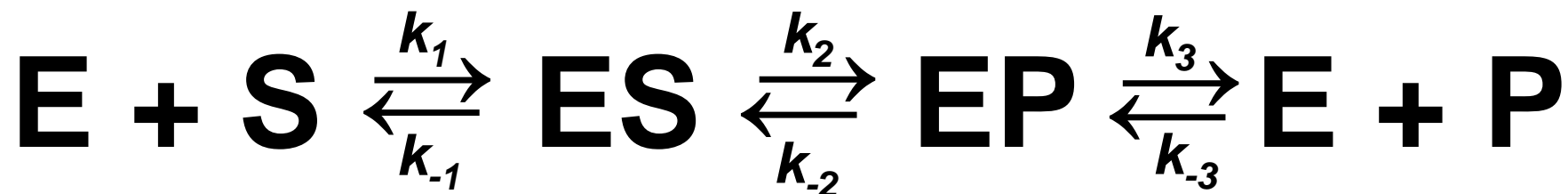
## **Биокатализ**

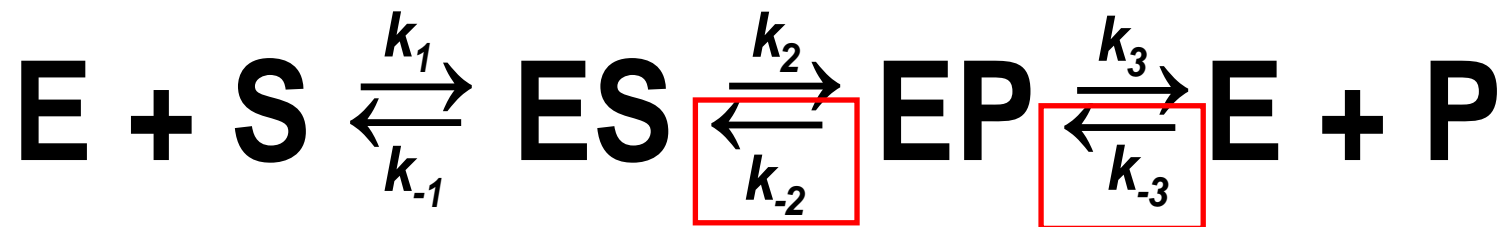
ускорение процессов в присутствии биологических молекул

# КАТАЛИЗ

Катализатор **НЕ ВЛИЯЕТ** на **константу равновесия** реакции!!!, поскольку **ускоряет** как **ПРЯМУЮ**, так и **ОБРАТНУЮ** реакцию.

**МИНИМАЛЬНАЯ ОБЩАЯ СХЕМА  
ОДНОСУБСТРАТНОЙ  
ФЕРМЕНТАТИВНОЙ  
РЕАКЦИИ**

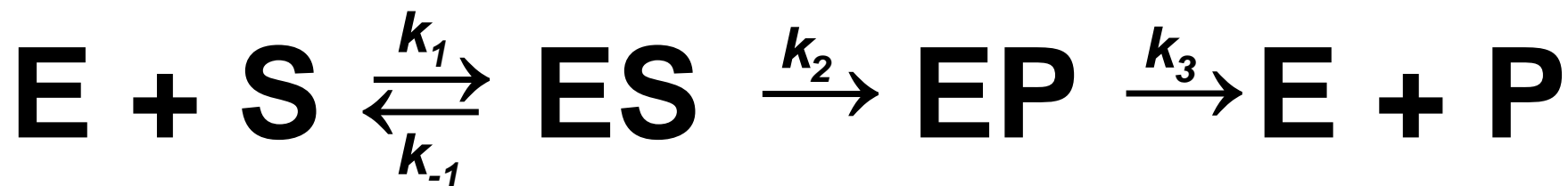


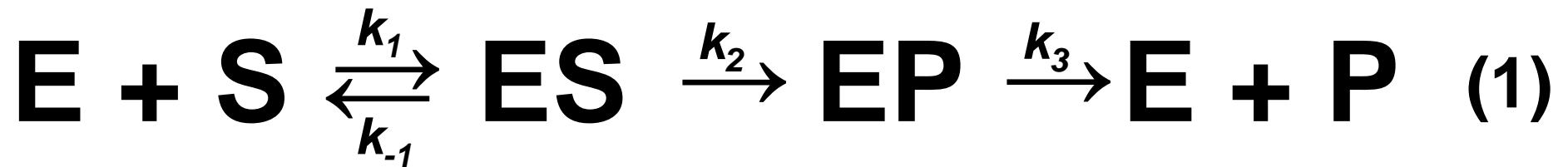


РЕАКЦИЯ В РЕЖИМЕ НАЧАЛЬНОЙ СКОРОСТИ



Схема приобретает следующий вид

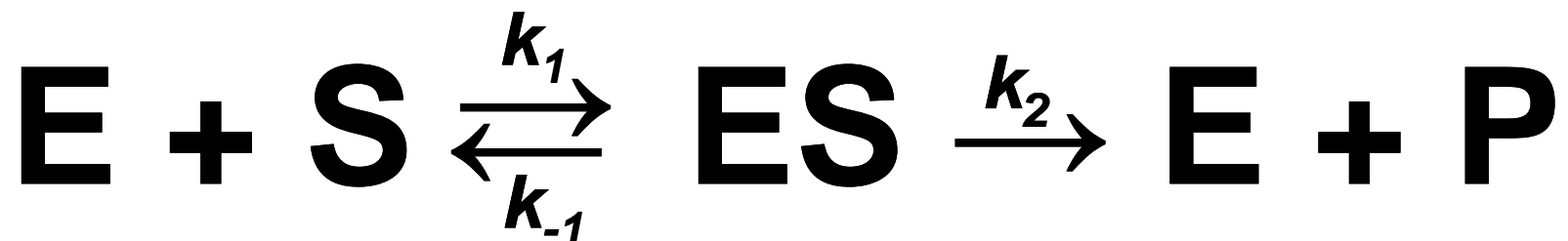




В схеме (1) каталитическая константа является комбинацией констант  $k_2$  и  $k_3$

В режиме стационара их отдельно определить невозможно.

Схема упрощается до



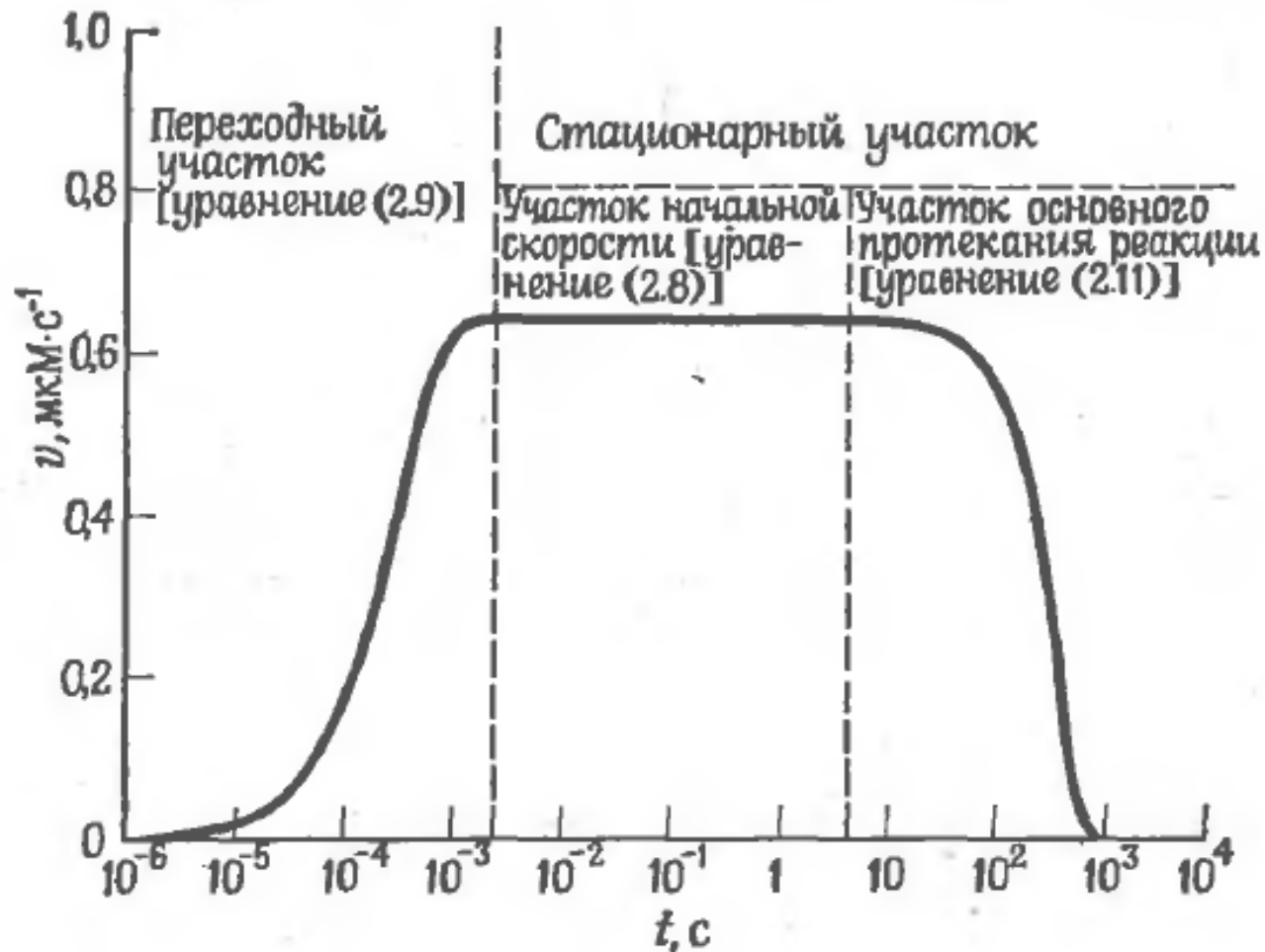
# ФЕРМЕНТАТИВНАЯ КИНЕТИКА

## ОСНОВНЫЕ ПОСТУЛАТЫ



1.  $E_0$  – общая концентрация фермента,  
 $E$ ,  $ES$  концентрации фермента и фермент-  
субстратного комплекса в ходе реакции  
 $S_0$  и  $S$  – начальная и текущая концентрации  
субстрата
2.  $S_0 \gg E_0$ ,  $S_0 \approx S$
3. Принцип стационарности  
 $dES/dt \approx 0$ .

# Справедливость допущения стационарного режима





# АВТОРЫ УРАВНЕНИЯ МИХАЭЛИСА - МЕНТЕН



**Мод Ментен**  
(1879-1960)



**Леонор Михаэлис**  
(1875-1949)

## ФЕРМЕНТАТИВНАЯ КИНЕТИКА

# Вывод уравнения Михаэлиса-Ментен



Скорость реакции

$$v = k_2 * ES$$

$$dES/dt = 0 = k_1 * E * S_0 - (k_{-1} + k_2) * ES$$

$$E_0 = E + ES \quad E = E_0 - ES$$

## ФЕРМЕНТАТИВНАЯ КИНЕТИКА

# Вывод уравнения Михаэлиса-Ментен



Скорость реакции  $v = k_2 * ES$

$$dES/dt = k_1 * E * S_0 - (k_{-1} + k_2) * ES = 0$$

$$E_0 = E + ES \quad E = E_0 - ES$$

$$k_1 * (E_0 - ES) * S_0 = (k_{-1} + k_2) * ES$$

$$k_1 * ES * S_0 + (k_{-1} + k_2) * ES = k_1 * E_0 * S_0$$

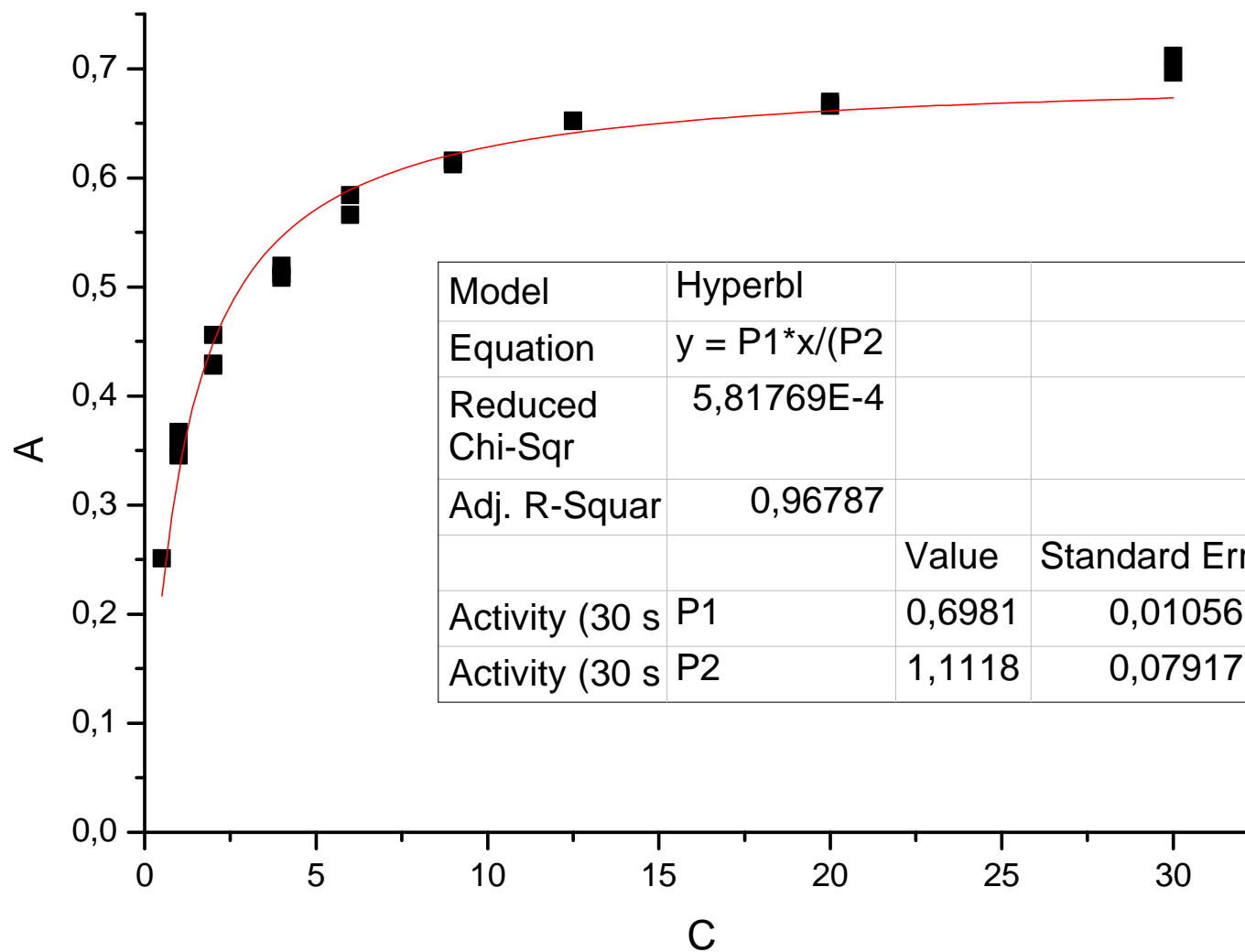
$$ES = k_1 * E_0 * S_0 / (k_1 * S_0 + (k_{-1} + k_2))$$

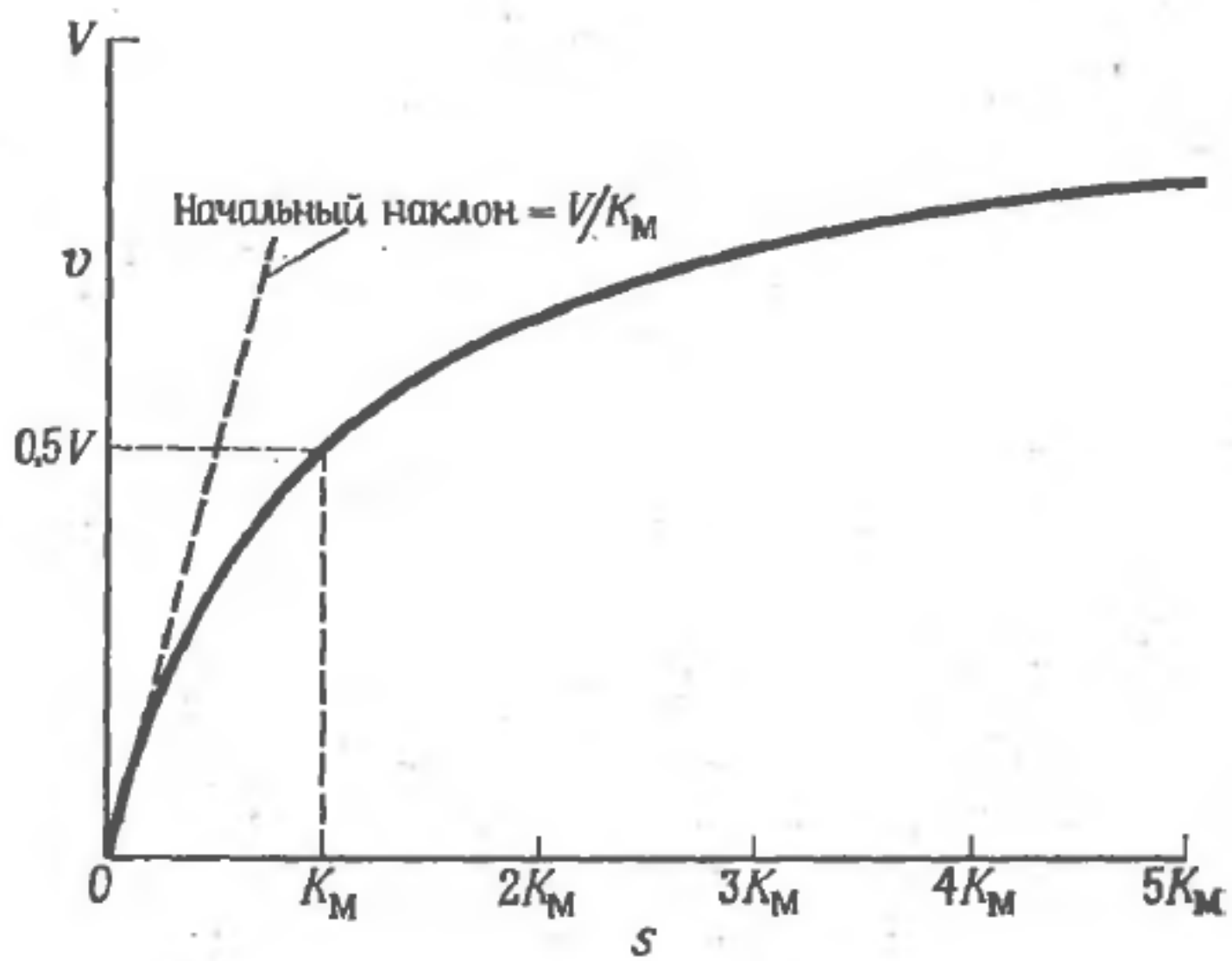
$$v = k_2 * ES = k_1 * k_2 * E_0 * S_0 / (k_1 * S_0 + (k_{-1} + k_2)) = k_2 * E_0 * S_0 / ((k_{-1} + k_2) / k_1 + S_0)$$

$$v = k_2 * E_0 * S_0 / (K_M + S_0) \quad V_{\max} = k_2 * E_0 \quad K_M = (k_{-1} + k_2) / k_1$$

$$v = V_{\max} * S_0 / (K_M + S_0)$$

# Экспериментальный пример зависимости скорости реакции, катализируемой формиатдегидрогеназой от концентрации формиат-иона

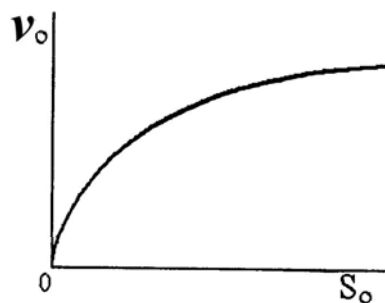




# Кинетика ферментативного катализа

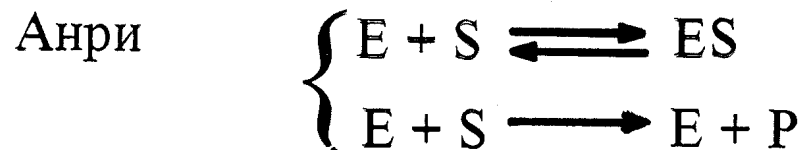
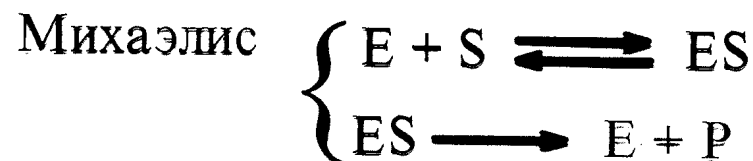
- Схема и уравнение Анри

$$v_0 = \frac{k_A \cdot K_A \cdot E_0 \cdot S_0}{K_A + S_0}$$



Экспериментально та же зависимость начальной скорости от концентрации субстрата, что и в случае схемы Михаэлиса

Механизмы различны



Стационарное приближение не дает возможности дискриминировать эти механизмы

# Линеаризация уравнения Михаэлиса-Ментен

$$\frac{s}{v} = \frac{K_M}{V} + \frac{s}{V},$$

Координаты  
Хейнса-Вульфа

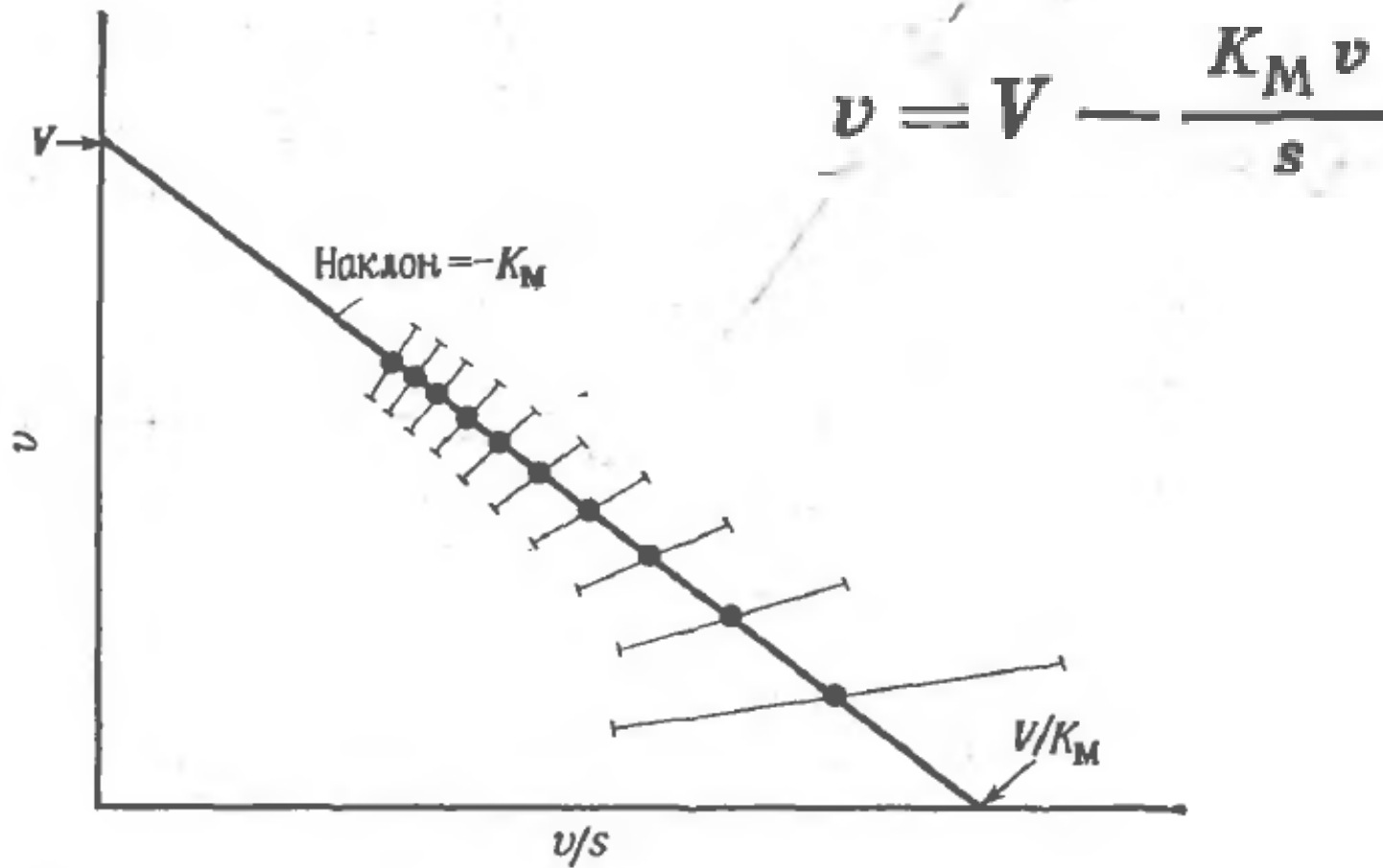
$$v = V - \frac{K_M v}{s},$$

Координаты  
Иди-Хофсти

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{K_M}{Vs}.$$

Координаты  
Лайнуивера-Берка

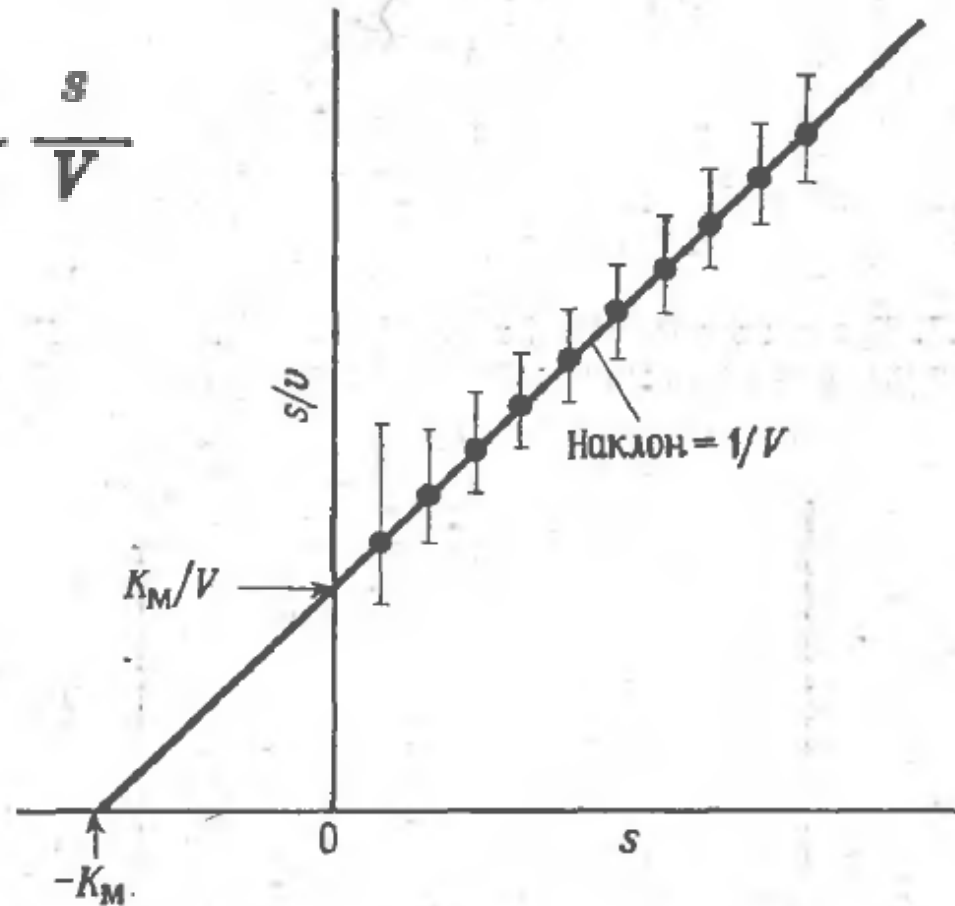
# Координаты Иди-Хофсти





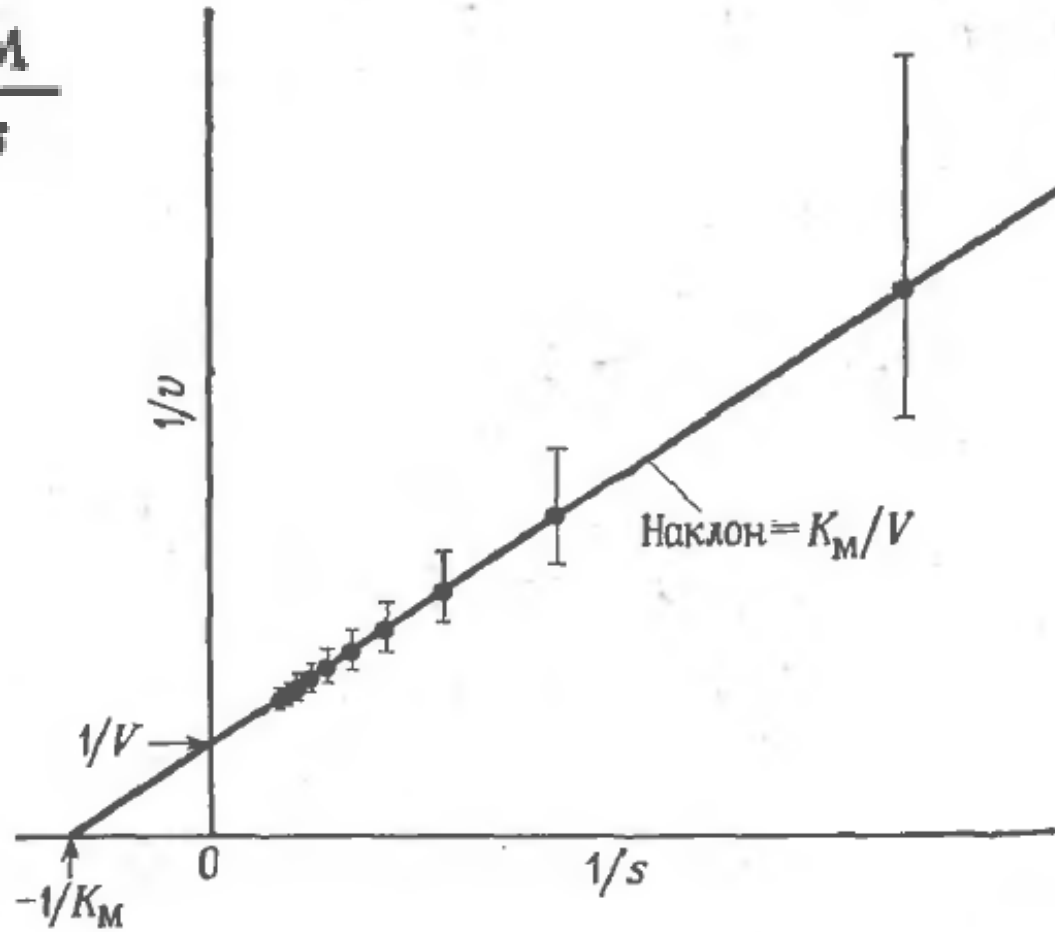
# Координаты Хейнса-Вульфа

$$\frac{s}{v} = \frac{K_M}{V} + \frac{s}{V}$$



# Координаты Лайнуивера-Берка

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{K_M}{Vs}$$

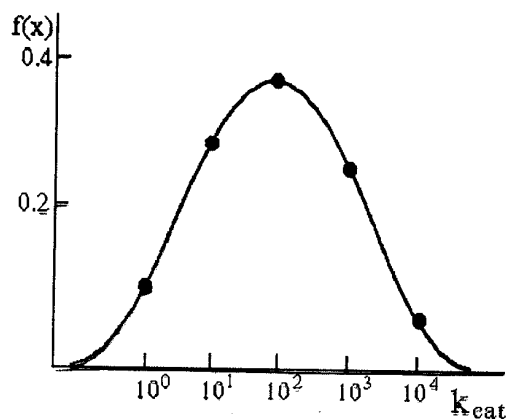


# Кинетика ферментативного катализа

## Скорости элементарных стадий в ферментативном катализе.

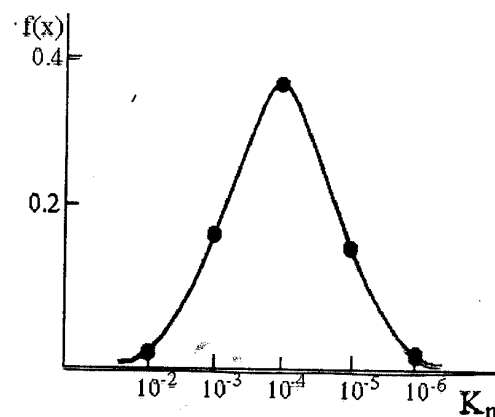
### Характерные значения $k_{cat}$ и $K_m$ .

- выборка около 500 ферментов. Значения констант разбиты на группы с приблизительно одинаковыми значениями  $k_{cat}$  и  $K_m$  в пределах одного порядка, подсчитано число ферментов в каждой группе. Это число отнесено на общее число ферментов в выборке. Таким образом найдена функция распределения ферментов относительно параметров  $k_{cat}$  и  $K_m$ .



Типичное значение

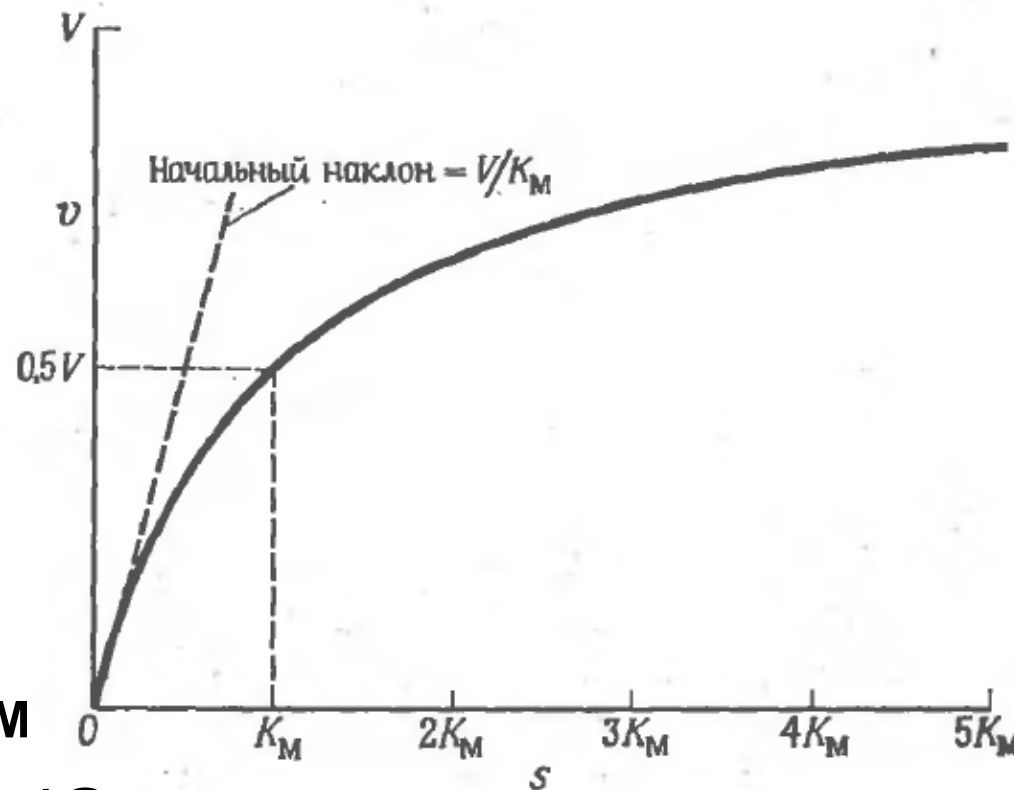
$$k_{cat} = 10^2 \text{ c}^{-1}$$



Типичное значение

$$K_m = 10^{-4} \text{ M}$$

# Порядок реакции в уравнении Михаэлиса-Ментен



$$S_0 \gg K_M$$
$$v = V_{\max}$$

$$S_0 \ll K_M$$

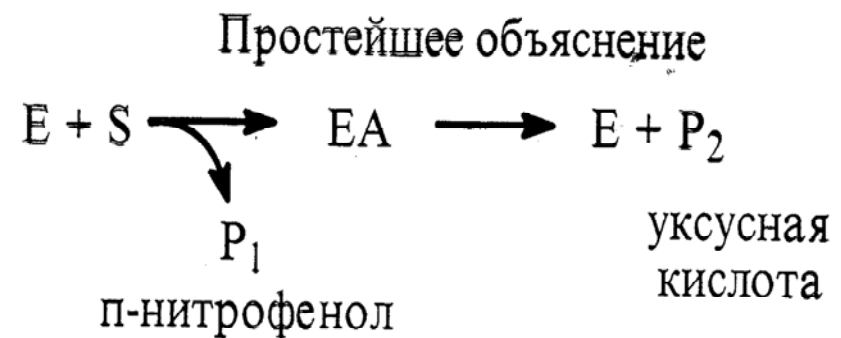
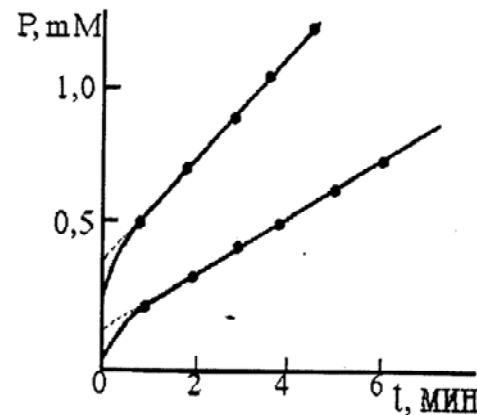
$$v = V_{\max} / K_M * S_0$$

$$v = V_{\max} * S_0 / (K_M + S_0)$$

# Кинетика ферментативного катализа

- Трехстадийная схема реакции с образованием ацилфермента - механизм действия сериновых протеаз

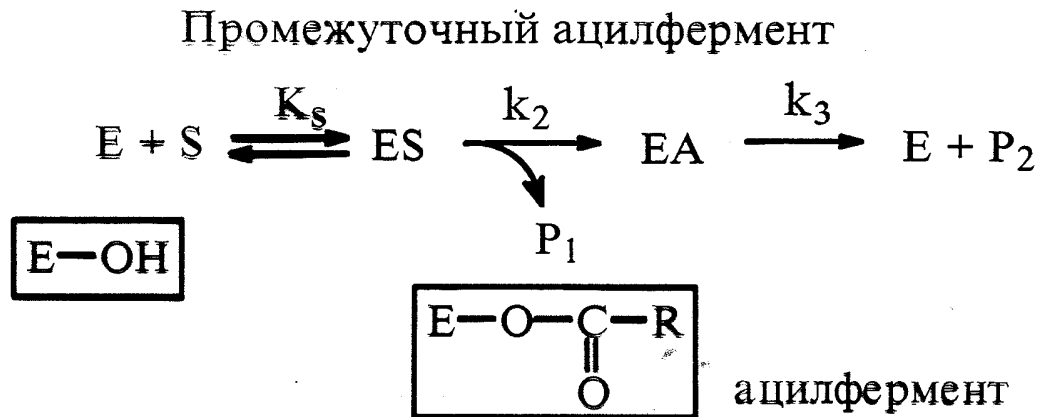
Хартли и Килби (Hartley, Kilbi, 1951), исследуя кинетику гидролиза *p*-нитрофенилового эфира уксусной кислоты, обнаружили две стадии.



# Кинетика ферментативного катализа

- Трехстадийная схема реакции с образованием ацилфермента - механизм действия сериновых протеаз

Сериновые протеазы (химотрипсин, трипсин, плазмин, тромбин и др.)



$k_2 \gg k_3$ ,  $k_{cat} = k_3$   
 лимитирует  
 деацилирование

$k_3 \gg k_2$ ,  $k_{cat} = k_2$   
 лимитирует  
 ацилирование

$$k_{cat} = \frac{k_2 \cdot k_3}{k_2 + k_3}; \quad K_m = \frac{K_s \cdot k_3}{k_2 + k_3}$$

# Двухсубстратная ферментативная реакция по механизму «пинг-понг»

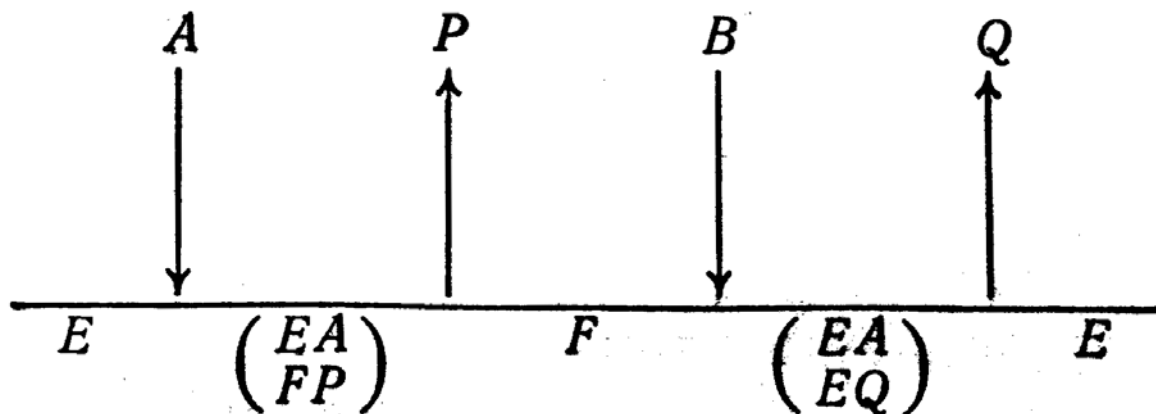
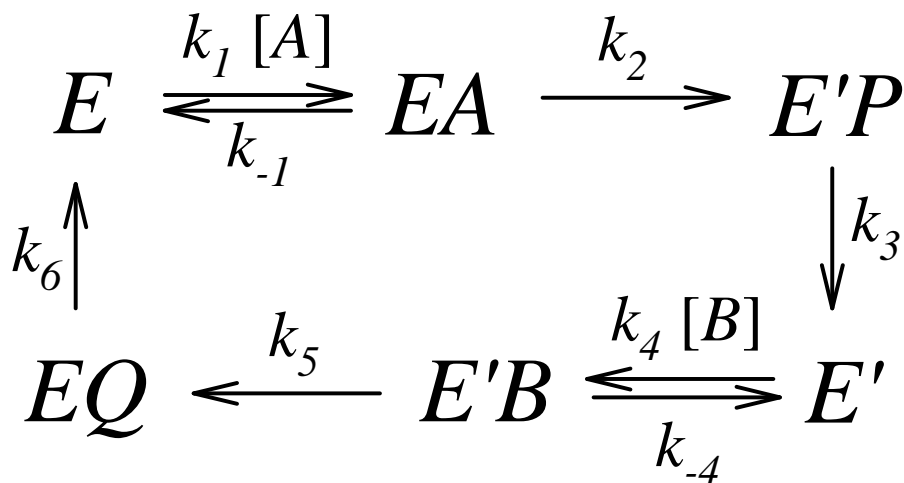


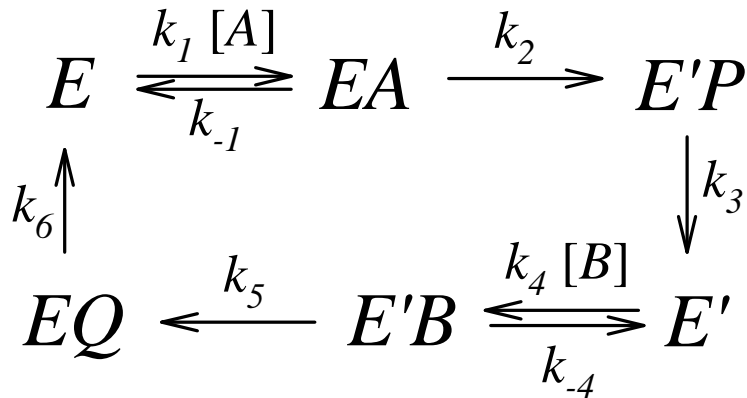
Схема  
Клеланда



Граф для  
вывода  
уравнения  
скорости  
реакции

# Двухсубстратная ферментативная реакция по механизму «ПИНГ-ПОНГ»

$$v = \frac{k_2 k_3 k_5 k_6}{k_2 k_3 k_6 + k_2 k_3 k_5 + k_2 k_5 k_6 + k_3 k_5 k_6} [A][B][EO] \cdot \frac{1}{\frac{k_3 k_5 k_6 (k_{-1} + k_2)}{k_1 [k_2 k_3 (k_5 + k_6) + k_5 k_6 (k_2 + k_3)] [B]} + \frac{k_2 k_3 k_6 (k_{-4} + k_5)}{k_4 [k_2 k_3 (k_5 + k_6) + k_5 k_6 (k_2 + k_3)] [A]} + [A][B]}$$



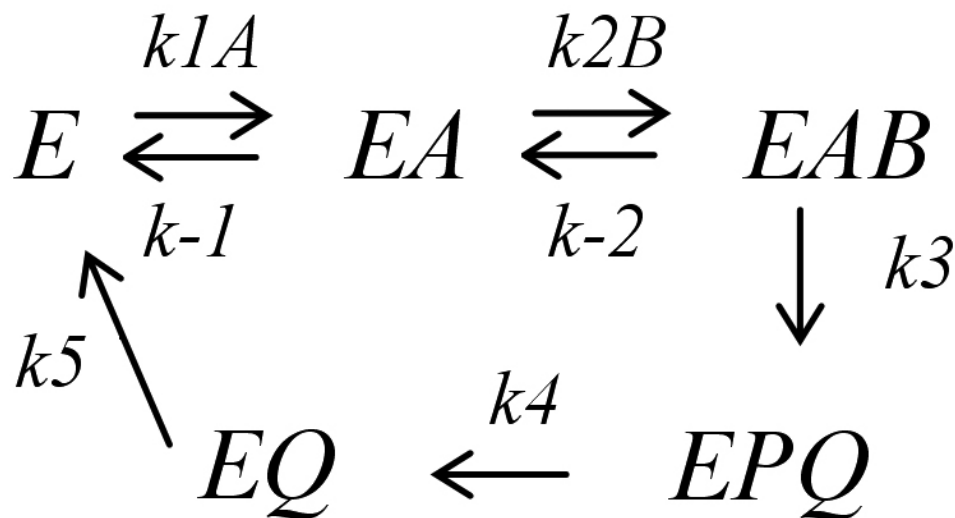
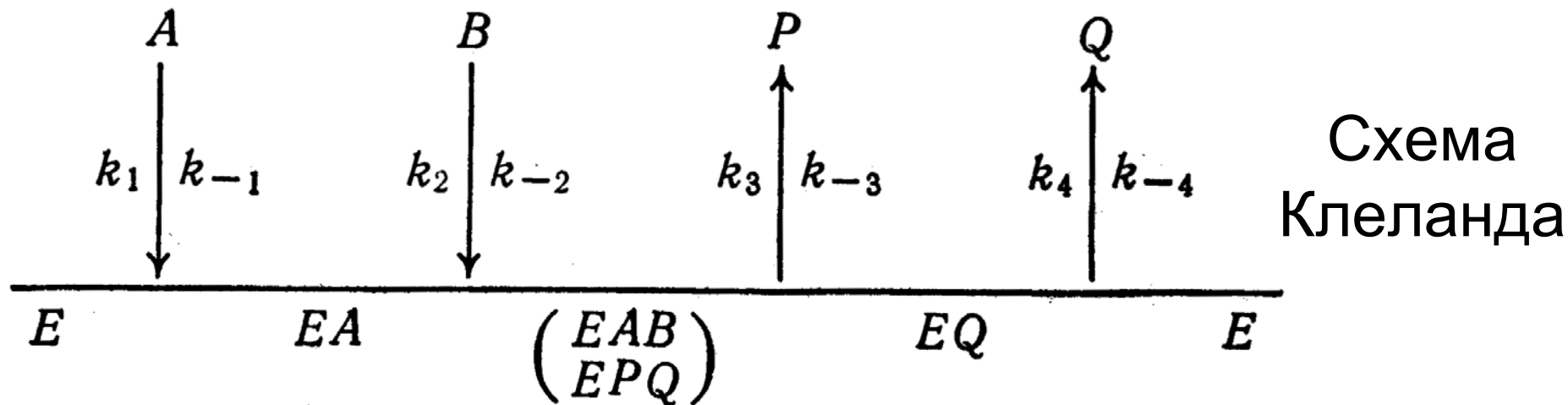
$$k_{cat} = \frac{k_2 k_3 k_5 k_6}{k_2 k_3 k_6 + k_2 k_3 k_5 + k_2 k_5 k_6 + k_3 k_5 k_6};$$

$$K_M^A = \frac{k_3 k_5 k_6 (k_{-1} + k_2)}{k_1 (k_2 k_3 k_6 + k_2 k_3 k_5 + k_2 k_5 k_6 + k_3 k_5 k_6)};$$

$$K_M^B = \frac{k_2 k_3 k_6 (k_{-4} + k_5)}{k_4 (k_2 k_3 k_6 + k_2 k_3 k_5 + k_2 k_5 k_6 + k_3 k_5 k_6)}.$$



# Упорядоченный Vi-Vi механизм с образованием тройного комплекса



# Упорядоченный Vi-Vi механизм с образованием тройного комплекса

$$v = \frac{V_m \cdot A \cdot B}{A \cdot B + K_m^A \cdot B + K_m^B \cdot A + K_{AB}}$$

$$V_m = \frac{k_3 k_4 k_5}{k_4 k_5 + k_3 k_5 + k_3 k_4} \cdot E_0$$

$$K_m^A = \frac{k_3 k_4 k_5}{k_1 (k_4 k_5 + k_3 k_5 + k_3 k_4)}$$

$$K_m^B = \frac{k_4 k_5 (k_{-2} + k_3)}{k_2 (k_4 k_5 + k_3 k_5 + k_3 k_4)}$$

$$K_{AB} = \frac{k_{-1} k_4 k_5 (k_{-2} + k_3)}{k_1 (k_4 k_5 + k_3 k_5 + k_3 k_4)} = K_d^A K_m^B$$

