Химические основы биологических процессов

Кинетика ферментативных процессов

Тишков Владимир Иванович

zamdekana07@gmail.com

комната 210 корпуса кафедры химической энзимологии

Баку, Москва – 2025

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

$A \rightarrow P$

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

Реакция второго порядка

$A + B \rightarrow P + Q$

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

$A + A \rightarrow P$

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

Порядок реакции

Молекулярность и порядок реакции

Реакция нулевого порядка

скорость реакции не зависит от концентрации вещества ☺

Молекулярность ≠ 0

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

4th, completely revised and greatly enlarged edition

WILEY-BLACKWELL

Катализ

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

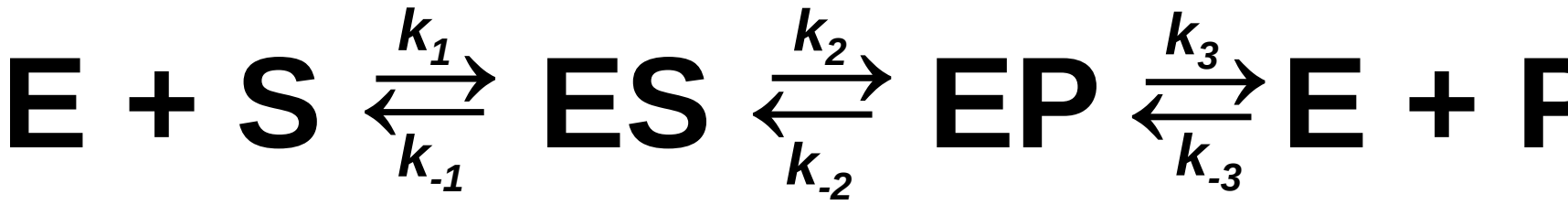
Биокатализ

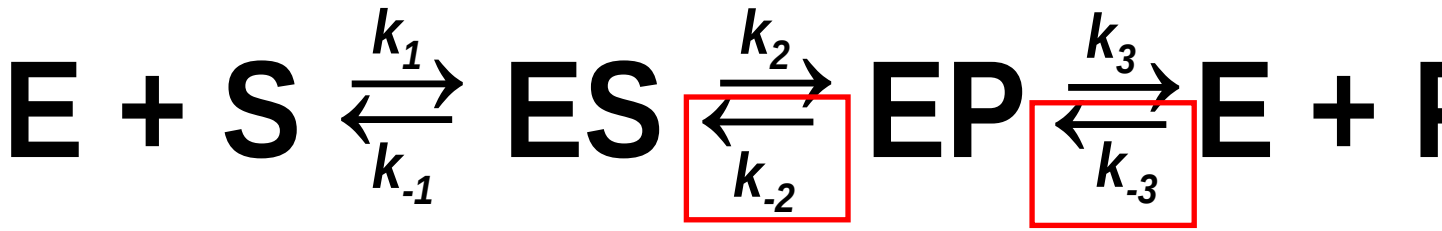
ускорение процессов в присутствии биологических молекул

КАТАЛИЗ

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

МИНИМАЛЬНАЯ ОБЩАЯ СХЕМА ОДНОСУБСТРАТНОЙ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ

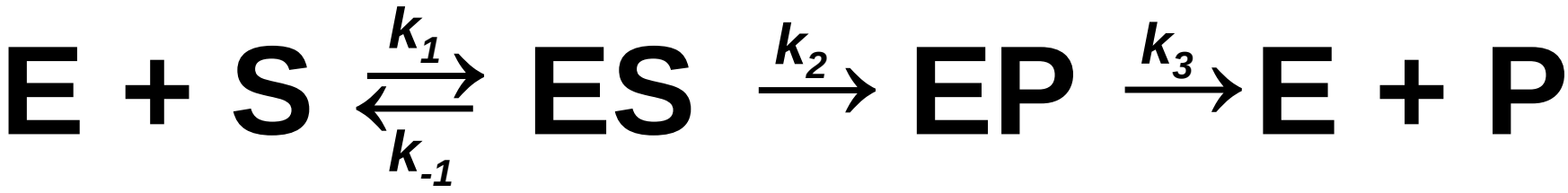




РЕАКЦИЯ В РЕЖИМЕ НАЧАЛЬНОЙ СКОРОСТИ

$$\longrightarrow [P] \approx 0$$

Схема приобретает следующий вид



$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} EP \xrightarrow{k_3} E + P \quad (1)$$

В схеме (1) каталитическая константа является комбинацией констант k_2 и k_3 В режиме стационара их отдельно определить невозможно.

Схема упрощается до

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ КИНЕТИКА

ОСНОВНЫЕ ПОСТУЛАТЫ

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

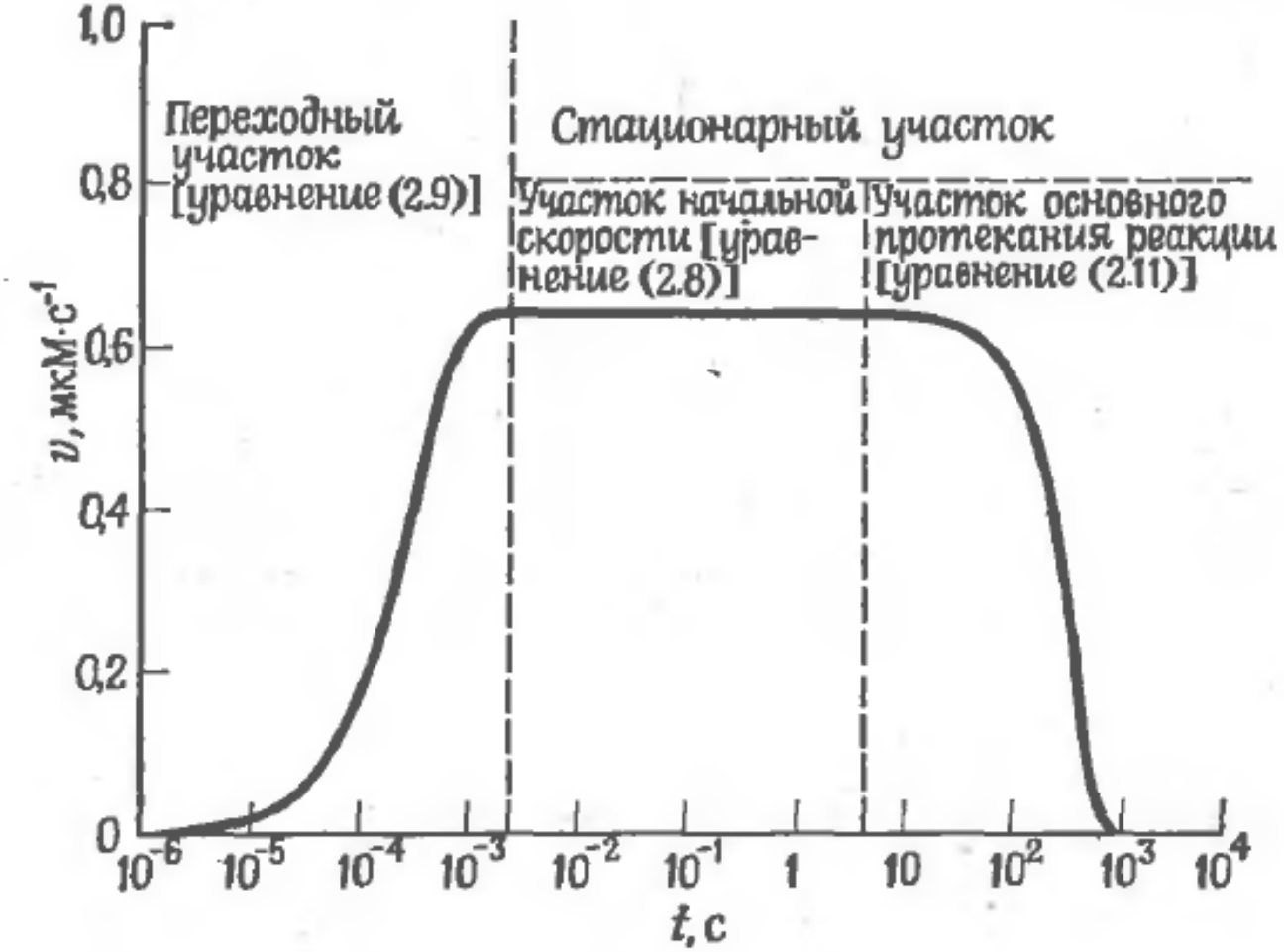
1. E_0 – общая концентрация фермента,
   E, **ES** концентрации фермента и фермент-субстратного комплекса в ходе реакции
   S_0 и **S** – начальная и текущая концентрации субстрата

2. $S_0 >> E_0$, $S_0 \simeq S$

3. Принцип стационарности

   $dES/dt \simeq 0$.

Справедливость допущения стационарного режима



АВТОРЫ УРАВНЕНИЯ МИХАЭЛИСА - МЕНТЕН

Мод Ментен
(1879-1960)

Леонор Михаэлис
(1875-1949)

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ КИНЕТИКА

Вывод уравнения Михаэлиса-Ментен

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

Скорость реакции

$$v = k_2 * ES$$

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

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

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ КИНЕТИКА

Вывод уравнения Михаэлиса-Ментен

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

Скорость реакции $v = k_2 * ES$

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

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

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

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

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

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

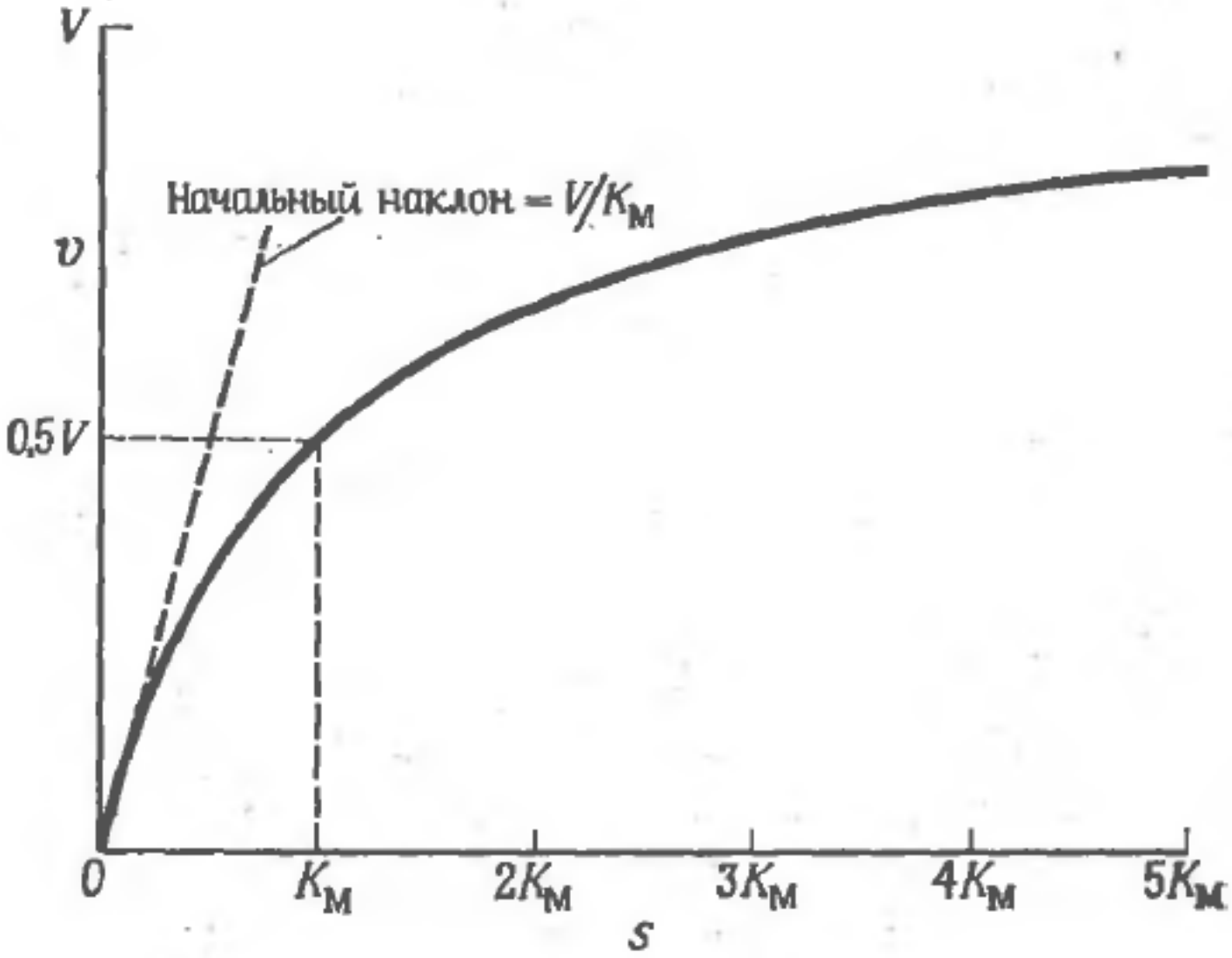
$$v = k_2 * E_0 * S_0 / (K_M + S_0) \qquad V_{max} = k_2 * E_0 \qquad K_M = (k_{-1} + k_2)/k_1$$

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

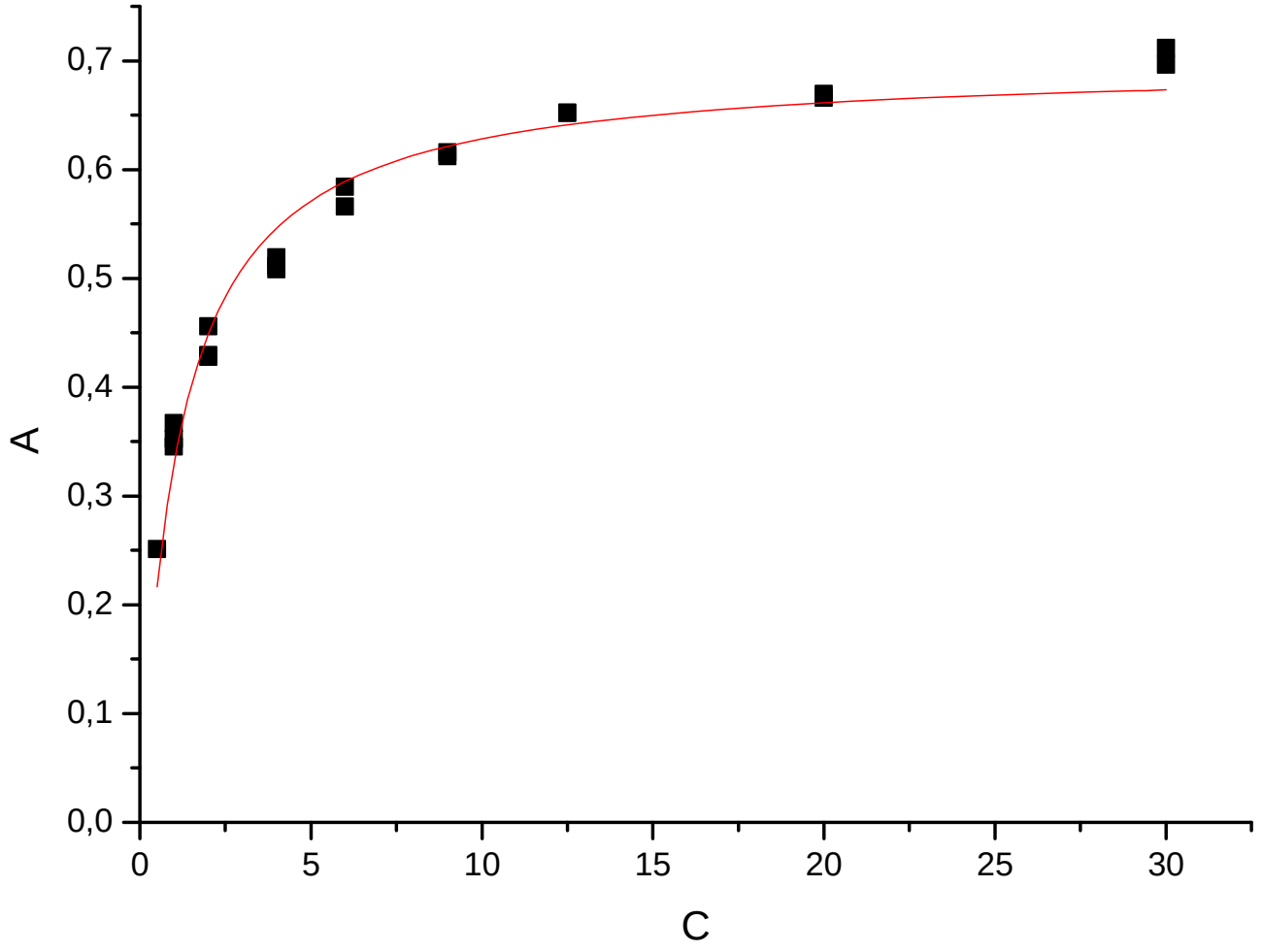
A novel derivation of the Michaelis-Menten equation based on singular value decomposition

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Short Communication
Section/Category:	Regular issue
Keywords:	Michaelis-Menten; multiscale; singular values
Manuscript Region of Origin:	MEXICO
Abstract:	The Michaelis-Menten (MM) equation is traditionally derived by taking a quasi-steady state assumption (QSSA) for the intermediate complex or a chemical equilibrium assumption for the substrate. The validity of these assumptions has been subjected to intense research in recent decades, where the use of tools from singularly perturbed systems has played a central role. The present work aims to explore an approach to derive the MM equation from a singular value decomposition (SVD) analysis of the MM kinetics. The idea is to consider singular values as scaling factors to convert the MM equations into a singularly perturbed system. The results showed that the MM equation can be obtained from the boundary-layer system for sufficient separation of the time scales represented by singular values. Such a boundary-layer system can be interpreted as resulting from a linear combination of the traditional complex QSSA and substrate equilibrium assumption (SEA). The SVD methodology combined with results from singularly perturbed systems can be used for extended MM kinetics. To this end, the case of the autocatalytic MM kinetics was considered a worked example. Numerical examples were used to illustrate the theoretical findings.


V
v
Начальный наклон = V/K_M
0,5V
0
K_M
$2K_M$
$3K_M$
$4K_M$
$5K_M$
s

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



Виктор Алексеевич Анри

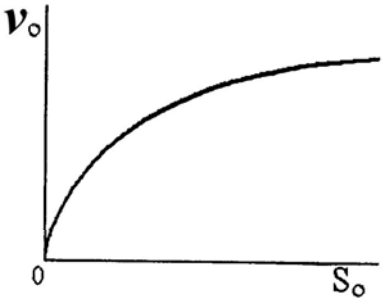
(1872-1940)

1903 г. Защита диссертации «Регуляция ферментативных процессов»

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

Михаэлис

$$\begin{cases} E + S \rightleftharpoons ES \\ ES \longrightarrow E + P \end{cases}$$

Анри

$$\begin{cases} E + S \rightleftharpoons ES \\ E + S \longrightarrow E + P \end{cases}$$

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

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

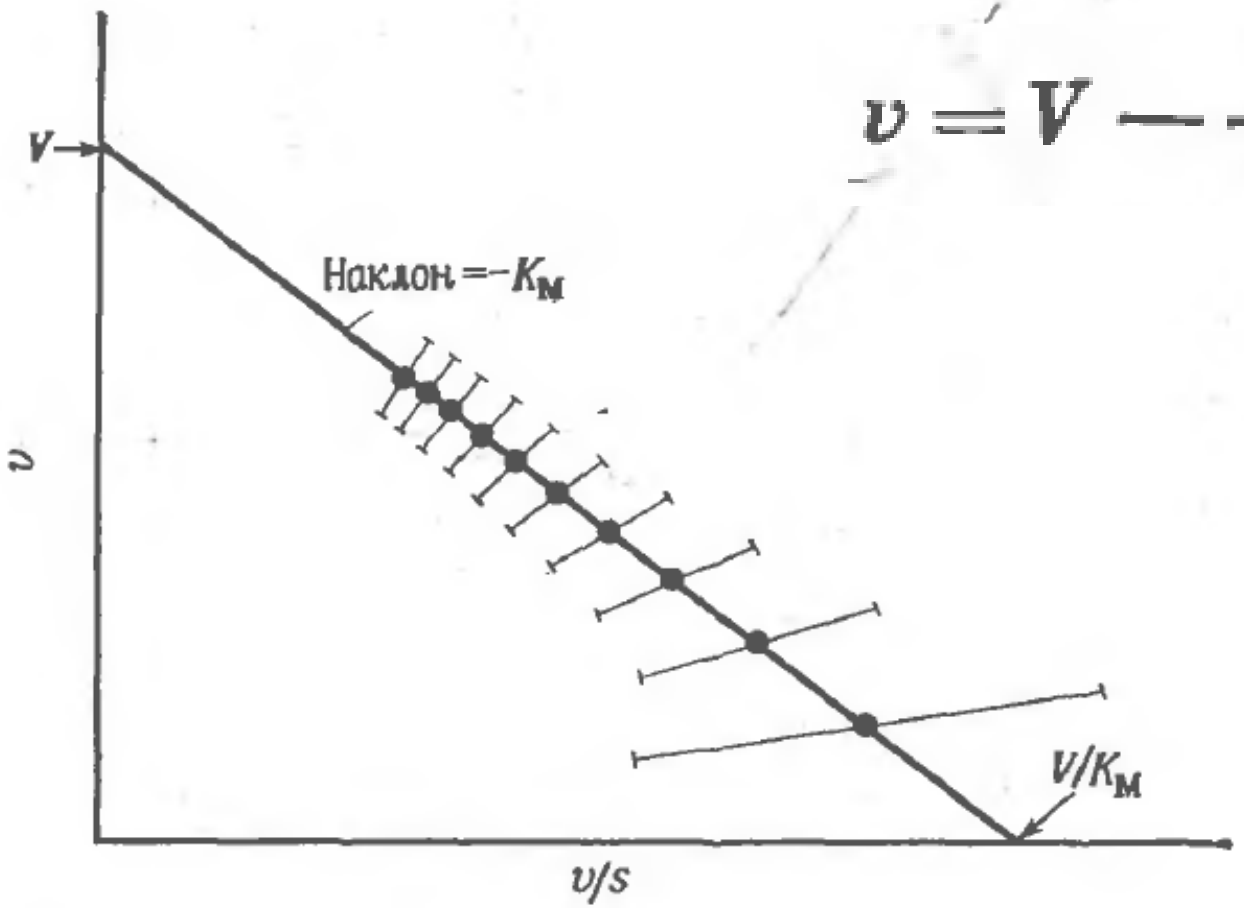
Координаты Иди-Хофсти

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

Координаты Лайнуивера-Берка

Координаты Иди-Хофсти

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

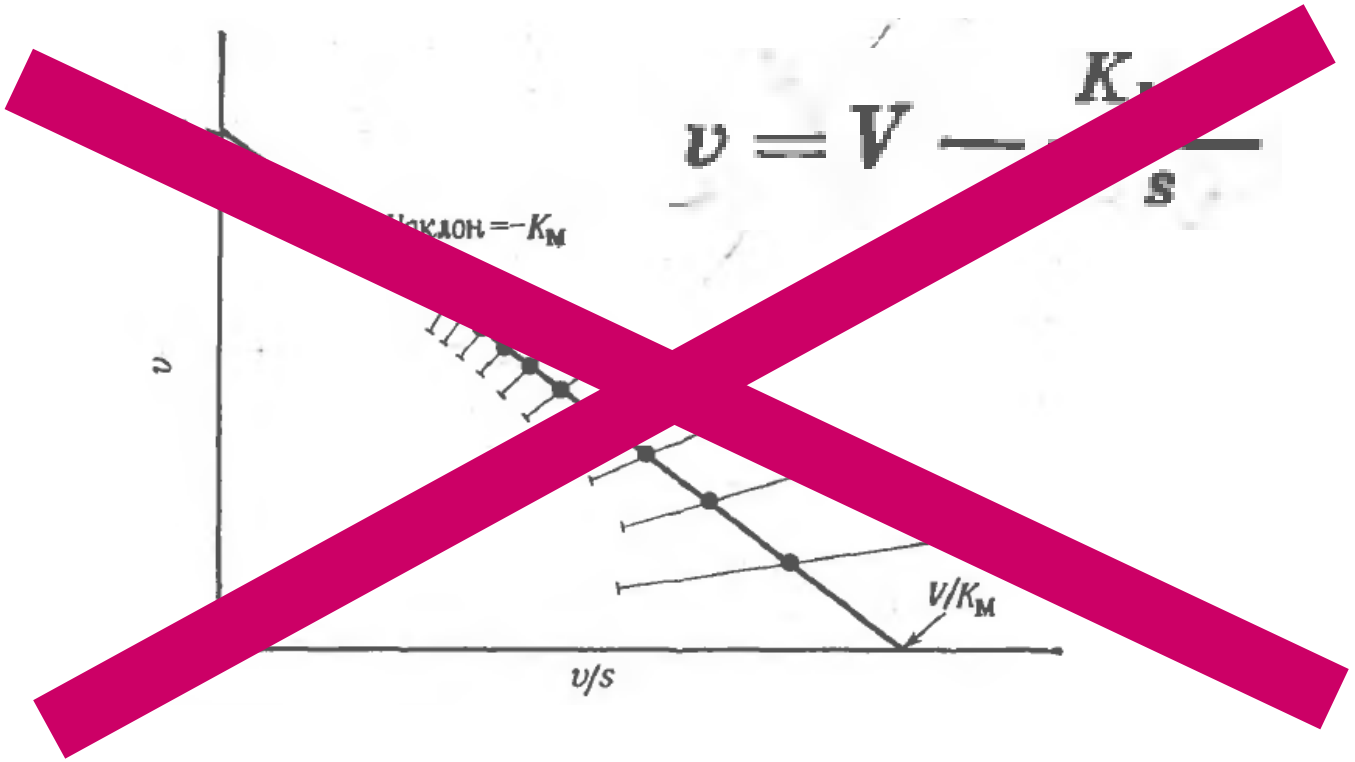


Координаты Иди-Хофсти

При определении параметров прямой методом линейной регрессии считается, что значения X задаются точно, без ошибки

В координатах Иди-Хофсти значение X равно ***v/S*** , что противоречит требованиям линейной регрессии

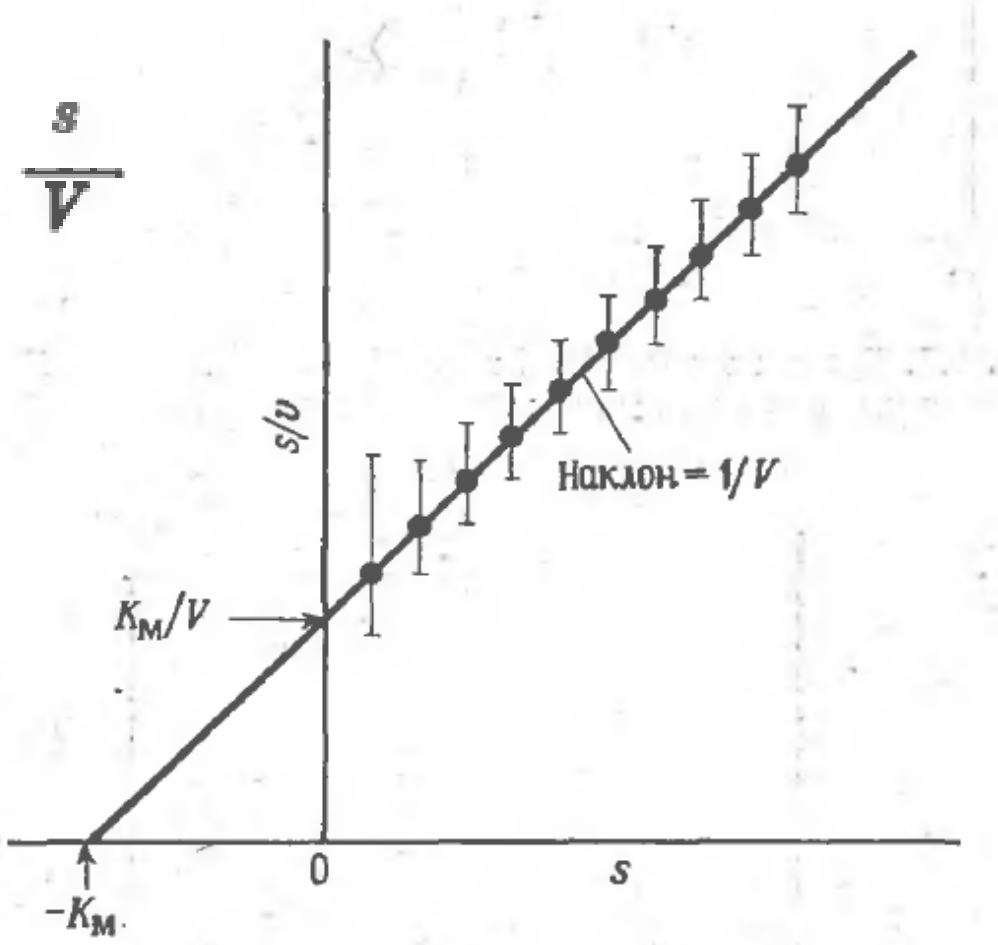
Координаты Иди-Хофсти



НИ ЗА ЧТО!!! НИКОГДА!!!

Координаты Хейнса-Вульфа

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



Координаты Хейнса-Вульфа

При определении параметров прямой методом линейной регрессии требуется, чтобы значения Y должны быть СТАТИСТИЧЕСКИ различными, т.е. не должно быть перекрывания значений соседних точек в диапазоне ошибок

Координаты Хейнса-Вульфа

При определении параметров прямой необходимо задавать РАВНЫЕ промежутки между значениями **X**

Выбор равных промежутков концентраций приводит к тому, что значения скоростей при концентрациях субстратов более 2 Км статистически не отличаются друг от друга:

При S_1 = 4Км

v_1 = Vmax*S\(S + Км) = Vmax*4Км\(4Км + Км) = 0,80*Vmax

С учетом ошибки измерения 5% значение скорости равно

v_1 = (0,80±0,040)*Vmax

S_2 = 5Км v_2 = Vmax*S\(S + Км) = Vmax*5Км\(5Км + Км) = 0,83*Vmax

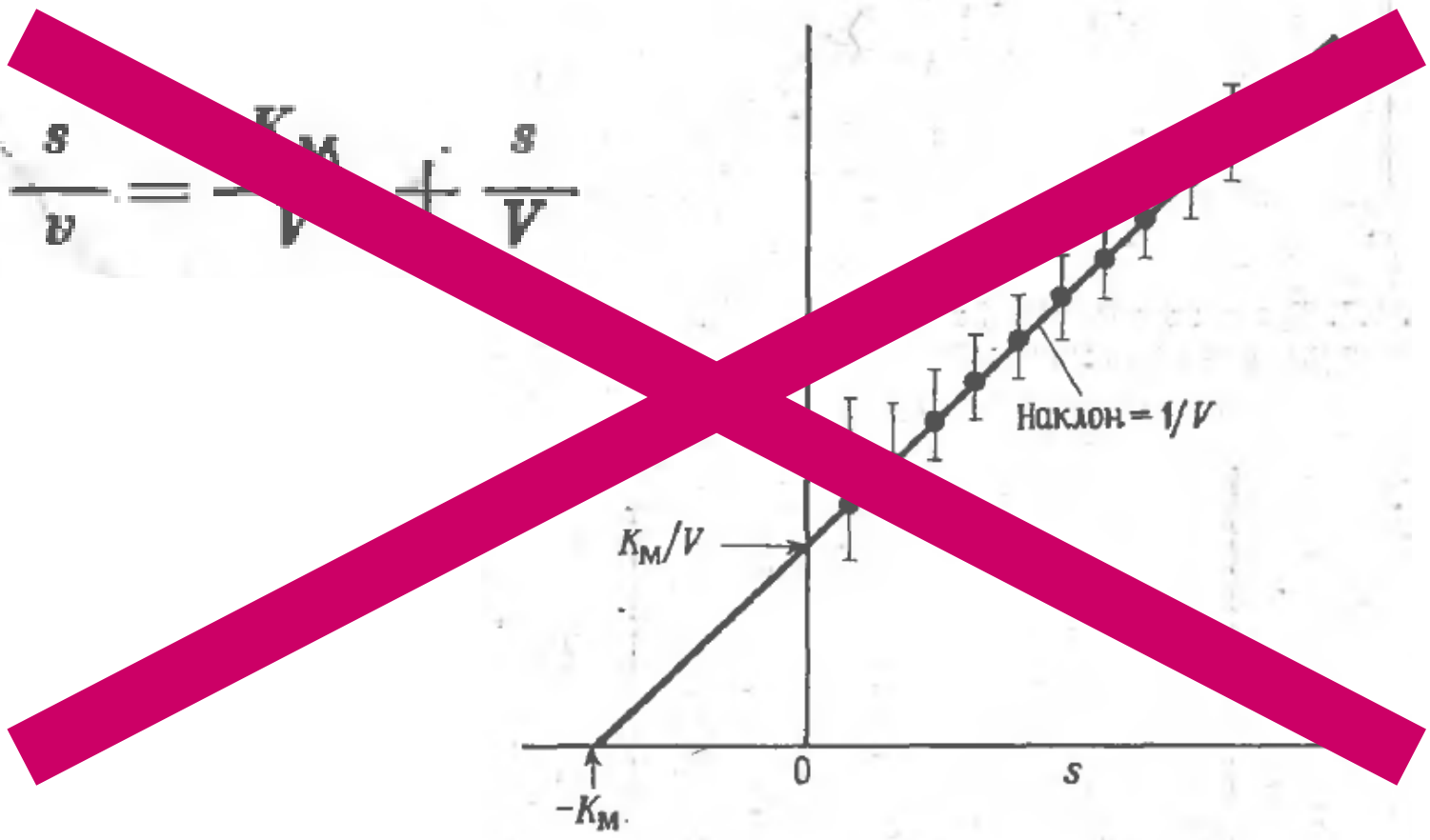
С учетом ошибки измерения 5% значение скорости равно

v_2 = (0,83±0,042)*Vmax

Результат

При ошибке измерения даже 5% для концентраций субстратов S_1 = 4Км и S_2 = 5Км **получаются одинаковые значения**

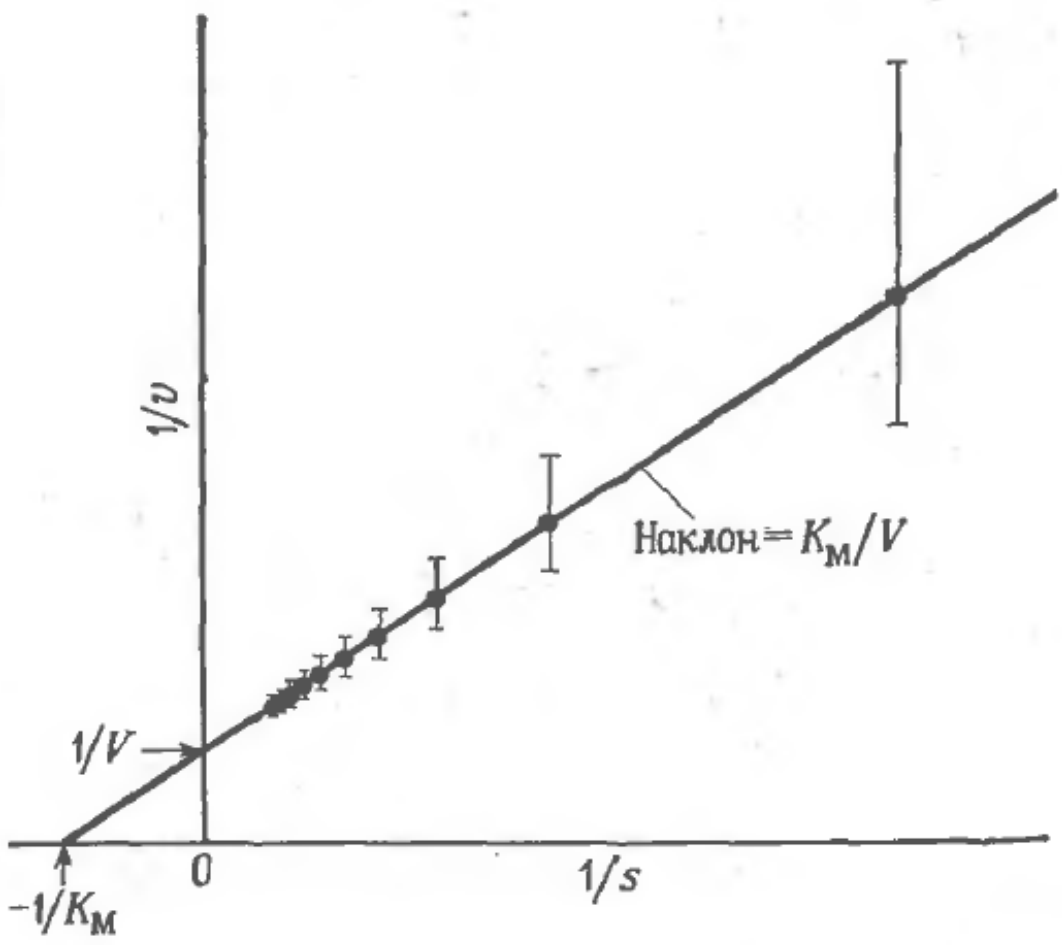
Координаты Хейнса-Вульфа



НИ ЗА ЧТО!!! НИКОГДА!!!

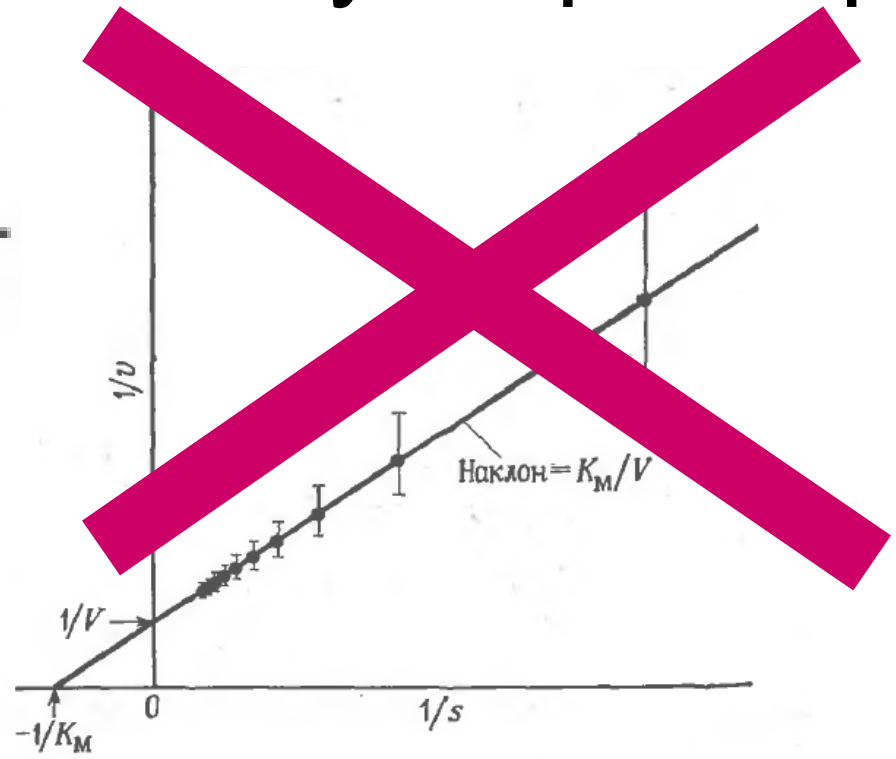
Координаты Лайнуивера-Берка

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



Координаты Лайнуивера-Берка

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



Практически во всех учебниках и статьях **используют равные промежутки между концентрациями**, что приводит к неравомерному расположению обратных концентраций на оси X.

Необходимо использовать **РАВНЫЕ** промежутки между **ОБРАТНЫМИ** концентрациями!!!

Почему именно координаты Лайнуивера-Берка?

В координатах Лайнуивера-Берка значения X надо задавать как РАВНЫЕ интервалы между ОБРАТНЫМИ концентрациями. В результате значения концентраций находятся в районе Km.

Матстатистика для определения параметров кривой требует задавать значения X в области **максимальной кривизны**. В уравнении Михаэлиса-Ментен максимальная кривизна именно при значении X равном Km.

Как уменьшить ошибки значений Y в двойных обратных координатах?

- Проводить обсчет с учетом статистических весов
  $\omega = 1/\sigma^2$
  при $y = 1/v$ $\omega = v^4/(\Delta v)^2$
- При низких концентрациях субстратов надо делать по несколько измерений

Как уменьшить ошибки значений Y в двойных обратных координатах?

- **Проводить обсчет с учетом статистических весов**
- **При низких концентрациях субстратов надо делать по несколько измерений**

- **Надо иметь «хорошие руки». Тогда получаются значения скоростей с малыми ошибками и величины V_m и K_m достаточно хорошо определяются в координатах Лайнуивера-Берка и без статвесов**

Прямой линейный график
(метод Корниш-Боудена)

Теория

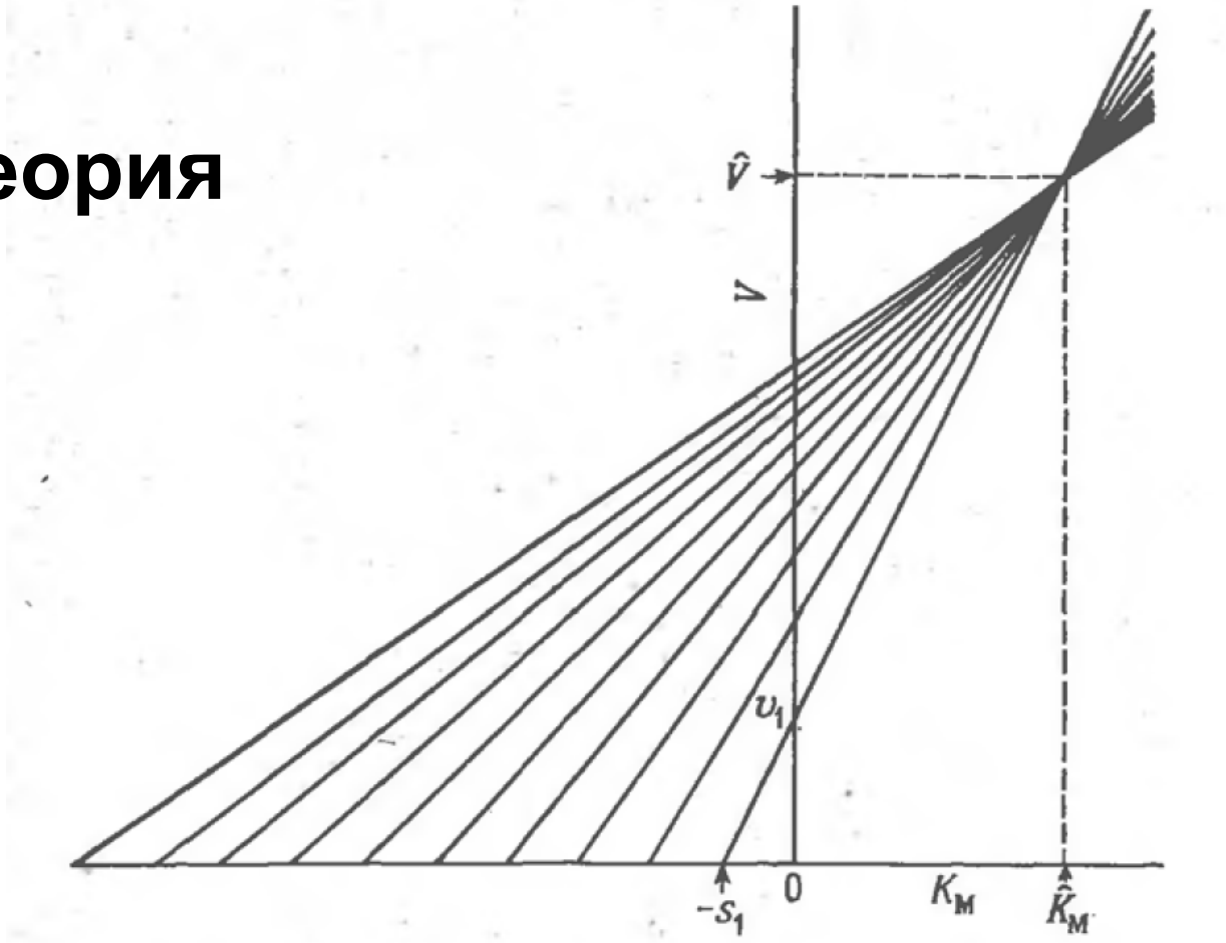


Рис. 2.7. Прямой линейный график (график зависимости V от $K_м$).

Прямой линейный график
(метод Корниш-Боудена)

Практика

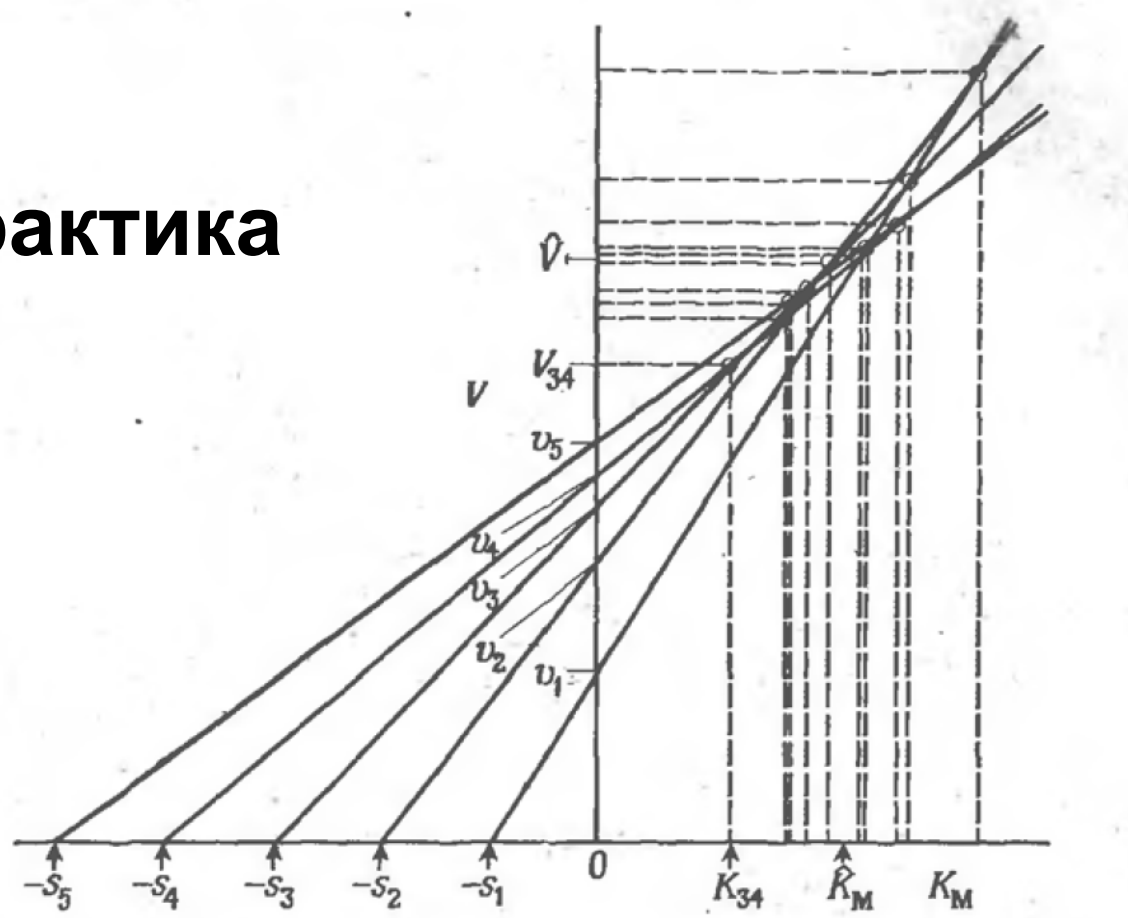


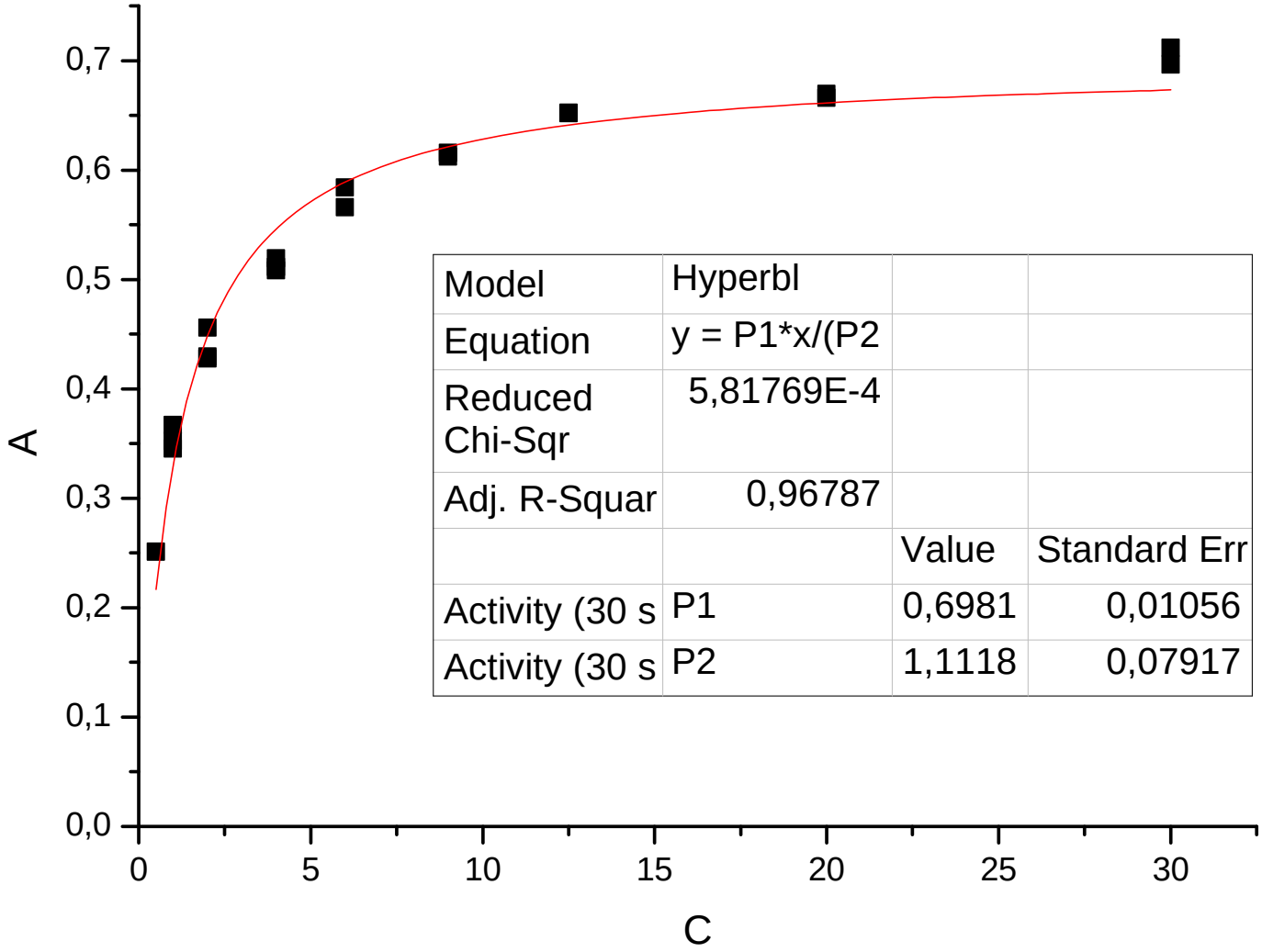
Рис. 10.3. Определение оценок медиан из прямого линейного графика.

Как правильно определять параметры гиперболы?

Как правильно определять параметры гиперболы?

Для корректного определения параметров гиперболы наиболее оптимальным является использование метода нелинейной регрессии для функции гипербола

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



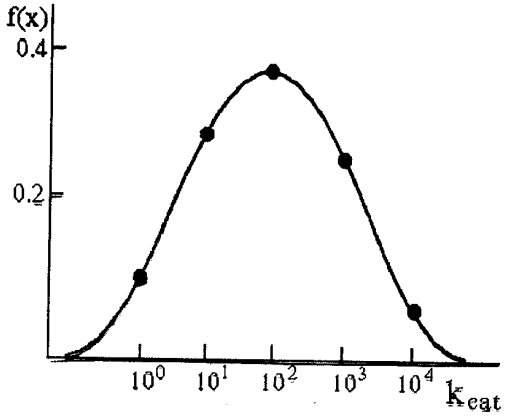
Model	Hyperbl		
Equation	y = P1*x/(P2		
Reduced Chi-Sqr	5,81769E-4		
Adj. R-Squar	0,96787		
		Value	Standard Err
Activity (30 s	P1	0,6981	0,01056
Activity (30 s	P2	1,1118	0,07917

Кинетика ферментативного катализа

Скорости элементарных стадий в ферментативном катализе.

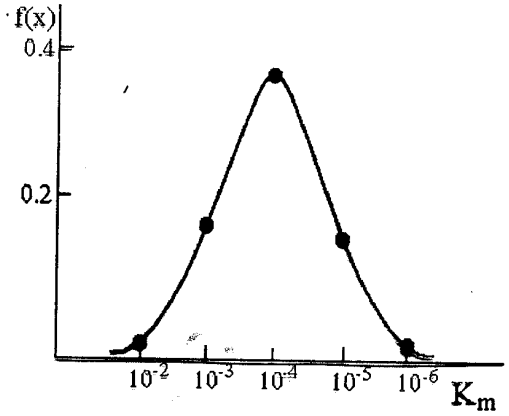
Характерные значения k_{cat} и $К_m$.

– выборка около 500 ферментов. Значения констант разбиты на группы с приблизительно одинаковыми значениями k_{cat} и $К_m$ 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 $К_m$.



Типичное значение

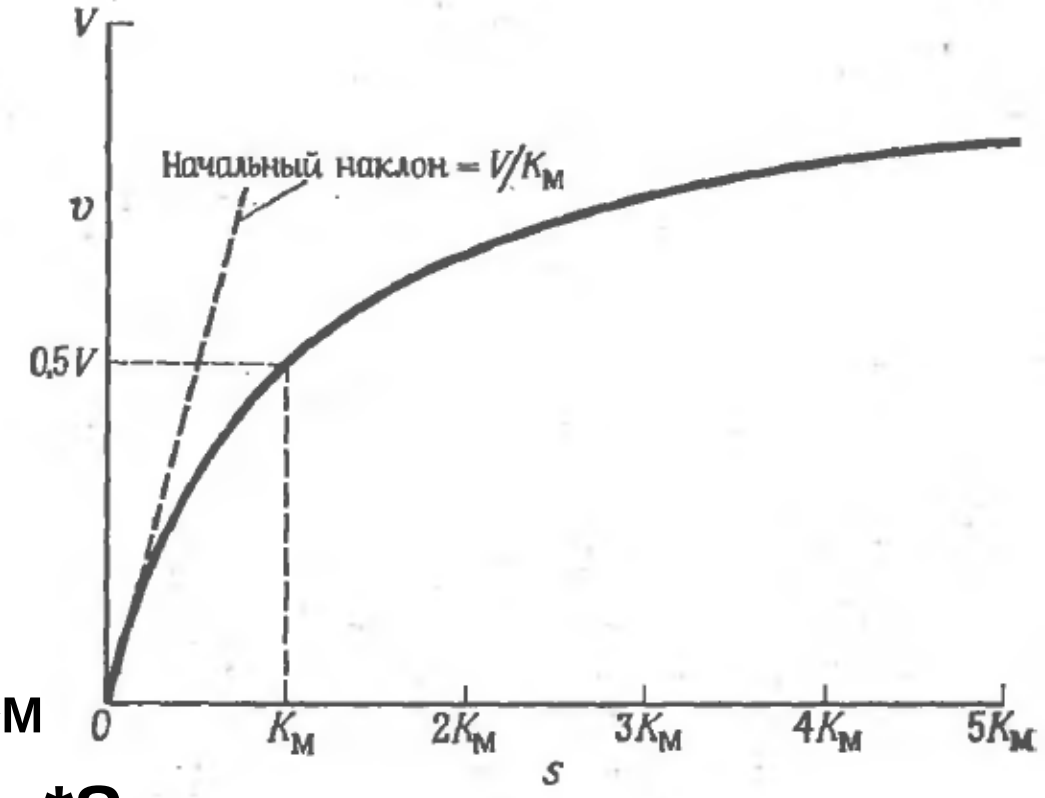
$k_{cat} = 10^2 с^{-1}$



Типичное значение

$К_m = 10^{-4}$ М

Порядок реакции в уравнении Михаэлиса-Ментен



$S_0 >> K_M$

$v = V_{max}$

$S_0 << K_M$

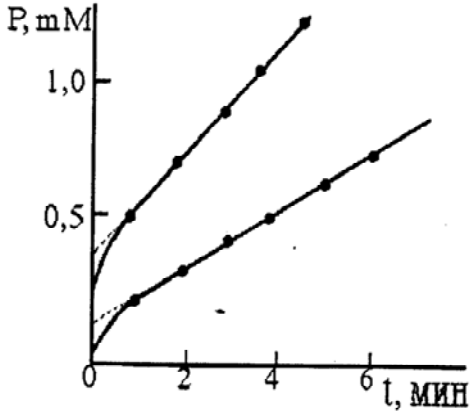
$v = V_{max}/K_M * S_0$

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

Кинетика ферментативного катализа

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

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



Простейшее объяснение

$E + S \rightarrow EA \rightarrow E + P_2$

P_1

п-нитрофенол

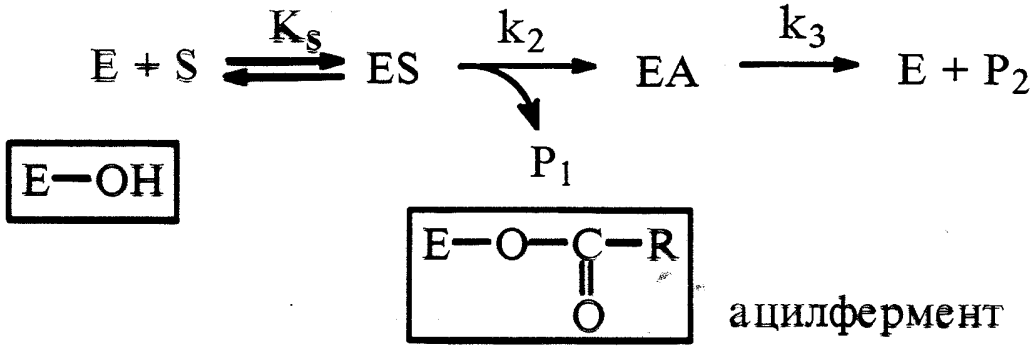
уксусная кислота

Кинетика ферментативного катализа

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

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

Промежуточный ацилфермент



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

$k_2 >> k_3$, $k_{cat} = k_3$ лимитирует деацилирование

$k_3 >> k_2$, $k_{cat} = k_2$ лимитирует ацилирование

Двухсубстратная ферментативная реакция по механизму «пинг-понг»

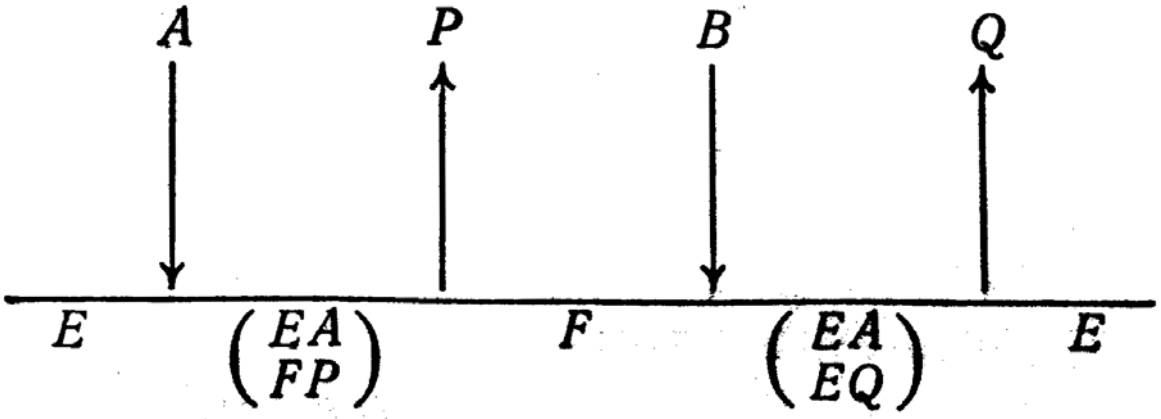
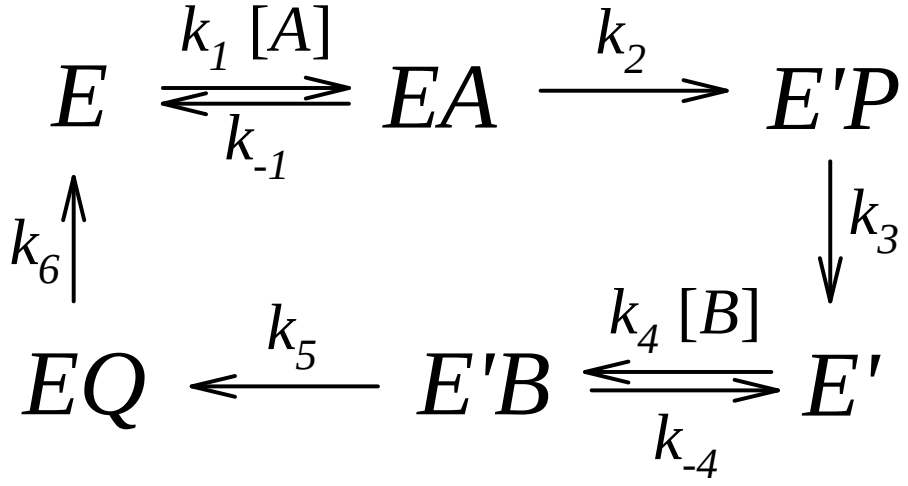


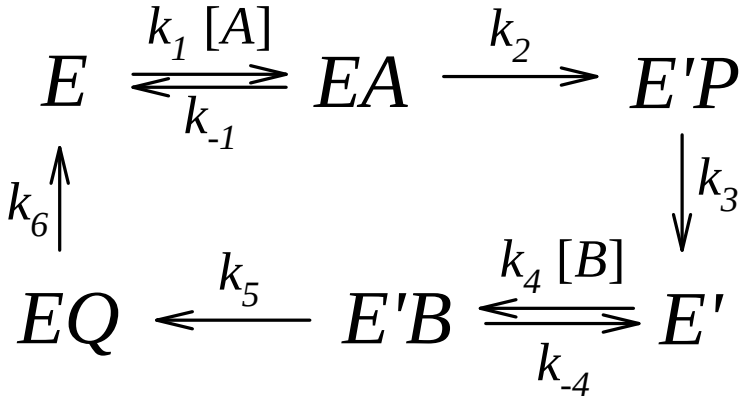
Схема Клеланда



Граф для вывода уравнения скорости реакции

Двухсубстратная ферментативная реакция по механизму «пинг-понг»

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



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

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

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

Кинетические схемы реакций, катализируемых пероксидазой

Одноэлектронное окисление субсстрата

$$E + H_2O_2 + 2H^+ \rightarrow E1 + 2H_2O$$

$$E1 + S \rightarrow E2 + P$$

$$E2 + S \rightarrow E + P$$

Кинетические схемы реакций, катализируемых пероксидазой

Одноэлектронное окисление субсстрата

$$E + H_2O_2 + 2H^+ \rightarrow E1 + 2H_2O$$

$$E1 + S \rightarrow E2 + P$$

$$E2 + S \rightarrow E + P$$

Двухэлектронное окисление иодид-иона

$$E + H_2O_2 + 2H^+ \rightarrow E1 + 2H_2O$$

$$E1 + I^- \rightarrow E^{\cdot}IOH$$

$$E^{\cdot}IOH \rightarrow E + IOH$$

Неферментативная стадия

$$I^- + IOH \rightarrow I_2 + OH^-$$

Упорядоченный Bi-Bi механизм с образованием тройного комплекса

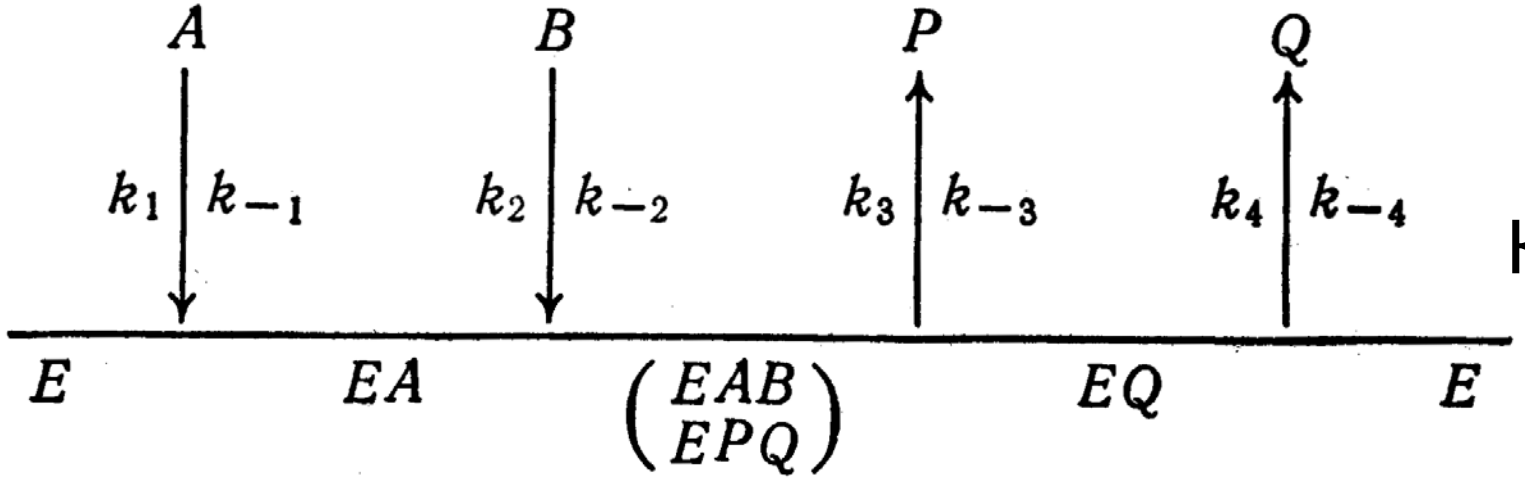
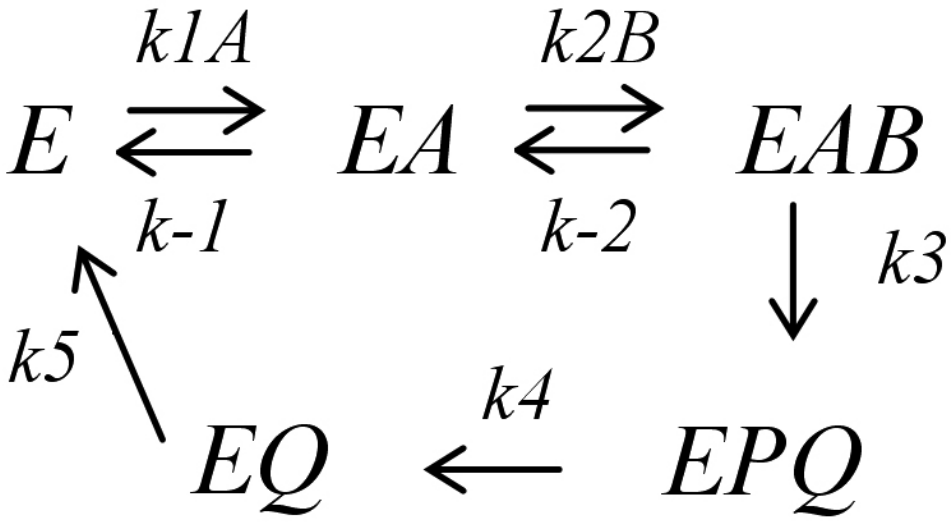


Схема Клеланда



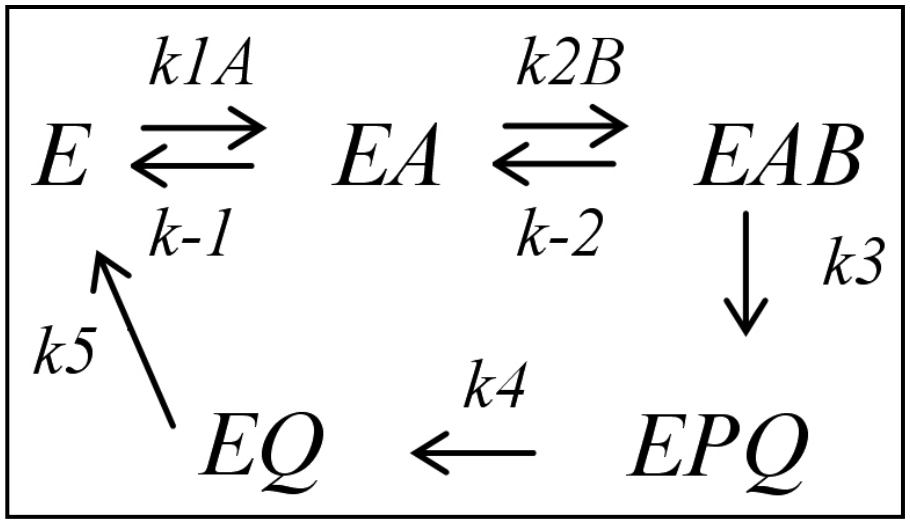
Граф для вывода уравнения скорости реакции

Упорядоченный Bi-Bi механизм с образованием тройного комплекса

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

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

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



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

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

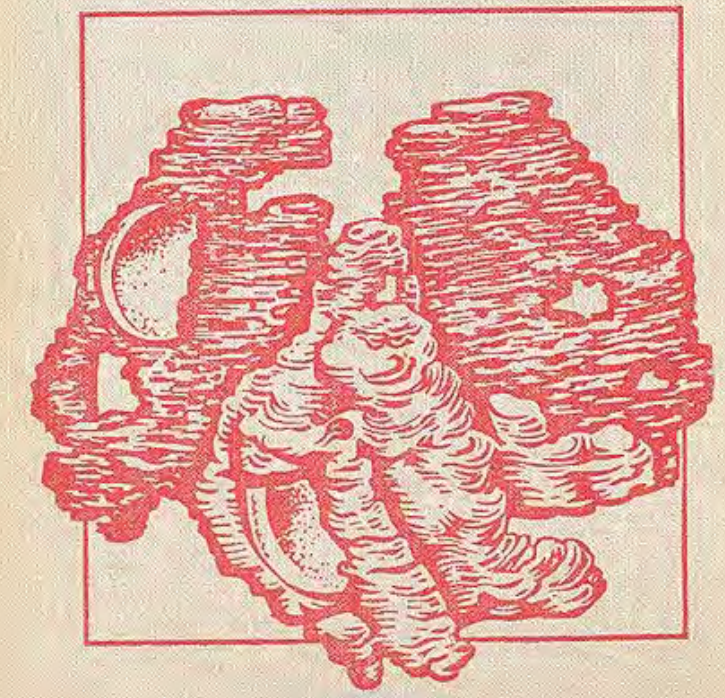
КАТАЛИЗ

Катализатор **не влияет** на **константу равновесия** реакции, поскольку ускоряет как **ПРЯМУЮ**, так и **ОБРАТНУЮ** реакцию.

4-е изд. - М.: "Химия", 1991 - 448 с.

О.М.ПОЛТОРАК·Е.С.ЧУХРАЙ

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА



ОЛЕСЬ ПОЛТОРАК,
ЕЛЕНА ЧУХРАЙ

Физико-химические основы ферментативного катализа

МЕХАНИЗМЫ КАТАЛИЗА

По типу катализатора

1. Гомогенный катализ
2. Гетерогенный катализ

По химической и физической природе действия

1. Активация за счет взаимодействия с катализатором
2. Кислотно-основной (электрофильно-нуклеофильный)
3. Сближение и ориентация
4. Эффект среды

Кислотно-основной катализ

1. Специфический катализ – катализ ионами H^+ и OH^-
2. Общий кислотно-основной катализ - катализ кислотами и основаниями
3. Катализ кислотами и основаниями Льюиса

.

СПЕЦИФИЧЕСКИЙ КАТАЛИЗ

Специфический катализ – катализ ионами H^+ и OH^-

Часто наблюдается в классическом катализе и не реализуется в ферментативном

.

Общий кислотно-основной катализ

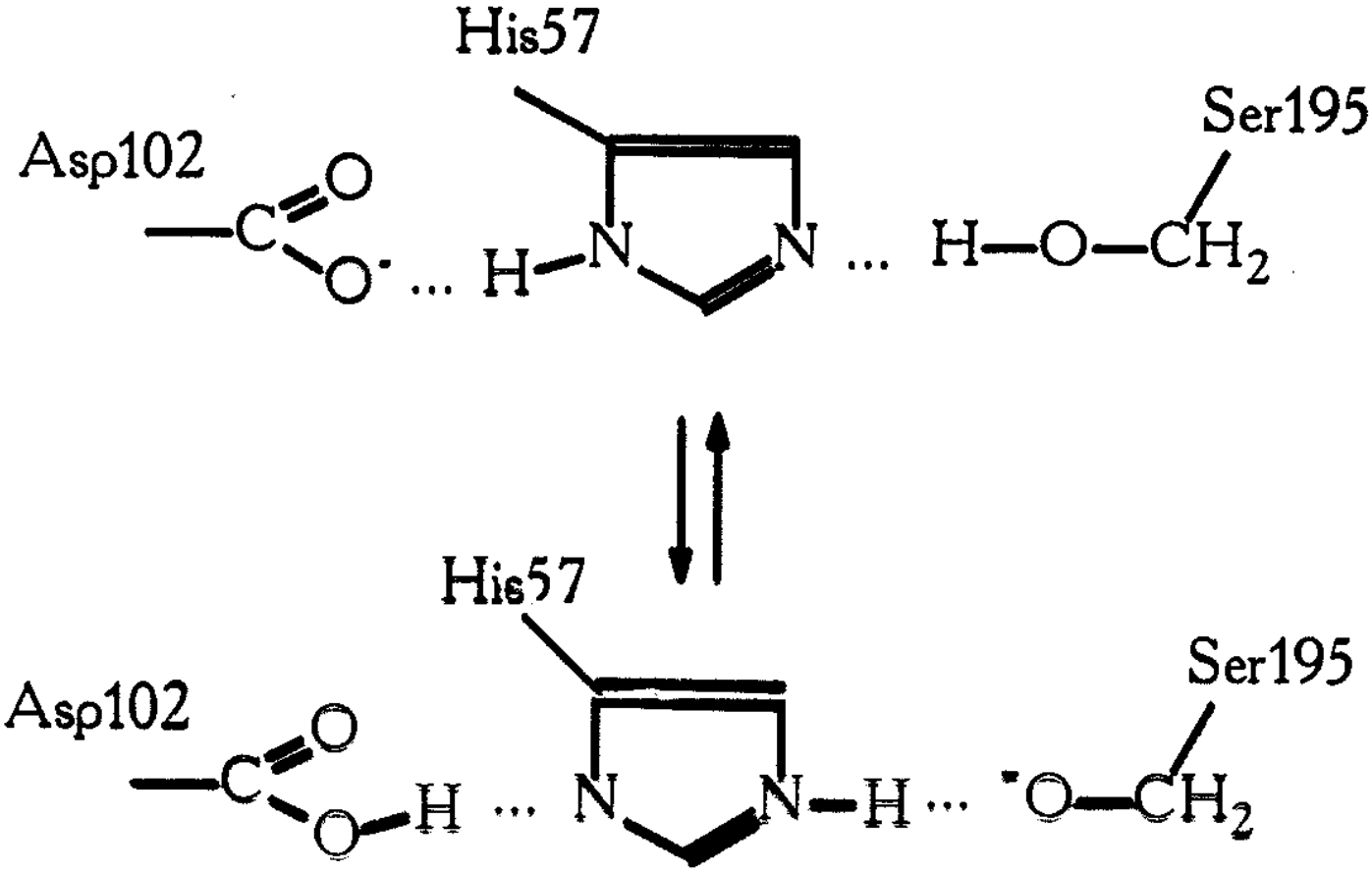
Катализ кислотами и основаниями

В качестве активных групп могут выступать группы боковых радикалов, а также кислород карбонила и азот амида основной цепи.

Катализ кислотами и основаниями Льюиса

.

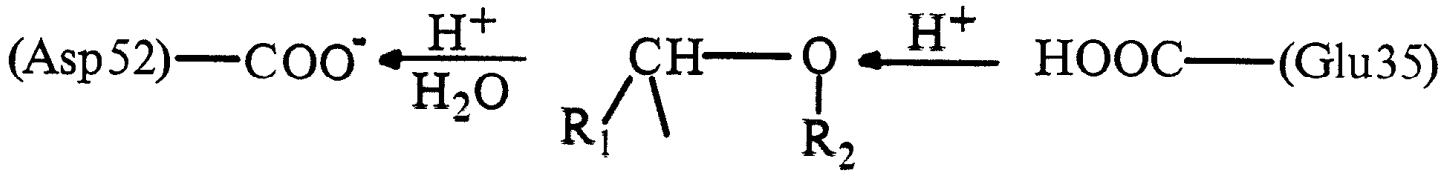
Цепь переноса протона (proton relay system)



Пуш-пульный механизм

Лизоцим

Цепь переноса заряда

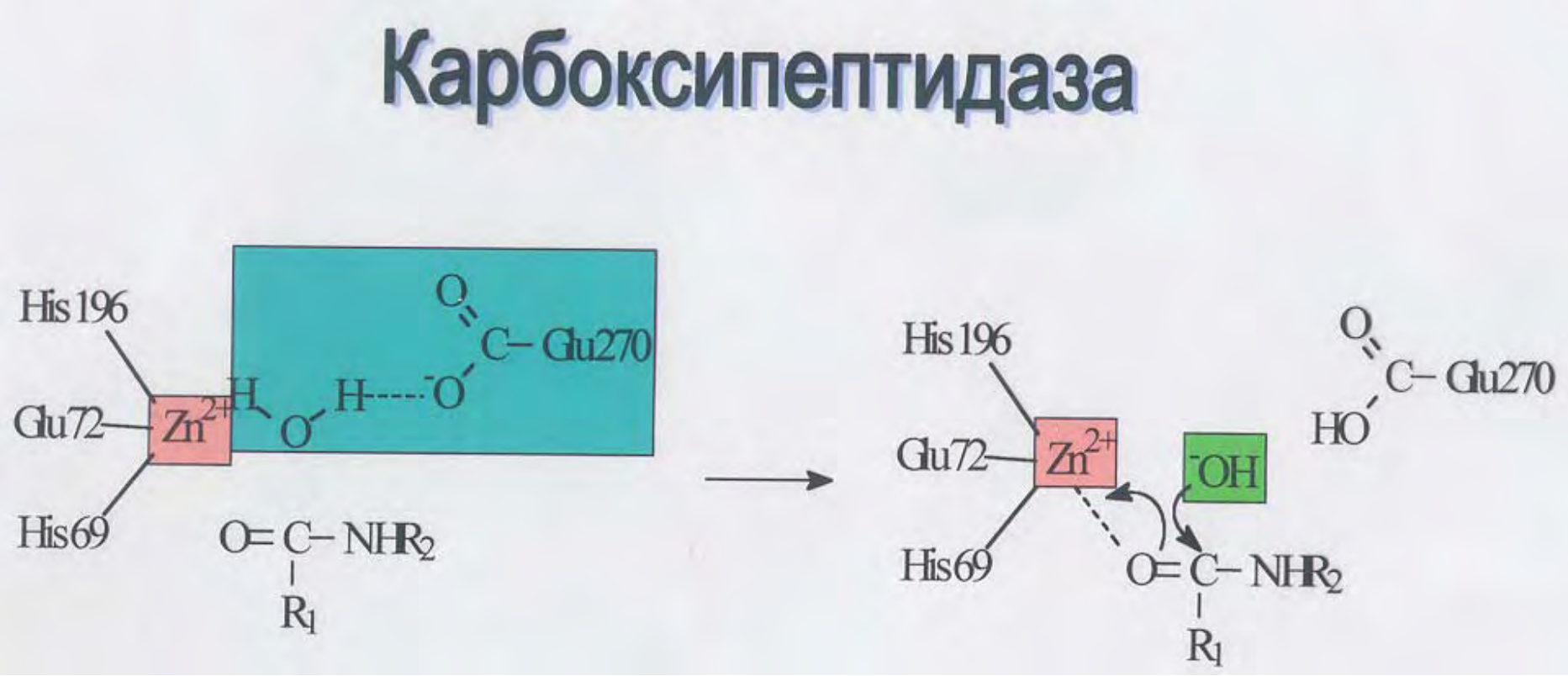


Общий основной катализ

Общий кислотный катализ

Продукты

Комбинированный катализ-
общий кислотно-основной и кислота Льюиса

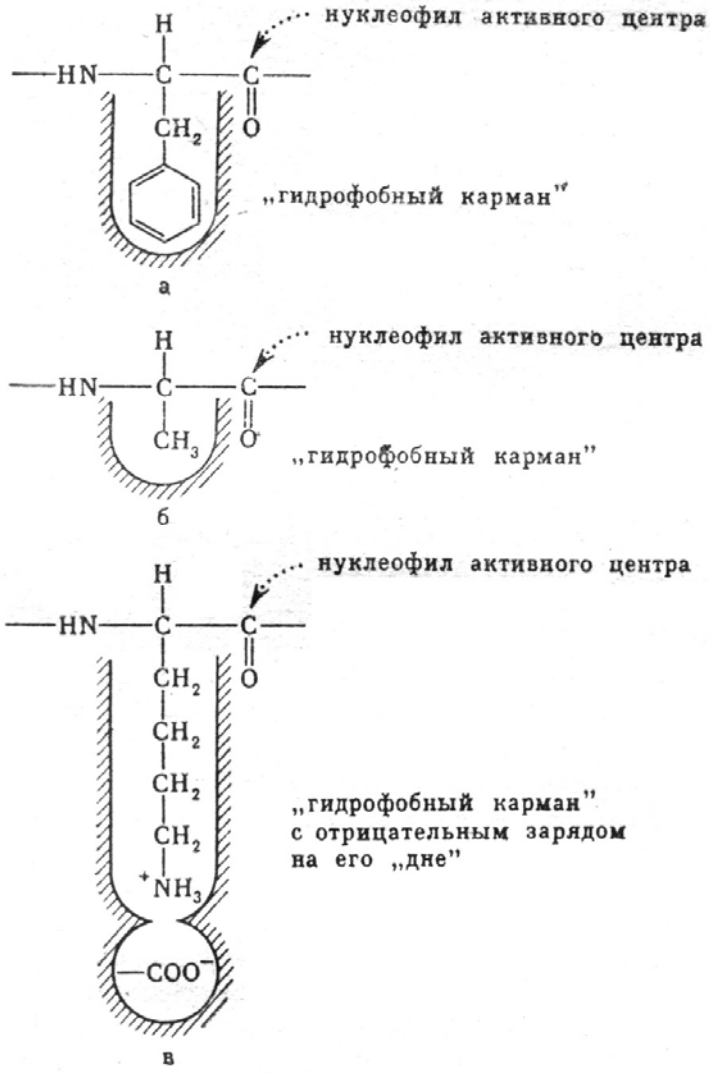


Ориентация и сближение

Достигается за счет связывания субстратов в активном центре

Процесс термодинамически выгодный за счет использования энергии взаимодействия субстрата с аминокислотными остатками фермента

Сближение-ориентация в активных центрах протеаз



Эффект среды

При связывании субстрата в активном центре возможно создание его окружения с определенными свойствами

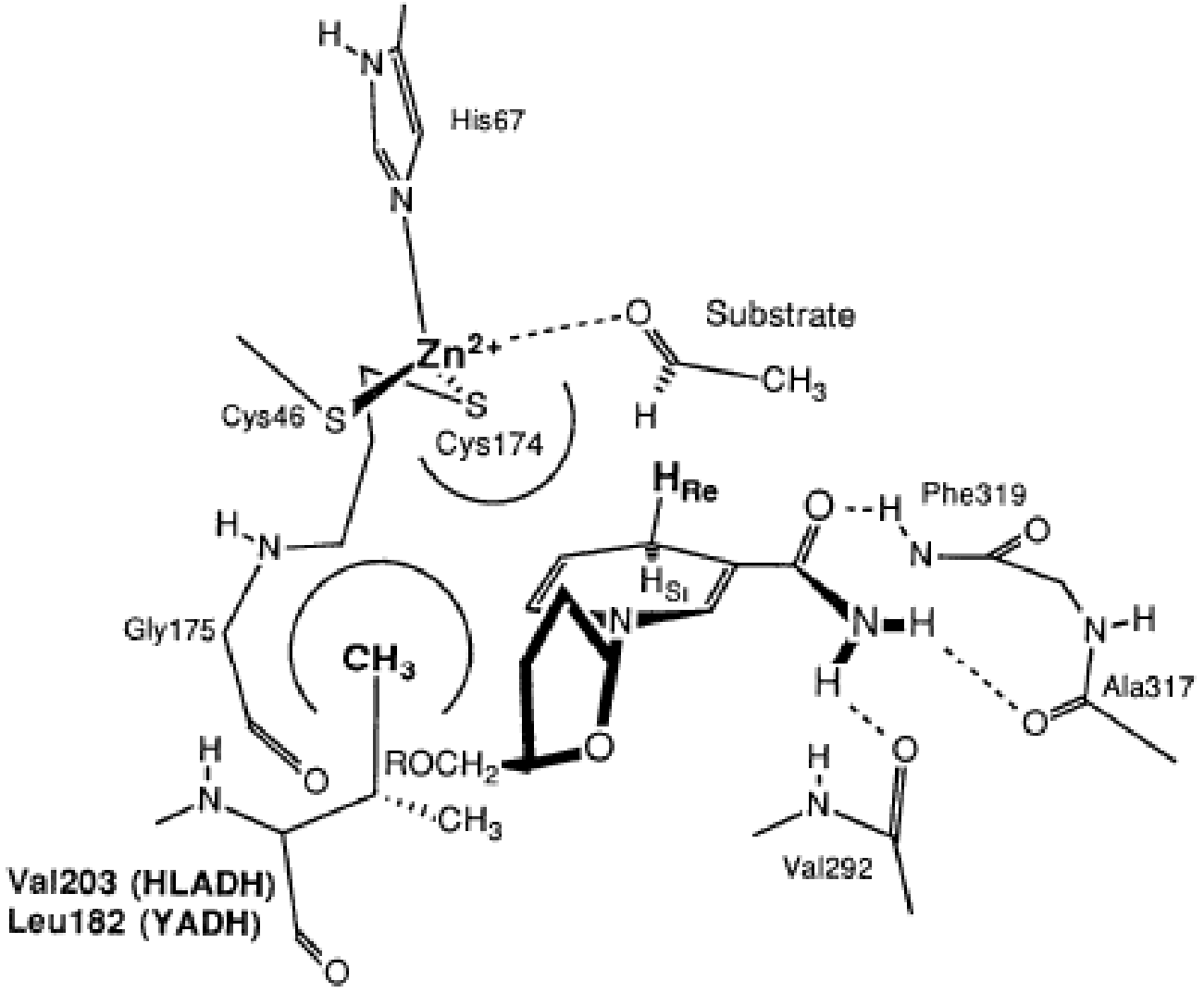
1. **Снижение диэлектрической проницаемости усиливает электростатические взаимодействия**
   (ускорение реакции переноса гидрид-иона от субстрата к окисленным формам коферменов ($NAD(P)^+$) и кофакторов (FAD, FMN)).
2. **Введение полярной (заряженной) группы рядом с кислотой и основанием изменяет величину рК**
   (позволяет иметь в активном центре две одинаковые группы в разном состоянии ионизации – карбоксилы в активном центре лизоцима и других карбогидраз)

ПРИЧИНА ВЫСОКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА

В случае ферментативного катализа возможна **ОДНОВРЕМЕННАЯ** реализация **СРАЗУ НЕСКОЛЬКИХ** типов и механизмов катализа

Одновременная реализация разных типов и механизмов катализа в активном центре фермента.

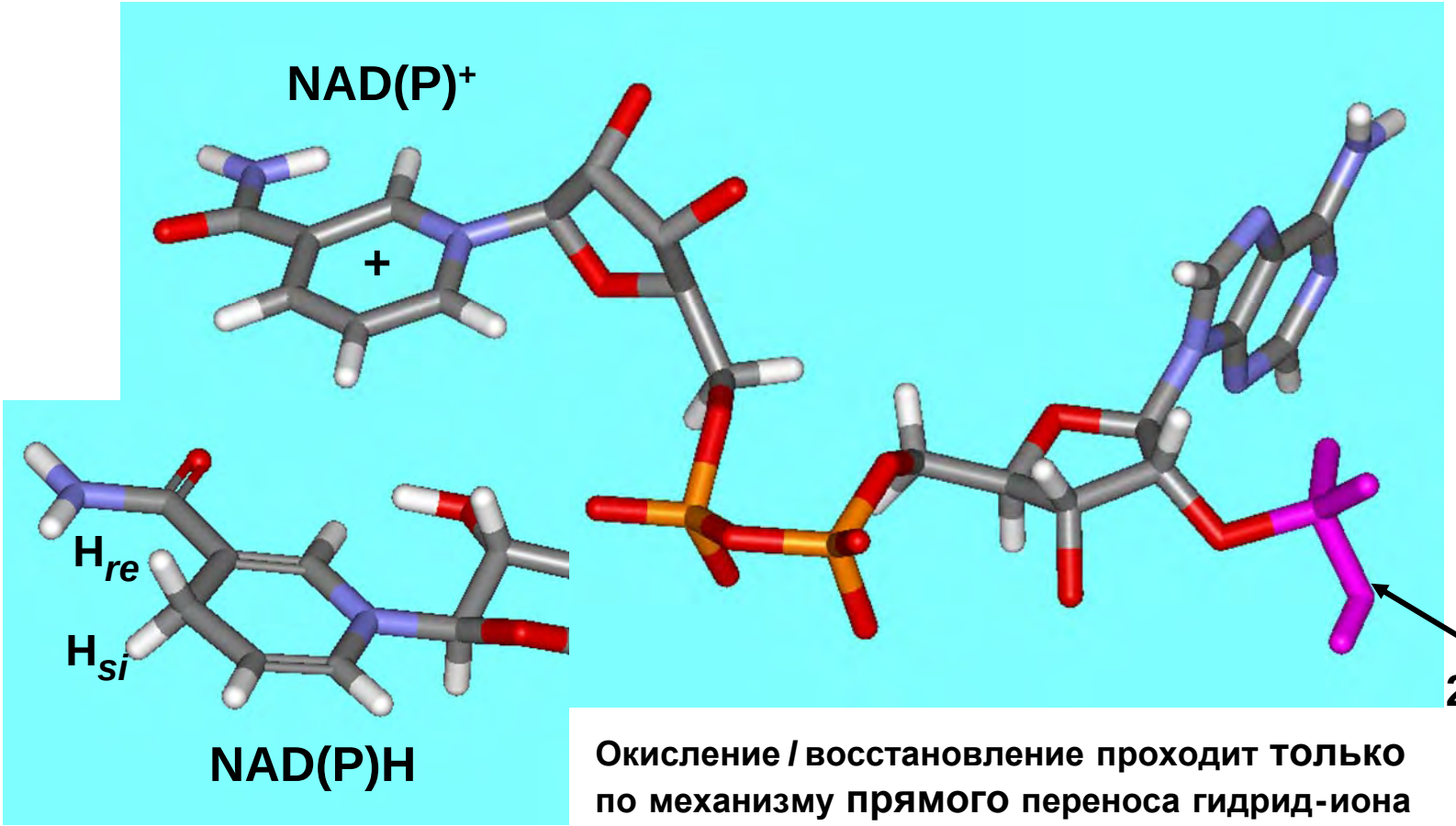
АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗА (АДГ)



Коферменты и кофакторы.
NAD^+ и $NADP^+$
Никотинамидадениндинуклеотид (фосфат)

NAD(P)+ - окисленная форма

NAD(P)H – восстановленная форма



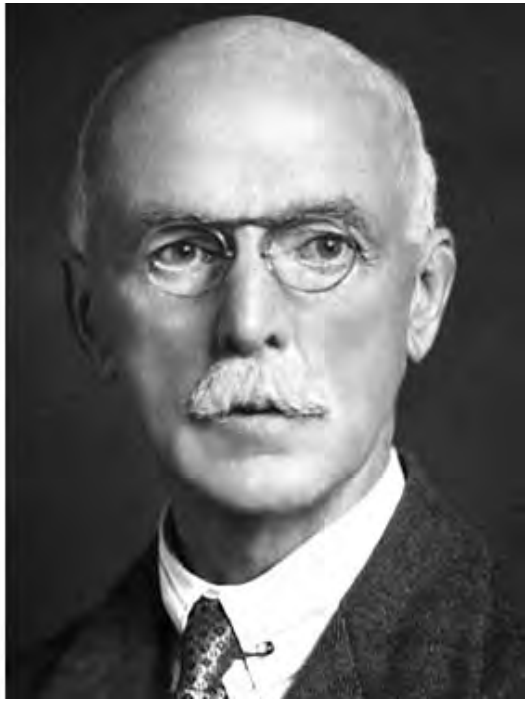
2'-фосфатная группа

Окисление / восстановление проходит только по механизму прямого переноса гидрид-иона

Кто открыл NAD(P)$^+$
1906 год

Уильям Джон Янг

А́ртур Га́рден — английский биохимик. Лауреат Нобелевской премии по химии (1929).



В 1906 году ими было открыто наличие теплостойкого компонента в экстрактах дрожжей, который ускорял спиртовое брожение. Неизвестный фактор, ответственный за это явление, они назвали ***коферментом*.**

Кто открыл NAD(P)$^+$
1934 год

О́тто Ге́нрих Ва́рбург — немецкий биохимик, доктор и физиолог, ученик Эмиля Фишера, лауреат Нобелевской премии в области физиологии и медицины 1931 года. Один из выдающихся учёных двадцатого века в области цитологии. Сын Эмиля Варбурга.

В 1934-1936 гг. немецкий учёный Отто Генрих Варбург установил функцию этого кофермента по переносу гидрид - иона и определил, что в окислительно-восстановительных реакциях участвует никотинамидная часть

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ КИНЕТИКА

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftarrows}} EP \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\rightleftarrows}} E + P$$

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftarrows}} EP \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\rightleftarrows}} E + P$$

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} ES \xrightarrow{k_2} EP \xrightarrow{k_3} E + P$$

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$