

VIII. ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ УРАВНЕНИЯ МИХАЭЛИСА–МЕНТЕН

Теоретическое введение

Строение и свойства ферментов

Ферменты, или **энзимы** (от лат. *fermentum*, греч. ζύμη, ενζύμων – дрожжи, закваска) – обычно белковые молекулы или молекулы РНК (рибозимы) или их комплексы, катализирующие химические реакции в живых системах. Термины «фермент» и «энзим» используются как синонимы (первый в основном в русской и немецкой научной литературе, второй – в англо- и франкоязычной). Реагенты в реакции, катализируемой ферментами, называются субстратами, а получающиеся вещества – продуктами.

Как и все белки, ферменты синтезируются в виде линейной цепочки аминокислот (первичная структура), которая скручивается или складывается определённым образом (вторичная структура) за счёт образования водородных связей. Под третичной структурой понимают расположение полипептидной цепи в пространстве в результате дальнейшего сворачивания цепи. Стабилизация двух последних структур осуществляется водородными и дисульфидными связями, силами Ван-дер-Ваальса и различного рода электростатическими взаимодействиями. Третичная структура белков может разрушаться при нагревании или воздействии некоторых химических веществ. Несколько белковых цепей могут нековалентно объединяться в белковый комплекс (четвертичная структура). Количество субъединиц в таком комплексе может быть от 2 до 3000. Молярная масса ферментов составляет от 10^4 до 10^{10} г·моль⁻¹ и более.

В каталитическом акте принимает непосредственное участие не вся белковая молекула в целом, а лишь определённые участки на её поверхности или располагающиеся в специальном углублении активные центры. Они представляют собой совокупность функциональных групп аминокислотных остатков, непосредственно взаимодействующих с субстратом. Некоторые ферменты выполняют каталитическую функцию сами по себе, безо всяких дополнительных компонентов. Однако есть ферменты, которым для осуществления катализа необходимы компоненты небелковой природы – коферменты. Коферментами могут быть как неорганические молекулы (ионы металлов, железо-

серные кластеры и др.), так и органические (например, флавин или гем).

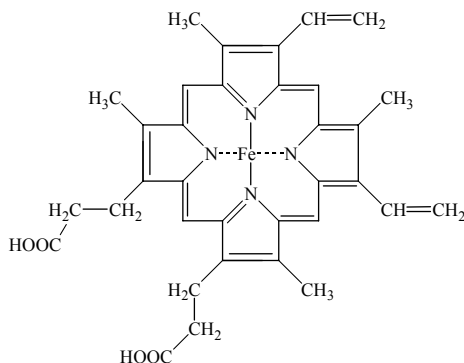
Из особых каталитических свойств ферментов в первую очередь следует упомянуть их уникальную *специфичность* и очень высокую *активность*. Для того чтобы катализировать реакцию, фермент связывается только с одним или несколькими определёнными субстратами. Это достигается частичной комплементарностью формы, распределения зарядов и гидрофобных областей на молекуле субстрата и в центре связывания субстрата на ферменте. Ферментативные реакции протекают со скоростями нередко в 10^8 – 10^{20} раз большими, чем соответствующие некаталитические процессы. По сравнению с неорганическими искусственными катализаторами ферменты обычно более эффективны в 10^8 – 10^9 раз. Активность фермента, определённая с использованием разных субстратов, может различаться в несколько раз. Зависит она также от температуры, pH, степени очистки фермента и других факторов.

По типу катализируемых реакций ферменты подразделяют на 6 классов согласно иерархической классификации ферментов, которая была предложена Международным союзом биохимии и молекулярной биологии (International Union of Biochemistry and Molecular Biology):

- **оксидоредуктазы**, катализирующие окисление или восстановление (например, каталаза, алкогольдегидрогеназа);
- **трансферазы**, катализирующие перенос химических групп с одной молекулы субстрата на другую (например, РНК-полимераза, транскетолаза, аспартат-карбамолитрансфераза);
- **гидролазы**, катализирующие гидролиз химических связей (например, эстеразы, пепсин, трипсин, амилаза);
- **лиазы**, катализирующие разрыв химических связей без гидролиза с образованием двойной связи в одном из продуктов, а также обратные реакции – присоединения по двойным связям (например, карбокси-лиазы, гидро-лиазы, аммиак-лиазы);
- **изомеразы**, катализирующие структурные или геометрические изменения в молекуле субстрата (например, малеинатизомераза);
- **лигазы**, катализирующие образование химических связей между субстратами за счёт гидролиза АТФ (например, глутамин-синтетаза, ДНК-полимераза).

Пероксидазы – ферменты класса оксидоредуктаз, катализирующие окисление с помощью перекиси водорода (H_2O_2) или органических перекисей, которые действуют как акцепторы водорода

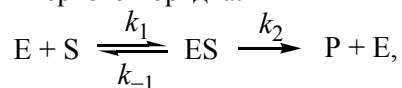
различных веществ (полифенолов, алифатических и ароматических аминов, а также жирных кислот, цитохрома, глутатиона и др.). Пероксидазы присутствуют преимущественно в растениях, их также можно обнаружить в лейкоцитах крови и в молоке; они участвуют в фотосинтезе, энергетическом обмене, в трансформации пероксидов и веществ, чужеродных организму. Пероксидазы, выделенные из различных источников, различаются молярной массой и субстратной специфичностью. Наиболее подробно изучена растительная пероксидаза из корней хрена (молярная масса $\approx 44100 \text{ г}\cdot\text{моль}^{-1}$), молекула которой состоит из одной полипептидной цепи (308 аминокислотных остатков), связанной ковалентно с 8 олигосахаридными цепями. Молекула содержит также нековалентно связанную простетическую группу, которая близка гему гемоглобина (последний обладает слабой пероксидазной активностью):



Пероксидазу применяют в экспериментальной и практической медицине для иммуноферментного анализа, а также в аналитических целях, например, для определения загрязнений в окружающей среде.

Кинетика ферментативных реакций

В основе кинетического анализа ферментативных процессов лежит предположение о том, что между ферментом E и субстратом S обратимо образуется промежуточный продукт – фермент-субстратный комплекс ES, который необратимо превращается в продукт P с константой скорости первого порядка:



где k_1 , k_{-1} и k_2 – константы скоростей реакций.

Если справедливо допущение о стационарном протекании реакции, то для фермент-субстратного комплекса применим метод квазистационарных концентраций, иными словами:

$$\frac{d[\text{ES}]}{dt} = k_1[\text{E}][\text{S}] - k_{-1}[\text{ES}] - k_2[\text{ES}] = k_1[\text{E}][\text{S}] - (k_{-1} + k_2)[\text{ES}] = 0.$$

Учтём тот факт, что фермент, изначально существовавший только в свободной форме, в процессе реакции находится как в виде фермент-субстратного комплекса, так и в виде молекул свободного фермента:

$$[\text{E}]_0 = [\text{E}] + [\text{ES}].$$

Выразим отсюда концентрацию фермента

$$[\text{E}] = [\text{E}]_0 - [\text{ES}]$$

и подставим её в уравнение квазистационарности:

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{ES}]}{dt} &= k_1([\text{E}]_0 - [\text{ES}])[\text{S}] - (k_{-1} + k_2)[\text{ES}] = \\ &= k_1[\text{E}]_0[\text{S}] - (k_1[\text{S}] + k_{-1} + k_2)[\text{ES}] = 0. \end{aligned}$$

Тогда концентрация фермент-субстратного комплекса

$$[\text{ES}] = \frac{k_1[\text{E}]_0[\text{S}]}{k_1[\text{S}] + k_{-1} + k_2}.$$

Скорость ферментативной реакции в целом, т. е. скорость образования продукта, представляет собой скорость распада фермент-субстратного комплекса с константой k_2 :

$$v = \frac{d[\text{P}]}{dt} = k_2[\text{ES}] = \frac{k_1 k_2 [\text{E}]_0 [\text{S}]}{k_1 [\text{S}] + k_{-1} + k_2}.$$

Разделим числитель и знаменатель на k_1 :

$$v = \frac{k_2 [\text{E}]_0 [\text{S}]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [\text{S}]} = \frac{k_2 [\text{E}]_0 [\text{S}]}{K_M + [\text{S}]},$$

где выражение $\frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$ называется константой Михаэлиса K_M . Это

кинетическая константа с размерностью концентрации, которая равна такой концентрации субстрата, при которой скорость ферментативной реакции составляет половину от максимального значения и половина исходного количества фермента оказывается связанной в фермент-субстратный комплекс. Численное значение K_M зависит от многих факторов – pH, температуры, присутствия ингибиторов или актива-

торов – и изменяется в довольно широких пределах – примерно от 1 до 10^{-8} моль·л⁻¹.

Для начальной стадии реакции (когда количеством продукта можно пренебречь, $[P] \rightarrow 0$), проводимой в условиях избытка субстрата по сравнению с ферментом ($[S]_0 \gg [E]_0$), уменьшением концентрации субстрата можно пренебречь, и уравнение материального баланса для субстрата можно записать следующим образом:

$$[S]_0 = [S] + [ES] + [P] \approx [S].$$

Тогда выражение для начальной скорости реакции приобретает вид:

$$v_0 = \frac{k_2[E]_0[S]_0}{K_M + [S]_0}. \quad (\text{VIII-1})$$

Если $k_{-1} \gg k_2$, то на первой стадии ферментативной реакции с течением времени устанавливается квазиравновесие, и в выражение для скорости ферментативной реакции входит уже не константа Михаэлиса, а субстратная константа K_S , характеризующая взаимодействие фермента с субстратом в равновесных условиях:

$$v_0 = \frac{k_2[E]_0[S]_0}{\frac{k_{-1}}{k_1} + [S]_0} = \frac{k_2[E]_0[S]_0}{K_S + [S]_0}, \text{ где } K_S = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]}.$$

Проанализируем уравнение (VIII-1) для начальной скорости реакции при различных начальных концентрациях субстрата.

1) В случае, когда начальная концентрация субстрата мала по сравнению с константой Михаэлиса, $[S]_0 \ll K_M$, то $v_0 = \frac{k_2[E]_0[S]_0}{K_M}$ и

ферментативная реакция имеет первый порядок как по ферменту, так и по субстрату.

2) При больших концентрациях субстрата, $[S]_0 \gg K_M$, начальная скорость реакции $v_0 = k_2[E]_0$ не зависит от концентрации субстрата (реакция имеет нулевой порядок по субстрату) и называется максимальной скоростью ферментативной реакции v_{\max} . Этот эффект так называемого субстратного насыщения обусловлен практически полным связыванием всего имеющегося в системе фермента в фермент-субстратный комплекс, поэтому его концентрация, а, следовательно, и наблюдаемая скорость реакции перестают зависеть от концентрации субстрата.

Тогда уравнение для начальной скорости ферментативной реакции можно записать в виде:

$$v_0 = \frac{v_{\max} [S]_0}{K_M + [S]_0}. \quad (\text{VIII-2})$$

Это уравнение было получено Бриггсом и Холдейном (G.E. Briggs, J.B.S. Haldane) в 1925 г., но названо ими уравнением Михаэлиса–Ментен (L. Michaelis, M. Menten) в честь классических исследований этих учёных, предложивших возможную схему ферментативной реакции и заложивших основы современной энзимологии.

Из известной величины максимальной скорости реакции можно определить $k_2 = \frac{v_{\max}}{[E]_0}$ – «число оборотов» фермента, которое

определяет молекулярную активность фермента и представляет собой число молей субстрата, превращаемых в продукт одним молем фермента за единицу времени в условиях субстратного насыщения, т. е. когда весь фермент находится только в форме ES. Величина, обратная k_2 , имеет размерность времени и определяет время, в течение которого один моль фермента превращает в продукт один моль субстрата.

На рис. VIII-1 представлена зависимость начальной скорости ферментативной реакции от начальной концентрации субстрата.

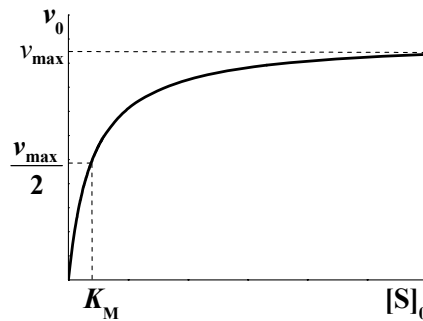


Рис. VIII-1. Зависимость начальной скорости ферментативной реакции от начальной концентрации субстрата

Однако построение такого графика не используется для экспериментального определения максимальной скорости реакции и константы Михаэлиса, т. к. в эксперименте нередко сложно достичь

субстратного насыщения (и даже если оно достигнуто, то определить параметры из кривой с насыщением бывает довольно трудно). Величины v_{\max} и K_M обычно находят одним из трёх способов, основанных на преобразовании уравнения Михаэлиса–Ментен к линейному виду, удобному для обработки экспериментальных данных.

1) *Координаты Лайнуивера–Берка* (H. Lineweaver, D. Burk), или *двойные обратные координаты*. Линейное уравнение получается из уравнения (VIII-2) при замене рассматриваемых величин на обратные:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M + [S]_0}{v_{\max}[S]_0} = \frac{K_M}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]_0} + \frac{1}{v_{\max}}. \quad (\text{VIII-3})$$

Графически эта форма зависимости приведена на рис. VIII-2. Максимальную скорость можно определить по отрезку, отсекаемому на оси ординат, $\frac{1}{v_{\max}}$, а константу Михаэлиса можно вычислить либо

по тангенсу угла наклона прямой, равному $\frac{K_M}{v_{\max}}$, либо по

отрицательному отрезку, отсекаемому на оси абсцисс. Эти координаты наиболее часто используются на практике, несмотря на то, что это наименее точный метод определения параметров уравнения Михаэлиса–Ментен: если начальную концентрацию субстрата $[S]_0$ варьируют с постоянным шагом, то координаты Лайнуивера–Берка приводят к весьма неравномерному распределению экспериментальных точек на прямой, что снижает точность определения параметров.

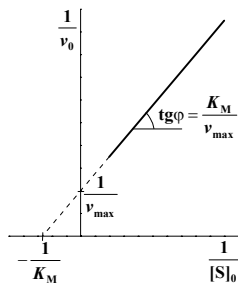


Рис. VIII-2. Графическое определение K_M и v_{\max} в координатах Лайнуивера–Берка

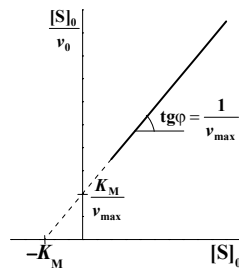


Рис. VIII-3. Графическое определение K_M и v_{\max} в координатах Вульфа–Хэйна

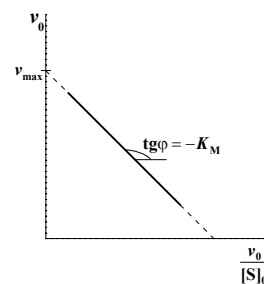


Рис. VIII-4. Графическое определение K_M и v_{\max} в координатах Иди–Хофсти

2) *Координаты Вульфа–Хэйна* (B. Woolf, C.S. Hanes). Вторая форма линейного уравнения вытекает из предыдущей при умножении обеих частей уравнения на $[S]_0$:

$$\frac{[S]_0}{v_0} = \frac{K_M}{v_{\max}} + \frac{[S]_0}{v_{\max}}. \quad (\text{VIII-4})$$

Графическая интерпретация этого уравнения приведена на рис. VIII-3. Отрезок, отсекаемый на оси абсцисс, равен $-K_M$, а на оси ординат $-\frac{K_M}{v_{\max}}$. Тангенс угла наклона прямой равен $\frac{1}{v_{\max}}$.

3) *Координаты Иди–Хофсти* (G.S. Eadie, B.H.J. Hofstee). После умножения обеих частей уравнения (VIII-3) на $v_{\max} \cdot v_0$ получаем уравнение

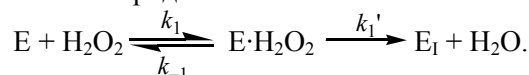
$$v_0 = v_{\max} - K_M \cdot \frac{v_0}{[S]_0}. \quad (\text{VIII-5})$$

Построение графика в координатах $v_0 = f\left(\frac{v_0}{[S]_0}\right)$ (рис. VIII-4) даёт прямую линию, тангенс угла наклона которой равен $-K_M$, а отрезок, отсекаемый на оси ординат, соответствует v_{\max} .

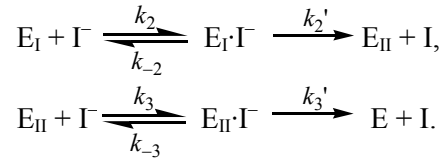
Если при обработке опытных данных каким-либо из трёх предложенных способов получена линейная зависимость, это ещё не означает, что реакция протекает по простому механизму, предложенному Михаэлисом и Ментен. Можно показать, что форма уравнения, аналогичная уравнению (VIII-2), может быть получена и для более сложных механизмов реакций.

Механизм и кинетика пероксидазного окисления иодид-ионов

Окисление иодид-ионов пероксидом водорода в присутствии фермента пероксидазы – сложная двухсубстратная реакция. Для описания этого процесса предложен следующий механизм. Сначала пероксидаза (E) окисляется пероксидом водорода H_2O_2 с образованием комплекса E_1 , в котором атом кислорода связан с ионом железа гема:



Затем следуют две стадии взаимодействия с иодид-ионом, на каждой из которых происходит передача по одному электрону к окисленному активному центру пероксидазы в комплексах E_1 и E_{II} :



Фактически от активного центра фермента отщепляется продукт реакции I_2 , а не отдельные атомы I . Скорость реакции равна

$$v = \frac{d[I_2]}{dt} = \frac{1}{2} \frac{d[I]}{dt} = \frac{1}{2} (k_2'[E_1 \cdot \Gamma] + k_3'[E_{II} \cdot \Gamma]).$$

Запишем уравнение материального баланса по ферменту

$$[E]_0 = [E] + [E \cdot H_2O_2] + [E_1] + [E_1 \cdot \Gamma] + [E_{II}] + [E_{II} \cdot \Gamma]$$

и условия квазистационарности для всех комплексов:

$$\frac{d[E \cdot H_2O_2]}{dt} = k_1[E][H_2O_2] - k_{-1}[E \cdot H_2O_2] - k_1'[E \cdot H_2O_2] = 0, \quad (\text{VIII-6})$$

$$\frac{d[E_1]}{dt} = k_1'[E \cdot H_2O_2] - k_2[E_1][\Gamma] + k_{-2}[E_1 \cdot \Gamma] = 0, \quad (\text{VIII-7})$$

$$\frac{d[E_1 \cdot \Gamma]}{dt} = k_2[E_1][\Gamma] - k_{-2}[E_1 \cdot \Gamma] - k_2'[E_1 \cdot \Gamma] = 0, \quad (\text{VIII-8})$$

$$\frac{d[E_{II}]}{dt} = k_2'[E_1 \cdot \Gamma] - k_3[E_{II}][\Gamma] + k_{-3}[E_{II} \cdot \Gamma] = 0, \quad (\text{VIII-9})$$

$$\frac{d[E_{II} \cdot \Gamma]}{dt} = k_3[E_{II}][\Gamma] - k_{-3}[E_{II} \cdot \Gamma] - k_3'[E_{II} \cdot \Gamma] = 0. \quad (\text{VIII-10})$$

При сложении уравнений (VIII-7) и (VIII-8) получаем, что

$$k_2'[E_1 \cdot \Gamma] = k_1'[E \cdot H_2O_2] \quad (\text{VIII-11})$$

$$\text{и } [E_1 \cdot \Gamma] = \frac{k_1'[E \cdot H_2O_2]}{k_2'}.$$

Аналогично путём сложения уравнений (VIII-9) и (VIII-10) и с учётом равенства (VIII-11) можно показать, что

$$k_3'[E_{II} \cdot \Gamma] = k_2'[E_1 \cdot \Gamma] = k_1'[E \cdot H_2O_2]$$

$$\text{и } [E_{II} \cdot \Gamma] = \frac{k_1'[E \cdot H_2O_2]}{k_3'}.$$

Тогда скорость образования иода может быть записана как

$$v = \frac{1}{2} (k_2'[E_1 \cdot \Gamma] + k_3'[E_{II} \cdot \Gamma]) = k_1'[E \cdot H_2O_2].$$

Из уравнений (VIII-6), (VIII-8) и (VIII-10) получаем, что

$$[E] = \frac{(k_{-1} + k'_1)[E \cdot H_2O_2]}{k_1[H_2O_2]} = \frac{K_1[E \cdot H_2O_2]}{[H_2O_2]}, \text{ где } K_1 = \frac{k_{-1} + k'_1}{k_1};$$

$$[E_I] = \frac{(k_{-2} + k'_2)[E_I \cdot I^-]}{k_2[I^-]} = \frac{K_2[E_I \cdot I^-]}{[I^-]} = \frac{K_2 k'_1 [E \cdot H_2O_2]}{k'_2 [I^-]}, \text{ где } K_2 = \frac{k_{-2} + k'_2}{k_2};$$

$$[E_{II}] = \frac{(k_{-3} + k'_3)[E_{II} \cdot I^-]}{k_3[I^-]} = \frac{K_3[E_{II} \cdot I^-]}{[I^-]} = \frac{K_3 k'_1 [E \cdot H_2O_2]}{k'_3 [I^-]}, \text{ где } K_3 = \frac{k_{-3} + k'_3}{k_3}.$$

Подставляем все полученные выражения для концентраций в уравнение материального баланса по ферменту

$$[E]_0 = \frac{K_1[E \cdot H_2O_2]}{[H_2O_2]} + [E \cdot H_2O_2] + \frac{K_2 k'_1 [E \cdot H_2O_2]}{k'_2 [I^-]} + \frac{k'_1 [E \cdot H_2O_2]}{k'_2} + \frac{K_3 k'_1 [E \cdot H_2O_2]}{k'_3 [I^-]} + \frac{k'_1 [E \cdot H_2O_2]}{k'_3}$$

и выражаем концентрацию комплекса $[E \cdot H_2O_2]$:

$$[E \cdot H_2O_2] = \frac{[E]_0}{1 + \frac{K_1}{[H_2O_2]} + \frac{K_2 k'_1}{k'_2 [I^-]} + \frac{K_3 k'_1}{k'_3 [I^-]} + \frac{k'_1}{k'_2} + \frac{k'_1}{k'_3}} = \frac{[E]_0}{1 + \frac{K_1}{[H_2O_2]} + \frac{K_2 k'_1 k'_3 + K_3 k'_1 k'_2}{k'_2 k'_3 [I^-]} + \frac{k'_1}{k'_2} + \frac{k'_1}{k'_3}}.$$

Тогда скорость накопления иода

$$v = \frac{k'_1 [E]_0}{1 + \frac{K_1}{[H_2O_2]} + \frac{K_2 k'_1 k'_3 + K_3 k'_1 k'_2}{k'_2 k'_3 [I^-]} + \frac{k'_1}{k'_2} + \frac{k'_1}{k'_3}}.$$

Умножим числитель и знаменатель полученного выражения на $\frac{k'_3}{k'_1}$:

$$v = \frac{k'_3 [E]_0}{\frac{k'_3}{k'_1} + \frac{K_1 k'_3}{k'_1 [H_2O_2]} + \frac{K_2 k'_3 + K_3 k'_2}{k'_2 [I^-]} + \frac{k'_3}{k'_2} + 1}$$

и введём обозначения: $\frac{k'_3}{k'_1} = \beta$ и $\frac{k'_3}{k'_2} = \alpha$. Тогда

$$v = \frac{k'_3[E]_0}{1 + \frac{\beta K_1}{[H_2O_2]} + \frac{\alpha K_2 + K_3}{[I^-]} + \alpha + \beta}.$$

Учитывая тот опытный факт, что $\alpha \ll 1$ и $\beta \ll 1$, их величинами по сравнению с 1 в знаменателе пренебрегаем и, таким образом, получаем выражение для скорости накопления I_2 в реакции пероксидазного окисления иодид-ионов:

$$v = \frac{k'_3[E]_0}{1 + \frac{\beta K_1}{[H_2O_2]} + \frac{\alpha K_2 + K_3}{[I^-]}}. \quad (\text{VIII-12})$$

При больших («насыщающих») концентрациях обоих субстратов скорость реакции перестаёт зависеть от их концентраций и приобретает максимальное значение $v_{\max} = k'_3[E]_0$. Так, реакция имеет первый порядок по пероксиду водорода в диапазоне концентраций 0.02–0.003 мМ, после достижения которой постепенно уменьшается до нулевого. Порядок реакции по иодид-иону близок к 1 вплоть до концентрации 6 мМ.

Полученному уравнению (VIII-12) можно придать вид уравнения Михаэлиса–Ментен (VIII-2) с эффективными параметрами $v_{\max, \text{эфф}}$ и $K_{M, \text{эфф}}$. Для двухсубстратной реакции можно получить два эффективных значения для максимальной скорости и два эффективных значения для константы Михаэлиса (по I^- и по H_2O_2).

1) При постоянной концентрации пероксида водорода зависимость скорости от концентрации иодид-ионов имеет вид:

$$\begin{aligned} v^{I^-} &= \frac{k'_3[E]_0}{1 + \frac{\beta K_1}{[H_2O_2]} + \frac{\alpha K_2 + K_3}{[I^-]}} = \frac{k'_3[E]_0[I^-]}{\left(1 + \frac{\beta K_1}{[H_2O_2]}\right)[I^-] + \alpha K_2 + K_3} = \\ &= \frac{k'_3[E]_0[I^-]}{\left(1 + \frac{\beta K_1}{[H_2O_2]}\right) \left([I^-] + \frac{\alpha K_2 + K_3}{1 + \frac{\beta K_1}{[H_2O_2]}}\right)} = \frac{v_{\max, \text{эфф}}^{I^-} \cdot [I^-]}{K_{M, \text{эфф}}^{I^-} + [I^-]}, \quad (\text{VIII-13}) \end{aligned}$$

$$\text{где } v_{\max, \text{эфф}}^{I^-} = \frac{k'_3[E]_0}{1 + \frac{\beta K_1}{[H_2O_2]}} \text{ и } K_{M, \text{эфф}}^{I^-} = \frac{\alpha K_2 + K_3}{1 + \frac{\beta K_1}{[H_2O_2]}}.$$

В случае «насыщающей» концентрации H_2O_2 $\frac{\beta K_1}{[\text{H}_2\text{O}_2]} \ll 1$, и эффективные параметры приобретают более простой вид: $v_{\text{max,эфф}}^\Gamma \rightarrow k'_3[\text{E}]_0$ и $K_{\text{M,эфф}}^\Gamma \rightarrow \alpha K_2 + K_3$.

Построив графическую зависимость в линейных координатах одним из трёх описанных выше способов (см. рис. VIII-2–VIII-4), можно получить значения эффективных параметров $v_{\text{max,эфф}}^\Gamma$ и $K_{\text{M,эфф}}^\Gamma$. Анализ зависимости эффективных параметров реакции от концентрации пероксида водорода позволяет найти и другие кинетические параметры. Для этого рассмотрим величины, обратные $v_{\text{max,эфф}}^\Gamma$ и $K_{\text{M,эфф}}^\Gamma$:

$$\frac{1}{v_{\text{max,эфф}}^\Gamma} = \frac{1}{k'_3[\text{E}]_0} + \frac{\beta K_1}{k'_3[\text{E}]_0} \cdot \frac{1}{[\text{H}_2\text{O}_2]}, \quad (\text{VIII-14})$$

$$\frac{1}{K_{\text{M,эфф}}^\Gamma} = \frac{1}{\alpha K_2 + K_3} + \frac{\beta K_1}{\alpha K_2 + K_3} \cdot \frac{1}{[\text{H}_2\text{O}_2]}. \quad (\text{VIII-15})$$

Так, из графика (рис. VIII-5), построенного в координатах уравнения (VIII-14) $\frac{1}{v_{\text{max,эфф}}^\Gamma} = f\left(\frac{1}{[\text{H}_2\text{O}_2]}\right)$, находим $\frac{1}{k'_3[\text{E}]_0}$ как отрезок, отсекаемый на оси ординат, и $\frac{\beta K_1}{k'_3[\text{E}]_0}$ как тангенс угла наклона.

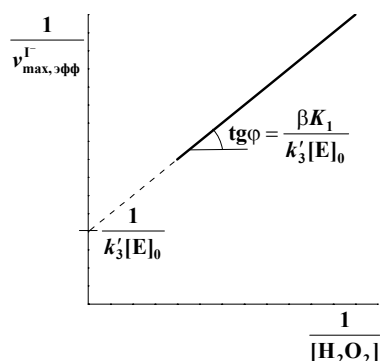


Рис. VIII-5. График, построенный в координатах уравнения (VIII-14)

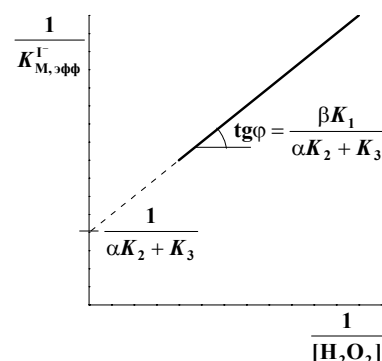


Рис. VIII-6. График, построенный в координатах уравнения (VIII-15)

Из этих величин можно определить истинную максимальную скорость реакции $v_{\max} = k'_3[E]_0$ и βK_1 . Из графика (рис. VIII-6), построенного в координатах уравнения (VIII-15) $\frac{1}{K_{M, \text{эфф}}^{I^-}} = f\left(\frac{1}{[H_2O_2]}\right)$, находим

$\frac{1}{\alpha K_2 + K_3}$ (отрезок, отсекаемый на оси ординат) и $\frac{\beta K_1}{\alpha K_2 + K_3}$ (тангенс угла наклона). Это позволяет рассчитать $\alpha K_2 + K_3$.

2) При постоянной концентрации иодид-ионов зависимость скорости от концентрации пероксида водорода следующая:

$$v^{H_2O_2} = \frac{k'_3[E]_0}{1 + \frac{\beta K_1}{[H_2O_2]} + \frac{\alpha K_2 + K_3}{[I^-]}} = \frac{k'_3[E]_0[H_2O_2]}{\left(1 + \frac{\alpha K_2 + K_3}{[I^-]}\right)[H_2O_2] + \beta K_1} =$$

$$= \frac{k'_3[E]_0[H_2O_2]}{\left(1 + \frac{\alpha K_2 + K_3}{[I^-]}\right)\left([H_2O_2] + \frac{\beta K_1}{1 + \frac{\alpha K_2 + K_3}{[I^-]}}\right)} = \frac{v_{\max, \text{эфф}}^{H_2O_2} \cdot [H_2O_2]}{K_{M, \text{эфф}}^{H_2O_2} + [H_2O_2]}, \quad (\text{VIII-16})$$

где $v_{\max, \text{эфф}}^{H_2O_2} = \frac{k'_3[E]_0}{1 + \frac{\alpha K_2 + K_3}{[I^-]}}$ и $K_{M, \text{эфф}}^{H_2O_2} = \frac{\beta K_1}{1 + \frac{\alpha K_2 + K_3}{[I^-]}}$.

Можно проанализировать величины, обратные эффективным параметрам, аналогично тому, как это было сделано в предыдущем случае:

$$\frac{1}{v_{\max, \text{эфф}}^{H_2O_2}} = \frac{1}{k'_3[E]_0} + \frac{\alpha K_2 + K_3}{k'_3[E]_0} \cdot \frac{1}{[I^-]}, \quad (\text{VIII-17})$$

$$\frac{1}{K_{M, \text{эфф}}^{H_2O_2}} = \frac{1}{\beta K_1} + \frac{\alpha K_2 + K_3}{\beta K_1} \cdot \frac{1}{[I^-]}. \quad (\text{VIII-18})$$

Из графика (рис. VIII-7), построенного в координатах уравнения (VIII-17), можно определить $\frac{1}{k'_3[E]_0}$ как отрезок, отсекаемый на оси

ординат, и $\frac{\alpha K_2 + K_3}{k'_3[E]_0}$ как тангенс угла наклона прямой. Из графика (рис. VIII-8), построенного в координатах уравнения (VIII-18),

находят $\frac{1}{\beta K_1}$ как отрезок, отсекаемый на оси ординат, и $\frac{\alpha K_2 + K_3}{\beta K_1}$ как тангенс угла наклона. Из этих величин можно определить истинную максимальную скорость реакции $v_{\max} = k_3'[E]_0$ и $\alpha K_2 + K_3$ и сравнить их со значениями, полученными с применением уравнений (VIII-14) и (VIII-15).

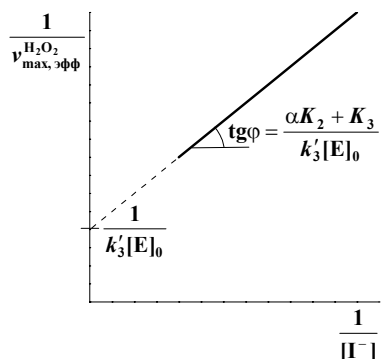


Рис. VIII-7. График, построенный в координатах уравнения (VIII-17)

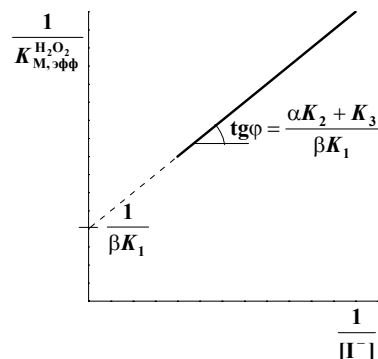


Рис. VIII-8. График, построенный в координатах уравнения (VIII-18)

Экспериментальная часть

Цель задачи – исследование кинетики окисления иодида калия пероксидом водорода в присутствии фермента пероксидазы и определение эффективных кинетических параметров ферментативной реакции: максимальной скорости $v_{\max, \text{эфф}}$ и константы Михаэлиса $K_{M, \text{эфф}}$.

Методика эксперимента

Ферментативное окисление иодид-ионов пероксидом водорода осуществляют в кислой среде при $\text{pH} = 4-5$, когда вклад неферментативной реакции в суммарный процесс не превышает 1–2%.

Растворы пероксидазы и субстратов – иодида калия и пероксида водорода – готовят в 0.1 М ацетатном буфере. Концентрации исходных растворов составляют $6 \cdot 10^{-2}$ М для иодида калия и $4 \cdot 10^{-3}$ М для пероксида водорода. Рабочие растворы получают путём разбавления исходных буферным раствором.

Препарат фермента представляет собой светло-коричневый порошок, хорошо растворимый в ацетатном буферном растворе. Молярная масса пероксидазы составляет примерно $44100 \text{ г}\cdot\text{моль}^{-1}$.

Ацетатный буферный раствор с $\text{pH} = 4.6\text{--}4.7$ готовят следующим образом: к 100 мл 1 М раствора уксусной кислоты добавляют 50 мл 1 М раствора гидроксида натрия и доводят до 500 мл дистиллированной водой. Значение pH контролируют с помощью pH -метра.

Исследование кинетики реакции проводят с использованием фотоэлектрического концентрационного колориметра или спектрофотометра. Реакцию проводят непосредственно в измерительной кювете толщиной 1 см. Изменение концентрации выделившегося иода определяют по поглощению при длине волны 400 нм.

Работа может быть выполнена в двух вариантах:

1. Определение эффективных параметров реакции – максимальной скорости и константы Михаэлиса – по иодиду калия.
2. Определение эффективных параметров реакции – максимальной скорости и константы Михаэлиса – по пероксиду водорода.

Работа 1. Определение эффективных значений максимальной скорости реакции и константы Михаэлиса по иодиду калия

Необходимо провести измерение начальной скорости ферментативной реакции с различными концентрациями иодида калия при постоянных концентрациях фермента и второго субстрата – пероксида водорода. Объёмы исходных растворов, необходимые для приготовления реакционных смесей, приведены в таблице VIII-1. Суммарный объём смеси постоянен и составляет 4 мл.

Таблица VIII-1. Объёмы исходных растворов (мл) для приготовления реакционных смесей

KI	Ацетатный буфер	Пероксидаза	H_2O_2
0.1	3.3	0.1	0.5
0.2	3.2	0.1	0.5
0.3	3.1	0.1	0.5
0.5	2.9	0.1	0.5
1.0	2.4	0.1	0.5
1.5	1.9	0.1	0.5

Перед началом опыта проводят (в соответствии с инструкцией к измерительному прибору) подготовительные операции, необходимые для измерения оптической плотности исследуемых растворов.

В кювету заливают буферный раствор, растворы иодида калия и пероксидазы (в соответствии с табл. VIII-1) и помещают её в кюветное отделение спектрофотометра (фотоколориметра). Ферментативную реакцию запускают путём внесения с помощью дозатора раствора пероксида водорода. Измерения оптической плотности реакционной смеси (запись кинетической кривой накопления I_2) проводят в соответствии с инструкцией к используемому измерительному прибору.

Концентрацию I_2 рассчитывают из значений оптической плотности растворов в соответствии с законом Бугера–Ламберта–Бера: $A = \varepsilon \cdot l \cdot C$, где A – оптическая плотность, ε – коэффициент молярного поглощения ($\varepsilon_{400}(I_2) = 725 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), l – толщина кюветы (1 см). Полученные результаты записывают в таблицу VIII-2.

Продолжительность одного кинетического опыта составляет примерно 5–10 минут. Затем кювету промывают водой и заливают в неё новые растворы для следующего опыта.

Кинетические опыты проводят при пяти различных концентрациях KI (концентрация H_2O_2 сохраняется постоянной!). В целом заполняют пять таблиц типа VIII-2.

Таблица VIII-2. Экспериментальные данные

№ опыта	Объём раствора субстрата, концентрация которого изменяется									
Время опыта, с										
Оптическая плотность										
Концентрация I_2 , M										

Работа 2. Определение эффективных значений максимальной скорости реакции и константы Михаэлиса по пероксиду водорода

Необходимо провести измерение начальной скорости ферментативной реакции с различными концентрациями пероксида водорода при постоянных концентрациях фермента и второго субстрата – иодида калия. Объёмы исходных растворов, необходимые для приготовления реакционных смесей, приведены в таблице VIII-3. Суммарный объём смеси постоянен и составляет 4 мл.

В кювету заливают буферный раствор, растворы иодида калия и пероксидазы (в соответствии с табл. VIII-3) и помещают её в кюветное отделение спектрофотометра (фотоколориметра). Ферментативную реакцию начинают внесением необходимого объёма раствора пероксида водорода. Дальнейший порядок измерений при выполнении данной работы такой же, как при выполнении работы 1. Данные эксперимента записывают в таблицу VIII-2.

Таблица VIII-3. Объёмы исходных растворов (мл) для приготовления реакционных смесей

KI	Ацетатный буфер	Пероксидаза	H ₂ O ₂
1.5	2.3	0.1	0.1
1.5	2.2	0.1	0.2
1.5	2.1	0.1	0.3
1.5	2.0	0.1	0.4
1.5	1.9	0.1	0.5
1.5	1.4	0.1	1.0

Запись и обработка результатов эксперимента. Представление результатов работы

По результатам измерений строят кинетические кривые (зависимость концентрации выделившегося иода от времени) и по наклону начальных линейных участков определяют начальные скорости реакции. Пример определения начальных скоростей приведён на рис. VIII-9.

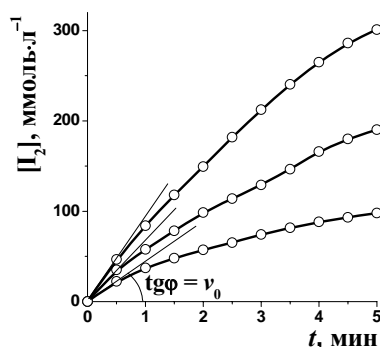


Рис. VIII-9. Кинетические кривые накопления продукта реакции (I₂) при трёх различных начальных концентрациях H₂O₂

Расчёт кинетических параметров ферментативной реакции выполняют тремя способами, описанными в теоретическом введении (см. с. 63–64 и рис. VIII-2–VIII-4).

1) *Определение кинетических параметров из графика в координатах Лайнуивера–Берка.* Для обработки экспериментальных данных используют уравнение (VIII-3). Для этого заполняют таблицу VIII-4 и строят график в координатах $\frac{1}{v_0}$ от $\frac{1}{[S]_0}$ (см. рис. VIII-2), из которого определяют эффективные константу Михаэлиса и максимальную скорость реакции.

Таблица VIII-4. Результаты кинетического эксперимента в случае обработки в координатах Лайнуивера–Берка

№	Объём субстрата, мл	Начальная концентрация субстрата $[S]_0$, моль·л ⁻¹	Начальная скорость v_0 , моль·л ⁻¹ ·мин ⁻¹	$\frac{1}{[S]_0}$, л·моль ⁻¹	$\frac{1}{v_0}$, мин·л·моль ⁻¹
1					
2					
...					

Пример расчёта концентрации субстрата. Исходная концентрация иодида калия $[KI]_0 = 6 \cdot 10^{-2}$ М. Объём рабочего раствора составляет 4 мл, в нём содержится, например, 1 мл KI (работа 1). Следовательно, исходный раствор KI разбавлен в 4 раза, концентрация KI в реакционной смеси равна $6 \cdot 10^{-2} : 4 = 1.5 \cdot 10^{-2}$ М.

Исходная концентрация раствора H₂O₂ равна $4 \cdot 10^{-3}$ М. Общий объём раствора – 4 мл, в нём содержится 0.1 мл H₂O₂ (работа 2), т. е. исходный раствор разбавлен в 40 раз. Таким образом, концентрация H₂O₂ в реакционной смеси составляет $4 \cdot 10^{-3} : 40 = 1 \cdot 10^{-4}$ М.

2) *Определение кинетических параметров из графика в координатах Вульфа–Хэймса.* Для обработки экспериментальных результатов используют уравнение (VIII-4). Для этого заполняют таблицу VIII-5 и строят график в координатах $\frac{[S]_0}{v_0}$ от $[S]_0$, из которого определяют $K_{M,эфф}$ и $v_{max,эфф}$ реакции (см. рис. VIII-3).

Таблица VIII-5. Результаты кинетического эксперимента в случае обработки в координатах Вульфа–Хэйна

№	Объём субстрата, мл	Начальная концентрация субстрата $[S]_0$, моль·л ⁻¹	Начальная скорость v_0 , моль·л ⁻¹ ·мин ⁻¹	$\frac{[S]_0}{v_0}$, мин
1				
2				
...				

3) *Определение кинетических параметров из графика в координатах Иди–Хофсти.* Для обработки экспериментальных результатов используют уравнение (VIII-5). Для этого заполняют таблицу VIII-6 и строят график в координатах v_0 от $\frac{v_0}{[S]_0}$, из которого определяют $K_{M, \text{эфф}}$ и $v_{\text{max, эфф}}$ реакции (см. рис. VIII-4).

Таблица VIII-6. Результаты кинетического эксперимента в случае обработки в координатах Иди–Хофсти

№	Объём субстрата, мл	Начальная концентрация субстрата $[S]_0$, моль·л ⁻¹	Начальная скорость v_0 , моль·л ⁻¹ ·мин ⁻¹	$\frac{v_0}{[S]_0}$, мин ⁻¹
1				
2				
...				

Полученные тремя разными методами значения эффективных константы Михаэлиса и максимальной скорости реакции занесите в табл. VIII-7 и сравните их с литературными данными, приведёнными в табл. VIII-8 Приложения.

Таблица VIII-7. Значения эффективных константы Михаэлиса и максимальной скорости реакции

Кинетический параметр	Способ обработки экспериментальных данных		
	Координаты Лайнуивера–Берка	Координаты Вульфа–Хэйinsa	Координаты Иди–Хофсти
$K_{M, \text{эфф}}$, ммоль·л ⁻¹			
$v_{\text{max, эфф}}$, ммоль·л ⁻¹ ·мин ⁻¹			
Коэффициент детерминации R^2			

Выполните следующие задания и ответьте на вопросы:

1. Выведите уравнение Михаэлиса–Ментен для простой ферментативной реакции.
2. Каковы размерности константы Михаэлиса и максимальной скорости реакции?
3. Как меняется порядок реакции по субстрату и порядок реакции в целом при увеличении концентрации субстрата?
4. Что такое «число оборотов» фермента?
5. На построенных Вами трёх графиках, соответствующих трём линейным формам уравнения Михаэлиса–Ментен, нарисуйте прямые:
 - а) в случае конкурентного ингибирования реакции,
 - б) в случае неконкурентного ингибирования реакции.
6. На основании сопоставления коэффициентов детерминации R^2 выберите координаты, которые являются наиболее удачными для определения параметров уравнения Михаэлиса–Ментен.

Приложение

Таблица VIII-8. Кинетические параметры реакции пероксидазного окисления иодид-ионов

Кинетические параметры, определённые по KI	Кинетические параметры, определённые по H ₂ O ₂
$K_{M, \text{эфф}}^{\text{I}} = 16.5 \pm 0.2$ ммоль·л ⁻¹	$K_{M, \text{эфф}}^{\text{H}_2\text{O}_2} = 0.115 \pm 0.010$ ммоль·л ⁻¹
$v_{\text{max, эфф}}^{\text{I}} = 2.29 \pm 0.03$ ммоль·л ⁻¹ ·мин ⁻¹	$v_{\text{max, эфф}}^{\text{H}_2\text{O}_2} = 1.49 \pm 0.05$ ммоль·л ⁻¹ ·мин ⁻¹