

ЛЕКЦИЯ 7

Органические вещества клетки. Белки.

Ферменты. Ферментативный катализ.

Ферменты (лат. «ферментум» — закваска) - белки, присутствующие во всех живых клетках и играющие роль биологических катализаторов. Синтезируются из аминокислот на рибосомах в соответствии с генетическим кодом. Ферменты способны увеличивать скорость реакции в десятки миллионов раз по сравнению со скоростью той же реакции в отсутствие фермента. Подавляющее большинство ферментов по своей химической природе являются белками; они имеют сложное строение и обычно обладают четвертичной структурой. Кроме того, ферменты могут иметь в своем составе и небелковые компоненты, которыми обычно являются либо ионы металлов, либо витамины или их предшественники (именно этим и определяется важная роль витаминов в организме). Белковая часть фермента называется апофермент, небелковая - кофактор (если это ион металла или простое неорганическое вещество) или кофермент (коэнзим) - если это органическое соединение. Функция ферментов в реакции в основном заключается в том, что они снижают энергию активации субстратов. Ферменты высокоспецифичны, т. е. способны отличать «свои» субстраты от других родственных молекул. Для объяснения специфичности ферментов в 90-х гг. XIX в. Р. Фишером была предложена аналогия «замок - ключ» - фермент и субстрат по своему строению соответствуют друг другу, как замок и ключ. Общепринятой ныне является гипотеза индуцированного соответствия, предложенная Д. Кошландом в 1959 г. Согласно этой гипотезе связывание субстрата и фермента вызывает в ферменте небольшие изменения формы молекулы, в результате чего каталитические группы фермента ориентируются таким образом, что становится возможным образование конечного продукта. Согласно современной классификации все ферменты подразделяются на шесть классов в зависимости от типа катализируемых реакций; названия всех ферментов имеют окончание *-аза*.

В клетках они образуют ферментные системы противоположного действия, что обеспечивает регуляцию жизнедеятельности; одни ферменты участвуют в анаболизме (синтез органических веществ), другие - в катаболизме (расщепление). Ни один процесс в клетке не проходит без участия ферментов. При этом ферменты действуют в строго определенной последовательности, они специфичны для каждого вещества и ускоряют только определенные реакции. В клетках действуют многочисленные ферментные конвейеры: с веществом производятся определенные «операции», пока не будет создано «готовое изделие» - строительный блок, полимер или конечный продукт метаболизма. С обязательным участием ферментов происходит самоудвоение ДНК, синтез РНК, белков, АТФ, фотосинтез, дыхание и другие процессы. Ферменты ускоряют химические процессы в клетках в миллионы раз. В народном хозяйстве также широко применяют ферменты: они используются в пищевой промышленности (приготовление безалкогольных напитков, консервов, колбас, копченостей); животноводстве (приготовление кормов); медицине (изготовление лекарств и питательных сред); в производстве ряда фотоматериалов, при обработке льна и других волокнистых культур, а также кожи, бумаги.

Таблица 15. Классификация ферментов

Название класса	Катализируемые реакции	Примеры
Оксидоредуктазы	Окислительно-восстановительные реакции: перенос атомов Н или О от одного вещества к другому	Каталаза разлагает перекись водорода на воду и молекулярный кислород
Трансферазы	Перенос функциональных групп от одного вещества к другому	Под действием фосфотрансфераз происходит перенос остатков фосфорной кислоты от АТФ на глюкозу: АТФ + глюкоза → глюкозо-6-фосфат + АДФ
Гидролазы	Гидролиз: реакции расщепления сложных органических соединений на более простые путем присоединения воды	Амилаза гидролизует крахмал до глюкозы; липаза расщепляет жиры до глицерина и жирных кислот; трипсин гидролизует белки и пептиды до аминокислот
Лиазы	Негидролитическое присоединение или отщепление функциональных групп	Отщепление карбоксильных групп декарбоксилазами
Изомеразы	Изомеризация	Взаимопревращения альдоз и кетоз
Лигазы (синтетазы)	Реакции синтеза с использованием энергии АТФ	Карбоксилазы катализируют присоединение углекислого газа к органическим кислотам

Принципы ферментативной кинетики

Определение скоростей ферментативных реакций и исследование влияния на них различных факторов составляет содержание ферментативной кинетики. Кинетические исследования широко используются для определения сродства субстратов и ингибиторов к ферментам, для установления механизма их действия.

К числу главных факторов, влияющих на скорости ферментативных реакций, относятся: концентрация фермента, концентрация субстрата, присутствие ингибиторов или активаторов, рН и температура среды.

В подавляющем большинстве случаев скорость ферментативной реакции v прямо пропорциональна концентрации фермента $[E]$:

$$v = k [E]$$

Один из наиболее важных факторов, определяющих скорость ферментативной реакции, - концентрация субстрата $[S]$. Во многих случаях наблюдается следующая характерная картина (рис 87): при относительно небольших значениях $[S]$ величина v пропорциональна $[S]$, а при достаточно больших $[S]$ величина v приближается к предельному постоянному значению, называемому максимальной скоростью (V_{max}).

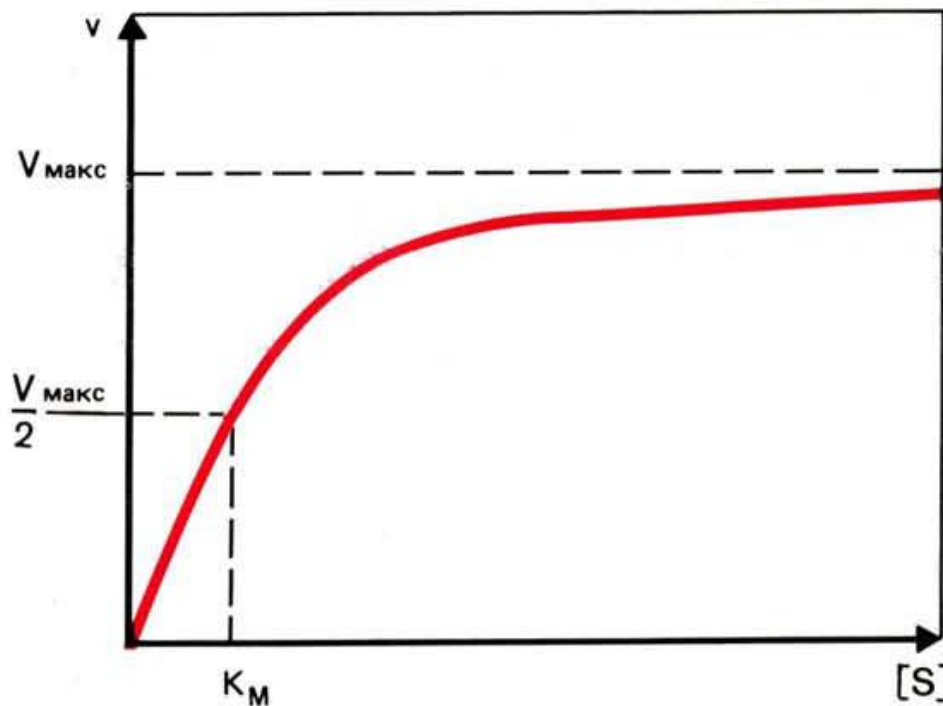


Рисунок 87 – График зависимости скорости реакции v от концентрации субстрата $[S]$

На основании анализа зависимости v от $[S]$ Л.Михаэлис и М.Ментен сформулировали в 1913 г. общую теорию кинетики действия ферментов.

Они постулировали, что ферментативная реакция является двухстадийной. На первой стадии фермент вступает в быстрое обратимое взаимодействие с субстратом; в результате образуется фермент-субстратный комплекс ES:



На второй стадии ES распадается с образованием продукта реакции P:



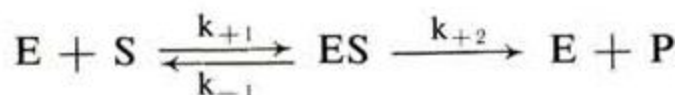
Вторая стадия лимитирует скорость процесса: последняя определяется концентрацией комплекса ES и константой скорости его распада k . На основании этих предпосылок было выведено уравнение, связывающее v и $[S]$, известное под названием уравнения Михаэлиса:

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

где v – начальная скорость реакции, т.е. скорость, регистрируемая в течение периода времени, за который убыль субстрата не превышает 10%. В этот период времени скорость реакции можно считать приблизительно постоянной, поскольку, во-первых, убыль субстрата невелика, а во-вторых, концентрация продукта, который в ряде случаев может оказывать ингибирующее действие, незначительна.

В уравнение входят две постоянные величины V_{\max} – максимальная скорость, т.е. скорость реакций в условиях насыщения фермента субстратом, и K_M – константа Михаэлиса для исследуемой пары фермент-субстрат.

Легко показать, что для односубстратной реакции, протекающей по схеме:



Где k_{+1} – константа скорости образования ES, k_{-1} – константа скорости обратного распада ES на E и S, k_{+2} – константа скорости распада ES с образованием продукта P, уравнение Михаэлиса справедливо и без допущения о том, что на стадии образования ES устанавливается равновесие и что стадия распада ES с образованием продукта является лимитирующей. При этом K_M может быть выражена через константы скоростей отдельных стадий:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}$$

Величины V_{\max} , и K_M можно определить по графику зависимости v от $[S]$ (Рис. 87). Из уравнения Михаэлиса следует, что при достаточно высокой концентрации субстрата (когда $[S] \gg K_M$)

$$v = V_{\max}$$

т.е. скорость постоянна и максимальна; реакция протекает по кинетическому закону нулевого порядка.

При низких концентрациях субстрата v прямо пропорциональна $[S]$; действительно, при $[S] \ll K_M$ по уравнению Михаэлиса оказывается, что

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M}$$

В таких условиях реакция протекает по кинетическому закону первого порядка. На графике (рис 87) это соответствует начальному линейному участку.

Для определения величины K_M снова обратимся к уравнению Михаэлиса; из него следует, что K_M численно равна концентрации субстрата, при которой скорость реакции

равна половине максимальной; действительно, при условии, что $v = \frac{V_{\max}}{2}$, имеем:

$$\frac{V_{\max}}{2} = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \text{ и } K_M = [S]$$

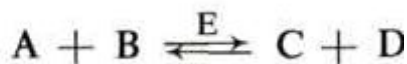
Для графического определения K_M сначала требуется найти величину $v = \frac{V_{\max}}{2}$, а затем через соответствующую точку на ординате провести прямую, параллельную оси абсцисс до пересечения с графиком; перпендикуляр, опущенный из точки пересечения на ось абсцисс, покажет величину $[S]$, численно равную K_M (рис 87).

Более удобно для определения величин V_{\max} , и K_M использовать графики линеаризованных форм уравнения Михаэлиса. Одной из таких форм является уравнение, обратное уравнению Михаэлиса:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]}$$

Его называют уравнением Лайнуивера – Берка. График зависимости $\frac{1}{v}$ от $\frac{1}{[S]}$ (рис 88) представляет собой прямую, имеющую наклон K_M / V_{\max} и отсекающую на оси ординат отрезок, равный $\frac{1}{V_{\max}}$, а на оси абсцисс отрезок, равный $-\frac{1}{K_M}$.

Большинство ферментов катализируют реакции с участием двух (или более) субстратов:



Исследование кинетики таких реакций позволяет определить величины V_{\max} , и K_M для каждого из субстратов; для этого строят графики зависимости скорости реакции от концентрации одного из субстратов при фиксированной (обычно насыщающей) концентрации другого.

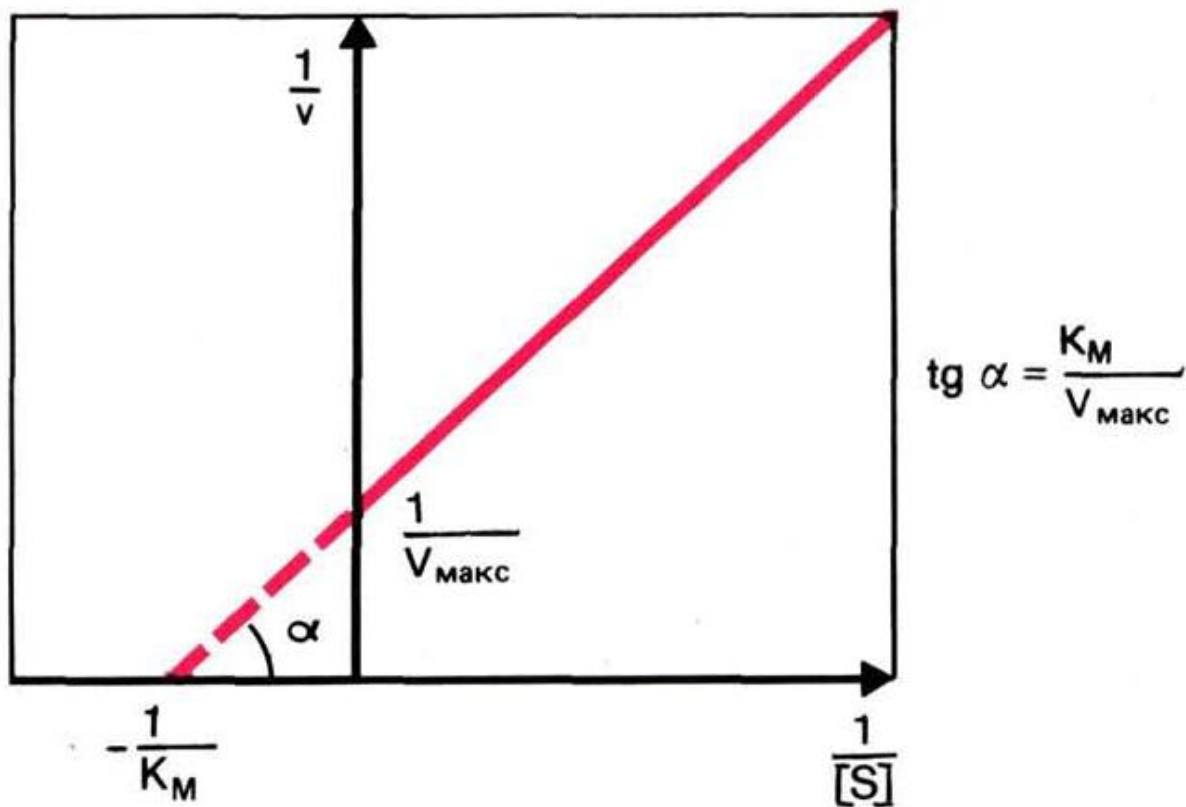
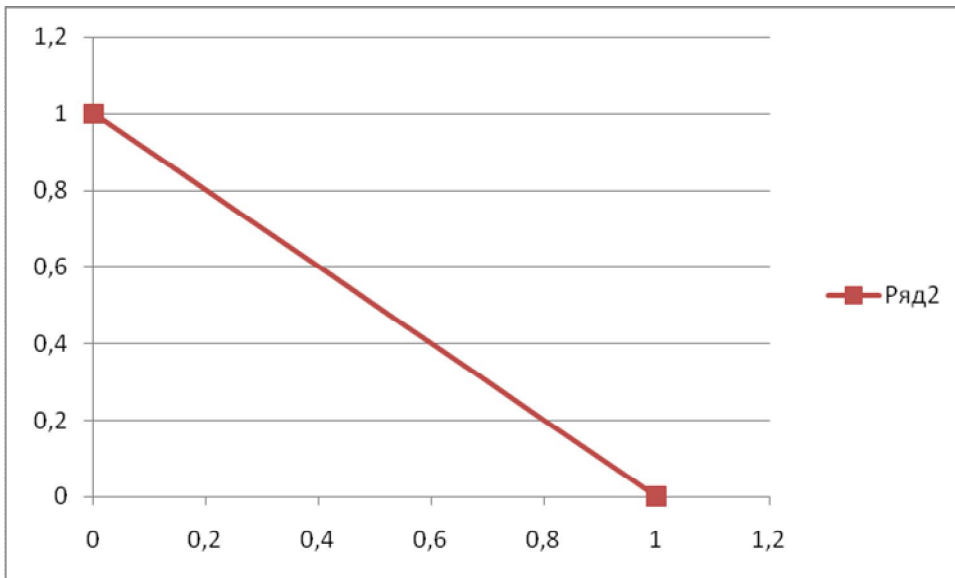


Рисунок 88 – График зависимости обратной скорости $\frac{1}{v}$ от обратной концентрации субстрата $\frac{1}{[S]}$

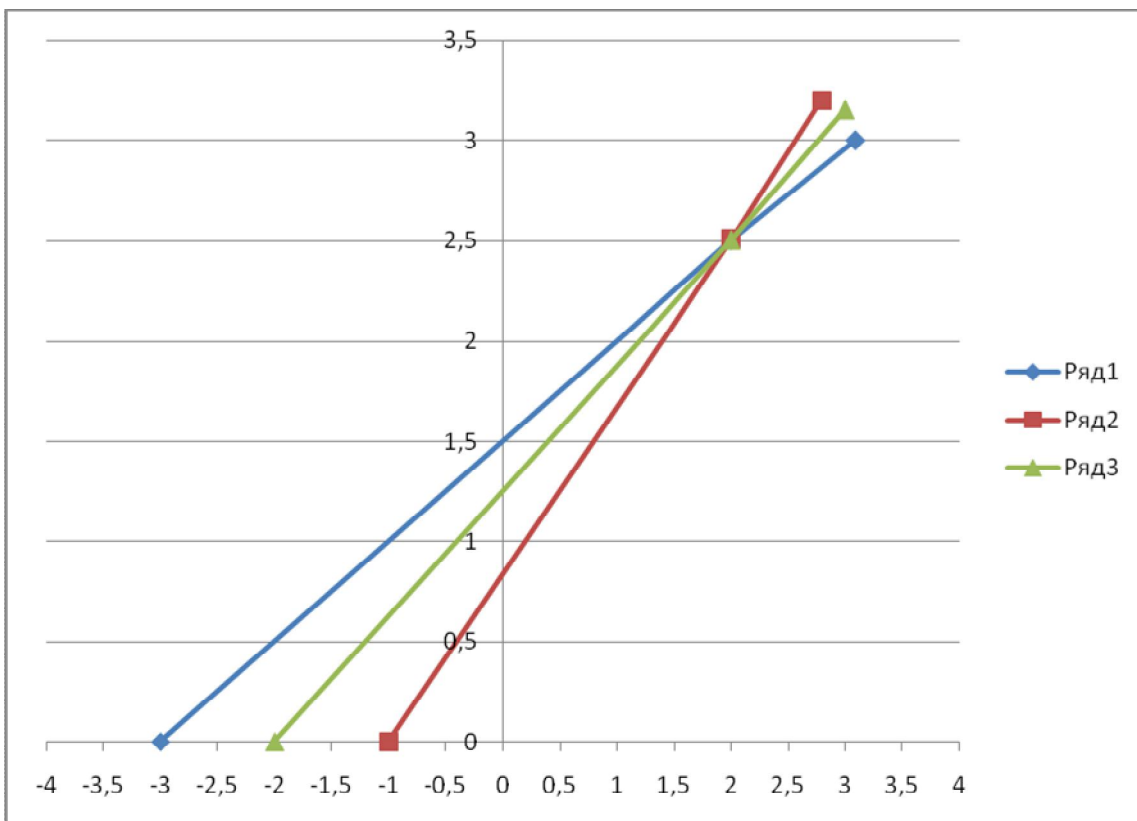
Величины V_{\max} , и K_M можно определить по графику зависимости v от $v / [S]$ Иди-Хофсти

$$v = V - \frac{v \cdot K_M}{[S]}$$



Величины V_{\max} , и K_M можно определить по графику зависимости v от K_m Корниш-Боудена

$$V = v + \frac{v}{[S]} \cdot K_m$$



Единицы активности ферментов. Активность препаратов ферментов обычно выражают в международных единицах активности. Активностью, равной одной международной единице, обладает такое количество фермента, которое катализирует превращение 1мкмоль субстрата в продукт за 1 мин в стандартных (обычно оптимальных) условиях. Удельная активность – это число единиц активности на 1мг белка препарата

фермента. Удельная активность отражает степень очистки фермента: она максимальна у чистого фермента.

Международный биохимический союз предложил использовать в качестве единицы активности «катал» (кат); активностью 1 кат обладает такое количество фермента, которое катализирует превращение 1 моль субстрата в продукт за 1 с. Следовательно, $1 \text{ кат} = 60 \cdot 10^6 = 6 \cdot 10^7$ международных единиц. Рекомендовано использовать также единицу значительно меньшего масштаба – нанокатал (нкат), равную 10^{-9} кат.

Ингибиторы ферментов. Действие многих ферментов может быть заторможено определенными химическими соединениями – ингибиторами. С помощью ингибиторов получают ценную информацию о специфичности ферментов, природе функциональных групп их активных центров и о механизме действия.

По характеру действия ингибиторы разделяют на необратимые и обратимые.

Необратимые ингибиторы химически модифицируют важные для активности функциональные группы фермента. Естественно, что после удаления свободного ингибитора путем диализа активность фермента не восстанавливается. Эффективность действия необратимого ингибитора характеризуется константой скорости процесса ингибирования. В ряде случаев активность модифицированного фермента можно восстановить, удалив присоединившийся необратимый ингибитор путем соответствующей химической реакции; этот процесс принято называть реактивацией.

Примерами необратимых ингибиторов являются диизопропилфторфосфат (ДФФ) и иодацетамид. ДФФ инактивирует ряд гидролаз (химотрипсин, трипсин, ацетиlxолинэстеразу), модифицируя важный для активности этих ферментов остаток серина (рис 89). Иодацетамид инактивирует ферменты, функционально значимой группой которых является остаток цистеина (глицеральдегидфосфатдегидрогеназа, папаин).

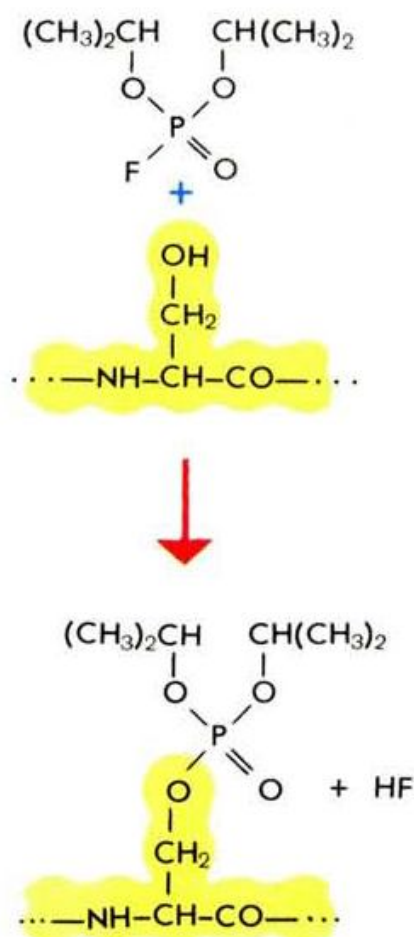


Рисунок 89 – Инактивация диизопропилфторфосфатом сериновой протеиназы.

Обратимые катализаторы взаимодействуют с ферментом без образования ковалентной связи. После инкубации с обратимым ингибитором активность фермента восстанавливается при удалении свободного ингибитора путем диализа. Характерная для соответствующей системы степень ингибирования достигается в общем случае относительно быстро и далее не зависит от времени, что указывает на наличие равновесия при образовании комплекса ингибитора I с ферментом $E + I \leftrightarrow EI$.

Константа ингибирования K_i при обратимом ингибировании – это константа диссоциации комплекса фермент – ингибитор

$$K_i = \frac{[E] \cdot [I]}{[EI]}$$

Она является величиной, обратной величине сродства ингибитора к ферменту.

Различаются два вида обратимых ингибиторов – конкурентные и неконкурентные. *Конкурентные ингибиторы* по строению обычно сходны с субстратом; они конкурируют с ним за связывание с ферментом. Скорость реакции в присутствии конкурентного ингибитора определяется выражением

$$v = \frac{V_{\text{макс.}} \cdot [S]}{K_M (1 + [I]/K_i) + [S]}$$

Характерная черта конкурентного ингибирования состоит в том, что эффективность ингибирования зависит от соотношения концентраций субстрата и ингибитора (а не от абсолютной концентрации ингибитора).

Неконкурентные (обратимые) ингибиторы, как правило, не имеют сходства с субстратом. Они могут обратимо связываться как со свободным ферментом, так и с ES-комплексом и не конкурируют с субстратом, т.е. не вытесняют его из комплекса с ферментом. Скорость реакции в присутствии неконкурентного ингибитора может быть выражена уравнением

$$v = \frac{V_{\text{макс.}} \cdot [S]}{(K_M + [S]) (1 + [I]/K_i)}$$

Эффективность неконкурентного ингибирования определяется концентрацией ингибитора и не зависит от соотношения концентраций ингибитора и субстрата.

Тип обратимого ингибирования (конкурентное или неконкурентное) устанавливают определением зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата в присутствии ингибитора. Для выяснения типа ингибирования и величины K_i пользуются графиками зависимости обратной скорости реакции от обратной концентрации субстрата; в случае систем с обратными ингибиторами они являются линейными.

При конкурентном ингибировании выражение для величины обратной скорости реакции следующее:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\text{макс.}}} + \frac{K_M}{V_{\text{макс.}}} (1 + [I]/K_i) \frac{1}{[S]}$$

Графики зависимости $\frac{1}{v}$ от $\frac{1}{[S]}$ в отсутствие и в присутствии конкурентного ингибитора приведены на рисунке 90. Об эффективности связывания конкурентного ингибитора можно судить по величине наклона графика.

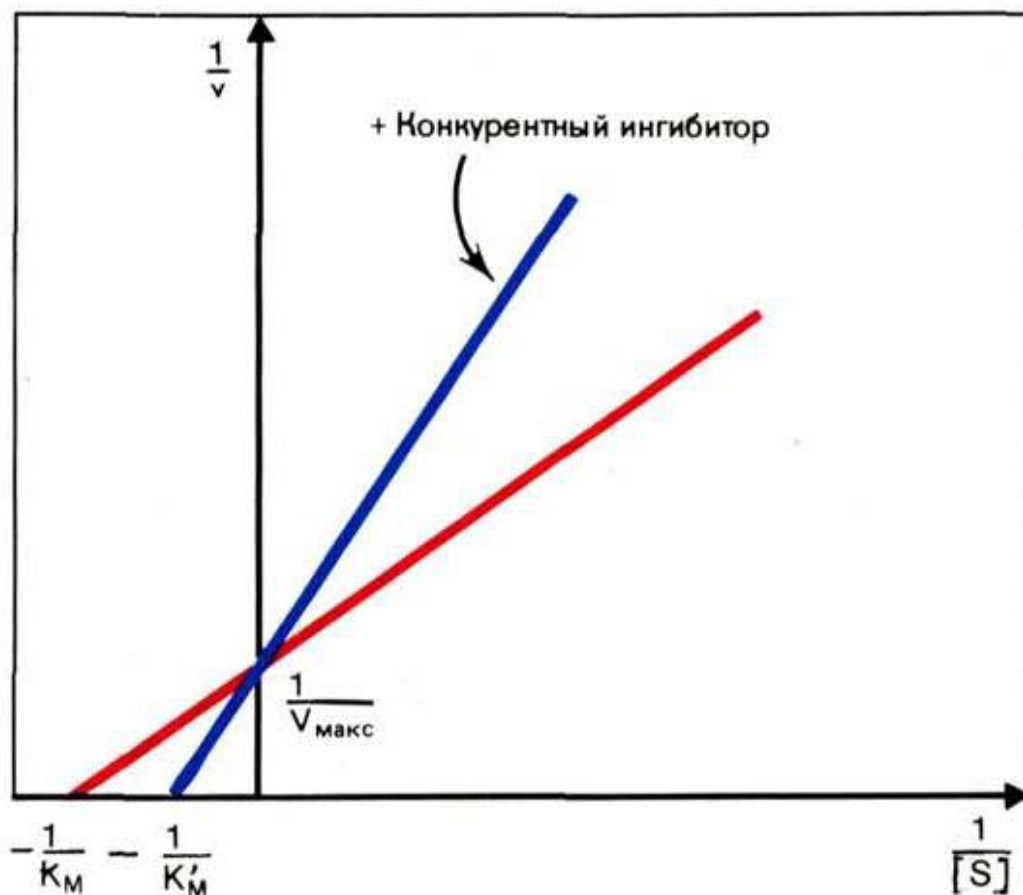


Рисунок 90 – График зависимости обратной скорости $\frac{1}{v}$ от обратной концентрации $\frac{1}{[S]}$ в присутствии конкурентного ингибитора.

При наличии в системе конкурентного ингибитора величина отрезка, отсекаемого на оси ординат ($\frac{1}{V_{\max}}$), не изменяется; в то же время изменяется величина отрезка, отсекаемого на оси абсцисс. Ее значение равно $\frac{1}{K'_M}$, где K'_M - кажущаяся величина K_M в присутствии ингибитора

$$\frac{1}{K'_M} = \frac{1}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$$

Откуда следует, что

$$K_i = \frac{1}{K'_M/K_M - 1}$$

При неконкурентном ингибировании величина обратной скорости реакции выражается уравнением

$$\frac{1}{v} = \left(\frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} \right) \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

Графики зависимости $\frac{1}{v}$ от $[S]$ в отсутствие и в присутствии неконкурентного ингибитора приведены на рисунке 91. В присутствии ингибитора величина отрезка, отсекаемого на оси абсцисс, остается постоянной, т.е. величина K_M не меняется. Величина отрезка, отсекаемого на оси ординат, изменяется, она становится равной $\frac{1}{V'_{\max}}$, где V'_{\max} – кажущаяся величина V_{\max} в присутствии ингибитора.

$$\frac{1}{V'_{\max}} = \frac{1 + [I]/K_i}{V_{\max}}$$

Из чего следует, что

$$K_i = \frac{[I]}{V_{\max}/V'_{\max} - 1}$$

Активаторы ферментов. Активность некоторых ферментов может увеличиваться в результате их взаимодействия с определенными соединениями – активаторами. В том случае, когда активатор А, связываясь с ферментом, влияет на связывание субстрата, выражение для обратной скорости реакции имеет вид, формально сходный с соответствующим выражением для конкурентного ингибирования:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}} \left(1 + \frac{K_a}{[A]} \right) \frac{1}{[S]}$$

Где K_a – константа диссоциации комплекса фермент-активатор.

Если связывание активатора не влияет на связывание субстрата (и наоборот), зависимость $\frac{1}{v}$ от $\frac{1}{[S]}$ имеет вид, сходный с соответствующим выражением для неконкурентного ингибирования:

$$\frac{1}{v} = \left(\frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} \right) \left(1 + \frac{K_a}{[A]} \right)$$

Такой вид активации называют неконкурентным, поскольку при повышении концентрации активатора v увеличивается, а K_M не изменяется.

Кооперативные эффекты и регуляторные ферменты. Ферменты, имеющие один активный центр, обычно функционируют в соответствии с кинетикой Михаэлиса: при этом график зависимости v от $[S]$ имеет вид гиперболы (рис 87). Для ферментов с олигомерной структурой, т.е. с несколькими активными центрами, кинетика функционирования не является однозначной.

В том случае, когда находящиеся в различных субъединицах активные центры кинетически независимы, график зависимости v от $[S]$ представляет собой гиперболу: если же между активными центрами имеется взаимодействие (они функционируют кооперативно), график будет иметь сигмовидную форму. Такой тип функционирования наблюдается у ряда олигомерных внутриклеточных ферментов, выполняющих важные регуляторные функции. В качестве примера на рисунке 92 приведен график зависимости v

от $[S]$ для аспарат-транскарбамоилазы. При повышении концентрации субстрата скорость реакции возрастает вначале относительно медленно, а затем значительно быстрее; прирост скорости резко уменьшается только перед достижением максимального значения. Благодаря сигмоидальному характеру зависимости v от $[S]$ оказывается возможным более эффективное регулирование скорости, чем в случае ферментов с «михаэлевской» кинетикой.

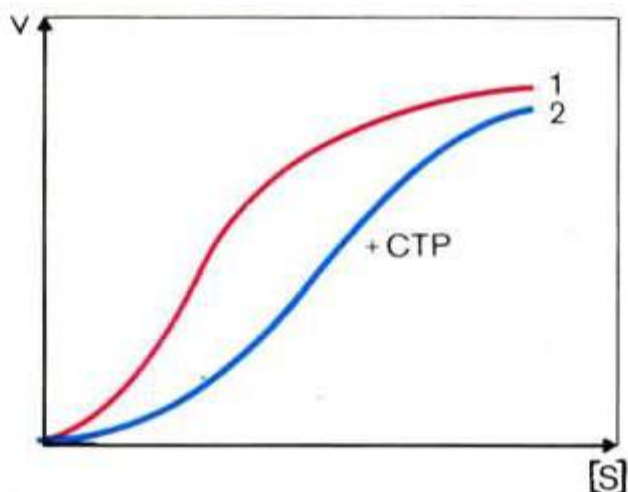


Рисунок 92 — зависимость скорости реакции, катализируемой аспарат-транскарбамоилазой, от концентрации аспарата; влияние ингибирующего эффектора (+CTP - цитидинтрифосфат): 1- в отсутствие эффектора; 2- в присутствии эффектора.

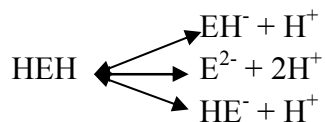
Активность регуляторных ферментов обратимо моделируется (ингибируется или стимулируется) определенными метаболитами, которые называют аллостерическими эффекторами. Название «аллостерические» (от греч. Άλλος — другой, ετερειος - пространство) эти эффекторы получили потому, что, как правило, они не имеют структурного сходства с субстратом (или продуктом) реакции, катализируемой соответствующим ферментом. Они связываются не с активным центром фермента, а со специальными участками, которые называют регуляторными центрами. По предложению Ж. Моно, ферменты, активность которых модулируется аллостерическими эффекторами, были названы аллостерическими.

Эффекторы аллостерических ферментов изменяют степень сигмоидальности графика зависимости v от $[S]$. Ингибирующий (отрицательный) эффектор смещает этот график вправо, и он становится более сигмоидальным; активирующий (положительный) эффектор смещает график в противоположную сторону, приближая его по форме к гиперболе. Влияние ингибирующего эффектора на активность аспарат-транскарбамоилазы показано на рисунке 92.

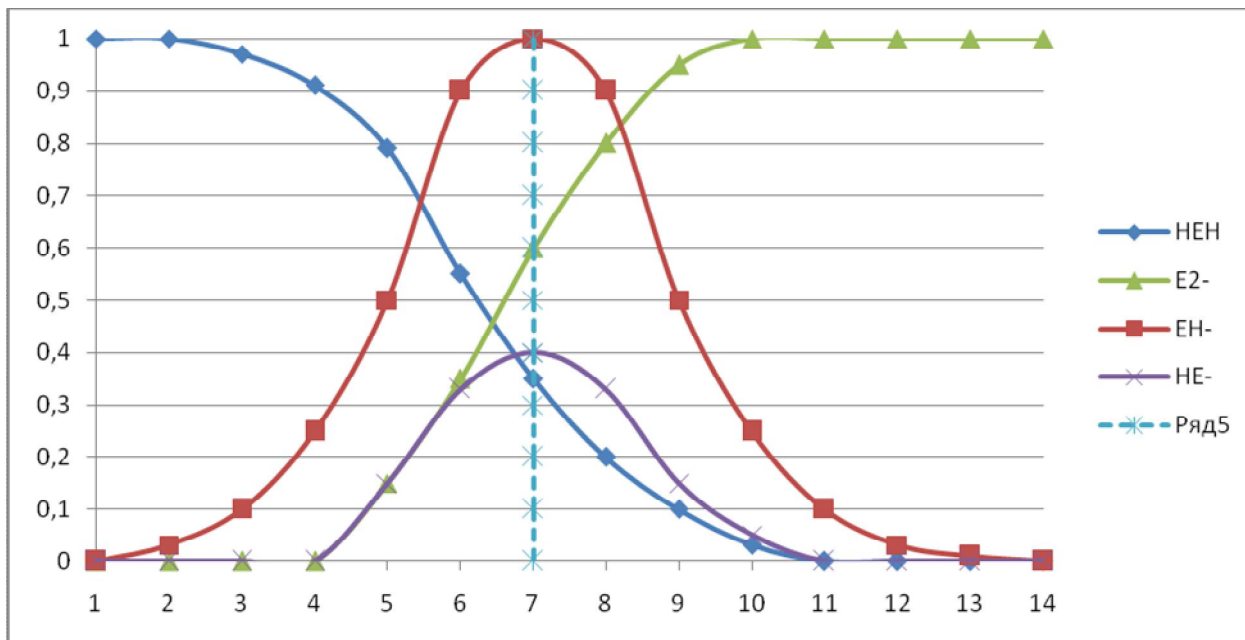
Влияние pH на активность ферментов.

Свойства ферментов сильно зависят от pH среды. Молекула фермента имеет большое количество кислых и основных групп. При нейтральном pH большинство этих групп либо полностью протонированы, либо полностью депротонированы.

Представим фермент в виде НЕН, он может диссоциировать по схеме:



Зависимость концентрации каждой формы фермента от рН можно представить в виде графика :



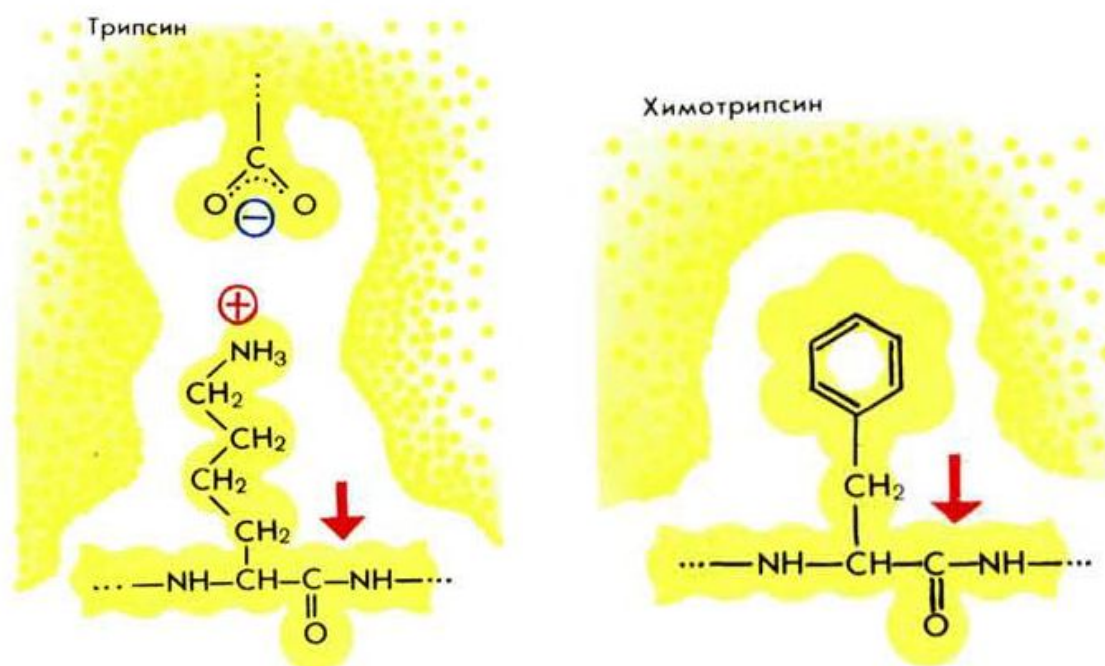
Наибольшую активность имеет смесь форм EH⁻ и E2⁻.

Влияние температуры на активность ферментов. Согласно закону Вант-Гоффа скорость химических реакций увеличивается примерно в два раза при повышении температуры на 10 °С (коэффициент Q₁₀). Это правило справедливо также и для ферментативных реакций, однако только в ограниченной области значений температуры. При повышении температуры выше 40 – 50 °С происходит инактивация белкового катализатора из-за тепловой денатурации. Следовательно, ферментативные реакции отличаются от реакций, катализируемых соединениями небелковой природы, наличием температурного оптимума. Причиной быстрого падения активности является высокая величина коэффициента Q₁₀ для процесса тепловой денатурации белка. Следует отметить, что ферменты термофильных бактерий имеют весьма высокий температурный оптимум.

Активный центр. Важная особенность ферментативного катализа состоит в том, что фермент образует с субстратом фермент-субстратный комплекс, и химическое превращение субстрата происходит в составе комплекса. В этом комплексе субстрат связывается с определенной зоной фермента, называемой активным центром; именно в активном центре происходит превращение субстрата в продукт.

Активные центры ферментов имеют ряд общих черт. Так, обычно активный центр занимает относительно небольшую часть молекулы фермента. Кроме того, активный центр – это трехмерная структура, часто имеющая, как показывают рентгеноструктурные данные, форму щели или впадины в глобуле фермента. Активный центр формируется

аминокислотными остатками, находящимися в различных, обычно значительно удаленных друг от друга участках полипептидной цепи. Условно в активном центре можно выделить два участка – связывающий и каталитический. Остатки аминокислот, образующие связывающий участок, обеспечивают удержание субстрата в активном центре. Именно «архитектура» связывающего участка активного центра фермента определяет его комплементарность структуре субстрата, т.е. специфичность фермента. Взаимодействие между субстратом и связывающим участком активного центра осуществляется за счет кооперативного действия сил различной природы. Оно обеспечивается электростатическими и водородными связями, гидрофобными и ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями. Вклады этих сил могут быть весьма различными у разных ферментов. Примером, показывающим участие электростатических сил в связывании субстрата, может служить взаимодействие субстрата с активным центром трипсина. В то же время гидрофобные взаимодействия играют доминирующую роль при связывании субстрата в случае химотрипсина. Наконец, примером, иллюстрирующим роль водородных связей, является связывание субстрата с панкреатической РНКазой. На рисунке 93 показаны водородные связи, образуемые уридиновым фрагментом РНК с группами связывающего участка фермента.



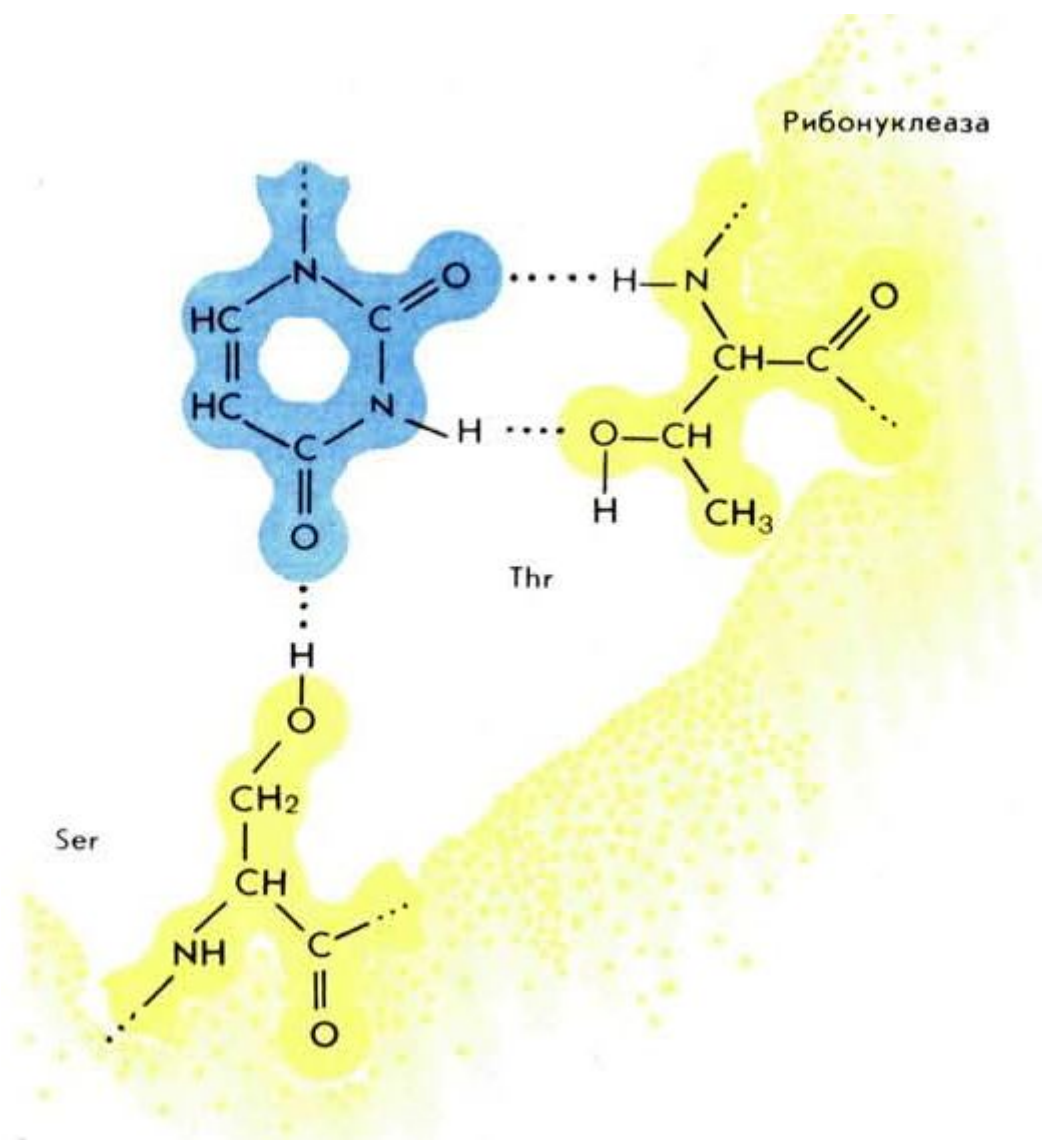


Рисунок 93 – образование водородных связей при связывании субстрата с рибонуклеазой.

В каталитический участок фермента входят остатки аминокислот, непосредственно участвующие в катализе. Их называют каталитическими группами. В качестве каталитических обычно выступают ионогенные группы.

Одна из главных задач при установлении механизма действия фермента – идентификация функциональных групп его активного центра, в первую очередь каталитических. Наиболее прямой путь – это использование необратимых ингибиторов, селективно модифицирующих определенные аминокислотные остатки. В одних случаях модификация каталитических групп оказывается возможной вследствие их высокой реакционной способности, а в других она достигается в результате использования ингибиторов, связывающихся в активном центре. Представители первой группы не имеют структурного сходства с субстратом, но избирательно модифицируют каталитические группы благодаря высокой реакционной способности последних. В качестве примера можно привести модификацию диизопропилфторфосфатом уникально реакционноспособного остатка серина в каталитическом центре химотрипсина (рис 89). Ингибиторы другой группы являются структурными аналогами субстратов, содержащих реакционноспособные группировки. Эти ингибиторы сначала нековалентно связываются в

зоне активного центра, а затем благодаря наличию реакционноспособной группировки модифицируют локализованные и находящиеся вблизи функциональные группы, образуя с ними ковалентные связи. Рассматриваемый подход известен под названием «аффинного мечения», или биоспецифической модификации.

Наиболее эффективный метод идентификации функциональных групп активного центра – рентгеноструктурный анализ. На основе информации о представленной структуре фермент-субстратного комплекса, взаиморасположении каталитических групп фермента и атакуемой связи субстрата в ряде случаев удается расшифровать механизм действия фермента.

Причины высокой каталитической активности ферментов

Между ферментативным и химическим катализом принципиальных различий не существует: химические механизмы, лежащие в их основе, сходны. Доминирующей концепцией химического катализа является теория переходного состояния. Эта теория рассматривает только два состояния реагентов – исходное (основное) и переходное – наименее стабильную структуру, образующуюся в ходе реакции. На графике (рис. 94) переходному состоянию соответствует максимум энергии; в таком состоянии химические связи непрерывно разрываются и образуются. Катализатор ускоряет реакцию, снижая величину энергии переходного состояния (энергетический барьер).

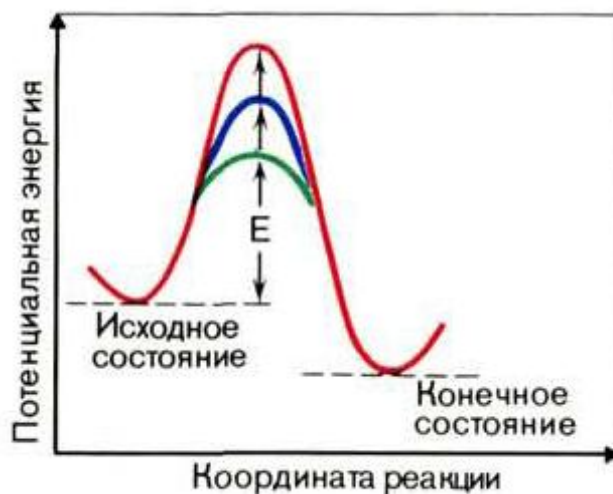


Рисунок 94 – Снижение энергии активации E при неферментативном и ферментативном катализе

- некатализируемая реакция;
- неферментативный катализ;
- ферментативный катализ.

Хотя механизмы химического и ферментативного катализа сходны, однако ферменты в условиях нормального и давления в водных растворах при 37 °С являются значительно более эффективными, чем обычные химические катализаторы.

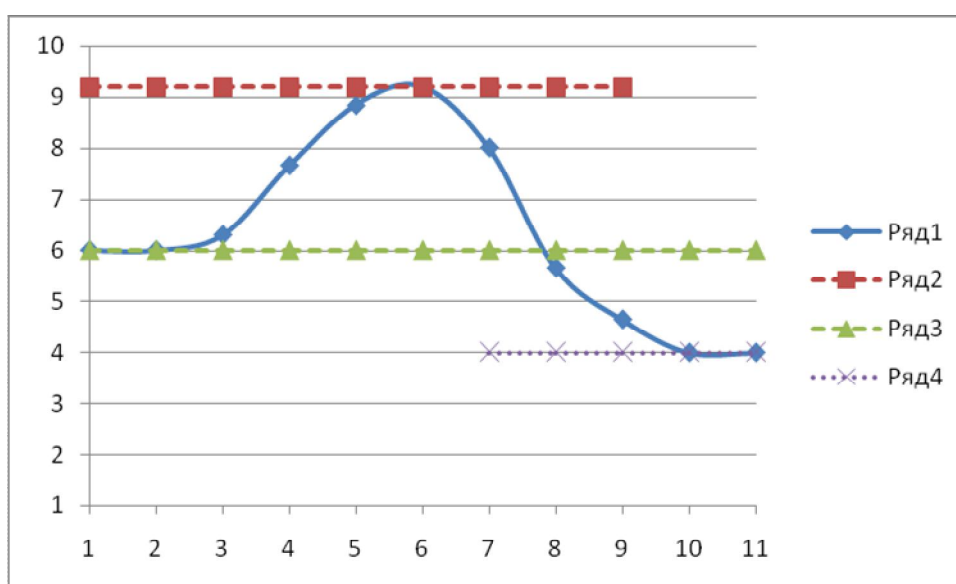
За счет чего достигается высокая каталитическая активность ферментов? Можно выделить несколько основных факторов, которые реализуются благодаря образованию фермент-субстратного комплекса: факторы сближения, фиксации и ориентации. В

рамках теории переходного состояния эти факторы, в конечном счете, снижают энергетический барьер реакции. Связывание субстрата в активном центре обеспечивает сближение атакуемой связи с каталитическими группами фермента, одновременно достигается фиксация субстрата и его оптимальная для разрыва и образования химических связей ориентация. Кроме того, это фактор изменения конформаций фермента и субстрата. Д. Кошланд сформулировал концепцию «индивидуального соответствия», согласно которой при связывании специфического субстрата происходит такое изменение конформации фермента, которое перемещает каталитические группы в положение, обеспечивающее эффективное протекание катализа. Индуцируемые субстратом изменения конформации фермента происходят, вероятно, в пределах тех состояний, которые «разрешены» и для свободного фермента. Концепцию индуцирования можно рассматривать как развитие представлений Э. Фишера о жесткой матрице, действующей по принципу «ключ - замок».

Большое значение для эффективности действия фермента может иметь сопряженный кислотно-основной катализ, а также нуклеофильный катализ с образованием реакционноспособного промежуточного соединения. Немалую роль играет и фактор микросреды. Совокупность факторов, вносящих вклад в повышение каталитической активности ферментов, обеспечивает снижение энергетического барьера реакции. Согласно получившей весьма широкое признание концепции, снижение энергетического барьера достигается благодаря стабилизации переходного состояния. Приближение к структуре переходного состояния требует в общем случае затраты энергии; согласно рассматриваемой концепции, необходимая энергия обеспечивается за счет части энергии связывания субстрата с ферментом.

Механизмы ферментативного катализа

Переходное состояние образуется, когда старая связь частично разорвана и одновременно образуется новая.



Ферментативная реакция включает несколько переходных состояний, разделенных ямами (промежуточные соединения). Факторы, приводящие к стабилизации переходного

состояния ($\downarrow \Delta G_{\text{акт}}$) повышают скорость реакции. Стабилизация переходного состояния реакции ферментом означает, что фермент проявляет большее сродство к переходному состоянию, чем к субстрату или продукту.

Кисотно-основный механизм

Ферменты, благодаря наличию кислотных и основных групп, являются хорошими донорами протонов. Чем ниже значение константы диссоциации фермента, тем выше его каталитическая активность.

Ковалентный катализ

Боковые группы аминокислот молекулы фермента могут не только участвовать в кислотно-основном катализе, но и вовлекаться в образование ковалентных связей с молекулами субстрата. В таком катализе чаще принимают участие основные группы. В ковалентном катализе чаще принимают участие коферменты.