



Биохимия



автор фото: Петр Шаров

Доктор химических наук, профессор Шоинбекова Сабина Алимжановна



Лекция № 6.

Ферменттік реакциялардың КИНЕТИКАСЫ.

1. Ферменттік реакцияның типтері;
2. Михаэлис-Ментен теңдеуі, константасы.
3. Ингибиторлар (тежегіштер): түрлері,
ингибиторлардың Михаэлис-Ментен теңдеуіне,
константасына әсері.



Химиялық кинетика – химиялық реакцияның механизмін, жүру барысында немесе уақыт аралығындағы құбылыстар заңдылықтарын, ***реакция жылдамдығының түрлі факторлардан*** (C , $t^{\circ}C$, P , сәулелену, катализаторлардың әсері, т.б.) тәуелділіктерін зерттейді.

Мақсаты – реакцияның механизмін анықтау, яғни, бастапқы заттардан – өнімдердің түзілуіне дейінгі элементарлы реакцияларды зерттеу болып табылады.



Алғаш рет ферменттік реакцияның математикалық сипаттамасын жасаған *Дюкло (1898)*.

Содан кейін *А. Браун* және *В. Анри* XX ғасырдың басында **«ферменттік реакциялардың негізінде субстрат пен ферменттің қайтымды әрекеттесуі»** жатыр деп болжаған еді. Ол әрекеттесудің нәтижесінде фермент-субстраттық комплекс түзіліп, ары қарай өнім түзілгеннен кейін фермент регенерацияланып, қалпына келеді.

Бұл гипотеза ары қарай *Леонор Михаэлис* және *Мауде Леонора Ментен (1913 ж.)* жұмыстарында жалғасын тауып, ары қарай – *Бригс пен Холден (1925 ж.)* зерттеді.



Химиялық реакцияның жылдамдығы:

Химиялық кинетиканың негізгі ұғымы – *химиялық реакцияның жылдамдығы.*

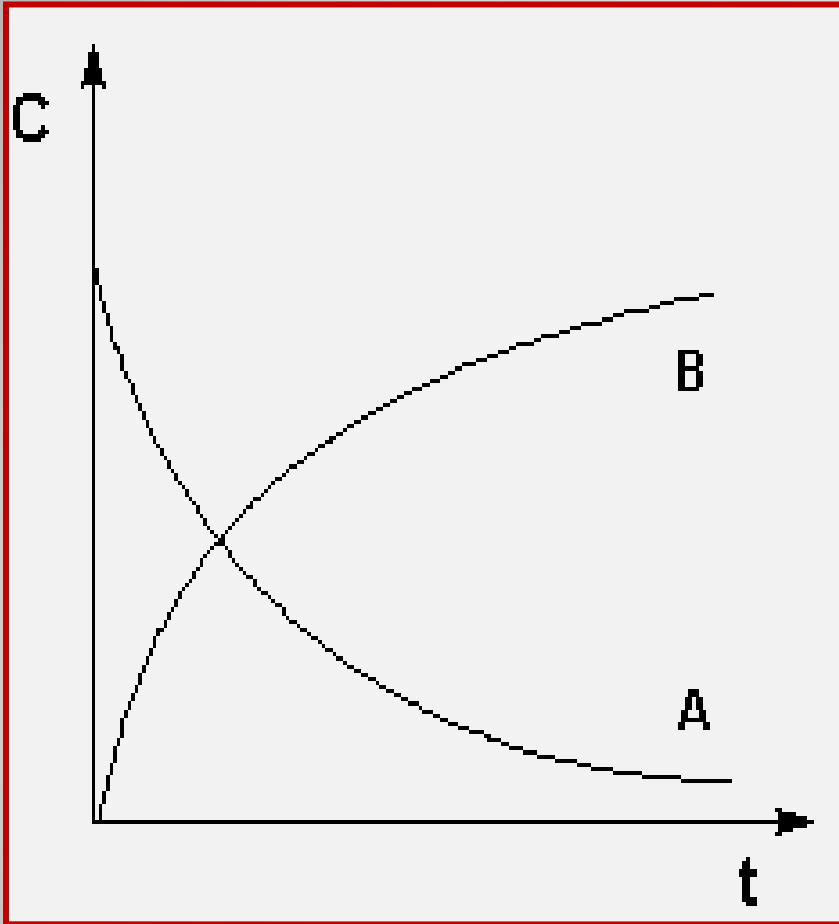
Ол – әрекеттесетін қосылыстардың концентрациясының бір уақыт бірлігінде өзгеруі.

$$W_{cp} = \pm \frac{\Delta C}{\Delta t}$$

Бастапқы субстраттың концентрациясы төмендейді ($\Delta C_{исх} < 0$; минус), ал өнім концентрациясы артады ($\Delta C_{прод} > 0$; плюс).



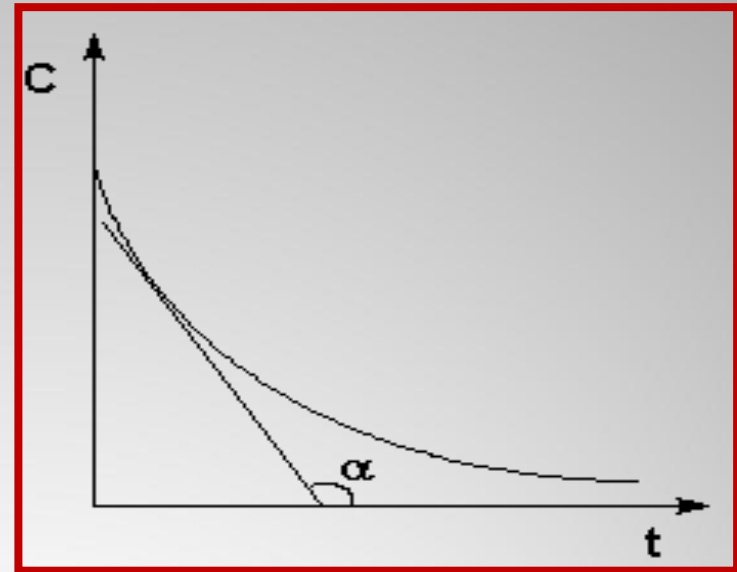
Реакцияның бастапқы заттары, субстрат (А) және өнімдерінің (В) кинетикалық қисықтары



$$w_{уст} = \pm \frac{dC}{dt}$$



Реакцияның нақты жылдамдығын графикалық жолмен анықтауға болады: кинетикалық қисыққа касательная құрып: реакция жылдамдығы – бұрыштың тангенсіне тең:



$$w_{уст} = \pm \frac{dC}{dt} = \pm tg \alpha$$

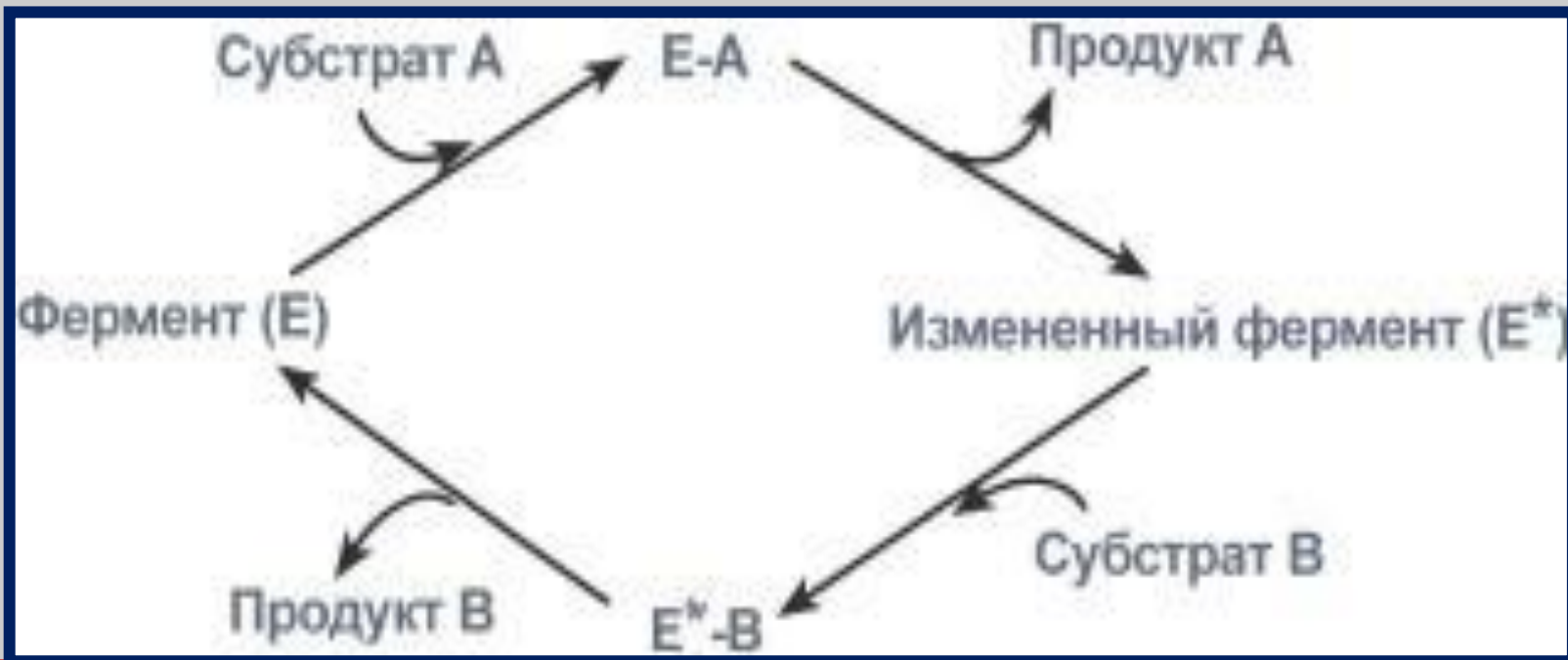
Егер, стехиометриялық коэффициенттер бірдей болмаса, реакция жылдамдығы анықталатын реагенттің концентрациясымен анықталады. Мысалы,
 $2H_2 + O_2 \rightarrow 2H_2O$
 сутек, оттегі, судың концентрациялары әртүрлі өзгереді. Реакция жылдамдығы әрекеттесетін қосылыстардың табиғатына, концентрациясына, температураға, еріткіштерге байланысты болады.



Ферменттік реакциялардың типтері:

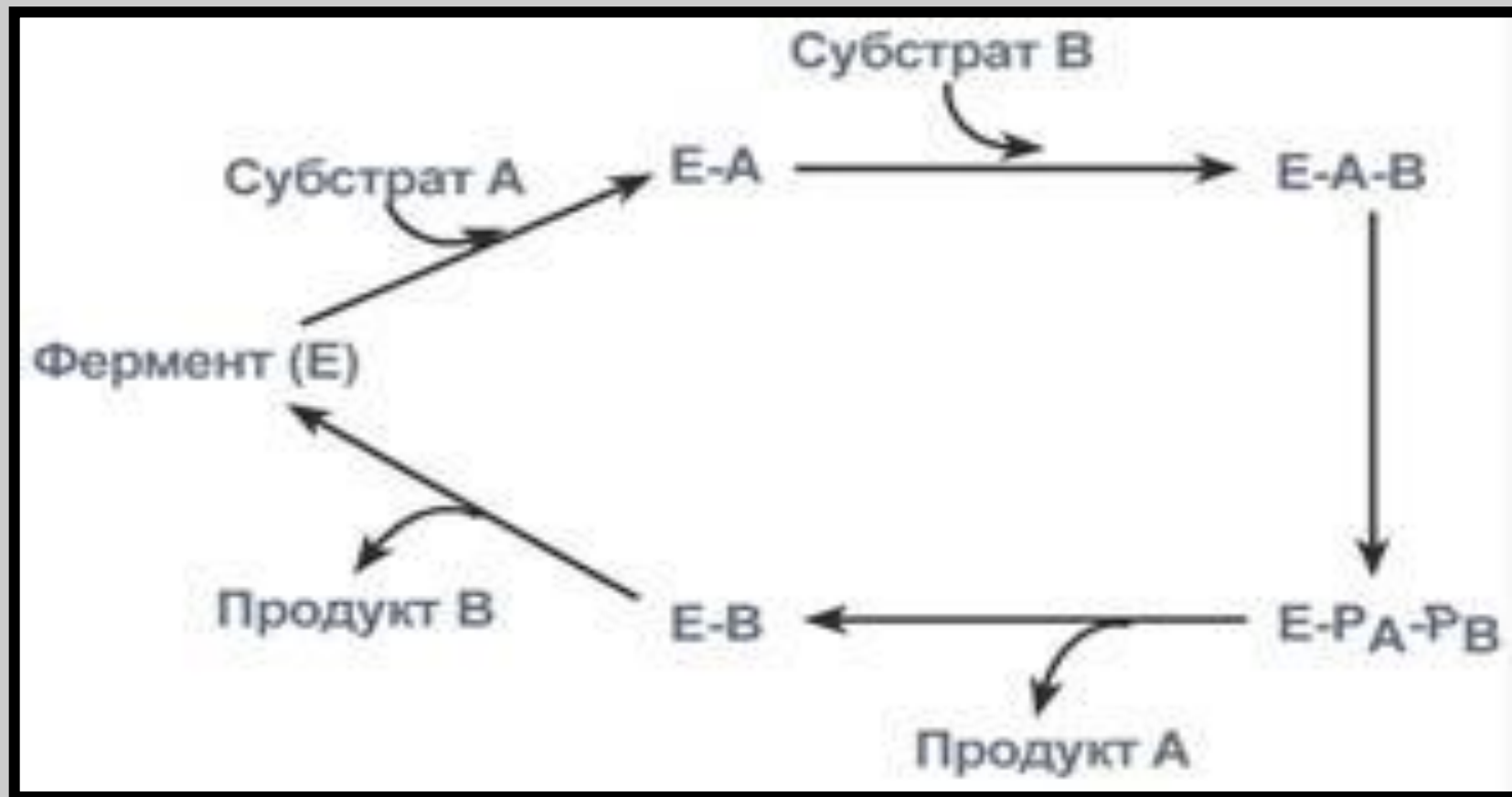
1. «Пинг-понг» типі – фермент бірінші А субстратымен әрекеттесіп, одан бір химиялық топты бөліп алып, өнімге айналдырады, өзі де өзгереді. Содан кейін ол В субстратымен әрекеттеседі, ол химиялық топты оған қосады.

Мысалы, амин топтарын кетоқышқылдарға тасымалдау (Трансаминдеу).



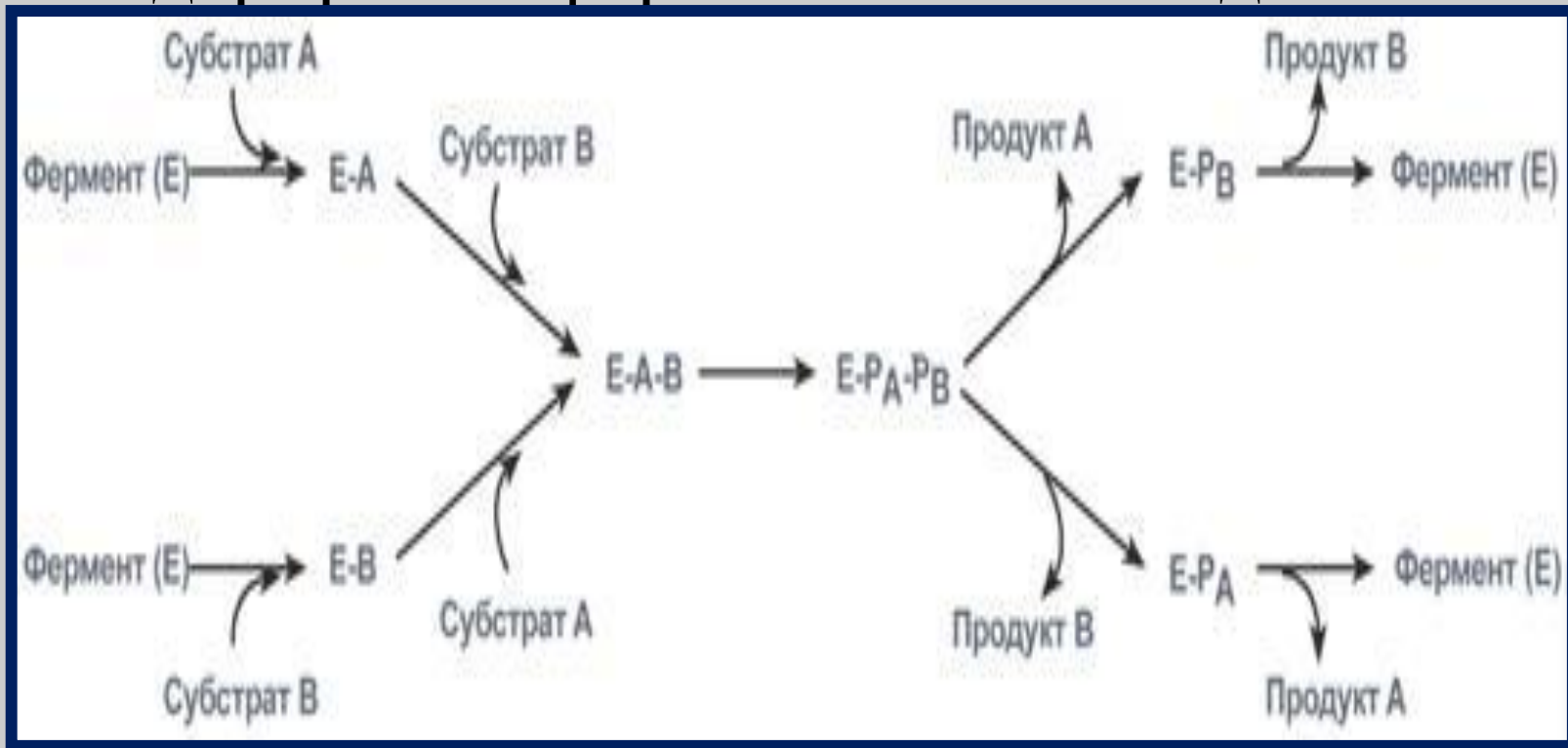


2. «Ретті реакциялар» типі – ферментке ретпен А және В субстраттары қосылады, "тройной комплекс", түзіліп, катализ жүреді. Реакция өнімдері кезекпен бөлінеді.





3. «Ретсіз әрекеттесу» типі – А және В субстраты ферментке ретсіз байланысып, катализ жүзеге асқан соң, А мен В-ның өнімдері ретсіз ферменттен бөлінеді.





Леонор Михаэлис

Мауде Леонора Ментен

(a)

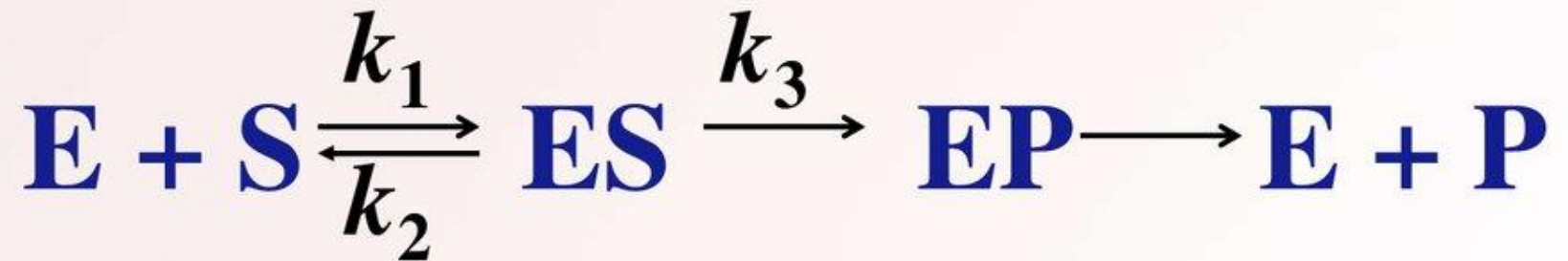


(b)



02.12.2023
Берлин, 1912 г.

Общее уравнение ферментативной реакции:





Михаэлис-Ментен теңдеуі

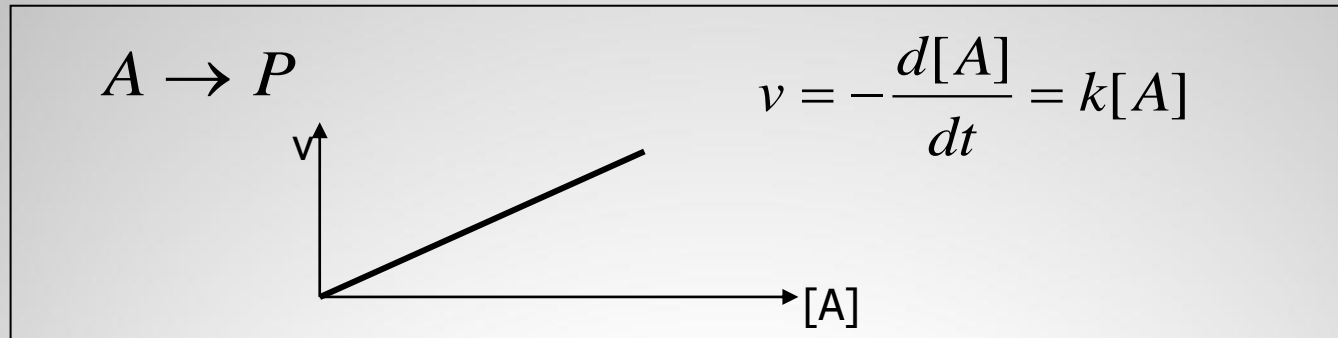
Мағынасы не? — Ферментативті реакцияның жылдамдығы туралы мәлімет алу

- Ферментпен (E) катализденетін субстраттың (S) өнімге (P) айналу реакциясының кестесі;
- *Михаэлис-Ментен теңдеуі – реакцияның жылдамдығының субстраттың концентрациясынан тәуелділігін көрсетеді.*
- Михаэлис-Ментен теңдеуінің жұмыс істейтін жағдайлары:
 - 1) Реакцияның стационарлы фазасы, яғни, $[ES]=\text{const}$, $d[ES]/dt=0$;
 - 2) Бастапқы реакцияның жылдамдығы өлшенеді; $[S] \approx [S_0]$
 - 3) $[E] = [E_0] - [ES]$

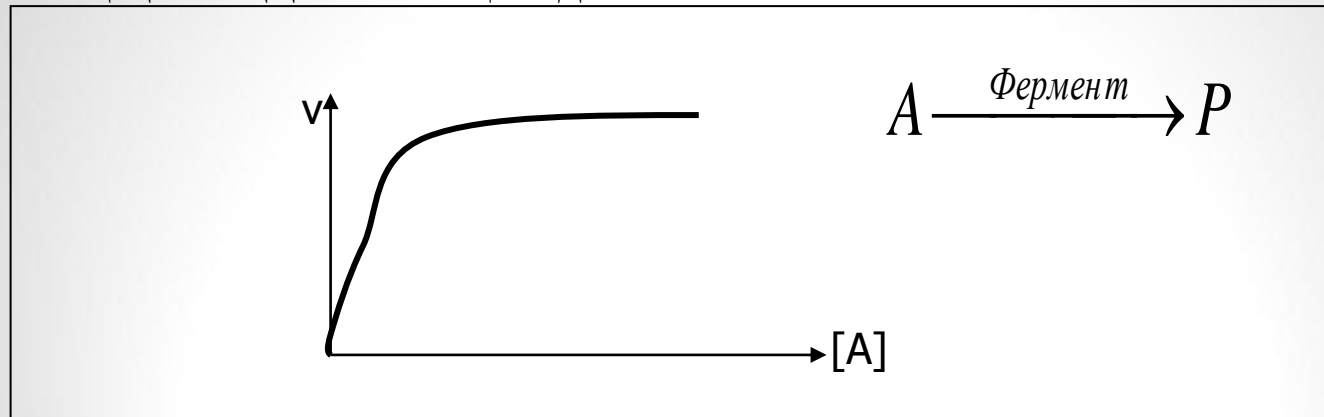


Ферментативті кинетика

- Мономолекулярлы реакцияның жылдамдығы А заттың концентрациясына [А] пропорционалды



- Егер осы реакцияны фермент катализдейтін болса, белгілі концентрацияда оның қаныққаны байқалады.





Стационарлы фазада фермент-субстраттық комплекстың $[ES]$ концентрациясы өзгермейді:



- $[ES]$ жиналатын алғы стационарлық фаза – өте қысқа.

$$-\frac{d[ES]}{dt} = 0$$

- Михаэлис-Ментен теңдеуі ферментативті реакцияның жылдамдығын тек **стационарлы фазада сипаттайды.**



Бастапқы жылдамдық өлшенеді



- Реакцияның басында өнім [P] аз мөлшерде түзіледі. Яғни, кері реакциядан (E+P) түзілетін [ES] концентрациясы есепке алынбайды және оны **ES → E+P қайтымсыз деп есептеуге болады.**
- Субстрат жаңадан жұмсала бастады: $[S] \approx [S_0]$.
- Теңдеуді келесідей жазуға болады:





Реакцияның жылдамдығы реагенттер концентрациясына пропорционалды



- Фермент-субстраттық комплекстың жиналу жылдамдығы, v_f :

$$v_f = k_1[E][S]$$

- Фермент-субстраттық комплекстың ыдырауы (кері реакцияның) жылдамдығы, v_d :

$$v_d = k_{-1}[ES] + k_2[ES] = (k_{-1} + k_2)[ES]$$

- Стационарлы фазада $[ES]$ - өзгермейді:

$$v_f = v_d$$

$$k_1[E][S] = (k_{-1} + k_2)[ES]$$



Михаэлис-Ментен теңдеуі

- Біз белгілі уақыттағы Е концентрациясын біле алмаймыз, бірақ, ферменттің бастапқы концентрациясын $[E_0]$ білеміз, ол фермент-субстраттық комплекстың концентрациясымен $[ES]$ бос ферменттің $[E]$ концентрациясының суммасы:

$$[E_t] = [ES] + [E] \quad v_f = k_1[E][S] = k_1([E_t] - [ES])[S]$$

- Стационарлық фазада концентрация $[ES]$ – const:

$$\Rightarrow k_1([E_t] - [ES])[S] = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad \Rightarrow \quad k_1[E_t][S] - k_1[ES][S] = (k_{-1} + k_2)[ES]$$

$$\Rightarrow k_1[E_t] = k_1[ES][S] + (k_{-1} + k_2)[ES] \quad \Rightarrow \quad k_1[E_t][S] = [ES](k_1[S] + (k_{-1} + k_2))$$

$$\Rightarrow [ES] = \frac{k_1[E_t][S]}{(k_1[S] + (k_{-1} + k_2))} = \frac{[E_t][S]}{[S] + \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1}} \xrightarrow{K_m = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1}} [ES] = \frac{[E_t][S]}{[S] + K_m}$$

- Өнімнің түзілу жылдамдығы: $v = k_2[ES]$:

$$v = \frac{k_2[E_t][S]}{[S] + K_m}$$



Михаэлис-Ментен теңдеуінен шыққан следствия

- Өнімнің түзілу жылдамдығын тәжірибеде көре аламыз.
- Максималды жылдамдық - фермент толық субстратпен қаныққанда байқалады, яғни $[S] \rightarrow \infty$

$$v_{[S] \rightarrow \infty} = \frac{k_2 [E_t]}{1 + \frac{K_m}{[S]}} = \boxed{k_2 [E_t] = v_{\max}}$$

Жылдамдық өзгермейді

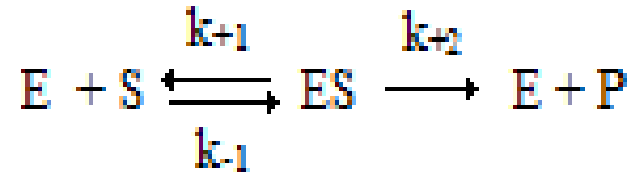
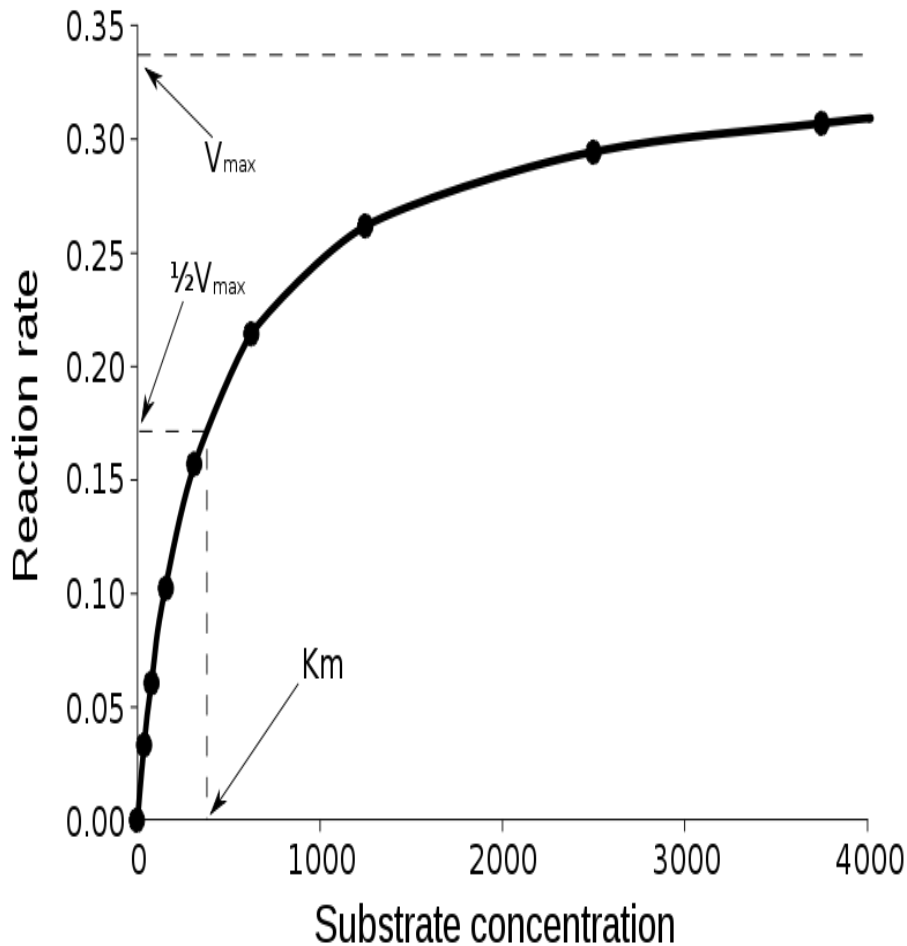
ММ теңдеуін келесі түрде жазамыз:

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



Михаэлис-Ментен теңдеуі

Ферменттік реакцияның субстрат концентрациясынан тәуелділігі



Михаэлис-Ментен теңдеуі:

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]_0}{K_m + [S]_0}$$



Михаэлис-Ментен константасының (K_m) мағынасы

- K_m жылдамдық константаларынан шығады:

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

- K_m Михаэлис-Ментен жағдайында фермент-субстраттық комплекстың ыдырауының жылдамдығын анықтайды:



Диссоциация константасы:

$$K_d = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

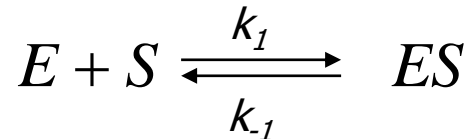
Төмен K_m –ның мағынасы – фермент пен субстрат күшті байланысқан; жоғары K_m – әлсіз байланысқан.

K_m – реакция жылдамдығы максималды жылдамдықтың $v = 1/2 v_{max}$ жартысына тең болатын субстрат концентрациясы.



V_{max} мағынасы:

- V_{max} әдетте табиғатта болмайды, себебі барлық фермент субстратпен байланысуы қажет
- ***Бірақ, химиялық тепе-теңдік ше? ...?***



$$k_{cat} = \frac{v_{max}}{[E_0]}$$

- **Айналым саны (число оборотов), k_{cat} , —**

Бір фермент молекуласының белгілі бір уақыт аралығында өнімге айналдыратын субстрат молекуласының саны (фермент субстратпен қаныққан жағдайда ($[S] \gg [E_t]$),

$$k_2 = \frac{v_{max}}{[E_0]} = k_{cat}$$



Кейбір ферменттердің V_{max} (айналым саны/число оборотов)

Фермент	Жылдамдық (с ⁻¹)
Каталаза	40 000 000
Ацетилхолинэстераза	14 000
Лактат-дегидрогеназа	1 000
Химотрипсин	100
ДНК-полимераза I	15
Лизоцим	0,5



Михаэлис-Ментен теңдеуі

К_м және V_{max} - ферменттердің аса маңызды сипаттамалары:

К_м – Михаэлис константасы - бұл ферментативті реакция жылдамдығы максималды жылдамдықтың жартысына тең болатын субстрат концентрациясы.

К_м – ферменттің субстратқа туыстығын (сәйкестігін) көрсетеді.

К- төмен болса, ферменттің субстратқа туыстығы артады, реакция жылдамдығы жоғары; ал К_м – үлкен болса, ферменттің субстратқа туыстығы төмен, реакция баяу жүреді.



Км және V_{\max} - ферменттердің аса маңызды сипаттамалары:

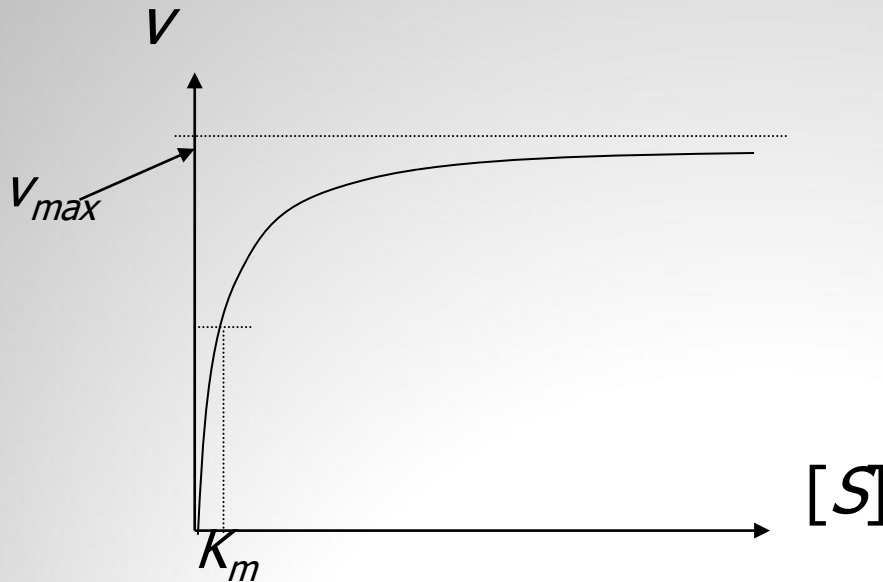
Көптеген ферментативті реакциялардың Км $10^{-2} - 10^{-5}$ М аралығында болады.

V_{\max} – белгілі фермент концентрациясында, субстраттың артық мөлшердегі жағдайында өнімнің максималды түзілу жылдамдығы.

V_{\max} - активті орталықтардың барлығы субстратпен байланысқан жағдайда байқалады.



Михаэлис-Ментен теңдеуінің графикалық түрі :



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

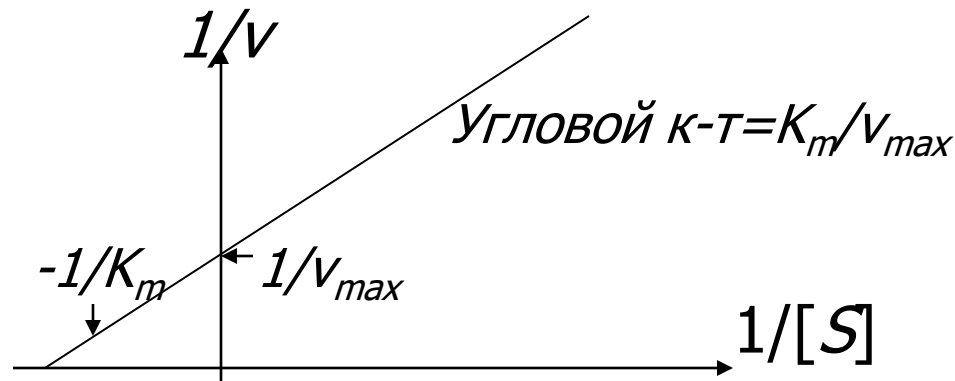
- Бірақ бұл нақты емес.



Лайнуивер және Берк (Lineweaver-Burk) линеаризациясы

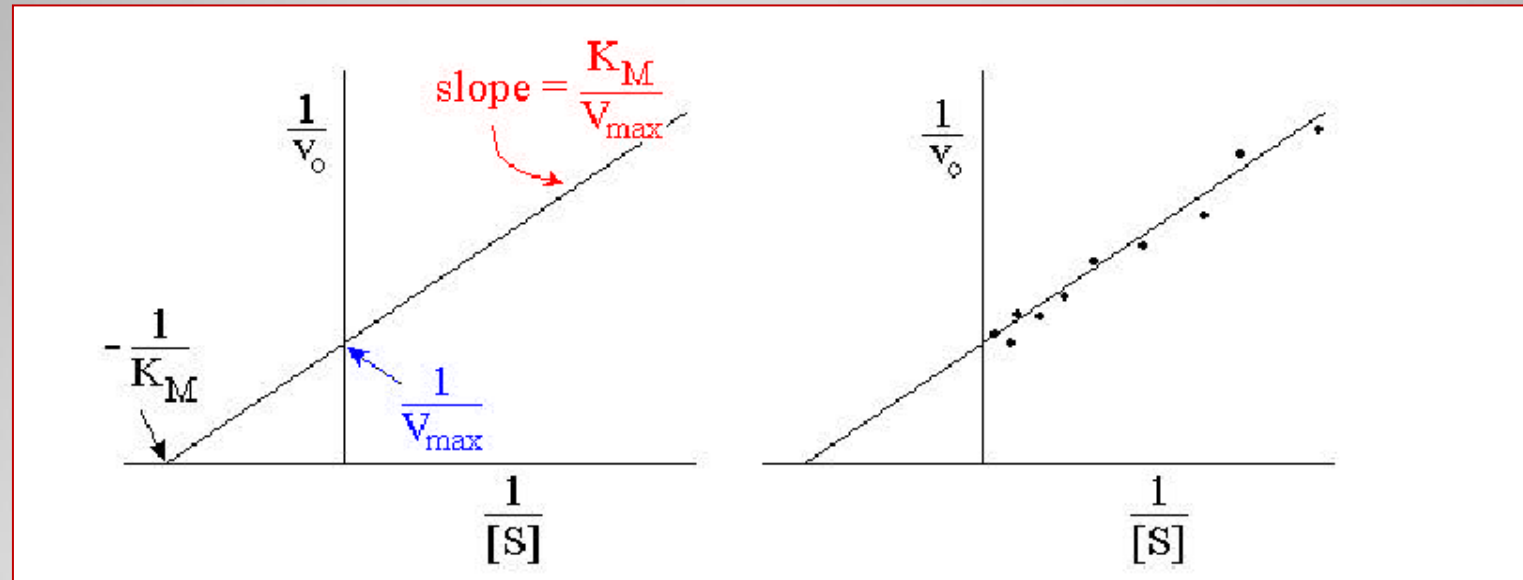
Теріс координата алсақ, ММ теңдеуі келесі
өрнекпен жазылады: $y=kx+b$:

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{[S] + K_m} \Rightarrow \frac{1}{v} = \frac{[S] + K_m}{v_{\max} [S]} = \frac{1}{v_{\max}} + \frac{K_m}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]}$$





Метод Лайнуивера-Берка (метод двойных обратных величин)



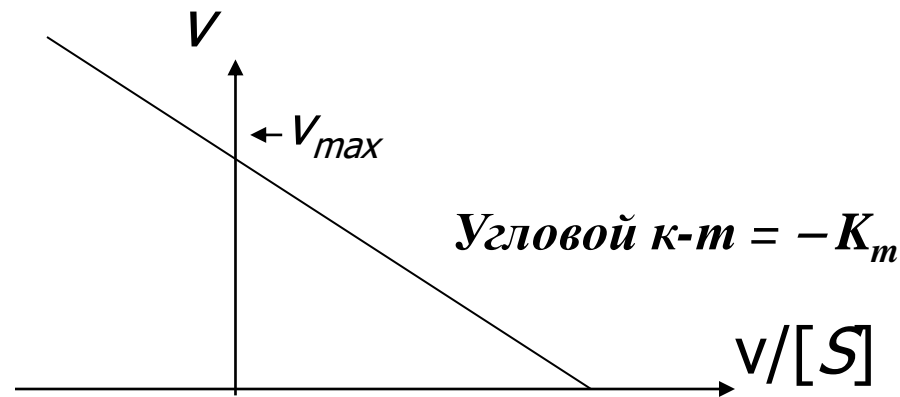
$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M + [S]}{V_{max} [S]}$$

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$



Эди-Хофсти (Eadie-Hofstee) линеаризациясы:

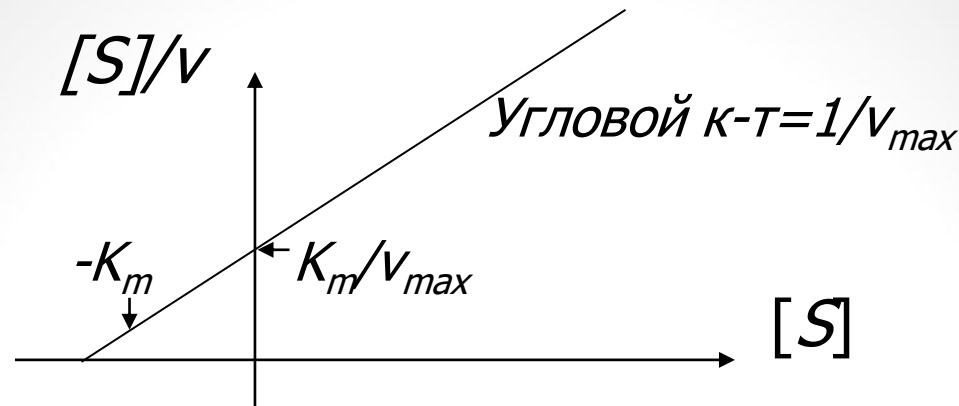
$$v = \frac{v_{\max}[S]}{[S] + K_m} \Rightarrow v([S] + K_m) = v_{\max}[S] \Rightarrow v[S] = v_{\max}[S] - K_m v \Rightarrow v = v_{\max} - \frac{K_m v}{[S]}$$





Хейнс-Вольф (Hanes-Wolff) немесе Диксон және Уэбб линеаризациясы:

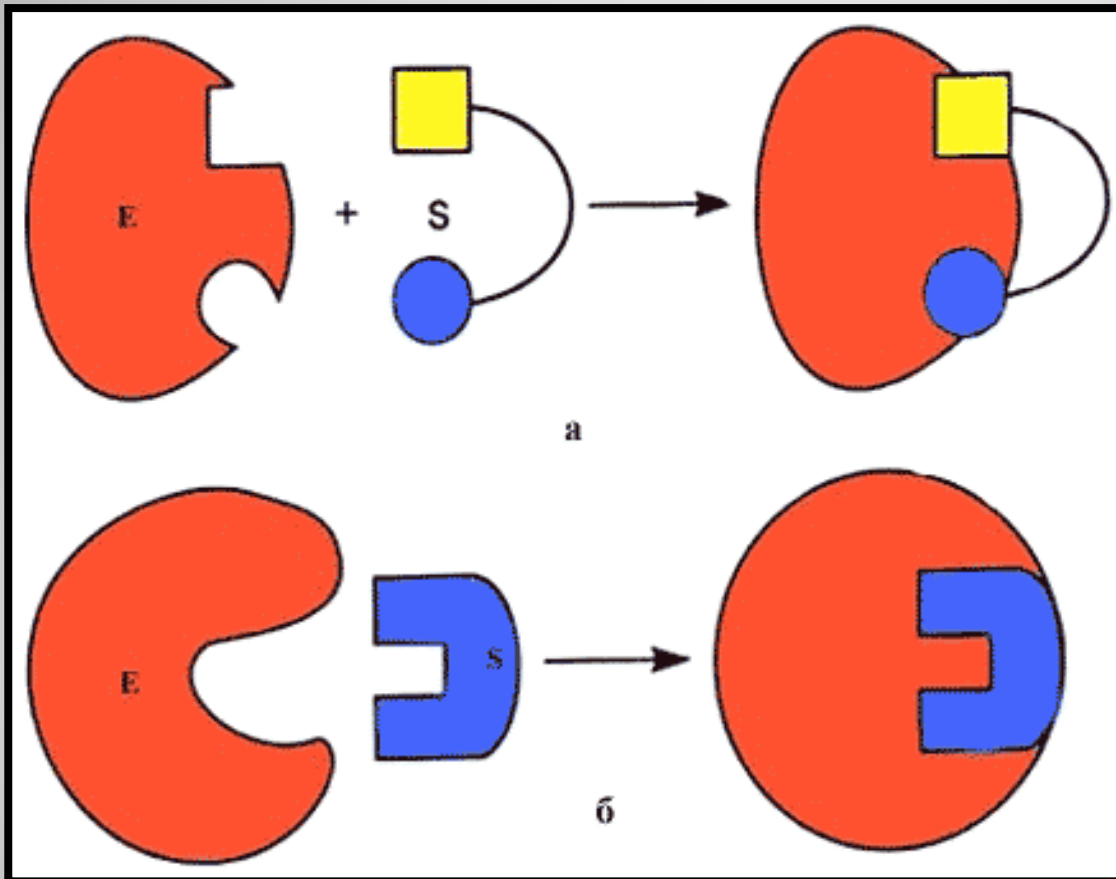
$$v = \frac{v_{\max} [S]}{[S] + K_m} \Rightarrow \frac{[S]}{v} = \frac{[S] + K_m}{v_{\max}} = \frac{[S]}{v_{\max}} + \frac{K_m}{v_{\max}}$$





Специфичность ферментов

Фермент пен субстрат әсері



А) Модель "жесткой матрицы" по Э. Фишеру

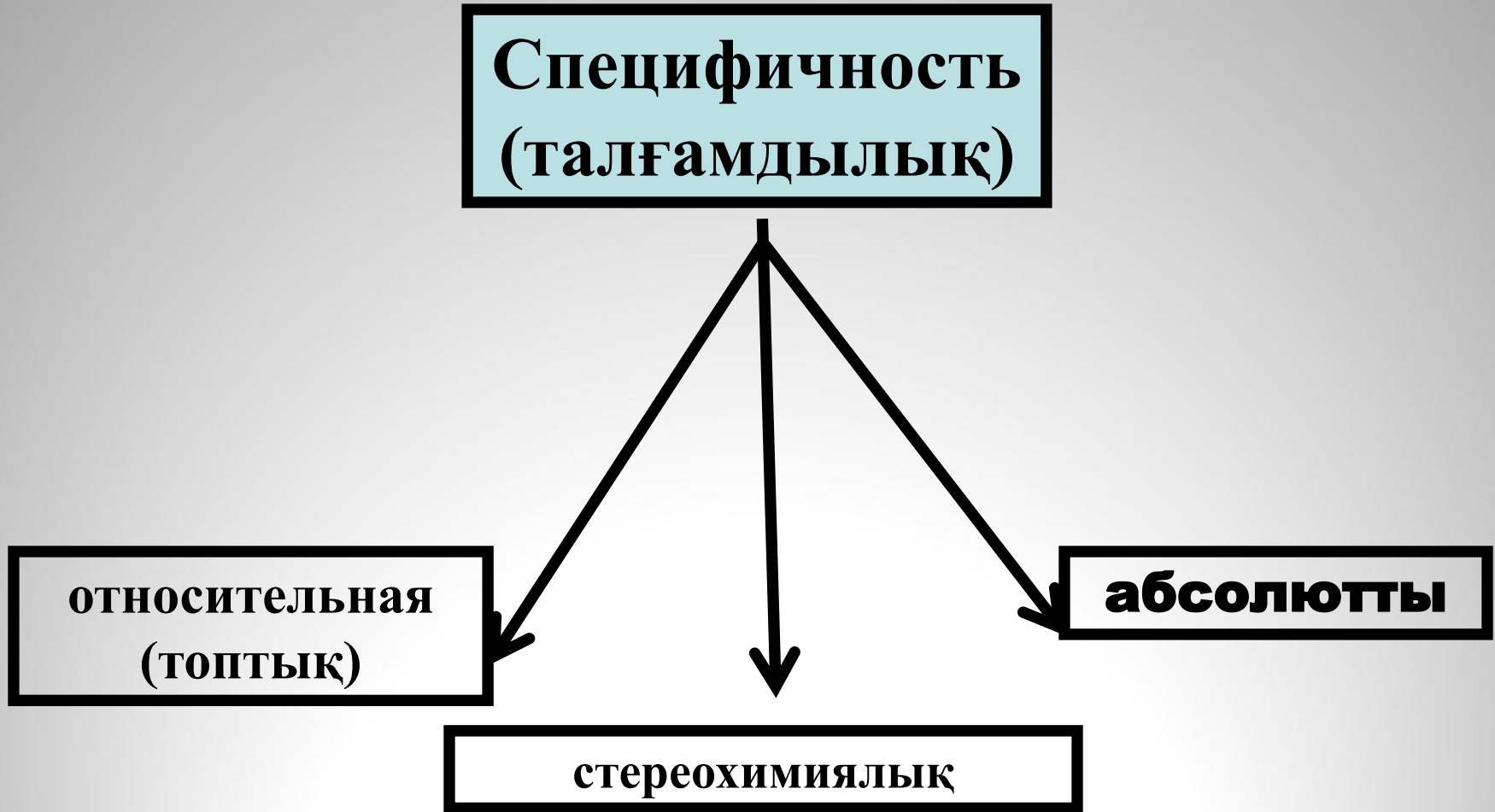
Б) Модель "перчатка - рука" по Д. Кошланду.

**Специфичность
(талғамдылық)**

**относительная
(топтық)**

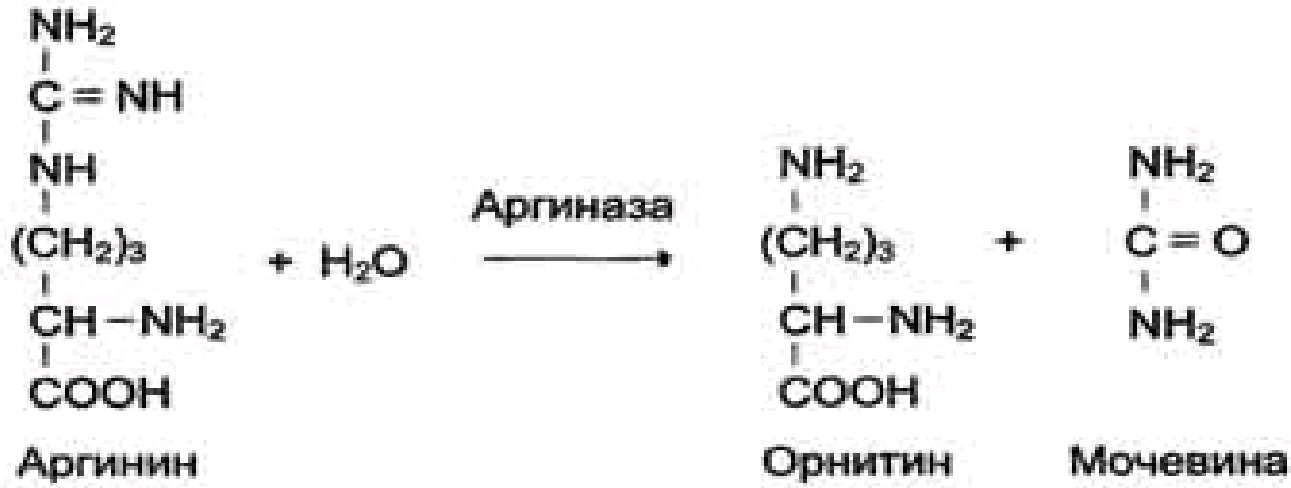
абсолютты

стереохимиялық





Абсолютты талғамдылығы бар ферменттер:



Карбоангидраза

Лактаза

Сахараза

Мальтаза

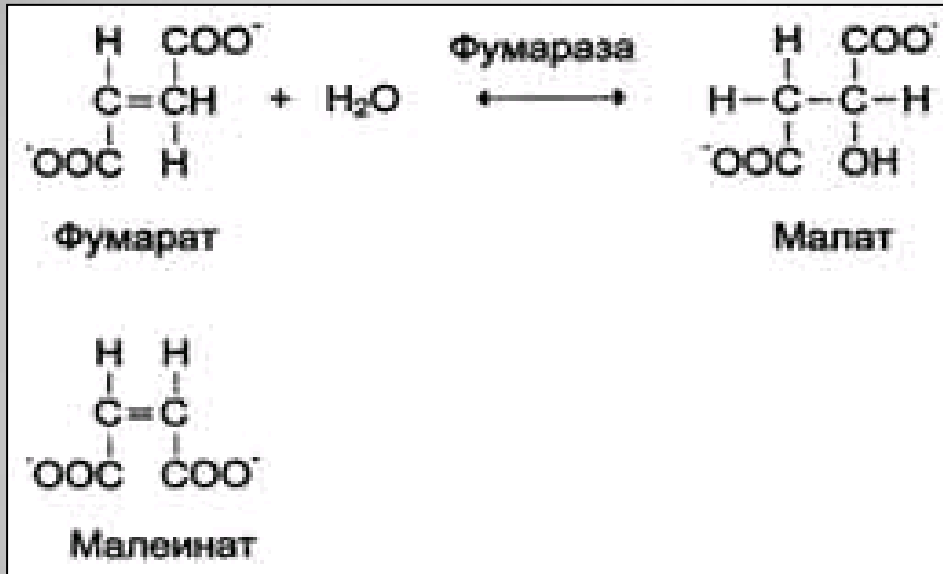
Глюкокиназа



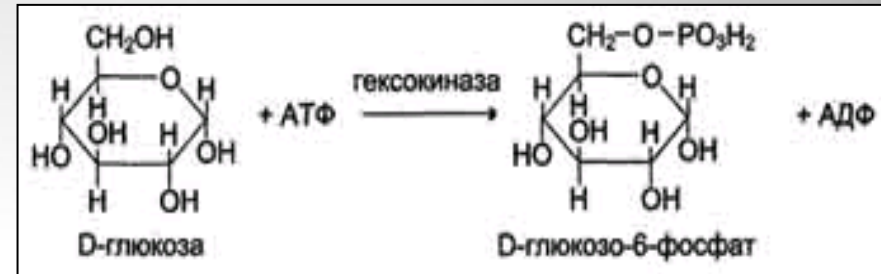


Стереоталғамды ферменттер

Фермент специфичен не только к субстрату, но и к его оптической конфигурации



Стереоспецифичность к цис-транс изомерам

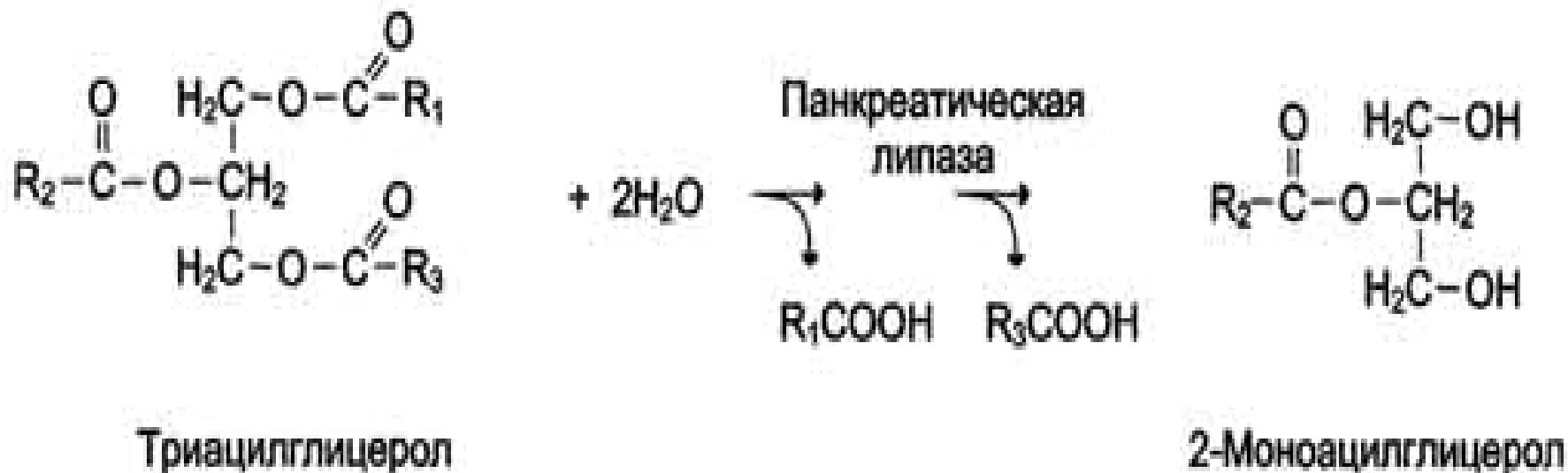


Стереоспецифичность к D-изомерам моносахаридов

**L-аминооксидазы
D-аминооксидаза**



Относительная специфичность ферментов



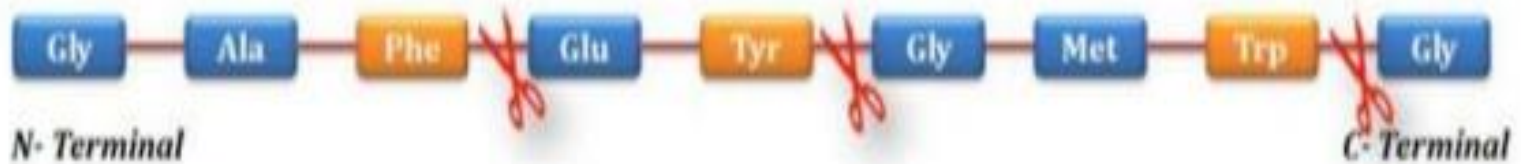


Относительная специфичность ферментов

Pepsin Cleavage Sites



Chymotrypsin Cleavage Sites





Фермент активаторлары:

Активаторлар – ферменттің катализдық әсерін арттыратын қосылыстар; табиғаты – әртүрлі қосылыстар.

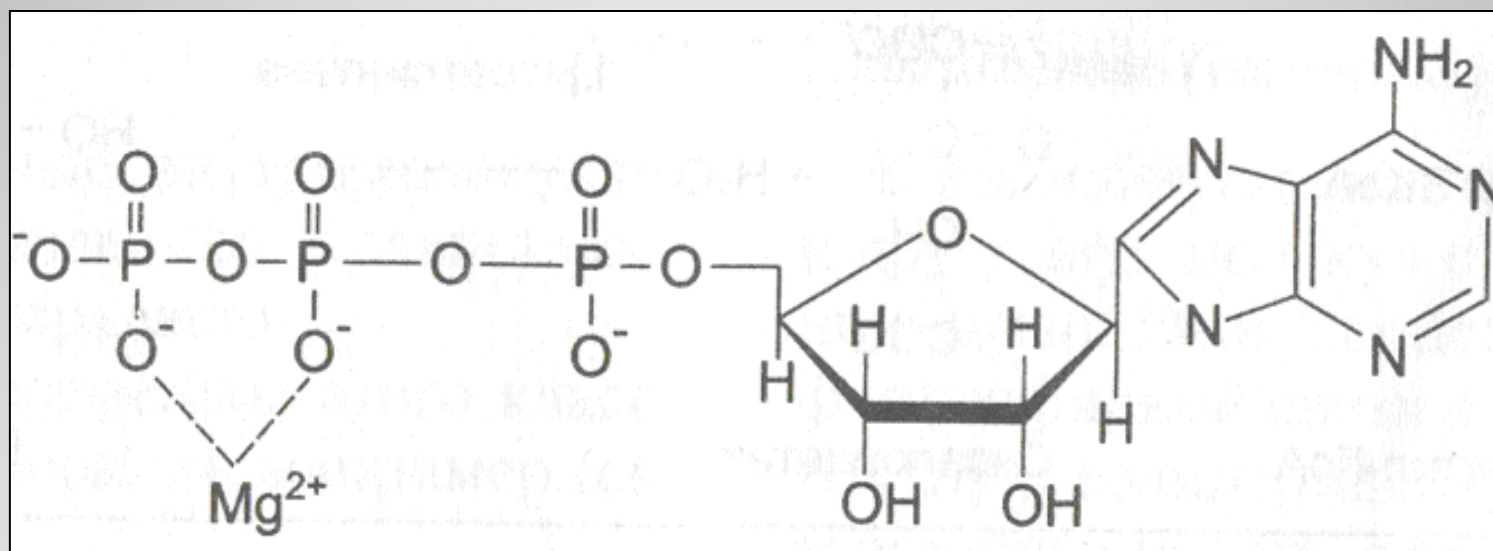
Әдетте, активаторлар - металл иондары: калий, кальций, магний, цинк, мыс, темір, марганец, кобальт, аниондардан - хлора.

- Тұз қышқылы – пепсиннің активаторы;
- Өт қышқылдары – панкреатитік липазаның;
- SH-топтары бар қосылыстар (глутатион, цистеин) – кейбір тканьдік ферменттердің (оксидоредуктазалардың, катепсиндердің, аргиназаның, т.б.) активтілігін арттырады;



Активаторы ферментов

Металлы – стабилизаторы субстратов и кофакторов

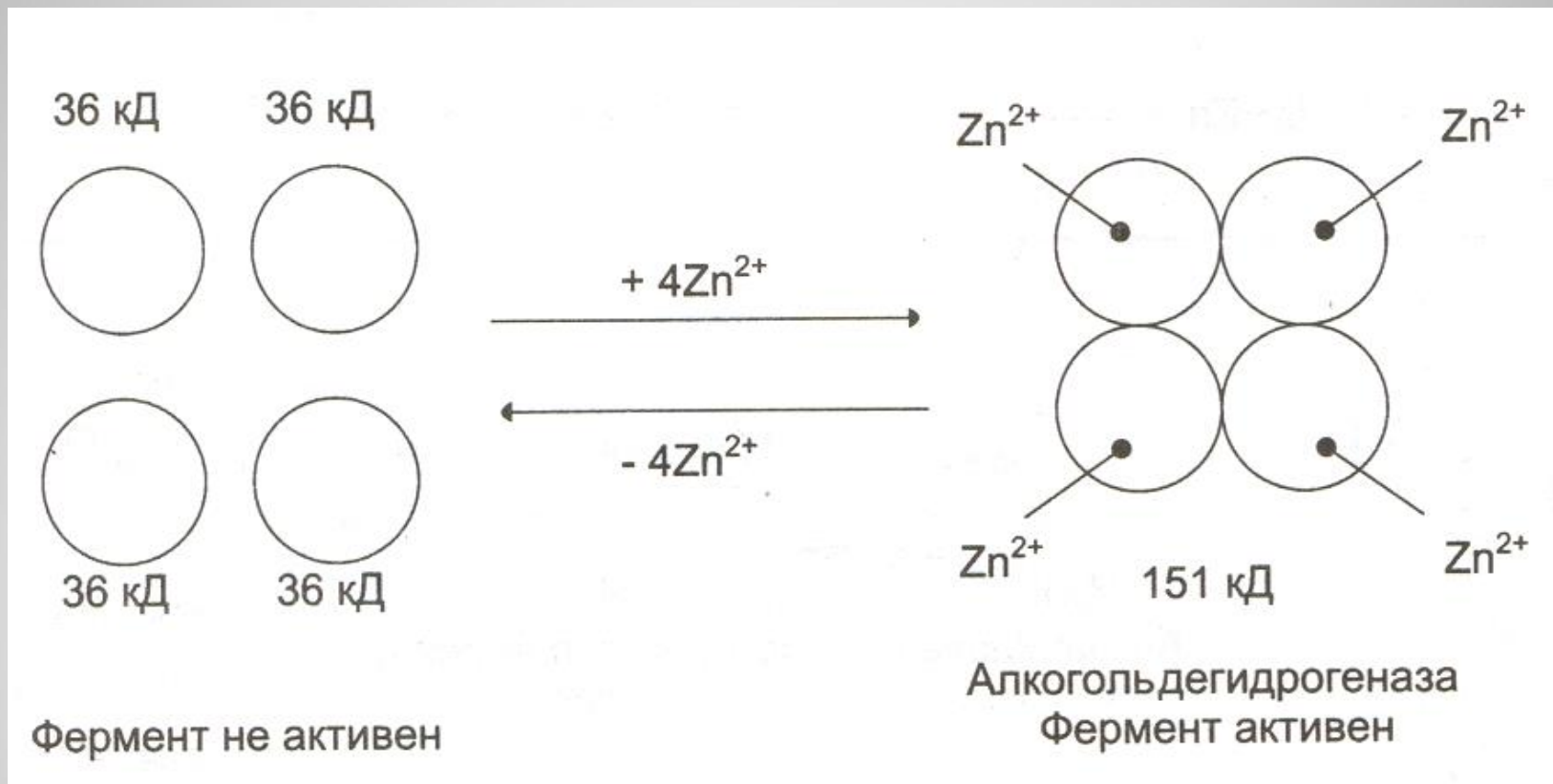


Комплекс Mg²⁺-АТФ

Рис. 14.2. Структура АТФ



Роль ионов цинка в стабилизации четвертичной структуры алкогольдегидрогеназы





Ингибиторлар

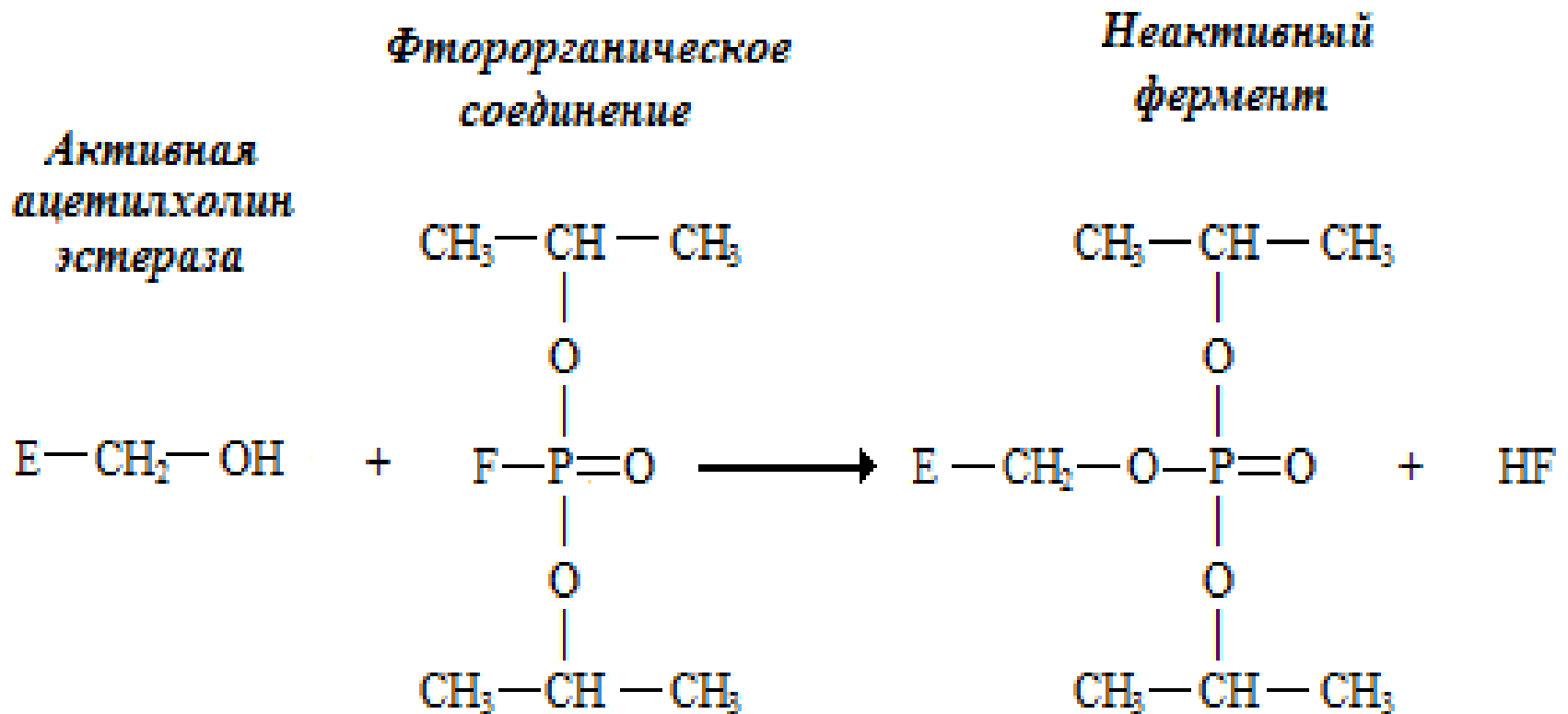
Ингибиторлар - фермент активтілігін тежейтін қосылыстар.





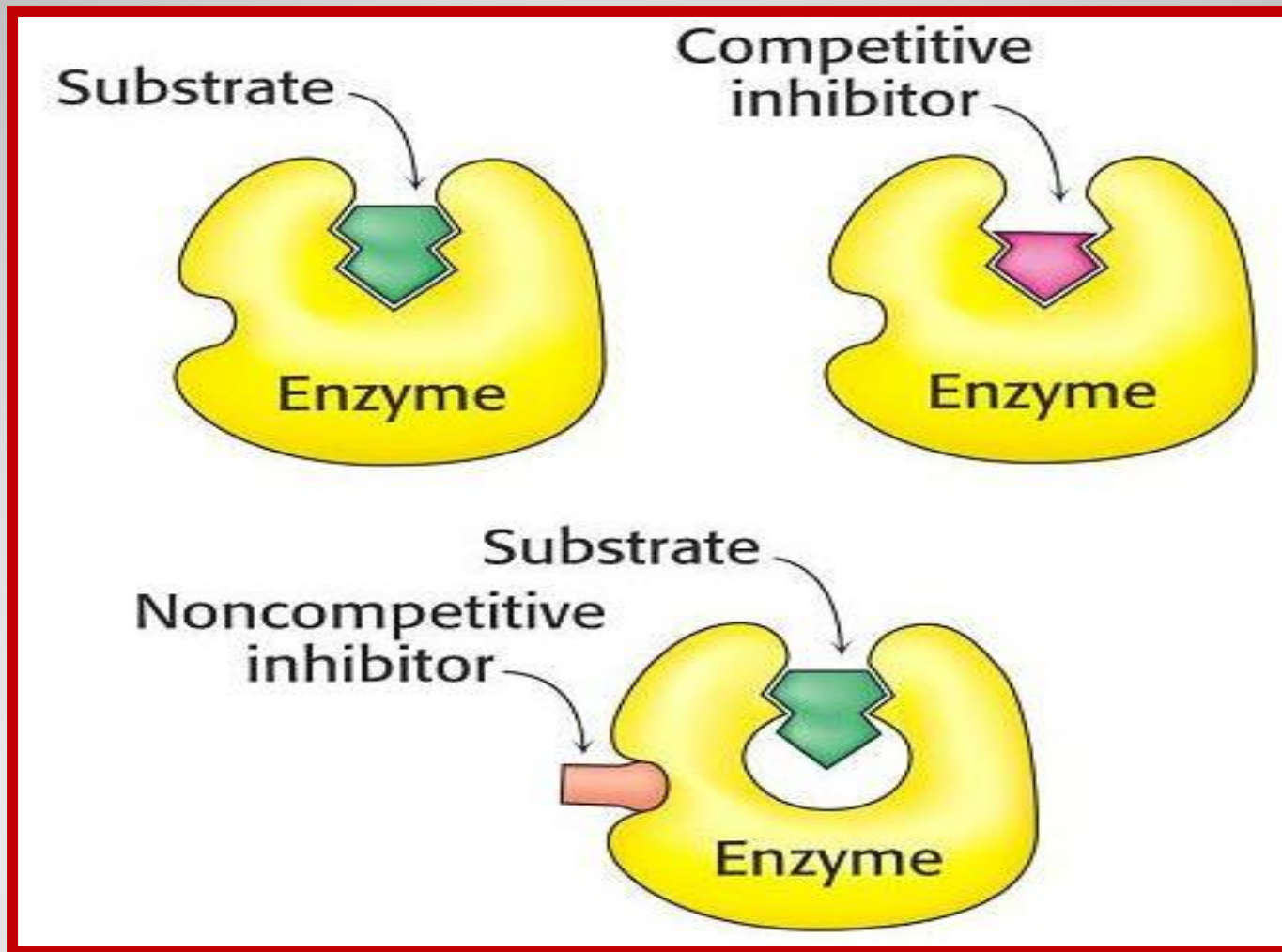
Ингибиторлар

Ацетилхолинэстеразаның Диизопропилфторфосфатпен қайтымсыз ингибирленуі





Бәсекелес және бәсекелес емес ингибиторлар





Ингибиторлар

Қайтымды бәсекелес емес ингибирлеу

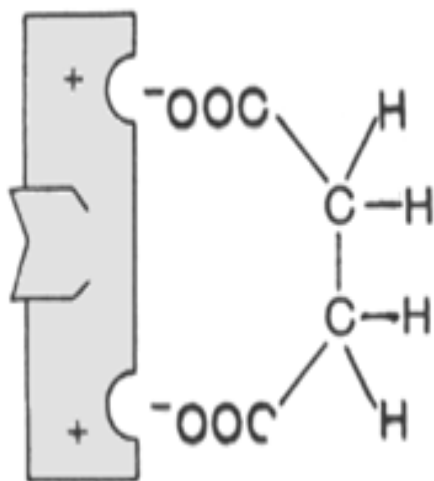




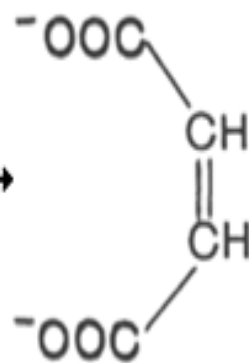
Ингибиторлар

Сукцинатдегидрогеназаның қайтымды бәсекелес ингибируленуі

Сукцинат-
дегидрогеназа

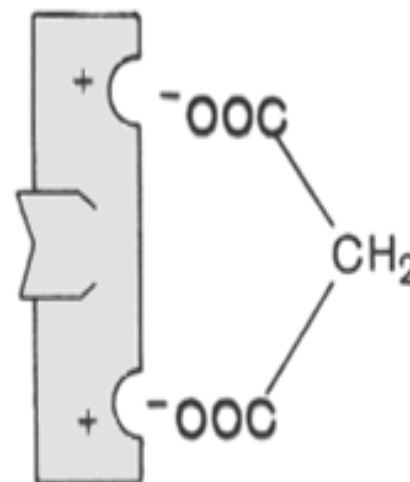


Сукцинат



Фумарат

Сукцинат-
дегидрогеназа



Малонат

Реакция не идет



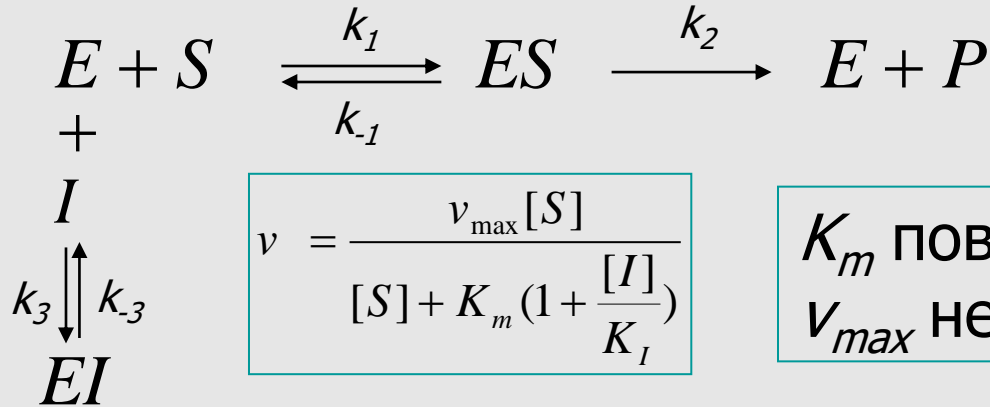


Ингибиторлардың Михаэлис-Ментен теңдеуіне әсері:

$$v = \frac{k_2 [E_t] [S]}{[S] + K_m}$$

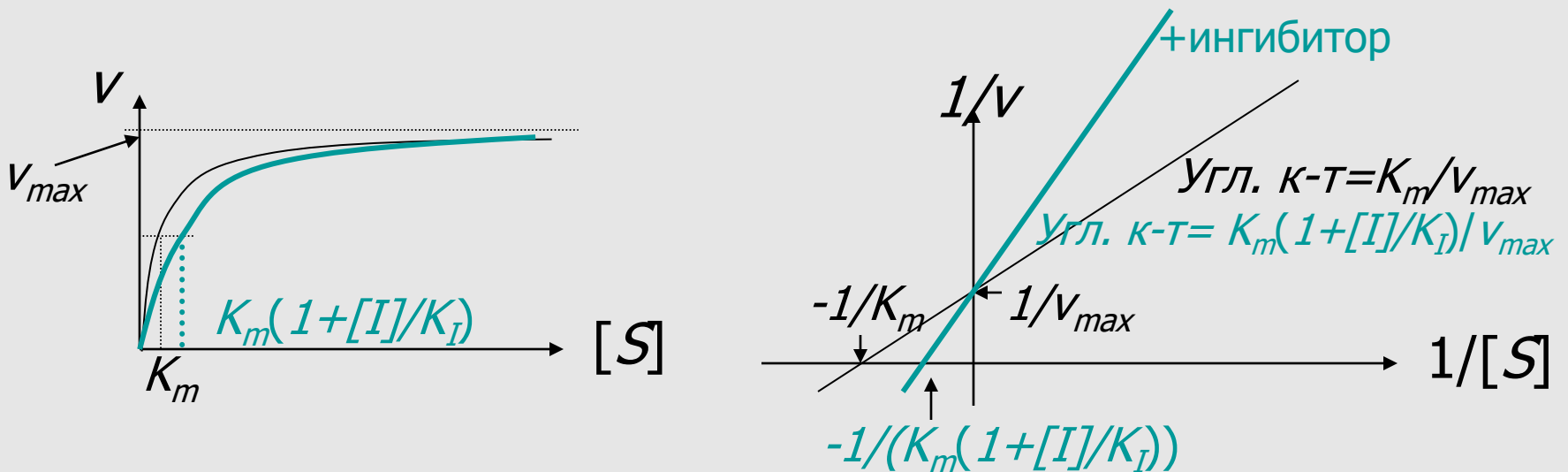


Бәсекелес қайтымды ингибиторлар тек ферментпен байланысады



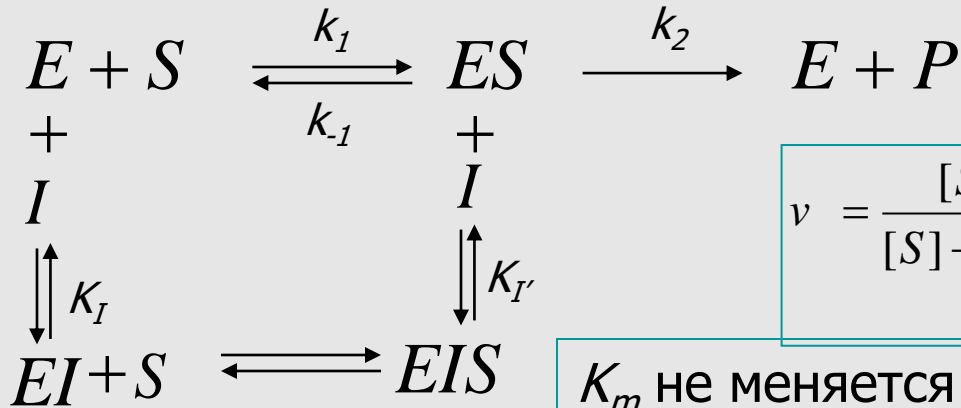
$$v = \frac{v_{max} [S]}{[S] + K_m (1 + \frac{[I]}{K_I})}$$

K_m **повышается**
 V_{max} **не меняется**



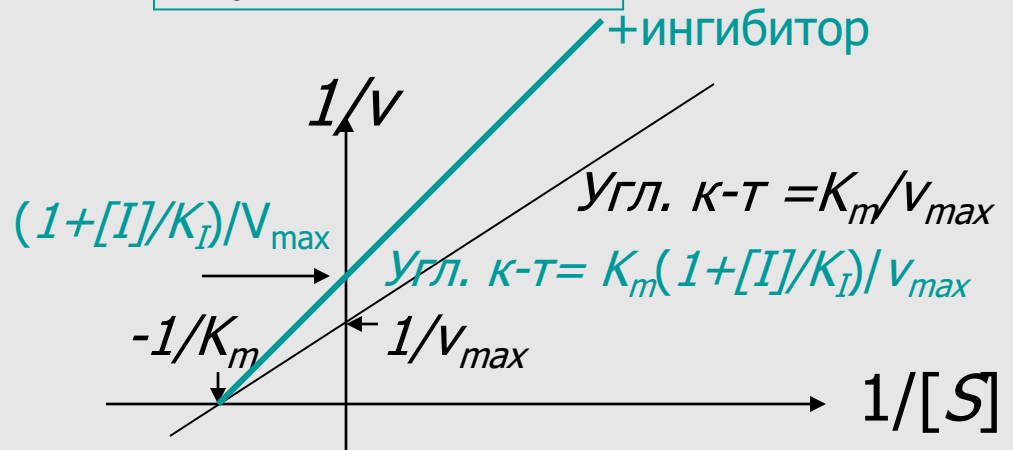
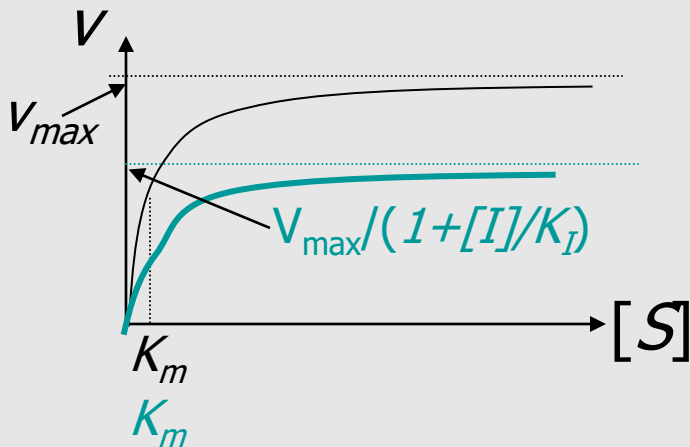


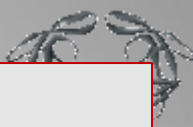
Бәсекелес емес қайтымды ингибиторлар Е және ES-пен байланысады



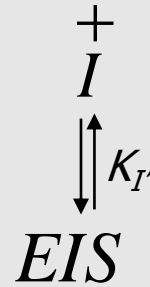
$$v = \frac{[S]}{[S] + K_m} \cdot \frac{v_{max}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}$$

K_m не меняется
 v_{max} уменьшается



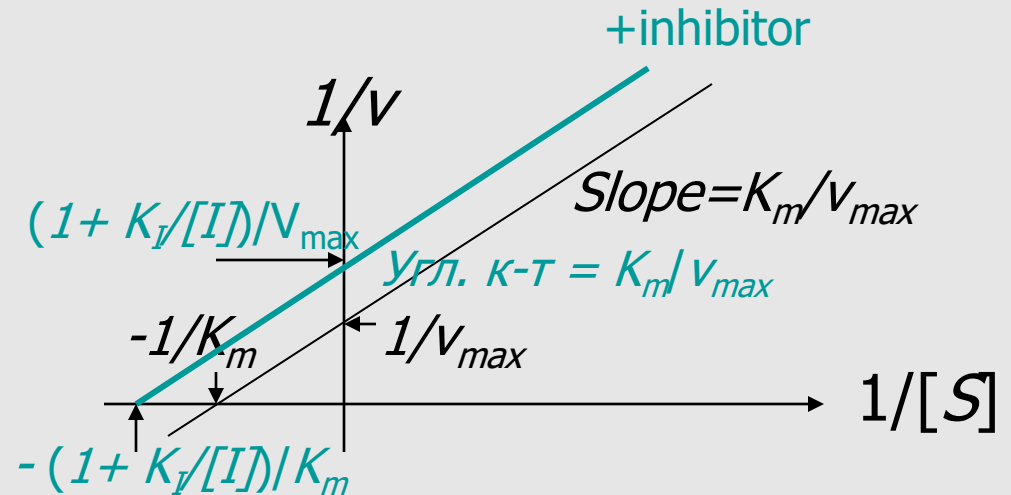
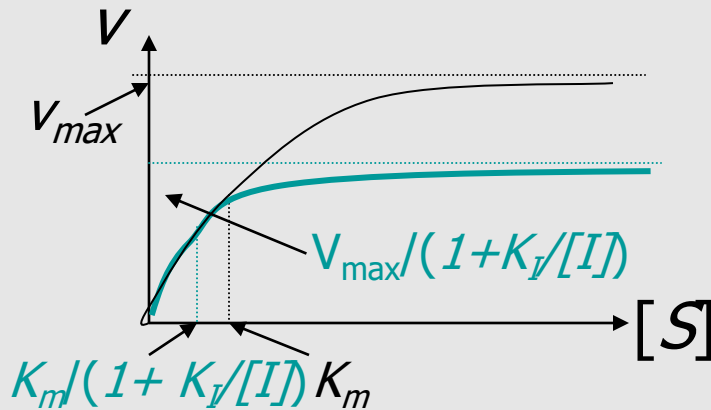


Бәсекелессіз қайтымды ингибиторлар тек ES-пен байланысады



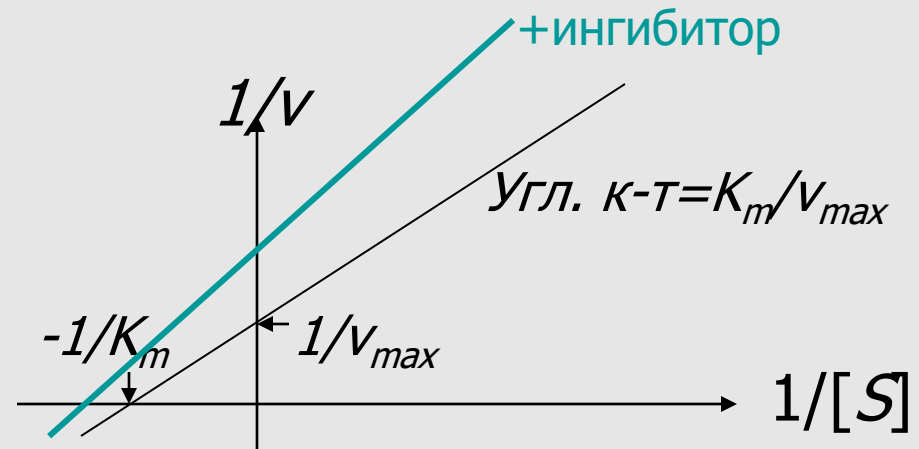
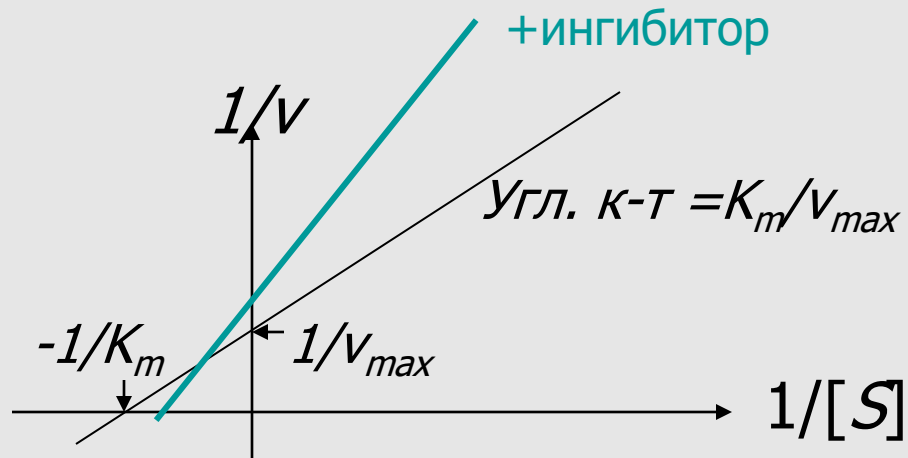
K_m уменьшается
 V_{max} уменьшается
 K_m/V_{max} не изм

$$v = \frac{[S]}{[S] + \frac{K_m}{(1 + \frac{K_I}{[I]})}} \cdot \frac{v_{max}}{(1 + \frac{K_I}{[I]})}$$





Аралас типті ингибирлеу





Ферменттердің активтілігінің реттелуі

Фермент молекуласының каталитикалық белсенділігінің өзгеруі.

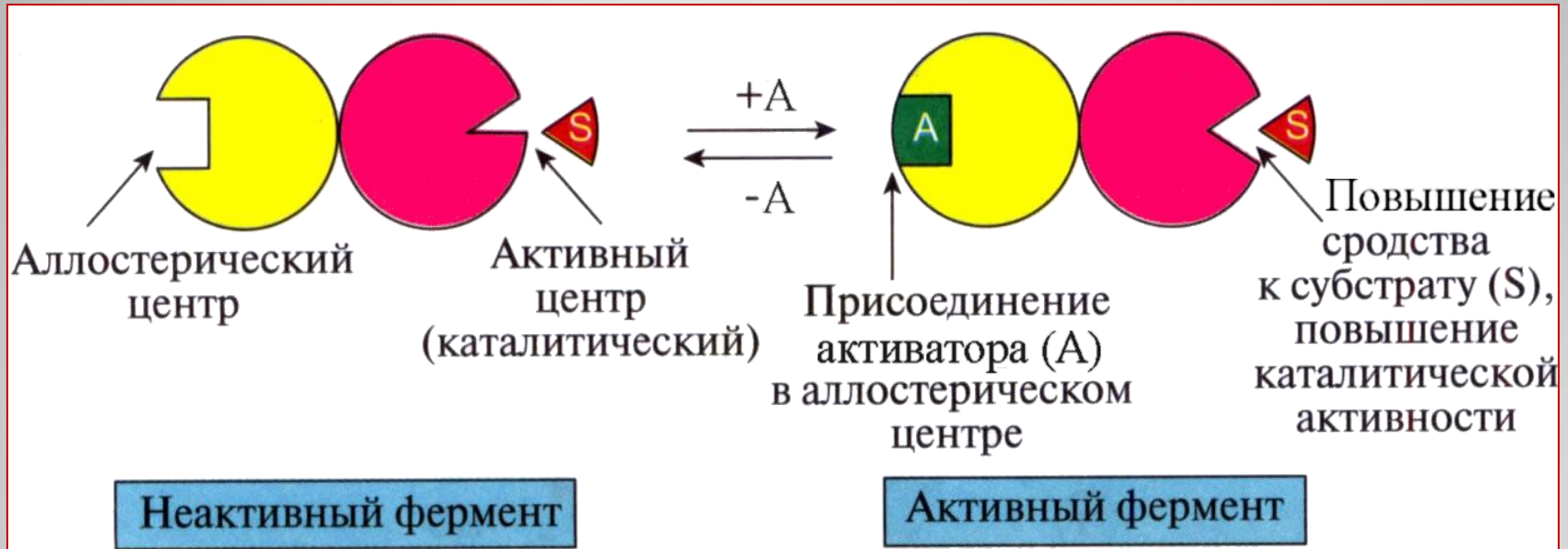
Негізгі түрлері:

- аллостериялық реттелу;
- коваленттік (химиялық) модификация;
- жартылай (ограниченный) протеолиз.



Ферменттердің активтілігінің реттелуі

Аллостериялық реттелу: активация

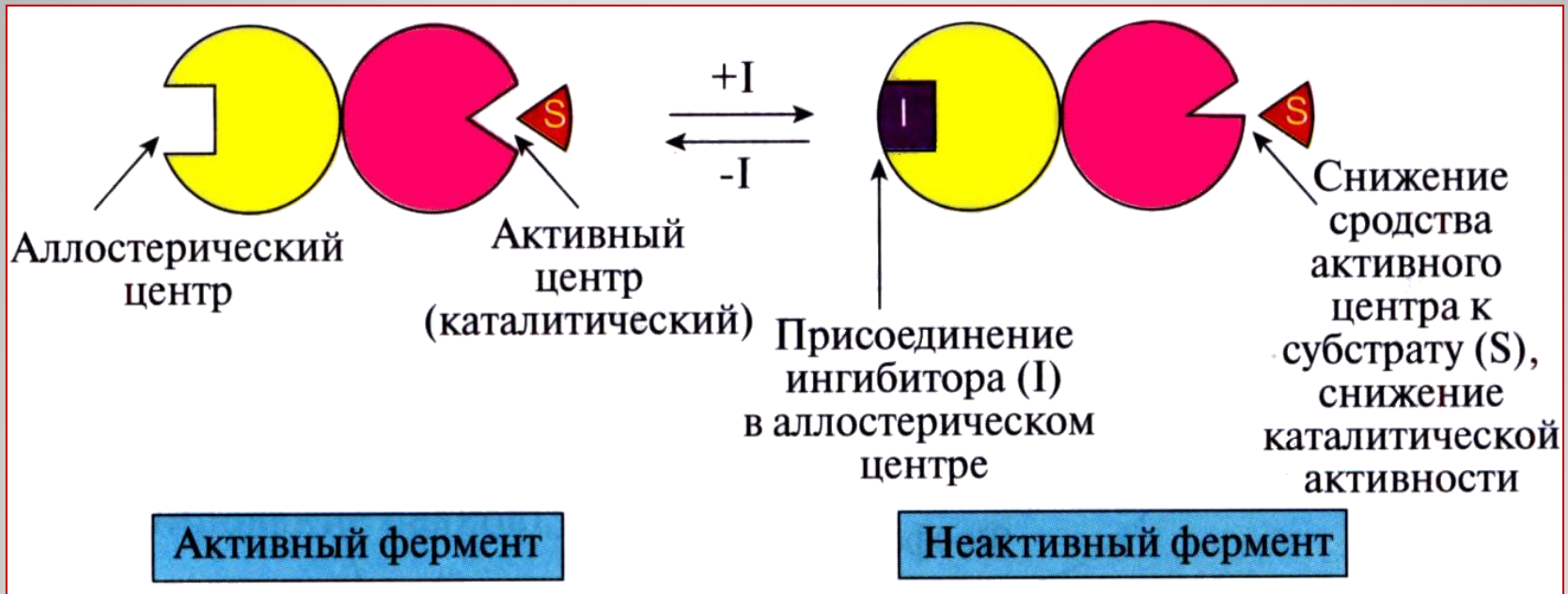


Аллостерические активаторы изменяют конформацию фермента и повышают сродство активного центра к субстрату (повышают активность).

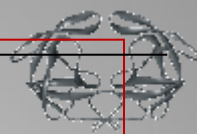


Ферменттердің активтілігінің реттелуі

Аллостериялық реттелу: ингибирлеу

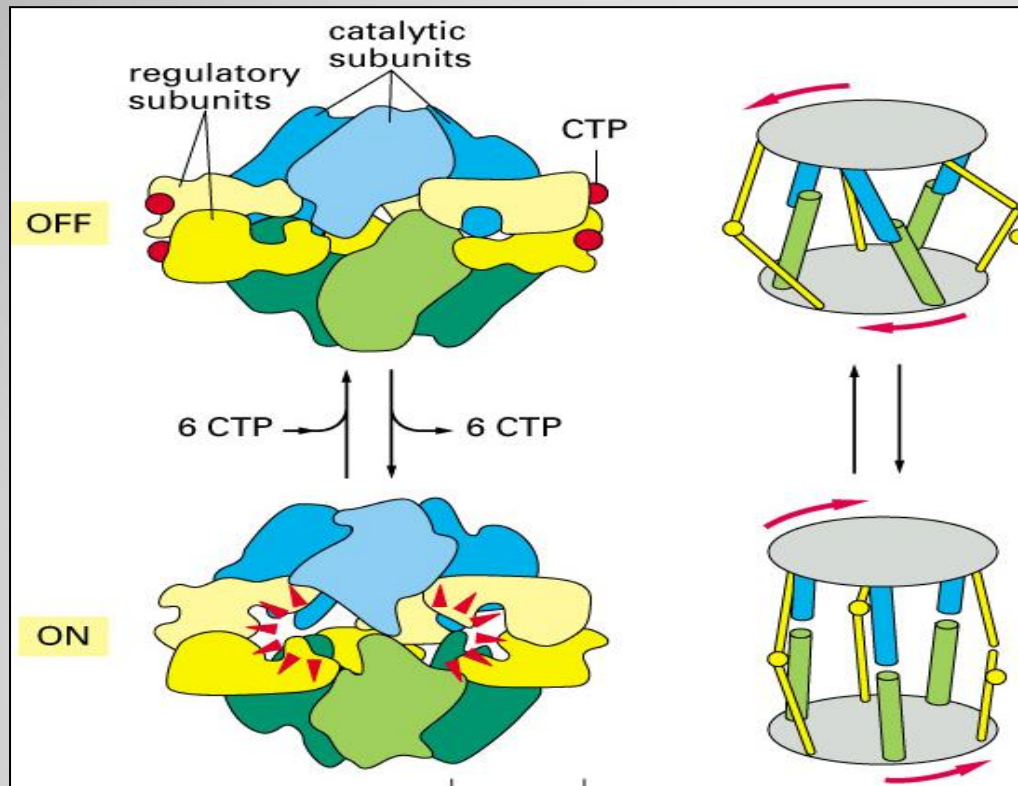


Аллостерические ингибиторы изменяют конформацию фермента и понижают сродство активного центра к субстрату (снижают активность).



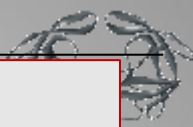
Ферменттердің активтілігінің реттелуі

Аллостерический контроль активности ферментов



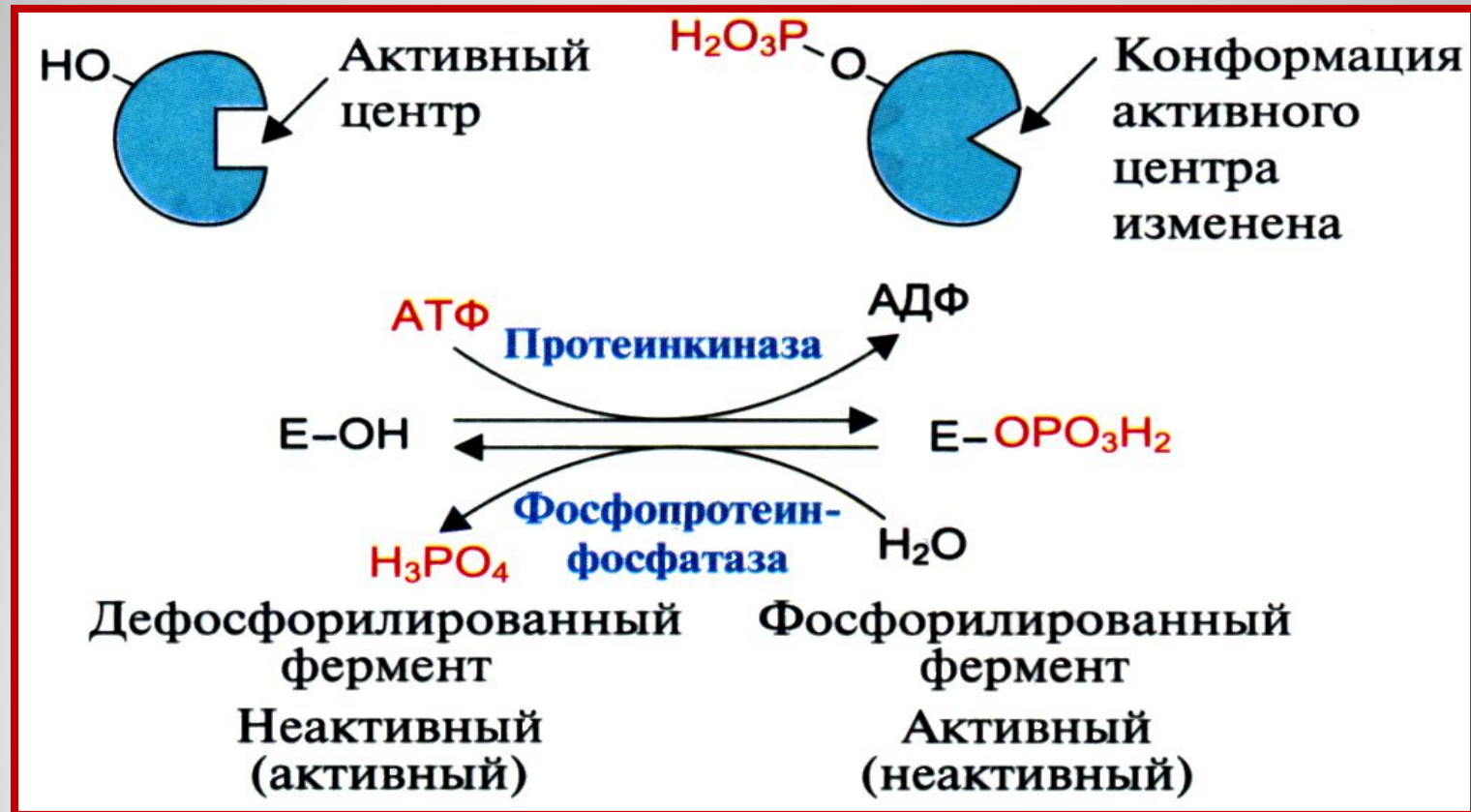
Фермент состоит из 12 субъединиц. 6 каталитических субъединиц и 6 – регуляторных. **GTP** – аллостерический ингибитор, **ATP** – аллостерический активатор.

Аспартаткарбамоилтрансфераза



Ферменттердің активтілігінің реттелуі

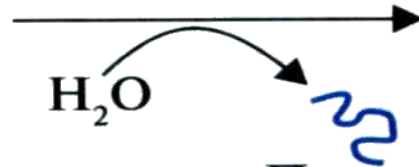
Ковалентті модификация (фосфорилирование - дефосфорилирование)





Ферменттердің активтілігінің реттелуі

Жартылай протеолиз жолымен реттелу



Пепсиноген (неактивный)

М.В. 42000

Пептид

Пепсин (активный)

М.В. 35000

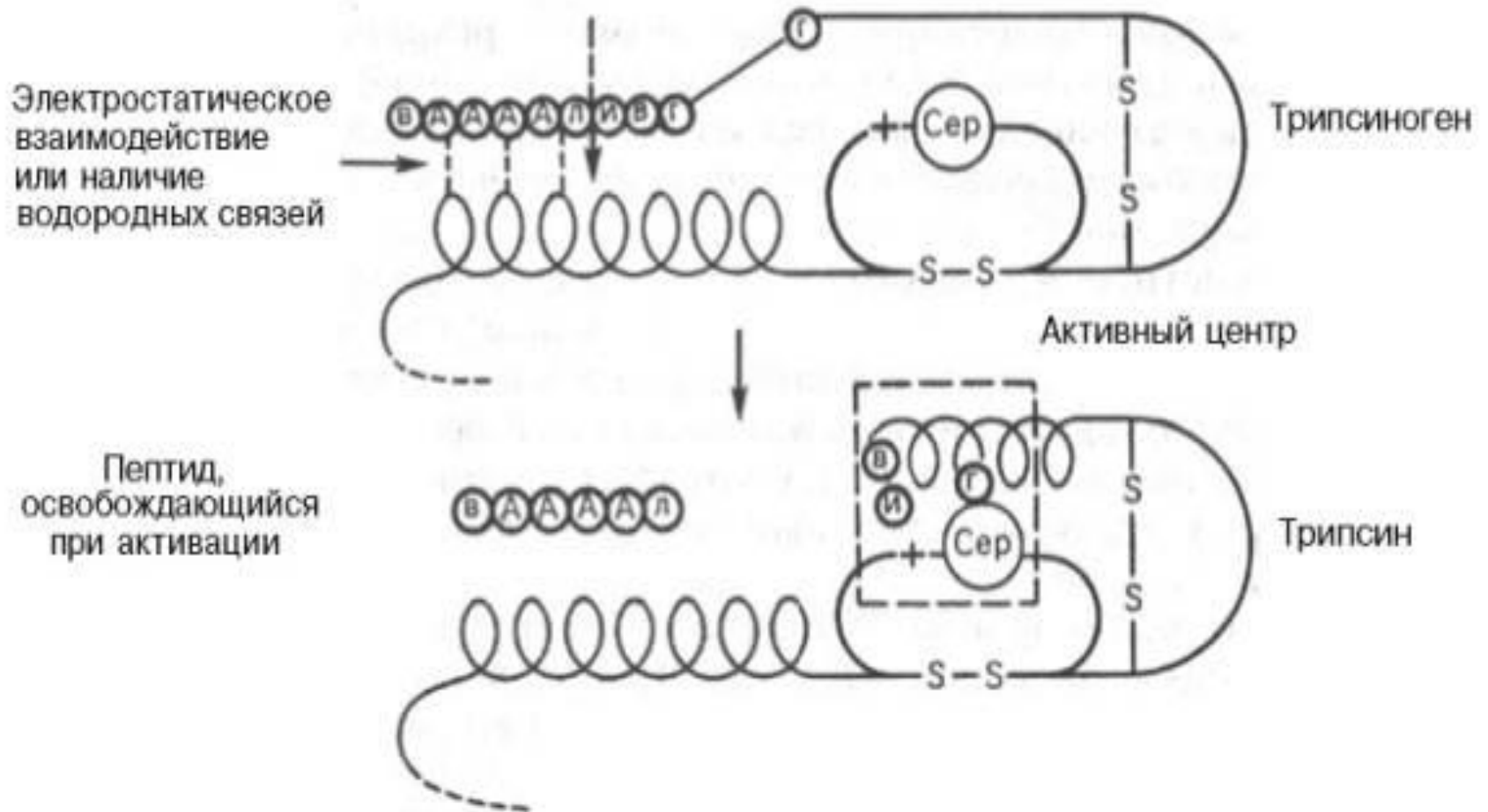
Проферменттер - ферменттердің белсенді емес алғы заттары.

Проферменттердің жартылай протеолизі - гидролиз нәтижесінде молекуладан бір немесе бірнеше пептидтік байланыстармен байланысқан фрагменттің бөлінуі.

Молекуланың қалған бөлігінің конформациясының өзгеруі оның қайта реттелуіне және белсенді орталықтың пайда болуына себеп болады.

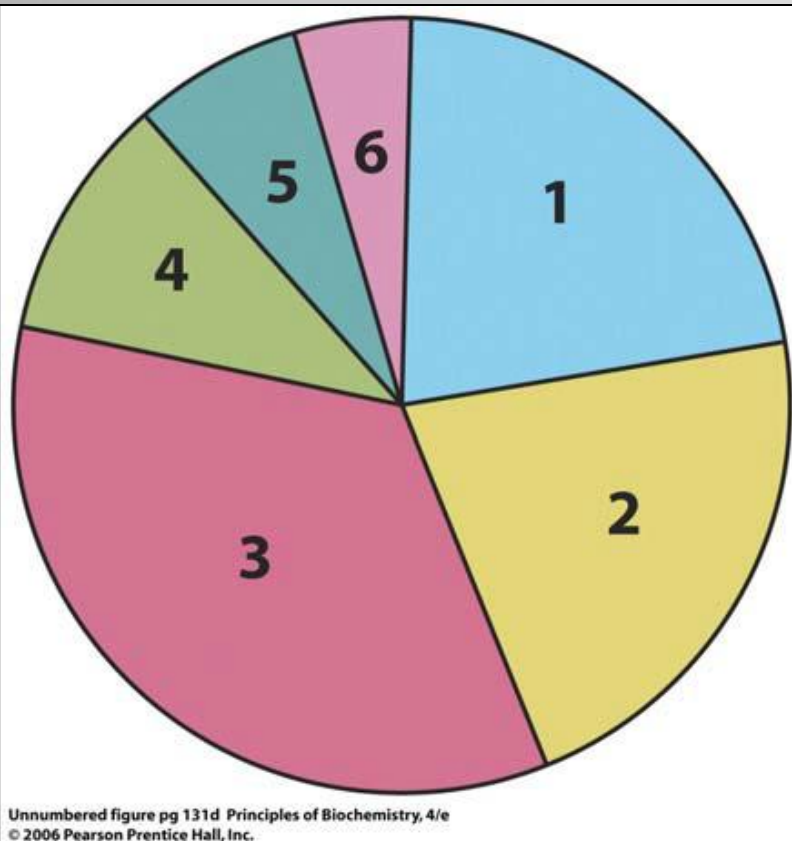


Бұқа трипсиногенінің активация механизмі





Ферменттер класстары:



1. Оксидоредуктазалар
2. Трансферазалар
3. Гидролазалар
4. Лиазалар
5. Изомеразалар
6. Лигазалар
(синтетазалар)



Халықаралық классификациясы және ферменттердің номенклатурасы

6 класс фермент (катализдейтін реакциясы бойынша);

әр класста - бірнеше подкласс;

Әр подкласста – бірнеше подподкласс;

әр подподкласста – индивидуалды ферменттер.



Номенклатура

Ферменттер класстары:

Систематикалық аты	L- малат: NAD⁺ оксидоредуктаза
Жұмыс аты	малатдегидрогеназа
Класс	1. Оксидоредуктазы
Подкласс	1.1. Действуют на СНОН-группу донора
Подподкласс	1.1.1. NAD⁺ в качестве ацептора
Классификационный номер (шифр)	КФ (Комиссия по ферментам) 1.1.1.37
Кофактор	NAD⁺