



## **АДАМ БИОХИМИЯСЫ**

**Лекция № 6. Ферменттік реакциялардың механизмдері мен кинетикасы. Михаэлис-Ментен константасы. Тежегіштер. Активаторлар, ингибиторлар.**



*автор фото: Петр Шаров*

**Химия ғылымдарының докторы, профессор  
Шоинбекова Сабина Алимжановна**

22.04.2022



***Химиялық кинетика*** — химиялық реакцияның механизмін, жүру барысында немесе уақыт аралығындағы құбылыстар заңдылықтарын, ***реакция жылдамдығының түрлі факторлардан (C,  $t^{\circ}\text{C}$ , 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.*

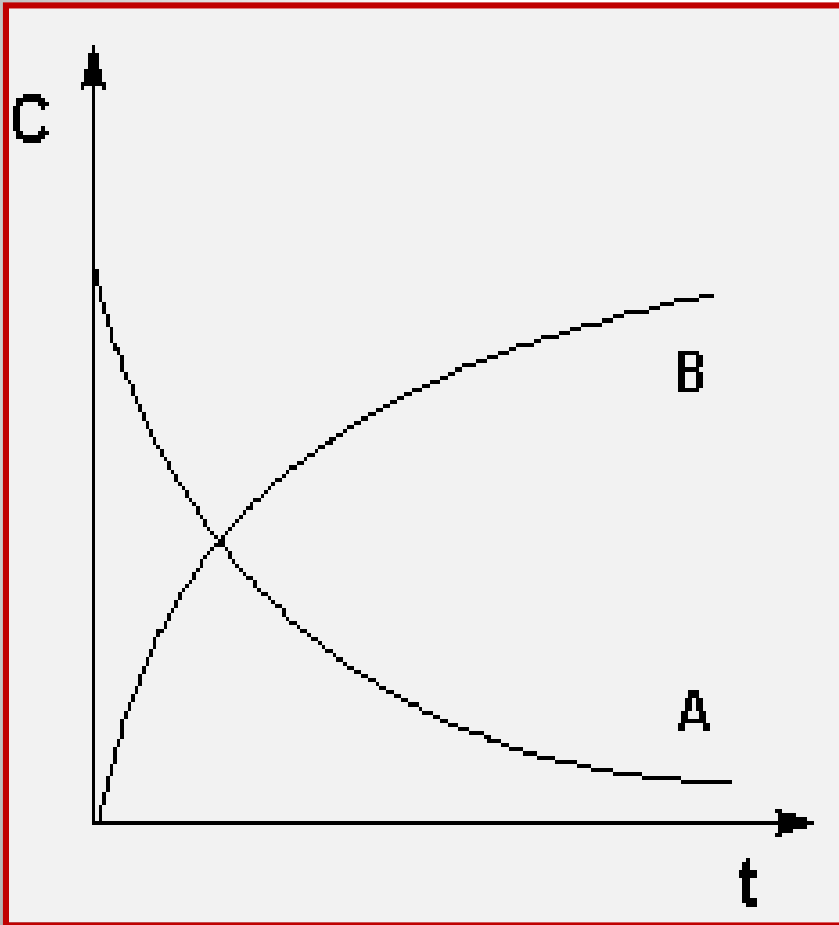
Ол – әрекеттесетін қосылыстардың концентрациясының бір уақыт бірлігінде өзгеруі.

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

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



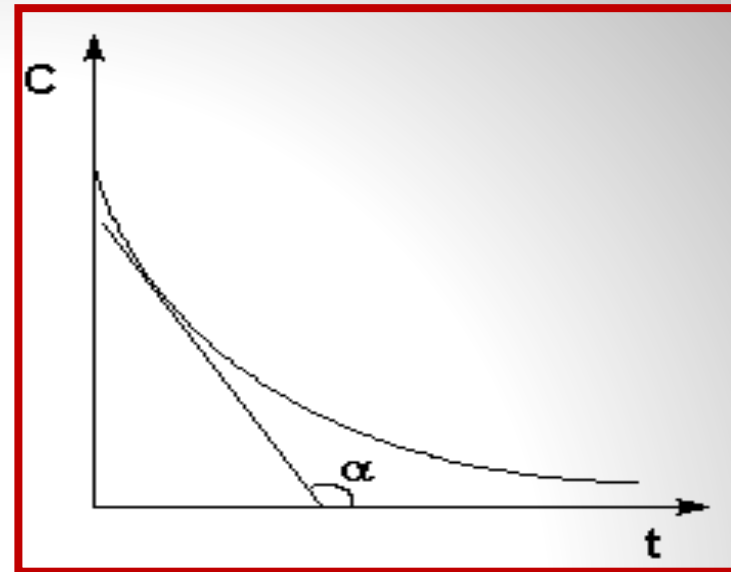
# Реакцияның бастапқы заттары, субстрат (А) және өнімдерінің (В) кинетикалық қисықтары



$$w_{уст} = \pm \frac{dC}{dt}$$



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



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

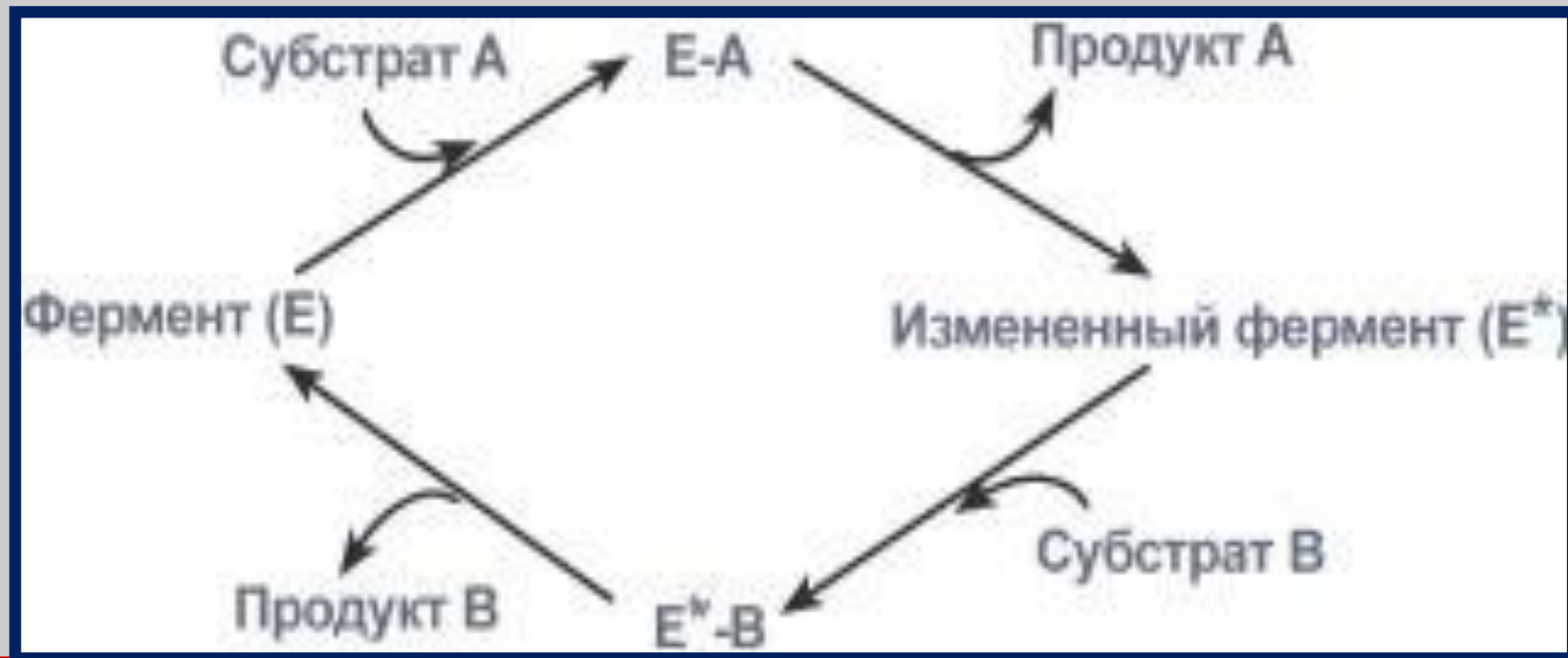
Егер, стехиометриялық коэффициенттер бірдей болмаса, реакция жылдамдығы анықталатын реагенттің концентрациясымен анықталады. Мысалы,  
 $2H_2 + O_2 \rightarrow 2H_2O$   
 сутек, оттегі, судың концентрациялары әртүрлі өзгереді. Реакция жылдамдығы әрекеттесетін қосылыстардың табиғатына, концентрациясына,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

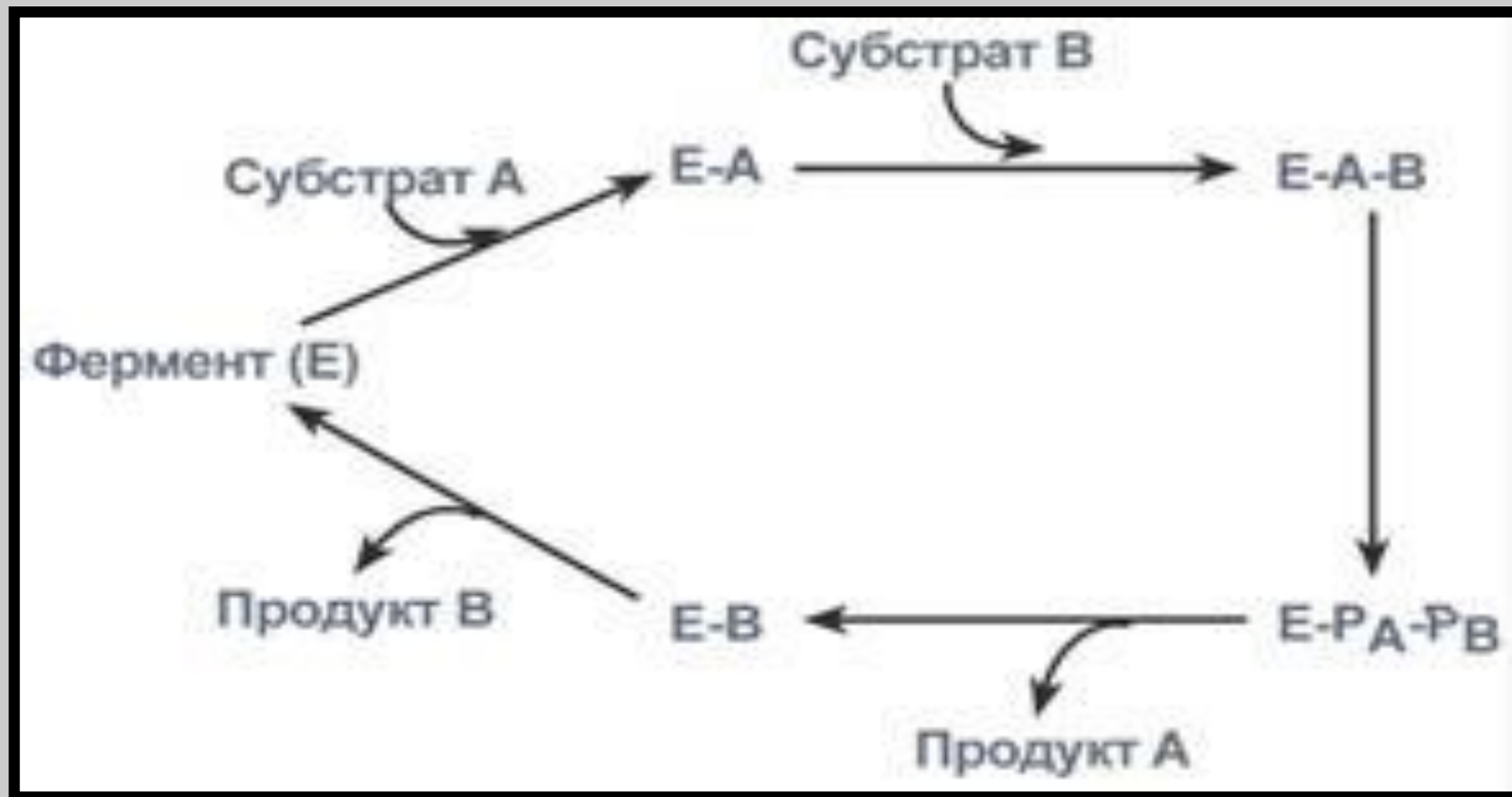
Мысалы, амин топтарын кетоқышқылдарға тасымалдау (Трансаминдеу).







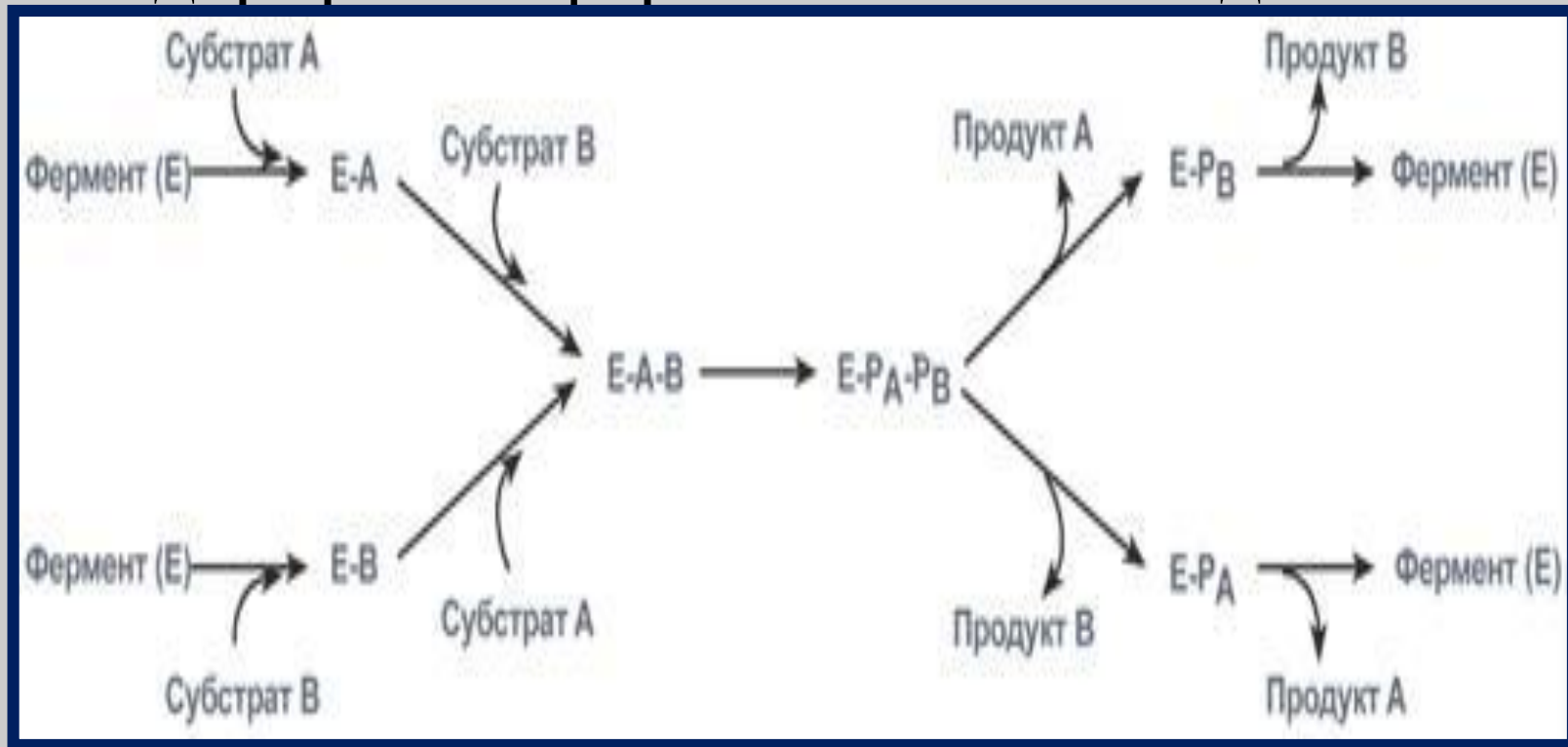
2. «Ретті реакциялар» типі – ферментке ретпен А және В субстраттары қосылады, "тройной комплекс", түзіліп, катализ жүреді. Реакция өнімдері кезекпен бөлінеді.







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

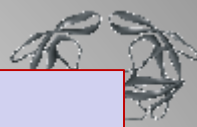
(a)



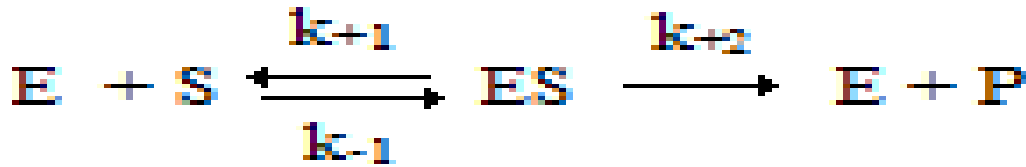
(b)



22.04.2022  
Берлин, 1912 г.



## Қарапайым ферменттік реакцияның схемасы:



Ферментативті реакция 2 сатылы жүреді:

1. Фермент және субстрат фермент-субстратты комплекс (ES) түзеді; *ол тез және қайтымды этап, бірақ химиялық өзгерістер болмайды*; ES комплекстың түзілуінің константасы мен оның ыдырауының константасы, сәйкесінше  $k_{+1}$  және  $k_{-1}$ . ES комплекстың түзілуінде ковалентті емес әрекеттесу жүреді.
2. Каталитикалық процесс 2 сатысында жүреді, оның константасы  $k_{+2}$  ( $k_{cat}$ , ферменттің айналу саны). ES комплекс өнім P мен регенерацияланған ферментке ыдырайды.



# Михаэлис-Ментен теңдеуі

*Мағынасы не? — Ферментативті реакцияның жылдамдығы туралы мәлімет алу*



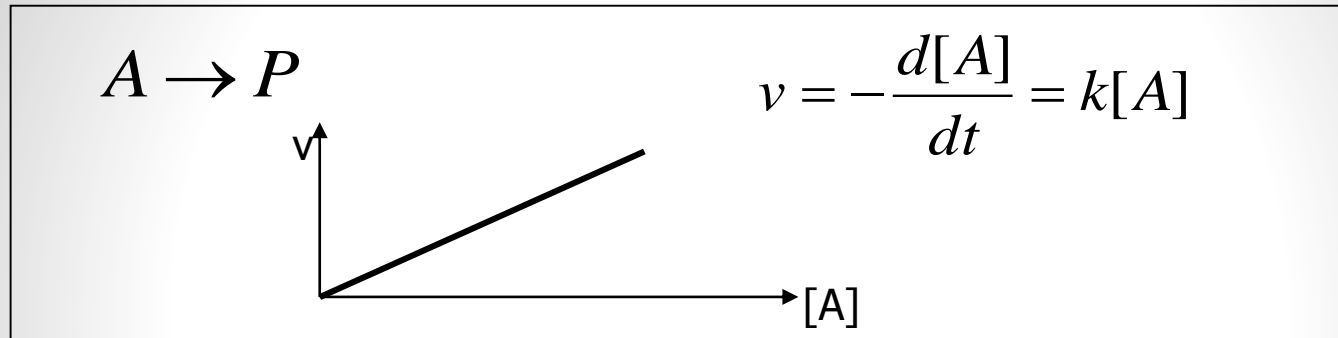
- Ферментпен (E) катализденетін субстраттың (S) өнімге (P) айналу реакциясының кестесі;
- **Михаэлис-Ментен теңдеуі – реакцияның жылдамдығының субстраттың концентрациясынан тәуелділігін көрсетеді.**
- **Михаэлис-Ментен теңдеуінің жұмыс істейтін жағдайлары:**

- 1) Реакцияның стационарлы фазасы, яғни,  $[ES]=\text{const}$ ,  $d[ES]/dt=0$ ;
- 2) Бастапқы реакцияның жылдамдығы өлшенеді;  $[S] \approx [S_0]$
- 3)  $[E] = [E_0] - [ES]$

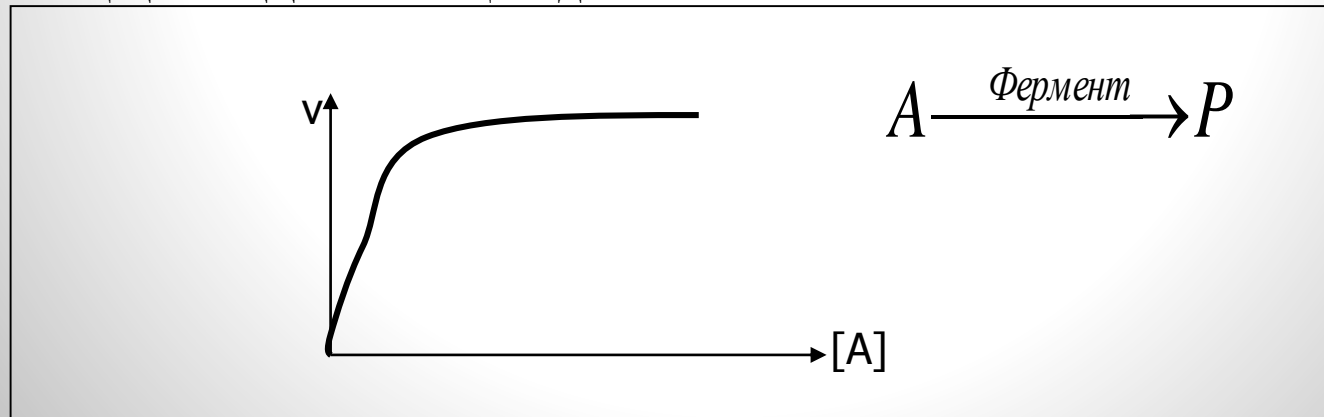


# Ферментативті кинетика

- 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 E 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:

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

# Кинетика ферментативных реакций

---

Модель Михаэлиса-Ментон

*Уравнение Михаэлиса-Ментен*

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

где  $v_0$  начальная скорость при концентрации субстрата  $[S]$ ,  $V_{\max}$  – максимальная скорость и  $K_M$  – константа Михаэлиса-Ментен для данного фермента, соответствующая определенному субстрату





## ***УРАВНЕНИЕ***

### ***МИХАЭЛИСА-МЕНТЕНА***

$$V_{ст} = \frac{V_{max} \times [S]}{k_M + [S]}$$

**$V_{max}$**  – максимальная скорость реакции в условиях насыщения фермента;

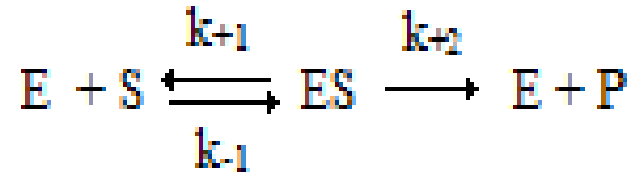
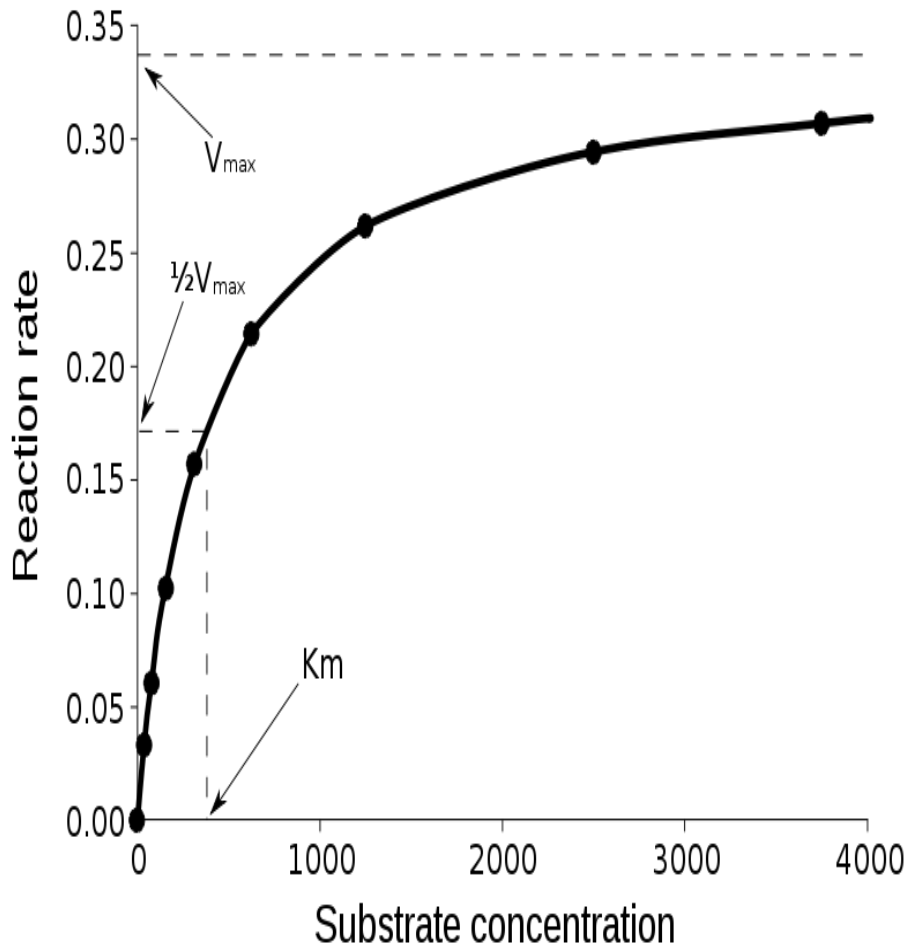
**$k_M$**  – константа Михаэлиса, имеющая размерность концентрации;

**$[S]$**  – концентрация субстрата



# 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:



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

Диссоциация константасы:

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

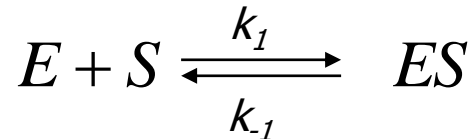
$K_m$  – реакция жылдамдығы максималды жылдамдықтың  $v = 1/2 v_{max}$  жартысына тең болатын субстрат концентрациясы.





## $V_{max}$ 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 <sup>-1</sup> )
Каталаза	40 000 000
Ацетилхолинэстераза	14 000
Лактат-дегидрогеназа	1 000
Химотрипсин	100
ДНК-полимераза I	15
Лизоцим	0,5



## *Михаэлис-Ментен теңдеуі*

**К<sub>м</sub> және V<sub>max</sub> - ферменттердің аса маңызды сипаттамалары:**

**К<sub>м</sub> – Михаэлис константасы - бұл ферментативті реакция жылдамдығы максималды жылдамдықтың жартысына тең болатын субстрат концентрациясы.**

*К<sub>м</sub> – ферменттің субстратқа туыстығын (сәйкестігін) көрсетеді.*

**К- төмен болса, ферменттің субстратқа туыстығы артады, реакция жылдамдығы жоғары; ал К<sub>м</sub> – үлкен болса, ферменттің субстратқа туыстығы төмен, реакция баяу жүреді.**



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

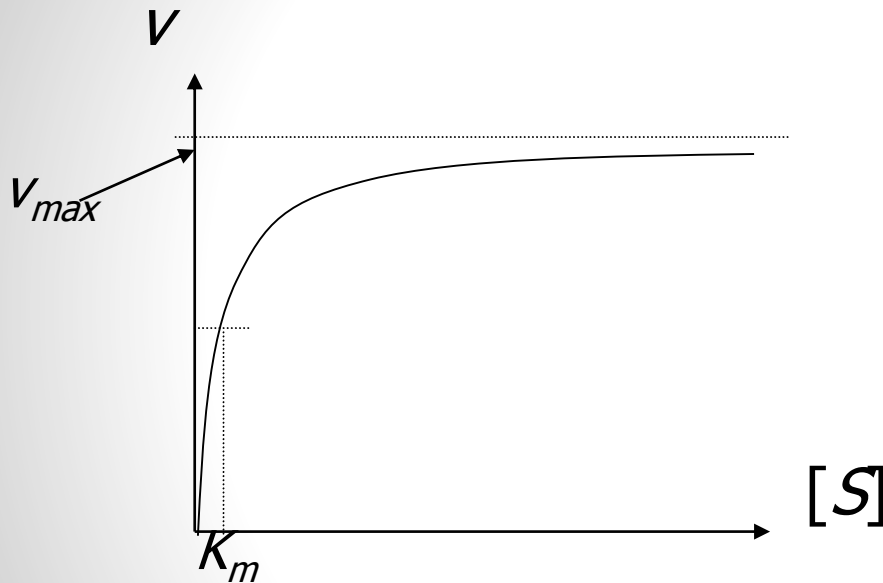
Көптеген ферментативті реакциялардың Км  $10^{-2} - 10^{-5}$  М аралығында болады.

$V_{\max}$  – 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 :



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

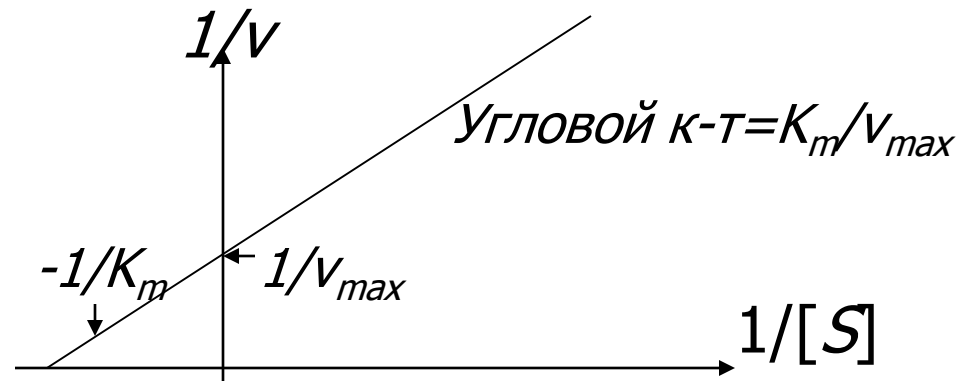
- Бірақ бұл нақты емес.



# Лайнуивер және Берк (Lineweaver-Burk) линеаризациясы

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

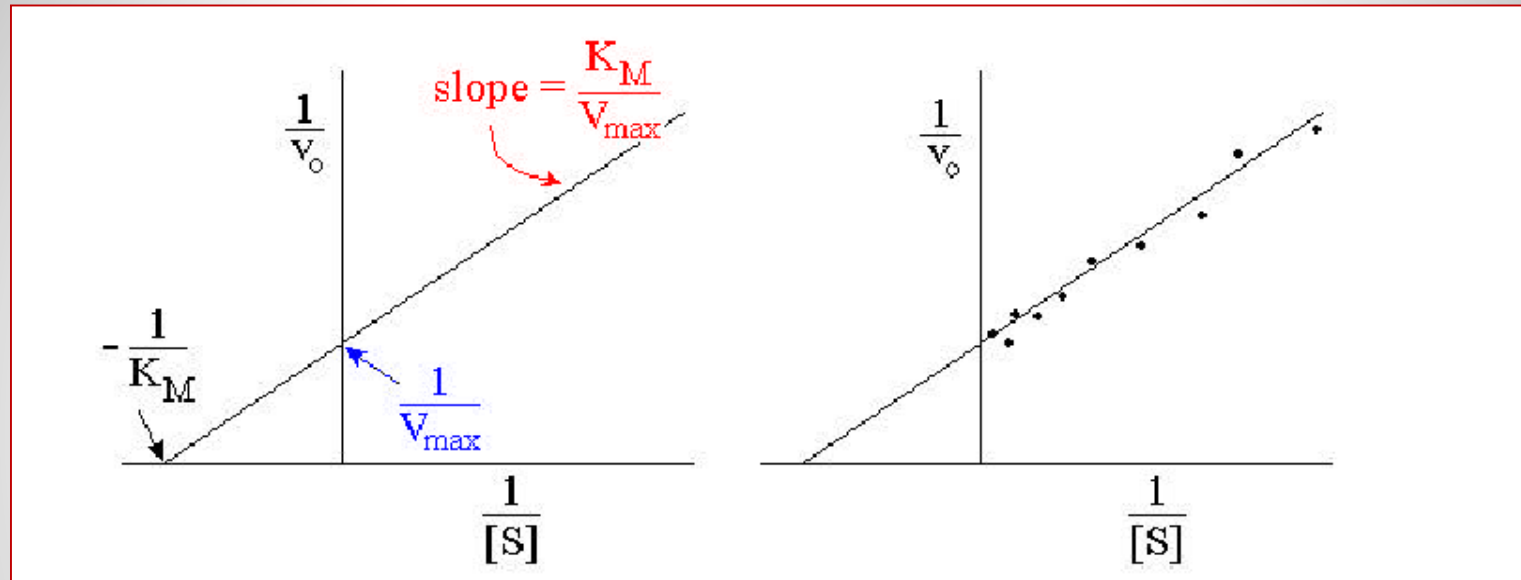
$$v = \frac{v_{\max} [S]}{[S] + K_m} \Rightarrow \frac{1}{v} = \frac{[S] + K_m}{v_{\max} [S]} = \frac{1}{v_{\max}} + \frac{K_m}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]}$$



•График в двойных обратных координатах



## Метод Лайнуивера-Берка (метод двойных обратных величин)



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

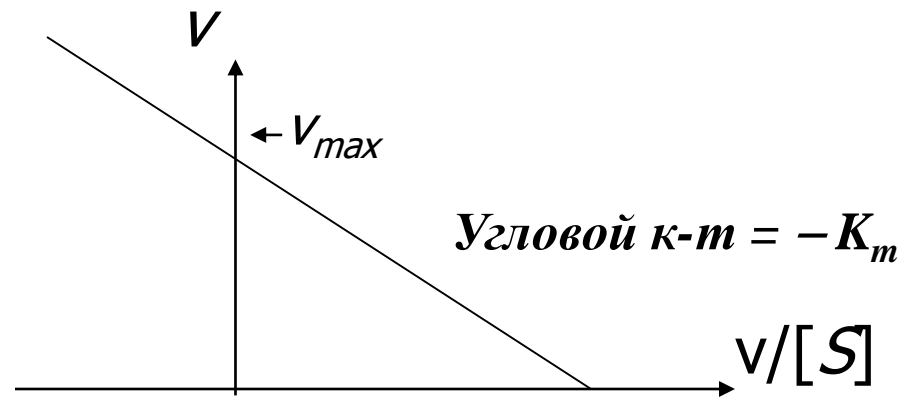
$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$





# Эди-Хофсти (Eadie-Hofstee) линеаризациясы:

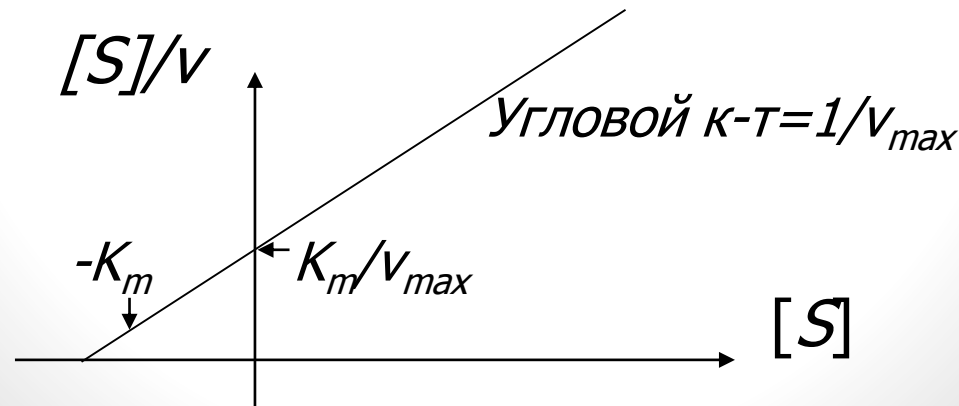
$$v = \frac{v_{\max}[S]}{[S] + K_m} \Rightarrow v([S] + K_m) = v_{\max}[S] \Rightarrow v[S] = v_{\max}[S] - K_m v \Rightarrow v = v_{\max} - \frac{K_m v}{[S]}$$





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

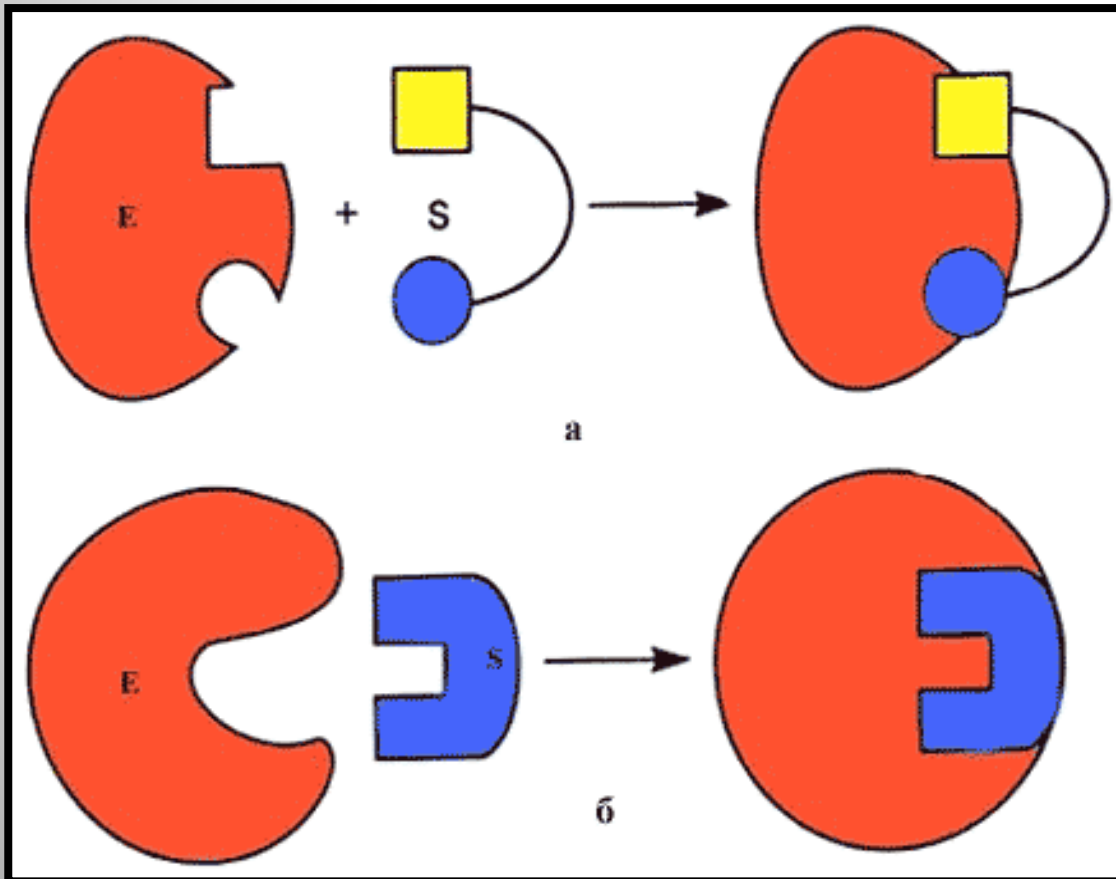
$$v = \frac{v_{\max} [S]}{[S] + K_m} \Rightarrow \frac{[S]}{v} = \frac{[S] + K_m}{v_{\max}} = \frac{[S]}{v_{\max}} + \frac{K_m}{v_{\max}}$$





## Специфичность ферментов

### Фермент пен субстрат әсері



А) Модель "жесткой матрицы" по Э. Фишеру

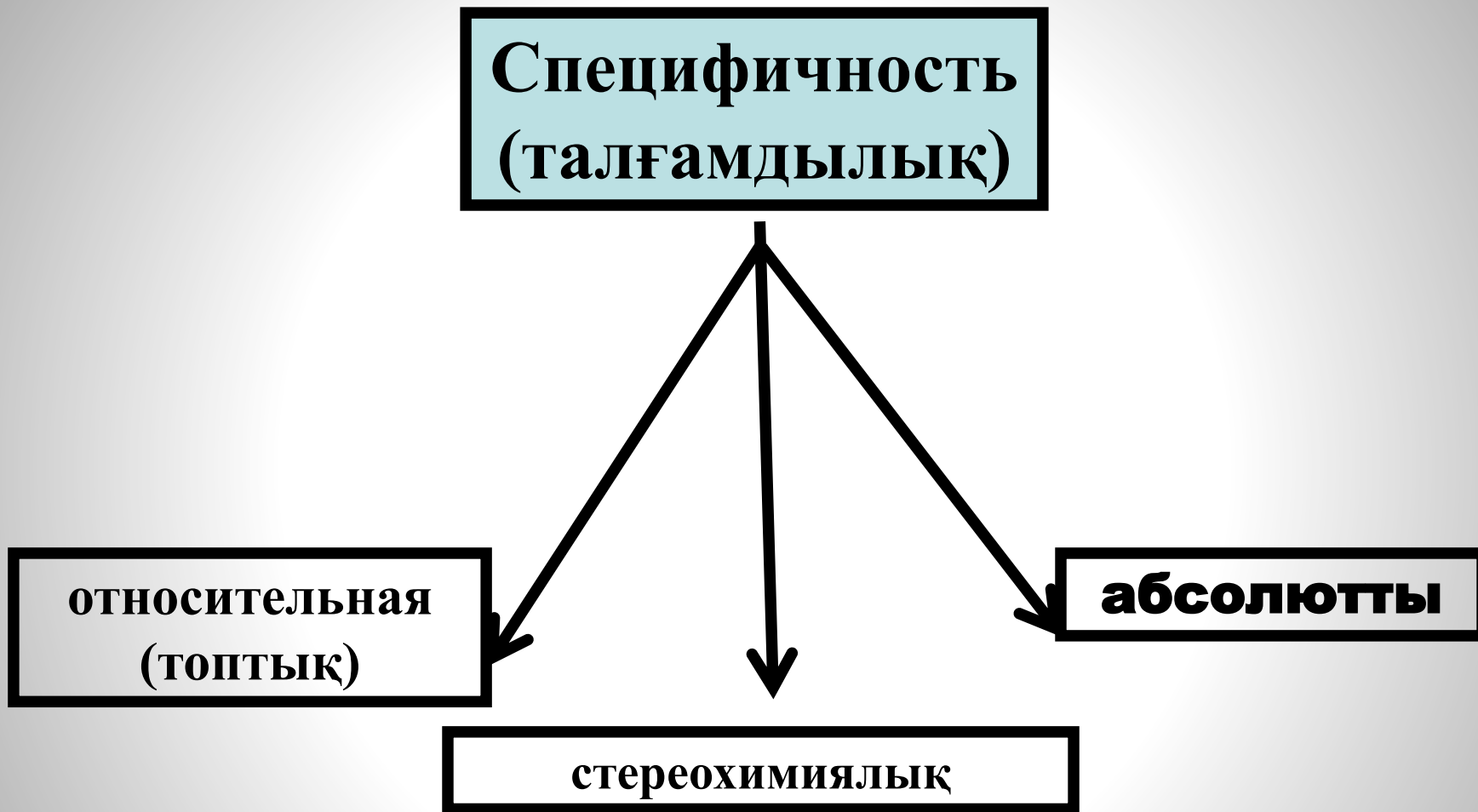
Б) Модель "перчатка - рука" по Д. Кошланду.

**Специфичность  
(талғамдылық)**

**относительная  
(топтық)**

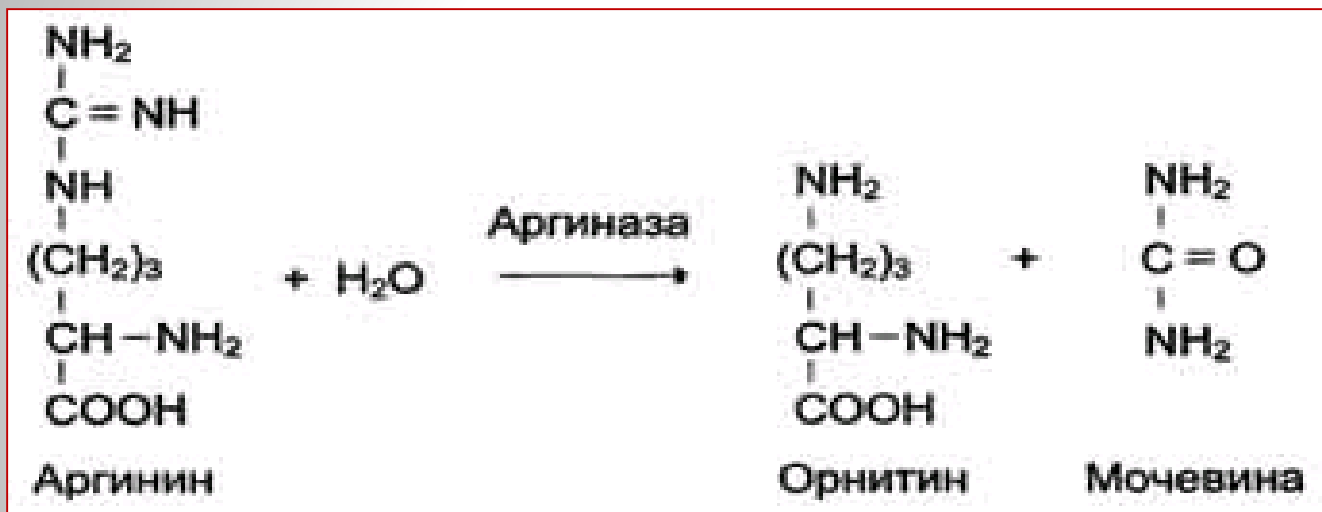
**абсолютты**

**стереохимиялық**





## Абсолютты талғамдылығы бар ферменттер:



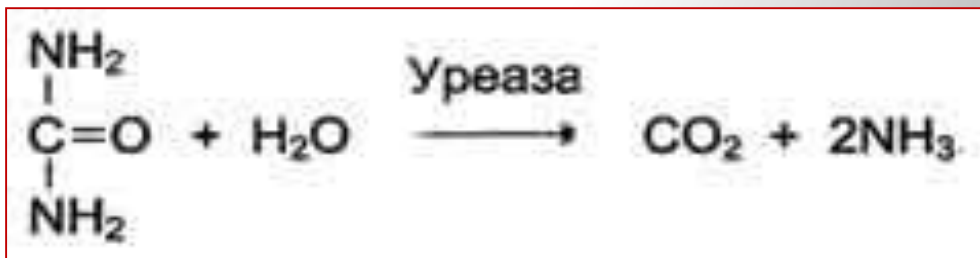
**Карбоангидраза**

**Лактаза**

**Сахараза**

**Мальтаза**

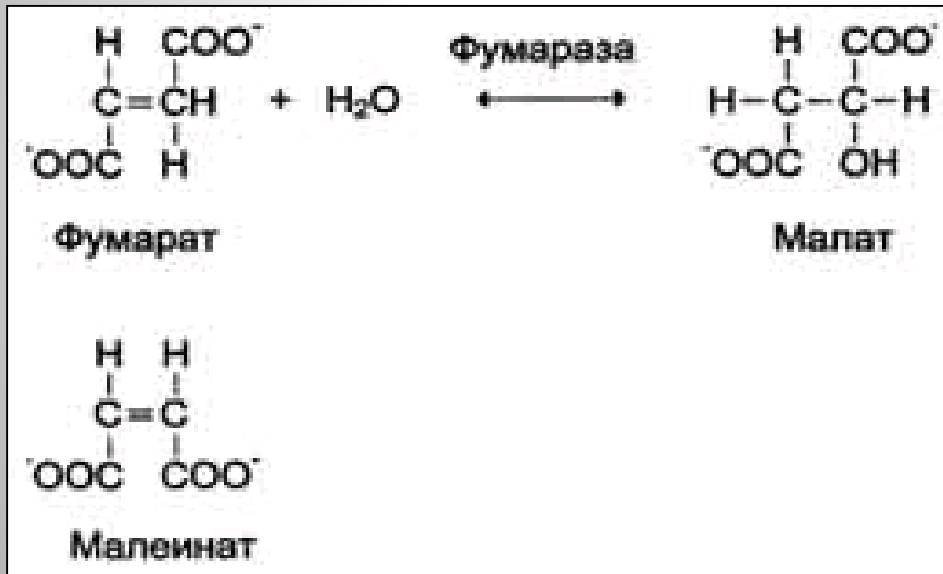
**Глюкокиназа**



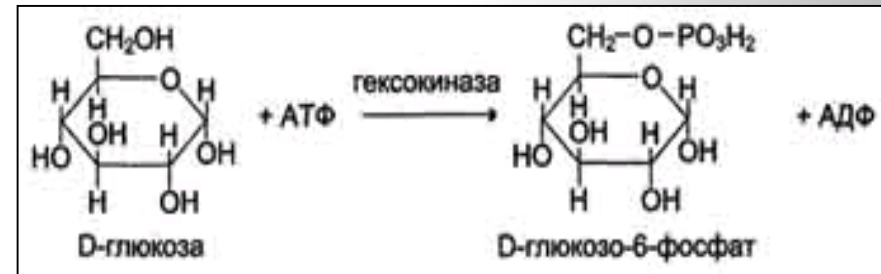


## Стереоталғамды ферменттер

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



**Стереоспецифичность к цис-транс изомерам**

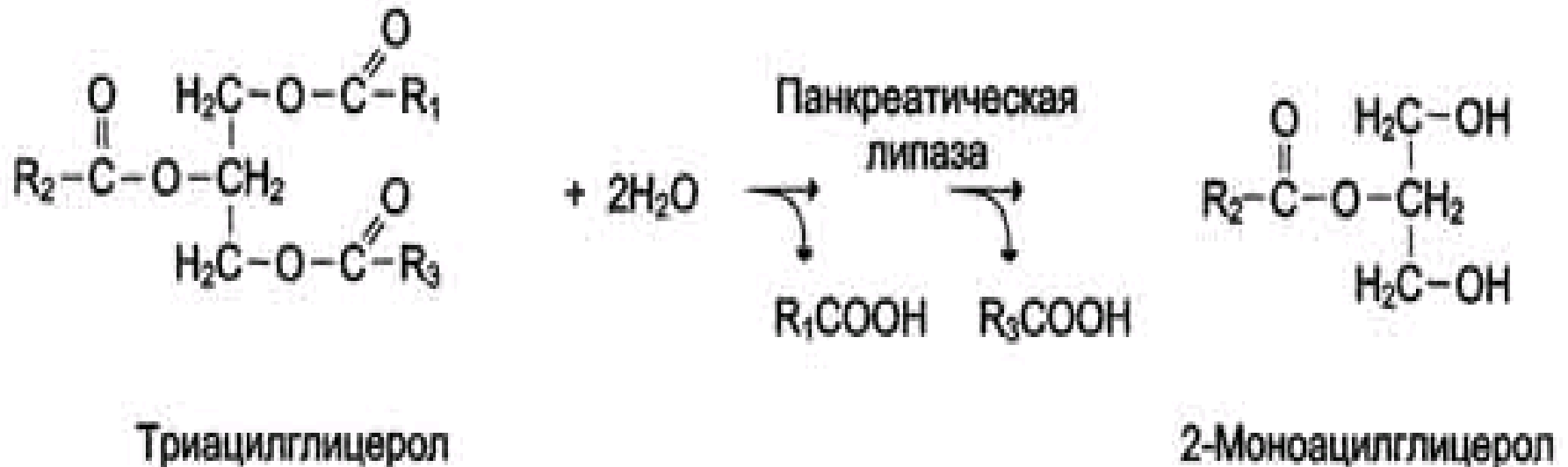


**Стереоспецифичность к D-изомерам моносахаридов**

**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.

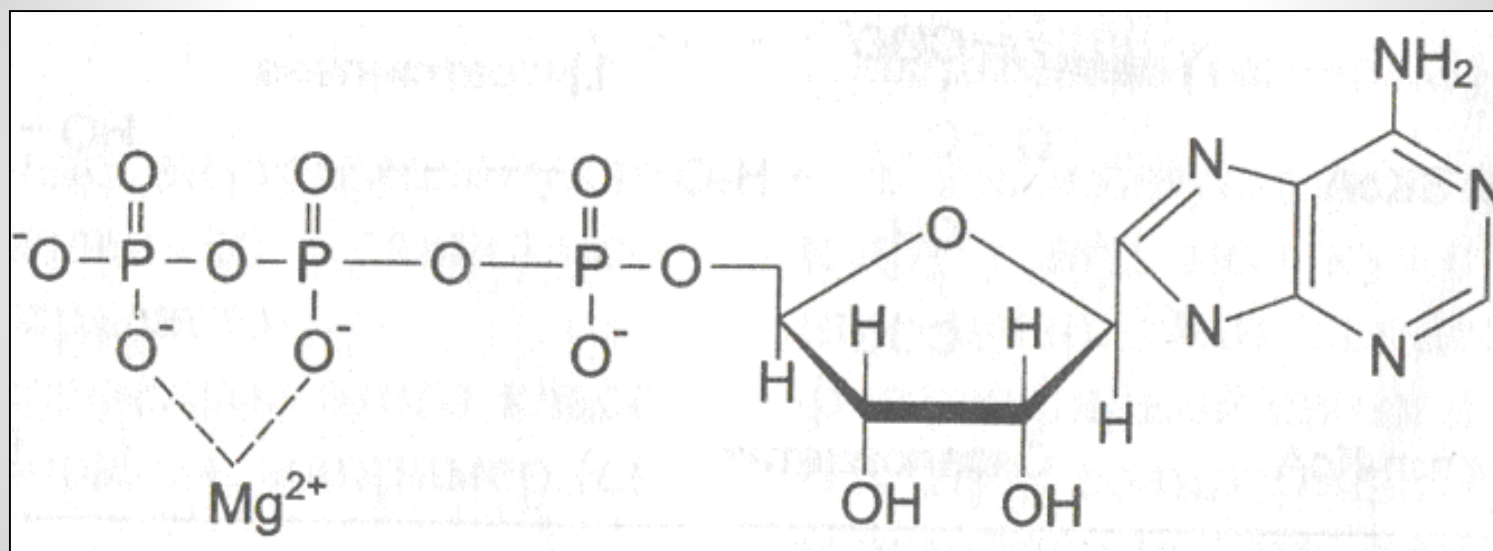
Әдетте, активаторлар - металл иондары: калий, кальций, магний, цинк, мыс, темір, марганец, кобальт, аниондардан - хлора.

- 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

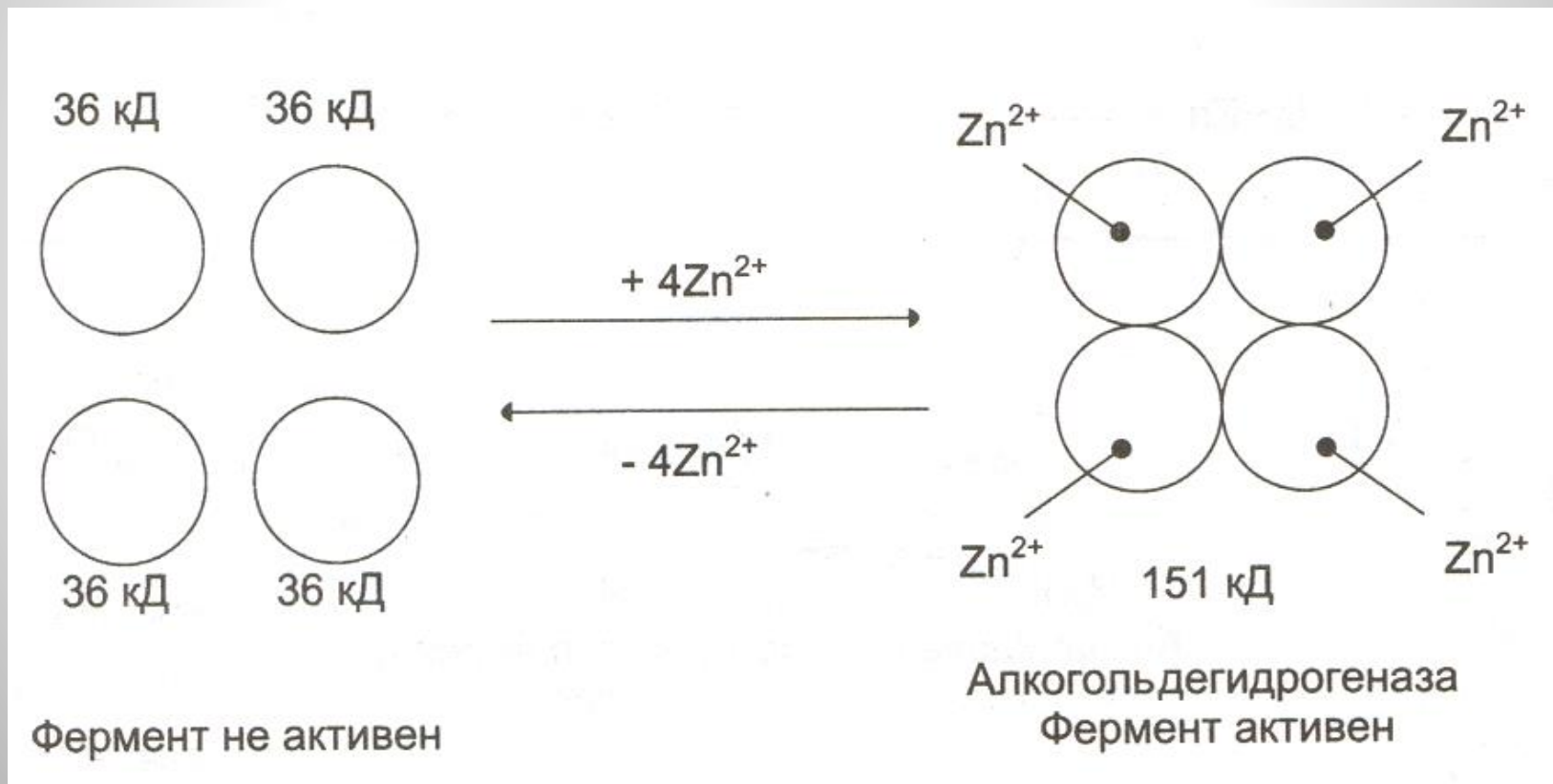


## Комплекс Mg<sup>2+</sup>-АТР

Рис. 14.2. Структура АТР



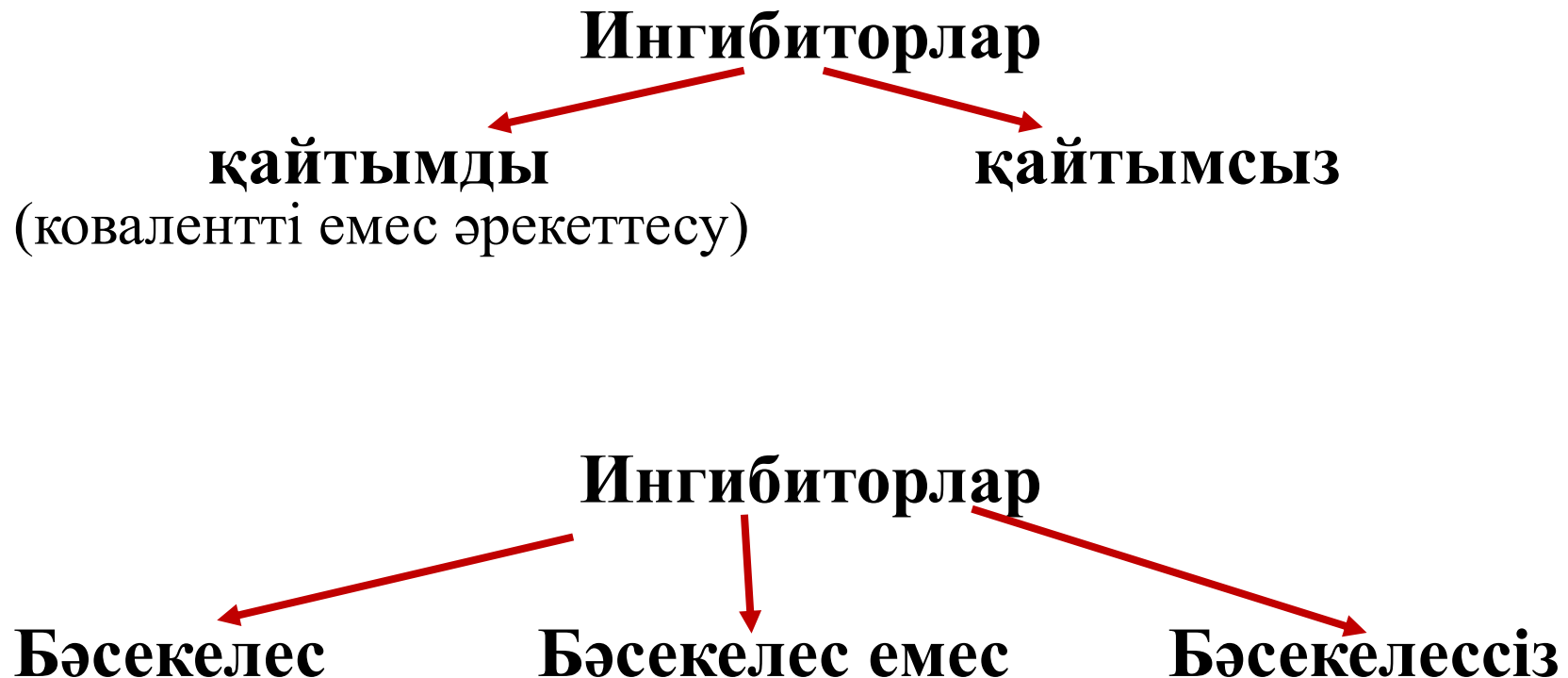
# Роль ионов цинка в стабилизации четвертичной структуры алкогольдегидрогеназы





# Ингибиторлар

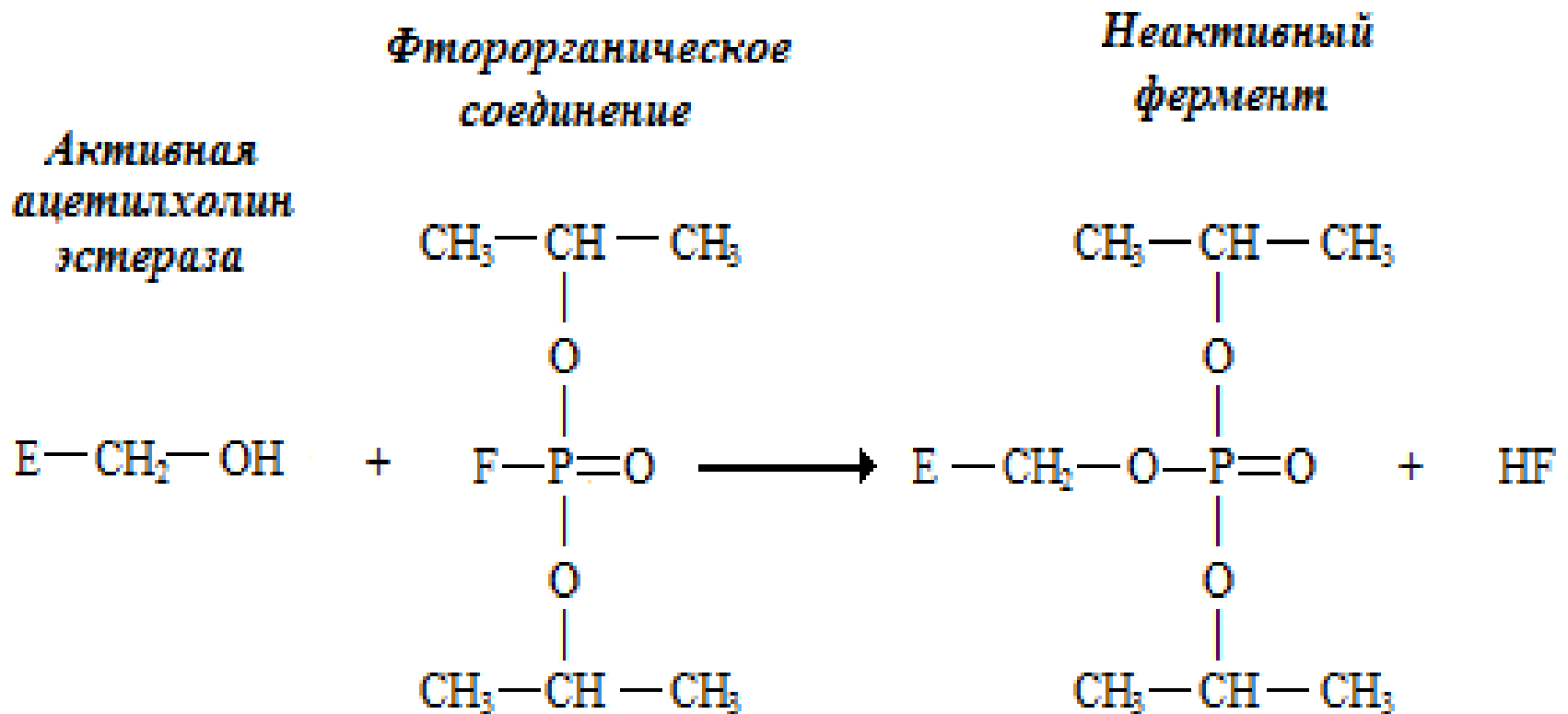
*Ингибиторлар - фермент активтілігін тежейтін қосылыстар.*





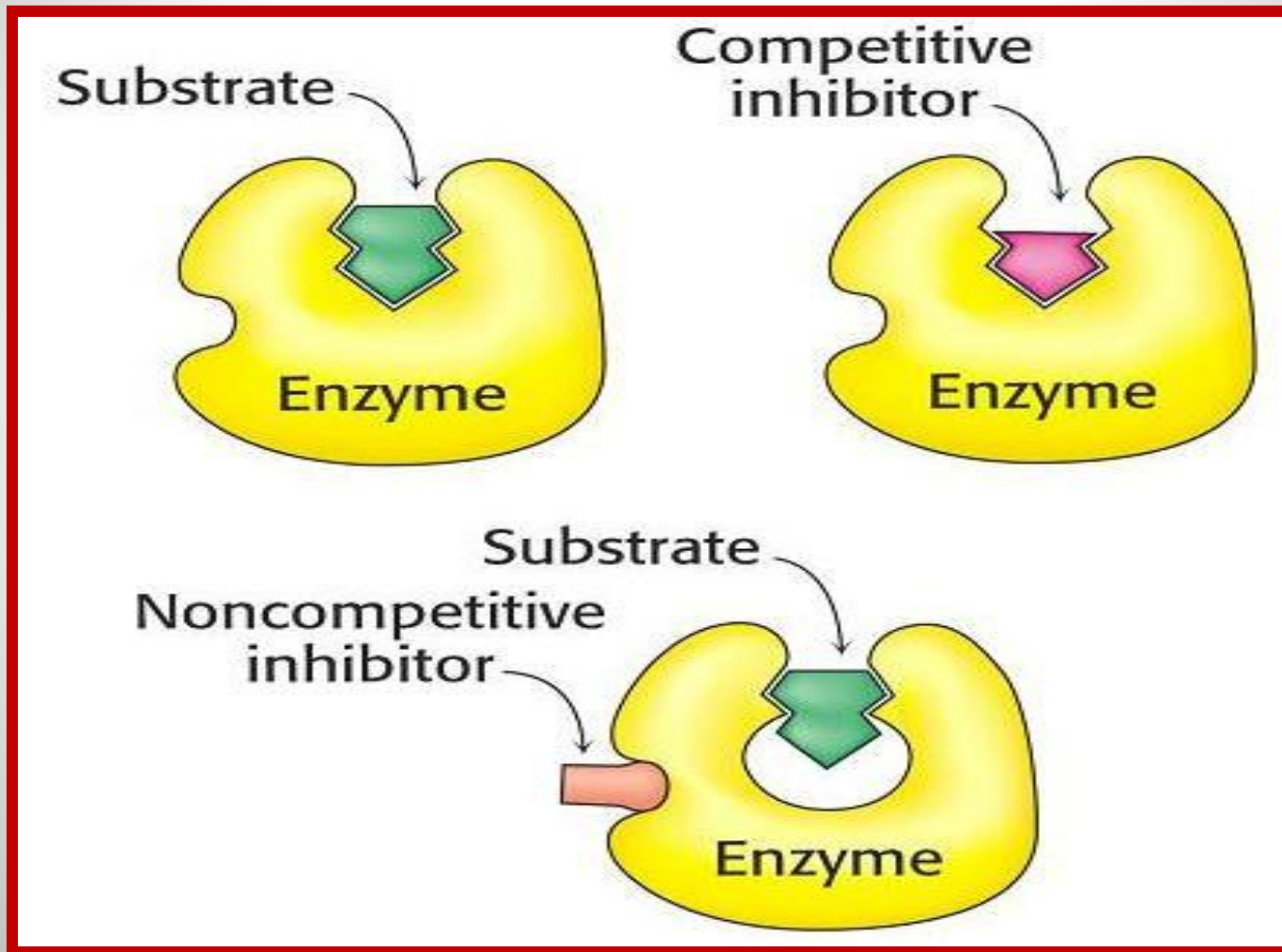
## Ингибиторлар

### Ацетилхолинэстеразаның Диизопропилфторфосфатпен қайтымсыз ингибирленуі





# Бәсекелес және бәсекелес емес ингибиторлар







## Ингибиторлар

### Қайтымды бәсекелес емес ингибирлеу

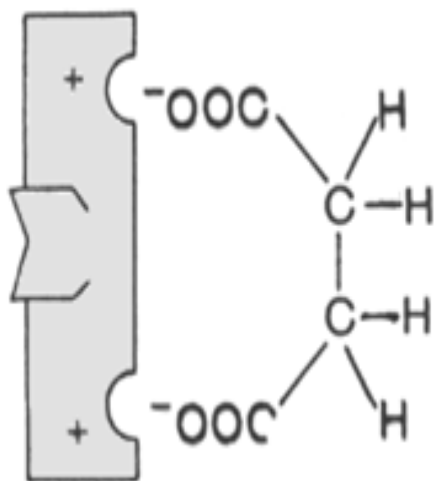




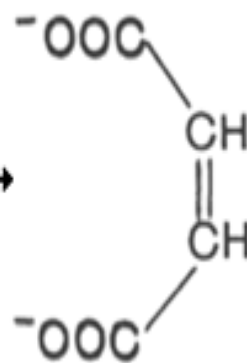
## Ингибиторлар

### Сукцинатдегидрогеназаның қайтымды бәсекелес ингибируленуі

Сукцинат-  
дегидрогеназа

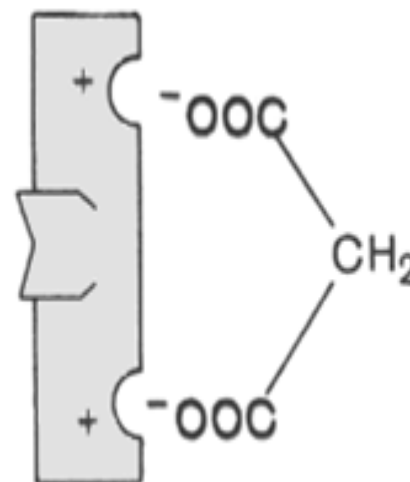


Сукцинат



Фумарат

Сукцинат-  
дегидрогеназа



Малонат

Реакция не идет



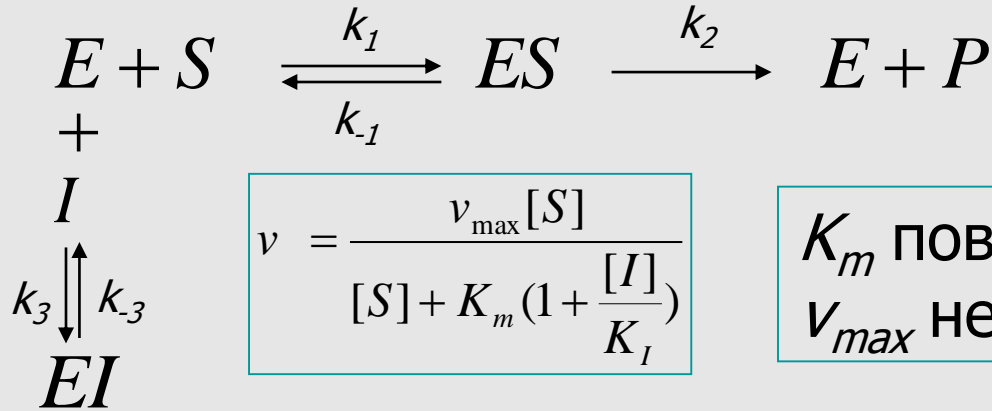


# Ингибиторлардың Михаэлис-Ментен теңдеуіне әсері:

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

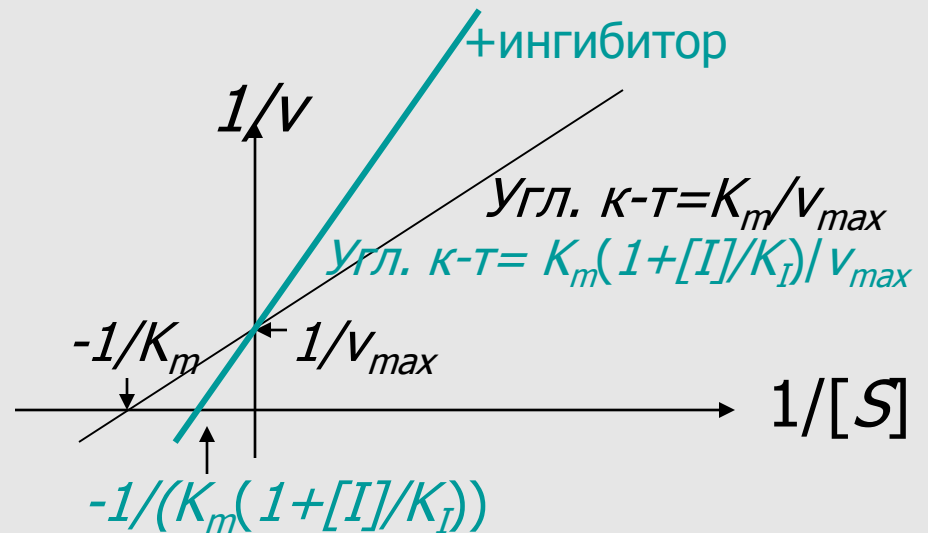
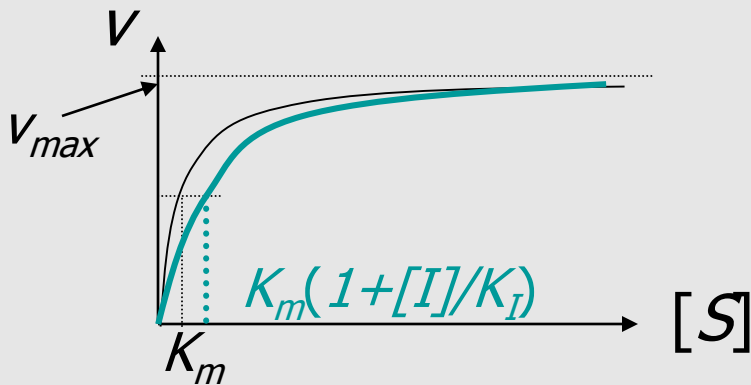


# Бәсекелес қайтымды ингибиторлар тек ферментпен байланысады



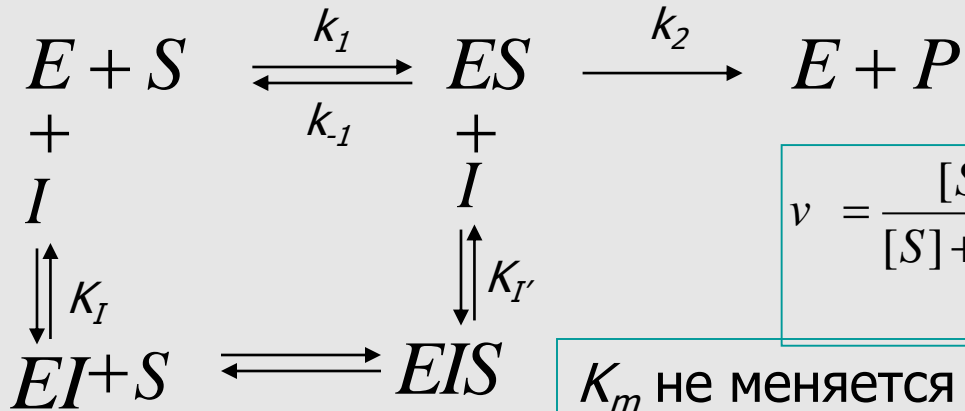
$$v = \frac{v_{\max} [S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}$$

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



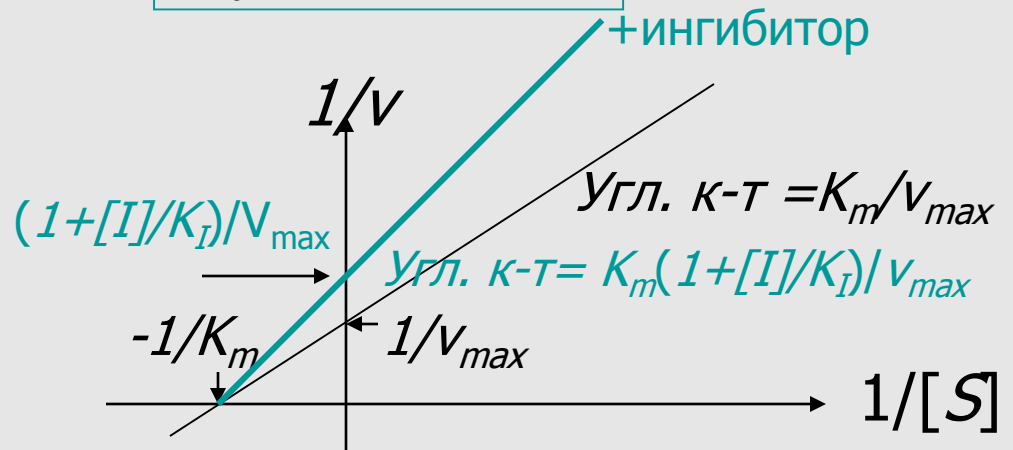
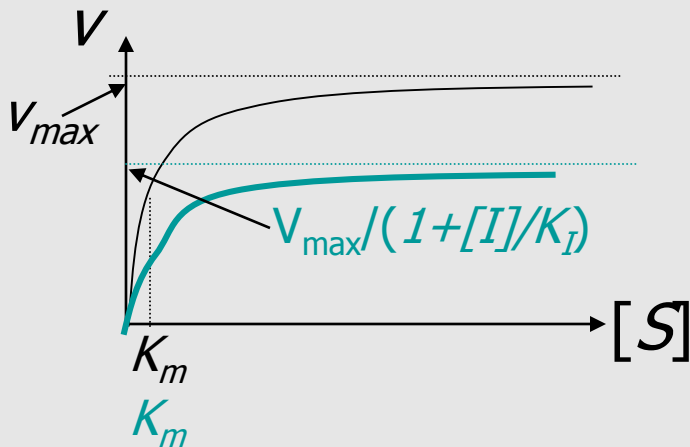


# Бәсекелес емес қайтымды ингибиторлар Е және ES-пен байланысады



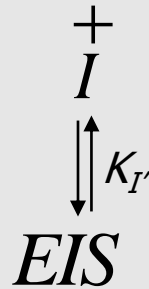
$$v = \frac{[S]}{[S] + K_m} \cdot \frac{v_{max}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}$$

$K_m$  не меняется  
 $v_{max}$  уменьшается



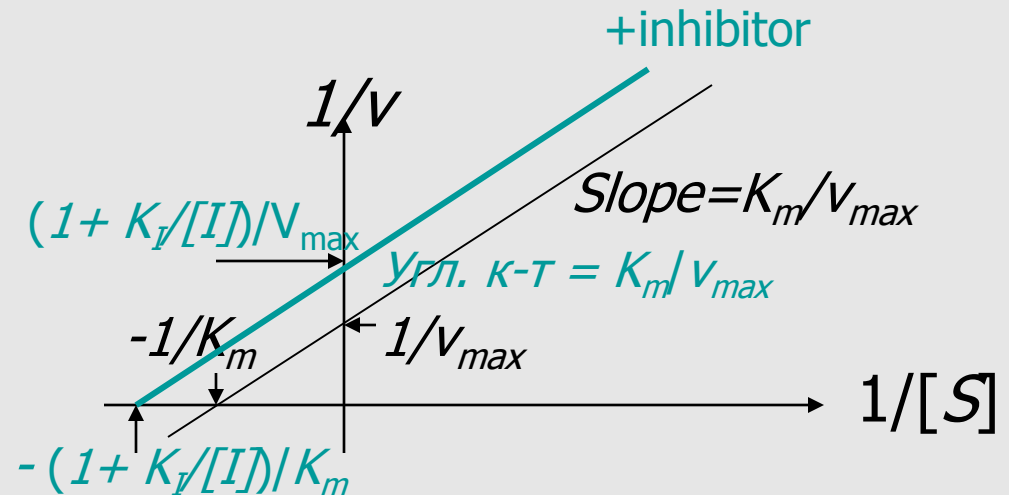
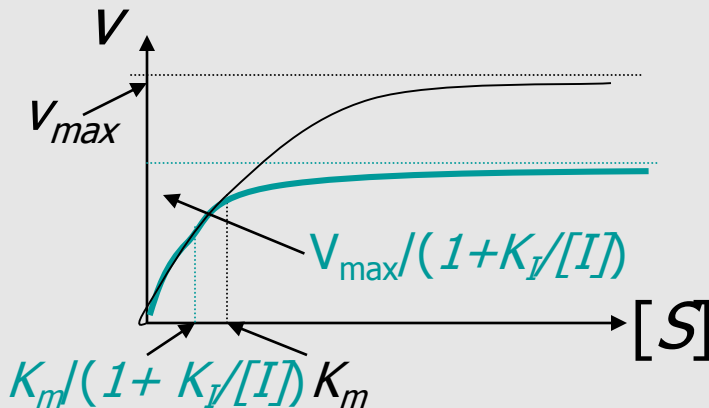


# Бәсекелессіз қайтымды ингибиторлар тек ES-пен байланысады



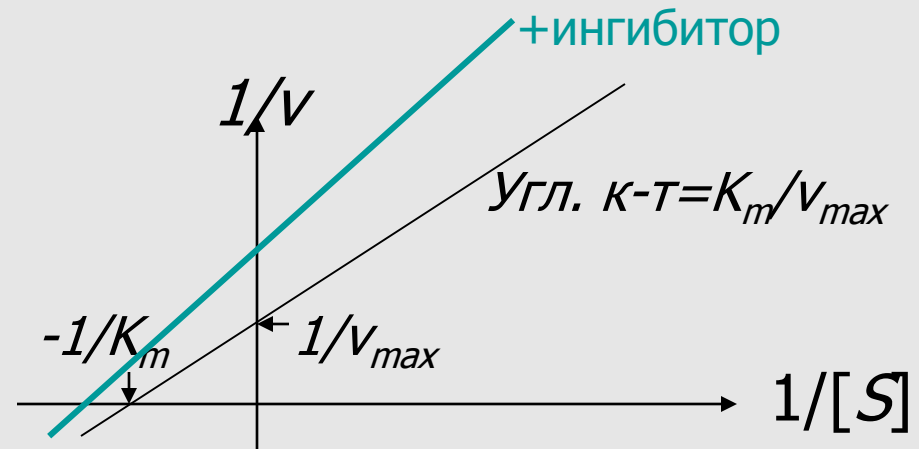
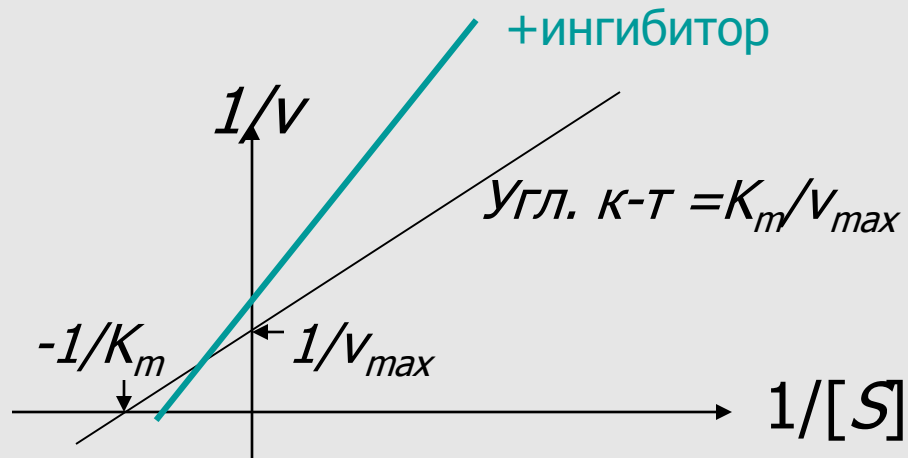
$K_m$  уменьшается  
 $V_{max}$  уменьшается  
 $K_m/V_{max}$  не изм

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





## Аралас типті ингибирлеу







## *Ферменттердің активтілігінің реттелуі*

**Фермент молекуласының каталитикалық белсенділігінің өзгеруі.**

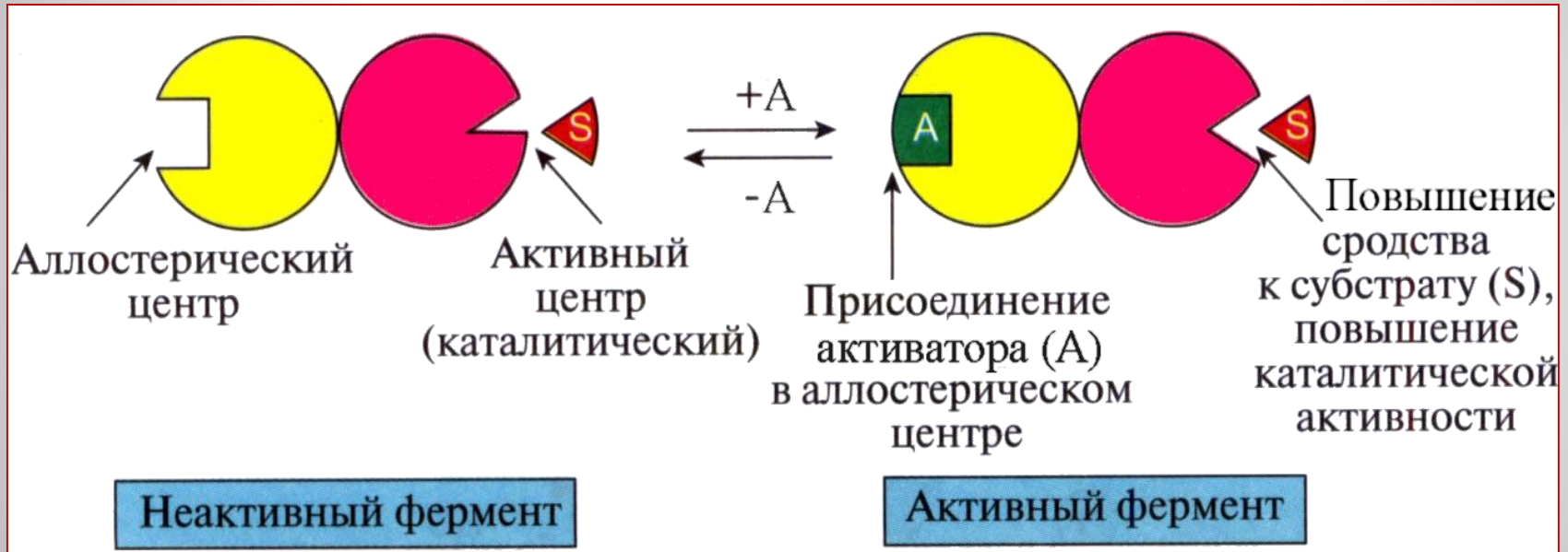
**Негізгі түрлері:**

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

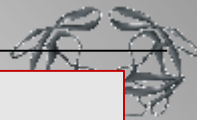


## Ферменттердің активтілігінің реттелуі

### Аллостериялық реттелу: активация

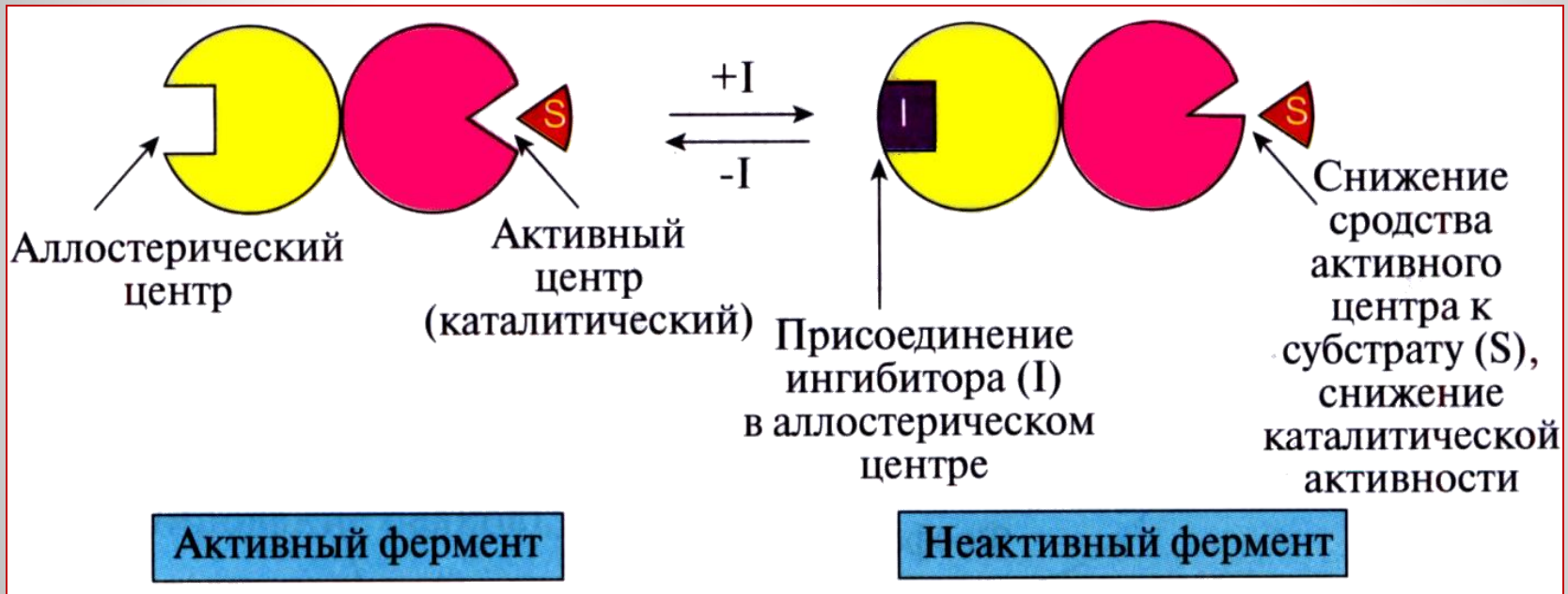


**Аллостерические активаторы изменяют конформацию фермента и повышают сродство активного центра к субстрату (повышают активность).**

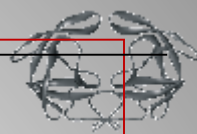


## Ферменттердің активтілігінің реттелуі

### Аллостериялық реттелу: ингибирлеу

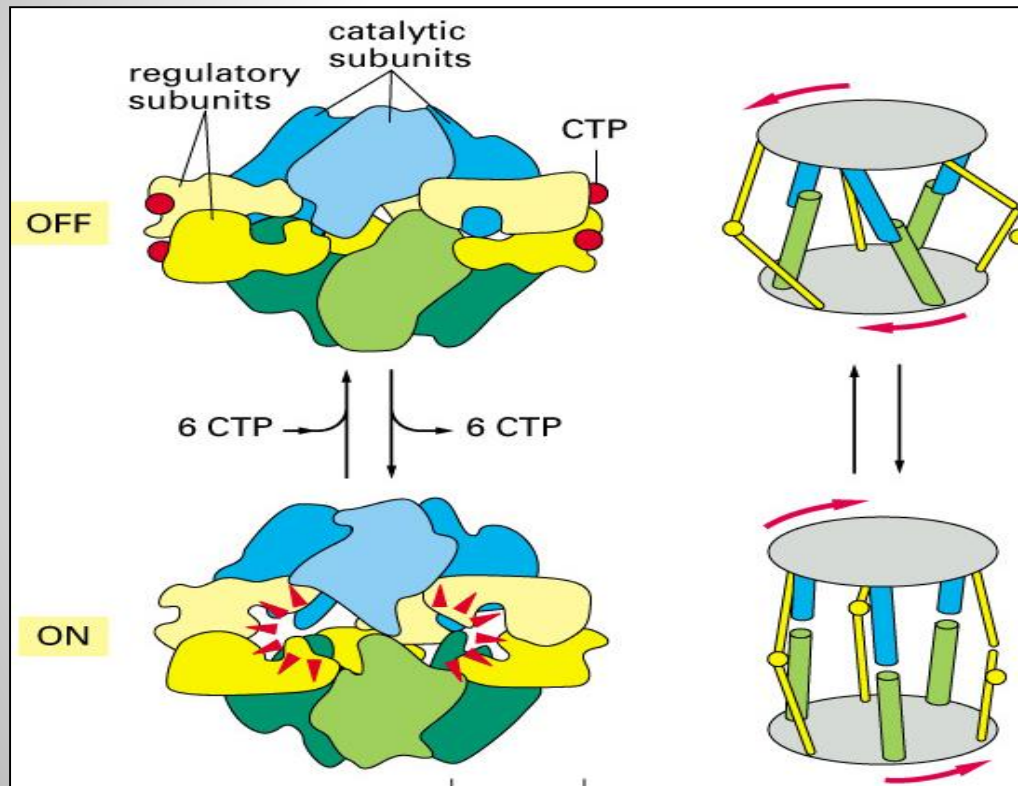


**Аллостерические ингибиторы изменяют конформацию фермента и понижают сродство активного центра к субстрату (снижают активность).**



## Ферменттердің активтілігінің реттелуі

# Аллостерический контроль активности ферментов



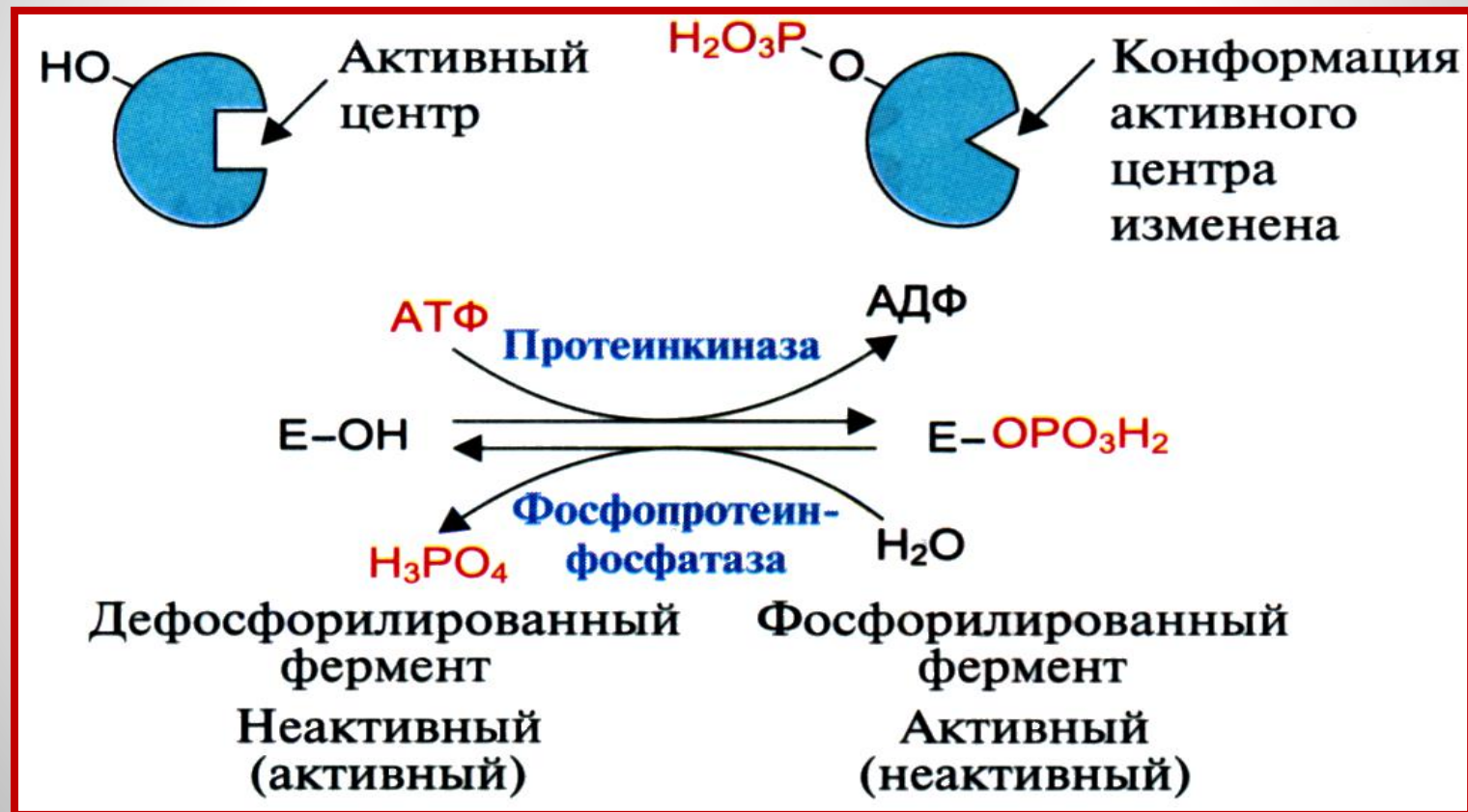
Фермент состоит из 12 субъединиц. 6 каталитических субъединиц и 6 – регуляторных. GTP – аллостерический ингибитор, ATP – аллостерический активатор.

### Аспартаткарбамоилтрансфераза



## Ферменттердің активтілігінің реттелуі

### Ковалентті модификация (фосфорилирование - дефосфорилирование)

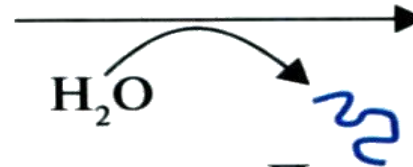






## Ферменттердің активтілігінің реттелуі

### Жартылай протеолиз жолымен реттелу



Пепсиноген (неактивный)

**М.В. 42000**

Пептид

Пепсин (активный)

**М.В. 35000**

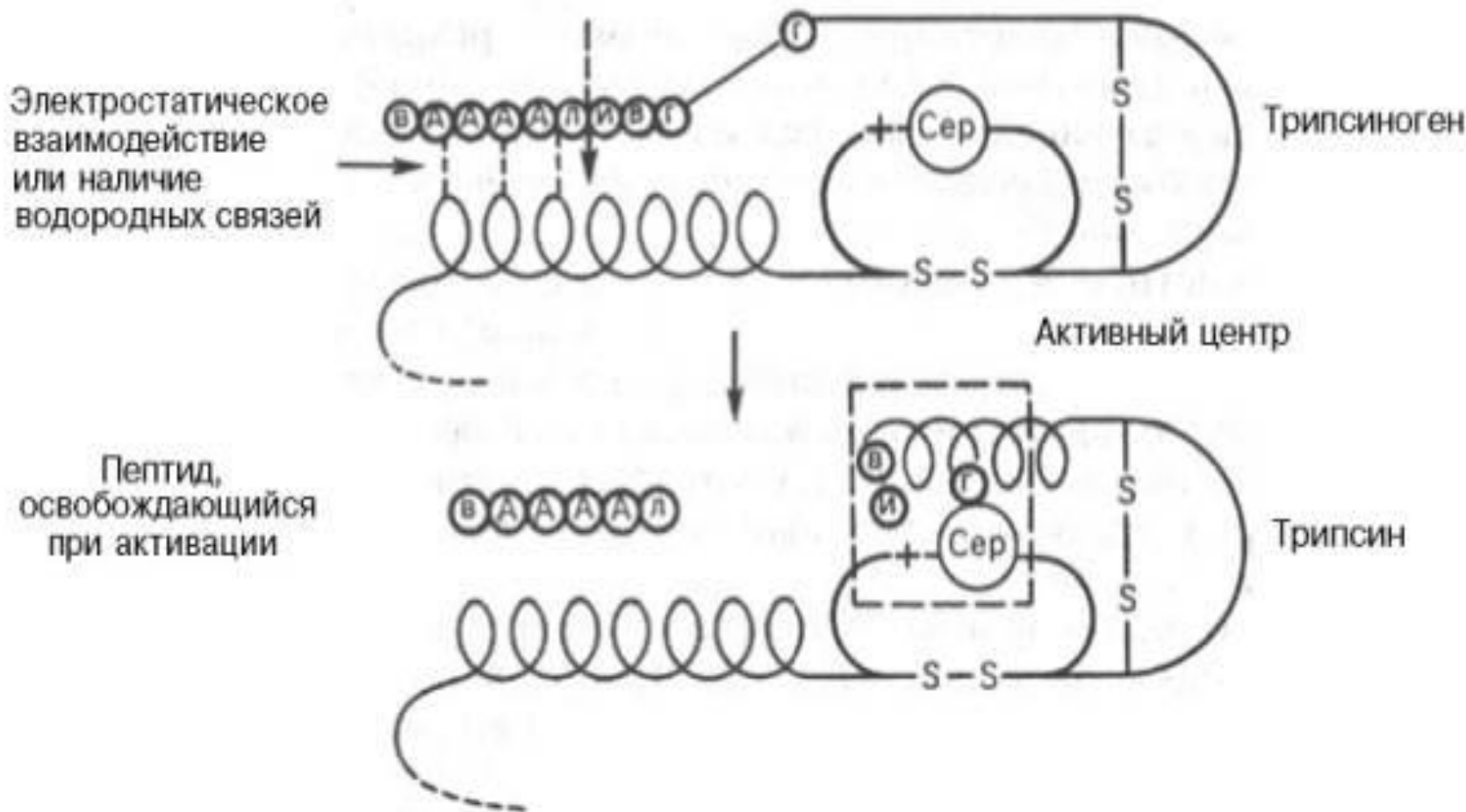
**Проферменттер - ферменттердің белсенді емес алғы заттары.**

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.



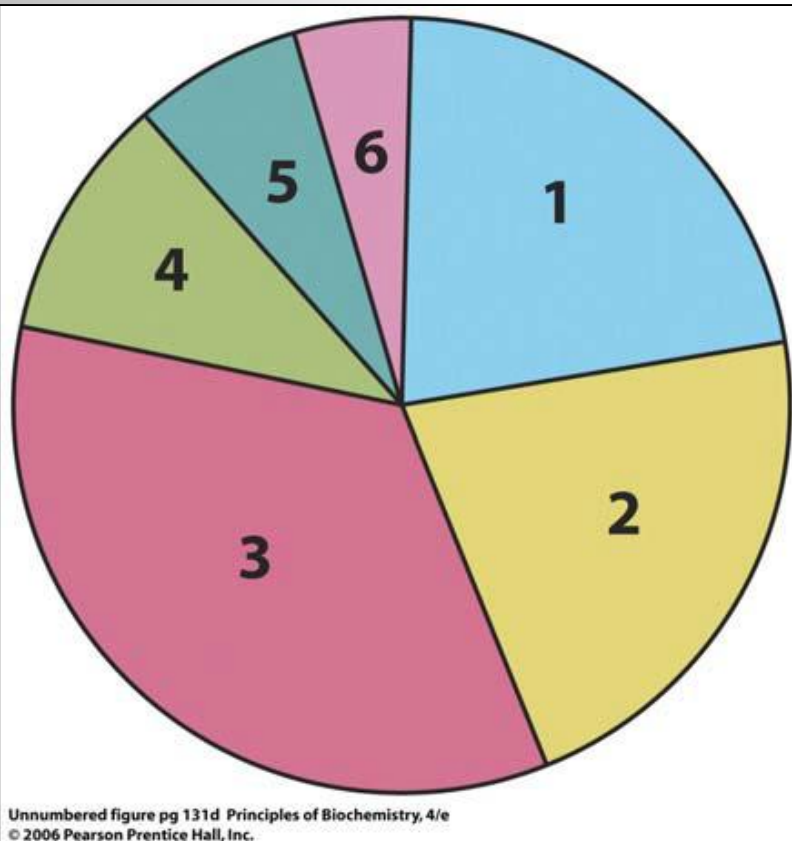
# Бұқа трипсиногенінің активация механизмі







## ***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:**

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