

# МАТЕМАТИЧНЕ МОДЕЛЮВАННЯ БІОХІМІЧНИХ ПРОЦЕСІВ

УДК 577.151.4:577.31

## ОБ ИСТИННЫХ И КАЖУЩИХСЯ КОНСТАНТАХ МИХАЭЛИСА В ЭНЗИМОЛОГИИ. I. ОТЛИЧИТЕЛЬНЫЕ ПРИЗНАКИ

С. А. КАРАХИМ

*Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;  
e-mail: laserlab@biochem.kiev.ua*

*Рассмотрены различия между истинными и кажущимися константами скорости и константами Михаэлиса. Истинными являются константы скорости элементарных стадий реальных механизмов, и могут быть определены только для надежно установленного механизма, для которого получено уравнение начальной скорости, из которого виден физический смысл этих констант и которое позволяет найти способ их расчета. Истинная константа Михаэлиса  $K_m$  выражается уравнением  $K_m = (k_{-1} + k_2)/k_1$ . Значения истинных констант не зависят от концентраций реактантов, активаторов, ингибиторов, посторонних веществ и рН.*

*Кажущиеся константы скорости — это такие константы скорости сложной реакции, которые наблюдаются при описании ее уравнением простой реакции. Они могут быть функциями нескольких истинных констант скорости и/или концентраций реагирующих веществ и не имеют ясного физического смысла, обеспечивая лишь формальную связь между скоростью реакции и концентрацией реактанта вне зависимости от изучаемого механизма. Константа Михаэлиса, рассчитанная на основании половины предельной скорости, является кажущейся константой.*

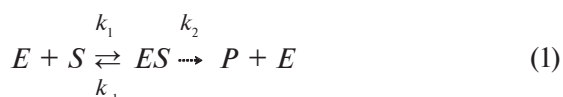
*Ключевые слова:* кинетика энзиматических реакций, уравнение Михаэлиса–Ментен, константа Михаэлиса, предельная скорость, субстратная константа.

Уравнение Михаэлиса–Ментен является одним из наиболее фундаментальных, а потому и наиболее часто употребляемых уравнений энзиматической кинетики. Простота уравнения и подробно разработанные методы его применения являются большим преимуществом при анализе экспериментальных результатов. Однако использование этого уравнения и его линеаризованных форм для исследования широкого спектра энзиматических реакций, механизм которых часто намного сложнее механизма, предложенного Михаэлисом–Ментен [1] и Бриггсом–Холдейном [2], таит в себе определенную опасность, связанную с тем, что для сложных реакций не так просто дать правильную интерпретацию полученных результатов. В этой статье мы остановимся на рассмотрении истинных и кажущихся констант скорости и констант Михаэлиса. Цель статьи: показать в каких случаях при расчете из экспериментальных данных получаются кажущиеся константы Михаэлиса,

а в каких — истинные, по каким признакам можно определить истинная это константа или кажущаяся и зачем нужно иметь правильное представление о природе рассчитанной константы Михаэлиса.

### Уравнение Михаэлиса–Ментен и условия эксперимента

Уравнение Михаэлиса–Ментен получено для простейшей (можно даже сказать модельной, поскольку в настоящее время неизвестны энзимы, которые действовали бы по простой схеме (1) [3, 4]) энзиматической реакции, протекающей через образование энзим–субстратного комплекса (ES):



Для того, чтобы рассчитать концентрации всех участвующих в реакции веществ, необходимо решить систему из 4 дифференциальных уравнений, каждое из которых представля-

ет собой изменение концентрации одного из участников реакции во времени.

Благодаря использованию принципа сохранения общей концентрации вещества в реакции [5], дифференциальные уравнения, описывающие изменения концентраций энзима ( $E$ ) и субстрата ( $S$ ), превращаются в алгебраические, которые показывают, что суммарная концентрация всех частиц, содержащих данный компонент реакции, равна его общей начальной концентрации. Представив изменение концентрации продукта во времени как скорость реакции  $v$ , получаем систему уравнений в следующем виде [5, 6]:

$$[E]_0 = [E] + [ES], \quad (2)$$

$$[S]_0 = [S] + [ES] + [P], \quad (3)$$

$$d[ES]/dt = k_1 \cdot [E] \cdot [S] - k_{-1} \cdot [ES] - k_2 \cdot [ES], \quad (4)$$

$$v = d[P]/dt = k_2 \cdot [ES]. \quad (5)$$

Фактически все условия проведения экспериментальных исследований энзиматических процессов согласованы с упрощающими предположениями, принятыми для вывода

уравнения Михаэлиса–Ментен. Такое согласование позволяет исследователям применять теоретическое уравнение для описания экспериментальных результатов. Кинетические исследования проводят при малых степенях превращения, т.е. измеряют начальную скорость реакции  $v$  – это позволяет не учитывать обратимость второй стадии реакции (1) и влияния продукта ( $P$ ) на ход реакции, а также не учитывать концентрацию  $P$  в уравнении (3). Исследования проводят при большом избытке  $S$  над  $E$  – это позволяет еще более упростить уравнение (3), не принимая в расчет концентрацию комплекса  $ES$ , которая оказывается пренебрежительно малой по сравнению с концентрацией  $S$ . Измерения начальной скорости  $v$  проводят в условиях линейности образования  $P$  в ходе реакции в зависимости от времени  $t$  (рис. 1), что означает постоянство концентрации комплекса  $ES$  в этих условиях – такой подход, т.е. применение принципа стационарности [5–7], дает возможность приравнять уравнение (4) к нулю.

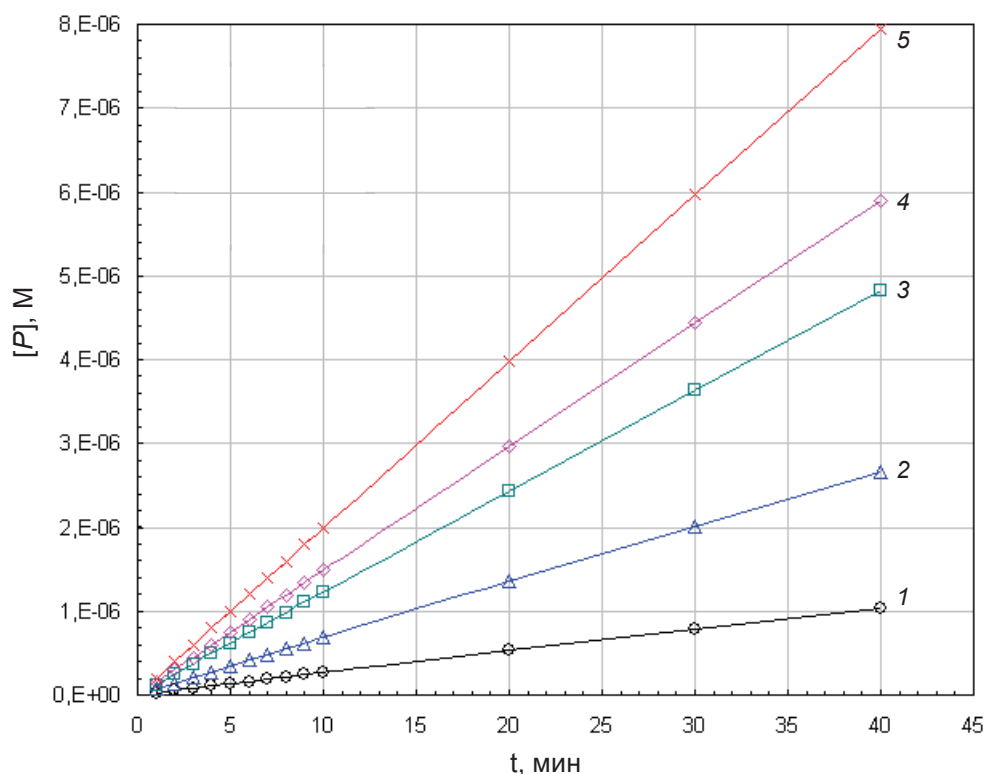


Рис. 1. Линейная зависимость образования продукта реакции  $P$  от времени  $t$  для энзиматической реакции, протекающей по механизму Михаэлиса–Ментен (1) при различных значениях общей концентрации субстрата  $S_0$ : 1 – 10; 2 – 30; 3 – 70; 4 – 100; 5 – 200  $\mu\text{M}$ . Для расчетов использованы следующие значения констант скорости:  $k_1 = 1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$ ;  $k_{-1} = 1000 \text{ мин}^{-1}$ ;  $k_2 = 3 \text{ мин}^{-1}$ . Концентрация энзима – 0,1  $\mu\text{M}$

Благодаря таким предположениям удается значительно упростить систему уравнений (2–5) для того, чтобы решить ее и получить результат в аналитическом виде. Решение приводит к уравнению Михаэлиса–Ментен:

$$v = \frac{k_2[E]_0[S]_0}{[S]_0 + \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}}, \quad (6)$$

которое часто записывают в следующей форме:

$$v = \frac{V[S]_0}{[S]_0 + K_m}. \quad (7)$$

Таким образом, для энзиматической реакции, протекающей по механизму (1), константа Михаэлиса  $K_m$  есть отношение суммы констант скорости распада комплекса  $ES$  ( $k_{-1}$  и  $k_2$ ) к константе скорости его образования ( $k_1$ ) [8–12]. Такое соотношение складывается в процессе вывода уравнения (6):

$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}, \quad (8)$$

а предельная скорость  $V$  – это произведение константы скорости распада комплекса  $ES$  до  $P$  ( $k_2$ ) и общей концентрации энзима  $[E]_0$ :

$$V = k_2[E]_0. \quad (9)$$

Эти два параметра ( $K_m$ ,  $V$ ) определяют поведение энзиматической системы (1) и их расчет является основной целью кинетического эксперимента. Поскольку Номенклатурный комитет Международного союза по биохимии и молекулярной биологии (IUBMB) рекомендовал отказаться от применения названия максимальная скорость для  $V$  в пользу названия предельная скорость [13], поскольку  $V$  определяет не максимум, а предел в математическом смысле, мы также будем пользоваться для  $V$  названием предельная скорость.

Подчеркнем еще раз, что уравнение (6) и соотношения (8) и (9) получены в результате решения системы уравнений (2–5), описывающей кинетику реакции, протекающей по механизму (1). Константы  $k_1$ ,  $k_{-1}$  и  $k_2$  в модели Михаэлиса–Ментен имеют ясный физический смысл как константы скорости образования

комплекса  $ES$  из несвязанных  $E$  и  $S$ , распада комплекса  $ES$  на свободные  $E$  и  $S$ , распада комплекса  $ES$  на свободный  $E$  и продукт реакции  $P$  соответственно и являются истинными.

### Истинные константы

Об истинных константах в многостадийных реакциях можно говорить только в связи с теоретическими представлениями, основанными на определенных моделях, описывающих механизм исследуемого процесса. Поэтому истинность констант скорости находится в прямой зависимости от истинности предложенного механизма изучаемой реакции, т.е. от того, насколько точно механизм реакции, представленный нами на бумаге, соответствует реальному, тому, который осуществляется в пробирке.

В химической кинетике понятие истинных констант скорости относится к константам скорости отдельных элементарных стадий. Если предложенный механизм соответствует реальному, то все константы скорости каждой стадии в таком механизме будут истинными и будут иметь четкий физический смысл.

Все эти константы скорости (элементарных стадий) в соответствии с законом действующих масс являются независимыми от концентраций реагирующих веществ (т.е. не изменяются на протяжении реакции) и других соединений, в том числе и тех, которые могут взаимодействовать с реагирующими веществами (например, ингибиторов, активаторов, ионов металлов и водорода) [14], а также от того, протекают ли в данной системе одновременно и другие элементарные реакции [4, 5]. В качестве неизменных коэффициентов (для данной температуры)\* они входят в уравнения скорости для каждой элементарной стадии как, например, в уравнения (4) и (5), а также в уравнение, связывающее начальную скорость реакции с концентрациями реагирующих веществ, например, в уравнение (6).

Так, если в систему (1) добавить ингибитор ( $I$ ), связывающийся с  $E$ , с образованием комплекса  $EI$  по механизму (18), то концентрация свободного энзима изменится, что приведет к тому, что изменятся скорость реакции и

\*Кроме температуры на величину константы скорости могут оказывать определенное влияние также и другие факторы: давление, ионная сила, вязкость, диэлектрическая проницаемость, полярность среды инкубации. Однако закон действующих масс не учитывает этих факторов, а принимает во внимание только концентрации веществ, непосредственно участвующих в изучаемом процессе, т.е. этот закон исходит из предположения, что все другие факторы, которые могут оказывать влияние на величину константы скорости остаются неизменными как в ходе одного эксперимента, так и в пределах серии экспериментов. В таких

ее кинетика, а все константы скорости ( $k_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_2$ ) при этом останутся неизменными (рис. 2).

Однако в качестве истинных констант могут выступать также и другие константы, которые являются функциями констант скорости отдельных стадий. Например, истинными константами являются константы равновесия элементарных стадий, выраженные через соотношение констант скорости прямой и обратной реакций, или константы диссоциации, выраженные через соотношение констант скорости обратной и прямой реакций. Истинной константой является также константа равновесия химической реакции, выраженная через соотношение произведения констант скорости прямых реакций и произведения констант скорости обратных реакций. Эти константы, так же как и константы скорости, не зависят ни от концентраций реагирующих и посторонних веществ, ни от наличия других реакций в системе.

К таким истинным константам, которые являются функцией элементарных констант скорости, можно отнести и константу Михаэлиса. Выраженная через константы скорости согласно уравнению (8), константа Михаэлиса оказывается (подобно константам скорости) также независимой от концентраций реагирующих и посторонних веществ, а также от того, протекают ли в данной системе одновременно и другие элементарные реакции.

Физический смысл истинной константы Михаэлиса в модели Михаэлиса–Ментен (1) можно выявить в результате анализа уравнения (4) в условиях стационарности [11, 15]:

$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad (10)$$

Сравнивая это уравнение с уравнением для истинной константы диссоциации  $K_s$  комплекса  $ES$ , можно увидеть, что  $K_m$  является фактически константой диссоциации комплекса  $ES$  (в условиях стационарности, т.е. постоянства концентрации комплекса  $ES$ ), когда у него есть возможность распада по двум направлениям – не только до исходных веществ, но и до продуктов реакции [15]. Если же возможности распада до продуктов нет (т.е.  $k_2 = 0$ ), то условия стационарности быстро

превращаются в условия равновесия, а  $K_m$  превращается в  $K_s$ .

Благодаря своей неизменности истинные константы скорости являются характеристичными для данной элементарной стадии, позволяя производить расчеты скорости расщедования реактантов и скорости образования продуктов в любой момент времени и при любых концентрациях реактантов и продуктов.

Таким образом, для реакции (1) константа Михаэлиса  $K_m$  и константа скорости распада комплекса  $ES$   $k_2$  являются истинными константами, т.е. их значения не изменяются ни в зависимости от общих концентраций  $E_0$  и  $S_0$ , ни в зависимости от присутствия ингибиторов, активаторов, наличия протонирования энзима, субстрата или комплекса  $ES$ , ни в зависимости от концентраций других посторонних веществ, т.е. тех, которые не взаимодействуют ни с энзимом, ни с субстратом, ни с комплексом  $ES$ , ни от наличия других реакций в энзиматической системе.

#### Кажущиеся константы

Поскольку, как было отмечено ранее, реакции, протекающие по простому механизму (1) практически не встречаются, на практике исследователям приходится изучать реакции с намного более сложными механизмами. Они часто сталкиваются со следующими ситуациями: изучается новая реакция с неизвестным механизмом; изучается реакция со сложным механизмом, для которой не удается получить зависимость начальной скорости реакции от концентрации реагирующих веществ в явном виде; механизм изучаемой реакции известен, уравнение начальной скорости реакции от концентрации реагирующих веществ в явном виде получено, но в реакционной среде присутствуют примеси, способные оказывать влияние на ход реакции, о которых исследователь не знает (или знает, но считает их не реакционноспособными).

В результате исследований таких реакций получают экспериментальные зависимости начальной скорости от концентрации субстрата, которые часто представляют собой равнобочную гиперболу (как на рис. 2). Такие зависимости хорошо описываются уравнениями вида, где  $y$  – скорость,  $x$  – концентрация субстрата:

условиях величина константы скорости оказывается неизменной, но включает результат действия всех вышперечисленных факторов. Поэтому дальнейшее изложение основано на предположении, что экспериментальные исследования проводят при постоянных температуре и давлении, поддерживают на неизменном уровне вязкость, ионную силу и рН среды инкубации, а также следят за тем, чтобы объем реакционной смеси не изменялся значительно в ходе проведения эксперимента.

$$y = \frac{cx}{d+x} \quad (11)$$

Подобрав константы  $c$  и  $d$  можно достаточно точно находить для каждого значения  $x$  соответствующее значение  $y$ . Однако уравнение (11) является математической абстракцией, не имеющей никакой связи с механизмом изучаемой реакции. Его константы  $c$  и  $d$  не имеют никакого физического смысла, а являются, по своей сути, подгонными коэффициентами, обеспечивающими связь между  $x$  и  $y$ . В химической и ферментативной кинетике такие константы, не имеющие ясного физического смысла, обеспечивающие лишь формальную связь между  $x$  и  $y$  вне зависимости от изучаемого механизма, называются эффективными или кажущимися. С. Д. Варфоломеев и К. Г. Гуревич дают такое определение кажущейся константы скорости – это такая константа скорости сложной реакции, которая наблюдается при описании ее (этой реакции) уравнением простой реакции [3]. Это определение можно распространить на константы равновесия и диссоциации, а также на константу Михаэлиса.

Уравнения подобного вида часто встречаются в исследованиях адсорбционных процессов, например, зависимость количества адсорбированного вещества на однородной поверхности  $a$  от давления адсорбата  $P$  описывается уравнением Ленгмюра [16]:

$$a = \frac{a_m b P}{1 + b P} = \frac{a_m P}{\frac{1}{b} + P} \quad (12)$$

где  $b$  – адсорбционный коэффициент;  $a_m$  – емкость монослоя.

Закон Рауля выражается подобным образом: например, для раствора, состоящего из  $n_1$  молей растворителя и  $n_2$  молей растворенного вещества, давление растворителя над раствором  $p_1$  равно:

$$p_1 = \frac{n_1 p_0}{n_1 + n_2} \quad (13)$$

где  $p_0$  – давление растворителя над чистым растворителем [16].

Уравнение (11) по форме аналогично также уравнению Михаэлиса–Ментен (7) и может

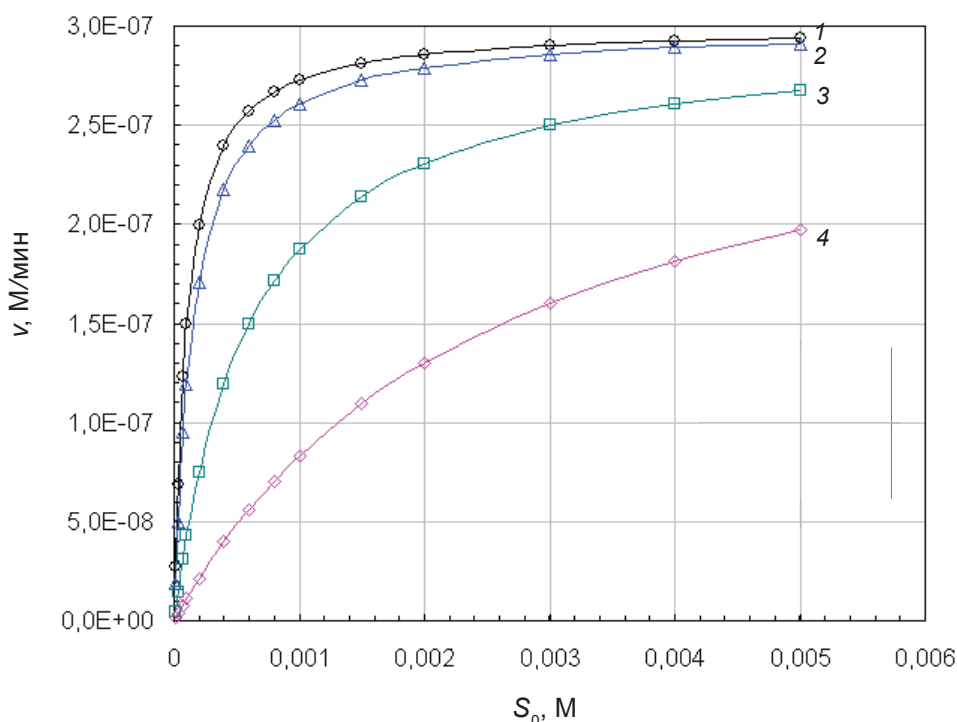


Рис. 2. Гиперболические зависимости начальной скорости  $v$  от концентрации субстрата  $S_0$  для ферментативной реакции, протекающей по механизму (18) при различных концентрациях ингибитора  $I_0$ : 1 – 0; 2 – 0,1; 3 – 1,0; 4 – 5,0 мМ. Для расчетов использованы следующие значения констант скорости:  $k_1 = 1 \cdot 10^7 \text{ М}^{-1} \text{ мин}^{-1}$ ;  $k_{-1} = 1000 \text{ мин}^{-1}$ ;  $k_2 = 3 \text{ мин}^{-1}$ ;  $k_{-3} = 200 \text{ мин}^{-1}$ ;  $k_3 = 1 \cdot 10^6 \text{ М}^{-1} \text{ мин}^{-1}$ . Концентрация фермента – 0,1 мМ. Время инкубации – 5 мин

быть записано в соответствии с терминологией модели Михаэлиса–Ментен:

$$v = \frac{V^{app}[S]_0}{[S]_0 + K_m^{app}}. \quad (14)$$

Уравнение (14) может рассматриваться как аналог уравнения (11) для применения в энзиматической кинетике, в котором  $c$  изменено на  $V^{app}$ , а  $d$  — на  $K_m^{app}$ . В таком случае параметры  $V^{app}$  и  $K_m^{app}$  являются эффективными, поскольку они не связаны с определенным механизмом, хотя иногда уравнение (14) связывают с обобщенным механизмом (17), аналогичным механизму (1), но, как будет показано в следующей статье, для этого нет достаточных оснований, и не имеют четкого физического смысла, а являются лишь подгонными коэффициентами. Например, коэффициент  $c$  в зависимости от того, какой процесс описывают уравнением (14), может иметь смысл емкости моно слоя, давления растворителя над чистым растворителем или предельной скорости.

Физический смысл может проявиться только после анализа реального механизма изучаемой реакции и математического вывода уравнения для начальной скорости реакции в виде, аналогичном уравнению (14). Как было показано выше, для механизма реакции (1) такой анализ был проведен Михаэлисом и Ментен, а также Бриггсом и Холдейном, и полученное ими уравнение (7), которое в полном виде выражается уравнением (6), полностью совпадает с уравнением (14). Поэтому, если мы исследовали реакцию с неизвестным механизмом и с помощью уравнения (14) вычислили для нее  $V^{app}$  и  $K_m^{app}$ , а затем установили, что механизм изучаемой реакции описывается схемой (1), то вычисленные нами эффективные параметры численно равны константам  $V$  и  $K_m$  из уравнения (7):

$$K_m^{app} = K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}, \quad (15)$$

$$V^{app} = V = k_2[E]_0. \quad (16)$$

Если же мы исследуем реакцию заранее зная, что ее механизм описывается схемой (1), то, применяя уравнение (7), сразу вычисляем значения констант  $V$  и  $K_m$ .

Однако, как было сказано ранее, реальные механизмы энзиматических реакций оказываются намного сложнее, чем модель Михаэлиса–Ментен, представленная схемой (1). Поэтому применение для их анализа уравнения (14) приводит к тому, что вычисленные

константа Михаэлиса и предельная скорость будут казаться (согласно определению кажущихся констант Варфоломеева и Гуревича [3]). Кажущаяся константа Михаэлиса может быть численно равна истинной для механизмов, для которых анализ зависимости начальной скорости от концентрации субстрата покажет, что кажущаяся константа Михаэлиса подчиняется уравнению (8). Чаще же всего  $V^{app}$  и  $K_m^{app}$ , вычисленные по уравнению (14), не будут совпадать с параметрами  $V$  и  $K_m$ , выраженными в форме уравнений (8) и (9), вытекающими из уравнений (6) и (7), если вообще эти константы ( $V$  и  $K_m$ ) можно рассчитать — т.е. если в сложной реакции есть стадии, которые можно описать с помощью констант  $k_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_2$ , характеризующих механизм (1). Это означает, что для реальных механизмов равенства (15) и (16) в большинстве случаев соблюдаться не будут.

Несмотря на одинаковый вид, уравнения (7) и (14) являются разными уравнениями с точки зрения физического смысла входящих в них кинетических параметров  $V$  и  $K_m$ . В уравнении (7) эти параметры имеют значения, выраженные уравнениями (8) и (9), а в уравнении (14) они могут быть выражены различным образом в зависимости от механизма исследуемого процесса. Поэтому уравнение (7), которое в полном виде записывается как уравнение (6), применимо только для исследования реакций, протекающих по механизму (1), в то время как уравнение (14) применимо для исследования любых реакций, подчиняющихся кинетике Михаэлиса–Ментен (т.е. реакций, для которых наблюдается гиперболическая зависимость начальной скорости от концентрации субстрата), поскольку в него входят эффективные параметры, не связанные напрямую с механизмом исследуемой реакции.

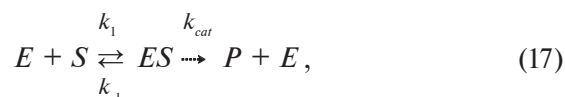
Как было отмечено ранее, определением истинной константы Михаэлиса (ее сутью), вытекающим из модели Михаэлиса–Ментен, является уравнение (8). А способом ее расчета, основанном на свойстве уравнения (7), является нахождение такой концентрации субстрата, при которой начальная скорость реакции равна половине ее максимального значения — при этом величина константы Михаэлиса численно равна этой концентрации [5, 9–12]. А вот в рекомендациях Номенклатурного комитета Международного союза по биохимии и молекулярной биологии — как и в других источниках [17, 18], относящихся к терминологии в энзиматической кинетике [13], в разделе, посвященном кинетике Михаэлиса–Ментен,

дается другое определение константы Михаэлиса: константа Михаэлиса есть концентрация субстрата, при которой  $v = 0,5 V$ . При этом для константы Михаэлиса употребляется обозначение  $K_m$ , как для истинной константы, поскольку кажущаяся константа обозначается  $K_m^{app}$  (в разделе, посвященном двухсубстратным реакциям). Даже приводится правило, как определить истинную константу Михаэлиса из кажущейся в случае двухсубстратных реакций: константа Михаэлиса для  $A$ ,  $K_{mA}$ , есть значение кажущейся константы Михаэлиса для  $A$ , когда концентрации всех субстратов, кроме  $A$ , экстраполированы до бесконечности. С другой стороны, указывается, что, поскольку большое количество механизмов подчиняются кинетике Михаэлиса-Ментен, не существует общего определения  $K_{mA}$  для частных механизмов, выраженного через константы скорости элементарных стадий. Как видим, определение константы Михаэлиса через концентрацию субстрата, при которой  $v = 0,5 V$ , сразу же приводит к заключению, что такие константы нельзя даже выразить подобно уравнению (8) с помощью констант скорости элементарных стадий [19].

Становится очевидным, что определение констант Михаэлиса согласно рекомендациям Номенклатурного комитета относится к кажущимся константам Михаэлиса. Действительно, для кажущихся констант Михаэлиса невозможно дать определение с точки зрения физического смысла. Поэтому приходится давать определение через способ расчета и называть константу Михаэлиса концентрацией субстрата. Давайте посмотрим, например, на уравнения (8), (19), (23), (25). Мы увидим, что константы Михаэлиса в этих уравнениях не являются концентрациями субстрата. Они просто численно равны [9, 11, 12] той концентрации субстрата, при которой скорость реакции равна половине предельной.

Хотя  $K_m$  и  $K_m^{app}$  и имеют одинаковые название и размерность и происходят из уравнения Михаэлиса-Ментен — это совершенно разные физические величины, а, соответственно, имеют и разный физический смысл. Истинная константа Михаэлиса  $K_m$  характеризует исключительно реакцию (1) или аналогичную реакцию в составе более сложного механизма, например, в реакции (18), т.е. состояние комплекса  $ES$  с учетом скоростей его образования определяется константой скорости (второго порядка) взаимодействия пары реагирующих веществ и распада — определяется константами скорости (первого порядка) распада комплекса до продуктов и до исходных веществ.

Эффективная константа Михаэлиса  $K_m^{app}$  может быть рассчитана методами линеаризации (см., например, рис. 3) и компьютерного подбора для любой сложной энзиматической реакции, подчиняющейся кинетике Михаэлиса-Ментен, т.е. описываемой уравнением (14), а поэтому не имеет ясного физического смысла. При этом часто можно рассчитать константу Михаэлиса не только по субстрату, но также и по активатору. И если для кажущейся константы Михаэлиса по субстрату мы можем формально представить себе простейшую схему механизма, который она характеризует [20]:



то для константы Михаэлиса по активатору даже такой формальной схемы представить невозможно, поскольку активатор энзиматически не превращается с образованием продукта (единственное, что можно представить, это то, что вместо свободного энзима в реакции участвует комплекс энзима с активатором, однако в этом случае  $K_m^{app}$  будет иметь смысл константы Михаэлиса по субстрату). Поэтому константы Михаэлиса по активатору не могут быть истинными (с точки зрения физического смысла), а всегда являются кажущимися.

Кажущиеся константы Михаэлиса и предельные скорости являются постоянными только для данных экспериментальных условий [4] (если они являются функциями концентраций реагирующих веществ или pH), т.е. позволяют описывать только экспериментальные зависимости начальной скорости от концентраций реактантов, полученные в строго идентичных условиях (другими словами описывают только одну экспериментальную кривую: см., например, рис. 2). В отличие от истинной константы кажущаяся константа Михаэлиса  $K_m^{app}$  в большинстве случаев является функцией различных параметров энзиматической системы (констант скорости различных стадий, концентрации ингибиторов, активаторов, кофакторов, pH) [21] и, как следует из метода ее определения, соответствует концентрации субстрата, при которой предельная скорость уменьшается вдвое. Поэтому кажущиеся константы (с точки зрения неизменности, постоянства) в общем случае константами не являются [19] (рис. 4). Константами они могут быть названы только тогда, когда являются функциями констант скорости отдельных стадий реакции, но не концентраций реагирующих веществ.

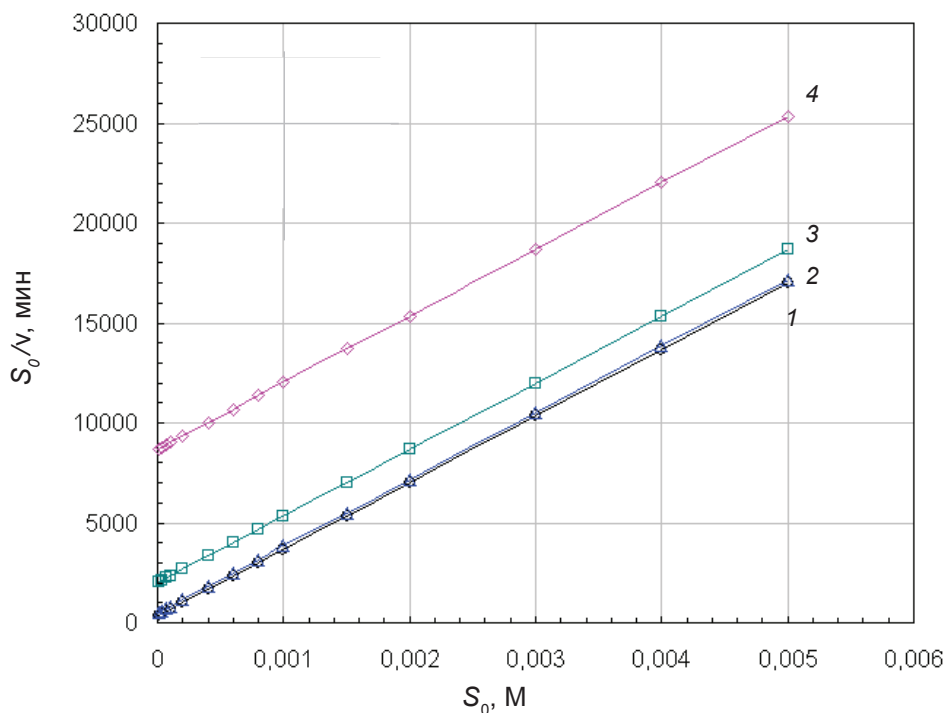


Рис. 3. Линеаризация кривых, показанных на рис. 2, по методу Хейнеса в координатах  $[S]_0/v - [S]_0$ . На оси ординат отсекается отрезок, численно равный  $K_m^{app}/V^{app}$ , а тангенс угла наклона прямых равен  $1/V^{app}$ .  $V^{app}$  не изменяется при добавлении ингибитора ( $V^{app} = k_2 [E]_0 = 3,00 \cdot 10^{-7}$  М/мин), в то время как  $K_m^{app}$  увеличивается с ростом концентрации ингибитора: 0,10; 0,15; 0,60 и 2,60 мМ для концентраций ингибитора 0 (кривая 1); 0,1 (кривая 2); 1,0 (кривая 3) и 5,0 мМ (кривая 4) соответственно. Следовательно, кажущаяся константа Михаэлиса  $K_m^{app}$  может быть намного больше истинной константы Михаэлиса  $K_m$  (которая равна 0,1003 мМ) и субстратной константы  $K_s$  (равной 0,1000 мМ)

Вследствие того, что название константы Михаэлиса из-за сходства уравнений (7) и (14) с истинной константой – уравнение (8) – распространилось на кажущуюся, а затем и на константы, рассчитываемые из эффективных констант (подобно  $K_m^{EP}$ ,  $K_m^{ES}$ ,  $K_m^{EMS}$  из приведенных ниже примеров), часто бывает не просто разобраться о какой константе Михаэлиса идет речь и каков ее физический смысл. Иногда даже трудно словами выразить разницу в смысле определяемых констант, которые все разные, а называются одинаково.

Было бы намного проще для восприятия, если бы различные константы Михаэлиса назывались по-разному. Например, можно было бы назвать истинную константу Михаэлиса, выраженную уравнением (8), константой Бриггса–Холдейна (обозначив ее  $K_{BH}$ ), за кажущейся константой Михаэлиса, расчет которой производится по уравнению (14), оставить название кажущейся константы Михаэлиса ( $K_M^{app}$ ), а если кажущаяся константа Михаэлиса для конкретного механизма называется функцией только констант скорости

элементарных стадий и проявляет свойства истинной – называть истинной константой Михаэлиса ( $K_M$ ). Истинные же константы Михаэлиса, рассчитанные из кажущихся –  $K = (k_{-n} + k_{n+1})/k_n$  – и не совпадающие по физическому смыслу с константой Бриггса–Холдейна (такие как  $K_m^{EP}$ ,  $K_m^{ES}$ ,  $K_m^{EMS}$  из приведенных ниже примеров), можно называть константами двунаправленной диссоциации конкретного комплекса: комплекса  $EAS$ , образующегося из  $S$  и комплекса энзима с активатором ( $EA$ ) –  $K_{2dS}^{EAS}$ ; комплекса  $EAS$ , образующегося из энзима  $E$  и комплекса субстрата с активатором  $AS$  –  $K_{2dAS}^{EAS}$ ; комплекса  $ES$ , образующегося из  $E$  и  $S$ , но распадающегося не до продуктов, а другим путем –  $K_{2dS}^{ES}$ .

Термин «константа Михаэлиса» вызывает ассоциации с взаимодействием  $E$  с  $S$ , недаром ее часто пытаются использовать для характеристики сродства энзима с субстратом [9, 10] (хотя это и неправильно). А когда скорость распада комплекса  $ES$  значительно меньше, чем скорость его образования, то константа Михаэлиса превращается в константу диссо-



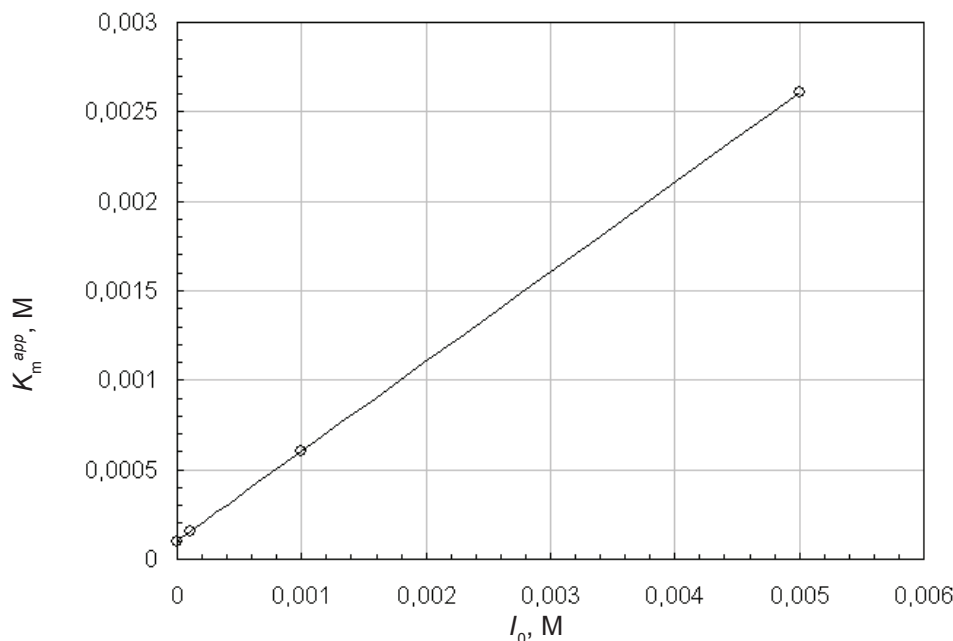


Рис. 4. График зависимости  $K_m^{app}$  от концентрации ингибитора  $I_0$  построенный по данным, полученным из рис. 3. На оси ординат прямая отсекает отрезок, численно равный истинной константе Михаэлиса  $K_m$ , а тангенс угла наклона прямой равен отношению  $K_m/K_i$ . Рассчитанные из графика значения равны:  $K_m = 0,1008$  мМ и  $K_i = 0,201$  мМ. Рассчитанные исходя из констант скоростей значения этих параметров составляют:  $K_m = 0,1003$  мМ и  $K_i = 0,200$  мМ. В результате добавления ингибитора кажущиеся константы Михаэлиса  $K_m^{app}$  изменяются (увеличиваются пропорционально концентрации ингибитора), а истинная  $K_m$  остается неизменной

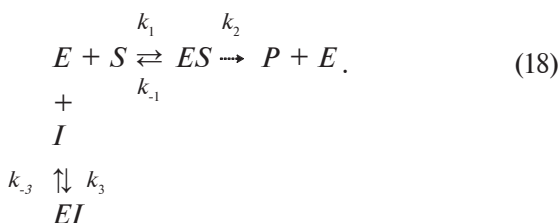
циации  $K_s$  комплекса  $ES$  действительно характеризующую сродство  $E$  с  $S$  (скажем точнее: сродство  $E$  и  $S$ , находящихся в растворе в свободном состоянии, т.е. не связанном с другими компонентами энзиматической системы).

Само понятие сродства эквивалентно константе равновесия  $K_p$ . Константа равновесия (как и константа диссоциации) характеризует энергию связи  $E$  с  $S$  (поскольку существует связь  $K_p$  со стандартным потенциалом Гиббса  $\Delta G^0$ :  $\Delta G^0 = -RT \ln K_p$  [17]): чем выше значение  $K_p$  (или чем меньше значение  $K_s$ ), тем сильнее взаимодействие  $E$  и  $S$ , или, как говорят, выше их сродство, или аффинитет. Чем выше значение  $K_p$  (или чем меньше значение  $K_s$ ), тем значительней константа скорости прямой реакции превышает константу скорости обратной реакции, тем большее количество комплекса  $ES$  образуется при достижении реакции равновесного состояния.

**Отличительные признаки кажущихся констант**

Для того, чтобы лучше понять по каким признакам можно отличить кажущуюся константу Михаэлиса от истинной, рассмотрим несколько примеров.

1. Полное конкурентное ингибирование:



Начальная скорость данной реакции зависит от концентраций реагентов следующим образом (если  $[S]_0 \gg [E]_0$  и  $[I]_0 \gg [E]_0$ ) (рис. 2):

$$\begin{aligned}
 v &= \frac{k_2[E]_0[S]_0}{[S]_0 + \left(\frac{k_{-1} + k_2}{k_1}\right)\left(1 + \frac{k_3[I]_0}{k_{-3}}\right)} = \frac{V[S]_0}{[S]_0 + K_m\left(1 + \frac{[I]_0}{K_i}\right)} \\
 &= \frac{V^{app}[S]_0}{[S]_0 + K_m^{app}}, \quad (19)
 \end{aligned}$$

где  $K_m = (k_{-1} + k_2)/k_1$ ;  $K_i = k_{-3}/k_3$ . В соответствии с предложенными обозначениями  $K_m = K_{вн}$ ,  $K_m^{app} = K_M^{app}$ .

Из уравнения (19) видно, что  $K_m^{app}$  является функцией истинной константы Михаэлиса  $K_m$ , константы ингибирования  $K_i$  и концентрации ингибитора  $[I]_0$ . В данном случае из на-

бора  $K_m^{app}$ , вычисленных при различных концентрациях ингибитора, мы можем рассчитать и истинную константу Михаэлиса  $K_m$  по отрезку, отсекаемому на оси ординат прямой, построенной в координатах  $K_m^{app} - [I]_0$  (рис. 4).

Зависимость кажущейся константы Михаэлиса  $K_m^{app}$  от концентрации ингибитора говорит о том, что эта константа константой не является, поскольку она меняет свое значение в зависимости от концентрации одного из реагентов (см. рис. 3–4). Такое поведение является одним из признаков кажущихся констант. При этом истинная константа Михаэлиса в соответствии с уравнением (8) остается неизменной при любых концентрациях  $E$ ,  $S$  и  $I$  (рис. 4).

Из уравнения (19) также следует, что кажущаяся предельная скорость  $V^{app}$ , рассчитанная на основании зависимости начальной скорости реакции от концентрации субстрата, не изменяется от концентраций  $S$  и  $I$  (рис. 3) и по физическому смыслу соответствует предельной скорости  $V$ , входящей в уравнение Михаэлиса–Ментен, – см. уравнение (9). Однако предельную скорость, входящую в уравнение Михаэлиса–Ментен (7) и выраженную посредством уравнения (9), нельзя назвать истинной константой (с точки зрения физического смысла) и вообще константой (с точки зрения неизменности), поскольку она также зависит от концентрации одного из реагирующих веществ (от концентрации энзима), т.е. она является, по существу, кажущейся константой. Поэтому два значения предельной скорости сравнивать бессмысленно, не принимая во внимание соответствующие концентрации энзима. Можно сравнивать только соотношения предельной скорости и соответствующей концентрации энзима, т.е. константы скорости  $k_2$ , которые являются истинными константами. Истинная константа  $k_2$  характеризует вторую (необратимую) стадию реакции (1) или аналогичную стадию в составе более сложного механизма, например (18), т.е. она представляет собой удельную скорость самопроизвольного распада комплекса  $ES$  до конкретного  $P$ . Как истинная константа скорости она не зависит ни от концентрации комплекса  $ES$ , ни от концентраций других веществ.

Кажущаяся предельная скорость  $V^{app}$ , как и кажущаяся константа Михаэлиса  $K_m^{app}$ , часто является функцией различных параметров энзиматической системы и показывает, какую самую большую скорость образования продукта можно достичь в рамках исследуемой энзиматической реакции. Однако значение  $V^{app}$

в большинстве случаев отличается от  $V$ , выраженной уравнением (9), поскольку вследствие более сложного механизма исследуемой реакции оказывается невозможным перевести весь исходный  $E$  в комплекс  $ES$  даже при значительном превышении общей концентрации  $S$  над общей концентрацией  $E$ , потому что последний расходуется не только на связывание с  $S$ , но также связывается и с другими участниками реакции. Вторым фактором, обуславливающим различие между значениями  $V^{app}$  и  $V$  является то, что комплекс  $ES$  может распадаться до  $P$  не прямо в одну стадию с константой скорости  $k_2$ , как представлено на схеме (1), а через несколько стадий. Поэтому для эффективной предельной скорости часто используют формулу [21]:

$$V^{app} = k_{cat} \cdot [E]_0, \quad (20)$$

где  $k_{cat}$  является параметром, учитывающим все вышеуказанные влияния на предельную скорость изучаемой реакции.

Как отмечалось ранее, если  $k_{-1} \gg k_2$ , то истинную константу Михаэлиса  $K_m$  можно рассматривать как константу диссоциации комплекса  $ES$  (1) [2–8, 18, 21, 22]:

$$K_s = k_{-1}/k_1. \quad (21)$$

Некоторые исследователи считают, что соотношение  $k_{-1} \gg k_2$  справедливо для большинства энзиматических реакций, а потому константа Михаэлиса  $K_m$  по величине практически совпадает с константой диссоциации  $K_s$  [12, 21]. Однако такое заключение может быть отнесено только к реакциям, протекающим по механизму (1) (если надежно установлено, что  $k_{-1} \gg k_2$ ). Для реакций с более сложными механизмами, т.е. для кажущихся констант Михаэлиса, оно не применимо, хотя иногда утверждается обратное [21]. Это можно проверить на примере реакции (18). Из уравнения (19) следует, что кажущаяся константа Михаэлиса  $K_m^{app}$  может быть намного больше истинной константы Михаэлиса  $K_m$ , а, соответственно, и субстратной константы  $K_s$ . При больших концентрациях ингибитора, когда  $[I]_0 \gg K_i$ , даже при соблюдении условия, что  $k_{-1} \gg k_2$ ,  $K_m^{app}$  может намного превышать  $K_s$  (например, из рис. 3 следует, что при концентрации ингибитора 5 мМ  $K_m^{app}$  превышает  $K_s$  в 26 раз).

Константа ингибирования  $K_i$  по смыслу аналогична субстратной константе  $K_s$  – это также константа диссоциации, но не комплекса  $ES$ , а комплекса  $EI$ . Важность этих констант состоит в том, что они позволяют

оценить сродство  $E$  с соответствующим компонентом энзиматической реакции. Однако величину сродства мы можем оценить только по значениям истинных констант  $K_1$  и  $K_s$  (т.е. констант, относящихся к элементарным стадиям образования соответствующих комплексов). Недостаточно четкое представление о том, с какими константами, истинными или кажущимися, мы имеем дело, может привести нас к неправильной интерпретации полученных результатов и к ошибочным выводам. В качестве примера рассмотрим статью В. Рогожина и Т. Рогожиной [23].

Целью данной работы было изучение влияния индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) на пероксидазное окисление, в частности, о-дианизидина (ОДН) в широком диапазоне рН.

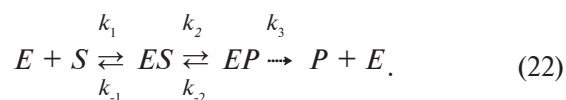
Авторы отмечают: «Связывание ИУК с пероксидазой зависит от рН среды. Так, в реакциях пероксидазного окисления ОДН величина  $K_1$  при рН 4,5–7,0 изменяется в диапазоне от 9,6 до 0,72 мкМ, т.е. с возрастанием рН сродство ингибитора к энзиму может повышаться в 13,3 раза». Похожую фразу можно прочитать также, например, и в работе [24]. Как мы отмечали выше, сродство  $I$  к  $E$  можно оценивать только по значению истинной константы ингибирования, расчет которой и является целью исследований с применением обратимых ингибиторов [25, 26]. Но истинная константа ингибирования не может зависеть от концентраций других участников энзиматического процесса: субстратов, ингибиторов, активаторов, кофакторов, ионов металлов и протонов (т.е. рН): она должна быть неизменной константой. У авторов статьи она изменяется в зависимости от рН, а это означает, что они имеют дело с кажущейся константой ингибирования, которая является функцией концентрации ионов водорода.

Кажущуюся константу ингибирования авторы получают потому, что для ее расчета используют простую схему, соответствующую конкурентному ингибированию аналогичную (18), поскольку такой тип ингибирования был установлен для данной реакции на основе построения графика в координатах Лайнуивера–Берка, в то время как истинный механизм исследуемой реакции намного сложнее. Как пишут авторы, ИУК является субстратом энзима пероксидазы (а в исследуемом случае авторы рассматривают ИУК только как ингибитор), а окисление ИУК пероксидазой протекает через образование тройного комплекса энзим-ИУК-кислород. Кроме того, как мы

видели выше, на скорость реакции оказывает существенное влияние также рН. Естественно, что простая схема (18) не может адекватно описывать такой сложный механизм, а, следовательно, по уравнению (19) невозможно рассчитать истинную константу ингибирования. Кажущаяся же константа ингибирования не может служить мерой сродства, поскольку является функцией концентрации протонов (а, может быть, и других участников реакции). Вследствие зависимости от концентраций реактантов, абсолютная величина кажущейся константы диссоциации может значительно отличаться от истинной.

Далее авторы снова применяют тот же подход: «Показано, что увеличение гидрофобности аминокислоты повышает сродство ауксина (т.е. ИУК) к энзиму». По кажущимся константам диссоциации нельзя судить о сродстве, а поэтому и предположение, сделанное авторами, что «преимущественным местом связывания ИУК и ОДН в активном центре пероксидазы, по-видимому, должна быть гидрофобная область», оказывается не имеющим под собой веских оснований.

2. Трехстадийная реакция, подчиняющаяся кинетике Михаэлиса–Ментен [6]:



Начальная скорость данной реакции зависит от концентраций реагентов следующим образом (если  $[S]_0 \gg [E]_0$ ):

$$v = \frac{k_3[E]_0[S]_0}{[S]_0(1 + K_m^{EP}) + [(k_{-1} + k_2)/k_1]K_m^{EP} - k_{-2}/k_1} = \frac{k_3[E]_0[S]_0}{(1 + K_m^{EP})[S]_0} = \frac{V^{app}[S]_0}{[S]_0 + K_m^{app}}, \quad (23)$$

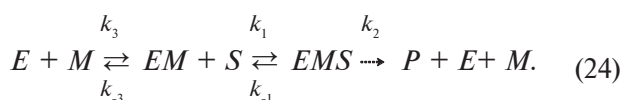
где  $K_m^{ES} = (k_{-1} + k_2)/k_1$ ;  $K_m^{EP} = (k_{-2} + k_3)/k_2$ . В соответствии с предложенными обозначениями  $K_m^{app} = K_m$ ,  $K_m^{ES} = K_{2dS}^{ES}$ ,  $K_m^{EP} = K_{2dES}^{EP}$ .

Из уравнения (23) видно, что  $K_m^{app}$  является функцией только констант скорости, а поэтому ее величина не изменяется в зависимости от концентраций реагирующих веществ. С этой точки зрения (постоянства, независимости от концентраций) она может быть названа истинной константой, но не истинной константой Михаэлиса  $K_m$  (если это выразить в предложенной терминологии, то кажущаяся константа Михаэлиса  $K_m^{app}$  для данного

механизма является истинной  $K_m$  и нет необходимости уточнять, что она не является константой Бриггса–Холдейна ( $K_{BH}$ ), поскольку имеет другой физический смысл, так как он является еще одним признаком кажущихся констант. Мы можем видеть, что в состав кажущейся константы Михаэлиса  $K_m^{app}$ , входит константа  $K_m^{ES}$  (истинная константа, поскольку является функцией только констант скорости элементарных стадий), которая с первого взгляда очень похожа на истинную константу Михаэлиса, выраженную уравнением (8). Однако из схемы (22) видно, что стадия, которая характеризуется константой скорости  $k_2$ , заключается не в распаде комплекса  $ES$  до  $P$ , как в случае модели Михаэлиса–Ментен, а в превращении его в другой комплекс. Поэтому константа  $K_m^{ES}$  не является истинной константой Михаэлиса в смысле, выраженном в уравнении (8) (в предложенной терминологии  $K_m^{ES}$  является двунаправленной константой диссоциации комплекса  $ES$ , а не  $K_{BH}$ ). Из-за отсутствия стадии распада комплекса  $ES$  до продукта, истинная константа Михаэлиса  $K_m$  в смысле, выраженном в уравнении (8) (в предложенной терминологии  $K_{BH}$ ) для рассматриваемого механизма рассчитана быть не может. В исследуемом механизме есть только одна стадия (первая), соответствие которой можно найти в модели Михаэлиса–Ментен, поэтому при изучении реакции, протекающей по данному механизму (23), в идеальном случае можно определить значения только двух констант скорости  $k_1$  и  $k_{-1}$  (или их соотношение), которые находят свое отражение в механизме реакции (1).

Из эффективной предельной скорости  $V^{app}$  можно рассчитать константу  $k_{cat} = k_3 / (1 + K_m^{EP})$ , также имеющую другой физический смысл, чем истинная константа  $k_2$  в модели Михаэлиса–Ментен, а поэтому являющаяся кажущейся.

3. Трехстадийная реакция с участием активатора – катиона металла ( $M$ ), также подчиняющаяся кинетике Михаэлиса–Ментен [27]:



В стационарном приближении для такого механизма можно получить следующее уравнение начальной скорости (если  $[S]_0 \gg [E]_0$  и  $[M]_0 \gg [E]_0$ ):

$$v = \frac{k_2[E]_0[S]_0}{[S]_0(1 + \frac{k_2}{k_3[M]_0}) + K_m^{EMS}(1 + \frac{K_s^M}{[M]_0})} = \frac{k_2 k_3 [E]_0 [M]_0 [S]_0}{k_3 [M]_0 + k_2 [S]_0} = \frac{V^{app} [S]_0}{[S]_0 + K_m^{app}}, \quad (25)$$

где  $K_m^{EMS} = (k_{-1} + k_2)/k_1$ ;  $K_s^M = k_{-3}/k_3$ . В соответствии с предложенными обозначениями  $K_m^{app} = K_m^{app}$ ,  $K_m^{EMS} = K_{2dS}^{EMS}$ .

Сопоставив два механизма реакций (24) и (1) можно увидеть, что в них нет ни одной одинаковой стадии. Поэтому в результате исследования реакции, протекающей по механизму (24), мы не сможем рассчитать ни константы скорости образования комплекса  $ES$  из  $E$  и  $S$  (точнее из свободных энзима и субстрата), ни констант скорости распада этого комплекса до  $E$  и  $S$  и до  $P$ , а также истинную константу Михаэлиса в соответствии с уравнением (8) (т.е.  $K_{BH}$ ). Тем не менее, кинетика исследуемой реакции соответствует кинетике Михаэлиса–Ментен и, как следует из уравнения (25), для нее мы можем рассчитать кажущуюся константу Михаэлиса  $K_m^{app}$ . Зная, что изучаемая реакция протекает по механизму (24) и, получив для нее уравнение начальной скорости (25), мы можем рассчитать две истинные константы:  $K_m^{EMS}$  и  $K_s^M$ . Константа  $K_m^{EMS}$  является истинной, потому что мы применили для описания экспериментальных кинетических данных уравнение, полученное на основе анализа правильно установленного механизма, и выяснили, что данная константа является функцией только констант скорости элементарных стадий. Однако физический смысл истинной константы  $K_m^{EMS}$  отличается от физического смысла истинной константы Михаэлиса  $K_m$ , вытекающего из модели Михаэлиса–Ментен ( $K_{2dS}^{EMS}$  не является  $K_{BH}$ ). Ведь в данном случае  $S$  связывается не непосредственно с  $E$  (свободным энзимом), а с комплексом энзим–металл ( $EM$ ).

Если рассчитать кажущуюся константу Михаэлиса  $K_m^{app}$  для энзиматической реакции с неизвестным механизмом по уравнению (14), то, нам кажется, что у многих исследователей эта константа будет ассоциироваться с образованием–распадом комплекса  $ES$ , хотя, как в случае с реакцией, протекающей по механизму

му (24), такой комплекс может вовсе не образовываться и соответственно не распадаться. Конечно, комплекс любой сложности можно назвать энзим-субстратным, поскольку в него входят и  $E$  и  $S$ . Часто называют энзимом не только энзим в свободном (несвязанном) состоянии, но также и протонированные или депротонированные его формы, и даже связанные с активаторами или ингибиторами. Например, часто употребляется фраза: «присутствие ингибитора влечет за собой уменьшение сродства энзима к субстрату» [5]. Это означает, что сродство субстрата  $S$  к комплексу  $EI$  меньше, чем к свободному энзиму  $E$  (нам кажется, что в таком виде фраза более точно передает смысл предложения). Считается, что комплексы субстрата с металлами также иногда могут выступать в качестве субстрата, например, показано, что комплекс АТФ с магнием ( $MgATP$ ) является субстратом многих энзимов (гексокиназы, пируваткарбоксилазы, креатинкиназы [28], Са-АТФ-азы саркоплазматического ретикулума, Na, К-АТФазы из различных источников [29]). С такой точки зрения можно рассматривать, например, в качестве энзима комплекс  $EHCa$ , образованный протонированной формой Са-АТФ-азы ( $EH$ ) с  $Ca^{2+}$ , а в качестве субстрата комплекс  $MgATP$ , образованный дважды депротонированной формой АТФ ( $ATP^{2-}$ ) с  $Mg^{2+}$ . Тогда образовавшийся комплекс  $EHCa-MgATP$  формально можно назвать энзим-субстратным, хотя, по нашему мнению, это не совсем правильно, поскольку, хотя в данный комплекс и входят энзим и субстрат, однако они не связываются непосредственно друг с другом. В любом случае, независимо от терминологии, исследователь должен четко представлять, с чем он имеет дело.

Почему мы так подробно останавливаемся на различиях истинных и кажущихся константах Михаэлиса? Потому что в литературе нет четкого определения истинной и кажущейся константы Михаэлиса, в подавляющем большинстве случаев невозможно понять о какой константе Михаэлиса идет речь (об истинной или кажущейся), а недостаточно четкое понимание разницы между истинной и кажущейся константами Михаэлиса может привести к принятию неверных решений в планировании эксперимента, к неправильной интерпретации полученных результатов и ошибочным выводам (детальнее — в следующей статье).

Таким образом, при исследовании энзиматических реакций схема механизма, используемая для анализа кинетики, должна макси-

мально соответствовать реальной. При этом, полученное в результате анализа такой схемы кинетическое уравнение должно адекватно описывать зависимости начальной скорости реакции от концентраций субстрата, активатора, ингибитора в широком интервале их концентраций.

Если точный механизм неизвестен, следует рассматривать все возможные механизмы, которые могут соответствовать полученным кривым. Иногда для рассмотрения выбирают механизм из соображений простоты, не учитывая того, что полученные данные равным образом могут относиться к другим механизмам. Обычно большую часть предложенных механизмов можно исключить, если тщательно проанализировать все имеющиеся возможности [3, 4, 27, 29]. Этот момент очень часто недооценивается исследователями, которые нередко ограничиваются рассмотрением только одного механизма.

Концентрации реагирующих веществ и константы скорости, входящие в кинетическое уравнение в качестве параметров, могут иногда быть объединены в новые константы. Эти новые константы могут состоять также только из констант скорости, и в таком случае могут быть названы истинными константами с точки зрения неизменности, независимости от концентраций (т.е. действительно неизменными, подобно истинным константам скорости), однако не могут называться истинными, а, по существу, с точки зрения физического смысла являются кажущимися. Если же эти новые константы являются функциями концентраций, то они только кажутся константами (с точки зрения неизменности, независимости от концентраций они могут рассматриваться как константы, но только при данных неизменных концентрациях реактантов), а поэтому называются кажущимися константами.

Истинными являются константы скорости элементарных стадий реальных механизмов, а истинная константа Михаэлиса выражается уравнением (7). Значения истинных констант не зависят от концентраций реактантов, активаторов, ингибиторов, посторонних веществ и pH.

Истинные константы могут быть определены только для надежно установленного механизма (и, соответственно, точно установленного числа участников реакции), для которого получено уравнение начальной скорости (предпочтительно в стационарном приближении, поскольку иногда форма уравнений, полученных в равновесном приближении, от-

личается от формы уравнений, полученных в стационарном приближении [5]), из которого виден физический смысл этих констант и которое позволяет найти способ их расчета.

Конечно, не всегда удастся получить уравнение начальной скорости или найти способы определения кинетических констант, так что приходится использовать уравнение Михаэлиса–Ментен для кинетического анализа. Но в таких случаях надо отдавать себе отчет в том, что мы будем иметь дело с эффективными константами и не делать далеко идущих выводов о механизме исследуемой реакции (если предварительно не было проведено теоретическое рассмотрение возможных механизмов для изучаемой энзиматической реакции) и средстве компонентов.

Кажущиеся константы скорости — это такие константы скорости сложной реакции, которые наблюдаются при описании ее уравнением простой реакции. Так же и константа Михаэлиса, рассчитанная на основании половины предельной скорости в соответствии с уравнением (14), является кажущейся константой. Кажущиеся константы могут быть функциями нескольких истинных констант скорости и/или концентраций реагирующих веществ. Они не имеют ясного физического смысла, обеспечивая лишь формальную связь между скоростью реакции и концентрацией реактанта вне зависимости от изучаемого механизма.

Если же и истинная, как нам кажется, константа Михаэлиса изменяется в каких-то условиях, значит, либо выбранный нами механизм не соответствует истинному, либо в энзиматической системе присутствуют компоненты, оказывающие влияние на процесс, на которые мы не обратили внимания — в любом случае изменяющаяся константа является не истинной, а эффективной. «Никогда нельзя быть уверенным, что предполагаемый механизм реакции абсолютно верен; можно лишь утверждать, что пока еще он не опровергнут.

Следует постоянно быть готовым к тому, чтобы поменять свою точку зрения, когда этого потребуют новые данные» [30].

## ПРО ІСТИННІ ТА УЯВНІ КОНСТАНТИ МІХАЕЛІСА В ЕНЗИМОЛОГІЇ.

### І. ОЗНАКИ ВІДМІННОСТІ

*С. О. Карахим*

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна  
НАН України, Київ;  
e-mail: laserlab@biochem.kiev.ua

Розглянуті відмінності між істинними та уявними константами швидкості і константами Міхаеліса. Істинними є константи швидкості елементарних стадій реальних механізмів і можуть бути визначені тільки для надійно встановленого механізму, для якого отримане рівняння початкової швидкості, з якого випливає фізичний зміст цих констант і яке дозволяє знайти спосіб їх розрахунку. Істинна константа Міхаеліса  $K_m$  виражається рівнянням  $K_m = (k_{-1} + k_2)/k_1$ . Значення істинних констант не залежать від концентрацій реактантів, активаторів, інгібіторів, сторонніх речовин та рН.

Уявні константи швидкості — це такі константи швидкості складної реакції, які визначаються при описанні її рівнянням простої реакції. Вони можуть бути функціями декількох істинних констант швидкості та/або концентрацій реагуючих речовин і не мають чіткого фізичного змісту, забезпечуючи лише формальний зв'язок між швидкістю реакції та концентрацією реактанту незалежно від досліджуваного механізму. Константа Міхаеліса, розрахована на основі половини граничної швидкості, є уявною константою.

**Ключові слова:** кінетика ензиматичних реакцій, рівняння Міхаеліса–Ментен, константа Міхаеліса, гранична швидкість, субстратна константа.

## ON TRUE AND APPARENT MICHAELIS CONSTANTS IN ENZYMOLOGY.

## I. DIFFERENCES

S. O. Karakhim

Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: laserlab@biochem.kiev.ua

## Summary

Differences between both true and apparent rate constants and Michaelis constants have been examined. Rate constants of elementary stages of real mechanisms are true ones. True Michaelis constant  $K_m$  is expressed by equation  $K_m = (k_{-1} + k_2)/k_1$ . True constants may be determined for reliable mechanism only for which the equation of initial rate was obtained which displays physical sense of these constants and permits to find the method of their calculation. The true constant values are independent of concentration of reactants, activators, inhibitors, extraneous agents and pH.

The apparent rate constants are such constants of the composite reaction which are observed when this reaction is described by the equation of simple reaction. Michaelis constant calculated by a half of the ultimate constant is an apparent constant. The apparent constants may be functions of several true rate constants and/or concentrations of reacting substances. The evident physical sense of apparent constants being absent, only formal relation between the reaction rate and reactant concentration independent of the investigated mechanism is provided.

**Key words:** enzyme kinetics, Michaelis-Menten equation, Michaelis constant, limiting rate, substrate constant.

1. Michaelis L., Menten M. L. // *Biochem. Z.*— 1913.— **49**. — P. 333–369.
2. Briggs G. E., Haldane J. B. S. // *Biochem. J.*— 1925.— **19**. — P. 338–339.
3. Варфоломеев С. Д., Гуревич К. Г. Биокинетика. — М.: Фаир-Пресс, 1999. — 720 с.
4. Уэбб Л. Ингибиторы ферментов и метаболизма. — М.: Мир, 1966.— 864 с.
5. Курский М. Д., Костерин С. А., Рыбальченко В. К. Биохимическая кинетика. — Киев: Вища школа, 1977. — 264 с.
6. Березин И. В., Варфоломеев С. Д. Биокинетика. — М.: Наука, 1979. — 312 с.
7. *Fundamentals of Enzyme Kinetics / Revised edition by Athel Cornish-Bowden. Third reprint.*— Portland Press — London, 2002. — 344 p.
8. Garrett R. H., Grisham C. M. *Biochemistry. Fourth edition.*— Brooks/Cole Cengage Learning, 2010.— 1060 p.
9. *Биохимия: Учебник / Под ред. Е. С. Северина.* — 2-е изд., испр. — М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. — 784 с.
10. Губський Ю. І. Біологічна хімія: Підручник. — Київ-Тернопіль: Укрмедкнига, 2000. — 508 с.
11. Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э., Хилл Р., Леман И. Основы биохимии: В 3-х томах. — М.: Мир, 1981. — Т. 1. — 534 с.
12. Страйер Л. Биохимия. — М.: Мир, 1984. — Т. 1. — 232 с.
13. *Symbolism and Terminology in Enzyme Kinetics // Eur. J. Biochem.* — 1982.— **128**. — P. 281–291.
14. Дикерсон Р., Грей Г., Хейт Дж. Основные законы химии. Т. 1.— М.: Мир, 1982.— 652 с.
15. Slater E. C., Bonner W. D. // *Biochem. J.* — 1952. — **52**(2).— P. 185–196.
16. Болдырев А. И. Физическая и коллоидная химия. — М.: Высшая школа, 1974. — 504 с.
17. Волькенштейн М. В. Биофизика: Учеб. руководство. — 2-е изд. — М.: Наука, 1988. — 592 с.
18. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. — М.: Изд-во Иностранной литературы, 1961. — 728 с.
19. Рубин А. Б., Пытьева Н. Ф., Ризниченко Г. Ю. Кинетика биологических процессов: Учеб. пособие. — 2-е изд. — М.: Изд-во МГУ, 1987. — 304 с.
20. Кнорре Д. Г., Мызина С. Д. Биологическая химия: Учеб. для хим., биол. и мед. спец. вузов. — 3-е изд. — М.: Высш. шк., 2000. — 479 с.
21. Березин И. В., Клесов А. А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. — М.: Изд-во МГУ, 1976. — 320 с.
22. Келети Т. Основы ферментативной кинетики. — М.: Мир, 1990. — 350 с.
23. Рогожин В. В., Рогожина Т. В. // *Электронный журнал «Исследовано в России».* — 2003. — Т. 6. — С. 918–933. (<http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2003/081.pdf>)
24. Бура М. В. // *Фізика живого.* — 2009. — **17**, № 2. — С. 44–48.
25. Yoshino M. // *Biochem. J.* — 1987. — **248**. — P. 815–820.
26. Карахим С. О., Костерин С. О., Жук П. Ф. // *Доп. НАН України.* — 2010. — № 10. — С. 179–183.

27. *Карахим С. А., Горчев В. Ф.* // Укр. біохім. журн. – 2006. – **78**, № 1. – С. 149–162.
28. *Диксон М., Уэбб Э.* Ферменты. – М.: Мир, 1982. – Т. 2. – 515 с.
29. *Карахим С. О., Горчев В. Ф., Костерін С. О.* // Укр. біохім. журн. – 2007. – **79**, № 2. – С. 97–113.
30. *Дикерсон Р., Грей Г., Хейт Дж.* Основные законы химии. – М.: Мир, 1982. – Т. 2. – 620 с.

Получено 30.06.2011