

ЭЛЕКТРОН-КОЛЕБАТЕЛЬНЫЕ ВОЗБУЖДЕННЫЕ КОМПЛЕКСЫ В ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЯХ

© 2020 г. Н.Л. Векшин

Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3

E-mail: nvekshin@rambler.ru

Поступила в редакцию 07.07.2018 г.

После доработки 04.09.2019 г.

Принята к публикации 19.09.2019 г.

Проведен анализ энергетического профиля процесса ферментативного катализа. Сделано заключение, что использование феноменологического уравнения Аррениуса и равновесных термодинамических параметров теории активированного комплекса Эйринга не позволяет адекватно объяснить механизм катализа. В фермент-субстратном комплексе в ходе всех стадий в реальности резко нарушается максвелл-больцмановское распределение молекул по энергиям, что эквивалентно мгновенному повышению локальной неравновесной температуры. Ферментативные стадии не являются равновесными и изотермическими. Сорбция субстрата на ферменте приводит (за счет нейтрализации зарядов или диполей) к локальному высвобождению большой энергии, достаточной для разрыва ковалентной связи или переноса электрона с образованием переходного электрон-колебательно-возбужденного комплекса. Именно энергия этих комплексов обеспечивает протекание дальнейших, более медленных, стадий (перегруппировка или перенос атомов, десорбция продукта). Ферментативные реакции идут через образование неравновесных электрон-колебательных возбужденных комплексов, кинетически не подчиняющихся термодинамике в стиле Эйринга.

Ключевые слова: ферменты, катализ, энергия активации, уравнение Аррениуса, переходный комплекс, теория Эйринга, электронно-возбужденные состояния.

DOI: 10.31857/S000630292002026X

ФЕНОМЕН КАТАЛИЗА

Феномен катализа – колоссального (в тысячи и миллионы раз) увеличения скорости – является одним из важнейших признаков ферментативных реакций [1, 2]. С термодинамической точки зрения катализ обусловлен двумя факторами – энтальпийным (энергетическим) и энтропийным (стерическим) [3, 4]. Первый из них заключается в энергетическом выигрыше при присоединении субстрата к ферменту в ходе нейтрализации (частичной или полной) разноименных зарядов, а также в ходе образования ионных и водородных связей. Второй заключается в том, что, соединяясь с ферментом, субстрат в значительной степени очищается от водной «шубы» и располагается в пространстве нужным образом. При этом фермент ограничивает число степеней свободы, направляя реакцию вдоль определенной пространственной координаты.

Сокращение: ЭКВК – электрон-колебательный возбужденный комплекс.

ОБ УРАВНЕНИЯХ АРРЕНИУСА И ЭЙРИНГА

Традиционные представления об энергетическом профиле ферментативных процессов [1–4] основаны на феноменологическом уравнении Аррениуса, предложенном еще в позапрошлом веке, и теории переходного активированного комплекса, предложенной Г. Эйрингом в середине прошлого века. В уравнении Аррениуса фигурируют энергия активации и температура, экспоненциально связанные со скоростью реакции. В уравнении Эйринга фигурируют термодинамические параметры – свободная гиббсовская энергия, энтропия, энтальпия, а также температура, причем эти параметры приписаны субстрат-ферментному переходному комплексу [5]. В основе теории Эйринга лежит, в частности, постулат о том, что во время течения реакции не нарушается максвелл-больцмановское распределение молекул по энергиям. Иными словами, в активных центрах ферментов не должно появляться неравновесных «горячих» промежуточных комплексов или продуктов, температура которых отличалась бы от температуры среды [4, 5].

Формальная замена аррениусовской энергии активации на свободную энергию Гиббса, сделанная Эйрингом и соавторами [5], не имеет физического смысла, ибо термодинамика применима только для нахождения баланса процесса, но не для описания пути реакции, ее механизма. Использование уравнения Аррениуса и теории Эйринга не позволяет адекватно объяснить понижение энергетического активационного барьера ферментом.

ВОЗБУЖДЕННЫЕ СОСТОЯНИЯ

Никаких экспериментальных доказательств постулата Аррениуса об особых «активных молекулах» и постулата Эйринга о равновесном распределении по энергии в ходе катализа не существует. Наоборот, во множестве каталитических реакций найдены неравновесные электронные и колебательные возбужденные состояния, детектируемые по хемилюминесценции [6], биолюминесценции [7] и инфракрасному излучению [8–10]. В ходе обычных ферментативных процессов в ряде случаев регистрируется сигнал электронного парамагнитного резонанса [11, 12], что говорит о наличии триплетных возбужденных состояний. Введя акцептор энергии, можно по его излучению выявить наличие таких состояний, как это было сделано, например, для пероксидазы [13].

ЧИСЛО АКТИВНЫХ МОЛЕКУЛ

При повышении температуры на 10 градусов, как известно, скорость ферментативных реакций возрастает как минимум вдвое [1, 2]. Аррениус и затем Эйринг объясняли это возрастанием доли «активных» молекул. Такое объяснение ошибочно. Например, при 300 К и 310 К различие составляет 1,03 раза, но никак не 2 раза. Это элементарно находится при объединении двух аррениусовских уравнений:

$$a_1/a_2 = \exp\{E_{\text{иа}}(T_2 - T_1)/(RT_1 T_2)\}, \quad (1)$$

где $E_{\text{иа}}$ – истинная энергия активации, a_1 – количество активных молекул при температуре T_1 , a_2 – количество активных молекул при повышенной температуре T_2 .

РОЛЬ ВЯЗКОСТИ

На самом деле увеличение скорости работы ферментов при некотором повышении температуры в значительной степени обусловлено тривиальным диффузионным фактором – понижением вязкости растворителя [14, 15]. Например, при увеличении температуры от 10 до 30°C вязкость воды падает от 1.3 до 0.8 пуаз [16]. Кроме того, повышение температуры уменьшает микровязкость

белковой глобулы и повышает ее конформационную подвижность [17]. Указанные обстоятельства ни Аррениусом, ни Эйрингом в расчет не принимались.

ЭНЕРГИЯ АКТИВАЦИИ

В уравнение Аррениуса принято подставлять температуру среды (T) и считать ее неизменной в ходе всех элементарных стадий ферментативного процесса. Измеряя зависимость скорости реакции от T , можно найти некоторую энергию активации E_a . Как было показано в работе [18], эта E_a является кажущейся и не имеет прямого отношения к истинной энергии активации – энергии, необходимой для начала протекания реакций внутри субстрат-ферментного комплекса. Автор работы [18] правильно указал на некорректность аррениусовской интерпретации и на неприменимость равновесной термодинамики для описания работы ферментов. Истинная энергия активации – это энергия, необходимая для преодоления активационного барьера реакции, т. е. для активации субстрата, а кажущаяся – та, которая определяется по уравнению Аррениуса из зависимости скорости при разных температурах. Кажущаяся энергия активации обусловлена прежде всего диффузионными факторами, вязкостью среды [14], а также микровязкостью самого фермента.

ЭЛЕКТРОННЫЕ И ЯДЕРНЫЕ ПЕРЕХОДЫ

Еще один недостаток теории Эйринга состоит в том, что в качестве «координаты реакции» рассматривается расстояние между ядрами, а нужно брать расстояние между ядрами и электронами. Ведь в первую очередь именно электронные орбитали участвуют во взаимодействиях [19]. Электронные переходы происходят мгновенно, а ядра затем медленно перестраиваются в новую конфигурацию [20]. Авторы работы [20] четко указали на роль возбужденных состояний в ферментативных реакциях и даже рассчитали этот вклад для некоторых реакций, но при этом они не рассматривали процессы как неравновесные, идущие при высокой внутримолекулярной температуре. Энергетический вклад ядерных (колебательных) движений на порядок меньше, чем электронных. При этом электрон-колебательные переходы квантованы, дискретны, что принципиально отличается от непрерывной траектории движения в теории Эйринга.

ЭНЕРГИЯ ХЕМОСОРБЦИИ

При сорбции субстрата на ферменте высвобождается большой квант энергии хемосорбции $E_{\text{хем}}$ [4, 20], который заведомо превышает величину E_a . Этот квант почти весь используется для

безактивационного протекания дальнейших стадий. При полной нейтрализации двух разноименных электрических зарядов величина $E_{\text{хем}}$ может быть найдена по следующему уравнению:

$$E_{\text{хем}} = 2.15 \times 10^6 N q_1 q_2 / r \epsilon, \quad (2)$$

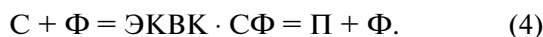
где q_1 и q_2 – величины положительного и отрицательного заряда, N – число Авогадро, r – конечное расстояние между нейтрализующимися зарядами, ϵ – диэлектрическая проницаемость (причем не внешней среды, а групп субстрата и активного центра фермента). При $r = 1,5 \text{ \AA}$ (длина ковалентной связи) и $\epsilon = 1$ получаем максимальную $E_{\text{хем}} = 250$ ккал/моль. Этой энергии достаточно для разрыва любой ковалентной связи. Для ферментов можно брать именно $\epsilon \sim 1$, так как молекулы воды ($\epsilon = 81$) обычно не помещаются между нейтрализующимися группами. При неполной нейтрализации зарядов (диполи и т. д.) и при $\epsilon > 1$ величина $E_{\text{хем}}$ может оказаться меньше, но все равно она выше энергии активации. Формулу по нейтрализации зарядов можно использовать для конкретных ферментативных реакций, если известны заряды и дипольные моменты, расстояния и диэлектрическая постоянная.

ЭЛЕКТРОН-КОЛЕБАТЕЛЬНЫЕ ВОЗБУЖДЕННЫЕ КОМПЛЕКСЫ

Величина $E_{\text{хем}}$ связана с энтальпийным членом ΔH гиббсовской свободной энергии ΔG . Не вся $E_{\text{хем}}$ тратится для совершения полезной работы, ибо небольшая часть теряется в тепло. Теплота сорбции ΔH (энтальпия), измеряемая калориметрически, представляет собой малую потерянную энергию:

$$\Delta H = E_{\text{хем}} - E^*, \quad (3)$$

где E^* – энергия переходного электрон-колебательного возбужденного комплекса (ЭКВК). Потеря небольшой (колебательной) части энергии в тепло при сорбции субстрата (С) на ферменте (Ф) обеспечивает необратимость протекания дальнейших стадий. При этом обратимость ферментативной реакции, как таковой, сохраняется (прямой и обратный путь совпадают):



Возникший ЭКВК быстро перестраивается и затем трансформируется в продукт (П). Это происходит раньше, чем ЭКВК успеет релаксировать в равновесное состояние. Именно энергия ЭКВК в конечном счете обеспечивает протекание дальнейших стадий – перегруппировку, перенос электронов или групп, десорбцию продукта реакции.

Не случайно в монографии М.В. Волькенштейна с соавторами [20] для описания энергетического

профиля энзиматических реакций были привлечены представления о том, что в активном центре фермента происходит смешивание молекулярных орбиталей основного и возбужденного состояния субстрата, изменяющие его геометрию, дипольный момент и рК.

Нужно отметить, что отсутствие свечения в ходе большинства энзиматических реакций вовсе не означает отсутствия ЭКВК. В таких реакциях энергия ЭКВК не высвечивается (в ультрафиолетовой или видимой области), а запасается в продукте и частично теряется в виде теплового инфракрасного излучения, поглощаемого водой.

ЛОКАЛЬНАЯ НЕРАВНОВЕСНАЯ ТЕМПЕРАТУРА

Ферментативные реакции не являются равновесными и изотермическими, поскольку в их ходе возбуждаются электронные степени свободы (с энергиями порядка 100 ккал/моль) или (и) колебательные (с энергиями порядка 10 ккал/моль).

Фермент понижает активационный барьер за счет возникновения ЭКВК. В ходе всех стадий сильно нарушается максвелл-больцмановское распределение молекул по энергиям, повышается локальная (неравновесная) температура в активном центре. Фермент всегда ведет реакцию при высокой неравновесной внутримолекулярной температуре. Локальная температура субстрата и активного центра совпадает с температурой среды только до и после каталитического акта, но в ходе акта – сильно не совпадает.

Здесь нужно особо заметить, что широко распространено мнение о том, что температура является мерой средней кинетической энергии, является далеко не полным. Это мнение верно для газов, где межмолекулярные взаимодействия пренебрежимо малы, а электронные и колебательные уровни не заселены. На самом же деле температура является мерой заселения всех степеней свободы молекул – вращательных, поступательных, колебательных и электронных [15, 21]. Например, при фотовозбуждении молекул в ультрафиолетовой и видимой области основной вклад дают электронные переходы, соответствующие неравновесным температурам в несколько тысяч градусов [17, 21].

ТЕМПЕРАТУРА, ЭНЕРГИЯ, ВОЛНОВОЕ ЧИСЛО, ЧАСТОТА

При 300 К средняя энергия молекул составляет, как известно, всего 0.6 ккал/моль [15], т.е. соответствует энергии поступательных и вращательных степеней свободы. В шкале волновых чисел 0.6 ккал/моль – это 200 см^{-1} , т.е. это дальний инфракрасный диапазон; в шкале частот это 10^{-12} с.

Если взять $\nu = 2000 \text{ см}^{-1}$ (6 ккал/моль), то в шкале частот это 10^{-10} с, т. е. это колебательные переходы. Если взять $\nu = 20000 \text{ см}^{-1}$ (60 ккал/моль), то получаем 10^{-9} с – типичное время жизни электронно-возбужденного состояния [17]. Именно за такое время осуществляется элементарный акт ферментативного катализа. Скорость же всей полной ферментативной реакции лимитируется самой медленной стадией – десорбцией продукта [1, 3, 17].

Пользуясь простой формулой Вина для спектра излучения при некоторой температуре [21] (или точнее – формулой Планка) и зная энергию излучаемых квантов ($E = h\nu$), можно найти неравновесную температуру ($E = kT$). Электронные переходы соответствуют неравновесным локальным температурам в несколько тысяч градусов. Например, для биолюминесценции в желтой области спектра неравновесная температура составляет около 5000 К.

ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

Во всех обычных «темновых» ферментативных реакциях (а не только в биолюминесцентных и фотохимических) активный центр сильно «разогревается» субстратом, в результате чего облегчается не только энергетическая составляющая, но и стерическая, так как разогрев увеличивает динамику, подвижность активного центра и облегчает десорбцию продукта.

Скорость ферментативной реакции в растворе лимитируется диффузией и стерическими факторами, но элементарные стадии катализа являются по сути мономолекулярными, похожими на известные термохимические реакции, не подчиняющимися теории Эйринга, ибо они идут по не изотермическому пути и сопровождаются высвобождением квантов энергии 10–50 ккал/моль [22, 23].

Протекание структурных изменений на стадиях ферментативных реакций удается описывать методами молекулярной динамики [24]. При этом энергетический профиль обычно имеет стадии с энергиями 5–20 ккал/моль, которые существенно выше равновесных (0.6 ккал/моль). Результаты расчетов методами равновесной молекулярной динамики, как отмечено в работе [24], часто не совпадают с экспериментальными данными.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. М. Диксон и Э. Уэбб, Ферменты (Мир, М., 1982).
2. А. Ленинджер, *Основы биохимии* (Мир, М., 1985).
3. Э. Фёршт, *Структура и механизм действия ферментов* (Мир, М., 1980).
4. Г. И. Лихтенштейн, *Многоядерные окислительно-восстановительные металлоферменты* (Наука, М., 1979).
5. С. Глесстон, К. Лейдлер и Г. Эйринг, *Теория абсолютных скоростей реакций* (ИЛ, М., 1948).
6. А. Kricka and J. Larry, *Anal. Chem.* **67** (12), 499R (1995).
7. О. Shimomura, *Bioluminescence: Chemical Principles and Methods* (World Scientific, 2006).
8. Р. Woerkom and R. Groot, *Appl. Optics* **21** (17), 3114 (1982).
9. J. I. Steinfeld, J. S. Francisco, and W. L. Hase, *Chemical Kinetics and Dynamics* (Prentice-Hall, 1998).
10. S. Torres, H. Mella, C. Reyes, et al., *Appl. Optics* **54** (8), 2057 (2015).
11. B. Commoner, B. Lippincott, and J. Passonneau, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **44**, 1099 (1958).
12. Т. Hollocher and B. Commoner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **46**, 416 (1960).
13. Y. Cilento, *Photochem. Photobiol.* **5**, 199 (1980).
14. И. Б. Заводник, *Биофизика* **36** (1), 46 (1991).
15. П. Эткинс, *Физическая химия* (Мир, М., 1980), т. 2.
16. *Краткий справочник физико-химических величин* (Химия, Л., 1974).
17. N. L. Vekshin, *Photonics of Biopolymers* (Springer, Berlin, 2002).
18. Л. А. Блюменфельд, *Проблемы биологической физики* (Наука, М., 1974).
19. Л. А. Грибов, *От теории спектров к теории химических превращений* (УРСС, М., 2001).
20. М. В. Волькенштейн, И. Б. Голованов и В. М. Соколов, *Молекулярные орбитали в энзимологии* (Наука, М., 1982).
21. Дж. Тригг, *Решающие эксперименты в современной физике* (Мир, М., 1974).
22. В. Hartke and J. Manz, *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 3063 (1988).
23. J. Polanyi, *Science* **236** (4802), 680 (1987).
24. А. В. Немухин, Б. Л. Григоренко, С. В. Луцкекина и С. Д. Варфоломеев, *Успехи химии* **81**, 1011 (2012).

Electronically-Vibrationally Excited Complexes in Enzymatic Reactions

N.L. Vekshin

Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

An analysis of the energy profile of enzymatic catalysis has been done. It is concluded that the use of the phenomenological Arrhenius equation and the equilibrium thermodynamic parameters of Eyring's theory of an activated complex does not adequately explain the mechanism of catalysis. In the enzyme-substrate complex during all stages, the Maxwell-Boltzmann energy distribution of molecules is sharply disturbed in reality, it is proportional to an instantaneous increase in local non-equilibrium temperature. Enzymatic stages are not equilibrium and isothermal. Sorption of the substrate on the enzyme leads (due to the neutralization of charges or dipoles) to the local release of high energy, sufficient to break the covalent bond or electron transfer with the formation of a transition electronically excited complex. The energy of electronically-vibrationally excited complex is needed for the normal progression of subsequent, more slower stages (rearrangement or transfer of atoms, desorption of the product). Enzymatic reactions proceed through the formation of non-equilibrium electronically-vibrationally excited complexes, which kinetically fail to obey the thermodynamics of the Eyring theory.

Keywords: enzymes, catalysis, activation energy, Arrhenius equation, transition complex, Eyring theory, electronically-vibrationally excited states