

Лекция 1

# ФЕРМЕНТЫ

БИОКАТАЛИЗАТОРЫ

к.б.н., доцент И.В. Андреева

# План лекции

- Понятие о ферментах. Сущность явлений ферментативного катализа
- Структурная организация ферментов
- Механизм действия ферментов
- Специфичность действия ферментов
- Кинетика ферментативных реакций
- Факторы, влияющие на скорость ферментативных реакций
- Классификация ферментов

**Физико-химические свойства ферментов и их биологическое и медицинское значение.**

Химическая природа, физико-химические свойства и биологическая роль ферментов. Строение ферментов - простых, сложных, изоферментов: активный и аллостерический центры, роль в катализе. Определение понятия: кофактор, холофермент, апофермент, кофермент, косубстрат, субстрат, метаболит, продукт. Локализация и компартментализация ферментов в клетке и тканях. Механизм действия ферментов: теории Фишера, Кошланда, переходных соединений. Стадии ферментативного катализа. Кинетика ферментативных реакций. Принципы качественного обнаружения и количественного определения активности ферментов. Единицы активности. Регуляция активности ферментов: неспецифическая, специфическая (понятия). Роль гормонов и вторичных мессенджеров (цАМФ, цГМФ,  $Ca^{2+}$ , ДГ, ИТФ, ПГ, и др.) в регуляции активности ферментов.

Классификация и номенклатура ферментов.

Использование ферментов в медицине.

# Понятие о ферментах

Практически все реакции в живом организме протекают с участием природных биокатализаторов, называемых **ферментами**, или **энзимами**.

Слово «фермент» происходит от *лат. fermentum* – закваска, а «энзим» – от греч. *εν* – в, внутри и *ζυμη* – дрожжи.

В настоящее время известно около 10000 ферментов.

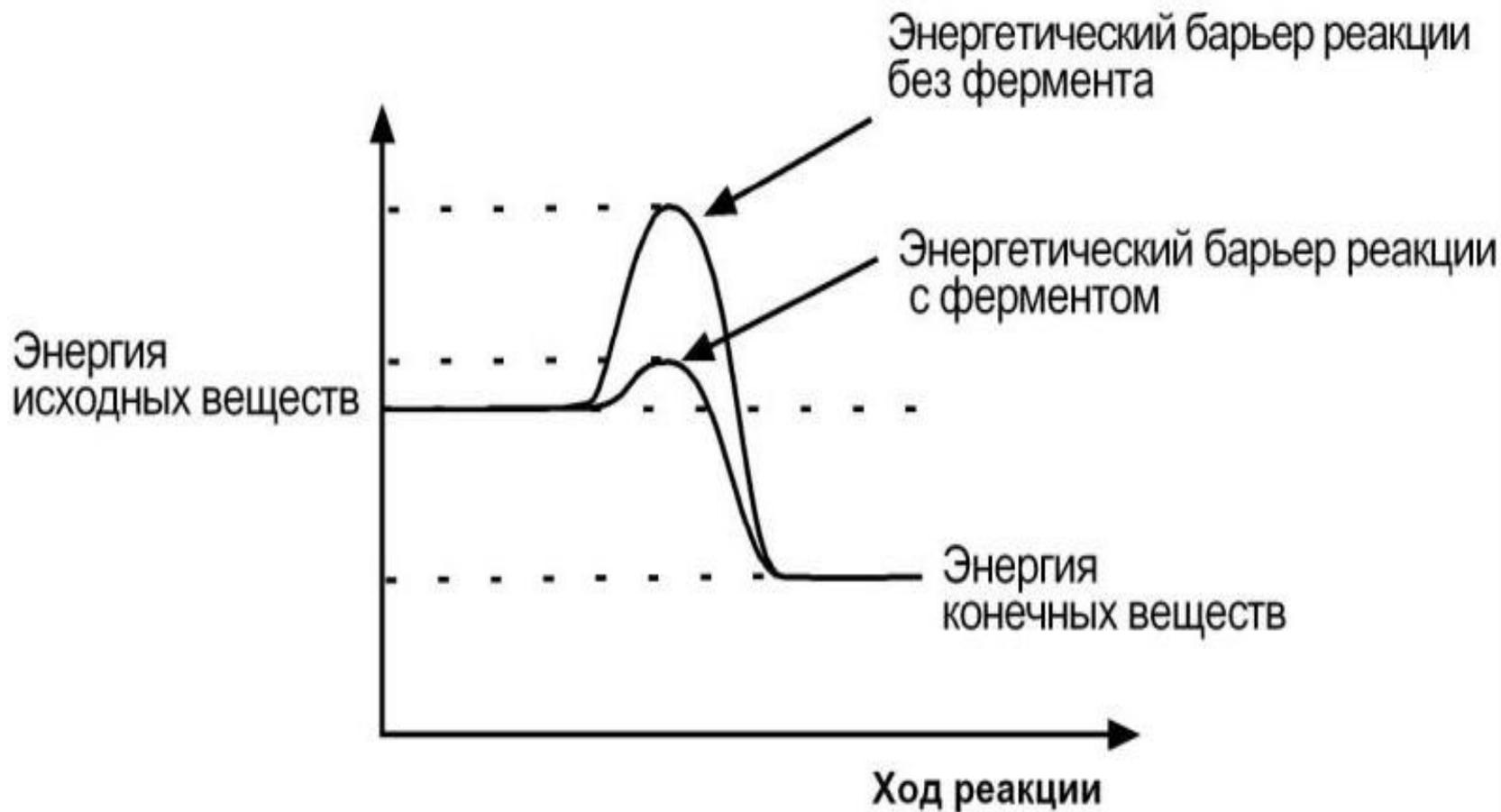
Известно, что для осуществления химической реакции необходимо, чтобы реагирующие вещества имели суммарную энергию выше чем величина называемая энергетическим барьером реакции. Преодоление энергии активации в химической реакции достигается либо увеличением энергии взаимодействующих молекул, например нагреванием, облучением, повышением давления, либо снижением требуемых для реакции затрат энергии при помощи катализаторов.

По своей сути ферменты являются биологическими катализаторами. Сущность действия ферментов, так же как неорганических катализаторов заключается:

Сущность действия ферментов, так же как неорганических катализаторов заключается:

- в активации молекул реагирующих веществ,
- в разбиении реакции на несколько стадий, энергетический барьер каждой из которых ниже такового общей реакции.

Однако энергетически невозможные реакции ферменты катализировать не могут.



Величина энергии активации реакции с ферментом и без него

Рассмотрим реакцию разложения угольной кислоты (не ферментативной реакцией):



Угольная кислота слабая; реакция её разложения пойдет в обычных условиях, если молекулы угольной кислоты имеют энергию превышающую определённый уровень, называемый энергией активации  $E_a$  (рис. 1).

**Энергией активации** называют дополнительное количество **кинетической энергии**, необходимое молекулам вещества, чтобы они вступили в реакцию.

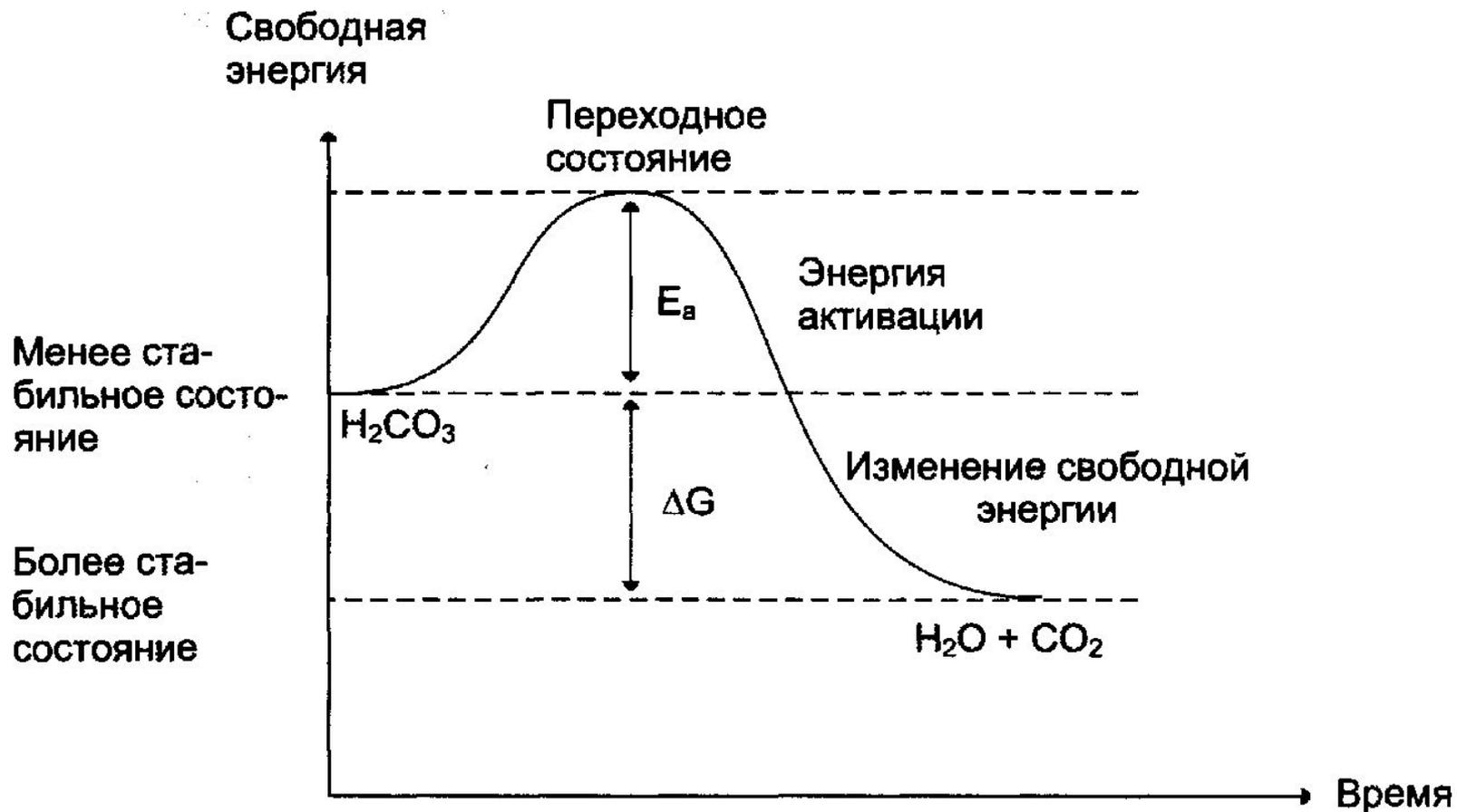


Рис. 1. Изменение свободной энергии при разложении угольной кислоты

При достижении этого энергетического барьера в молекуле происходят изменения, вызывающие перераспределение химических связей и образование новых соединений. Говорят, что молекулы, обладающие  $E_a$ , находятся в переходном состоянии. Разницу энергий между исходным реагентом  $H_2CO_3$  и конечными соединениями  $H_2O$  и  $CO_2$  называют **свободной энергией** реакции ( $\Delta G$ ). Молекулы  $H_2O$  и  $CO_2$  более стабильные вещества, чем  $H_2CO_3$ , т.е. обладают меньшей энергией и при обычных условиях практически не реагируют.

Выделившаяся энергия рассеивается в виде тепла.

В нашем организме эту реакцию осуществляет фермент **карбоангидраза** при  $37^\circ C$ .

**Сходство** ферментов с небиологическими катализаторами заключается в том, что ферменты:

- 1) катализируют только энергетически возможные реакции, т. е. те реакции, которые могут протекать и без них;
- 2) не изменяют направление реакции;
- 3) не сдвигают равновесие обратимой реакции, а лишь ускоряют его наступление;
- 4) не расходуются в процессе реакции и выходят из реакции в первоначальном виде.

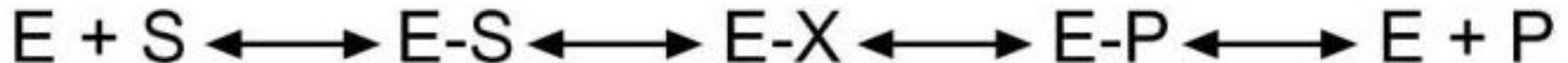
**Отличие** ферментов от небиологическими катализаторами заключается в том, что ферменты:

- 1) Скорость ферментативных реакций намного выше;
- 2) Высокая специфичность;
- 3) Мягкие условия работы (внутриклеточные);
- 4) Возможность регулирования скорости реакции;
- 5) Скорость ферментативной реакции пропорциональна количеству фермента.

# Этапы ферментативного катализа

В ферментативной реакции можно выделить следующие этапы:

1. Присоединение субстрата (S) к ферменту (E) с образованием фермент-субстратного комплекса (E-S).
2. Преобразование фермент-субстратного комплекса в один или несколько переходных комплексов (E-X) за одну или несколько стадий.
3. Превращение переходного комплекса в комплекс фермент-продукт (E-P).
4. Отделение конечных продуктов от фермента.



# Механизмы ферментативного катализа

1. **Кислотно-основной катализ** – в активном центре фермента находятся группы специфичных аминокислотных остатков (радикалов), которые являются хорошими донорами или акцепторами протонов. Такие группы представляют собой мощные катализаторы многих органических реакций.

Доноры	Акцепторы
-COOH	-COO-
-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	-NH <sub>2</sub>
-SH	-S-
-OH	-O-

**2. Ковалентный катализ** – ферменты реагируют со своими субстратами, образуя при помощи ковалентных связей очень нестабильные фермент-субстратные комплексы, из которых в ходе внутримолекулярных перестроек образуются продукты реакции.

# Строение ферментов

# Общая характеристика

Ферменты имеют белковую природу и обладают всеми свойствами, характерными для белков:

1. При гидролизе ферменты как и белки распадаются на аминокислоты
2. Молекулярная масса ферментов, как и белков 10 000 - 1 000 000 Да.
3. Ферменты амфотерны, обладают электрофоретической подвижностью, имеют ИЭТ, подвергаются денатурации и др.

Подобно белкам они делятся на простые и сложные

- **Простые ферменты** состоят только из аминокислот – например, пепсин, трипсин, лизоцим.
- **Сложные ферменты** (холоферменты) имеют в своем составе **белковую часть**, состоящую из аминокислот – *апофермент*, и **небелковую часть** – *кофактор*.

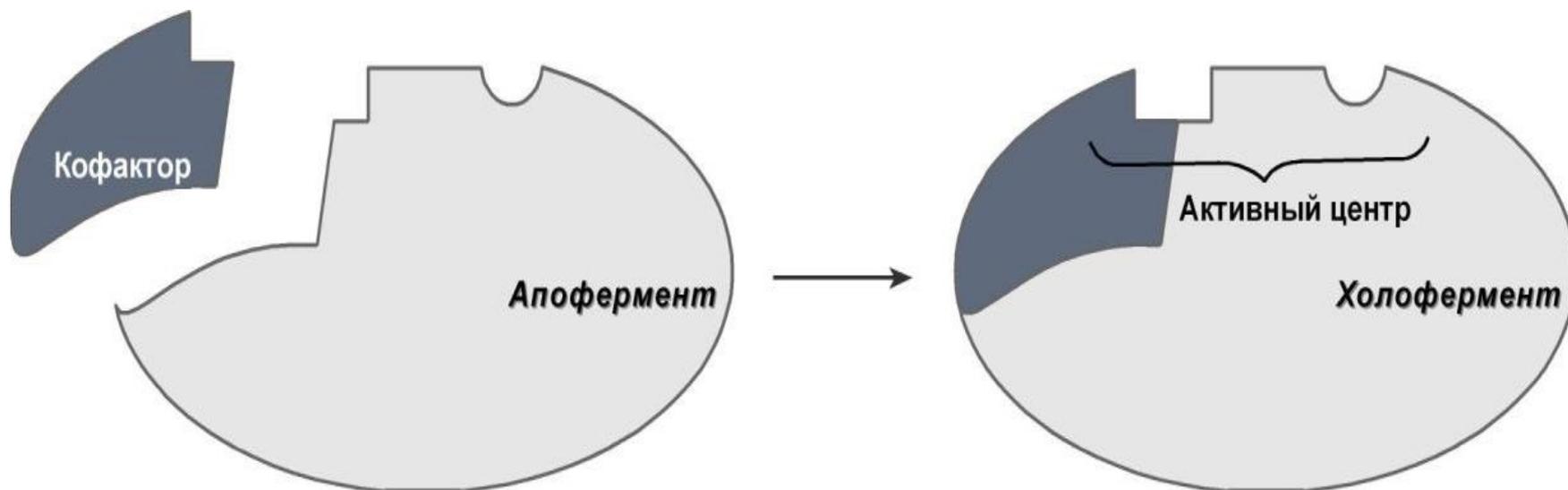
Кофактор, в свою очередь, может называться коферментом или простетической группой.

*Примером* могут быть:

- сукцинатдегидрогеназа (содержит ФАД),
- аминотрансферазы (содержат пиридоксальфосфат),
- пероксидаза (содержит гем).

Кофакторы – ионы металлов, коферменты – низкомолекулярные вещества небелковой природы, чаще всего **витамины**.

## Схема формирования сложного фермента



Кофактор + апофермент = холофермент

*holo* – весь, целый

У сложных ферментов в активном центре обязательно расположены функциональные группы кофактора. Кофактор участвует в связывании субстрата или в его превращении.

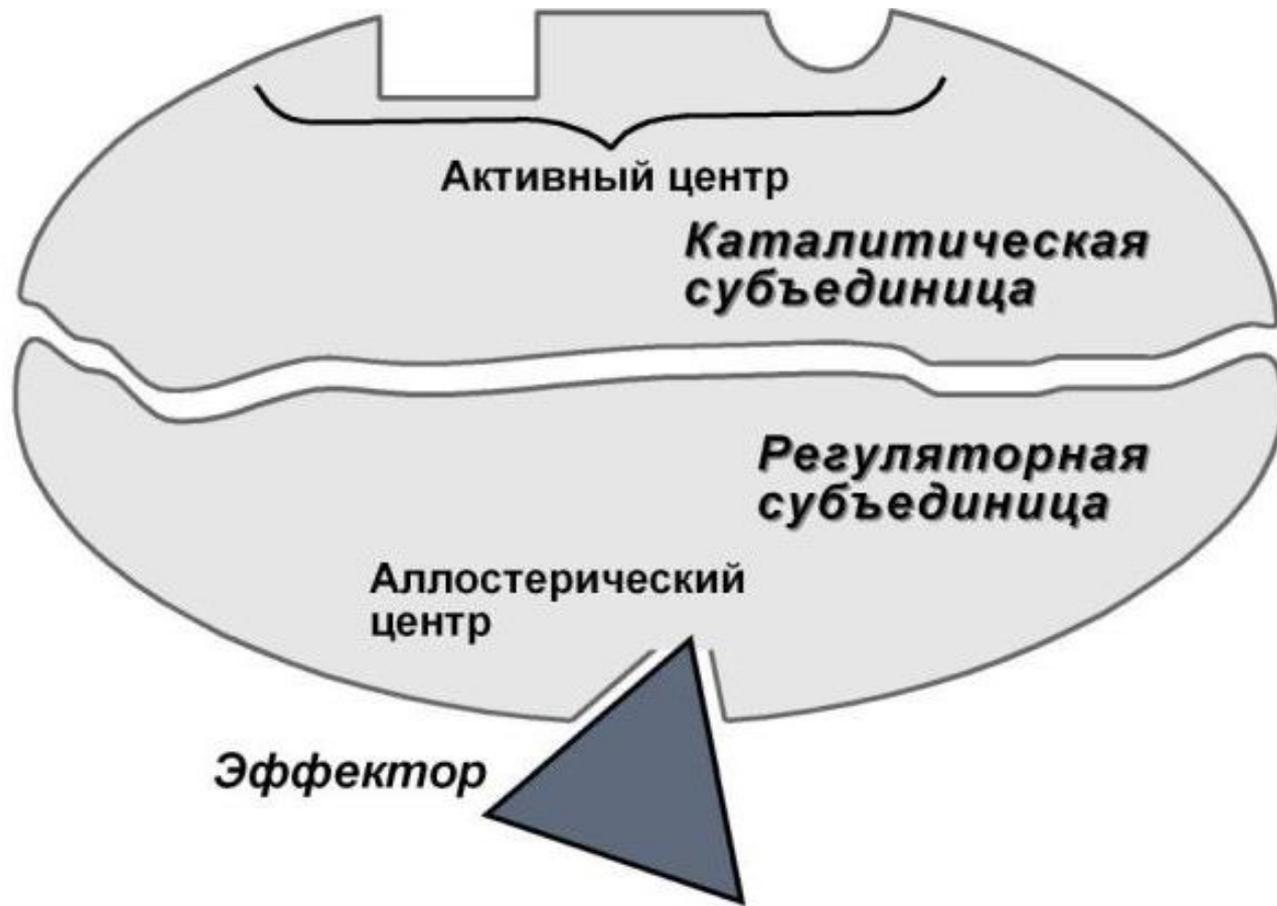
Для осуществления катализа необходим полноценный комплекс апобелка и кофактора, по отдельности катализ они осуществить не могут.

Как и многие белки, ферменты могут быть **мономерами**, т.е. состоят их одной субъединицы, и **полимерами**, состоящими из нескольких субъединиц

**2. Аллостерический центр** (allos – чужой) – центр регуляции активности фермента, который пространственно отделен от активного центра и имеется не у всех ферментов.

Связывание с аллостерическим центром какой-либо молекулы (называемой активатором или ингибитором, а также эффектором, модулятором, регулятором) вызывает изменение конфигурации белка-фермента и, как следствие, скорости ферментативной реакции. В качестве такого регулятора может выступать продукт данной или одной из последующих реакций, субстрат реакции или иное вещество.

- Аллостерические ферменты являются **полимерными белками**, их активный и регуляторный центры находятся в разных субъединицах.



Схематическое изображение  
аллостерического фермента

# Структурно-функциональная организация ферментов

или как ферменты работают.

В составе фермента выделяют области, выполняющие различную функцию:

- 1. Активный центр** – комбинация аминокислотных остатков (обычно 12-16), обеспечивающая непосредственное связывание с молекулой субстрата и осуществляющая катализ.

В активном центре выделяют два участка:

- **якорный** (контактный, связывающий)
- **каталитический.**

Ферменты состоящий из нескольких мономеров могут иметь несколько активных центров. У сложных ферментов в активном центре расположен кофактор.

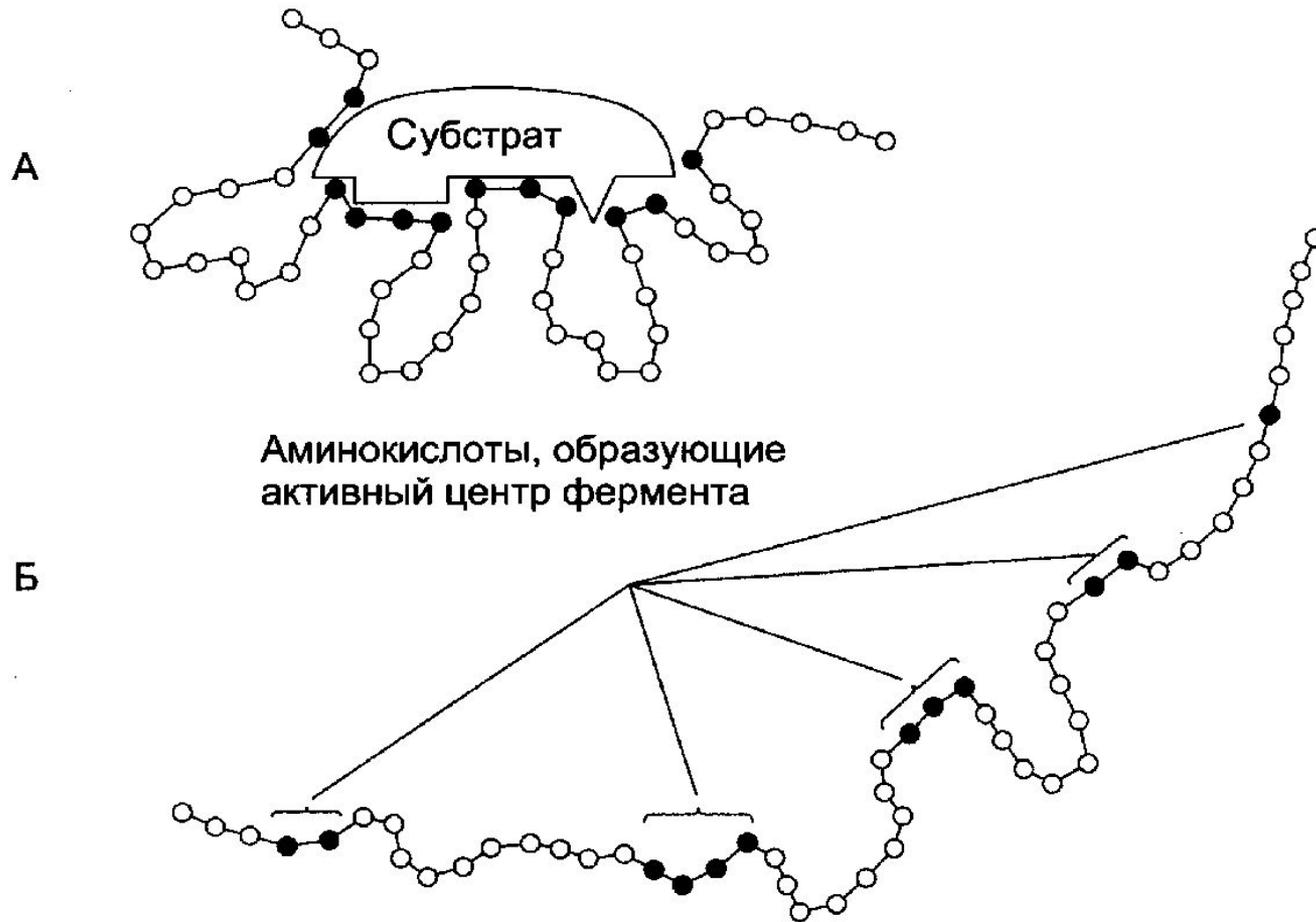
Биологическая функция фермента, как и любого белка обусловлена наличием в его структуре **активного центра**. **Лиганд**, взаимодействующий с активным центром фермента, называют субстратом (**Substrat**).

В активном центре фермента есть аминокислотные остатки, функциональные группы которых обеспечивают **связывание субстрата**, и аминокислотные остатки, функциональные группы которых осуществляют **химическое превращение субстрата**.

Условно эти группы обозначают как **участок связывания субстрата (якорный участок)** и **каталитический участок**.



**Схематичное изображение основных участков фермента в белковой глобуле**

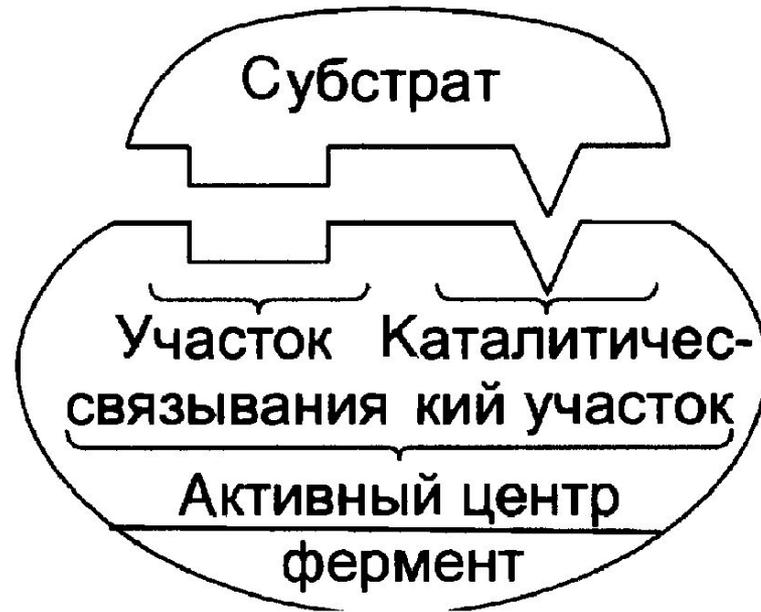


## Строение активного центра фермента (1)

А – присоединение субстрата к ферменту в активном центре

Б – положение аминокислотных остатков, формирующих активный центр фермента, в первичной структуре белка

В



## Строение активного центра фермента (2)

В – активный центр фермента условно разделяется на **участок связывания** и **каталитический участок**

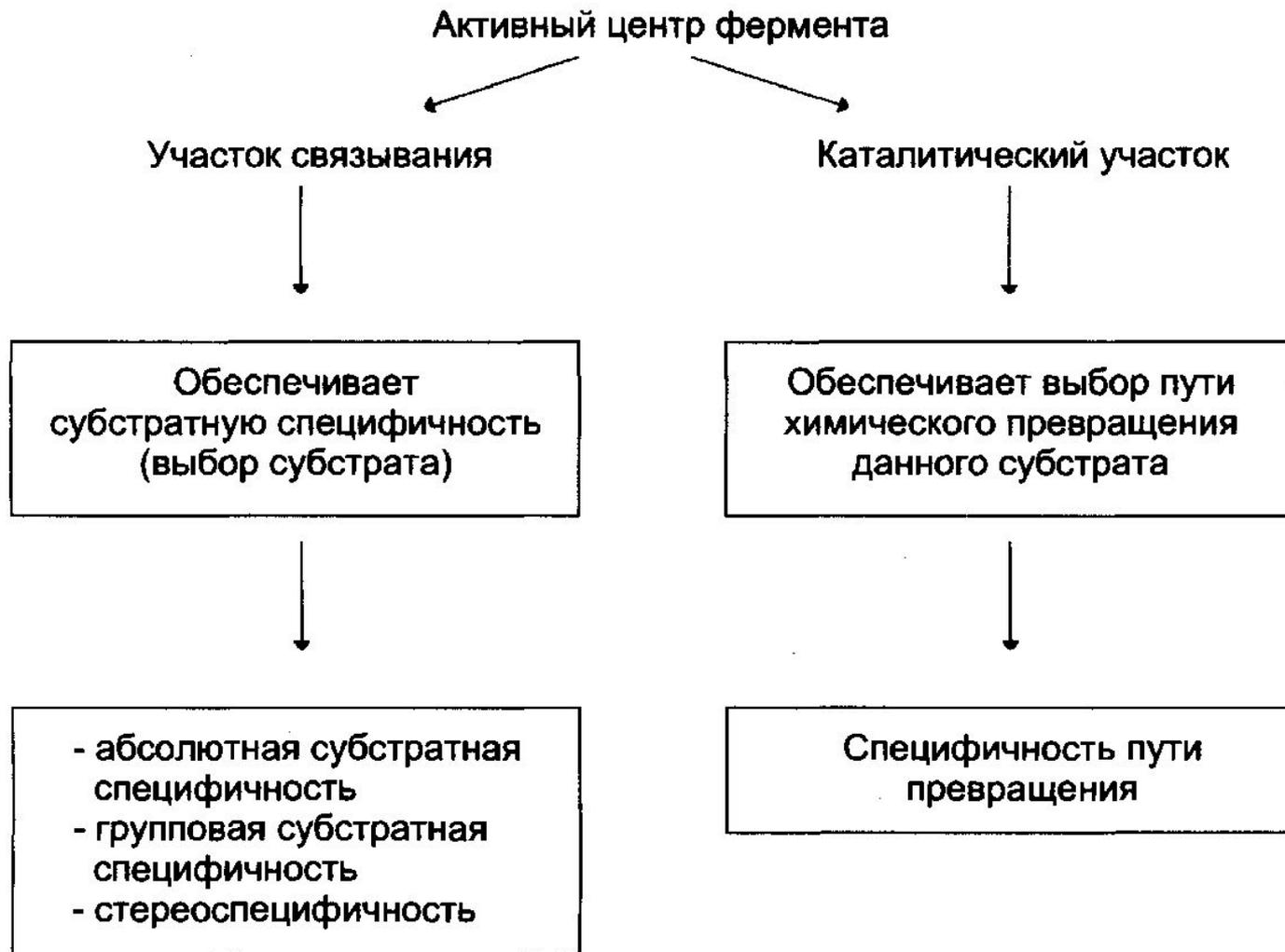


Рис.2. **Функциональная значимость отдельных участков активного центра фермента**

# Что означает выражение «активность фермента»?

При сравнении в характеристике ферментов и их изоформ есть понятия:

- активный фермент,
- малоактивный фермент,
- неактивный фермент и др.

Это означает способность, скорость с которой ферменты осуществляют химические превращения своих субстратов. Определение количества фермента не является таким показателем. Активность более широкое понятие.

**Активность фермента** подразумевает результат реакции, а именно **убыль субстрата** или **накопление продукта**. Естественно при этом нельзя игнорировать **время**, которое потратил фермент, и **число молекул Фермента**. Но так как число молекул фермента не всегда можно подсчитать, то используют количество биологического материала, содержащего фермент (объем или массу).

Следовательно при определении активности ферментов учитываются три переменные:

1. **масса** полученного продукта или исчезнувшего субстрата,
2. **время** потраченное на реакцию,
3. **количество фермента** или массу или объем биологического материала, содержащего фермент.

1. Активность фермента выражается в скорости накопления продукта или скорости убыли субстрата в пересчете на количество материала, содержащего фермент за единицу времени.

В практике обычно используют:

- единицы количества вещества – моль (и его производные ммоль, мкмоль), грамм (кг, мг),
- единицы времени – минута, час, секунда,
- единицы массы или объема – грамм (кг, мг), литр (мл).

Международная единица активности (ME, Unid)  
соответствует мкМоль/мин

Таким образом, активность фермента может выражаться, например, в

ммоль / с × л,

г / час × л,

МЕ/л,

кат/мл и т.д.

*Например,*

- известно, что 1 г пепсина расщепляет 50 кг яичного белка за один час – таким образом, его активность составит 50 кг/час на 1 г фермента.

- Если количество слюны в 1,6 г расщепляет 175 кг крахмала в час – активность амилазы слюны составит 109,4 кг крахмала в час на 1 г слюны.

2. Создание стандартных условий, чтобы можно было сравнивать результаты, полученные в разных лабораториях
  - оптимальная рН, и
  - фиксированная температура, например, 25°C или 37°C,
  - соблюдение времени инкубации субстрата с ферментом.
  
3. Избыток субстрата, чтобы работали все имеющиеся в растворе молекулы фермента.

# От чего зависит активность ферментов?

## Свойства ферментов

Активность ферментов зависит от:

- температуры,
- pH,
- концентрации субстрата,
- концентрации фермента

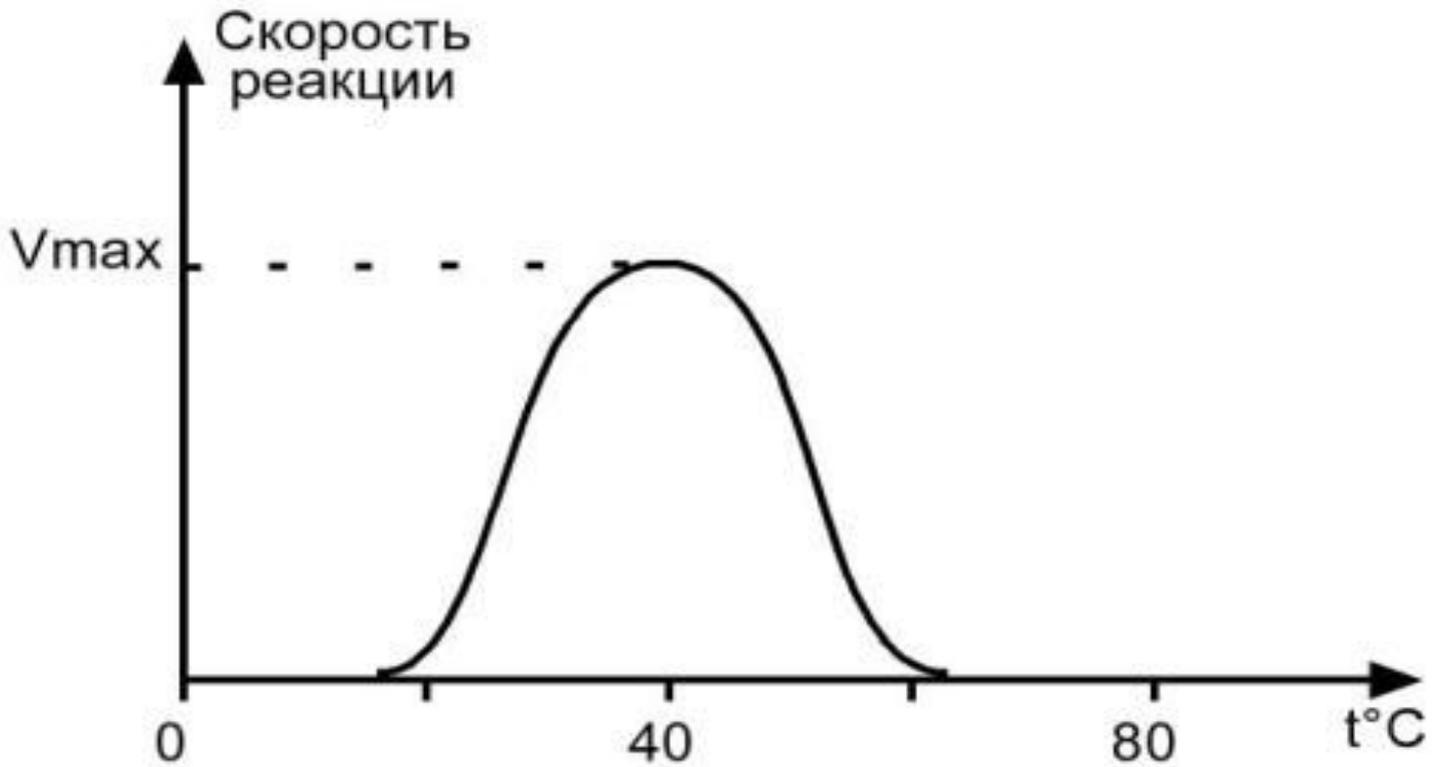


Рис. Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры

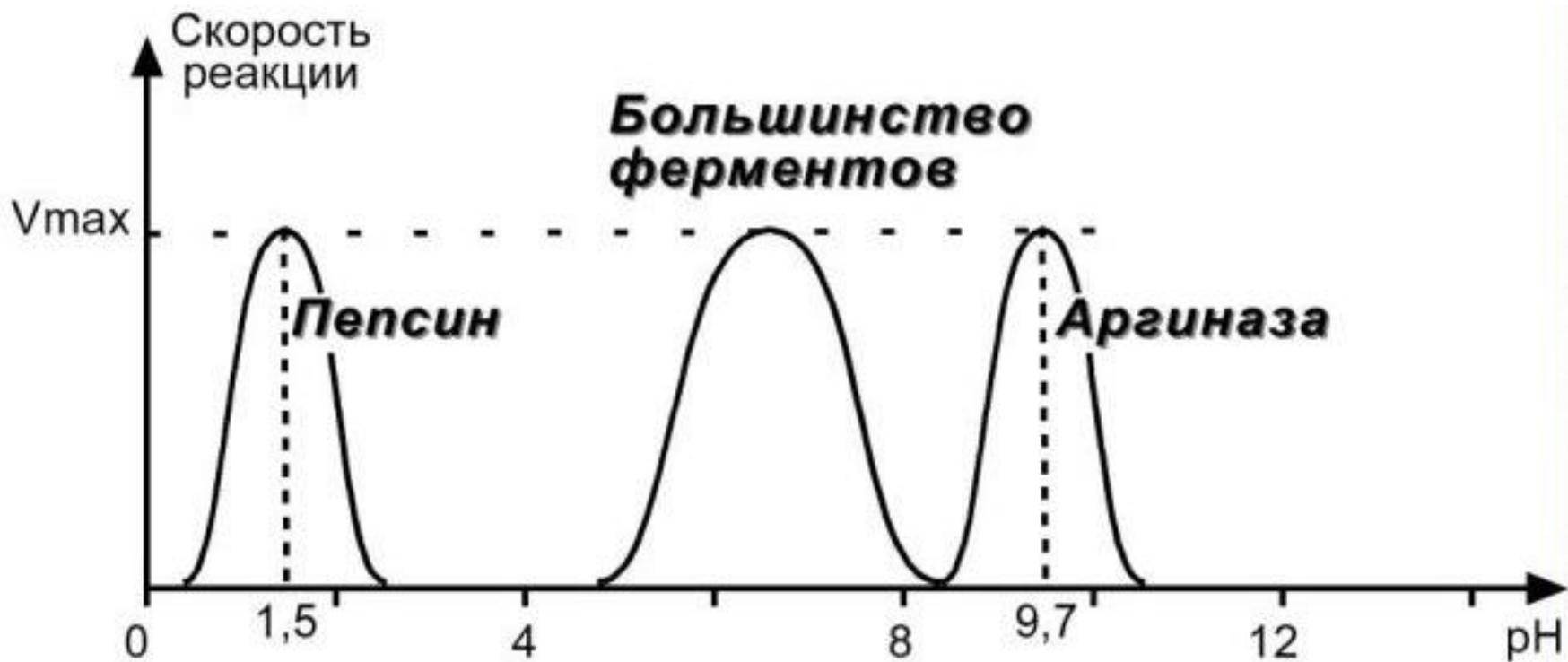
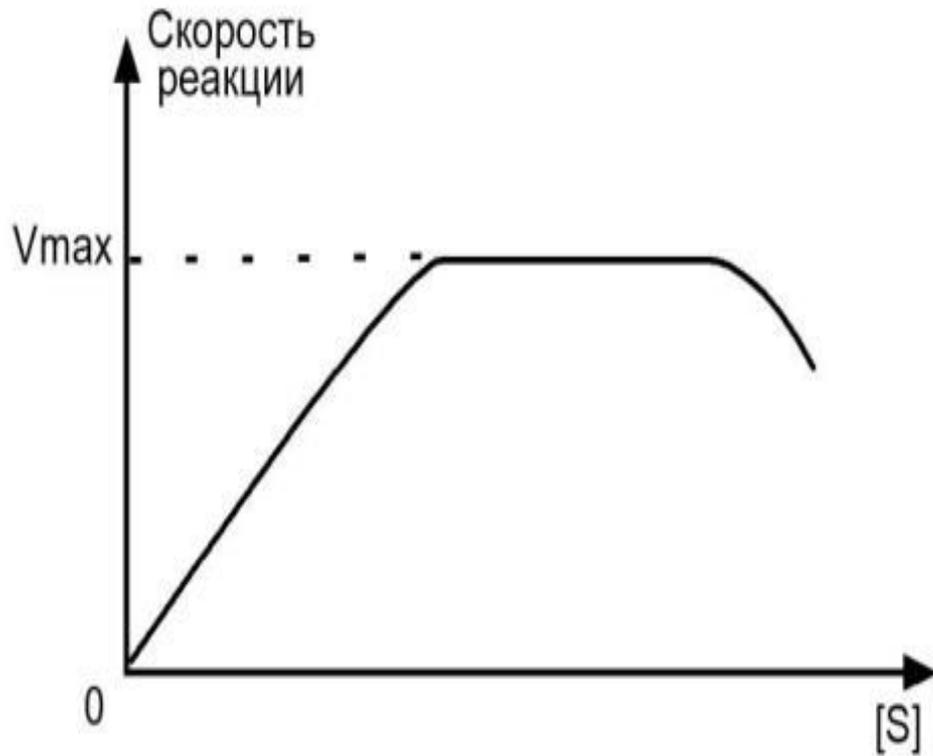


Рис. Зависимость скорости реакции от pH



Зависимость скорости  
реакции от концентрации  
**субстрата**



Зависимость скорости  
реакции от концентрации  
**фермента**

Ферменты избирательны в своём  
действии

# Ферменты избирательны в своём действии

**Специфичность**, т.е. высокая избирательность действия ферментов, основана на **комплементарности** структуры субстрата и активного центра фермента.

Разные ферменты по отношению к субстрату проявляют:

- стереоспецифичность,
- абсолютную специфичность,
- групповую специфичность,
- относительную специфичность.

# 1 Стереоспецифичность

При наличии у субстрата нескольких стереоизомеров фермент проявляет абсолютную специфичность к одному из них.

В организме человека наблюдают специфичность ферментов к следующим стереоизомерам.

Стереоспецифичность к

D-сахарам,

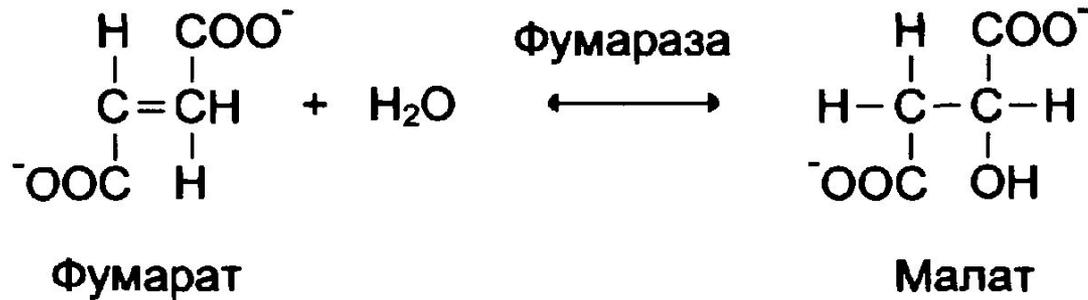
L-аминокислотам,

цис- транс- изомерам,

альфа- и бета- гликозидным связям.

пример: **Стереоспецифичность к**  
**цис-транс-изомерам**

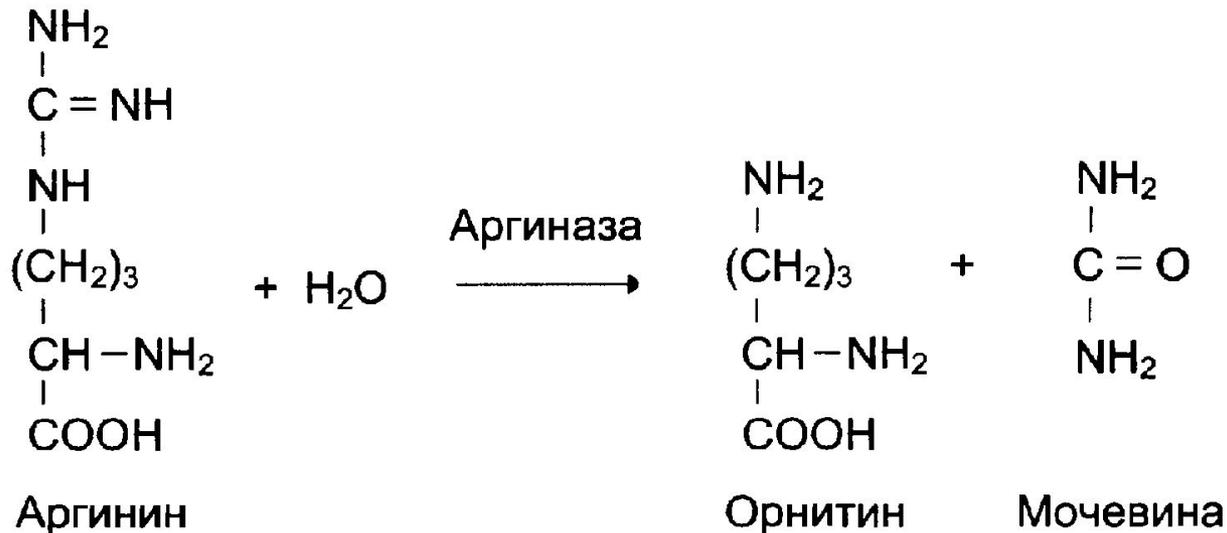
Фермент фумараза оказывает действие только на фумарат. Малейнат (цис-изомер фумарата) не является субстратом фумаразы.



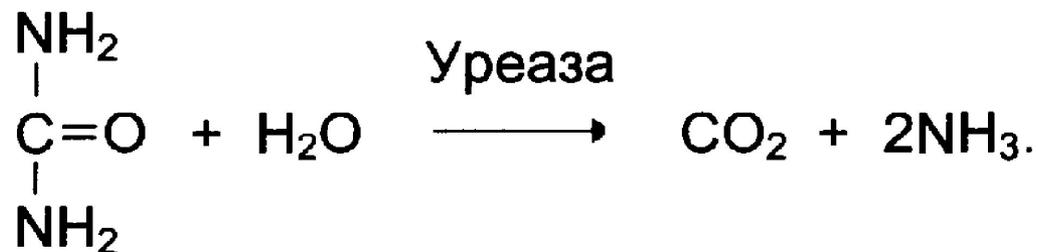
## Абсолютная субстратная специфичность

Активный центр фермента комплементарен только одному субстрату. Таких ферментов мало.

Пример: фермент **аргиназа**, катализирующая реакцию расщепления аргинина до мочевины и орнитина.



Другой пример фермента с **абсолютной субстратной специфичностью** **уреаза**, катализирующая гидролиз мочевины до диоксида углерода и аммиака



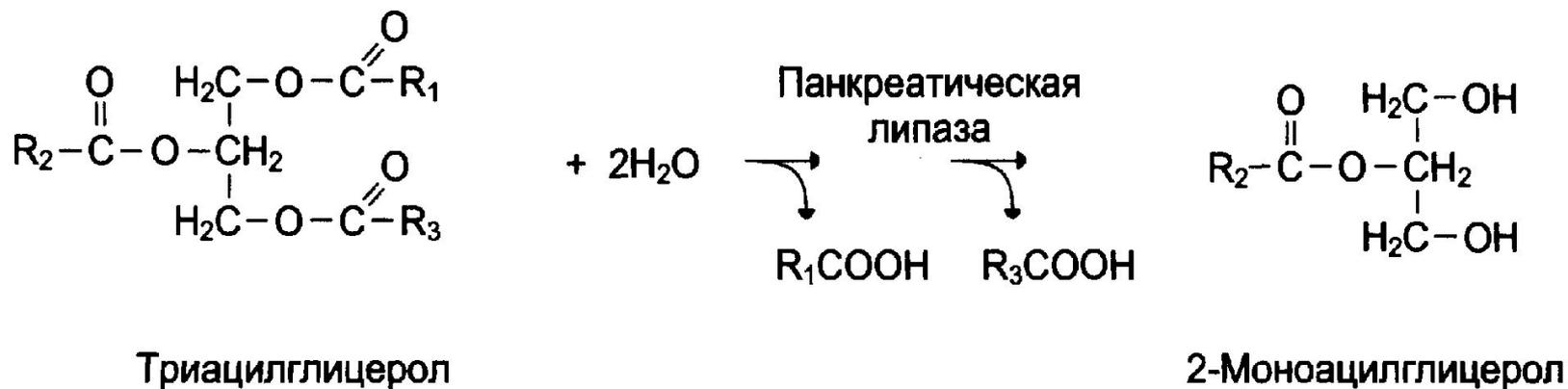
## Групповая субстратная специфичность

Большинство ферментов катализируют однотипные реакции с небольшим количеством (группой) структурно похожих субстратов.

Примеры:

- **протеолитические ферменты** гидролизующие пептидные связи в белках (пепсин, трипсин, химотрипсин),
- **панкреатическая липаза** гидролизует триацилглицерины или жиры и масла.

## Пример действия липазы А



**Относительная специфичность** – превращение субстратов с некоторыми общими признаками.

Например,

**цитохром P450** окисляет только гидрофобные вещества, которых насчитывается около 7000.

# МЕХАНИЗМЫ СПЕЦИФИЧНОСТИ

В общем виде все сводится к комплементарному взаимодействию фермента и субстрата. При этом функциональные группы субстрата взаимодействуют с соответствующими им функциональными группами фермента. Наличие субстратной специфичности объясняют две гипотезы:

- 1. Гипотеза Фишера**
- 2. Гипотеза Кошланда**

# 1. Гипотеза Фишера

(модель "жесткой матрицы", "ключ-замок") – активный центр фермента строго соответствует конфигурации субстрата и не изменяется при его присоединении. Эта модель хорошо объясняет абсолютную специфичность, но не групповую.



Теория Фишера – модель специфичности “ключ-замок”

**2. Гипотеза Кошланда** (модель "индуцированного соответствия", "рука-перчатка") – подразумевает *гибкость* активного центра. Присоединение субстрата к якорному участку фермента вызывает изменение конфигурации каталитического центра таким образом, чтобы его форма соответствовала форме субстрата.



Теория Кошланда – модель специфичности “рука-перчатка”

# РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ *IN VIVO*

Активность ферментов в клетке непостоянна во времени. Она чутко реагирует на ситуацию, в которой оказывается клетка, на факторы, воздействующие на клетку как снаружи, так и изнутри.

Главная цель этой реакции – отреагировать на изменение окружающей среды, приспособить клетку к новым условиям, дать должный ответ на гормональные и иные стимулы, а в некоторых ситуациях – получить шанс выжить.

1. Компарментализация,
2. Доступность субстрата или кофермента,
3. Изменение количества фермента,
4. Ограниченный частичный протеолиз проферментов,
5. Аллостерическая регуляция

# 1. Компарментализация.

Компарментализация – это сосредоточение ферментов и их субстратов в одном компарменте (одной органелле) – в эндоплазматическом ретикулуме, митохондриях, лизосомах.

Например,

- бета-окисление жирных кислот протекает в митохондриях,
- синтез белка – в рибосомах,
- синтез иРНК в ядре, для эукариотов.

И ферменты осуществляющие эти процессы находятся только в этих органеллах (компарментах)

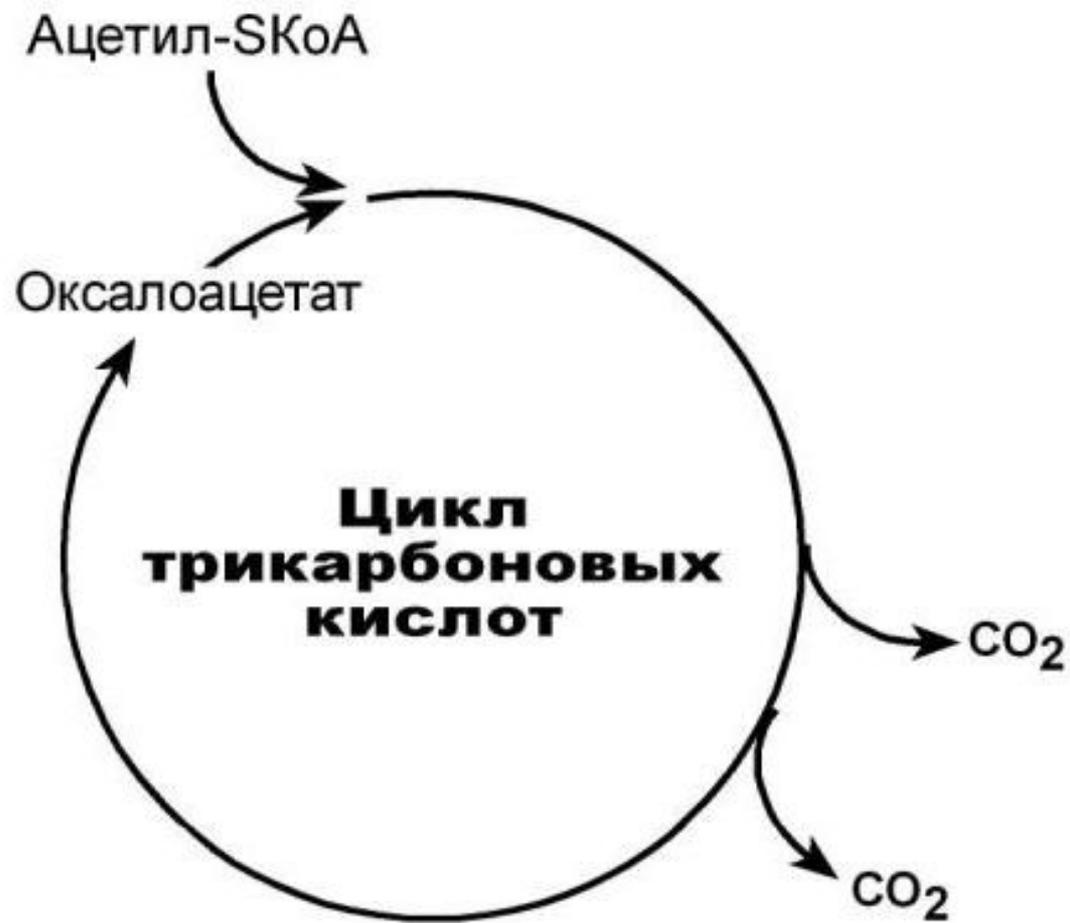
## **2. Доступность субстрата или кофермента.**

Здесь работает закон действия масс – фундаментальный закон химической кинетики: при постоянной температуре скорость химической реакции пропорциональна произведению концентрации реагирующих веществ.

Или упрощенно – скорость, с которой вещества реагируют друг с другом, зависит от их концентрации.

Таким образом, изменение количества хотя бы одного из субстратов прекращает или начинает реакцию.

Для цикла трикарбоновых кислот таким субстратом является **оксалоацетат (щавелевоуксусная кислота)**.



Роль оксалоацетата в регуляции скорости ЦТК

### 3. Изменение количества фермента.

Изменение количества фермента может происходить в результате увеличения или снижения его синтеза.

Изменение скорости синтеза фермента обычно зависит от количества определенных гормонов или субстратов реакции.

*Например,* гормон кортизол стимулирует синтез ферментов **глюконеогенеза**, что обеспечивает стабильность концентрации глюкозы в крови и устойчивость ЦНС к стрессу.

- При беременности и после родов под воздействием лактотропного гормона в молочной железе активно идет синтез фермента лактозосинтазы.
- Исчезновение пищеварительных ферментов при длительном голодании и их появление в восстановительный период (в результате изменения секреции кишечных гормонов).
- Этанол стимулирует в печени синтез "своего" фермента (обезвреживающего спирт) - изофермента P450.

## 4. Ограниченный (частичный) протеолиз проферментов.

Т.к. синтез некоторых ферментов осуществляется в виде более крупного предшественника (**трипсиноген, пепсиноген, прокарибосипептидазы, факторы свертывания крови**), то при поступлении в нужное место этот фермент активируется через отщепление от него одного или нескольких пептидных фрагментов.

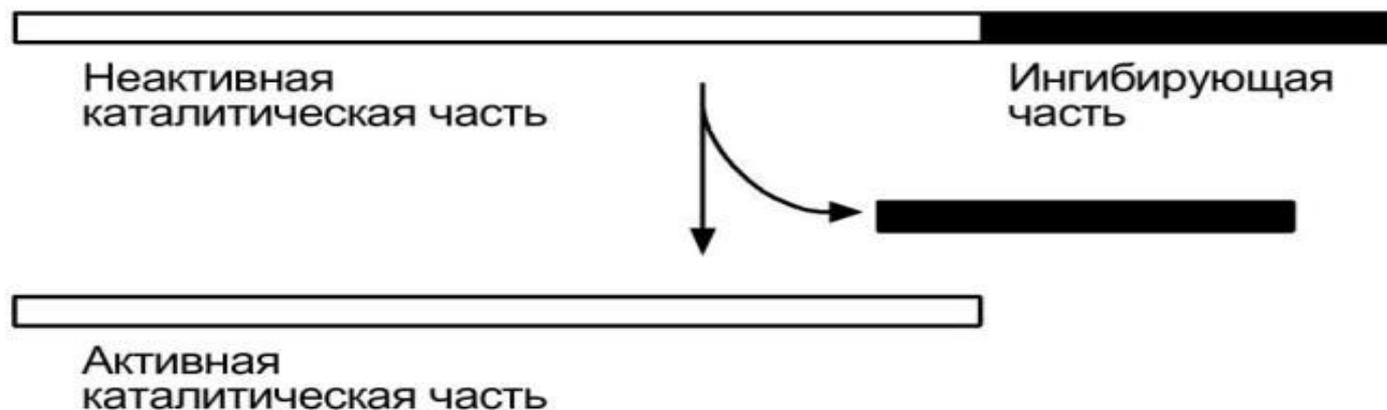


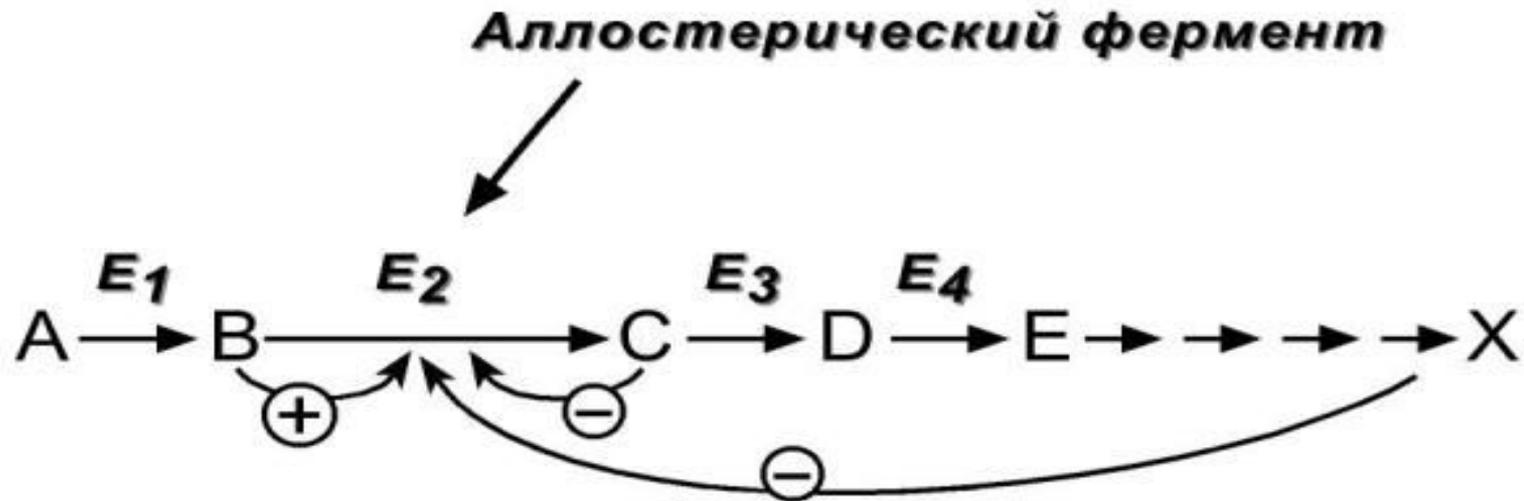
Схема активации фермента способом “ограниченного протеолиза”

## 5. Аллостерическая регуляция.

Аллостерические ферменты построены из двух и более субъединиц: одни субъединицы содержат каталитический центр, другие являются регуляторными. Присоединение эффектора к **аллостерической (регуляторной) субъединице изменяет конформацию белка и активность каталитической субъединицы.**

Аллостерические ферменты обычно стоят в начале метаболических путей, и от их активности зависит течение многих последующих реакций. Поэтому они часто называются **ключевыми ферментами.**

В качестве **отрицательного регулятора** может выступать конечный метаболит биохимического процесса, продукт данной реакции, т.е работает механизм обратной отрицательной связи. Если регуляторами являются начальный метаболит или субстрат реакции, то говорят о **прямой положительной регуляции**.

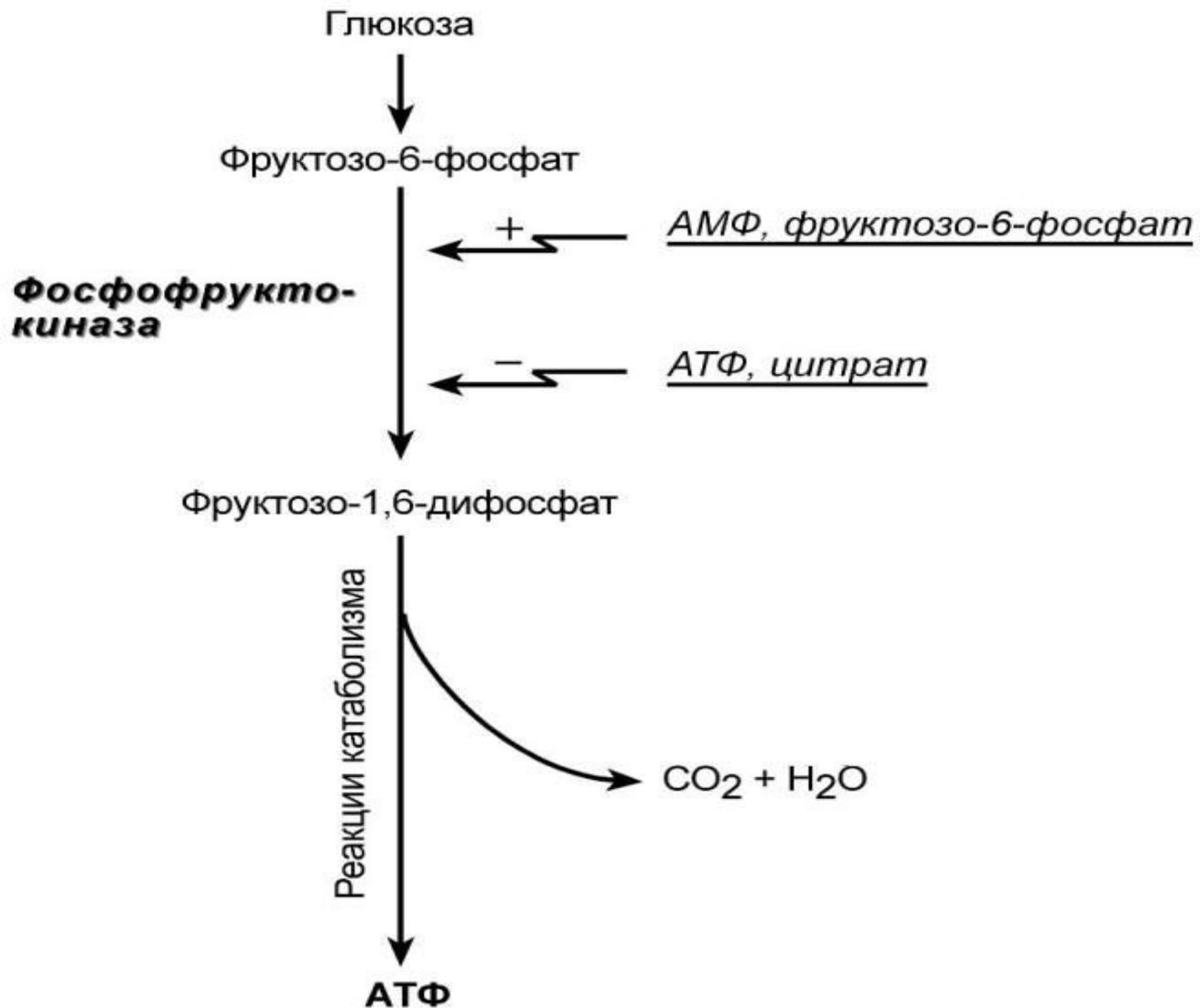


Общий принцип аллостерической регуляции

Например,  
фермент энергетического распада глюкозы,  
**фосфофруктокиназа**, регулируется промежуточными  
И конечными продуктами этого распада.

При этом АТФ, лимонная кислота,  
фруктозо-1,6-дифосфат являются ингибиторами,

а фруктозо-6-фосфат и АМФ – активаторами  
фермента.



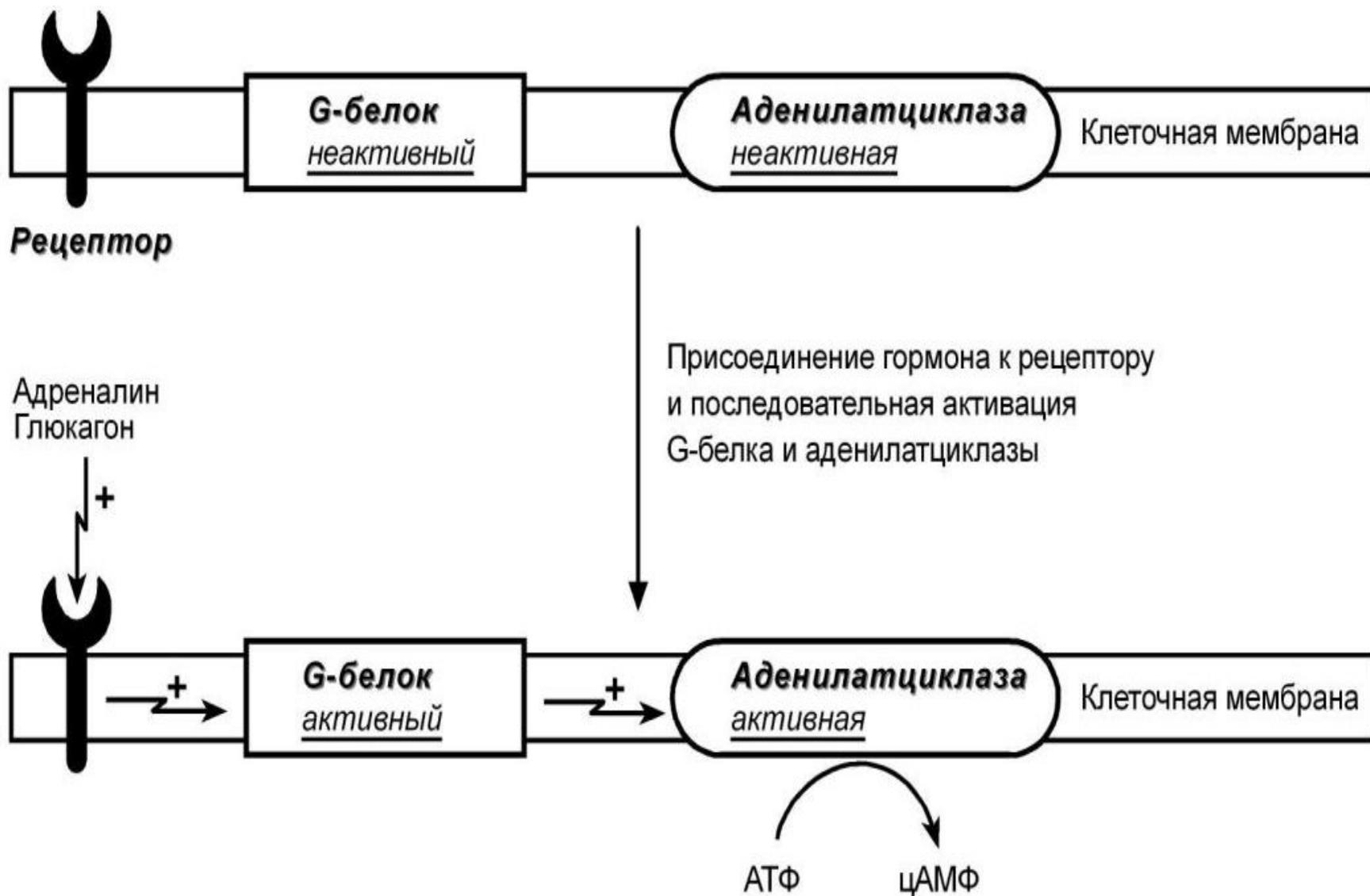
Алlostерическая регуляция фосфофруктокиназы

## **6. Белок-белковое взаимодействие.**

Термин белок-белковое взаимодействие обозначает ситуацию, когда в качестве регулятора выступают не метаболиты биохимических процессов, а **специфичные белки (гормоны и др.)**.

Влияние каких-либо факторов на эти белки изменяет их активность, и они, в свою очередь, воздействуют на нужный фермент.

К примеру, мембранный фермент **аденилатциклаза** является чувствительным к воздействию мембранного G-белка, который сам активируется при действии на клетку некоторых гормонов (например, адреналина и глюкагона).

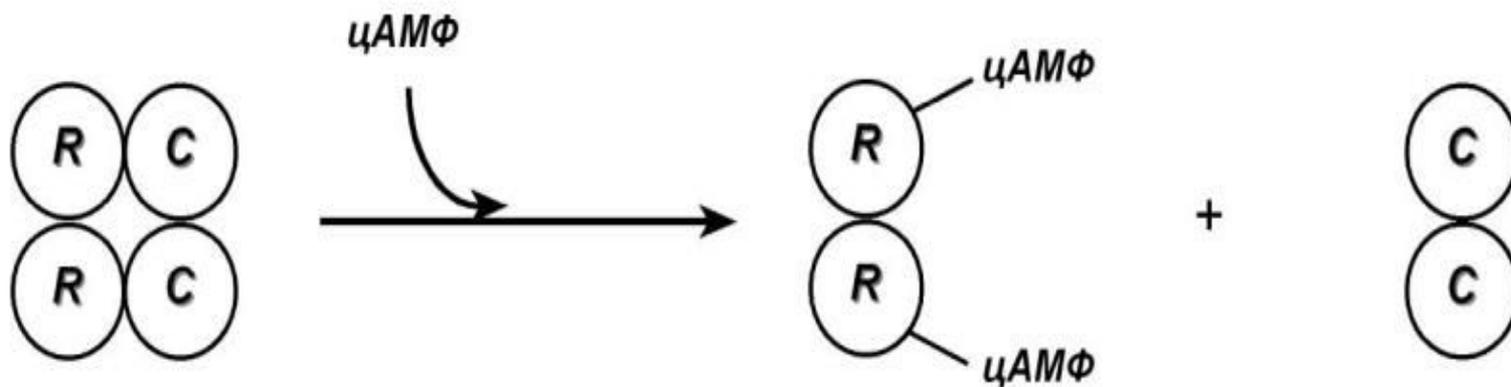


Упрощенная схема активации аденлатциклазы

Другим примером **белок-белкового взаимодействия** может быть регуляция активности протеинкиназы А.

Протеинкиназа А является тетрамерным ферментом, состоящим из 2 каталитических (С) и 2 регуляторных (R) субъединиц. Активатором для протеинкиназы А является цАМФ. Присоединение цАМФ к регуляторным субъединицам фермента вызывает изменение их конформации и отхождение от каталитических субъединиц.

Каталитические субъединицы при этом активируются.



**Протеинкиназа А**  
неактивная

**Протеинкиназа А**  
активная

Алlostерическая активация протеинкиназы А при помощи цАМФ

## 7. Ковалентная (химическая) модификация.

Ковалентная модификация заключается в обратимом присоединении или отщеплении определенной группы, благодаря чему изменяется активность фермента. Чаще всего такой группой является фосфорная кислота, реже метильные и ацетильные группы. Фосфорилирование фермента происходит по остаткам серина, треонина, тирозина.

Присоединение фосфорной кислоты к белку осуществляют ферменты **протеинкиназы**,  
*отщепление – протеин-фосфатазы.*

Ферменты могут быть активны как в фосфорилированном так и в дефосфорилированном состоянии.

Например, ферменты гликогенфосфорилаза и гликогенсинтаза при потребности организма в глюкозе фосфорилируются, при этом фосфорилаза гликогена становится активной и начинает расщепление гликогена, а гликогенсинтаза неактивна.

При необходимости синтеза гликогена оба фермента дефосфорилируются, синтаза при этом становится активной, фосфорилаза – неактивной.



Изменение активности фермента  
путем фосфорилирования-дефосфорилирования

# II классификация и номенклатура ферментов

Каждый фермент имеет 2 названия.  
Первое короткое, так называемое рабочее.  
Второе (более полное) систематическое.

## ***Рабочее название***

В названиях большинства ферментов содержится суффикс «аза», присоединённый к названию субстрата реакции,

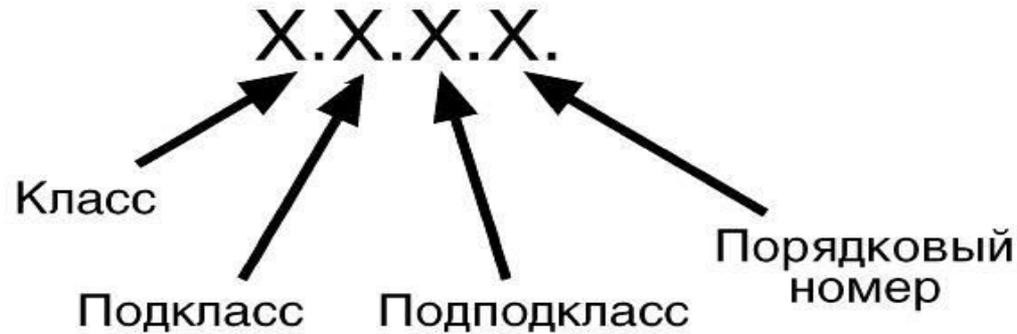
например уре**аза**, сахар**аза**, лип**аза**, нукле**аза**

или к названию химического превращения определённого субстрата, например лактатдегидроген**аза**, аденилатцикл**аза**, фосфоглюкомут**аза**, пируваткарбоксил**аза**.

## II классификация и номенклатура ферментов

В 1961 г в Москве V Международный биохимический союз принял современную классификацию ферментов. В соответствии с этой классификацией все ферменты делятся:

- на классы – по типу катализируемой реакции,
- каждый класс подразделяется на подклассы – по природе атакуемой химической группы,
- подклассы делятся на подподклассы – по характеру атакуемой связи или по природе акцептора.



Каждому ферменту присвоен четырехзначный классификационный номер, включающий класс, подкласс, подподкласс и порядковый номер в подподклассе.

Например,

*алкогольдегидрогеназа имеет номер КФ 1.1.1.1. – это оксидоредуктаза, действует на ОН-группу донора с НАД в качестве акцептора с первым порядковым номером в своем подподклассе; лактатдегидрогеназа – КФ 1.1.1.27, действует на ОН-группу донора с НАД в качестве акцептора с порядковым номером 27 в своем подподклассе*

# Номенклатера ферментов

1. **Тривиальное название** – название, сложившееся исторически.

Например, пепсин, трипсин.

Для некоторых ферментов к названию субстрата добавляется окончание "-аза" – уреаза, амилаза, липаза.

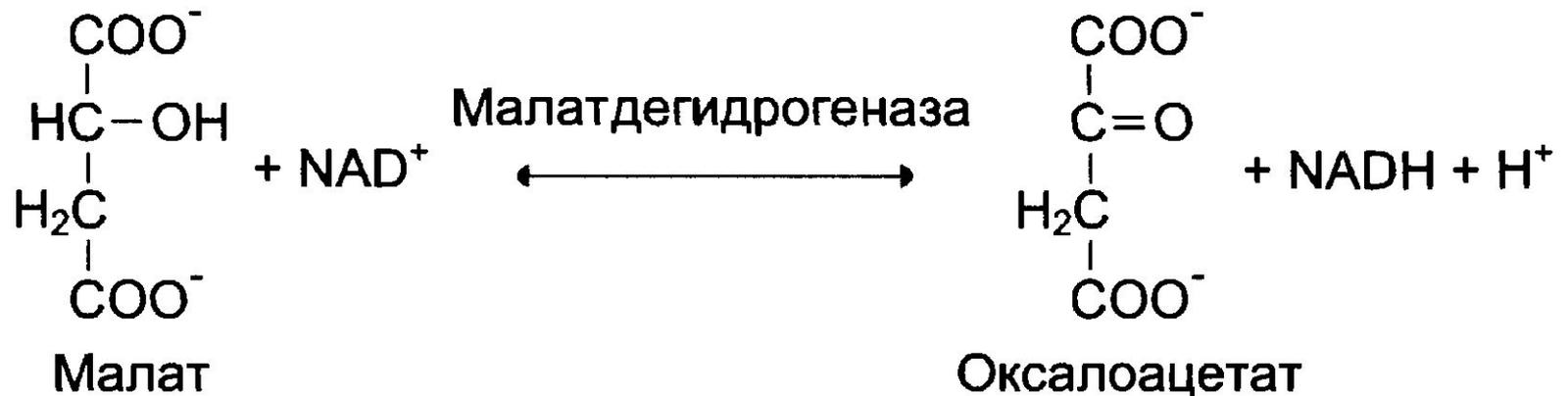
2. **Систематическое название** – согласно современной классификации. Как производное систематического названия у многих ферментов имеется одно или несколько рабочих названий.

# Классификация ферментов

<i>№ КФ</i>	<i>Класс</i>	<i>Тип катализируемой реакции</i>
1	Оксидоредуктазы	Окислительно-восстановительные реакции
2	Трансферазы	Перенос отдельных групп от донорной молекулы к акцепторной молекуле
3	Гидролазы	Гидролитическое (с участием воды) расщепление связей
4	Лиазы	Расщепление связей способом, отличным от гидролиза или окисления
5	Изомеразы	Взаимопревращение различных изомеров
6	Лигаза (или синтетаза)	Образование связей в реакциях конденсации двух различных соединений (используется энергия АТФ)

# 1 КФ. оксидоредуктазы

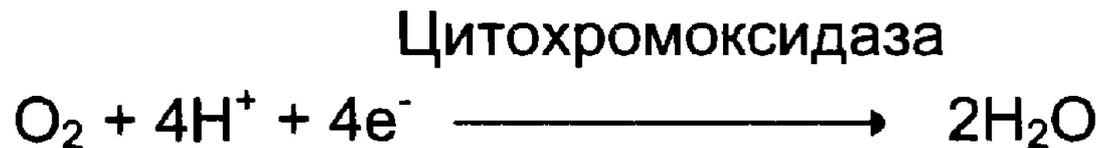
- Дегидрогеназы осуществляют отщепление водорода от субстрата. В качестве акцепторов используются НАД<sup>+</sup>, НАДН<sup>+</sup>, ФАД, ФМН



# 1 КФ. оксидоредуктазы

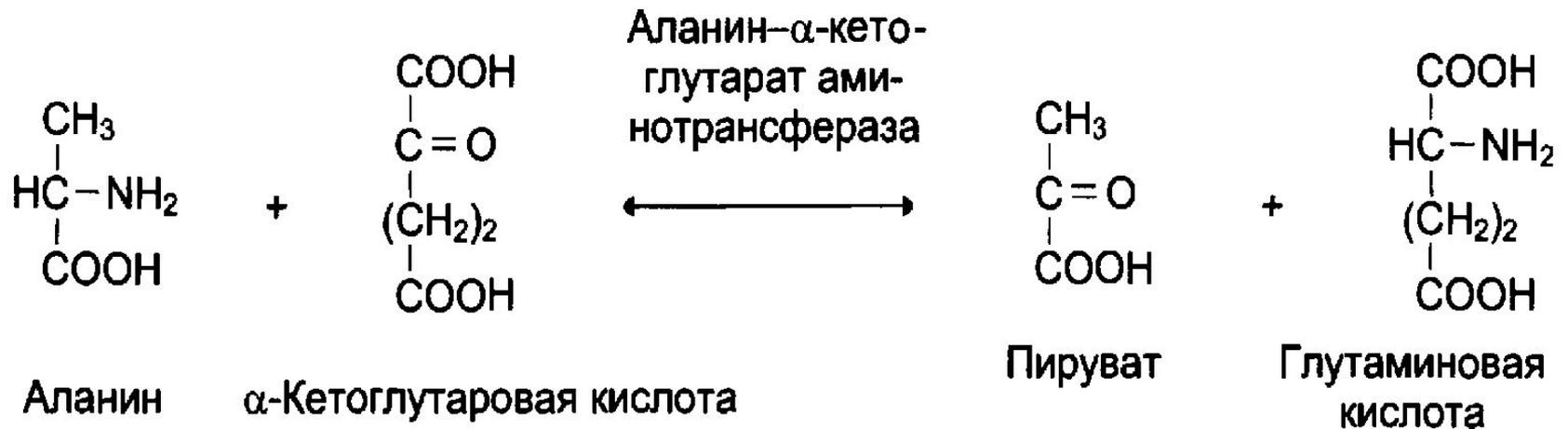
Другой пример:

- У оксидоредуктаз, акцептором электрона (ов) служит молекулярный кислород.



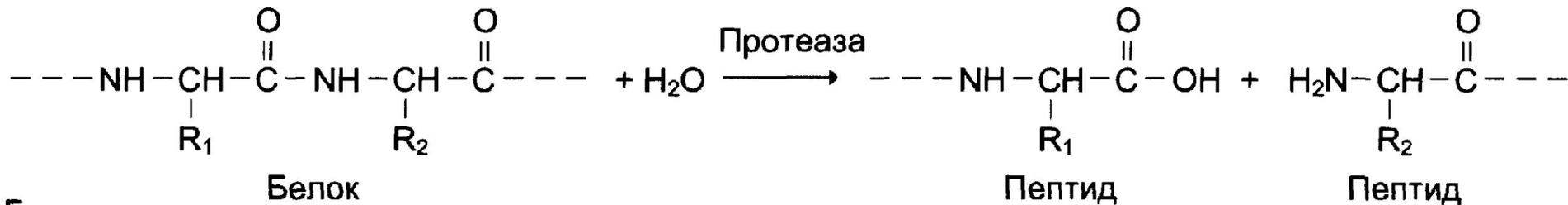
# 2 КФ. Трансферазы

- Катализируют перенос функциональных групп от одного соединения к другому



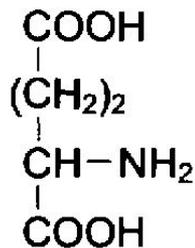
# 3 КФ. Гидролазы

- Катализируют реакции **гидролиза** (расщепления ковалентной связи с присоединением молекулы воды по месту разрыва). Это протеазы, липазы...



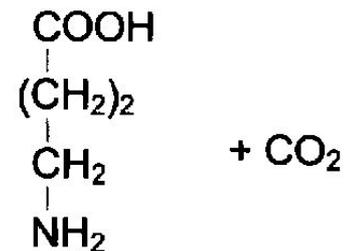
# 4 КФ. Лиазы

- К лиазам относят ферменты, отщепляющие от субстрата негидролитическим путём определённую группу (при этом могут отщепляться **CO<sub>2</sub>**, **H<sub>2</sub>O**, **NH<sub>2</sub>**, **SH<sub>2</sub>** или другие) или присоединение, чаще всего молекулы воды, по двойной связи

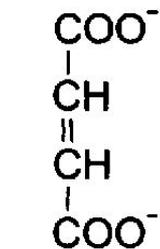


Глутаминовая кислота

Глутаматдекарбоксилаза

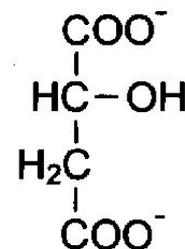
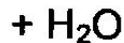


γ-Аминомасляная кислота (ГАМК)



Фумарат

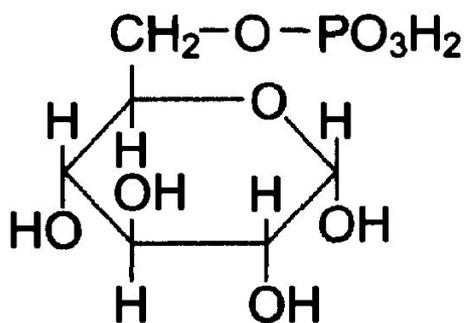
Фумаратгидратаза (фумараза)



Малат

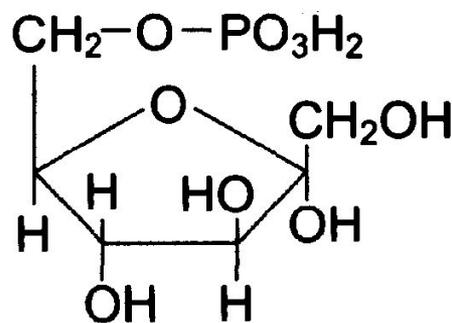
# 5 КФ. Изомеразы

- Катализируют различные внутримолекулярные превращения. Подразделяют в зависимости от типа реакции изомеризации.



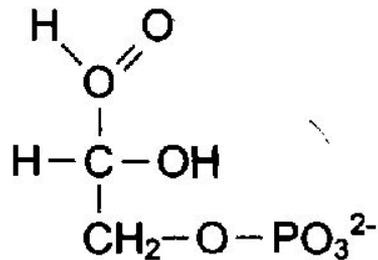
Глюкозо-6-фосфат

Фосфоглюкоизомераза



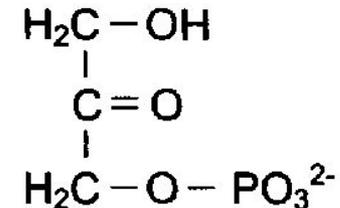
Фруктозо-6-фосфат

# 5 КФ. Изомеразы (другие примеры)



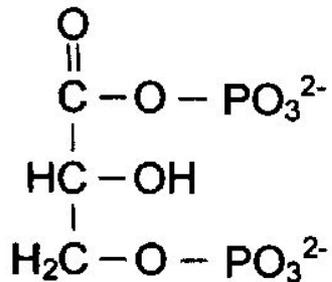
Глицеральдегид-3-фосфат

Триозофосфатизомераза



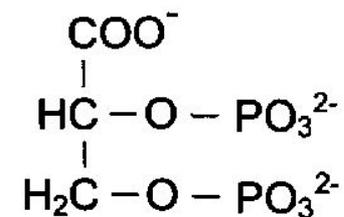
Дигидроксиацетонфосфат

---



1,3-Бисфосфоглицерат

Дифосфоглицератмутаза



2,3-Бисфосфоглицерат

# 6 КФ. Лигаза (или синтетаза)

Катализируют реакции присоединения друг к другу молекул с образованием ковалентной связи. Этот процесс сопряжен с разрывом фосфоэфирной связи в молекуле АТФ или других макроэргических соединений







# III. Кофакторы и коферменты

Большинство ферментов для проявления ферментативной активности нуждается в низкомолекулярных органических соединениях небелковой природы - КОФЕРМЕНТАх.

и/или ионах металлов - КОФАКТОРАх.

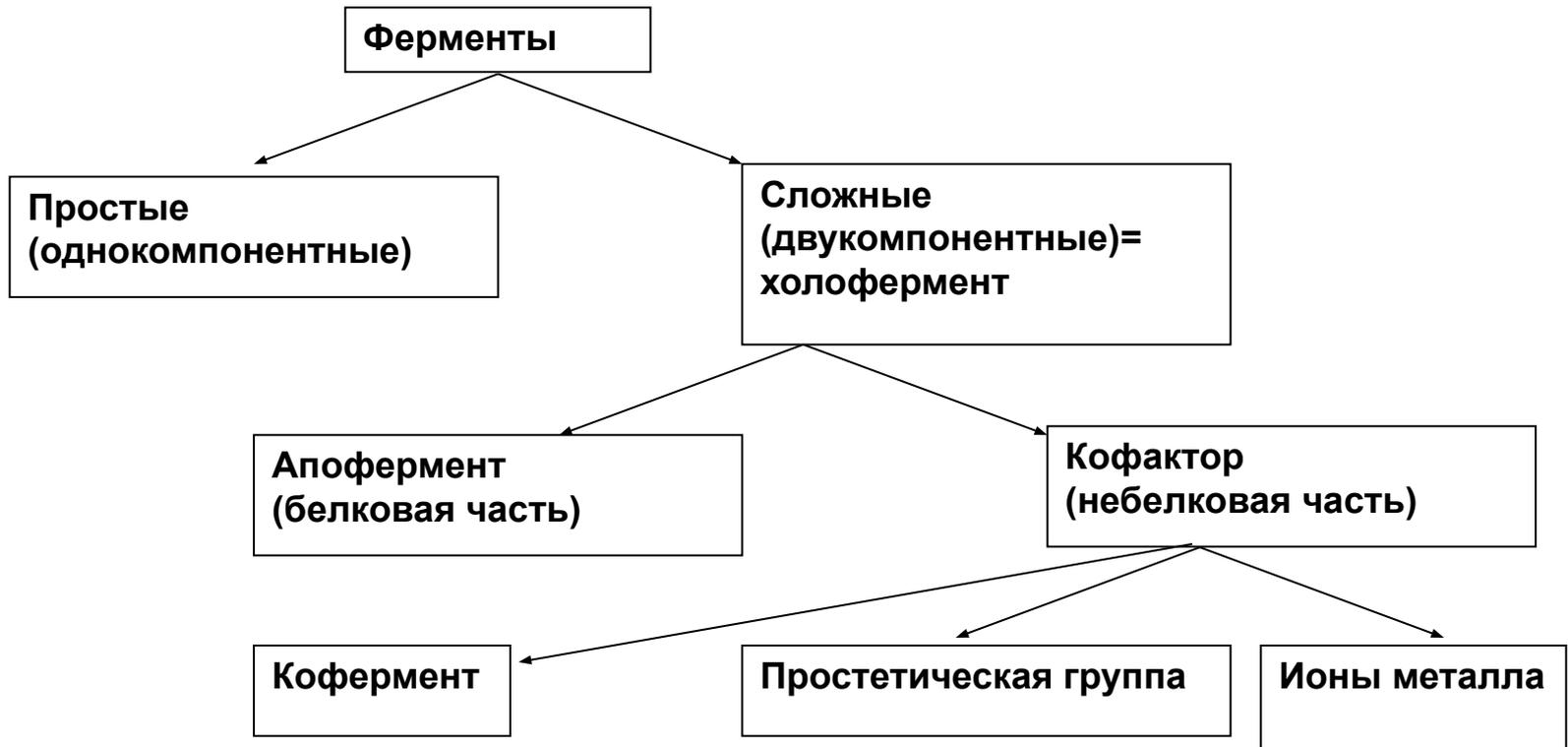
Большинство ферментов состоит из термолабильной белковой части и термостабильного небелкового фактора – кофермента.

Белковую часть называют «апофермент», который в отсутствие кофермента не обладает каталитической активностью.

Кофермент с белковой молекулой (апоферментом) формируют молекулу **холофермента**, обладающую каталитической активностью.

(«холо» = весь целый, **холофермент** = апофермент + кофермент)

# Структура ферментов



# Структурная организация ферментов

## Структура ферментов

**Согласно одной из классификаций все коферменты делят на 2 группы:**

- производные витаминов;**
- невитаминные кофакторы.**

## Важнейшие коферменты ферментов

Наименование КоЕ	витамин	Группы, подлежащие переносу
Никатинамидаденин динуклеотид (НАД, НАДФ)	Никотинамид, витамин РР	Атомы водорода (электроны)
Флавинмононуклеотид, рибофлавинфосфат (ФМН, ФАД)	Рибофлавин, витамин В <sub>2</sub>	Атомы водорода (электроны)
Коэнзим А (СоА) или КоА	Пантотеновая кислота	Ацильные, ацетильные и др. группы
Тетрагидрофолиевая кислота (ТГФ)	Фолиевая кислота	Метильные, метиленовы, формильные группы или иминогруппы (одноуглеродные остатки)
Биоцитин	Биотин, витамин Н	Двуокись углерода (активная форма СО <sub>2</sub> )
Тиаминдифосфат (ТДФ)	Тиамин, витамин В <sub>1</sub>	Альдегиды и кетоны
Пиридоксальфосфат (ПФ)	Пиридоксин, витамин В <sub>6</sub>	Аминогруппы, Карбоксильные группы
Дезоксиаденозил– и (метил)–кобаломин (В <sub>12</sub> – коферменты)	Цианкоаломин, витамин В <sub>12</sub>	Атомы водорода, протоны и электроны

# Невитаминные кофакторы

К невитаминным кофакторам относят следующие соединения:

– HS-глутатион,

– АТФ,

– липоевая кислота,

– производные нуклеозидов (уридинфосфат, цитидинфосфат, фосфоаденозинфосфосульфат),

– порфиринсодержащие вещества,

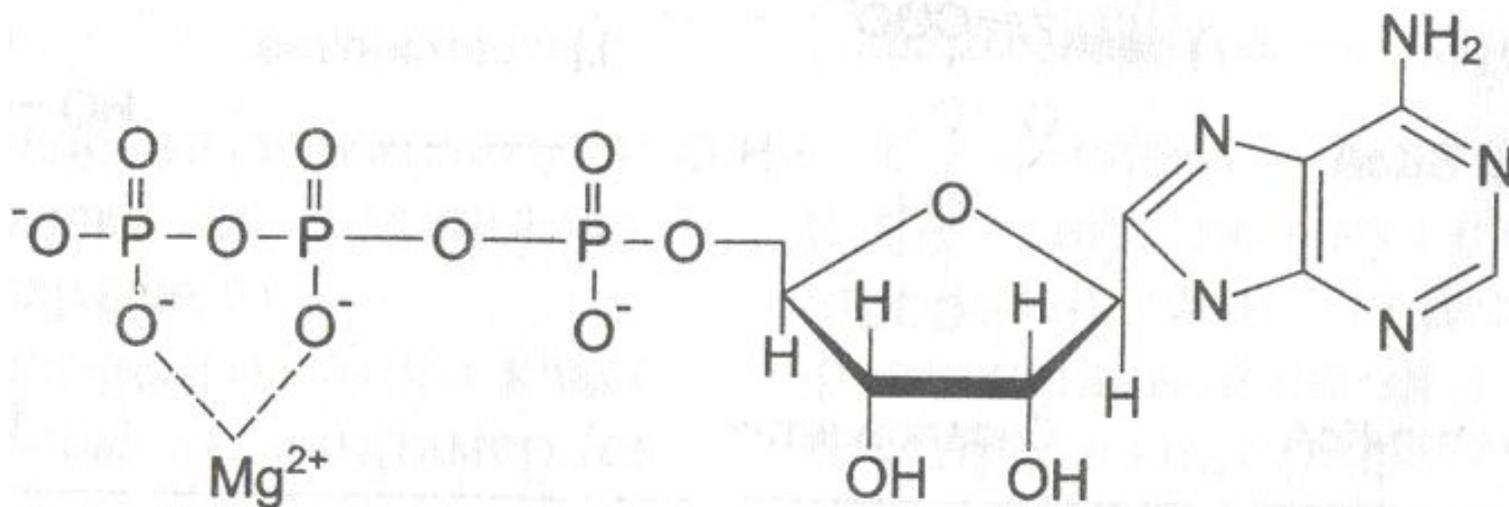
– тРНК, которые в составе ферментов аминоксил-тРНК-синтетаз принимают активное участие в транспорте аминокислот к рибосоме, где осуществляется синтез белка.

# Роль металлов в функционировании ферментов

1. Ионы металла выполняют *функцию стабилизаторов* молекулы субстрата, активного центра фермента и конформации белковой молекулы фермента, а именно третичной и четвертичной структур:
  - а) ионы металлов – стабилизаторы молекулы субстрата;
  - б) ионы металлов – стабилизаторы активного центра фермента;
  - в) роль металлов в стабилизации третичной и четвертичной структуры фермента;
2. Ионы металлов могут принимать непосредственное *участие в акте катализа*:
  - а) участие в электрофильном катализе;
  - б) участие в окислительно-восстановительных реакциях;
3. Роль металлов в *регуляции активности ферментов*.

Пример:

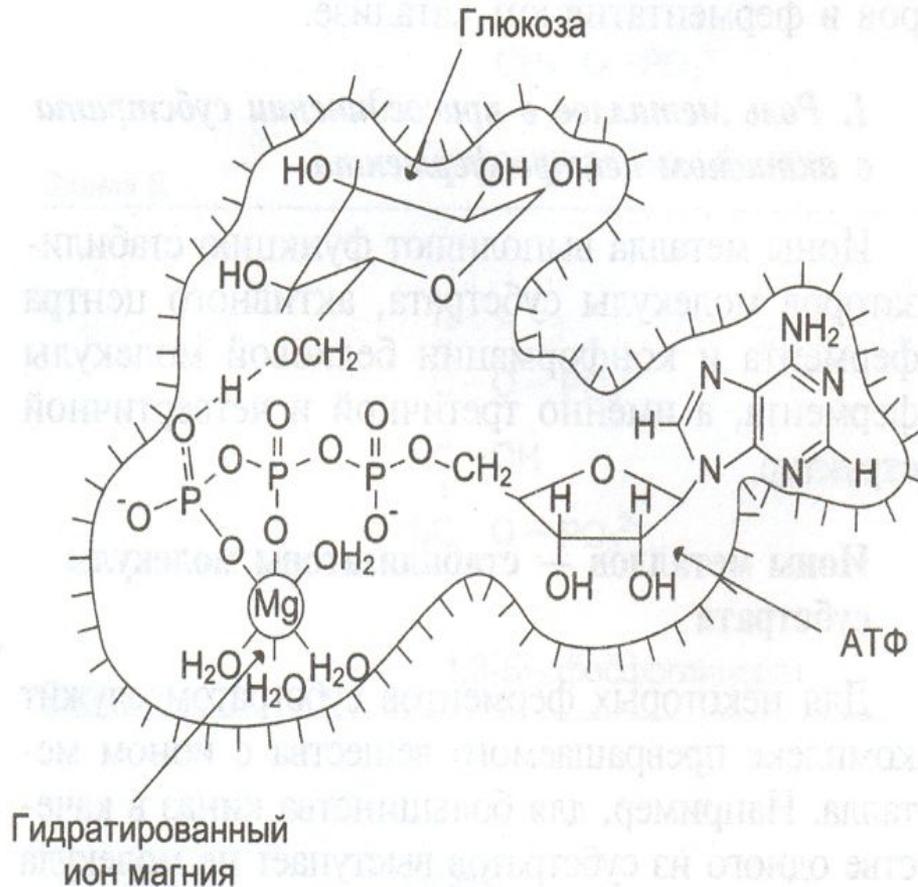
## роли металлов в стабилизации молекулы субстрата



Структура АТФ

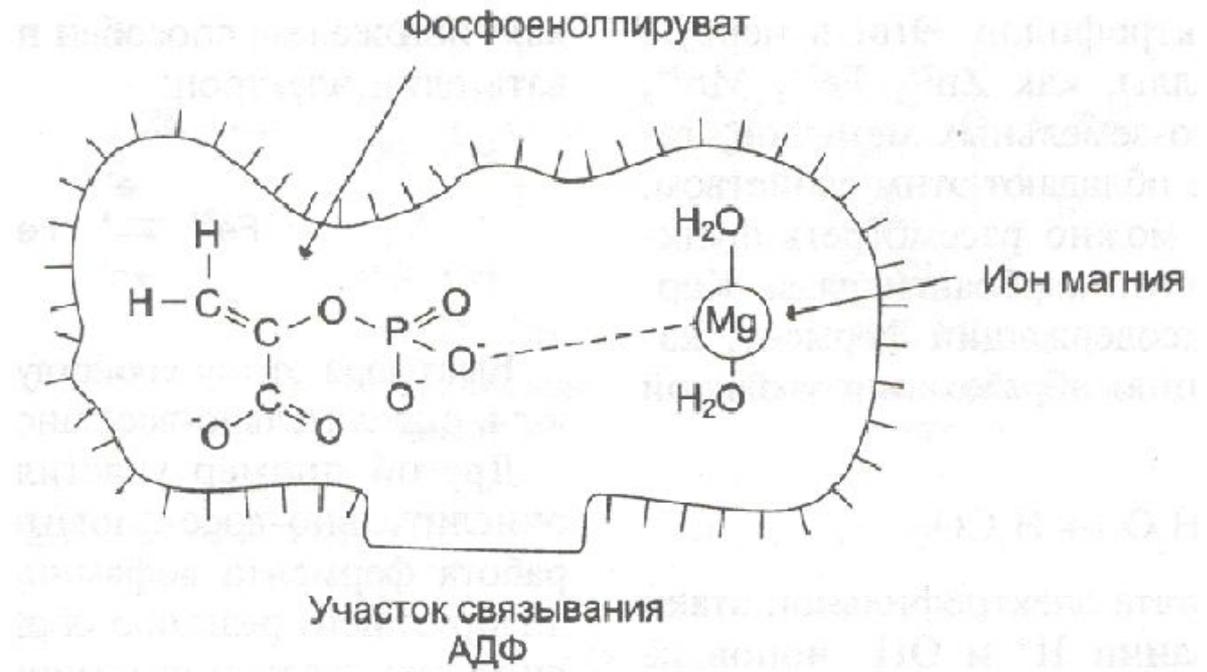
## Пример:

**Участие ионов магния**  
в присоединении субстрата  
**в активном центре** гексокиназы.



В активном центре гексокиназы есть участки связывания для молекулы глюкозы и комплекса  $Mg^{2+}$ -АТФ. В результате ферментативной реакции происходит перенос концевого,  $\gamma$ -фосфатного остатка молекулы АТФ на глюкозу с образованием глюкозо-6-фосфата

Пример:



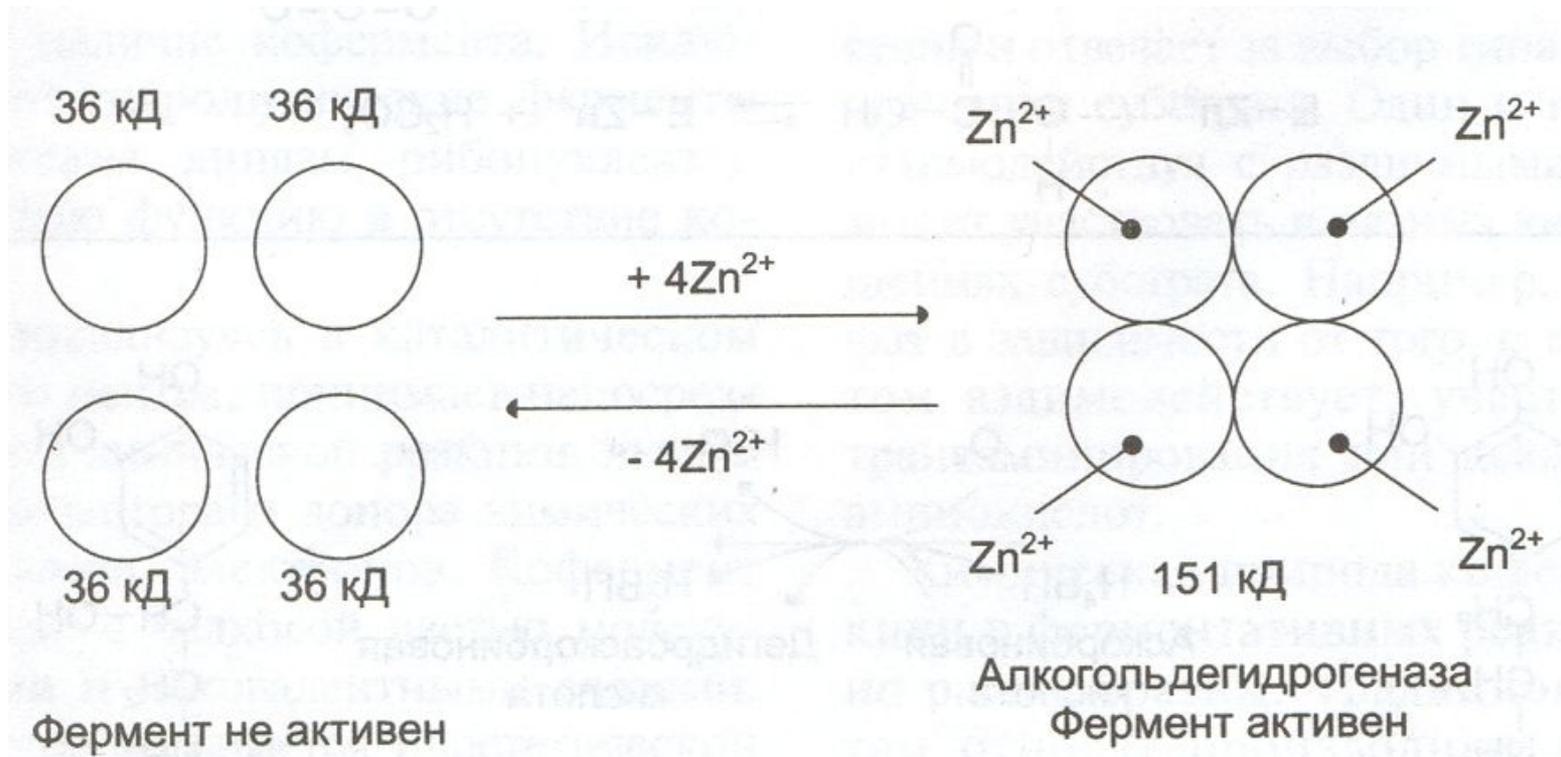
## Участие ионов магния в присоединении субстрата в активном центре пируваткиназы.

Активный центр пируваткиназы имеет участки связывания для фосфоенолпирувата и АДФ.

$\text{Mg}^{2+}$  участвует в стабилизации активного центра, что облегчает присоединение фосфоенолпирувата.

В ходе ферментативной реакции образуются пируват и АТФ.

Пример:



**Роль ионов цинка  
в стабилизации четвертичной структуры  
алкогольдегидрогеназы**

# Активные и аллостерические центры, их характеристика

## Аллостерический центр (или центры)

(от греч. allos— другой, иной и steros— пространственный, структурный) – участок молекулы фермента, с которым связываются определенные, обычно низкомолекулярные, вещества (эфффекторы, или модификаторы), молекулы которых отличаются по структуре от субстратов.

# IV Механизм действия ферментов

- Механизм действия ферментов может быть рассмотрен с 2-х позиций:

С точки зрения изменения **энергетики** химических реакций и

С точки зрения событий в **активном центре**

# А. Энергетические изменения при химических реакциях

Любые химические реакции протекают подчиняясь двум основным законам термодинамики:

1. Закону сохранения энергии
2. Закону энтропии

...общая энергия химической системы и её окружения остаётся постоянной, при этом химическая система стремится к снижению упорядоченности (то есть увеличению энтропии).

Энтропия – мера беспорядка.

Рассмотрим реакцию разложения угольной кислоты (не ферментативной реакцией):



Угольная кислота слабая; реакция её разложения пойдет в обычных условиях, если молекулы угольной кислоты имеют энергию превышающую определённый уровень, называемый энергией активации  $E_a$  (рис. 1).

**Энергией активации** называют дополнительное количество **кинетической энергии**, необходимое молекулам вещества, чтобы они вступили в реакцию.

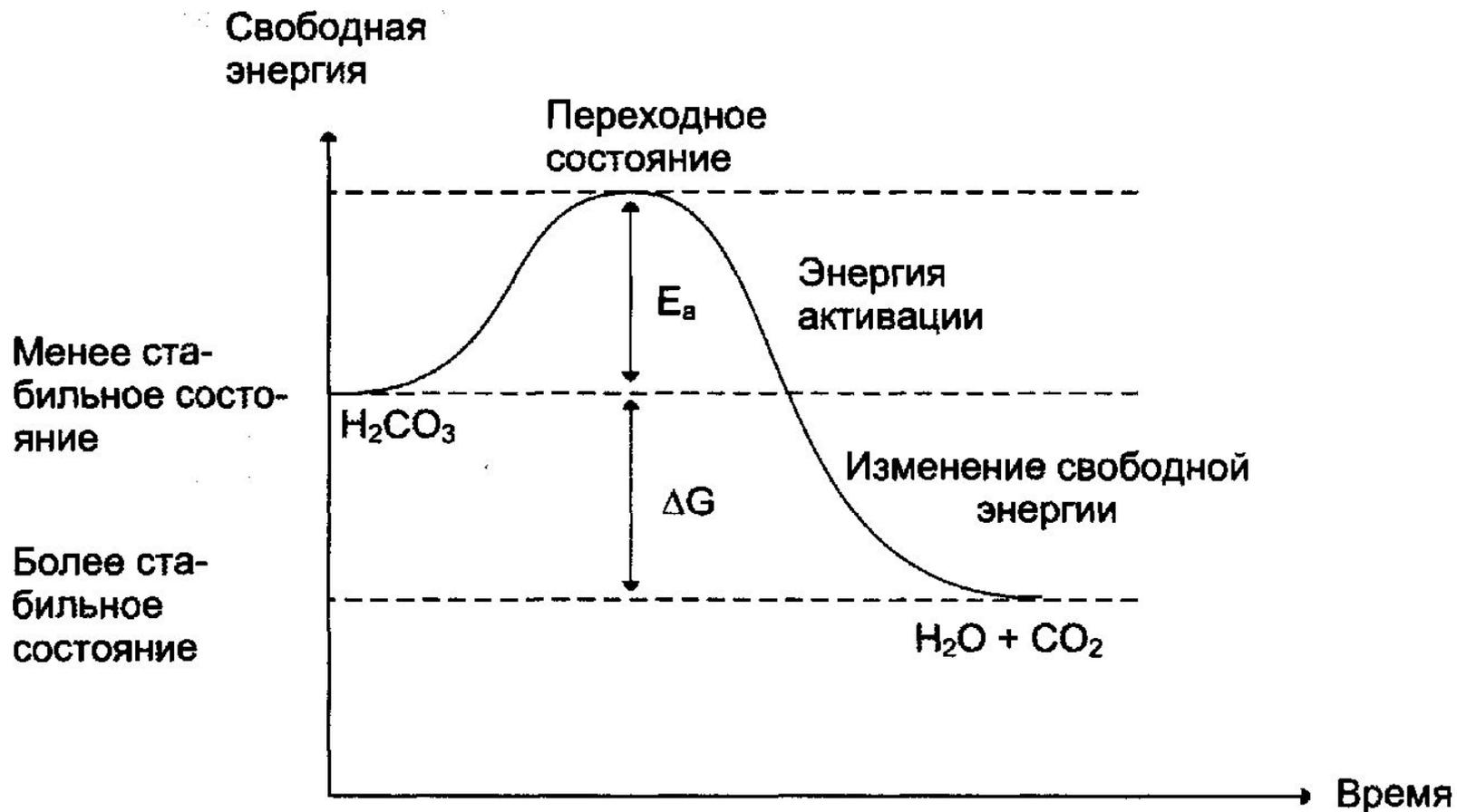


Рис. 1. Изменение свободной энергии при разложении угольной кислоты

При достижении этого энергетического барьера в молекуле происходят изменения, вызывающие перераспределение химических связей и образование новых соединений. Говорят, что молекулы, обладающие  $E_a$ , находятся в переходном состоянии. Разницу энергий между исходным реагентом  $H_2CO_3$  и конечными соединениями  $H_2O$  и  $CO_2$  называют **свободной энергией** реакции ( $\Delta G$ ). Молекулы  $H_2O$  и  $CO_2$  более стабильные вещества, чем  $H_2CO_3$ , т.е. обладают меньшей энергией и при обычных условиях практически не реагируют.

Выделившаяся энергия рассеивается в виде тепла.

Чем больше молекул обладают энергией, превышающей уровень  $E_a$ , тем выше скорость химической реакции.

**Повысить скорость химической реакции можно нагреванием.** При этом увеличивается скорость реагирующих молекул. Однако **для живых организмов высокие температуры губительны**, поэтому в клетке для ускорения химических реакций используются **ферменты**.

**Ферменты обеспечивают высокую скорость реакций при оптимальных условиях, существующих в клетке, путём понижения уровня энергии активации ( $E_a$ ) субстрата(ов).**

Таким образом, ферменты снижают высоту энергетического барьера, в результате возрастает количество реакционно-способных молекул, следовательно, увеличивается скорость реакции.

В механизме ферментативного катализа решающее значение имеет образование нестойких промежуточных соединений – фермент-субстратный комплекс  $ES$ , подвергающийся превращению в нестабильный переходный комплекс  $EP$ , который почти мгновенно распадается на свободный фермент и продукт реакции ( $E + P$ ).



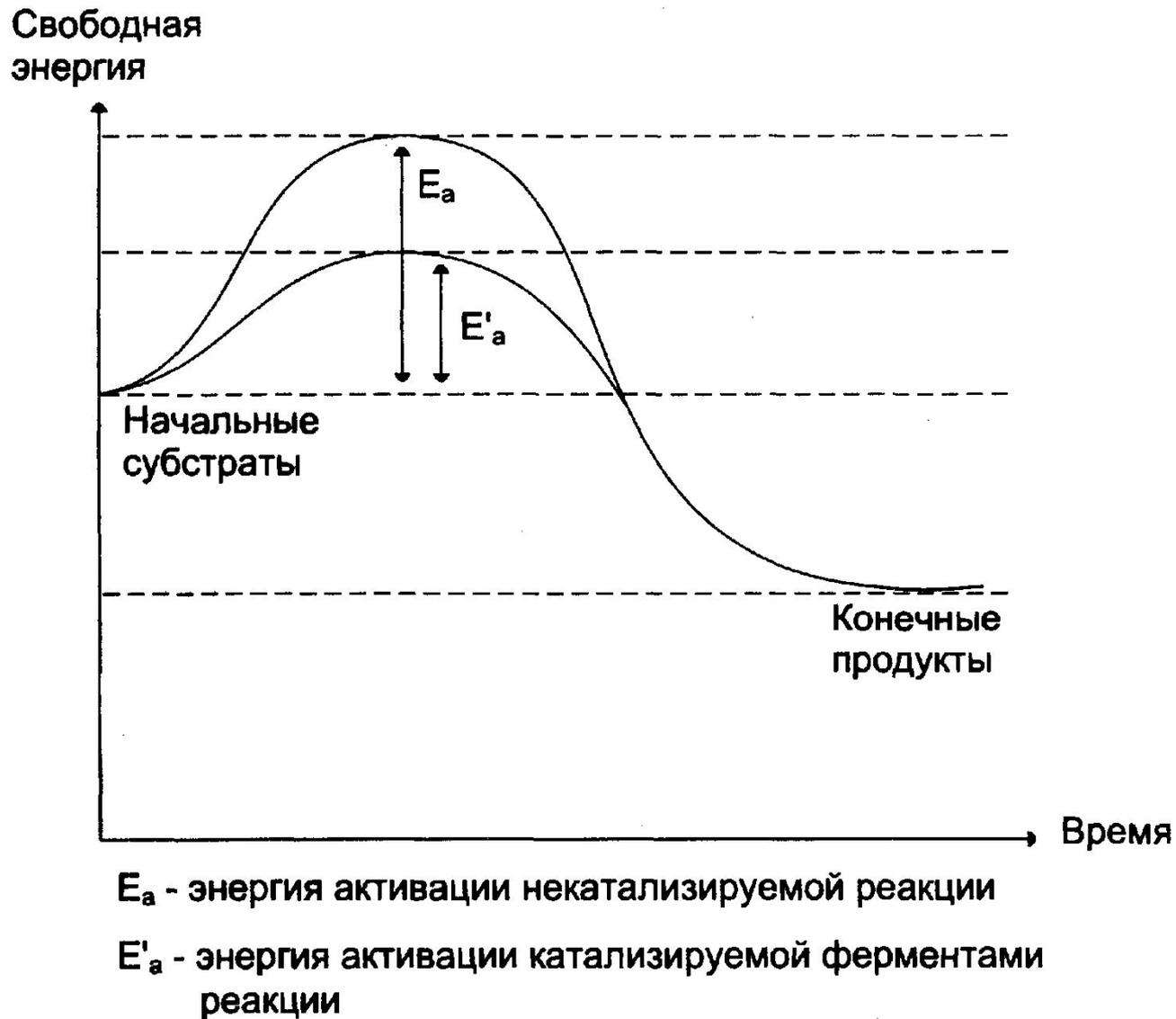


Рис. 2. Изменение свободной энергии в ходе химической реакции, некатализируемой и катализируемой ферментами

Таким образом, биологические катализаторы (ферменты) не изменяют свободную энергию субстратов и поэтому не меняют равновесие реакции (рис. 2).

Объяснение к рис. 2.

Фермент **понижает** активацию  $E_a$ , т.е. снижает высоту энергетического барьера, в результате возрастает доля реакционно-способных молекул, следовательно, увеличивается скорость реакции.

Фермент, выполняя функцию катализатора химической реакции, подчиняется общим законам катализа и обладает всеми свойствами, характерными для небиологических катализаторов, однако имеет и **отличительные свойства**, связанные с особенностями строения ферментов.

## Сходство ферментов с небиологическими катализаторами:

- фермент катализирует энергетически возможные реакции;
- энергия химической системы остается постоянной;
- в ходе реакции направление реакции не изменяется;
- ферменты не расходуются в ходе реакции.

# Отличие ферментов от небиологических катализаторов:

- скорость ферментативных реакций выше, чем реакций катализируемых небелковыми катализаторами;
- ферменты обладают высокой специфичностью;
- ферментативная реакция проходит в клетке, т.е. при температуре  $37^{\circ}\text{C}$ , постоянном атмосферном давлении и физиологическом значении pH;
- скорость ферментативной реакции можно регулировать.

# Б. Кинетика ферментативного катализа

- См стр. 94

Ученые Михаэлис и Ментен разработали теорию взаимодействия фермента и субстрата.

Константа Михаэлис-Ментен ( $K_m$ ) показывает концентрацию субстрата при которой достигается  $\frac{1}{2} V_{max}$  ( $\frac{1}{2}$  скорости фермента).

$K_m$  показывает сродство фермента к субстрату, чем меньше её значение, тем больше сродство.

# Влияние концентрации субстрата на скорость ферментативной реакции



Теоретический график зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата при постоянной концентрации фермента:

- а — реакция первого порядка (при  $[S] < K_m$  скорость реакции пропорциональна концентрации субстрата);
- б — реакция смешанного порядка;
- в — реакция нулевого порядка, когда  $v = V_{max}$  и скорость реакции не зависит от концентрации субстрата

# Теории и стадии ферментативного катализа



Leonor Michaelis,  
1875–1949



Maud Menten,  
1879–1960

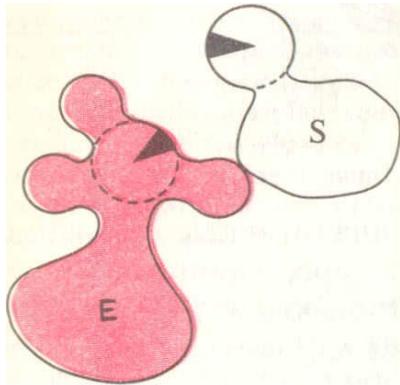


- I. Диффузия субстрата(S) к ферменту(E) и стерическое связывание его с активным центром фермента, т. е. образование фермент-субстратного комплекса (ES).
- II. Преобразование первичного комплекса в один или несколько активированных фермент-субстратных комплексов ( $ES^*$ ,  $ES^{**}$  ...).
- III. Отделение продуктов (P) реакции от активного центра и диффузия его в окружающую среду.

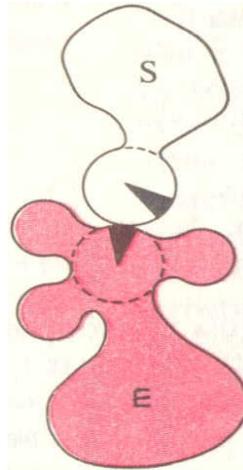
## Механизм действия ферментов

Факторы, влияющие на эффективность ферментативного катализа

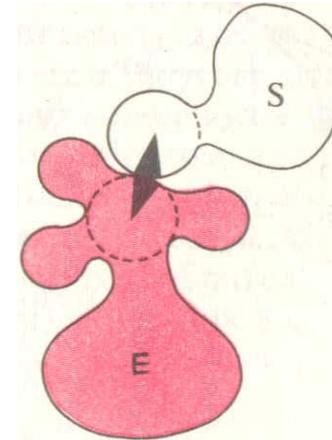
### 1. Сближение и ориентация



Неправильная ориентация, неправильное сближение



Правильное сближение, неправильная ориентация



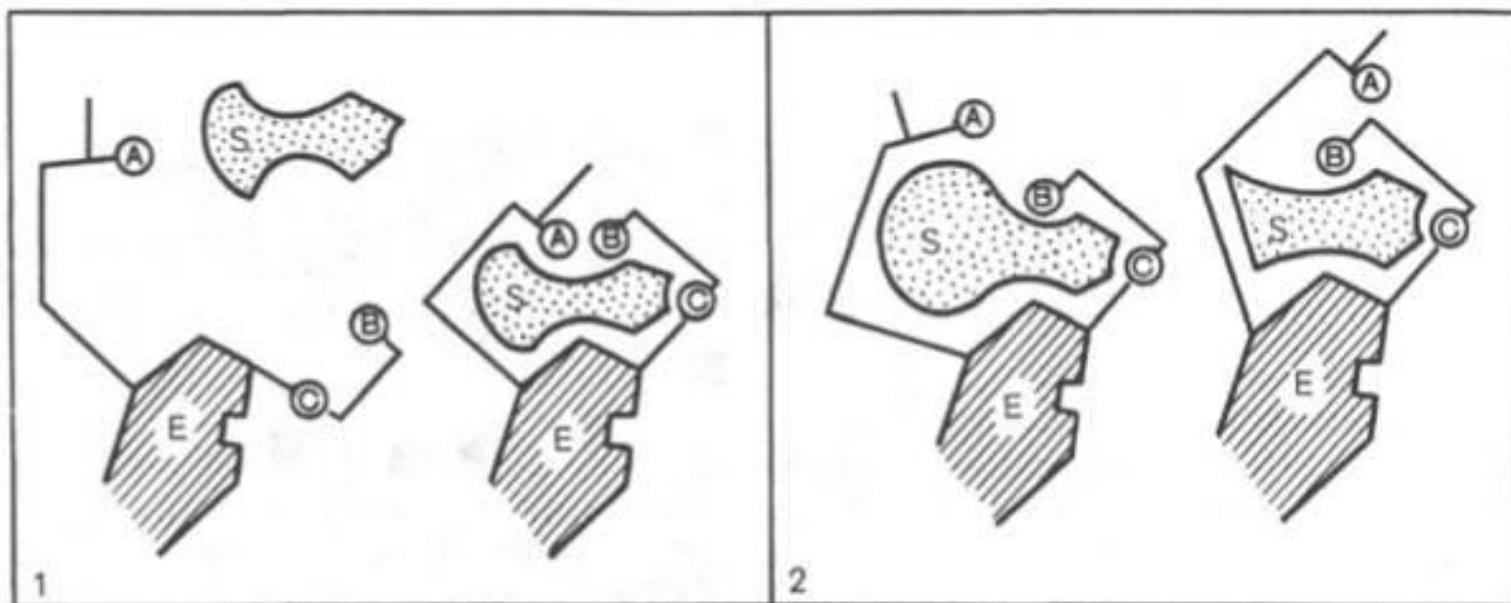
Правильное сближение, правильная ориентация

Схематическое изображение процессов сближения и ориентации при взаимодействии молекулы субстрата S с каталитической группой в активном центре фермента E.

## Механизм действия ферментов

Факторы, влияющие на эффективность ферментативного катализа

### 2. Напряжение и деформация: **индуцированное соответствие**



**Индукционное соответствие** между активным центром фермента и напряженной формой молекулы субстрата

# Молекулярные механизмы ферментативного катализа

Механизмы ферментативного катализа определяются ролью функциональных групп активного центра фермента в химической реакции превращения субстрата в продукт.

Выделяют 2 основных механизма ферментативного катализа:

**КИСЛОТНО-ОСНОВНОЙ** и **КОВАЛЕНТНЫЙ** катализ

СЛОЖНО.....

# Кислотно-основной катализ

Концепция кислотно-основного катализа объясняет ферментативную активность участием в химической реакции кислотных групп (доноры протонов) и/или основных групп (акцепторы протонов).

Кислотно-основной катализ - часто встречающееся явление.

Аминокислотные остатки, входящие в состав активного центра, имеют функциональные группы, проявляющие свойства как кислот, так и оснований.

# Факторы, влияющие на эффективность ферментативного катализа

## Общий кислотно-основный катализ

Некоторые протон-донорные группы:

– COOH

–  $\text{N}^+$

– SH



Некоторые протон-акцепторные группы:

– COO<sup>-</sup>

– N

– S



Многие органические реакции ускоряются донорами или акцепторами протонов, т. е. обобщенными кислотами или основаниями.

Активные центры ряда ферментов содержат функциональные группы аминокислотных остатков, принимающие участие в каталитических процессах в качестве доноров или акцепторов протонов.

Здесь показаны некоторые из этих групп:  
– SH-группа принадлежит цистеину,  
имидазольная группа – гистидину.

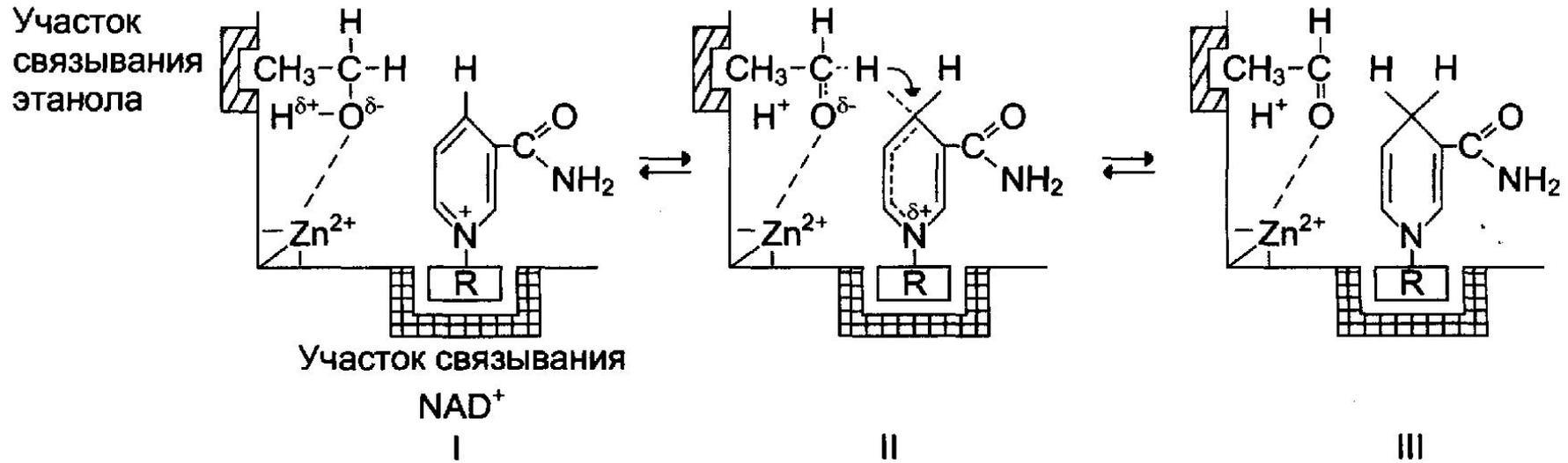
К аминокислотам, участвующим в кислотно-основном катализе, в первую очередь относятся цистеин, тирозин, серин, лизин, глутаминовую и аспарагиновую кислоты и гистидин.

Радикалы этих аминокислот в протонированной форме – кислоты (доноры протона),  
в депротонированной форме – основания (акцепторы протона).

Примером кислотно-основного катализа, в котором кофакторами являются ионы  $Zn^{2+}$ , а в качестве **кофермента** используется молекула  $NAD^+$ , можно привести фермент **алкогольдегидрогеназу** печени, катализирующую реакцию окисления спирта до уксусного альдегида:



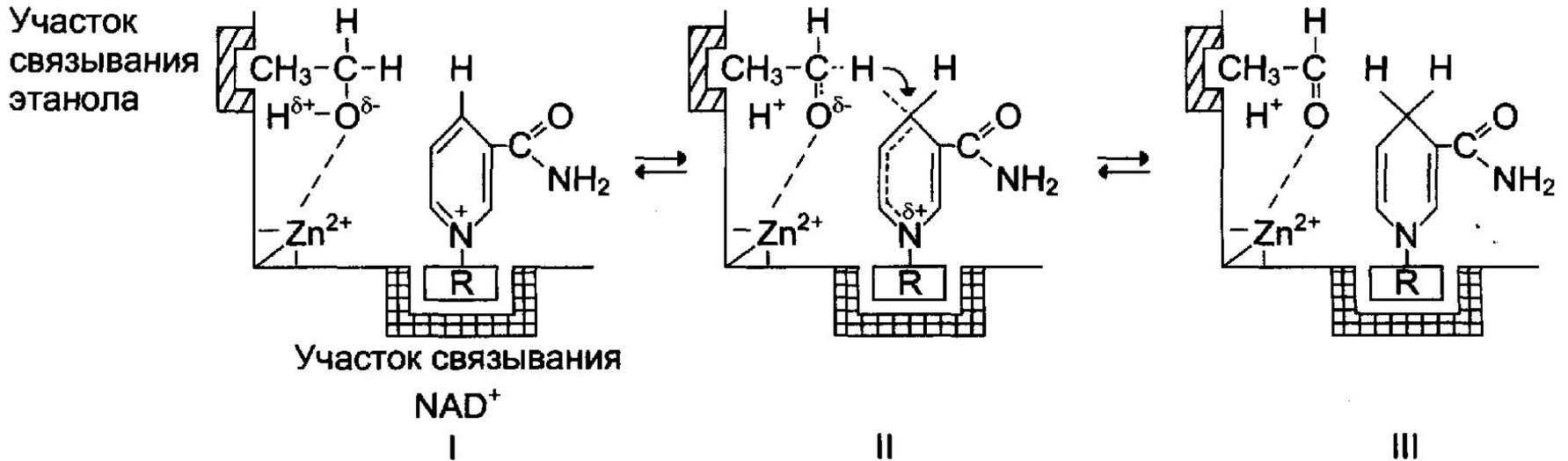
# Механизм кислотно-основного катализа на примере алкогольдегидрогеназы печени



I – молекула этилового спирта имеет центр связывания, обеспечивающий гидрофобное взаимодействие активного центра и метильной группы спирта;

II – положительно заряженный атом цинка способствует отщеплению протонов от спиртовой группы этанола с образованием отрицательно заряженного атома кислорода.

# продолжение:



... Отрицательный заряд перераспределяется между атомом кислорода и соседним атомом водорода, который затем в виде гидрид-иона переносится на четвёртый углеродный атом никотинамида кофермента NAD<sup>+</sup>;

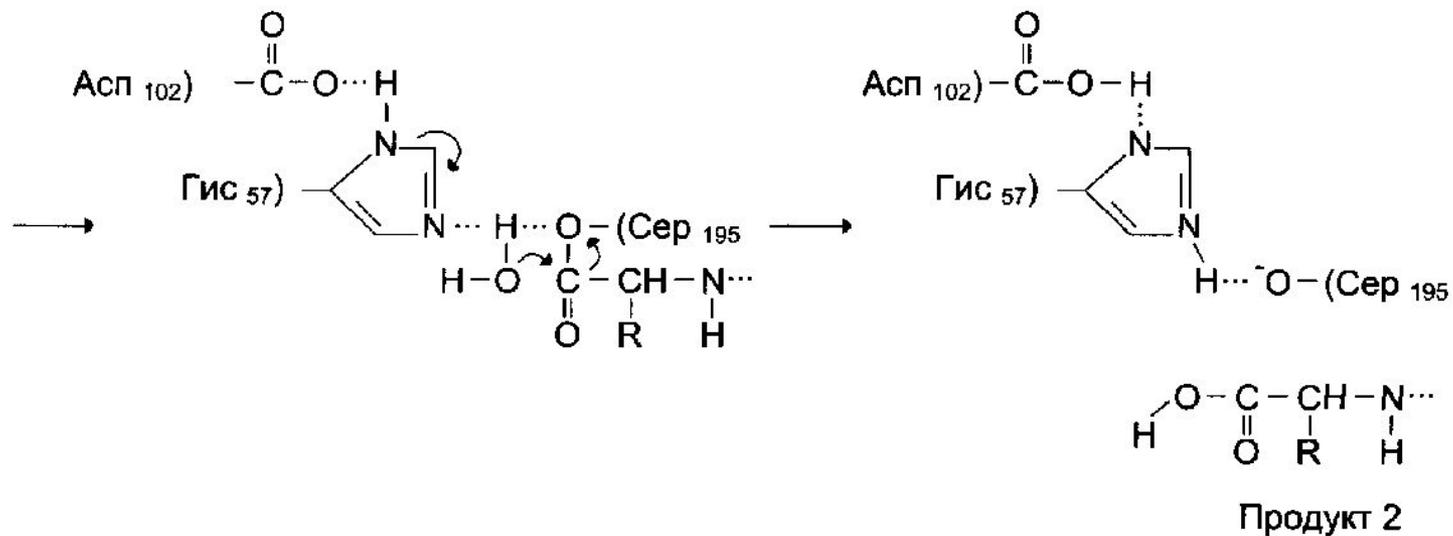
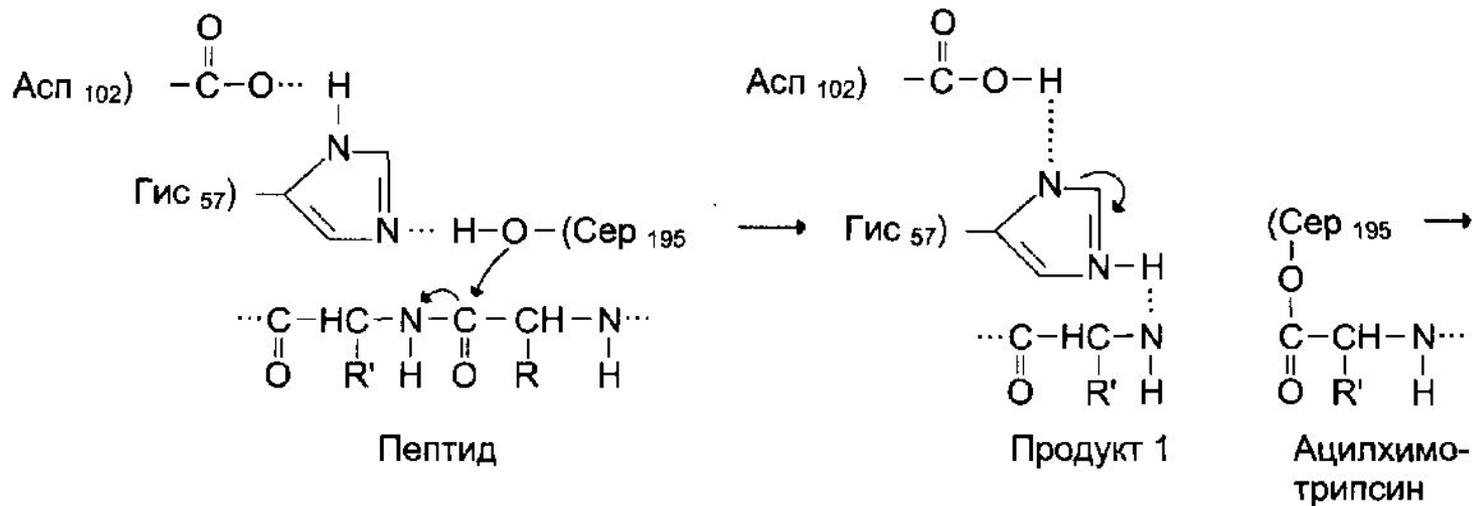
III – в результате формируется восстановленная форма NADH и уксусный альдегид.

## 2. Ковалентный катализ

Ковалентный катализ основан на атаке нуклеофильных (отрицательно заряженных) или электрофильных (положительно заряженных) групп активного центра фермента молекулами субстрата с формированием ковалентной связи между субстратом и коферментом или функциональной группой аминокислотного остатка активного центра фермента.

Действие «сериновых протеаз», таких как **трипсин, химитрипсин** и тромбин, пример механизма **ковалентного катализа** когда ковалентная связь образуется между субстратом и аминокислотным остатком (радикалом) **серина** в активном центре фермента.

Термин «сериновые протеазы» связан с тем что, **аминокислотный остаток серина входит в состав активного центра** всех этих ферментов и **участвует** непосредственно **в катализе**.



Механизм ковалентного катализа в активном центре химотрипсина

## Механизм действия ферментов

Факторы, влияющие на эффективность ферментативного катализа

### *Ковалентный катализ*

Некатализируемая реакция       $RX + H_2O \rightarrow ROH + HX$

Катализируемая реакция       $RX + \mathbf{E-OH} \rightarrow ROH + \mathbf{EX}$   
    $\mathbf{EX} + H_2O \rightarrow E-OH + HX$

Суммарная реакция               $RX + H_2O \rightarrow ROH + HX$

Одна из моделей ковалентного катализа. В некоторых ферментативных реакциях фермент замещает функциональную группу R в субстрате RX, в результате чего образуется ковалентный комплекс EX. Он нестабилен и гидролизуется значительно быстрее, чем RX.

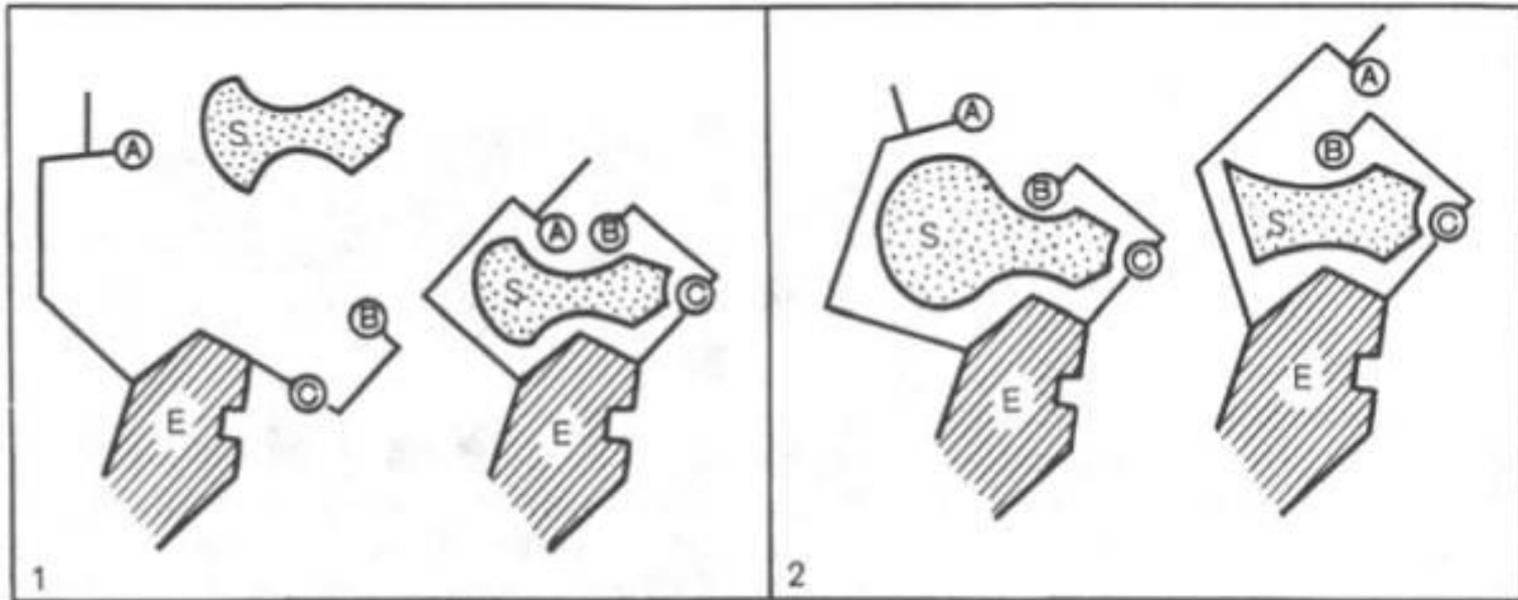
К ферментам, осуществляющим ковалентный катализ, относится химотрипсин.

## Гипотеза «ключа и замка»



Образование нестойкого фермент-субстратного комплекса согласно теории Э. Фишера «ключ-замок»

## Гипотеза индуцированного соответствия



Изменения структуры активного центра фермента, вызванные субстратом, согласно модели «индуцированного соответствия» Д. Кошленда

# Объяснить:

Методы определения скорости ферментативных реакция

- По убыли субстрата,
- По нарастанию концентрации продуктов реакции

...синтетические цветные аналоги субстрата...

...образование с продуктом реакции цветных соединений,

Концентрацию которых определяют на ФЭК.

Не окрашенные (в УФ спектре)

спектрофотометрически

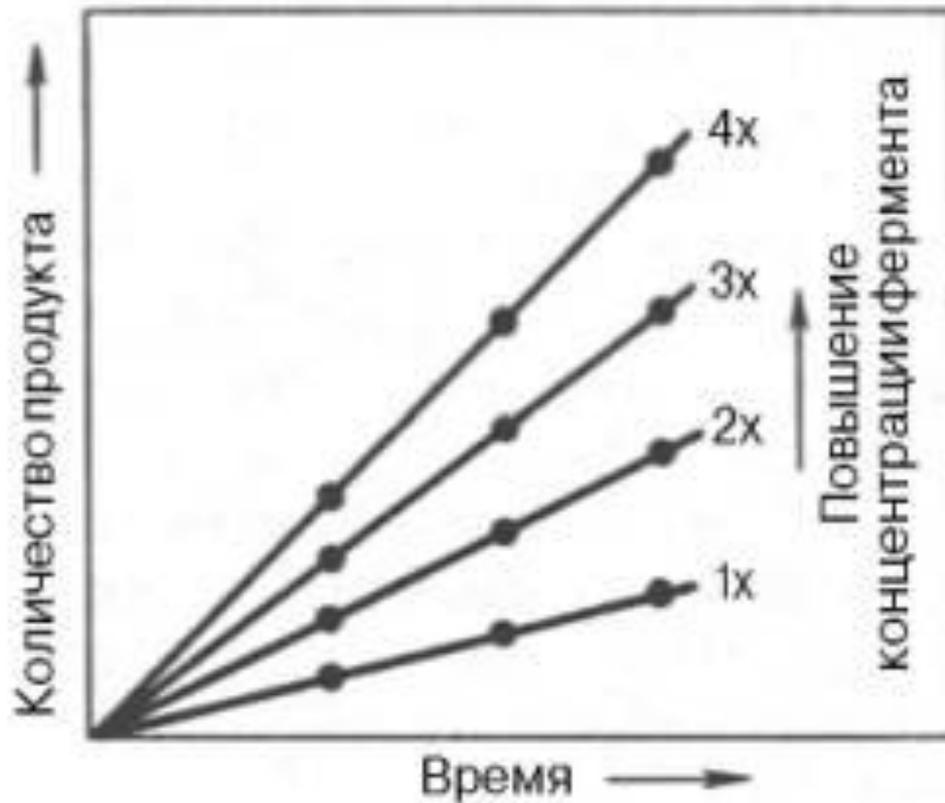
# Влияние концентрации субстрата на скорость ферментативной реакции



Теоретический график зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата при постоянной концентрации фермента:

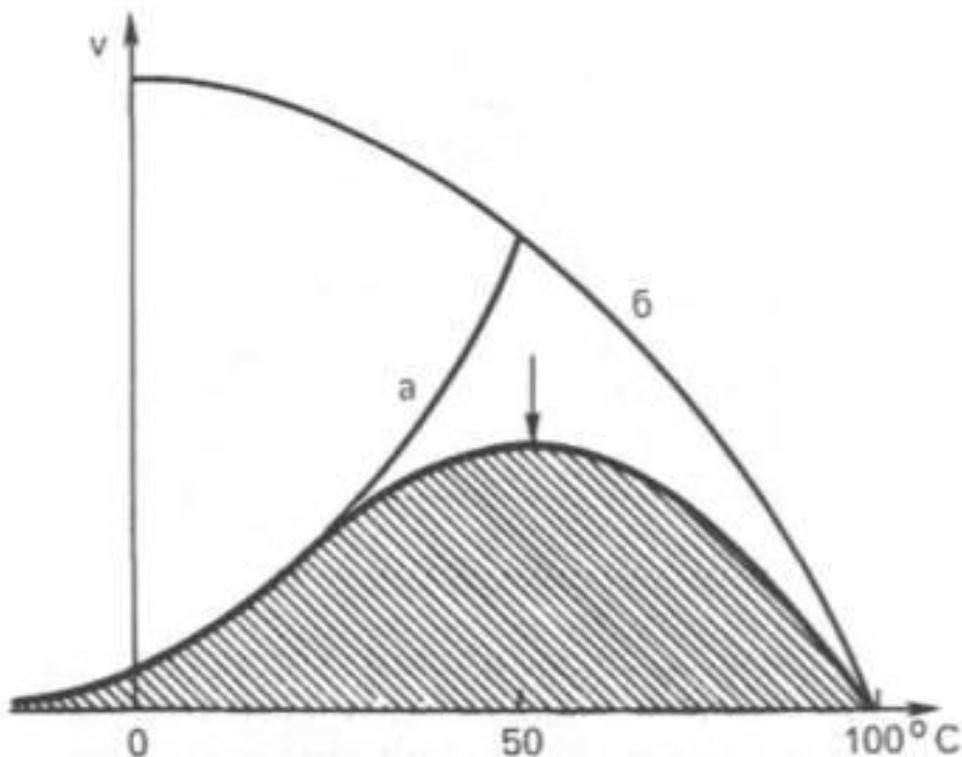
- а** – реакция первого порядка (при  $[S] < K_m$  скорость реакции пропорциональна концентрации субстрата);
- б** – реакция смешанного порядка;
- в** – реакция нулевого порядка, когда  $v = V_{max}$  и скорость реакции не зависит от концентрации субстрата

## Влияние концентрации фермента на скорость ферментативной реакции



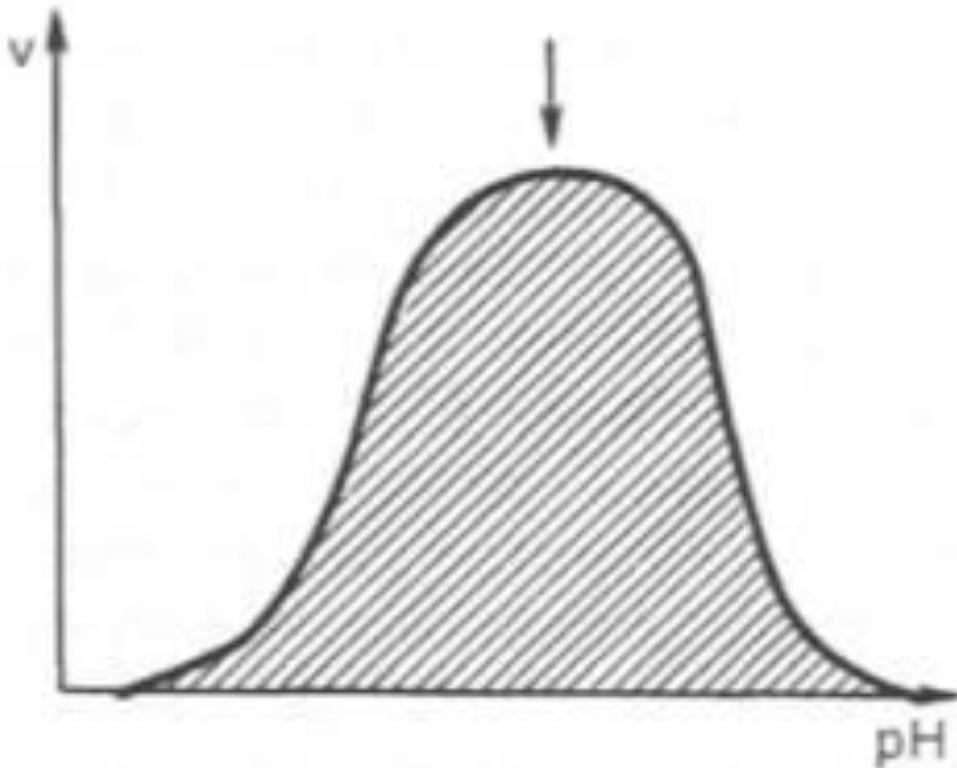
Зависимость скорости реакции от концентрации фермента в присутствии насыщающих концентраций субстрата.

## Влияние температуры на скорость ферментативной реакции



Зависимость скорости катализируемой ферментом реакции от температуры:  
а – повышение скорости реакции как функция температуры;  
б – снижение скорости реакции как функция денатурации белка-фермента; стрелка указывает оптимум температуры.

## Влияние pH среды на скорость ферментативной реакции



Зависимость скорости катализируемой ферментом реакции от  $pH$  среды

(стрелка указывает оптимум  $pH$ ).

Лекция

Регуляция ферментативной активности.  
Классификация ферментов

# План лекции

- Активаторы ферментов
- Ингибиторы ферментов
- Регуляция активности ферментов
- Классификация и номенклатура ферментов

### Примеры активаторов

Активирующее влияние на скорость ферментативной реакции оказывают разнообразные вещества органической и неорганической природы, например:

- соляная кислота активирует действие пепсина желудочного сока;
- желчные кислоты повышают активность панкреатической липазы;
- соединения, содержащие свободные SH-группы (глутатион, цистеин), активируют некоторые тканевые ферменты (оксидоредуктазы, катепсины, аргиназу), растительную протеиназу и др.
- ионы металлов особенно часто выступают активаторами. Около четверти всех известных ферментов для проявления полной каталитической активности нуждаются в присутствии металлов.

# Необратимое ингибирование

Если ингибитор вызывает стойкие изменения пространственной третичной структуры молекулы фермента или модификацию функциональных групп фермента, то такой тип ингибирования называется **необратимым**.

Необратимое действие ингибитора в самом простом случае может быть описано уравнением:

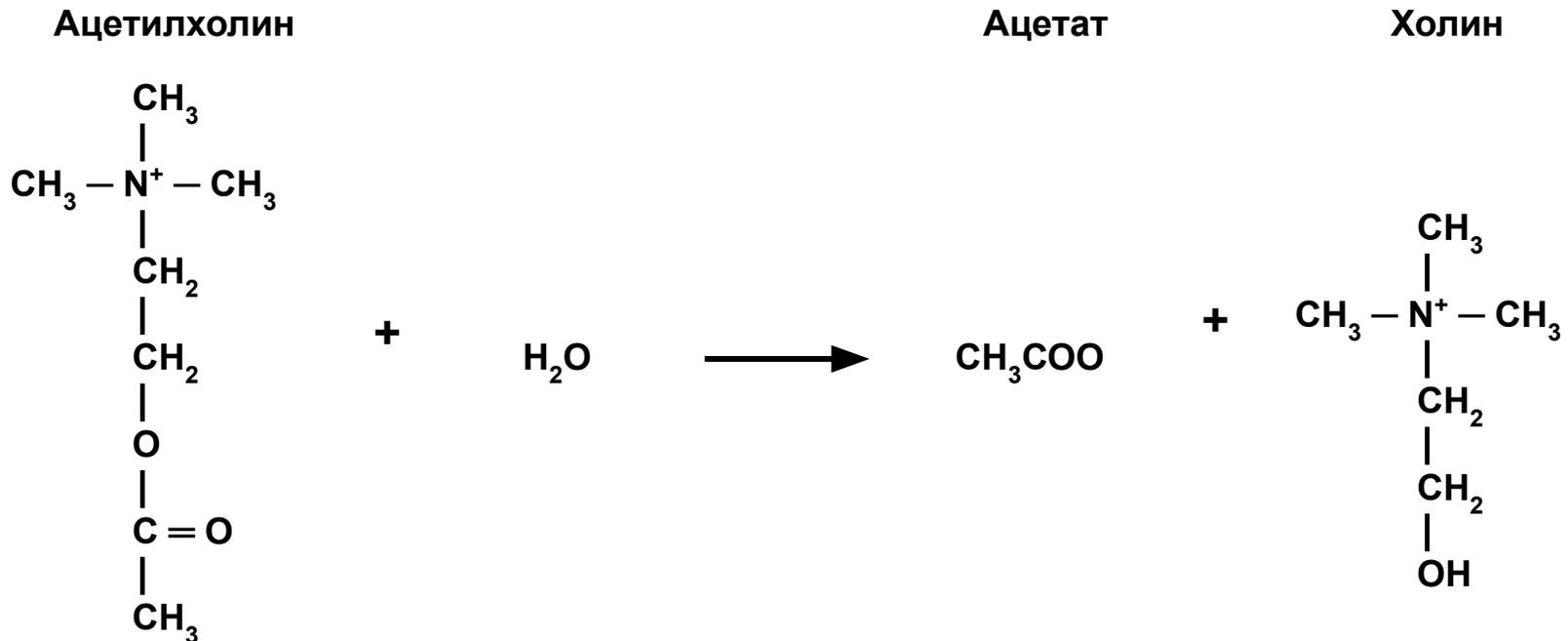


где  $E$  – фермент,  $I$  – ингибитор,  $EI$  – комплекс.

Многие **лекарства / яды** – являются ингибиторами ферментов

## Ингибиторы ферментов

### *Необратимое ингибирование на примере ацетилхолинэстеразы*



Реакция, катализируемая ацетилхолинэстеразой

## Ингибиторы ферментов

### ***Необратимое ингибирование на примере ацетилхолинэстеразы***

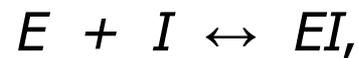


Необратимое ингибирование ацетилхолинэстеразы диизопропилфторфосфатом

### ***Обратимое ингибирование***

В случае обратимого действия ингибитор образует с ферментом непрочный комплекс, способный распадаться, в результате чего снова возникает активный фермент.

Обратимое действие ингибитора может быть описано уравнением:



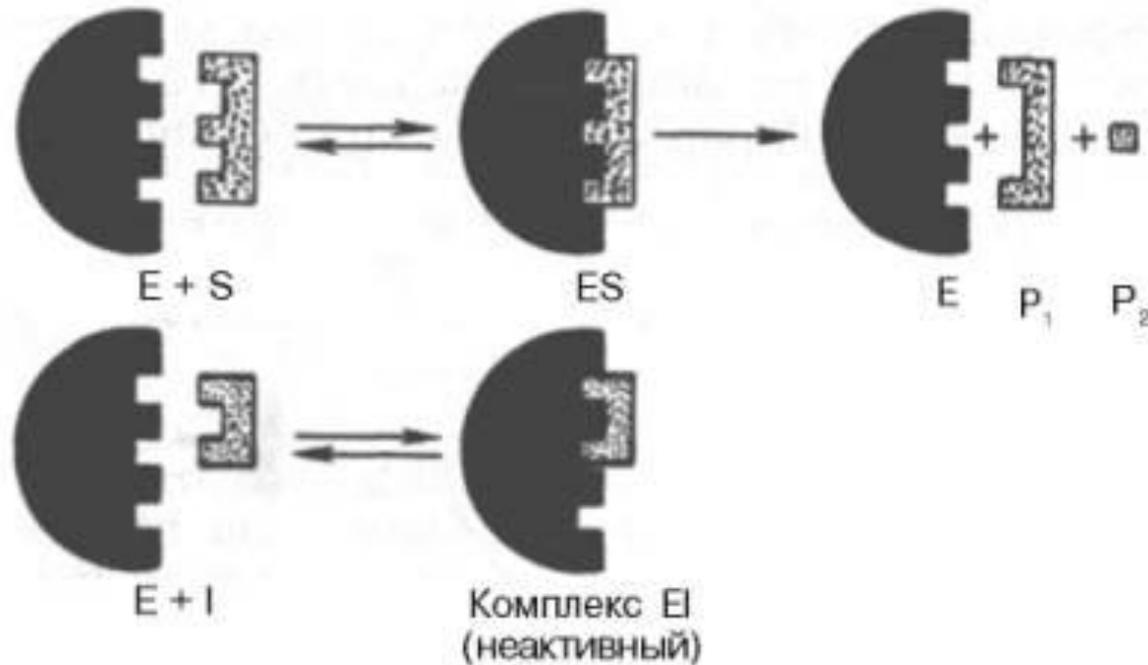
где  $E$  – фермент,  $I$  – ингибитор,  $EI$  – комплекс.

Обратимое ингибирование делят на:

- конкурентное,
- неконкурентное.

## Ингибиторы ферментов

### Обратимое конкурентное ингибирование

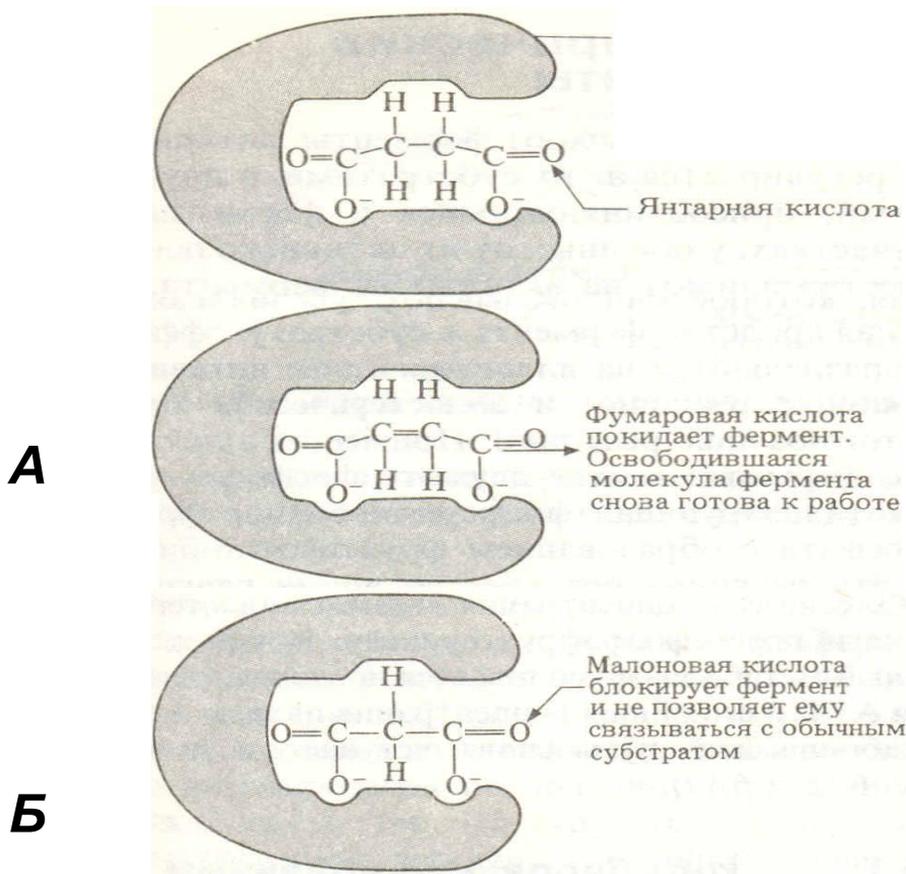


Действие конкурентного ингибитора (схема по В.Л. Кретовичу):  
 $E$  – фермент;  $S$  – субстрат;  $P_1$  и  $P_2$  – продукты реакции;  
 $I$  – ингибитор

## Ингибиторы ферментов

### Обратимое ингибирование на примере сукцинатдегидрогеназы

Сукцинатдегидрогеназа



Пример конкурентного ингибирования:

**А** – фермент сукцинатдегидрогеназа катализирует превращение янтарной кислоты в фумаровую;

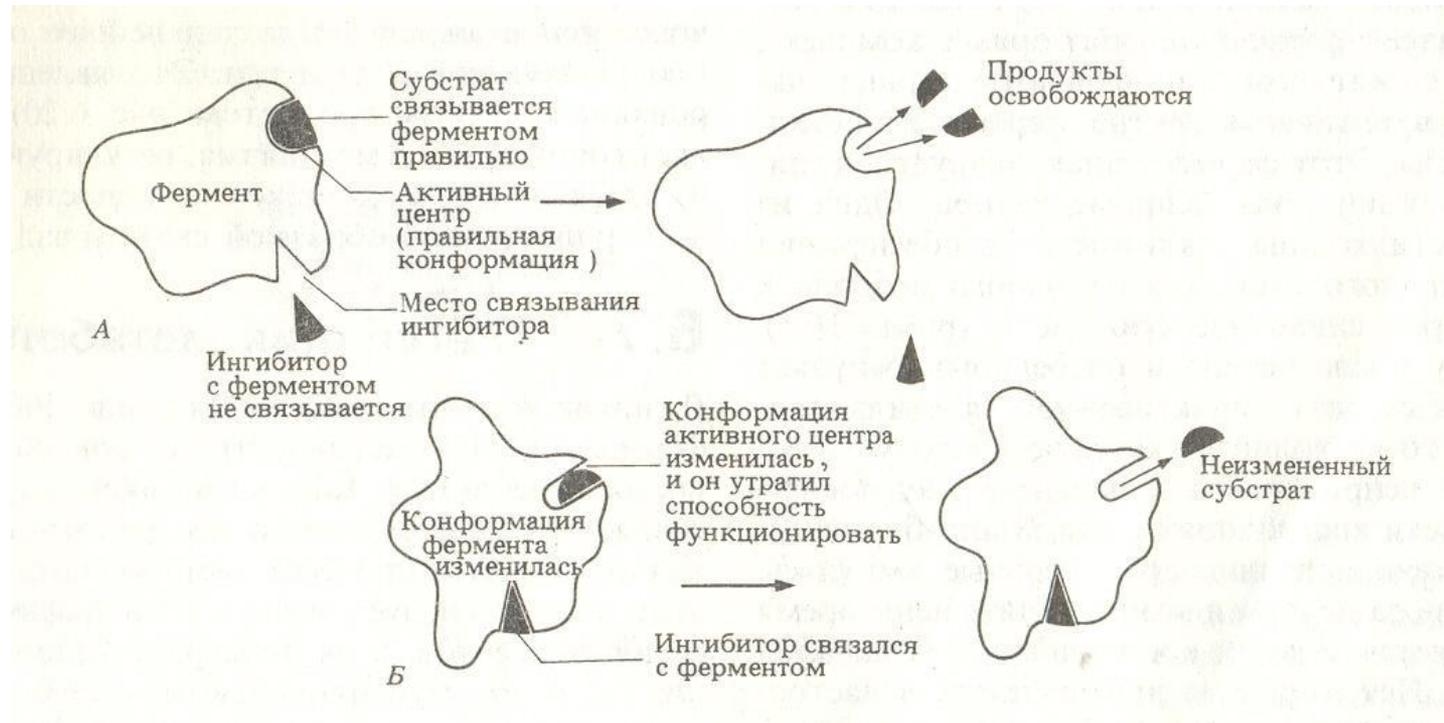
**Б** – конкурентное ингибирование малоновой кислотой

# Объяснить

Обратимое ингибирование  
«снимается» (ликвидируется) высокой  
концентрацией  
субстрата

## Ингибиторы ферментов

### Обратимое неконкурентное ингибирование

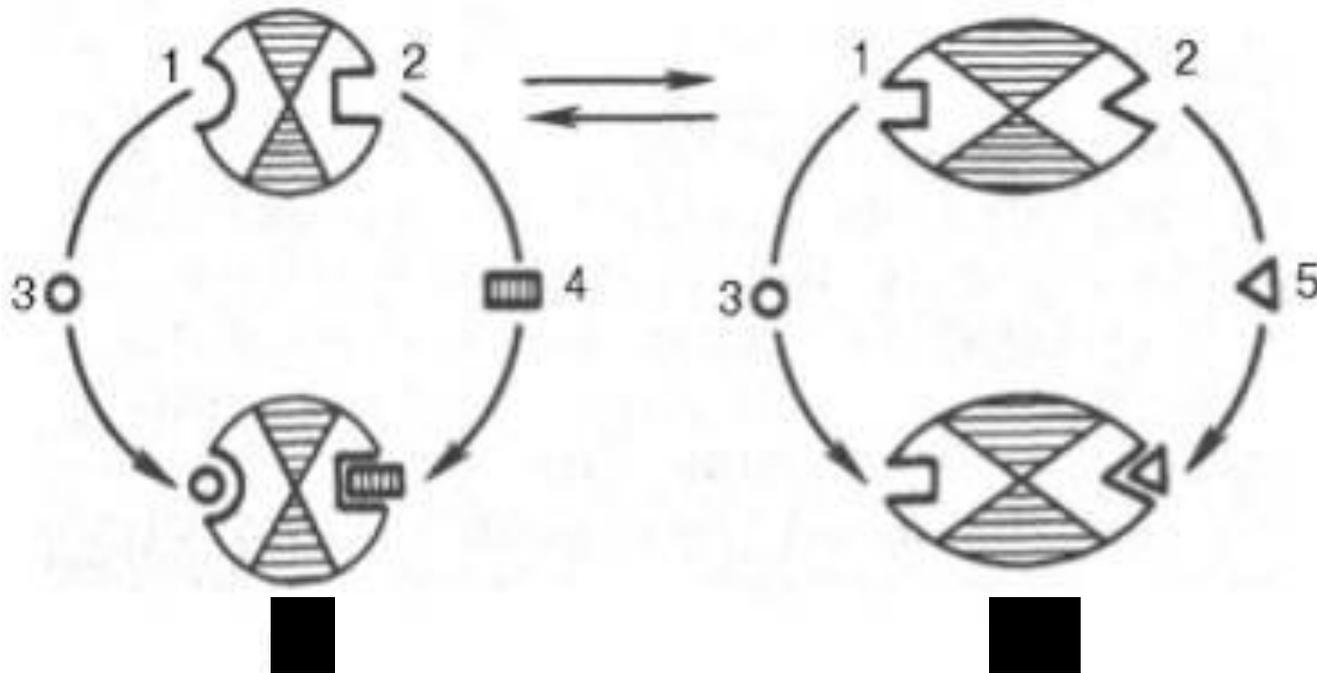


Проявление неконкурентного ингибирования:

А – нормальная реакция;

Б – неконкурентное ингибирование

## Аллостерический контроль активности ферментов



Взаимодействие аллостерического фермента с субстратом и эффекторами: *а* – активный комплекс; *б* – неактивный комплекс; 1 – активный центр; 2 – аллостерический центр; 3 – субстрат; 4 – положительный эффектор; 5 – отрицательный эффектор

# Объяснить

Строение клетки

органеллы

компартменты

компарментализация клетки

## Локализация ферментов в клетке

Цитозоль	Амилаза, Липаза панкреатическая, Глицеро-3-фосфатдегидрогеназа, Гистидаза, Сорбитолдегидрогеназа, Лактатдегидрогеназа, Алкогольдегидрогеназа, Креатинкиназа, Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, Аланинаминотрансфераза, Аспаратаминотрансфераза, Гликогенсинтетаза
Митохондрии	Пируватдегидрогеназный комплекс, Цитратсинтаза, Малатдегидрогеназа, Уроканиназа, Глутаматдегидрогеназа, Креатинкиназа, Ацил-СоА-дегидрогеназа, $\delta$ -аминолевулинатсинтетаза, Аспаратаминотрансфераза, Пируваткиназа
Лизосомы	Кислая фосфатаза, $\alpha$ -Галактозидаза, $\beta$ -Галактозидаза, Гиалуронидаза, Коллагеназа, $\beta$ -Глюкуронидаза, Арилсульфатаза, Кислая рибонуклеаза, Кислая дезоксирибонуклеаза, Катепсин, $\alpha$ -Маннозидаза
Микросомы	Глюкозо-6-фосфатаза, $\gamma$ -Глутамил транспептидаза, Моноаминоксидаза, Церулоплазмин, Глюкуронидтрансфераза
Ядро	ДНК-полимераза, ДНК-лигаза, Топоизомераза, Эндонуклеаза, РНК-полимераза, Хеликаза, NAD-синтетаза
Клеточная мембрана	Нуклеотидаза, Щелочная фосфатаза, $\gamma$ -Глутамил транспептидаза, $K^+, Na^+$ -АТРаза, Аденилатциклаза