

ФЕРМЕНТЫ

Строение, свойства,
механизмы действия

«О ферментах как и о людях судят по их поведению»

Академик В.А.Энгельгарт

- Фермент (от лат. fermentatio – брожение)
- Энзим (от греч. en zyme – в дрожжах)
- 1814 г. – Кирхгоф (Санкт-Петербург) – превращение крахмала в мальтозу под действием экстрактов из ячменя (амилаза)
- 1860 г. – Л.Пастер (Париж) – исследование брожения с участием дрожжей
- 1872 г. – М.Манассеина в лаборатории проф. Вайснера (Вена) – опыты по спиртовому брожению в бесклеточном экстракте дрожжей
- 1897 г. – Э.Бюхнер (Германия) – опыты по спиртовому брожению в отсутствие клеток, за которые ему в 1907 году вручена Нобелевская премия

Скорость химической реакции зависит

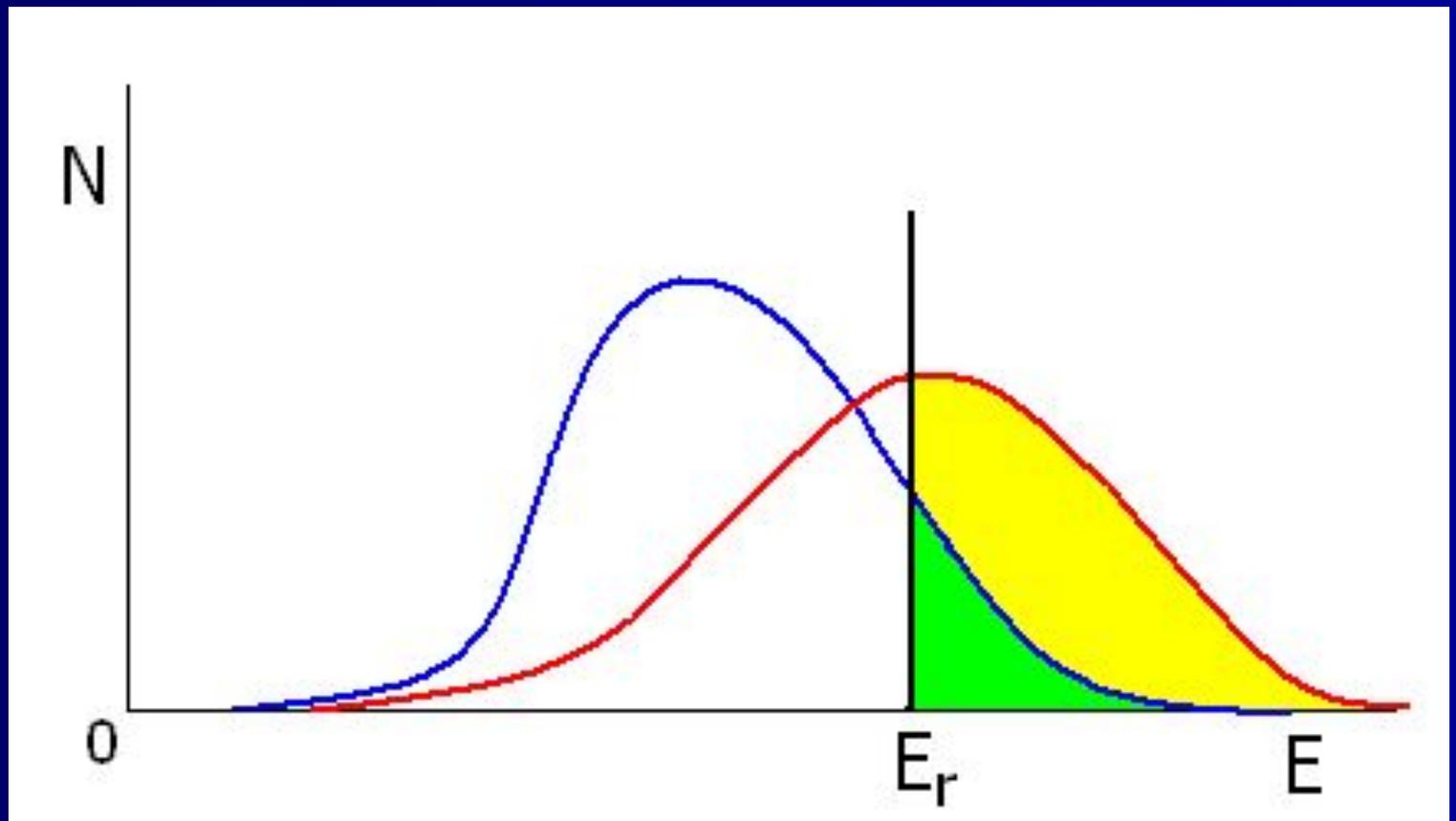
 от концентрации реагентов

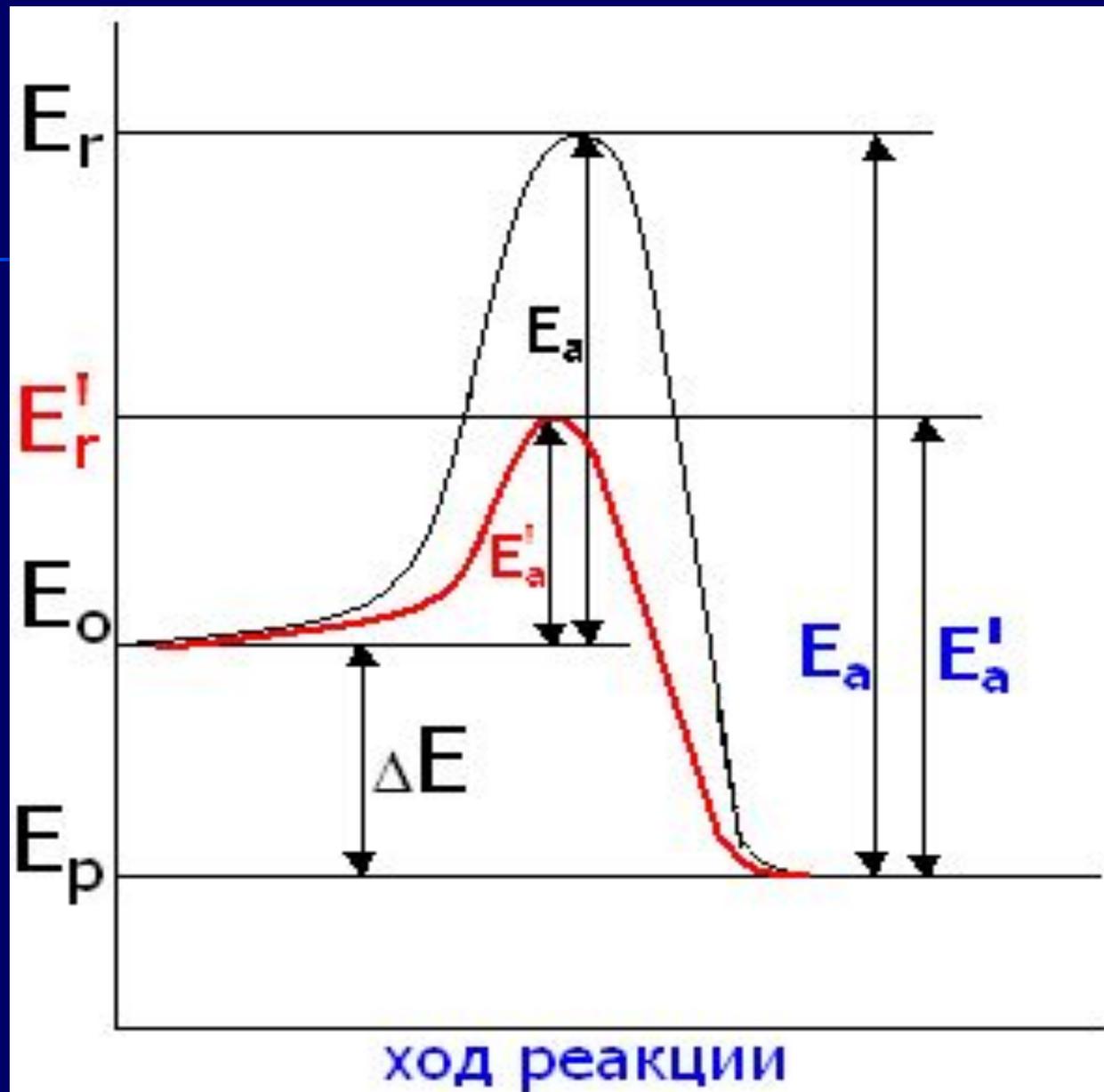
$$V = k[A][B]$$

 от энергии активации

$$k = \alpha e^{\frac{-E_{\text{акт}}}{RT}}$$

Связь между энергией молекул и температурой





Свойства катализаторов

- Катализатор не вызывает, а лишь УСКОРЯЕТ химическую реакцию
- Катализатор не влияет на величину энергетического итога реакции
- В обратимых реакциях в присутствии катализатора ускоряется как прямая, так и обратная реакции

(с.110)

Свойства ферментов как биокатализаторов

- Высокая эффективность
- Специфичность действия
- Субстратная специфичность
- Зависимость от температуры
- Зависимость от pH среды
- Чувствительность к ионному составу среды
- Чувствительность к действию лигандов (активаторов и ингибиторов)

(с.110)

Эффективность биокатализа



- Спонтанно $k = 10^{-6} \text{ с}^{-1}$

- Катализатор FeCl_2 ($k = 6 \times 10^{-2} \text{ с}^{-1}$)

- Фермент каталаза ($k = 7 \times 10^6 \text{ с}^{-1}$)

При равных (в молярном выражении) концентрациях соли и фермента

Специфичность действия ферментов

- Способность ферментов катализировать превращение субстрата в химической реакции определенного типа называется специфичностью действия.
Современная классификация и номенклатура ферментов основана на делении ферментов на группы по специфичности их действия.

Классификация ферментов

- 1 класс – Оксидоредуктазы
- 2 класс – Трансферазы
- 3 класс – Гидролазы
- 4 класс – Лиазы
- 5 класс – Изомеразы
- 6 класс – Лигазаы (Синтетазы)

Субстратная специфичность ферментов

- Относительная (групповая) субстратная специфичность – это способность фермента катализировать превращение похожих по строению субстратов.
(вариант – стереоспецифичность)
- Абсолютная субстратная специфичность – способность фермента катализировать превращение единственного субстрата

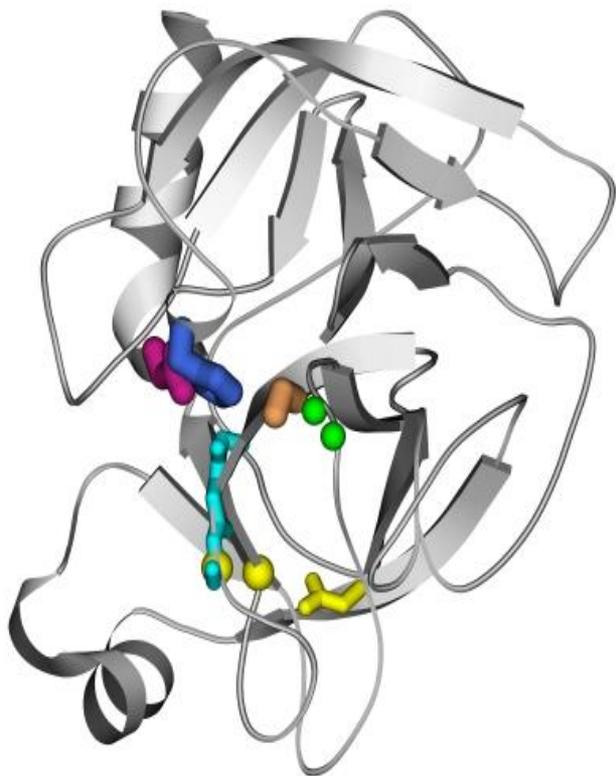
Активный центр фермента состоит из двух функционально различных участков:

1) Адсорбционный участок (центр) – для ориентированной сорбции молекулы субстрата на поверхности молекулы фермента.

2) Каталитический участок (центр) – отвечает за реакцию катализа, т.е. за химическое преобразование субстрата, связавшегося с боковыми радикалами аминокислот, входящих в состав активного центра.

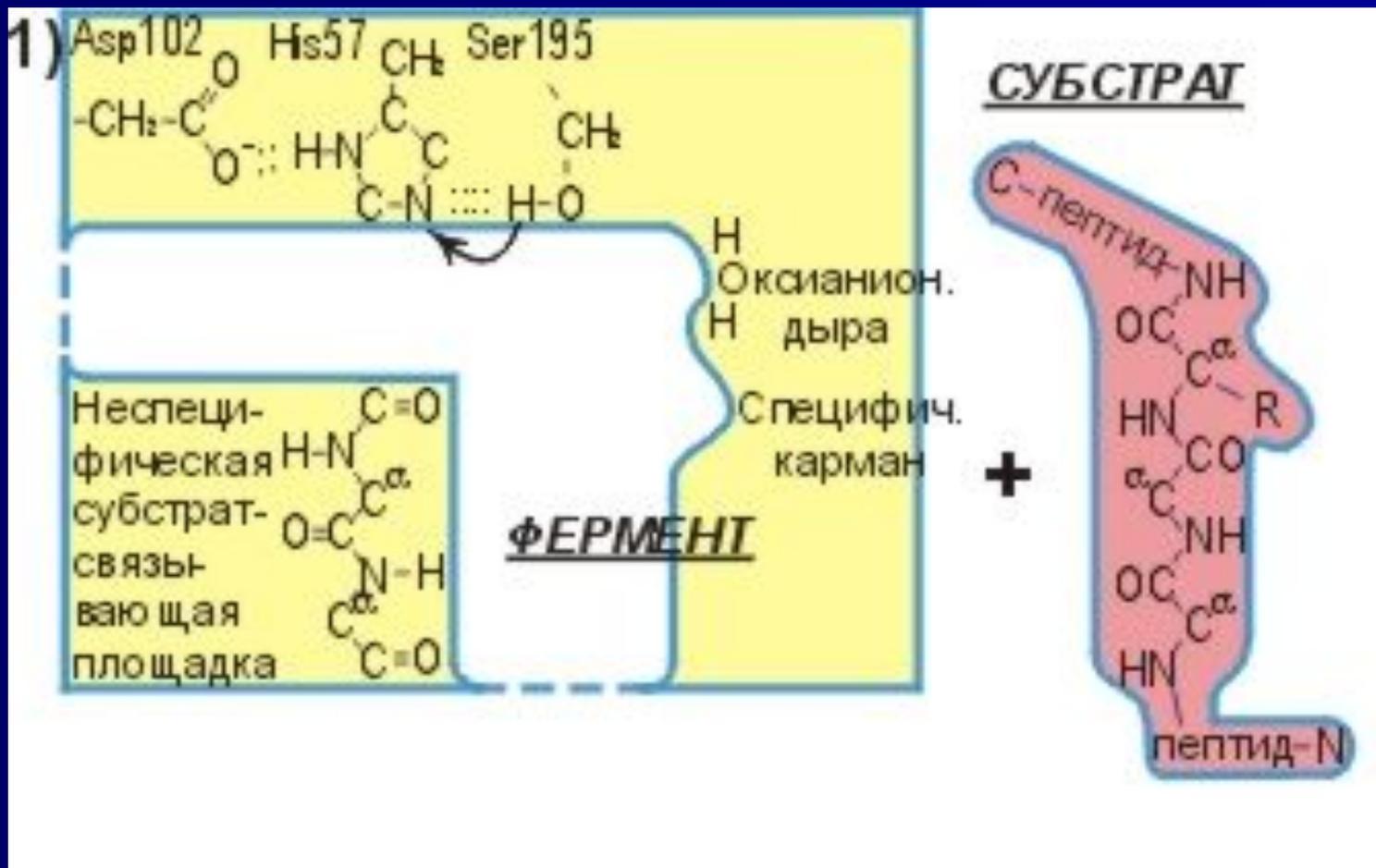
Строение активного центра ферментов

Трипсин и трипсиноподобные сериновые протеазы.

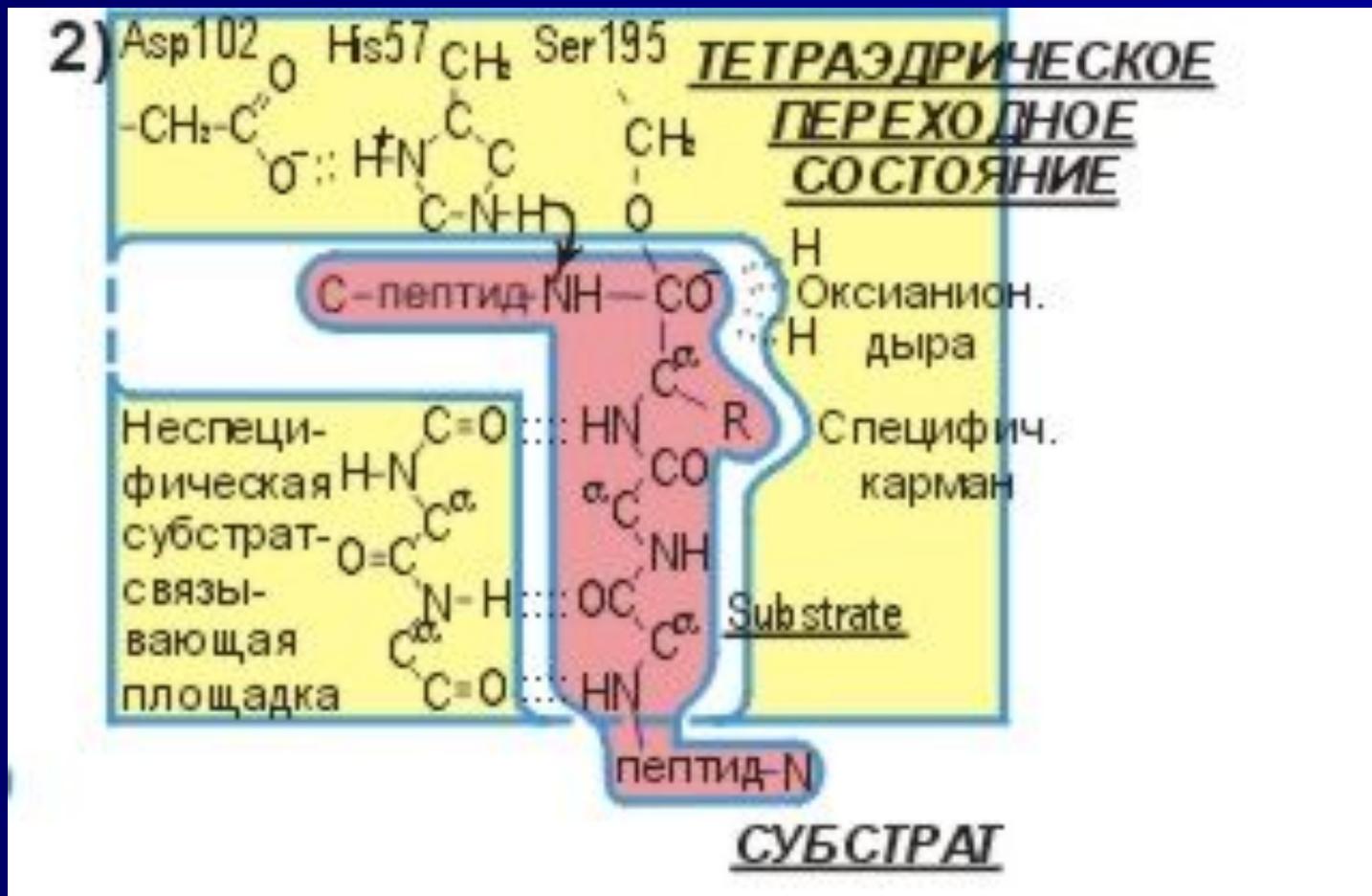


- Части активного центра:
- Каталитический центр
- Ser195 (оранжевый),
- His57 (синий)
- Asp102 (малиновый)
- Адсорбционный (субстрат-связывающий) центр:
- NH-группы, образующие оксианионовую дыру (зеленый),
- неспецифическая субстрат-связывающая площадка (голубой),
- группы, выстилающие специфический субстрат-связывающий карман (желтый).

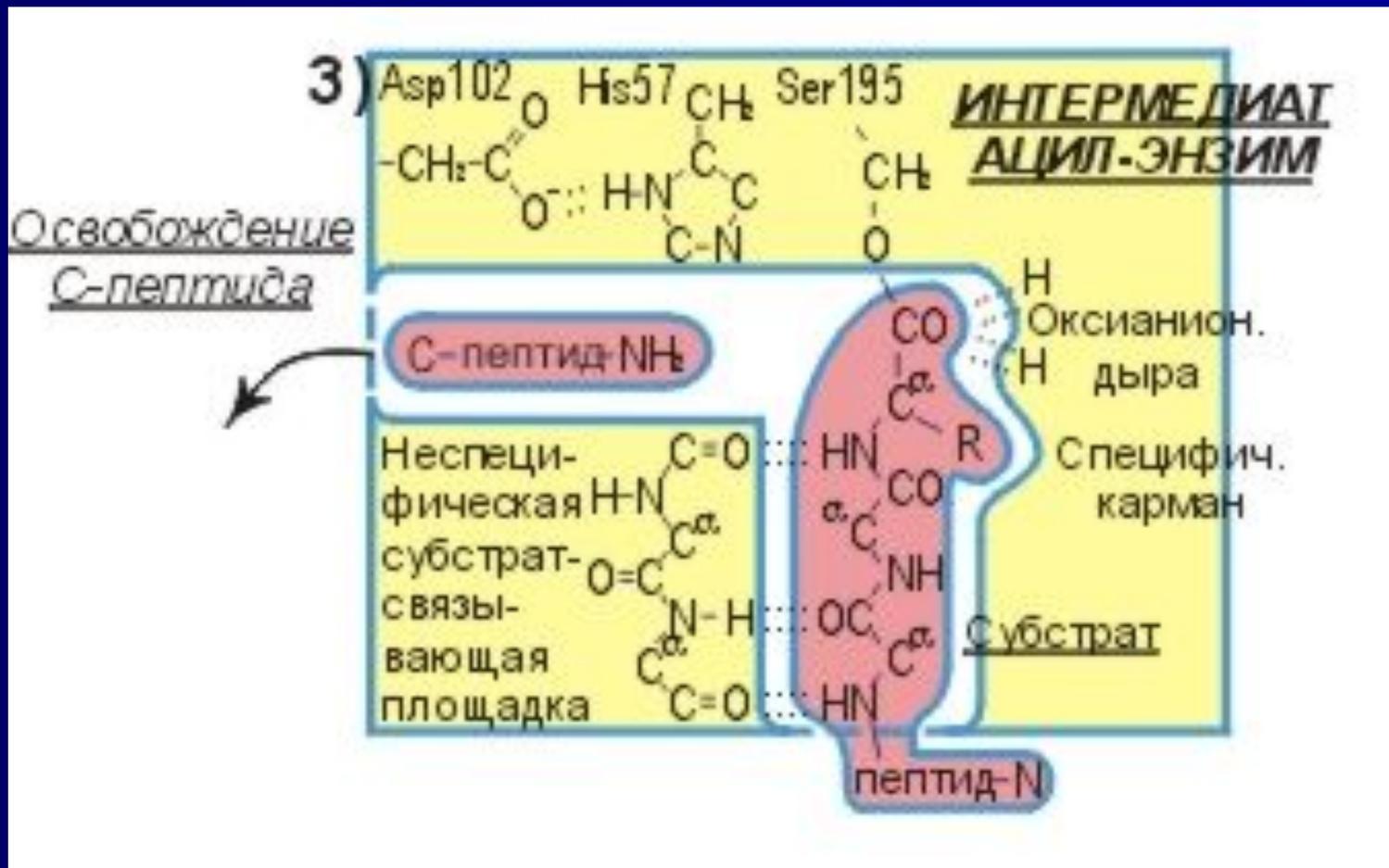
Соответствие субстрата активному центру фермента



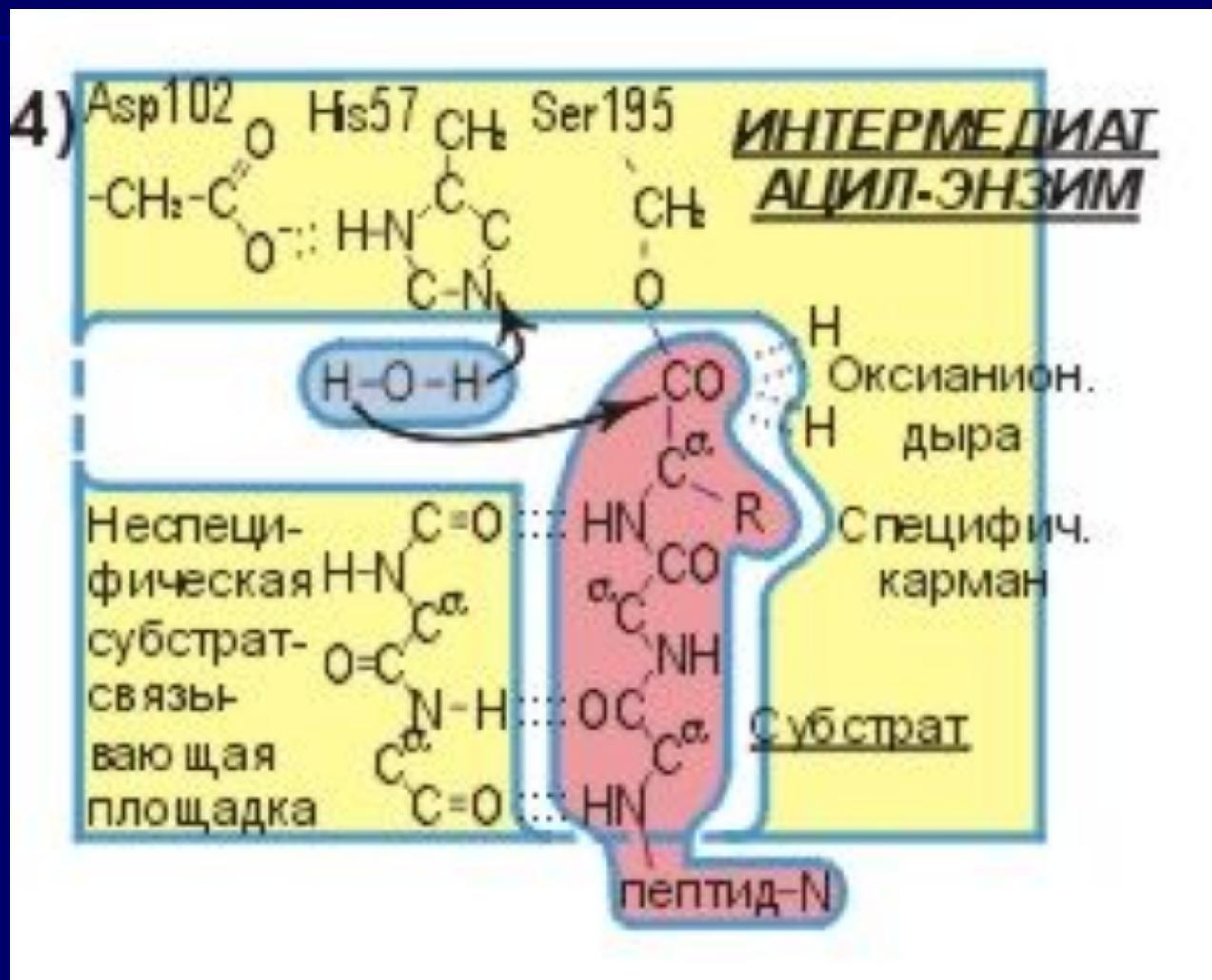
Переходное состояние (образование комплекса ES)



Промежуточный комплекс ES' (I) и освобождение продукта (С-пептида)



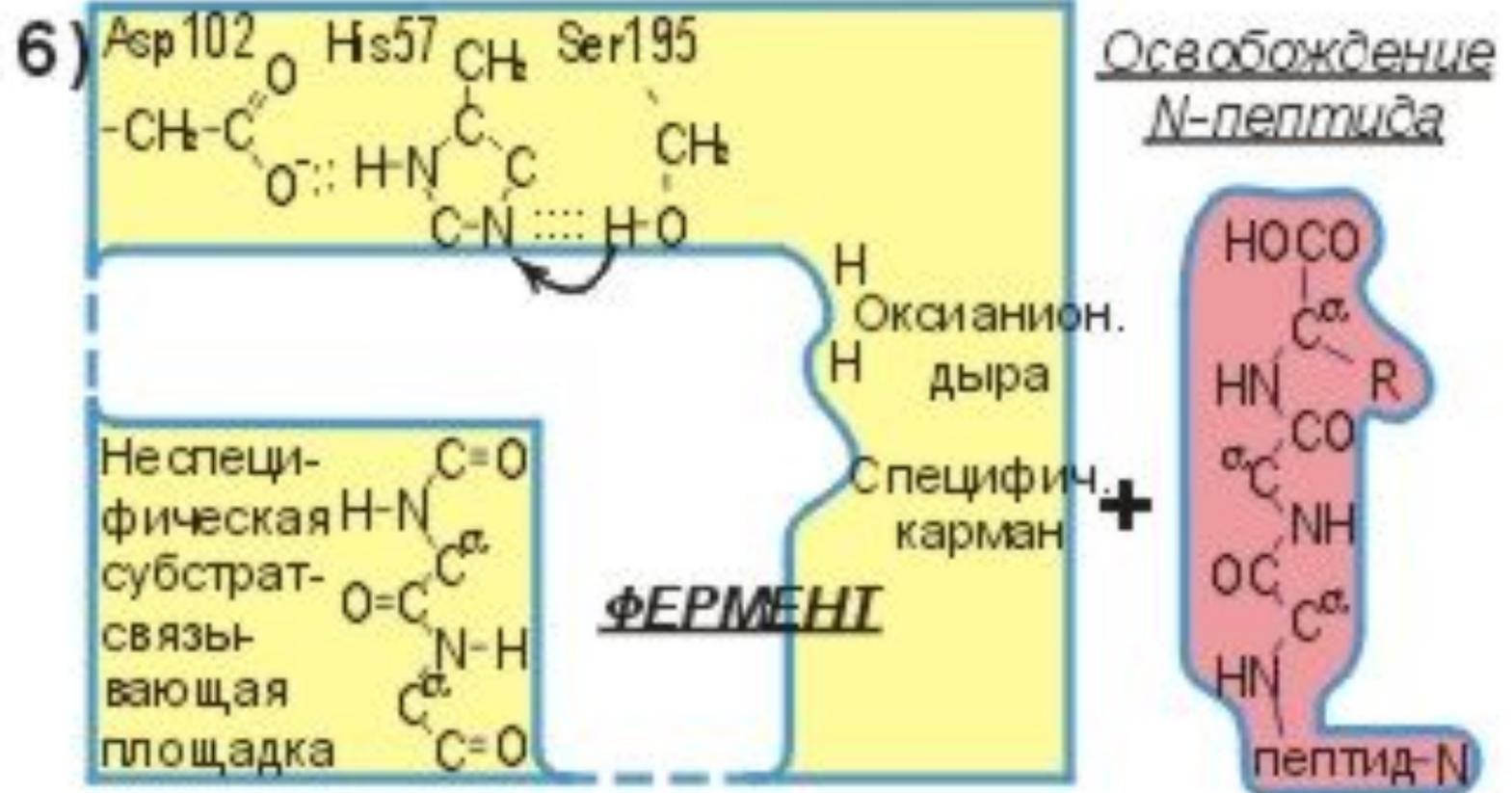
Промежуточный комплекс ES' (II)



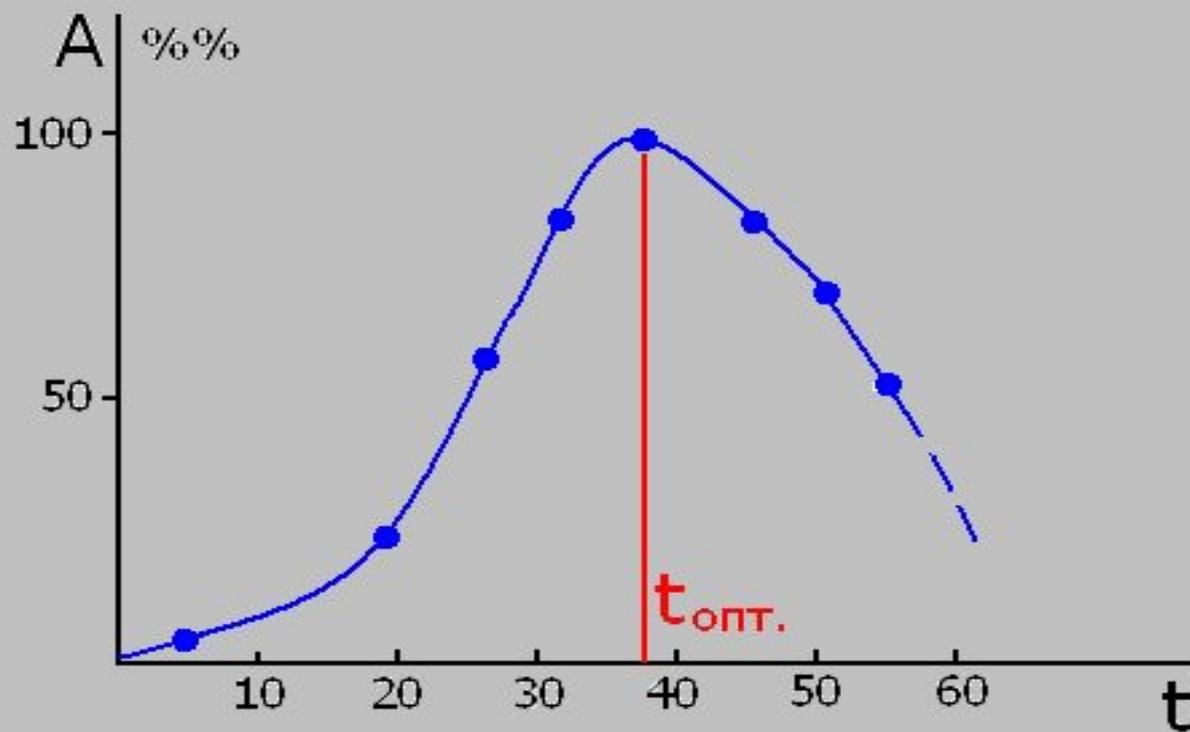
Промежуточный комплекс ES' (III)



Освобождение продукта (N-пептида)

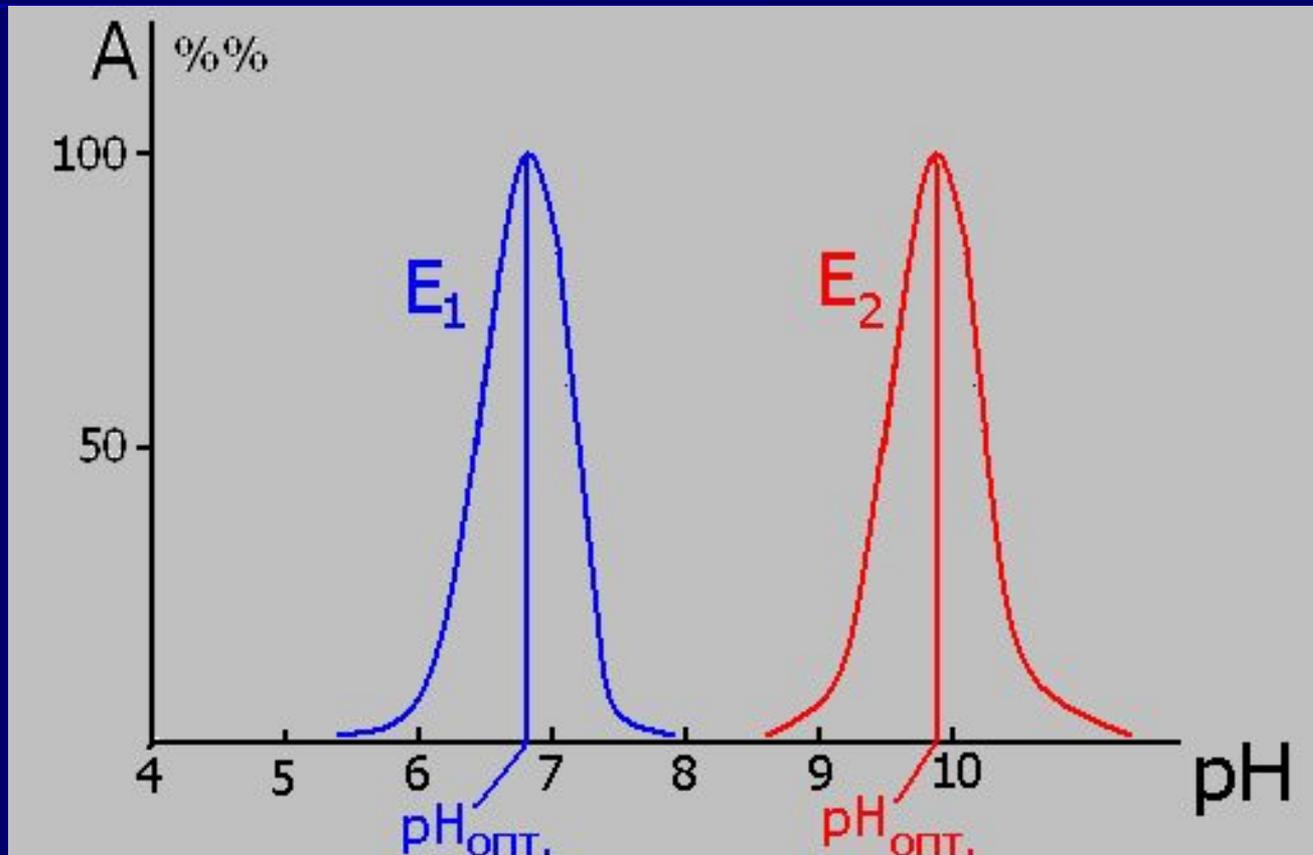


Зависимость активности фермента от температуры



(с.111)

Зависимость активности ферментов от pH среды



Зависимость активности ферментов от ионного состава среды

Влияние растворенных в среде электролитов на активность ферментов – двоякое:

- Ионная сила раствора оказывает влияние на коллоидоустойчивость белков-ферментов
- Некоторые ионы являются кофакторами ферментов

Зависимость активности ферментов от ионного состава среды

- Активация фермента НАД-киназы ионами магния и марганца



Кофакторы ферментов

- Кофакторами ферментов принято называть неорганические ионы, необходимые для выполнения ферментами своей функции (например, ионы Mg^{++} , Zn^{++} , Mn^{++} , Cu^{++} и др.)

Коферменты

- Низкомолекулярные небелковые органические соединения, необходимые для выполнения ферментами своих функций
- Коферменты участвуют в реакциях:
 - переноса электронов
 - перенос химических групп

Многие коферменты образуются из витаминов

- НАД и НАДФ – из витамина РР
- ТГФК – из фолиевой кислоты (B_c)
- HS-КоА – из витамина B_3

Простетические группы

- Это небелковые органические соединения, прочно связанные с молекулой сложного белка.
- Некоторые простетические группы сложных белков ферментов обладают коферментными функциями (гем, ФАД, ФМН)

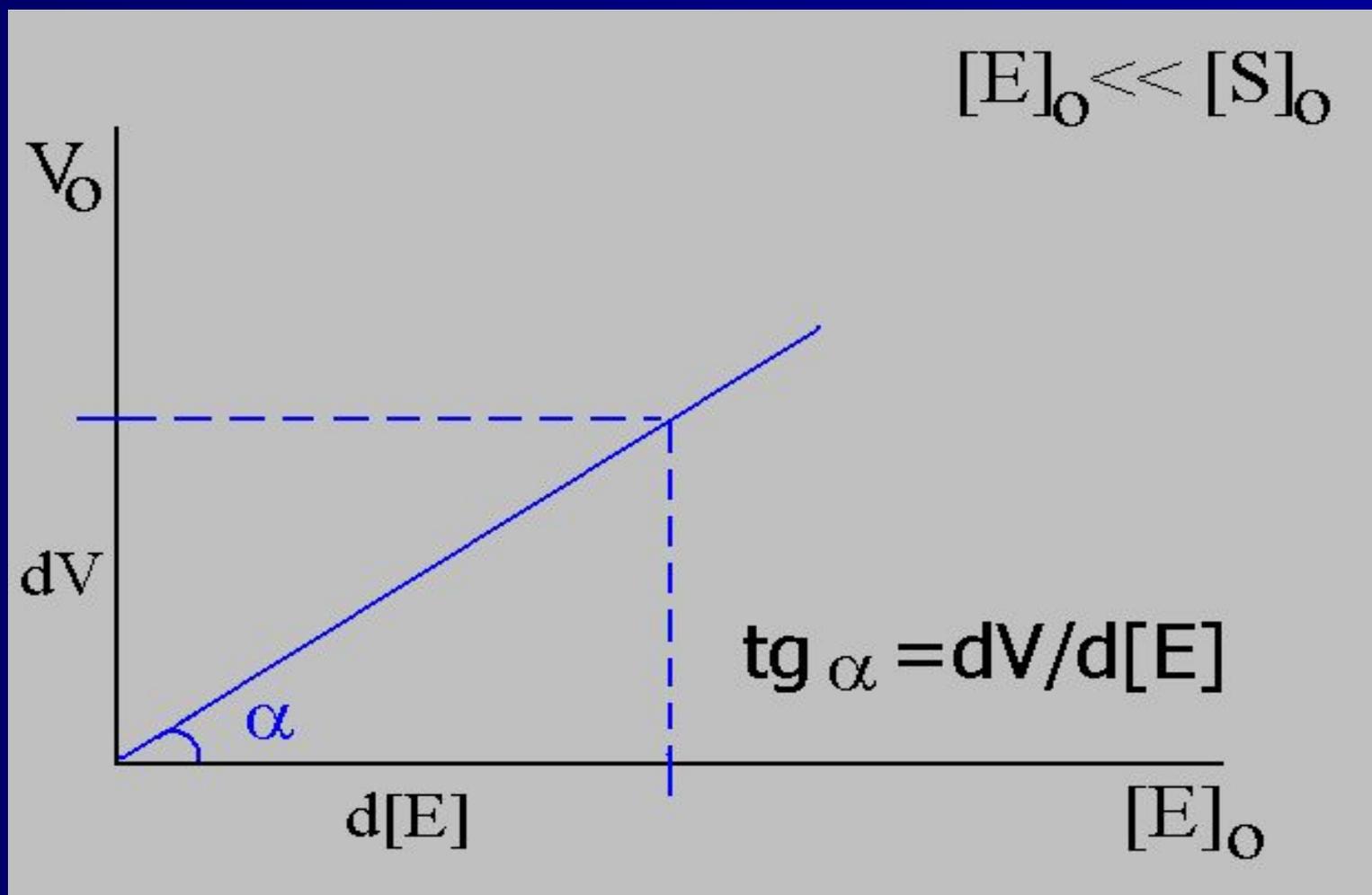
Активность ферментов

- Активностью фермента называют его способность превращать определенное количество субстрата в единицу времени
- Молекулярная активность – количество молекул субстрата, превращенных в продукт одной молекулой фермента за 1 минуту
- Удельная активность – количество молей субстрата, превращенных в единицу времени в пересчете на единицу массы белка (или на единицу объема) исследованного биоматериала

Способы выражения активности ферментов

- В системе СИ единица измерения активности (количества) фермента: $1 \text{ Катал} = 1 \text{ моль} \cdot \text{с}^{-1}$
1 катал – это такое количество фермента, которое превращает 1 моль субстрата за 1 секунду ($= 6 \cdot 10^7$ Юнит).
- На практике чаще применяют единицу, называемую Юнит: $1 \text{ Юнит} = 1 \text{ мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1}$ 1 Юнит – это такое количество фермента, которое превращает 1 мкмоль субстрата за 1 минуту (с.124)
- При биохимическом анализе в клинике результаты определения активности ферментов обычно выражают количеством юнит в единице объема исследованного материала (кровь, моча и т.п.)
– в системе СИ: количество катал в 1 м^3

Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации фермента (с.123)



Причины изменения активности ферментов

- Изменение скорости синтеза фермента (ускорение или замедление)
- Ингибирование ферментов
- Активация ферментов
 - аллостерическая активация
 - переход неактивной формы фермента в активную

Ингибирование ферментов

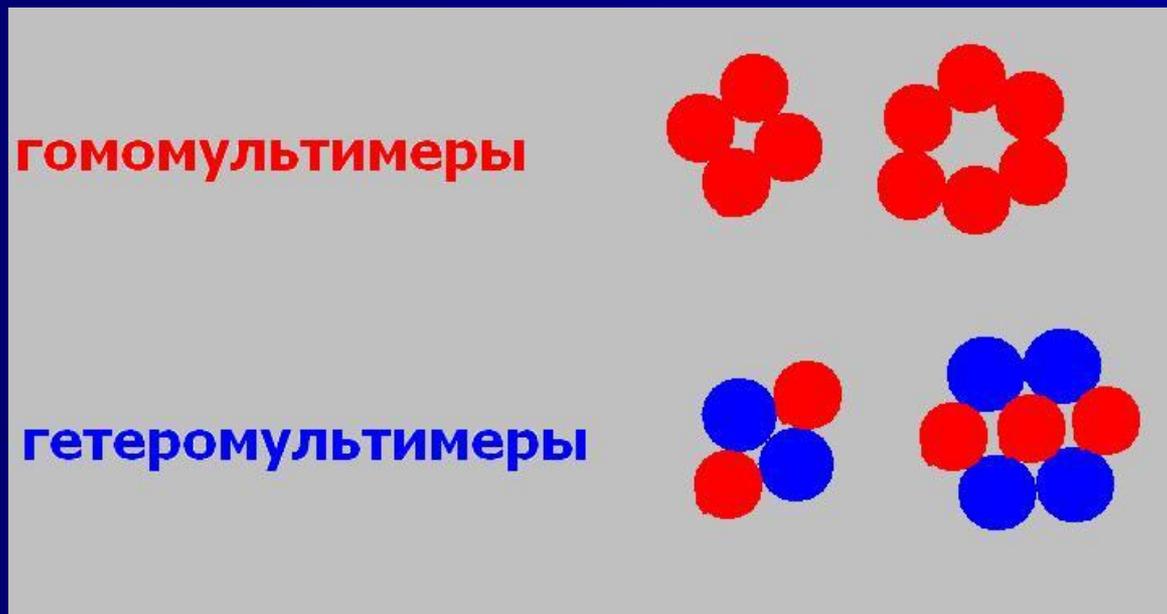
1. Неспецифическое
2. Специфическое
 - 2.1. Специфическое необратимое
 - 2.2. Специфическое обратимое
 - 2.2.1. Конкурентное
 - 2.2.2. Неконкурентное

Образование активных форм ферментов из неактивных

1. Ограниченный протеолиз – гидролиз пептидной связи и переход зимогена в активный фермент
2. Фосфорилирование – дефосфорилирование
3. Восстановление атома S в активном центре тиолового фермента
4. Диссоциация фермента из комплекса с обратимыми ингибиторами

ИЗОФЕРМЕНТЫ

- Изоферментами называют ферменты, катализирующие одну и ту же реакцию, но отличающиеся по физико-химическим свойствам (pI , M_r)



Примеры использования ферментов в медицине

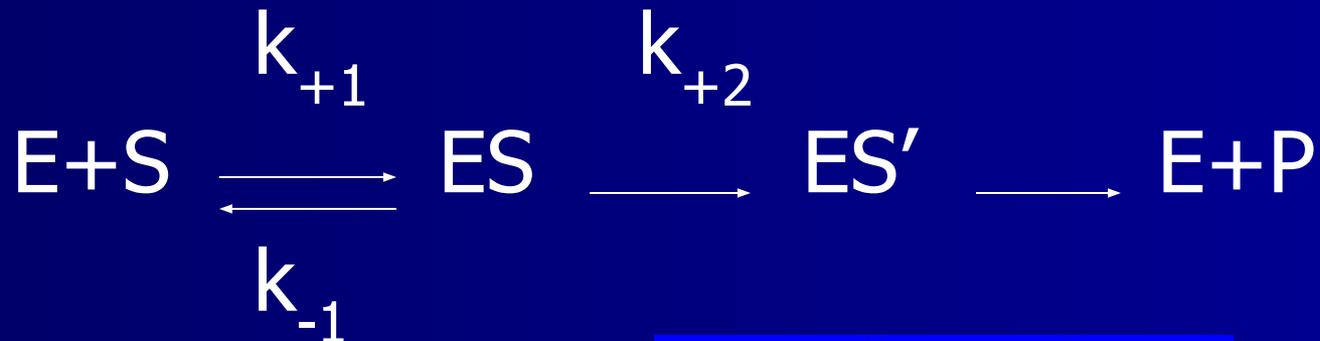
- Обработка нагноившихся раневых поверхностей и полостей, заполненных гнойным содержимым (протеазы)
 - Амилаза, протеазы и липаза – компоненты препаратов для заместительной терапии при нарушении пищеварения
 - Определение содержания различных веществ в биологических жидкостях
 - определение глюкозы энзиматическим глюкозооксидазным методом и т.п.
 - иммунологические исследования с использованием ферментной метки методом ELISA* (пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза)
 - Молекулярно-генетические исследования (метод ПЦР, получение рекомбинантных белков)
- * ELISA = Enzyme linked immunosorbent assay

Примеры использования ферментов

- Производство сыра, вина, пива, уксуса, патоки, хлебопечение
- Изготовление моющих средств с биодобавками
- Обработка растительных волокон и древесины
- Изготовление полусинтетических антибиотиков
- Приготовление питательных сред для микробиологических исследований
- Изготовление биосенсоров, позволяющих проводить количественное определение различных веществ (с высокой чувствительностью)

Кинетика ферментативного катализа

- Этапы ферментативного катализа (с.121)

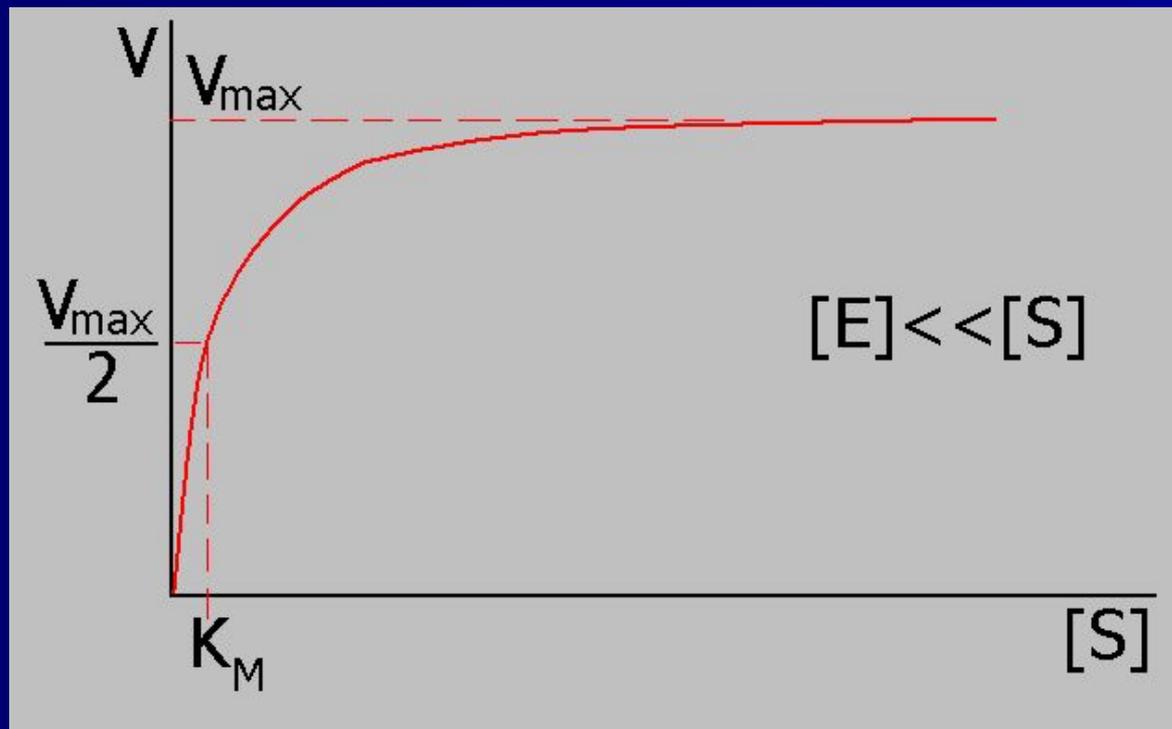


$$K_M = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}$$

$$V_{\max} = k_{+2} \cdot [\text{ES}] = k_{+2} \cdot [\text{E}]$$

$$[\text{E}] \ll [\text{S}]$$

Зависимость V от $[S]$ (с.125)



$$K_M = [S], \text{ если } V = 1/2 V_{\max}$$

Уравнение Михаэлиса-Ментен

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

(с.124)