

- **Тема: Ферменты**

- **Ферменты** – органические вещества белковой природы являющиеся биологическими катализаторами.
- По химической природе – глобулярные белки, ускоряющие химические реакции в тысячи раз.
- Открыл Константин Кирхгоф, 1814 г (превращал крахмал в сахар под действием амилазы)

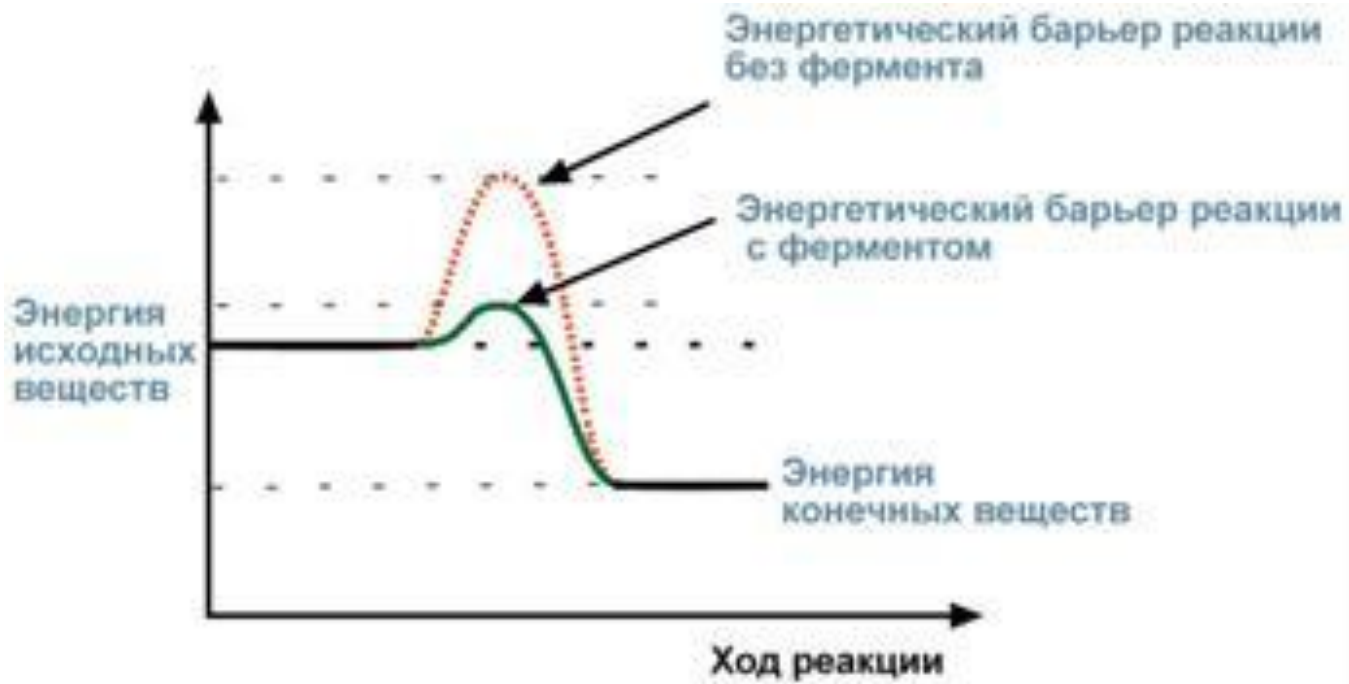
- **Основные свойства ферментов**

К ферментам применимы три основных критерия, характерных для неорганических катализаторов:

1) они остаются относительно неизменными после реакции, то есть освобождаются вновь и могут реагировать с новыми молекулами субстрата;

Субстратом (S) называют вещество, химические превращения которого в продукт (P) катализирует фермент (E).

- 2) ферменты оказывают свое действие в ничтожно малых концентрациях;
- 3) наличие фермента (катализатора) не оказывает влияния как на величину константы равновесия, так и на изменения свободной энергии. Катализаторы лишь повышают скорость реакций (точку равновесия не сдвигают).



Величина энергии активации с ферментом и без него

- Особенности ферментов как биологических катализаторов

1. Высокая эффективность действия.

Ферменты могут ускорять реакцию в 10^8 - 10^{12} раз.

2. Высокая избирательность ферментов к субстратам (субстратная специфичность) и к типу катализируемой реакции (специфичность действия).

- В зависимости от механизма действия различают ферменты с относительной или групповой и абсолютной специфичностью.

- Для действия некоторых гидролитических ферментов характерна **относительная специфичность**.
- Например, пепсин расщепляет белки (разрывает пептидную связь - CO-NH - между аминокислотами) животного и растительного происхождения, хотя они могут отличаться по химическому строению, аминокислотному составу и физико-химическим свойствам. Однако пепсин не расщепляет жиры и углеводы.

- Липаза, катализирующая гидролиз жиров на глицерин и жирные кислоты, разрывает сложноэфирные связи. Аналогично групповой специфичностью обладают трипсин, химотрипсин, пептидазы, ферменты, гидролизующие α -гликозидные связи в полисахаридах. Указанные ферменты пищеварительные, их групповая специфичность имеет биологический смысл.

- **Абсолютная специфичность** – это способность фермента катализировать превращение только единственного субстрата. Например: аргиназа, расщепляющая в организме аргинин; уреаза, катализирующая распад мочевины и др.
- **Стереохимическая специфичность:** оксидазы (аминокислот) действуют только на свой специфический стереоизомер – L- или D-аминокислот.

3. Высокая чувствительность ферментов к неспецифическим физико-химическим факторам среды — температуре, рН, ионной силе раствора и т.д.

- **Термолабильность ферментов.**

Скорость химической реакции зависит от температуры. Реакции, катализируемые ферментами, так же чувствительны к изменениям температуры. Скорость химической реакции повышается в два раза при повышении температуры на 10 0C. Ускорение реакции идет до 45 0C, затем, в связи с денатурацией белка-фермента, снижается. При 100 0C почти все ферменты полностью утрачивают свою активность.

- **Зависимость активности ферментов от рН среды.**
- Ферменты обычно активны в узких пределах значений рН, как правило, рН 6,0-8,0. Каждый фермент имеет свой оптимум рН. рН-оптимум действия ферментов лежит в пределах физиологических значений. Исключением является пепсин, рН-оптимум которого – 2,0.

- Влияние изменений pH среды на активность фермента заключается в том, что **изменяется степень ионизации кислотных и основных групп** (-COOH, -SH, имидазольной, -NH₂ и т.д.). При разных значениях pH активный центр может находиться в частично ионизированной или неионизированной форме, что сказывается на третичной структуре белка и соответственно на формировании активного фермент-субстратного комплекса.

- **Строение ферментов**
- Ферменты могут относиться к простым или сложным белкам.
- **Ферменты однокомпонентные** – простые белки. К ним относятся гидролитические ферменты – пепсин, трипсин, папаин, уреаза, лизоцим, рибонуклеаза, фосфатаза и др.

- Ферменты двухкомпонентные (сложные белки) – кроме белкового компонента, содержат небелковый компонент – кофактором.
- Белковая часть называется апоферментом, а все вместе называется холоферментом.

- Если белковая часть фермента слабо связана с кофактором и фермент активируется только при присоединении этой части, то кофактор называют **ко-ферментом**.

- **Коферментами** являются витамин РР (никотинамид), В2 (рибофлавин), пантотеновая кислота, фолиевая кислота, биотин (витамин Н), В1 (тиамин), В6 (пиридоксин), В12 (цианкобаламин), витамин Q (убихинон); нуклеотиды (НАД, НАДФ, ФМН, ФАД, КоА и т.д.).

- Кофакторами могут быть соединения, не являющиеся витаминами: HS -глутатион, АТФ, липоевая кислота, производные нуклеозидов (уридинфосфат, цитидинфосфат, фосфоаденозин-фосфосульфат), порфиринсодержащие вещества, т-РНК и др.

- Многие двухвалентные металлы (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+}) выполняют роль кофакторов; в ряде случаев ионы металлов прочно связаны с белковой молекулой и выполняют функции простетической группы. Например: фермент, катализирующий окисление витамина С (аскорбиновой кислоты) в дезоксиаскорбиновую кислоту, содержит 8 атомов меди на молекулу. Все они прочно связаны с белковой молекулой, и не отделяются путем диализа.

- **Активный центр фермента**

- Молекула фермента является очень крупной и при взаимодействии с субстратом в контакт входит лишь ее ограниченная часть – **активный центр фермента.**

- **Активный центр** - это участок в молекуле фермента, где происходит связывание и превращение субстрата. АЦ обычно располагается в гидрофобном углублении (недоступном для молекул воды), изолируя субстрат от воды. В образовании АЦ, участвуют боковые группы АК (12-20 АК), причём эти АК могут находиться на разных участках п/п цепи, но при формировании пространственной конфигурации фермента они укладываются т.о., что располагаются в области активного центра.

- В активном центре фермента различают **каталитический участок**, непосредственно вступающий в химическое взаимодействие с субстратом и **"контактную" (якорную) площадку**, которая обеспечивает сродство к субстрату и формирование его комплекса с ферментом.



Образование фермент-субстратного
комплекса.

- Кроме АЦ в пространственной структуре фермента можно выделить **АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЙ центр**).
- К АЛЛОСТЕРИЧЕСКОМУ центру могут присоединяться различные вещества, которые отличаются по структуре от молекул субстрата. Эти вещества называются АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТОРЫ.

- Они могут влиять на КОНФОРМАЦИЮ активного центра фермента, изменяя её, т.е. могут или повышать скорость реакции, или тормозить её.
- В роли АЛЛОСТЕРИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОРОВ чаще всего выступают гормоны, лекарственные вещества и др. химические соединения.

- Первичная структура активного центра определяется генетически, что реализуется при синтезе белка в рибосомах. Любое **воздействие, связанное с денатурацией,** приводит к нарушению активного центра и **соответственно к потере ферментативной активности.** Если удастся восстановить третичную структуру фермента, то восстанавливается функция активного центра.

- **Механизм действия ферментов**
Повышение скорости реакции под действием ферментов объясняют тем, что при ферментативном катализе фермент соединяется (обратимо) со своим субстратом, образуя нестойкий промежуточный ферментсубстратный комплекс, который в конце реакции распадается с освобождением фермента и продуктов реакции.

- В процессе реакции различают следующие стадии:
- 1. Присоединение молекулы субстрата к ферменту.
- 2. Преобразование первичного промежуточного соединения в один или несколько последовательных (переходных) комплексов.
- 3. Отделение конечных продуктов реакции от фермента.



Рис. 4.2. Схема образования нестойкого фермент-субстратного комплекса.

- Фермент вступает во взаимодействие с субстратом на очень короткий период.
- В образовании фермент-субстратного комплекса участвуют водородные связи, электростатические и гидрофобные взаимодействия, а также, в ряде случаев, ковалентные, координационные связи.

- **Кинетика ферментативных реакций**
- Под ферментативной кинетикой понимают зависимость скорости реакции от химической природы реагирующих веществ и условий их взаимодействия (концентрация, температура, pH, наличия активаторов или ингибиторов).

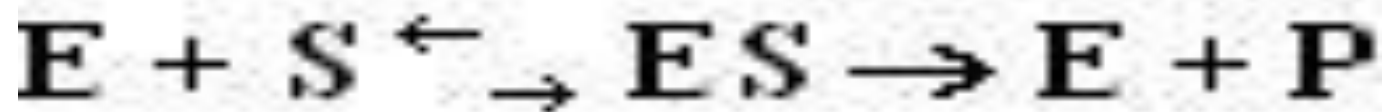
- Скорость ферментативной реакции определяется химическим количеством прореагировавшего субстрата или образовавшегося продукта реакции в единицу времени в единице объема при определенных условиях:

$$v = \Delta c / t$$

где v – скорость ферментативной реакции, Δc – изменение концентрации субстрата или продукта реакции, t – время.

- Скорость ферментативной реакции зависит от природы фермента, которая определяет его активность. Чем выше активность фермента, тем выше скорость реакции. **Активность фермента определяют** по скорости реакции, катализируемой ферментом. Мерой активности фермента является **одна стандартная единица активности фермента (E)** – это такое количество фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата за 1 минуту.

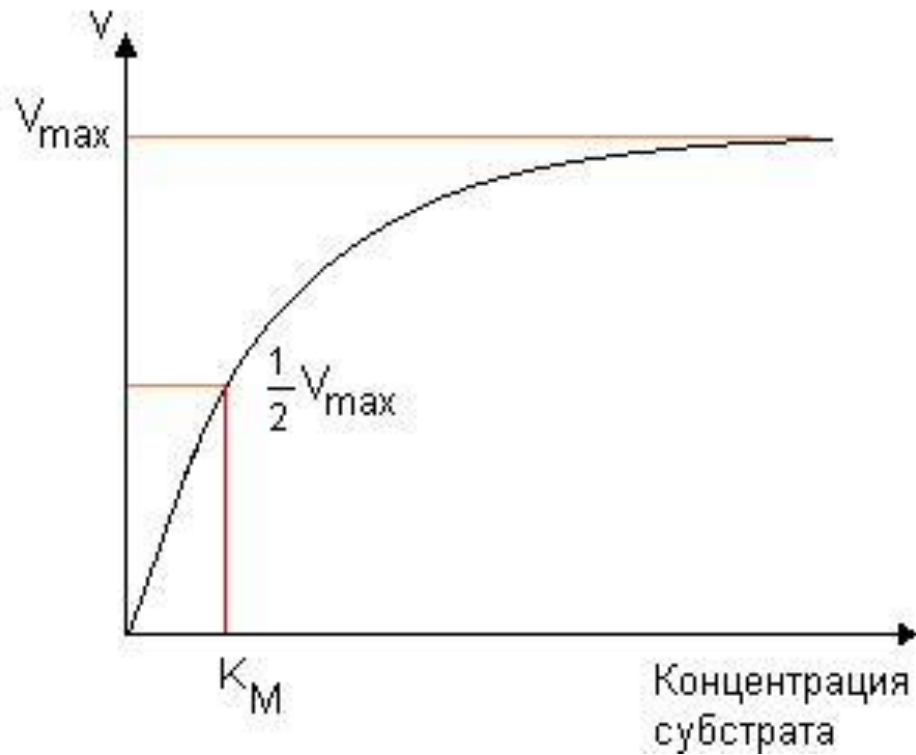
В процессе ферментативной реакции фермент (E) взаимодействует с субстратом (S), в результате образуется фермент-субстратный комплекс, который затем распадается с высвобождением фермента и продукта (P) реакции:



- Влияние концентрации субстрата и фермента на скорость ферментативной реакции.

- При низких концентрациях субстрата скорость прямо пропорциональна его концентрации, далее с ростом концентрации скорость реакции увеличивается медленнее, а при очень высоких концентрациях субстрата скорость практически не зависит от его концентрации и достигает своего максимального значения (V_{max}).

- При таких концентрациях субстрата все молекулы фермента находятся в составе фермент-субстратного комплекса, и достигается полное насыщение активных центров фермента, именно поэтому скорость реакции в этом случае практически не зависит от концентрации субстрата.



Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата

График зависимости активности фермента от концентрации субстрата описывается уравнением Михаэлиса – Ментен

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

где v – скорость ферментативной реакции; $[S]$ – концентрация субстрата; K_M – константа Михаэлиса.

- Физический смысл константы Михаэлиса.
При условии, что $v = \frac{1}{2} V_{\max}$, получаем $K_M = [S]$.
- Таким образом, константа Михаэлиса равна концентрации субстрата, при которой скорость реакции равна половине максимальной.



Скорость ферментативной реакции зависит и от концентрации фермента. Эта зависимость носит прямолинейный характер.

- **Активирование и ингибирование ферментов**

- Активность фермента зависит от присутствия активаторов, в качестве которых могут выступать различные соединения, например, HCl – для пепсина; желчные кислоты – для панкреатической липазы; глутатион, цистеин, витамин С – для тканевых ферментов и папаина (растительный фермент); для многих ферментов активаторами являются ионы металлов.

Ингибиторы – полностью или частично подавляют активность ферментов.

К таким факторам относятся, прежде всего агенты, вызывающие **денатурацию белка**: нагревание, кислоты, щелочи, соли тяжелых металлов.

- Специфические ингибиторы – подавляют активность какого-либо одного фермента или группы ферментов.
- Известны вещества, специфически связывающие ту или иную группу в молекуле фермента, выключая ее из химической реакции. Например, $\text{I-CH}_2\text{-COOH}$ (йодацетат), его амид и ряд других соединений легко входят в связь с SH-группами ферментов.

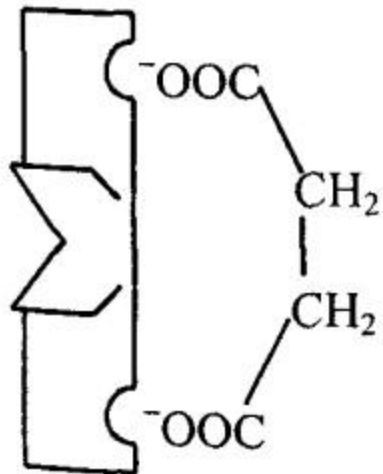
- На ингибировании ферментов основан механизм действия многих токсинов и ядов на организм.
- Например, при отравлениях синильной кислотой смерть наступает как результат торможения дыхательных ферментов. Влияние инсектицидов – результат блокирования фермента холинэстеразы. Нервно-паралитические яды (зоман, зарин, Vx) тоже блокируют ферменты.

- **Типы ингибирования**

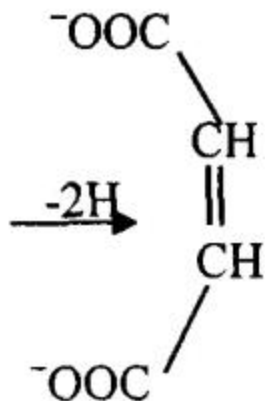
Различают **обратимое, необратимое и конкурентное ингибирование.**

Конкурентное ингибирование вызывается веществами, имеющими структуру, похожую на субстрат, но немного отличающуюся от структуры истинного субстрата. Примером является торможение активности сукцинатдегидрогеназы малоновой кислотой. Этот фермент катализирует окисление путем дегидрирования янтарной кислоты в фумаровую.

фермент-субстратный
комплекс

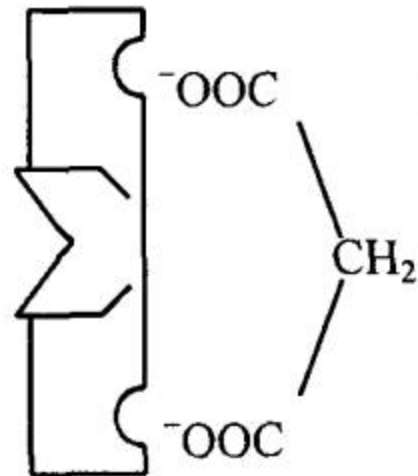


Сукцинат



Фумарат

фермент-ингибиторный
комплекс



Малонат

Блокирование
реакции

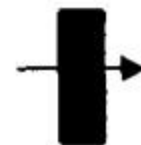
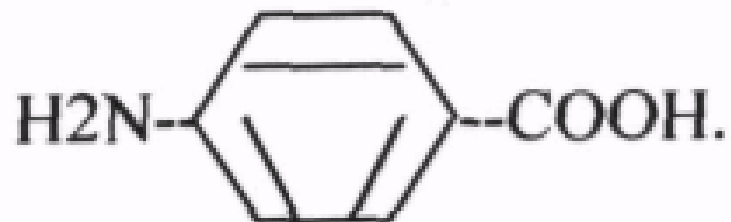


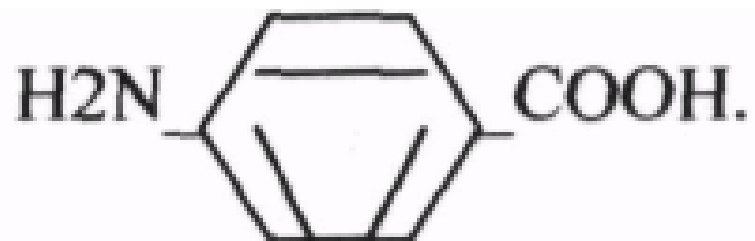
Схема конкурентного ингибирования фермента.

- Метод конкурентного торможения широко применяется в медицине и ветеринарии, в частности действие сульфаниламидных препаратов (бактериостатическое) рассчитано на такое ингибирование.

- *Механизм действия сульфаниламидных препаратов* представляет собой конкурентный антагонизм с парааминобензойной кислотой (ПАБК). ПАБК является соединением, необходимым для синтеза микробной клеткой фолиевой кислоты, без которой невозможен рост и размножение бактерий (ПАБК → дигидрофолиевая кислота → тетрагидрофолиевая кислота → пуриновые и пиримидиновые основания → РНК и ДНК).



ПАРААМИНОБЕНЗОЙНАЯ К-ТА.



СУЛЬФАНИЛАМИД.

- **Неконкурентное ингибирование**

вызывается веществами, не имеющими структурного сходства с субстратами и часто связывающимися не с активным центром, а в другом месте молекулы фермента. При этом образуется ковалентная связь и вследствие этого фермент инактивируется полностью, а торможение (ингибирование) бывает необратимым. Например: действие йодоцетата, соляной кислоты и др.

- **АЛЛОСТЕРИЧЕСКОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ** характерно для ферментов, имеющих четвертичную структуру, молекула которых состоит из нескольких единиц (ПРОТОМЕРОВ). В отсутствии АЛЛОСТЕРИЧЕСКОГО ИНГИБИТОРА субстрат присоединяется к каталитическому центру, и идёт обычная каталитическая реакция. При появлении АЛЛОСТЕРИЧЕСКОГО ИНГИБИТОРА, он присоединяется к АЛЛОСТЕРИЧЕСКОМУ центру, и изменяет КОНФОРМАЦИЮ АЦ фермента, в результате этого активность фермента снижается.

- **Классификация и номенклатура ферментов**

- Рациональная номенклатура ферментов составляется путем прибавления к латинскому корню названия субстрата, на который действует фермент, или к названию процесса, катализируемого ферментом, окончания "аза".

- Например, фермент, воздействующий на крахмал (*amylum*), называется амилаза; мочевины (*urea*) – уреаза; фенолы – фенолаза и т.д.
- Кроме рационального названия сохранились ранее появившиеся термины: пепсин, трипсин.

- В 1961 г. принята новая международная классификация, в основу которой принят тип катализируемой реакции. В настоящее время известно около 3000 различных ферментов. Классификацию их проводят по типу их действия. **Различают 6 классов ферментов:**

- **1 .Оксидоредуктазы – окислительно-восстановительные ферменты;**
катализируют биологическое окисление.
- **2.Трансферазы – катализируют реакции переноса различных химических групп от одной молекулы (донора) к другой молекуле (акцептору).**

- **3. Гидролазы** – осуществляют химические превращения веществ с участием молекулы воды.
- **4. Лиазы** – отщепляют от субстратов ту или иную группу негидролитическим путем.
- **5. Изомеразы** – осуществляют изомерные превращения соединений.
- **6. Лигазы (синтетазы)** – катализируют реакции синтеза, сопровождающиеся отщеплением фосфорной кислоты от АТФ или другого трифосфата.

- **I класс. Оксидоредуктазы** – это ферменты окислитель-но-восстановительных реакций, лежащих в основе биологического окисления. Название ферментов составляется по следующей форме: название субстрата (донора), от которого отщепляются атомы водорода (электроны), название акцептора, на который переносятся атомы водорода и оканчивается названием "оксидоредуктаза": например, лактат: НАД-оксидоредуктаза.

- Различают следующие подклассы:
- 1) аэробные дегидрогеназы, которые переносят электроны и протоны водорода с окисляемого субстрата на кислород:

- 2) анаэробные дегидрогеназы переносят электроны и протоны водорода с окисляемого на другой субстрат. К ним относятся пиридинзависимые и флавинзависимые дегидрогеназы. Например, окисление молочной кислоты происходит под действием лактатдегидрогеназы, при этом НАД восстанавливается в НАДН₂:

