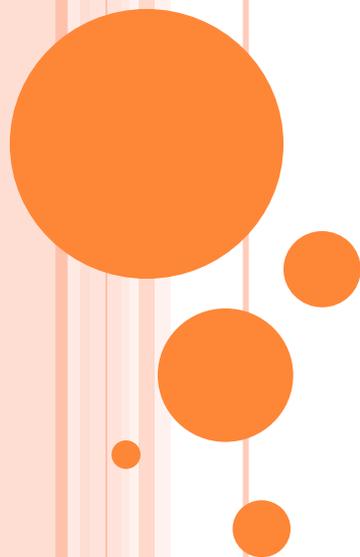


ФЕРМЕНТОЛОГИЯ

к.б.н., доцент

Бахта А.А.



ПЛАН ЛЕКЦИИ

- Основные термины
- Историческая справка
- Строение ферментов
- Номенклатура ферментов
- Классификация ферментов
- Свойства ферментов
- Механизм ферментативной реакции
- Факторы, влияющие на скорость ферментативных реакций
- Ферментопатология
- Ферментодиагностика
- Ферментотерапия



ФЕРМЕНТОЛОГИЯ.

Существование организма животного напрямую связано с множеством химических реакций клеточного метаболизма. На сегодняшний день все реакции рассматриваются как ферментативные, т.е. любая реакция протекает с участием одного или более ферментов.

Ферменты — это биологические катализаторы белковой природы. Синтезируются клетками организма. За последние 50 лет удалось выделить 3000 ферментов.



ОСНОВНЫЕ ТЕРМИНЫ

- ▣ **Ферменты**, (от лат. *fermentum* – закваска), или **энзимы** (от греч *en* – внутри, *gute* – закваска) – биологические катализаторы белковой природы, синтезируемые живой клеткой и активирующие биохимические процессы.
- ▣ Русский физиолог И.П. Павлов называл ферменты "возбудителями жизни".
- ▣ В настоящее время известно около 3000 ферментов, более 200 из них получено в кристаллическом состоянии.
- ▣ **Ферментология (энзимология)** – наука о ферментах и катализируемых ими реакциях.
- ▣ Каждый вид ферментов катализирует превращение определенных веществ (субстратов), иногда — лишь единственного вещества в единственном направлении.
- ▣ **Субстрат** – соединение, превращение которого катализирует фермент, образуя с ним фермент-субстратный комплекс.



ИСТОРИЧЕСКАЯ СПРАВКА

- Ферментативные процессы использовались человеком в
 - - виноделии
 - - пивоварении
 - - выпечки хлеба
 - - приготовление кисломолочных продуктов
 - - приготовлении квашенных продуктов



- Пять-шесть тысяч лет тому назад шумеры в Вавилоне варили пиво. В пивоварнях из муки грубого помола делали караваи, которые слегка запекали, зачем крошили и оставляли для сбраживания. Пивоварение было важным государственным делом. Царь Вавилонии Хаммурапи (1792–1750 гг. до н. э.) в известном своде законов (памятник древневосточного права) постановил, что пивоваров-изготовителей некачественного пива ждет суровая кара: если их уличат в разбавлении пива водой, они будут утоплены в бочках с этим пивом или их заставят пить его до тех пор, пока не наступит смерть.



- В Египте история виноделия уходит корнями в эпоху Древнего царства (начало XXVIII — середина XXIII в. до н.э.) — сохранились барельефы, изображающие сборщиков винограда за работой, есть также письменные свидетельства.
- В Греции история вина началась около 4000 лет назад — этому способствовал мягкий теплый климат страны. Кстати, эллинское вино сильно отличалось от современного: это был густой напиток с травами, орехами, мёдом. Некоторые рецепты предписывали даже добавлять в вино золу, белую глину или масло.
- Рим, очевидно, перенял греческие традиции, обогатил их и успешно распространил по остальному миру в ходе победоносных завоеваний. Именно римляне научились выдерживать вино в бочках (в литературе того времени упоминаются сорта столетней выдержки, хотя это маловероятно) и наладили экспорт в другие страны Европы.
- Закавказье претендует на роль «колыбели» виноделия — в этом регионе вино появилось не менее 4000 лет назад, а семантический анализ самого слова «вино» не исключает его кавказского происхождения.
- Во Франции производить ароматный пьянящий напиток начали не позже VII века до н.э., в Португалии — во II в. до н.э., а в Германии — по самым скромным прикидкам как минимум в I веке нашей эры, а то и раньше.



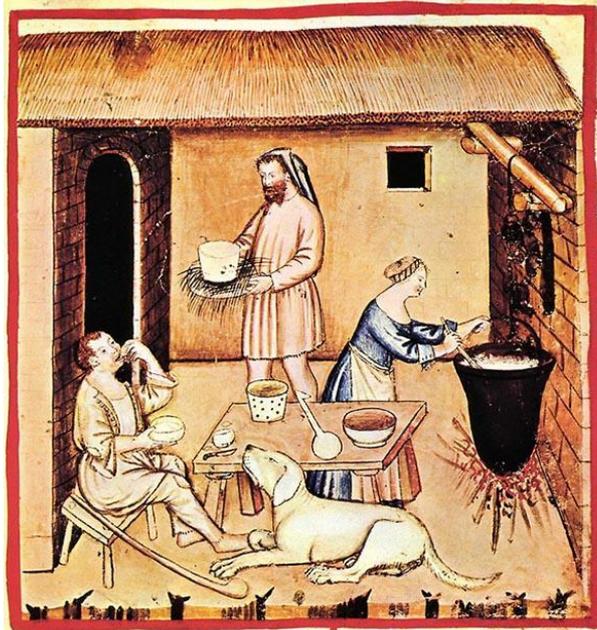
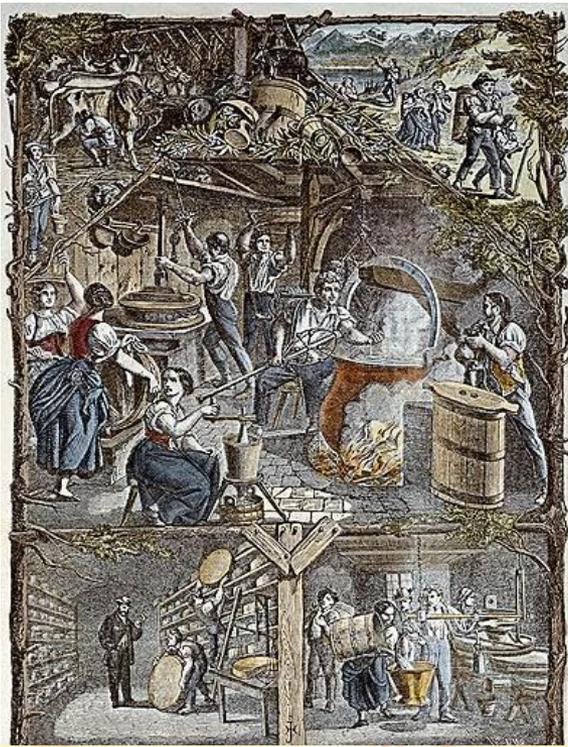
ИСТОРИЧЕСКАЯ СПРАВКА

В 10 в. до н.э. египтяне научились получать дрожжи в чистом виде и вывели новый сорт пшеницы, дающий белую муку. Это был почти такой же хлеб, каким мы его знаем сегодня. В то же время египтяне научились варить хлебное пиво. Кроме белого хлеба, в Египте выпекали около 30 разных сортов хлеба.



- ❑ **Квашение**¹ (*заквашивание, сквашивание, консервирование*) — заготовка овощей впрок, способ консервирования овощей путём молочнокислого брожения, в процессе которого образуется молочная кислота, оказывающая на продукты (наряду с добавляемой поваренной солью) консервирующее действие. По существу квашеными овощами являются и так называемые солёные овощи (огурцы, томаты, свёкла и другие). У народов Печорского и Пермского края России квасили рыбу.
- ❑ Данный вид консервирования возник в Китае, есть посменные источники, которые указывают на то, что данное блюдо (квашенная капуста) использовалось для организации питания рабочих, задействованных на строительстве Великой китайской стены, а было это ещё в III веке до нашей эры.
- ❑ Из китайской традиционной кухни, в которой для приготовления этого блюда использовалась пекинская капуста, оно перекочевало в Корею, а спустя не так много времени стало достоянием румынской, болгарской и чешской кухни.
- ❑ Квашение является наиболее древним способом консервирования овощных продуктов для приготовления сезонных запасов (в основном на зиму).





- Гомер описал свертывание молока в присутствии млечного сока фигового дерева.
- Издавна для приготовления сыра использовали сычужный фермент, получаемый из слизистой желудка телят. Великий философ и ученый Аристотель (384–322 гг. до н. э.), сочинения которого охватывают все отрасли современного ему знания, в труде "О возникновении животных" упоминал о сычужном ферменте как о виде молока, образующегося в желудке молодых животных в период их молочного вскармливания. По его мнению, это молоко, содержащее "огонь", который образуется за счет тепла тела животного при свертывании молока. Если заменить слово "огонь" словом "фермент", то это описание Аристотеля будет звучать вполне современно.



- Научное изучение ферментов началось лишь в конце XVIII века. Обычно "ферментацией" (от лат. *fervere* – варить) назывались процессы разложения одного вещества под действием другого; при этом процессы, происходящие с образованием пузырьков углекислого газа, назывались брожением.



□ К первым научным описаниям ферментативных процессов относится описание пищеварения у животных. **Рене Антуан Реомюр (1683–1757)** при постановке своих экспериментов исходил из предположения о том, что хищные птицы отрыгивают непереваренные остатки пищи. Реомюр сконструировал маленькую проволочную капсулу, в которую был положен кусок мяса. Капсулу с мясом поместил в клетку к сарычу. Через 24 часа сарыч выплюнул эту капсулу. В ней остался размягченный кусок пищи, который, однако, не портился. "Этот процесс может быть только результатом действия какого-то растворителя", — к такому заключению пришел Реомюр.



Рене Антуан Реомюр
(1683–1757)

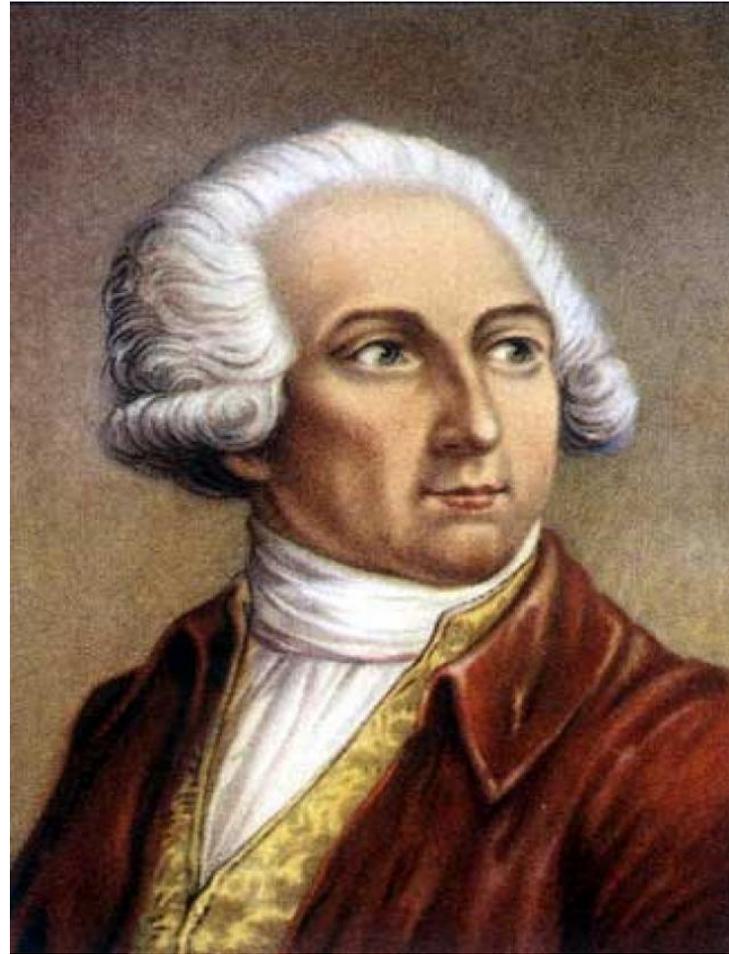




- ▣ **Ладзаро Спалланцани** (1729–1799), профессор истории естествознания университета города Падуя, сообщал о подобных экспериментах.
- ▣ Однако он не рассматривал пищеварение как процесс ферментации по той простой причине, что при этом не образовывались пузырьки газа.



- Более подробно процесс ферментации был изучен одним из основоположников современной химии **Антуаном Лораном Лавуазье (1743–1794)**. Изучая спиртовое брожение, происходящее при изготовлении вина, он обнаружил, что глюкоза превращается в спирт и углекислый газ.

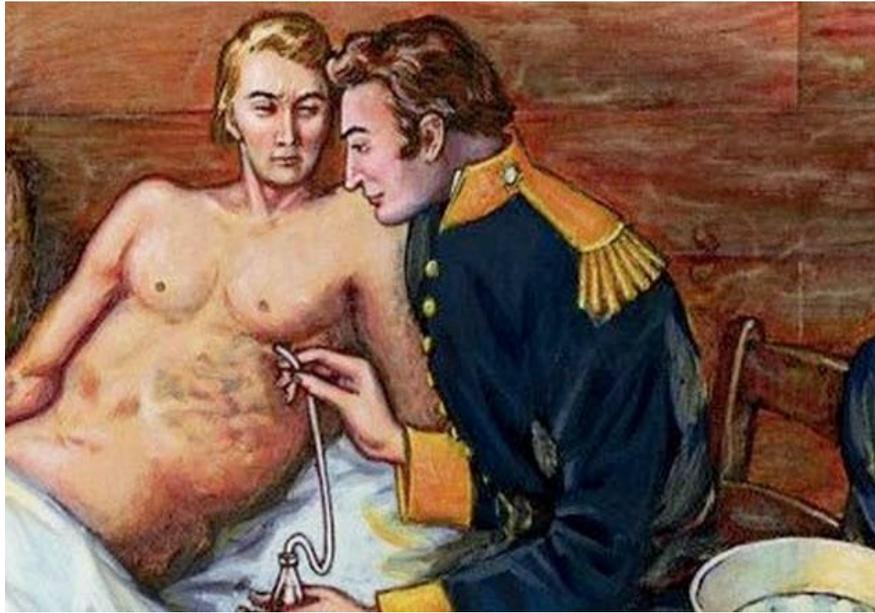


- К началу XIX века в науке преобладала единая точка зрения: ферментация — это химические изменения, вызываемые некоторыми специфическими формами органического материала, а именно "ферментами".



- В 1814 г. русский ученый (немец по происхождению), академик Петербургской Академии наук **Константин Готлиб Сигизмунд Кирхгоф** (1764–1833) показал, что образование сахара из глюкозы в проросших зерновках злаков обусловлено химическим процессом, а не появлением ростков.





- Несколько лет спустя американский военный врач **Уильям Бомонт (1785–1853)** подтвердил эксперименты Реомюра и Спалланцани. При лечении пациента с огнестрельным ранением в живот на незаживающей сквозной ране в области желудка ему удалось проанализировать процесс пищеварения различных питательных веществ. Было установлено, что под действием желудочного сока пища может перевариваться и вне живого тела. Бомонт высказал предположение, что наряду с соляной кислотой в желудочном соке содержатся еще и "другие активные химические начала".



- В 1833 г. **Ансель Пайен** (1795–1871), директор сахарного завода в Париже, вместе со своим коллегой **Жаном Франца Персо** (1805–1865) выделили из проросших зерен ячменя "вещество, разжижающее крахмал". При этом они уже тогда обнаружили у этого вещества свойства, которые по современным представлениям относятся к определяющим универсальным свойствам ферментов.
- Например, относительно небольшие количества препарата могли разжижать большие количества крахмала, однако при нагревании препарат утрачивал эту способность. Активная субстанция могла быть получена в порошкообразном виде из раствора, а после повторного растворения в воде вновь становилась активной.
- Описанная субстанция, получившая название **диастазы** (речь идет об амилазе) (от греч. *dia* – через и *stasis* – стояние, разделение), была первым растительным ферментом, изученным в очищенном виде в лаборатории.





Три года спустя одному из основоположников клеточной теории, немецкому биологу **Теодору Шванну** (1810–1882) удалось получить в чистом виде и изучить фермент желудочного сока животного происхождения — пепсин. Таким образом, он обнаружил одно из тех "других химических начал", о которых писал Бомонт.



- Значительно опередил научную мысль своего времени шведский химик **Йене Якоб Берцелиус (1779–1848)**, который утверждал, что ферментативные процессы представляют собой каталитические процессы.
- Он определил катализаторы как тела, присутствие которых вызывает химические процессы и без которых эти процессы происходить не могут. Сами они в ходе химических реакций остаются в неизменном виде. В 1836 г. Берцелиус писал: "У нас есть основания полагать, что в живых растениях и у животных протекают тысячи каталитических процессов между тканями и жидкостями".



- Однако последующие открытия поставили под сомнение такое определение фермента. В 1837 г. Т. Шванн обнаружил, что гниение, т. е. разложение веществ, по определению относящееся к процессам ферментации, вызывают микроорганизмы.
- Складывалось впечатление, что под термином "ферменты" понимают совершенно разные понятия: с одной стороны, невидимые, "обладающие формой", "организованные" активные начала, такие как возбудители гниения, а с другой — видимые в растворе, "не имеющие формы", "неорганизованные начала" (пепсин и диастаза).



- Начались дискуссии о природе ферментов. В 1680 г. нидерландский натуралист Антони ван Левенгук (1632–1723) с помощью микроскопа собственной конструкции обнаружил, что дрожжи представляют собой круглые живые "частицы", однако вплоть до начала XIX века дрожжи считали особым химическим соединением, *ферментом*. Примерно через 150 лет после Левенгука Шванн показал, что дрожжи действительно живые микроорганизмы, а спиртовое брожение – результат их жизнедеятельности. Это утверждение было, однако, единодушно отвергнуто выдающимися химиками того времени, такими как Йене Якоб Берцелиус, Юстус Либих и Фридрих Велер.



- Представление о том, что спиртовое брожение вызывается жизнедеятельностью некоего микроорганизма, получило распространение лишь после опубликования в 1857 г. работ Луи Пастера (1822–1895), благодаря которым спиртовое брожение стали связывать с жизнедеятельностью дрожжей, причем было признано, что этот процесс всегда сопровождается их ростом и размножением.
- Оппонируя Пастеру, Либих приводил в качестве примера действие диастазы и пепсина – "неживых субстанций", вызывающих изменения, подобные тем, которые происходят в присутствии ферментов. Он обвинял Пастера в том, что тот привлекает некую воображаемую "жизненную силу" объяснения более или менее простых химических процессов. Тем не менее в научных спорах благодаря практическим успехам микробиологии на определенное время победил принцип, выдвинутый Пастером – "нет ферментации без жизни".



- В результате сложилась своеобразная ситуация. Считалось, что существует два класса ферментов: организованные (истинные) ферменты, такие как дрожжи и другие микроорганизмы, и неорганизованные (растворимые) ферменты, такие как диастаза и пепсин. Согласно этим представлениям неорганизованные ферменты не связаны с процессами жизнедеятельности.
- Поэтому в 1876 г. на заседании Общества истории естествознания и медицины Вильгельм Фридрих Кюне (1837–1900) предложил "во избежание недоразумений и обременительных описаний... называть ферменты, не имеющие формы, или неорганизованные ферменты, которые могут действовать в организме и вне его, *"энзимами"*.



- Организованные ферменты были "последним бастионом" витализма, приверженцы которого проповедовали наличие в организмах сверхъестественной *vis vitalis* (жизненной силы). Господствовала точка зрения: органические соединения принципиально невозможно получить в лабораторных условиях, поскольку они обладают жизненной силой. Это представление было опровергнуто в 1828 г., когда Фридриху Велеру удалось синтезировать мочевины.
- В 1897 г. немецкий профессор Эдуард Бухнер (1860–1917) нанес витализму "смертельный" удар. Он пришел к выводу, что выделить находящийся в дрожжах "энзим брожения" можно чисто механическим путем, разрушая дрожжевые клетки. Первые опыты по выделению фермента путем многократного замораживания и оттаивания клеток или путем растирания дрожжей в ступке были неудачными. По предложению своего ассистента Бухнер усовершенствовал методику: в ступку с дрожжами он добавил кварцевый песок и кизельгур, тщательно растер большим пестиком, полученную массу завернул в плотную парусину и отжал на гидравлическом прессе. При этом был получен бесклеточный дрожжевой экстракт, который легко разлагался, поэтому для хранения Бухнер на ночь растворил его в концентрированном растворе сахара. В прозрачном растворе началось активное образование углекислого газа.



- Бухнеру удалось впервые наблюдать спиртовое брожение в отсутствие живых дрожжевых клеток в бесклеточной жидкости. Это был момент рождения современной биохимии. Месяц спустя, проведя повторные опыты, которые привели к тем же результатам, он выступил перед общественностью со своим сенсационным сообщением.
- Бухнер назвал открытый им фермент *zymазой* это был первый фермент, вызывающий образование газа. За это открытие, ознаменовавшее собой начало новой эры в развитии науки, Бухнеру в 1907 г. была присуждена Нобелевская премия в области химии.
- В 1897 г. он доказал, что ферментация возможна и в отсутствие живых клеток. Это открытие положило конец искусственному делению ферментов на организованные субстанции и энзимы. Организованными субстанциями оказались клетки дрожжей или других микроорганизмов. Их активность объяснялась тем, что они были "начинены" ферментами.



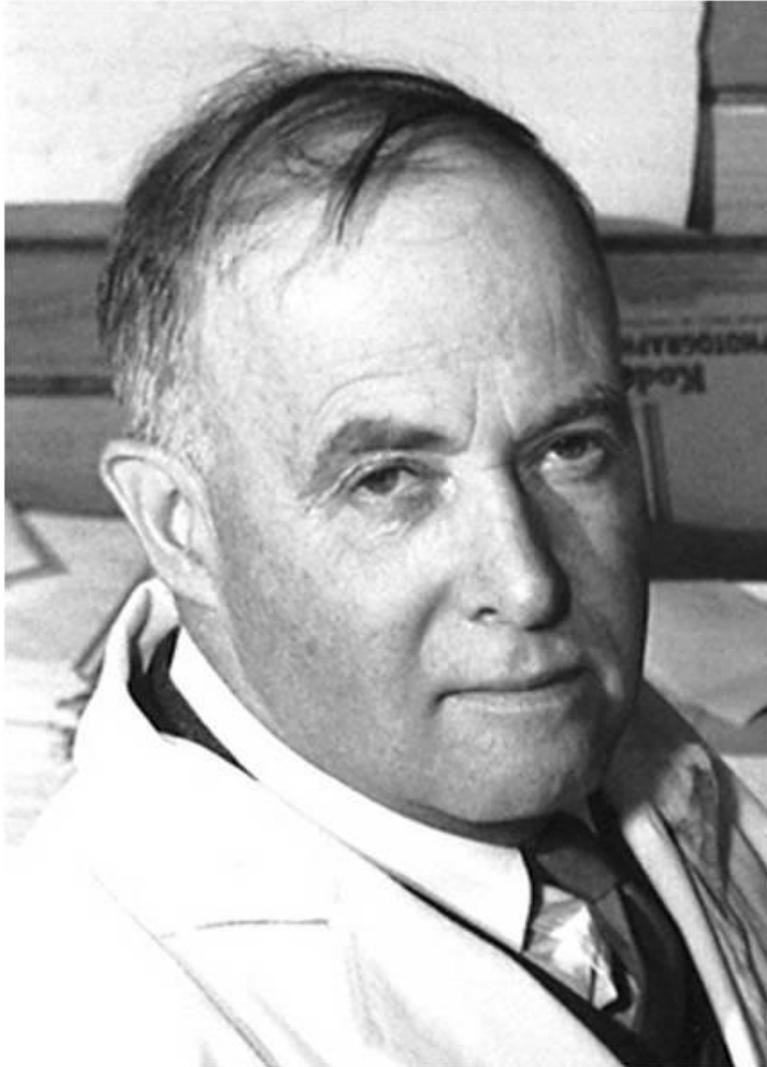


- **Немецкий химик Мориц Траубе (1826–1894)** уже в 1858 г. высказал предположение о том, что ферменты, вопрос о химической классификации которых еще не был решен, представляют собой белки (протеины). Однако подобные взгляды не встретили поддержки других ученых, поскольку не подкреплялись никакими доказательствами.
- Впоследствии было обнаружено, что подобно белкам ферменты состоят из углерода, водорода и азота, при нагревании они свертываются, под действием большинства осадителей белка выпадают в осадок и дают химические реакции, характерные для белков. Результаты этих экспериментов были встречены в научных кругах с большим скептицизмом.



- В 1918 г. **Рихард Мартин Вильштеттер (1872–1942)**, лауреат Нобелевской премии, ученик Адольфа Байера и один из корифеев органической химии своего времени, вместе со студентами начал систематическую работу по выделению и очистке ферментов.
- Хотя при этом удалось получить очищенные ферменты, обладающие высокой активностью, однако белки в этих препаратах не были обнаружены. Поэтому Вильштеттер сделал получивший признание в научных кругах вывод о том, что ферменты — это неизвестные органические соединения небелковой природы, а белки служат носителями этих соединений.





Самнер Джеймс Бетчеллер

- Американский биохимик **Джеймс Бетчеллер Самнер** в 1926 г. также проводил работы по выделению фермента в чистом виде. В качестве исходного материала он использовал бобы *Canavalia ensiformis*, богатые ферментом уреазой. Уреаза катализирует разложение мочевины на углекислый газ и аммиак. Сначала Самнер измельчил бобы на кофейной мельнице и из полученной муки экстрагировал уреазу с помощью растворителя.
- После фильтрования экстракт был оставлен на ночь в холодном месте. На следующее утро, к великому удивлению исследователя, в фильтрате были обнаружены маленькие восьмигранные кристаллы. После перекристаллизации они разлагали мочевины в 700 раз активнее, чем исходная мука.

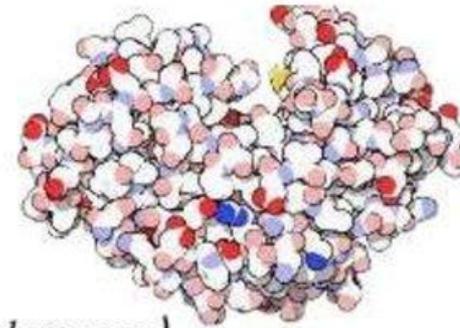


- Несмотря на скептическое отношение Вильштеттера к полученным Самнером результатам, по истечении некоторого времени научный мир поверил в силу кристаллов ферментов. Выделение фермента в виде кристаллов доказывало специфичность данного вещества.
- Кроме того, кристаллы уреазы проявляли типичные свойства белков. Полученные Самнером результаты были подтверждены американским биохимиком Джоном Хоуардом Нортролпом, который в 30-х годах получил в виде кристаллов пищеварительные ферменты пепсин, трипсин, химотрипсин и их неактивные предшественники.
- Лишь много позже стало понятно, почему в ферментных препаратах Вильштеттера не удавалось обнаружить присутствие белков: несмотря на тщательную очистку, они были настолько сильно разбавлены, что с помощью имевшихся в то время малочувствительных методов в них просто нельзя было обнаружить белок.
- В 1946 г. за совместную работу Самнеру и Нортролпу была присуждена Нобелевская премия в области медицины. Через 20 лет после получения первого кристаллического фермента стало очевидно, что ферменты представляют собой белки.



Строение фермента

подавляющая часть ферментов – белки.

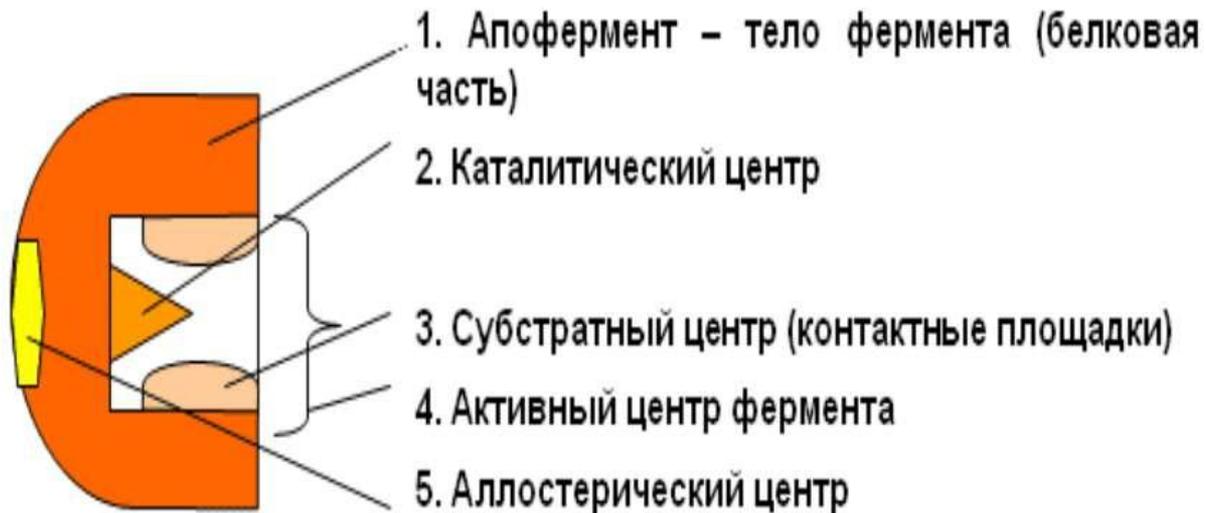


Коферменты (КоЕ):

- производные витаминов: НАД⁺, ФАД, ФМН, ТПФ;
- нуклеотиды;
- порфирины (гем)
- металлы (кофакторы); K⁺, Fe⁺⁺, Cu⁺⁺, Co⁺⁺, Zn⁺⁺, Mn⁺⁺, Mg⁺⁺, Ca⁺⁺

В СТРУКТУРЕ ФЕРМЕНТА ВЫДЕЛЯЮТ:

СТРОЕНИЕ ФЕРМЕНТА



- Апофермент -белковый компонент сложных ферментов, определяет субстратную специфичность, участвует в регуляции каталитической активности.
- Активный центр фермента — участок поверхности молекулы фермента, непосредственно взаимодействующий с молекулой субстрата. Образован из остатков аминокислот, находящихся в составе различных участков полипептидной цепи или различных полипептидных цепей, пространственно сближенных. Возникает на уровне третичной структуры белка-фермента.



□ В пределах активного центра различают три области:

□

1) каталитический центр — область (зона) активного центра фермента, непосредственно участвующая в химических преобразованиях субстрата. Формируется за счет радикалов 2–3 аминокислот, расположенных в разных местах полипептидной цепи фермента, но пространственно сближенных между собой за счет изгибов этой цепи. Если фермент — сложный белок, то в формировании каталитического центра нередко участвует простетическая группа молекулы фермента — кофермент (например, все водорастворимые витамины и жирорастворимый витамин К);

□

2) адсорбционный центр — участок активного центра молекулы фермента, на котором происходит сорбция (связывание) молекулы субстрата. Формируется 1, 2, чаще 3 радикалами аминокислот, расположенными рядом с каталитическим центром. Главная функция — связывание молекулы субстрата и передача этой молекулы каталитическому центру в наиболее удобном положении (для каталитического центра). Сорбция происходит только за счет слабых типов связей и потому обратима. По мере формирования этих связей происходит конформационная перестройка адсорбционного центра, которая приводит к более тесному сближению субстрата и активного центра фермента, более точному соответствию между их пространственными конфигурациями. Именно структура адсорбционного центра определяет субстратную специфичность фермента;

□

3) аллостерические центры — такие участки молекулы фермента вне его активного центра, которые способны связываться слабыми типами связей (значит — обратимо) с тем или иным веществом (лигандом). Это связывание приводит к такой конформационной перестройке молекулы фермента, которая распространяется и на активный центр, облегчая либо затрудняя (замедляя) его работу. Соответственно такие вещества называются аллостерическими активаторами, или аллостерическими ингибиторами данного фермента. Аллостерические центры найдены не у всех ферментов.



ИЗОФЕРМЕНТЫ

- Изоферменты – это молекулярные формы одного и того же фермента, возникшие в результате небольших генетических различий в первичной структуре фермента. Различные изоферменты определяют скорость и направление реакции благодаря разному сродству к субстрату.

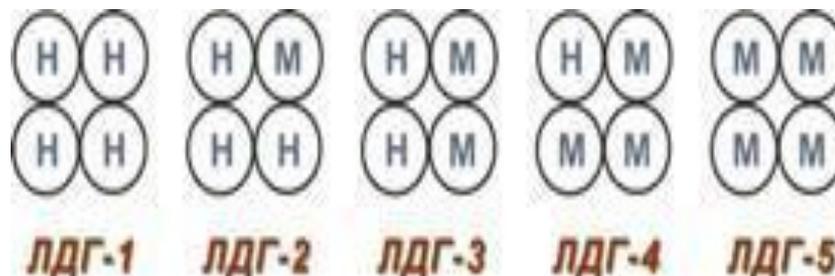


- Например, димерный фермент **креатинкиназа** (КК) представлен тремя изоферментными формами, составленными из двух типов субъединиц: М (англ. *muscle* – мышца) и В (англ. *brain* – мозг). Креатинкиназа-1 состоит из субъединиц типа В и локализуется в головном мозге, креатинкиназа-2 – по одной М и В субъединице, активна в миокарде, креатинкиназа-3 содержит две М-субъединицы, специфична для скелетной мышцы.

Изоферменты креатинкиназы



- Также существует пять изоферментов **лактатдегидрогеназы** (роль ЛДГ) – фермента, участвующего в обмене глюкозы. Отличия между ними заключаются в разном соотношении субъединиц Н (англ. *heart* – сердце) и М (англ. *muscle* – мышца). Лактатдегидрогеназы типов 1 (H_4) и 2 (H_3M_1) присутствуют в тканях с **аэробным** обменом (миокард, мозг, корковый слой почек), обладают высоким сродством к молочной кислоте (лактату) и превращают его в пируват. ЛДГ-4 (H_1M_3) и ЛДГ-5 (M_4) находятся в тканях, склонных к **анаэробному** обмену (печень, скелетные мышцы, кожа, мозговой слой почек), обладают низким сродством к лактату и катализируют превращение пирувата в лактат. В тканях с **промежуточным** типом обмена (селезенка, поджелудочная железа, надпочечники, лимфатические узлы) преобладает ЛДГ-3 (H_2M_2).



НОМЕНКЛАТУРА ФЕРМЕНТОВ

- Номенклатура
 - Тривиальная
 - Рациональная
 - Систематическая



ТРИВИАЛЬНАЯ НОМЕНКЛАТУРА

- Исторически сложившиеся названия
- *Принцип названия по данной номенклатуре:* нет
- *Пример:* пепсин, трипсин



РАЦИОНАЛЬНАЯ НОМЕНКЛАТУРА

▣ *Принцип названия:*

- 1. Первая часть слова – название субстрата*
- 2. Вторая часть слова – АЗА*

Пример:

Амилаза, липаза



МЕЖДУНАРОДНАЯ НОМЕНКЛАТУРА

▣ *Принцип названия:*

- 1. Первая часть слова – название субстрата*
- 2. Вторая часть слова – тип катализируемой реакции*
- 3. Третья часть слова – АЗА*

Пример:

аланинаминотрансфераза



МЕЖДУНАРОДНАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ

(В основу классификации ферментов положен тип реакций, подвергающихся каталитическому воздействию.)

- 1. Оксидоредуктазы — катализируют окислительно-восстановительные реакции.
- 2. Трансферазы — переносят ту или иную функциональную группу от одного субстрата на другой.
- 3. Гидролазы — также участвуют в переносе групп, однако акцептором всегда является молекула воды.
- 4. Лиазы (синтазы) — катализируют расщепление или образование химических соединений или образование химических связей, при этом образуются или исчезают двойные связи.
- 5. Изомеразы — перемещают группы в пределах одной молекулы.
- 6. Лигаза (синтетаза) — катализируют энергозависимые реакции присоединения и поэтому их действие сопряжено с гидролизом АТФ.



КЛАССИФИКАЦИОННЫЙ НОМЕР — ШИФР ФЕРМЕНТА

- ▣ *Шифр состоит из четырех цифр, которые обозначают:*
- ▣ *1. – класс*
- ▣ *2. – подкласс*
- ▣ *3.- подподкласс*
- ▣ *4. порядковы номер в подподклассе*
- ▣ *Пример*
- ▣ *1.1.1.1. алкогольдегидрогеназа*
 - первая цифра 1- означает класс оксидоредуктаз,
 - вторая цифра 1- подкласс дегидрогеназ (действует на СН-ОН – группу)
 - третья цифра 1- подподкласс анаэробные дегидрогеназы (акцептором служит НАД или НАДФ)
 - четвертая цифра 1- порядковый номер в подподклассе анаэробных дегидрогеназ алкогольдегидрогеназы.



ШИФР ФЕРМЕНТА



ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ

Ферменты этого класса катализируют **окислительно-восстановительные реакции**, лежащие в основе биологического окисления.

Класс насчитывает 22 подкласса.

Коферментами этого класса являются: **НАД, НАДФ, ФАД, ФМН, убихинон, глутатион, липоевая кислота.**

Примером подклассов могут служить ферменты, действующие на СН-ОН-группу доноров, на СН-СН-группу доноров, на СН- NH_2 -группу доноров, на гемсодержащие доноры.



□ Если рассматривать класс полностью, то в **подклассы** выделяются группы ферментов, действующие на:

- 1.1. СН-ОН группу доноров;
- 1.2. альдегидную или кетонную группу доноров;
- 1.3. СН-СН группу доноров;
- 1.4. СН- NH_2 группу доноров;
- 1.5. СН- NH_2 группу доноров;
- 1.6. НАДН или НАДФН в качестве доноров;
- 1.8. содержащие серу группы доноров;
- 1.9. гем-содержащие доноры;
- 1.10. дифенолы в качестве доноров;
- 1.11. пероксид водорода в качестве акцептора;
- 1.11. водород в качестве донора;
- 1.13. один донор с включением молекулярного кислорода;
- 1.14. два донора с включением молекулярного кислорода;
- 1.15. супероксидные радикалы в качестве акцептора;
- 1.17. CH_2 группу доноров;
- 1.18. ферредоксин в качестве донора;
- 1.19. флаводоксин в качестве донора;
- 1.20. фосфор или мышьяк в качестве донора;
- 1.21. на вещества X-H и Y-H с образованием X-Y-связи;
- 1.22. галоген в качестве донора;
- 1.97. другие оксидоредуктазы.

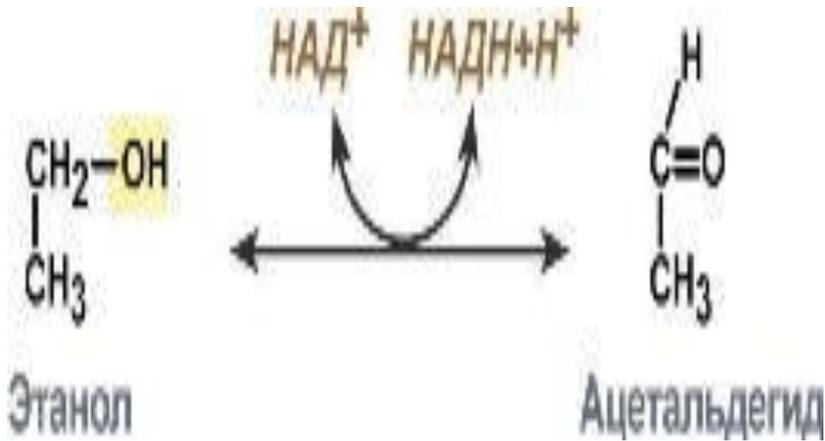
На **подподклассы** деление производится в зависимости от акцептора – НАД+ или НАДФ+ (1.1.1., 1.2.1., 1.3.1., 1.4.1.), дисульфиды (1.2.4.), кислород (1.3.3.). Например, каталаза (КФ 1.11.1.6), пероксидаза (КФ 1.11.1.7).



- Наиболее распространены следующие **рабочие названия** оксидоредуктаз:
- 1. **Дегидрогеназы** – оксидоредуктазы, катализирующие дегидрирование субстрата с использованием в качестве акцептора водорода любых молекул, кроме кислорода.
- 2. Если перенос водорода от молекулы донора трудно доказуем, то такие оксидоредуктазы называют **редуктазами**.
- 3. **Оксидазы** – оксидоредуктазы, катализирующие окисление субстратов с молекулярным кислородом в качестве акцептора электронов без включения кислорода в молекулу субстрата.
- 4. **Моноксигеназы** – оксидоредуктазы, катализирующие внедрение одного атома кислорода в молекулу субстрата с молекулярным кислородом в качестве донора кислорода.
- 5. **Диоксигеназы** – оксидоредуктазы, катализирующие внедрение 2 атомов кислорода в молекулу субстрата с молекулярным кислородом в качестве донора кислорода.
- 6. **Пероксидазы** – оксидоредуктазы, катализирующие реакции с пероксидом водорода в качестве акцептора электронов.



ПРИМЕР 1



Систематическое название

Алкоголь:НАД-кислоредуктаза

Рабочее название

Алкогольдегидрогеназа

Класс

1. Оксидоредуктазы

Подкласс

1.1. Действующие на СН-ОН-группу доноров

Подподкласс

1.1.1. с НАД⁺ или НАДФ⁺ в качестве акцептора

Классификационный номер

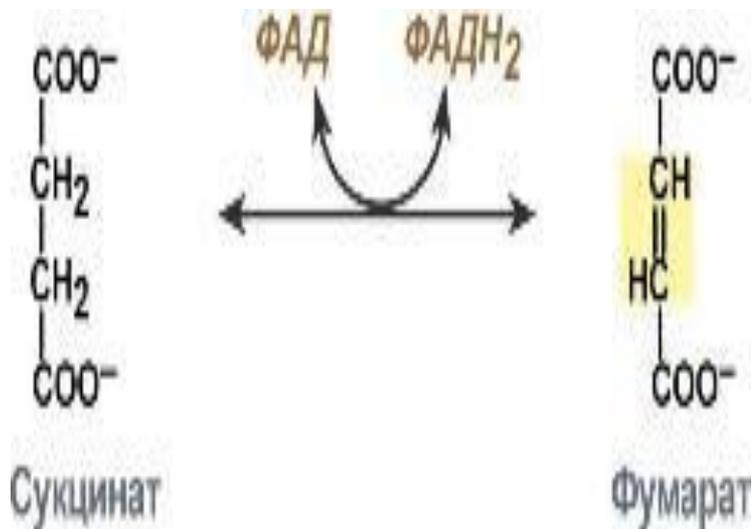
КФ 1.1.1.1.

Кофакторы

Никотинамидадениндинуклеотид. Железо или цинк.



ПРИМЕР 2



Характеристика фермента

Систематическое название

Сукцинат:ФАД-оксидоредуктаза

Рабочее название

Сукцинатдегидрогеназа

Класс

1. Оксидоредуктазы

Подкласс

1.3. Действующие на СН-СН-группу доноров

Подподкласс

1.3.99. с ФАД⁺ в качестве акцептора

Классификационный номер

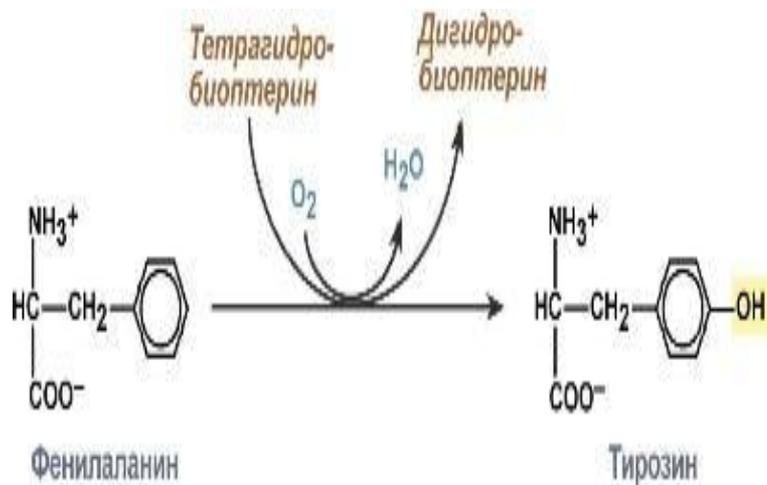
КФ 1.3.99.1.

Кофакторы

Флавинадениндинуклеотид



ПРИМЕР 3



Систематическое название

Фенилаланин.Тетрагидробиоптерин:кислород-
оксидоредуктаза

Рабочее название

Фенилаланин-4-монооксигеназа

Фенилаланин-гидроксилаза

Класс

1. Оксидоредуктазы

Подкласс

1.14. Два донора с включением молекулярного
кислорода

Подподкласс

1.14.16. С восстановленным птеридином в
качестве донора и включением одного
атома кислорода

Классификационный номер

КФ 1.14.16.1

Кофакторы

Тетрагидробиоптерин. Железо.



ТРАНСФЕРАЗЫ

- Трансферазы катализируют реакции переноса различных групп от одного субстрата (донор) к другому (акцептор), участвуют в реакциях взаимопревращения различных веществ, обезвреживания природных и чужеродных соединений. Коферментами являются **пиридоксальфосфат, коэнзим А, тетрагидрофолиевая кислота, метилкобаламин**. Класс подразделяется на 9 подклассов в зависимости от строения переносимых групп.
- **Примером** подклассов являются ферменты, переносящие одноуглеродные фрагменты, альдегидные или кетоостатки, ацильные остатки, азотсодержащие группы, фосфорсодержащие группы.



□ Если рассматривать класс полностью, то в **подклассы** выделяются группы ферментов в зависимости от вида переносимой группы:

2.1. переносящие одноуглеродные фрагменты;

2.2. переносящие альдегидные и кетогруппы;

2.3. переносящие ацильные группы;

2.4. переносящие гликозильные группы;

2.5. переносящие неметильные алкильные и арильные группы;

2.6. переносящие азотсодержащие группы;

2.7. переносящие фосфорсодержащие группы.

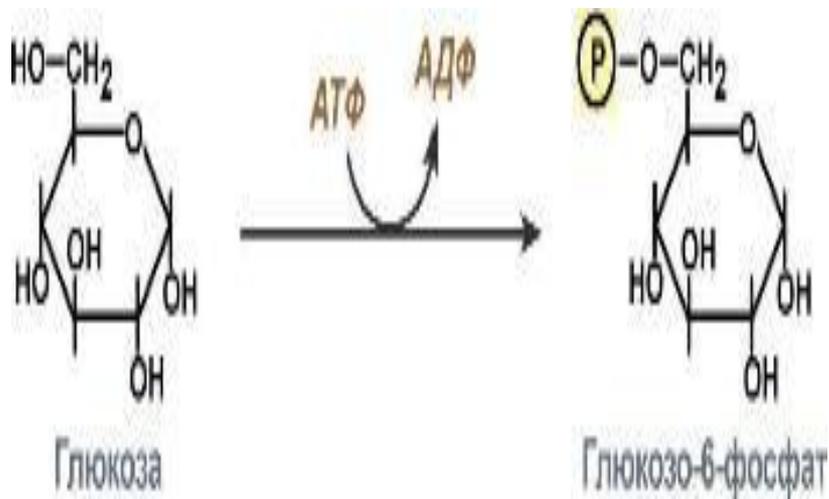
2.8. переносящие сульфосодержащие группы;

2.9. переносящие селенсодержащие группы.

На подподклассы деление производится в зависимости от вида переносимой группы – метил (2.1.1.), карбоксиметил или формил (2.1.2.), amino-группы (2.6.1.).



ПРИМЕР 1



Характеристика фермента

Систематическое название

АТФ:D-гексоза-6-фосфотрансфераза

Рабочее название

Гексокиназа

Класс

2. Трансферазы

Подкласс

2.7. Переносящие фосфорсодержащие группы

Подподкласс

2.7.1. Со спиртовой группой в качестве акцептора

Классификационный номер

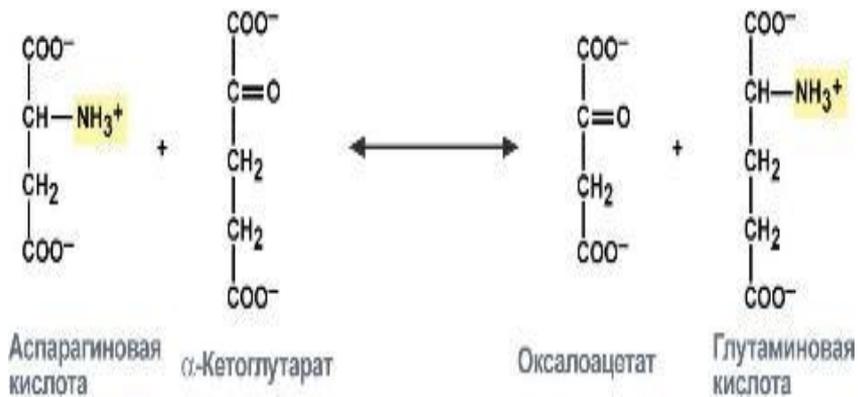
КФ 2.7.1.1.

Кофакторы

Магний



ПРИМЕР 2



Характеристика фермента

Систематическое название

L-Аспаргат:2-оксоглутарат-аминотрансфераза

Рабочее название

Аспаргатаминотрансфераза

Класс

2. Трансферазы

Подкласс

2.6. Переносящие азотсодержащие группы

Подподкласс

2.6.1. Аминотрансферазы

Классификационный номер

КФ 2.6.1.1.

Кофактор

Пиридоксальфосфат



ГИДРОЛАЗЫ

Гидролазы – ферменты, осуществляющие разрыв внутримолекулярных связей в субстрате (за исключением С-С связей) путем присоединения элементов H_2O , подразделяются на 13 подклассов. Ввиду сложности многих субстратов у ряда ферментов сохранены тривиальные названия, например, **пепсин**, **трипсин**. Коферменты отсутствуют.

Гидролазы широко представлены ферментами желудочно-кишечного тракта (пепсин, трипсин, липаза, амилаза и другие) и лизосомальными ферментами. Осуществляют распад макромолекул, образуя легко адсорбируемые мономеры. Примером подклассов служат группы ферментов, действующие на сложные эфиры, на простые эфиры, на пептиды, на углерод-углеродные связи.



□ Если рассматривать класс полностью, то в подклассы выделяются группы ферментов, катализирующие гидролиз:

3.1. сложных эфиров;

3.2. O-гликозидов;

3.3. простых эфиров;

3.4. пептидов;

3.5. не пептидных азот-углеродных связей;

3.6. ангидридов кислот;

3.7. углерод-углеродных связей;

3.8. связей с участием галогена;

3.9. связей фосфор-азот;

3.10. связей сера-азот;

3.11. связей углерод-фосфор;

3.12. связей сера-сера;

3.13. связей углерод-сера.

Среди подподклассов выделяют гидролазы карбоновых кислот (3.1.1.), гидролазы фосфомоноэфиров (3.1.3.).

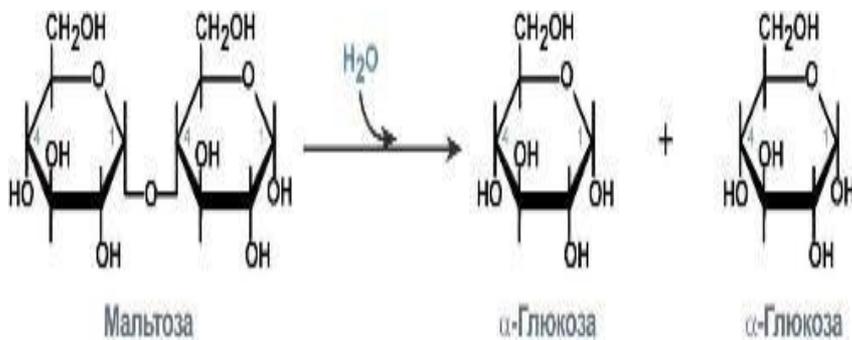


ГИДРОЛАЗЫ

- Исторически названия гидролаз складывались из названия субстрата с окончанием "-аза" – коллагеназа, амилаза, липаза, ДНК-аза. Наиболее часто встречаются следующие рабочие названия гидролаз:
- 1. **Эстеразы** – гидролиз сложноэфирных связей.
- 2. **Липазы** – гидролиз нейтральных жиров.
- 3. **Фосфатазы** – гидролиз моноэфиров фосфорной кислоты.
- 4. **Гликозидазы** – гидролизуют O- и S-гликозидные связи.
- 5. **Протеазы, пептидазы** – гидролиз белков и пептидов.
- 6. **Нуклеазы** – гидролиз нуклеиновых кислот.



ПРИМЕР 1



Характеристика фермента

Систематическое название

α-D-глюкозид:глюкогидролаза

Рабочее название

Мальтаза

Класс

3. Гидролазы

Подкласс

3.2. Гликозидазы

Подподкласс

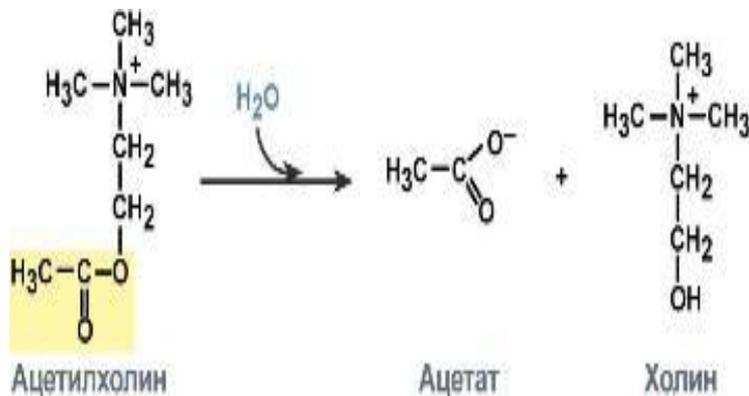
3.2.1. Гидролизующие O-
гликозидные связи

Классификационный номер

КФ 3.2.1.20.



ПРИМЕР 2



Характеристика фермента

Систематическое название

Ацетилхолин:ацетил-гидролаза

Рабочее название

Холинэстераза

Класс

3. Гидролазы

Подкласс

3.1. Действующие на сложные эфиры

Подподкласс

3.1.1. Гидролазы карбоновых кислот

Классификационный номер

КФ 3.1.1.7.



ЛИАЗЫ

Лиазы – ферменты, катализирующие разрыв C-O, C-C, C-N и других связей, а также обратимые реакции отщепления различных групп негидролитическим путем.

Выделяют 7 подклассов.

Эти реакции сопровождаются образованием двойной связи или присоединением групп к месту двойной связи.

Лиазы являются сложными ферментами. Коферментами служат **пиридоксальфосфат**, **тиаминдифосфат**, участвует **магний**, **кобальт**.

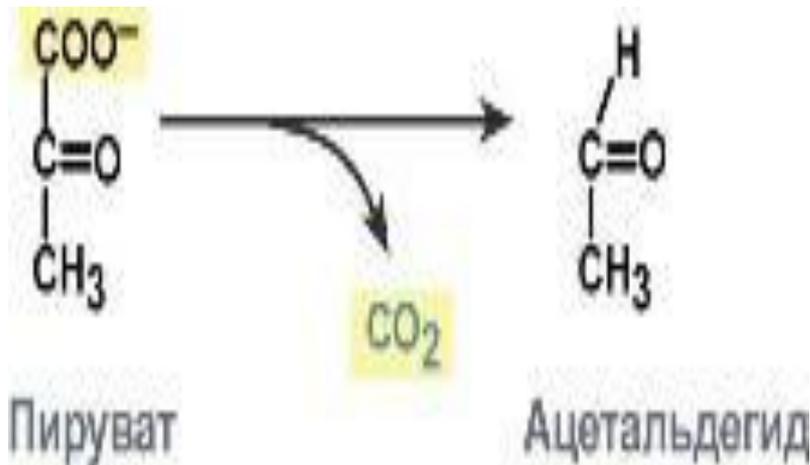
Примером подклассов являются ферменты, действующие на углерод-углеродные связи, углерод-кислородные связи, углерод-азотные связи.



- Если рассматривать класс полностью, то в подклассы выделяются ферменты в зависимости от природы разрываемой связи:
 - 4.1. углерод-углерод лиазы;
 - 4.2. углерод-кислород лиазы;
 - 4.3. углерод-азот лиазы;
 - 4.4. углерод-сера лиазы;
 - 4.5. фосфор-кислород лиазы.Среди подподклассов выделяют, например, карбокси-лиазы (4.1.1.), гидро-лиазы 4.2.1.).



ПРИМЕР 1



Характеристика фермента

Систематическое название

2-оксокислота:карбокси-лиаза

Рабочее название

Пируватдекарбоксилаза

Класс

4. Лиазы

Подкласс

4.1. Углерод-углерод-лиазы

Подподкласс

4.1.1. Карбокси-лиазы

Классификационный номер

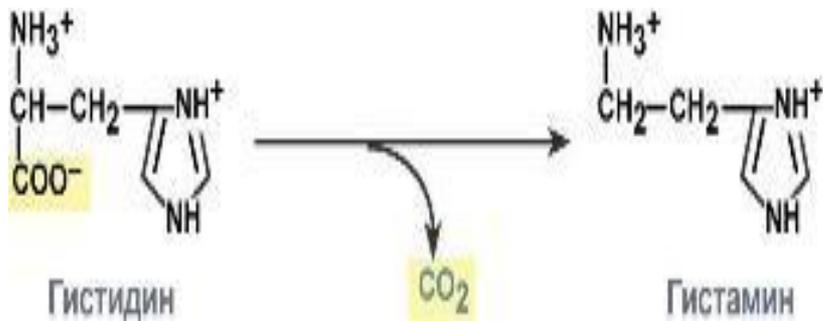
КФ 4.1.1.1.

Кофактор

Тиаминдифосфат



ПРИМЕР 2



Характеристика фермента

Систематическое название

Гистидин:карбокси-лиаза

Рабочее название

Гистидин-декарбоксилаза

Класс

4. Лиазы

Подкласс

4.1. Углерод-кислород-лиазы

Подподкласс

4.1.1. Карбокси-лиазы

Классификационный номер

КФ 4.1.1.22.

Кофактор

Пиридоксальфосфат



ИЗОМЕРАЗЫ

Изомеразы – ферменты, катализирующие изомерные превращения в пределах одной молекулы.

Изомеразы – сложные ферменты.

К их коферментам относятся **пиридоксальфосфат**, **дезоксиаденозилкобаламин**, **глутатион**, **фосфаты моносахаридов** (глюкозо-1,6-дифосфат) и др.



Выделяют 6 подклассов изомераз в зависимости от типа реакции. Например, в первый подкласс выделяют **рацемазы** (обратимое превращение L- и D-стереоизомеров) и **эпимеразы** (превращения изомеров, имеющих более одного центра асимметрии, например, α -D-глюкозу в β -D-глюкозу).



Если рассматривать весь класс целиком, то изомеразы делятся по типу изомеризации на:

5.1. рацемазы и эпимеразы. Рацемазы отвечают за взаимопревращения L- и D-изомеров, S- и R-изомеров. Эпимеразы изменяют конфигурацию при одном из хиральных атомов углерода, например: взаимопревращение α - и β -изомеров, превращения рибулоза \leftrightarrow ксилулоза, галактоза \leftrightarrow глюкоза, манноза \leftrightarrow галактоза;

5.2. цис-транс изомеразы;

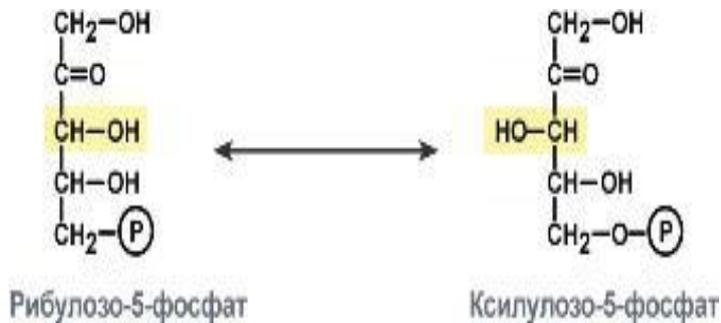
5.3. внутримолекулярные оксидоредуктазы;

5.4. внутримолекулярные трансферазы – мутаза, осуществляют перенос химических групп внутри молекулы;

5.5. внутримолекулярные лиазы.

Среди подподклассов выделяют, например: действующие на аминокислоты и их производные (5.1.1.), на углеводы и их производные (5.1.3.), перемещающие двойные (C=C) связи (5.3.3.).





Характеристика фермента

Систематическое название

D-рибулозо-5-фосфат-3-эпимераза

Рабочее название

Рибулозофосфат 3-эпимераза

Класс

5. Изомеразы

Подкласс

5.1. Рацемазы и эпимеразы

Подподкласс

5.1.3. Действующие на углеводы и их производные

Классификационный номер

КФ 5.1.3.1.





Характеристика фермента

Систематическое название

α -D-глюкозо-1,6-фосфомутаза

Рабочее название

Фосфоглюкомутаза

Класс

5. Изомеразы

Подкласс

5.4. Внутримолекулярные
трансферазы

Подподкласс

5.4.2. Фосфотрансферазы

Классификационный номер

КФ 5.4.2.2.

Кофактор

Глюкозо-1,6-дифосфат



ЛИГАЗЫ

Лига́зы (синте́тазы) – ферменты, катализирующие присоединение друг к другу двух молекул с использованием энергии высокоэнергетических связей АТФ (или других макроэргов).

Лига́зы – сложные ферменты. Они содержат **нуклеотидные (УТФ), биотиновые (витамин Н), фолиевые** коферменты.

Выделяют 6 подклассов.

Примером подклассов служат группы ферментов по виду образуемой связи: углерод-кислород, углерод-сера, углерод-азот, углерод-углерод.



Если рассматривать класс в целом, то выделяют 6 подклассов ферментов, формирующих связи:

6.1. углерод-кислород;

6.2. углерод-сера;

6.3. углерод-азот;

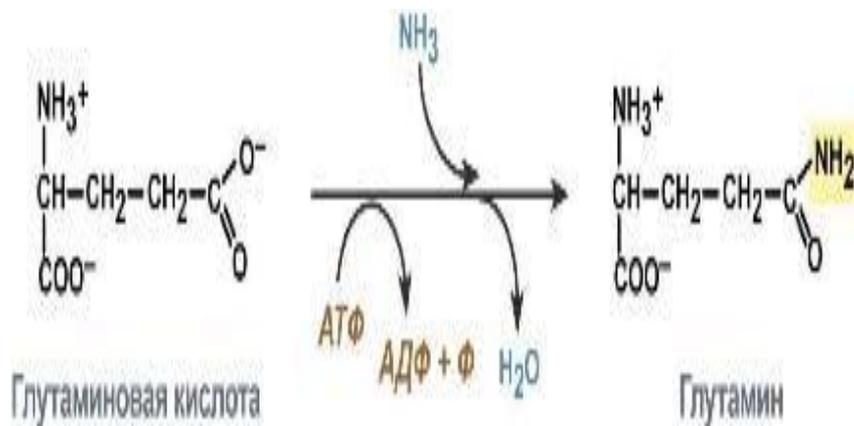
6.4. углерод-углерод;

6.5. фосфор-кислород;

6.6. азот-металл. Среди подподклассов выделяют синтезирующие соединения типа кислота-тиол (6.2.1.), амиды (6.3.1.).



ПРИМЕР 1



Характеристика фермента

Систематическое название

Л-глутамат:аммиак-лигаза

Рабочее название

Глутаминсинтетаза

Класс

6. Лигазы

Подкласс

6.3. Образующие связи углерод-азот

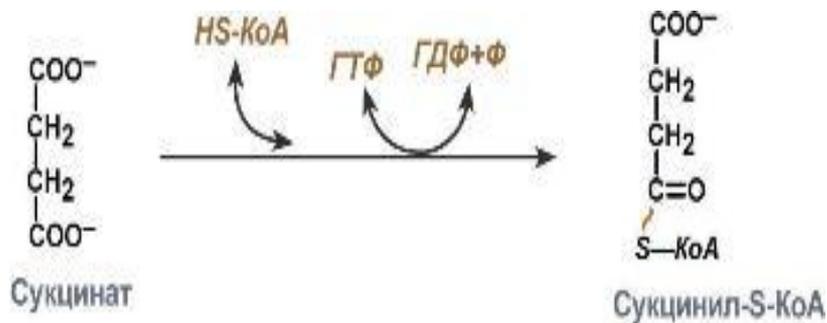
Подподкласс

6.3.1. Амид-синтетазы

Классификационный номер

КФ 6.3.1.2.





Характеристика фермента

Систематическое название

Сукцинат:КоА-лигаза

Рабочее название

Сукцинил-КоА-синтетаза

Сукцинат-тиокиназа

Класс

6. Лигазы

Подкласс

6.2. Образующие связи углерод-сера

Подподкласс

6.2.1. Лигазы кислота-тиол

Классификационный номер

КФ 6.2.1.4.



ОБЩИЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ И НЕОРГАНИЧЕСКИХ КАТАЛИЗАТОРОВ

1. Катализируют только термодинамически возможные реакции.
2. Не изменяют направления реакции.
3. Не смещают равновесия в сторону прямой или обратной реакции.
4. Образуют с субстратами высокореакционные промежуточные комплексы.
5. Не расходуются в процессе реакции



СПЕЦИФИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ, КАК БЕЛКОВЫХ КАТАЛИЗАТОРОВ

1. Специфичность действия ферментов

это способность ускорять протекание одной определенной реакции, не влияя на скорость остальных, даже очень похожих.

Различают:

Абсолютную – когда фермент катализирует только одну определенную реакцию (аргиназа – расщепление аргинина)

Относительную (групповую спец) – фермент катализирует определенный класс реакций (напр. гидролитическое расщепление) или реакции при участии определенного класса веществ.

Специфичность ферментов обусловлена их уникальной аминокислотной последовательностью, от которой зависит конформация активного центра, взаимодействующего с компонентами реакции.

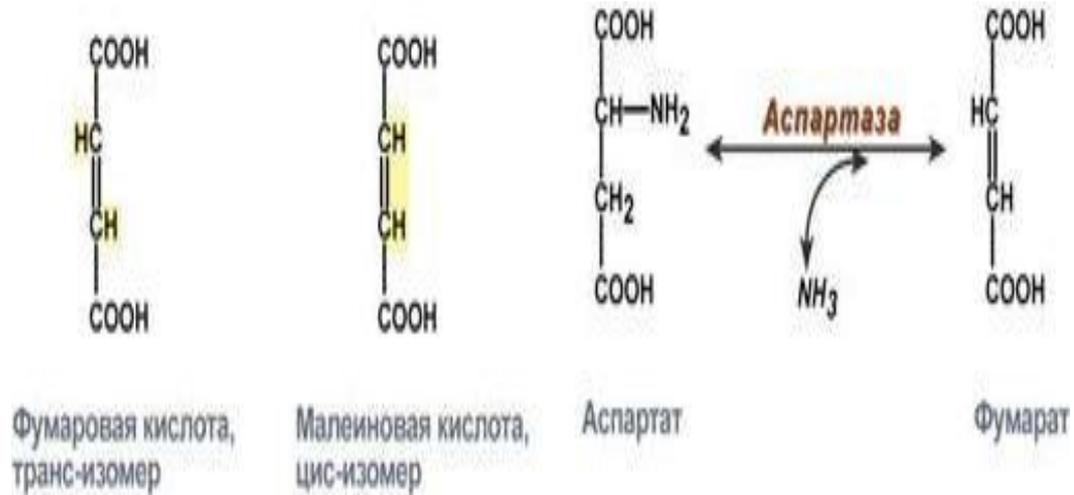


1. СТЕРЕОСПЕЦИФИЧНОСТЬ

катализ только одного из стереоизомеров, например: специфичность к L- или D-аминокислотам – например, почти все ферменты человека взаимодействуют с L-аминокислотами, специфичность к цис- и транс-изомерам.

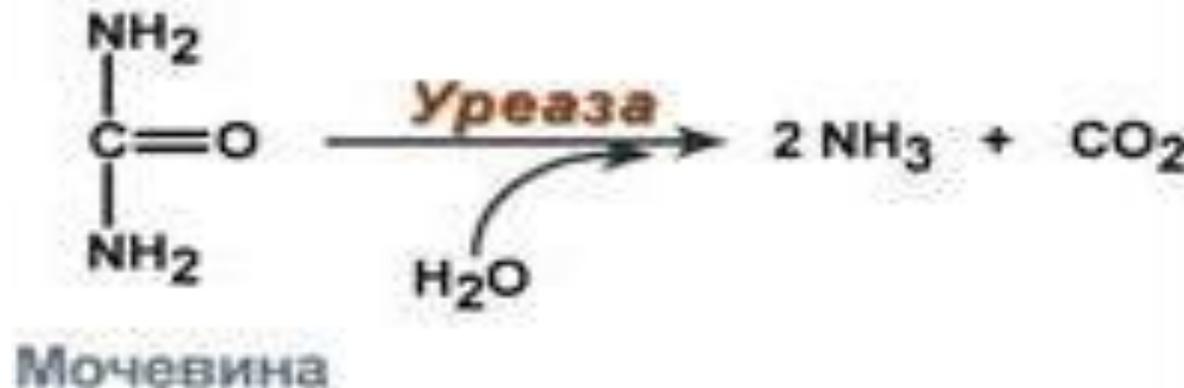


НАПРИМЕР, АСПАРТАЗА РЕАГИРУЕТ ТОЛЬКО С ТРАНС-ИЗОМЕРОМ
— ФУМАРОВОЙ КИСЛОТОЙ, НО НЕ С МАЛЕАТОМ (ЦИС-ИЗОМЕР).



2. АБСОЛЮТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Фермент производит катализ только одного вещества. Например, расщепление мочевины уреазой.



3. ГРУППОВАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Катализ субстратов с общими структурными особенностями, т.е. при наличии определенной связи или химической группы:

например, наличие **пептидной связи**:
• бактериальный фермент **субтилизин** специфичен к пептидной связи независимо от строения образующих ее аминокислот,
• **пепсин** катализирует разрыв пептидной связи, образованной карбоксильными группами ароматических аминокислот (пепсин),
• **тромбин** расщепляет пептидную связь только между аргинином и глицином.

например, наличие **ОН-группы**: **алкогольдегидрогеназа** (реакция) окисляет до альдегидов одноатомные спирты (этанол, метанол, пропанол).



4. ОТНОСИТЕЛЬНАЯ ГРУППОВАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Превращение субстратов с некоторыми общими признаками. Например, цитохром P_{450} окисляет только гидрофобные вещества, которых насчитывается около 7000.

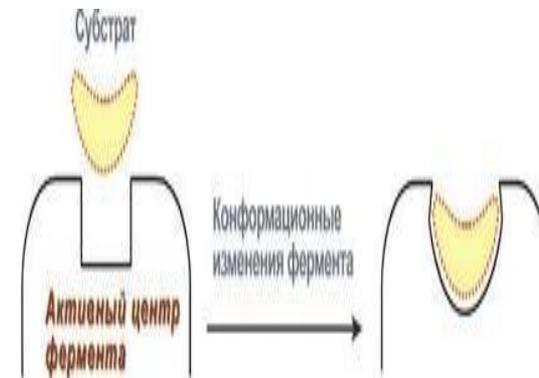
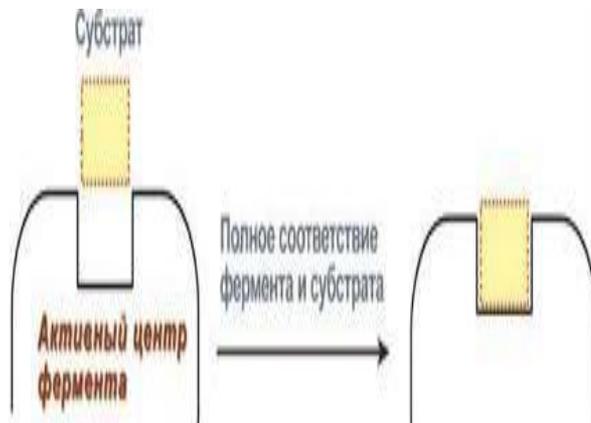


Механизмы специфичности

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. Теория 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.

2. Теория 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.



СПЕЦИФИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ, КАК БЕЛКОВЫХ КАТАЛИЗАТОРОВ

2.Эффективность

Ферменты- высокоактивные вещества- скорость ферментативных реакций в миллионы раз выше, чем не ферментативных.



СПЕЦИФИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ, КАК БЕЛКОВЫХ КАТАЛИЗАТОРОВ

3. Термолабильность

Скорость ферментативных реакций зависит от температуры. Максимальная скорость отмечается в диапазоне оптимуму температур.



▣ 4. зависимость ферментов от рН среды

Скорость ферментативных реакций зависит от рН среды. Максимальная скорость отмечается в диапазоне оптимума рН, который индивидуален для каждого фермента.



▣ 5. Регулируемая активность



РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

В клетке имеется несколько способов регуляции активности ферментов – одни способы подходят для любых ферментов, другие более специфичны.



1. 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.

Например, для цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) таким субстратом является **оксалоацетат** (щавелевоуксусная кислота). Наличие оксалоацетата "подталкивает" реакции цикла, что позволяет вовлекать в окисление молекулы ацетил-SКоА.

Именно из-за недостатка оксалоацетата (относительного или абсолютного) развивается **кетацидоз** при голодании и инсулинзависимом сахарном диабете.



2. КОМПАРТМЕНТАЛИЗАЦИЯ

Компартментализация — это сосредоточение ферментов и их субстратов в одном компартменте (одной органелле) — в эндоплазматическом ретикулуме, митохондриях, лизосомах.

- Например, ферменты цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) и β -окисления жирных кислот расположены в митохондриях, ферменты синтеза белка — в рибосомах.



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:
- исчезновение **пищеварительных ферментов** при длительном голодании и их появление в восстановительный период (в результате изменения секреции кишечных гормонов),
- при беременности и после родов в молочной железе активно идет синтез фермента **лактозосинтазы** под воздействием лактотропного гормона,
- гормоны глюкокортикоиды стимулируют синтез ферментов **глюконеогенеза**, что обеспечивает стабильность концентрации глюкозы в крови и устойчивость ЦНС к стрессу,
- токсические субстраты этанол, барбитураты стимулируют в печени синтез "своего" изофермента **цитохрома P₄₅₀**, который окисляет и обезвреживает эти вещества.



4. ОГРАНИЧЕННЫЙ (ЧАСТИЧНЫЙ) ПРОТЕОЛИЗ ПРОФЕРМЕНТОВ

Ограниченный (частичный) протеолиз проферментов подразумевает, что синтез некоторых ферментов осуществляется в виде **более крупного предшественника** и при поступлении в нужное место этот фермент активируется через отщепление от него одного или нескольких пептидных фрагментов. Подобный механизм защищает внутриклеточные структуры от повреждений.



5. АЛЛОСТЕРИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ

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

Алlostерические 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 или продукт данной реакции, т.е. включается **механизм обратной отрицательной связи**. Если регуляторами являются начальный метаболит или субстрат реакции, то говорят о **прямой регуляции**, она может быть как положительной, так и отрицательной. Также регулятором могут быть метаболиты биохимических путей, каким то образом связанных с данной реакцией



6. БЕЛОК-БЕЛКОВОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ

Термин белок-белковое взаимодействие обозначает ситуацию, когда в качестве регулятора выступают не метаболиты биохимических процессов, а специфичные белки. В целом ситуация схожа с аллостерическим механизмом: после влияния каких-либо факторов на специфичные белки изменяется активность этих белков, 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).



7. КОВАЛЕНТНАЯ (ХИМИЧЕСКАЯ) МОДИФИКАЦИЯ

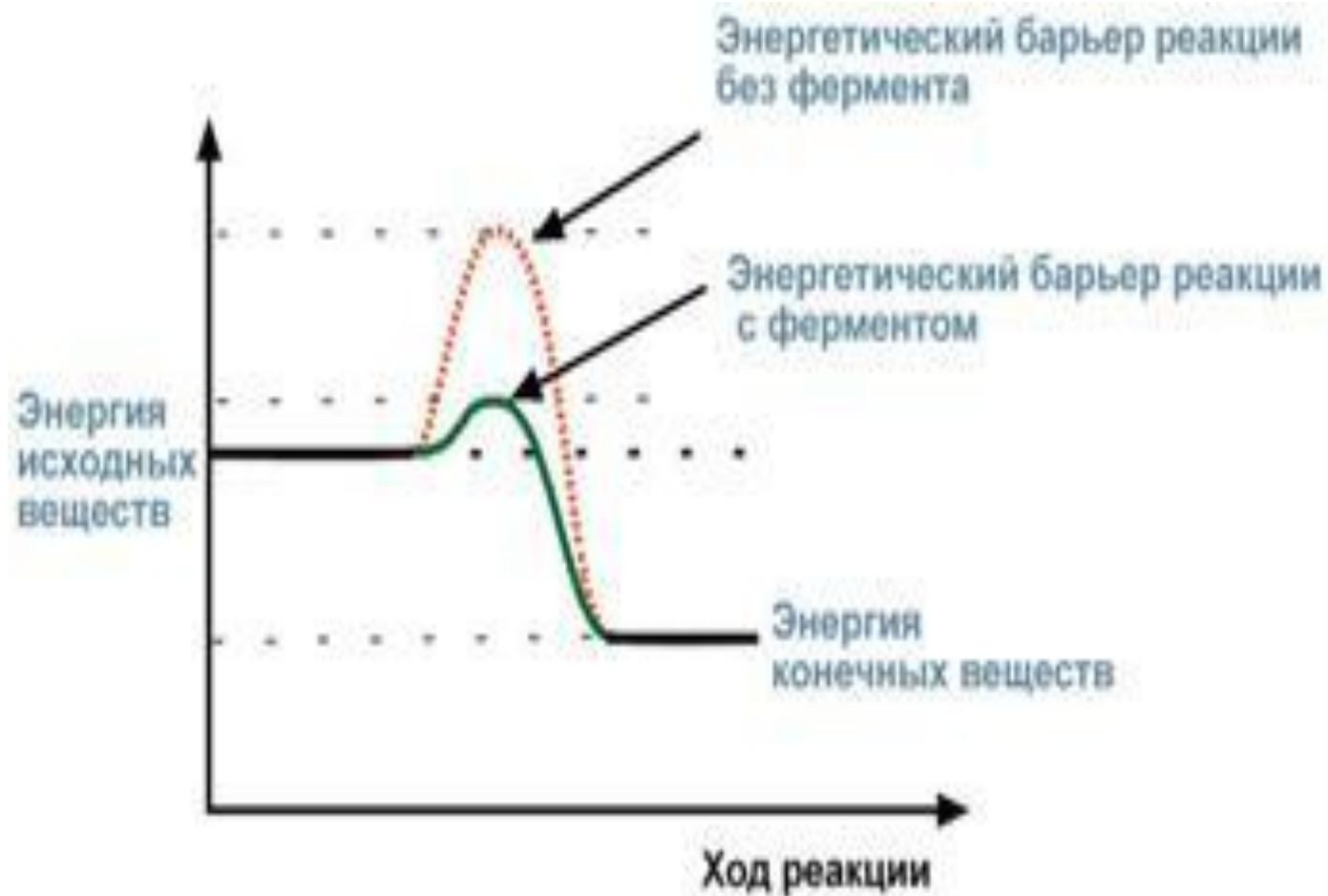
- Ковалентная модификация заключается в обратимом присоединении или отщеплении определенной группы, благодаря чему изменяется активность фермента. Чаще всего такой группой является фосфорная кислота, реже метильные и ацетильные группы. Фосфорилирование фермента происходит по остаткам серина и тирозина. Присоединение фосфорной кислоты к белку осуществляют ферменты **протеинкиназы**, отщепление – **протеинфосфатазы**.



КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

- Известно, что для осуществления химической реакции необходимо, чтобы реагирующие вещества имели суммарную энергию выше, чем величина, называемая **энергетическим барьером** реакции.
- Для характеристики величины энергетического барьера Аррениус ввел понятие **энергии активации**.
- Преодоление энергии активации в химической реакции достигается либо увеличением энергии взаимодействующих молекул, например нагреванием, облучением, повышением давления, либо снижением требуемых для реакции затрат энергии (т.е. энергии активации) при помощи катализаторов.

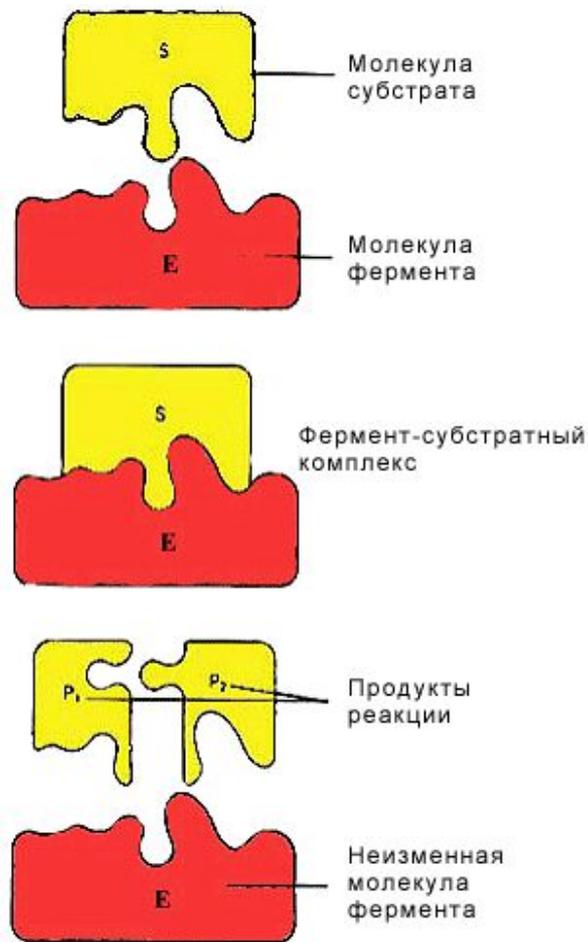




- По своей функции ферменты являются биологическими катализаторами. Сущность действия ферментов, так же как неорганических катализаторов, заключается:
 - в активации молекул реагирующих веществ,
 - в разбиении реакции на несколько стадий, энергетический барьер каждой из которых ниже такового общей реакции.



МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ



I. Активация фермента

II. Узнавание ферментом своего субстрата

III. Образование неактивного фермент-субстратного комплекса с помощью слабых водородных связей между субстратом и аминокислотами контактных участков

IV. Образование активного фермент-субстратного комплекса за счет каталитического участка

V. Образование продуктов реакции.



- На первом этапе (I) происходит активация фермента путем связывания с аллостерическим центром регуляторных веществ (например, гормонов), что приводит к изменению конформации активного центра фермента и увеличению его способности связывать молекулу субстрата.
- На втором этапе (II) происходит 'узнавание' ферментом своего субстрата (см. Специфичность действия фермента).
- На третьем этапе (III) происходит формирование неактивного фермент-субстратного комплекса за счет образования гидрофобных и водородных связей между радикалами аминокислотных остатков субстратного центра (контактные площадки) и соответствующими группировками в молекуле субстрата. Молекула субстрата удерживается вблизи активного центра, но химическим преобразованиям еще не подвергается.
- На четвертом этапе (IV) образуется активный фермент-субстратный комплекс. При этом происходит химическое преобразование субстрата с участием каталитического центра и кофермента (если речь идет о сложном ферменте). В результате этого молекула субстрата меняет свою пространственную конфигурацию, в ней происходит перераспределение энергии и уменьшается прочность связей.
- На пятом этапе (V) фермент-субстратный комплекс становится нестабильным и затем преобразуется в комплекс фермент-продукт, который распадается на продукты реакции и фермент. Фермент из реакции выходит в неизменном виде.



1. ЗАВИСИМОСТЬ СКОРОСТИ ХИМИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ СРЕДЫ

Зависимость активности ферментов (скорости реакции) от температуры описывается **колоколообразной кривой** с максимумом скорости при значениях **оптимальной температуры** для данного фермента.

Закон о повышении скорости реакции в 2-4 раза при повышении температуры на 10°C справедлив и для ферментативных реакций, но только в пределах до $55-60^{\circ}\text{C}$, т.е. до температур **денатурации** белков. Наряду с этим, как исключение, имеются ферменты некоторых микроорганизмов, существующих в воде горячих источников и гейзеров.

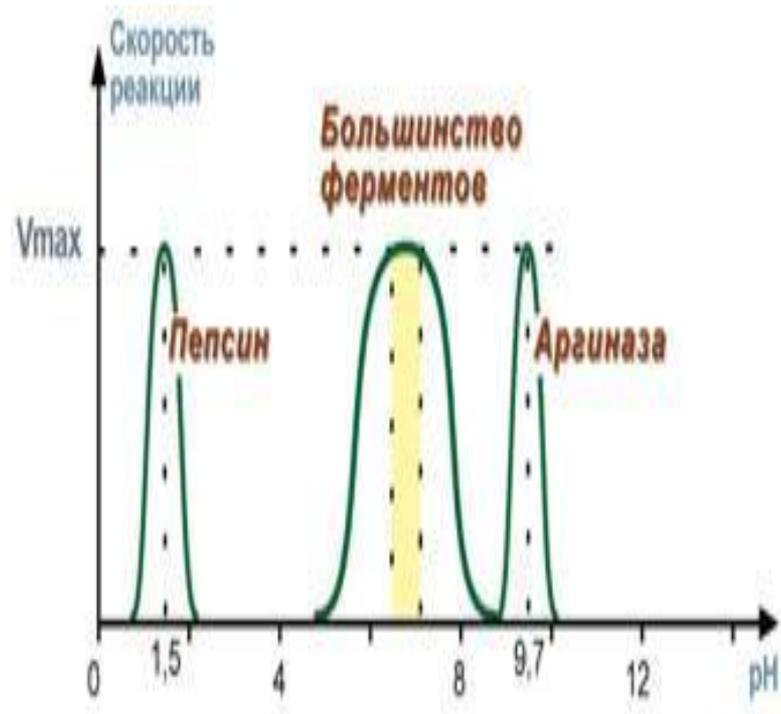
При понижении температуры активность ферментов понижается, но не исчезает совсем. Иллюстрацией может служить зимняя спячка некоторых животных (суслики, ежи), температура тела которых понижается до $3-5^{\circ}\text{C}$. Это свойство ферментов также используется в хирургической практике при проведении операций на грудной полости, когда больного подвергают охлаждению до 22°C .



2. ЗАВИСИМОСТЬ СКОРОСТИ РЕАКЦИИ ОТ pH

Зависимость также описывается **колоколообразной кривой** с максимумом скорости при **оптимальном** для данного фермента значении pH.

Для каждого фермента существует определенный узкий интервал pH среды, который является оптимальным для проявления его высшей активности. Например, оптимальные значения pH для пепсина 1,5-2,5, трипсина 8,0-8,5, амилазы слюны 7,2, аргиназы 9,7, кислой фосфатазы 4,5-5,0, сукцинатдегидрогеназы 9,0.



3. ЗАВИСИМОСТЬ СКОРОСТИ РЕАКЦИИ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ СУБСТРАТА

При увеличении концентрации субстрата скорость реакции сначала возрастает соответственно подключению к реакции новых молекул фермента, затем наблюдается эффект насыщения, когда все молекулы фермента взаимодействуют с молекулами субстрата. При дальнейшем увеличении концентрации субстрата между его молекулами возникает конкуренция за активный центр фермента и скорость реакции снижается.



4. ЗАВИСИМОСТЬ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ ФЕРМЕНТА

При увеличении количества молекул фермента скорость реакции возрастает непрерывно и прямо пропорционально количеству фермента, т. к. большее количество молекул фермента производит большее число молекул продукта.



- Зависимость скорости химической реакции от наличия в системе ингибиторов и активаторов



- **Ингибиторами** называют вещества, вызывающие снижение активности фермента.
- Следует различать инактивацию и ингибирование фермента.
- Сам по себе факт торможения ферментативной реакции в присутствии какого-либо вещества ещё не говорит о том, что это вещество — ингибитор.
- Любые денатурирующие агенты вызывают инактивацию фермента и торможение ферментативной реакции.
- Ингибиторы, в отличие от денатурирующих агентов, действуют в малых концентрациях и вызывают специфическое снижение ферментативной активности.



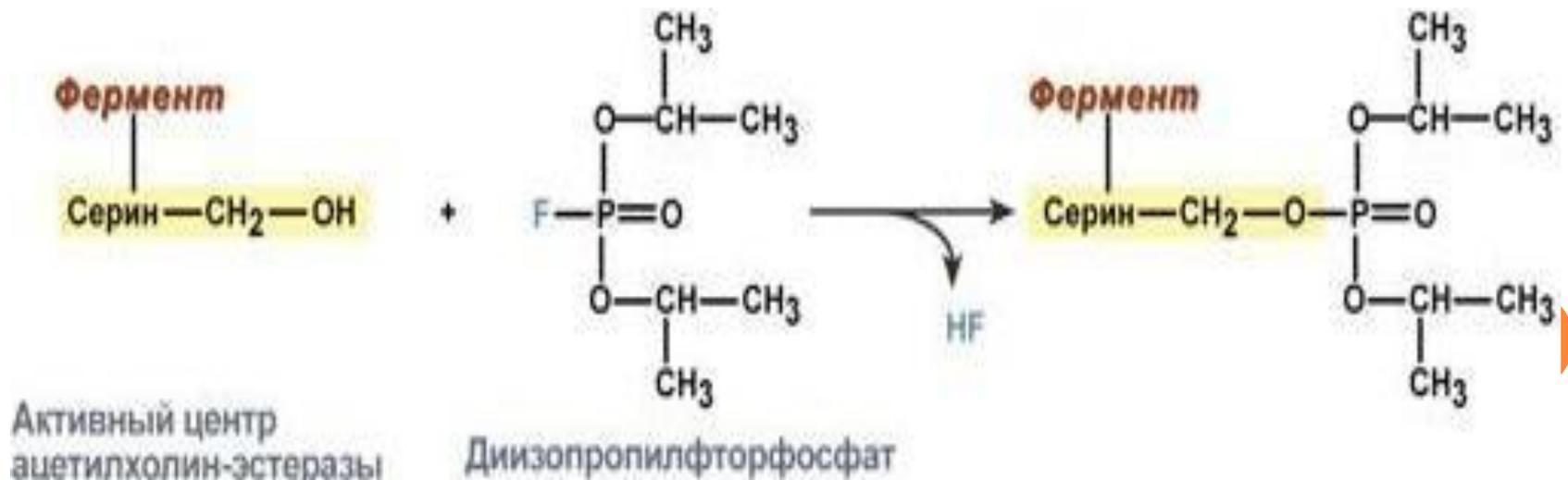
ИНГИБИРОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ

- по прочности связывания фермента с ингибитором ингибирование бывает **обратимым** и **необратимым**.
- по отношению ингибитора к активному центру фермента ингибирование делят на **конкурентное** и **неконкурентное**.



НЕОБРАТИМОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ

- При необратимом ингибировании происходит связывание или разрушение функциональных групп фермента, необходимых для проявления его активности.
- Например, вещество **диизопропилфторфосфат** прочно и необратимо связывается с гидроксигруппой серина в активном центре фермента **ацетилхолинэстеразы**, гидролизующей ацетилхолин в нервных синапсах. Ингибирование этого фермента предотвращает распад ацетилхолина в синаптической щели, в результате чего медиатор продолжает оказывать воздействие на свои рецепторы, что бесконтрольно усиливает холинергическую регуляцию. Аналогичным образом действуют боевые **фосфоорганические вещества** (зарин, зоман) и **инсектициды** (карбофос, дихлофос).



ОБРАТИМОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ

- При обратимом ингибировании происходит непрочное связывание ингибитора с функциональными группами фермента, вследствие чего активность фермента постепенно восстанавливается.
- Примером обратимого ингибитора может служить **прозерин**, связывающийся с ферментом **ацетилхолинэстеразой** в ее активном центре. Группа ингибиторов холинэстеразы (прозерин, дистигмин, галантамин) используется при миастении, после энцефалита, менингита, травм ЦНС.



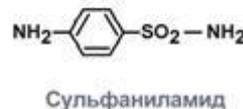
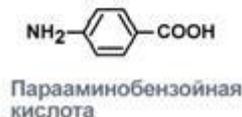
КОНКУРЕНТНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ

При таком виде ингибирования ингибитор по своей структуре похож на субстрат фермента. Поэтому он соперничает с субстратом за активный центр, что приводит к уменьшению связывания субстрата с ферментом и нарушению катализа. В этом состоит особенность конкурентного ингибирования — возможность усилить или ослабить ингибирование через изменение концентрации субстрата.



НАПРИМЕР:

1. Конкурентное взаимодействие этанола и метанола за активный центр **алкогольдегидрогеназы**.
2. Ингибирование **сукцинатдегидрогеназы** **малоновой кислотой**, структура которой схожа со структурой субстрата этого фермента – янтарной кислоты (сукцината).
3. Также к конкурентным ингибиторам относят антиметаболиты или псевдосубстраты, например, антибактериальные средства **сульфаниламиды**, схожие по структуре с *n*-аминобензойной кислотой, компонентом фолиевой кислоты. При лечении сульфаниламидами в бактериальной клетке конкурентно нарушается испол



НЕКОНКУРЕНТНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ

Данный вид ингибирования связан с присоединением ингибитора не в активном центре, а в другом месте молекулы. Это может быть аллостерическое ингибирование, когда активность фермента снижается естественными модуляторами, или связывание с ферментом каких-либо токсинов.

Например, **синильная кислота (цианиды)** связывается с гемовым железом ферментов дыхательной цепи и блокирует клеточное дыхание.



АКТИВАТОРЫ

это вещества, увеличивающие скорость ферментативной реакции.



ВИДЫ АКТИВАТОРОВ:

- 1. **Вещества, влияющие на область активного центра.** К ним относятся *ионы металлов* (Na^+ , K^+ , Fe^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} и др.). В ряде случаев ионы металлов выполняют функцию кофактора фермента. В других случаях они способствуют присоединению субстрата к активному центру фермента. Ионы металлов оказываются активаторами только в условиях дефицита их в организме.



- **2. Аллостерические эффекторы**, которые связываются с аллостерическим (регуляторным) участком апофермента.
- Это связывание вызывает конформационные изменения в молекуле белка, приводящие к изменению структуры активного центра, что сказывается на связывании и превращении субстрата в активном центре.
- При этом активность фермента либо увеличивается (это *аллостерические активаторы*), либо уменьшается (это *аллостерические ингибиторы*). Аллостерическими эффекторами ферментов наиболее часто выступают различные метаболиты, а также гормоны, ионы металлов, нуклеозиды - АТФ, АДФ, АМФ.



□ **3. Вещества, вызывающие модификации, не затрагивающие активный центр фермента.**

Возможно несколько вариантов таких модификаций:

□ *3.1. активация путём присоединения специфической модифицирующей группы к молекуле фермента*

□ **Пример:** регуляция активности *липазы*.

□ В этом случае фосфатная группа присоединяется к гидроксильным группам аминокислот, находящихся в белковой части фермента. Отрицательно заряженные фосфатные группы могут разрывать слабые водородные и ионные связи в третичной структуре белка-фермента и влиять на конформационное состояние его активного центра. В зависимости от природы фермента фосфорилирование может его активировать или, наоборот, инактивировать. Реакции присоединения фосфатной группы катализируют ферменты *протеинкиназы*, а отщепления – *фосфатазы*. Активность этих ферментов в свою очередь находится под контролем гормональной системы.



□ 3.2. активация путём перехода неактивного предшественника - профермента в активный фермент за счёт частичного протеолиза.

Некоторые ферменты синтезируются в клетке первоначально неактивными и после секреции из клетки переходят в активную форму. Неактивные предшественники называются *проферменты* (*зимогены*).

Под действием активатора происходит частичный гидролиз профермента с отщеплением от него неактивного пептида, в результате чего открывается активный центр.

Так происходит активация ферментов желудочно-кишечного тракта, переваривающих белки пищи. Например, фермент *пепсиноген*, синтезированный в клетках желудка, затем в просвете желудка под действием соляной кислоты превращается в активный *пепсин* путём удаления неактивного участка полипептидной цепи.



3.3. активатор вызывает диссоциацию субъединиц фермента, имеющего четвертичную структуру (отщепление одной из субъединиц фермента).



