

Лекция № 5

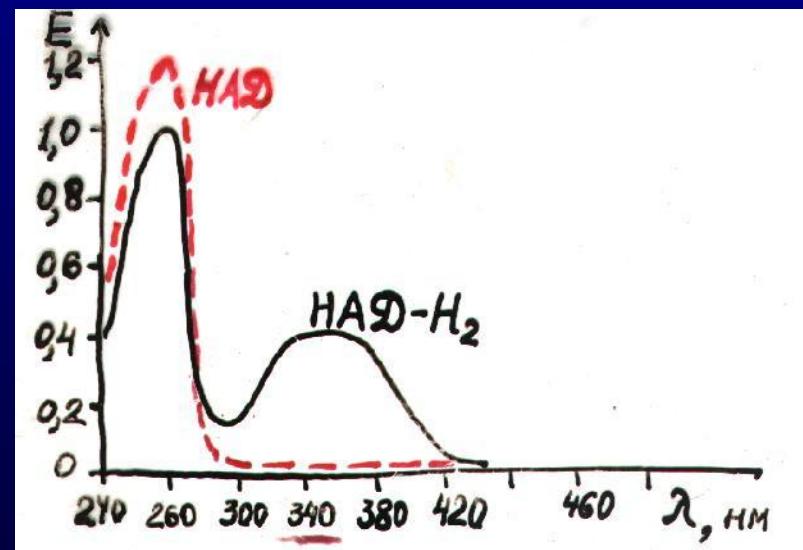
Кинетика  
ферментативного  
катализа.

# 1. Методы определения количества ферментов

Наиболее часто используемые:

- 1) Колориметрические - основаны на определении образующихся в ходе реакции окрашенных веществ.  
Спектрофотометрические – основаны на поглощении света в определенных участках спектра субстратами и продуктами реакции, реже активными группами ферментов.

Определение  
активности НАД –  
зависимых  
дегидрогеназ



## **2. Способы выражения активности ферментов.**

## Используются 2 основные единицы:

- 1) **КАТАЛ** – такое количество фермента, которое может осуществить превращение 1 моль субстрата за 1 сек.

**Катал = Моль/с, мМоль/с, мкМоль/с, нМоль/с**

- ## 2) IU - International Units

МЕ( международная единица) – то количество любого фермента, которое катализирует превращение 1 мкМоля субстрата в минуту при заданных условиях.

**МЕ = мкМоль / мин**

## **Активность ферментов в сыворотке и плазме крови - в единицах на 1 литр : МЕ/л, Е/л**

$$1 \text{ МЕ} = 16,67 \text{ нкнкат/л}$$

### 3. Кинетика ферментативных реакций

Ферментативная кинетика занимается исследованием закономерностей влияния химической природы реагирующих веществ (ферментов, субстратов) и условий их взаимодействия (концентрации, pH среды, температуры, присутствия активаторов или ингибиторов) на скорость ферментативной реакции.

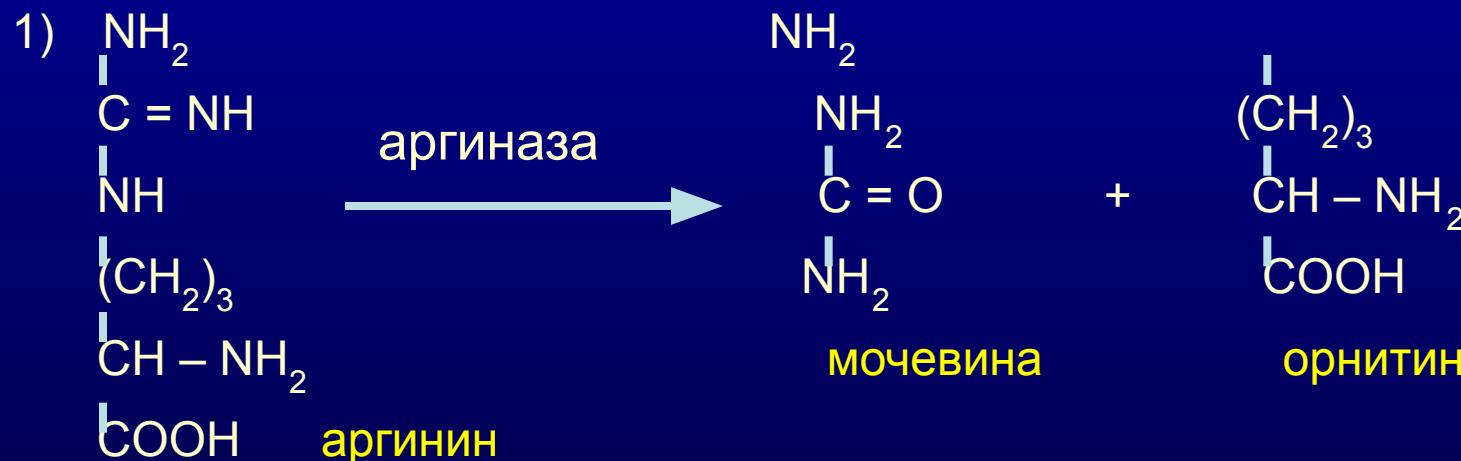
**РАССМОТРИМ ФАКТОРЫ, КОТОРЫЕ ВЛИЯЮТ НА СКОРОСТЬ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ:**

## 1) Зависимость скорости от вида субстрата.

Ферменты обладают избирательностью действия - **специфичность действия:**

1 – **Абсолютная специфичность**. - фермент превращает только 1 субстрат.

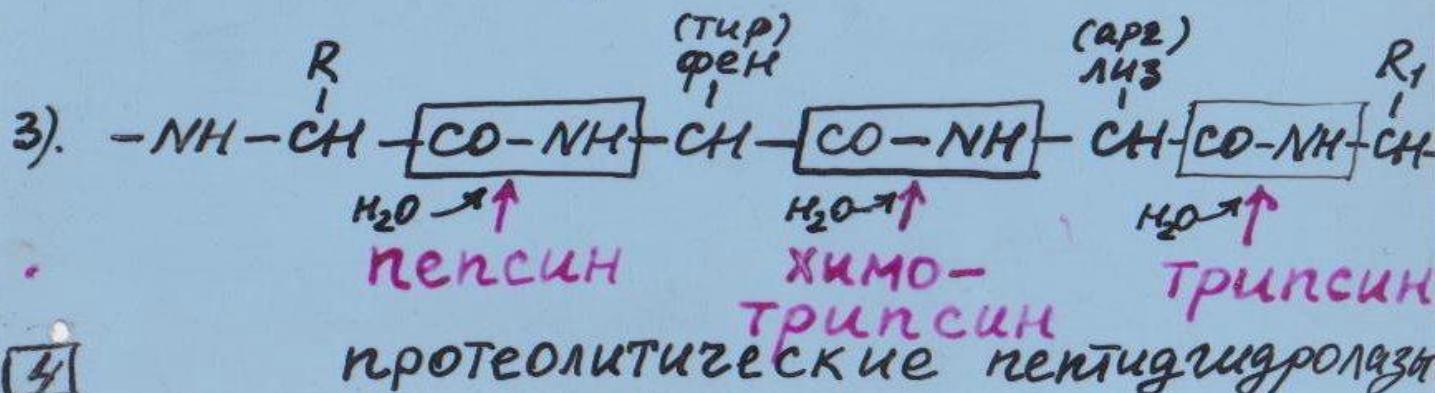
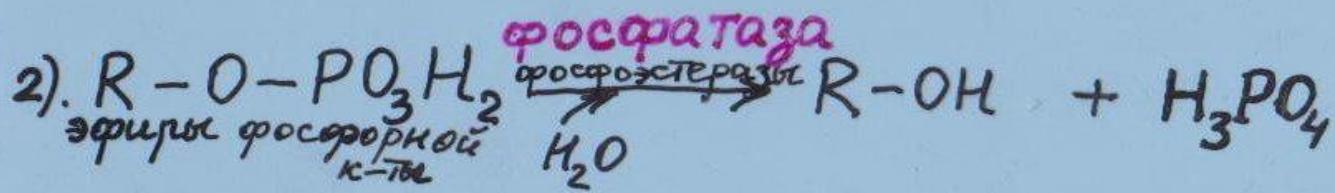
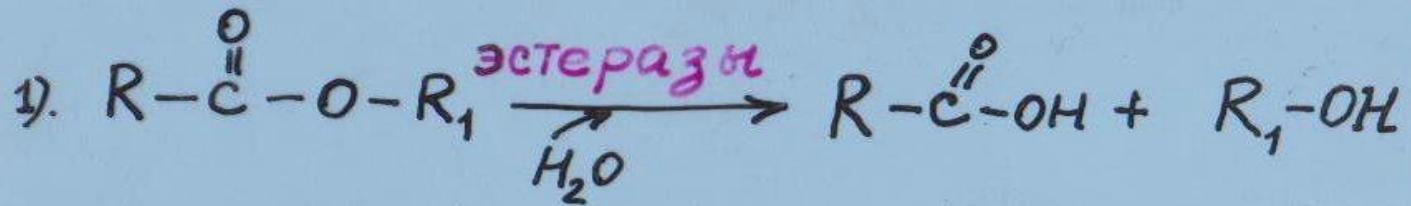
**Стереохимическая специфичность** – разновидность абсолютной. ( ЛДГ осуществляет превращение только L- лактата)



## 2 – Относительная специфичность

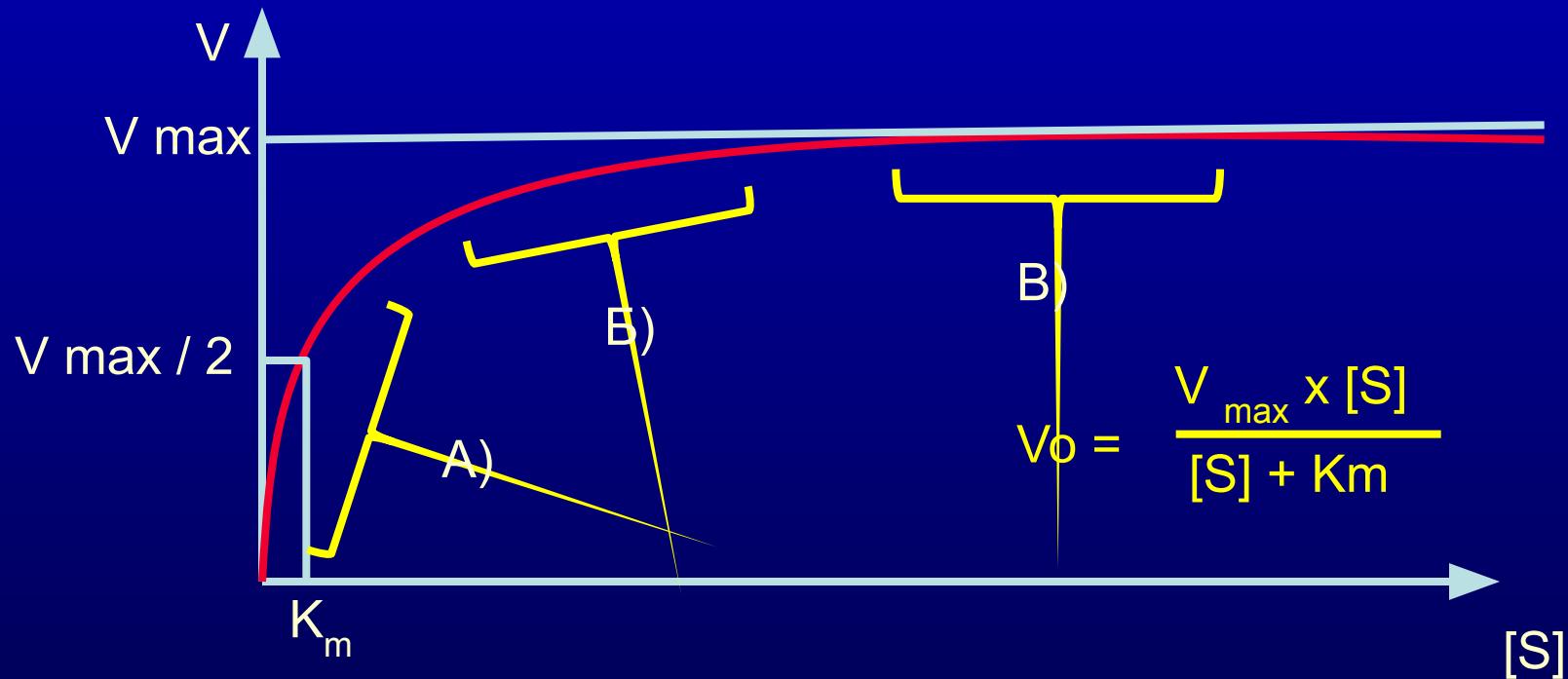
( объясняется тем, что, активный центр ферментов, обладающих относительной специфичностью не жесткая структура, он может менять свою конформацию при образование E-S комплекса, и с каждым S эта конформация своя.)

### Относительная специфичность



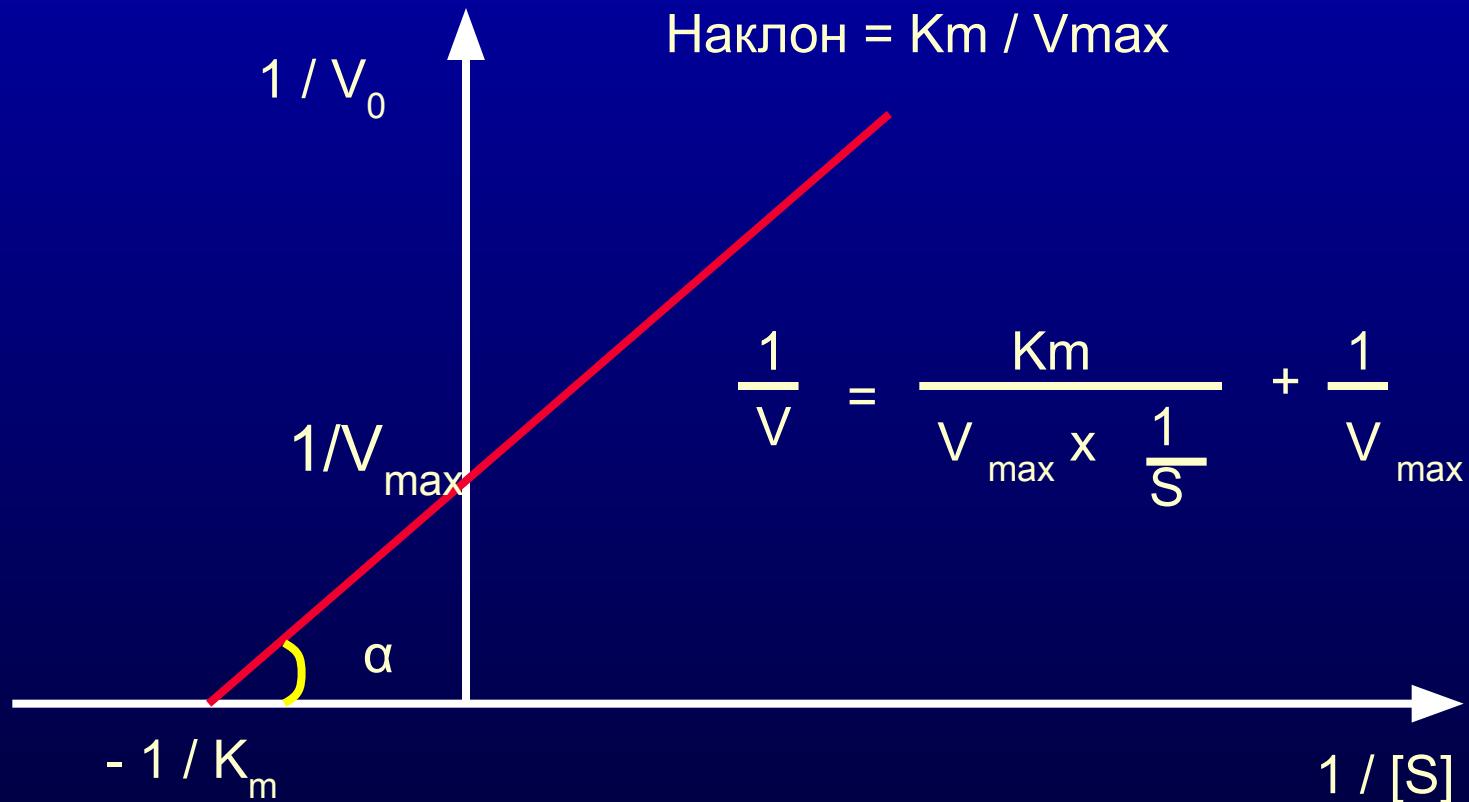
## 2) Влияние [S] на скорость реакции.

Теоретический график зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата при постоянной концентрации фермента. ( Михаэлиса – Ментен)

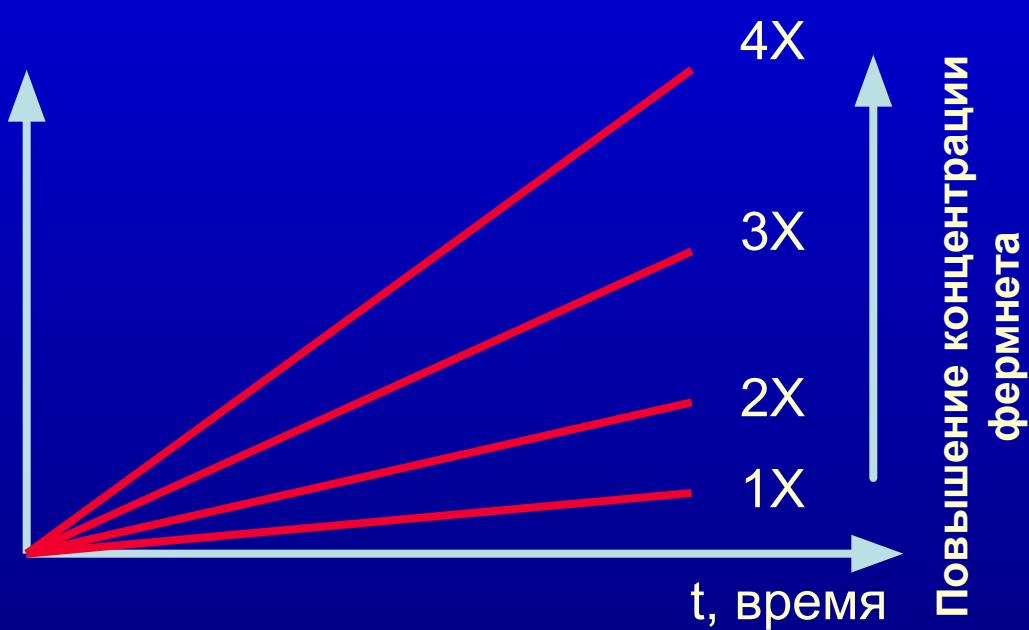


- а) – реакция первого порядка (при  $[S] < K_m$  скорость реакции пропорциональна  $[S]$ )
- б) – реакция смешанного порядка (скорость пропор. конц. реаг. в-в)
- в) – реакция нулевого порядка (высокая скорость , не зависящая от  $[S]$ ).

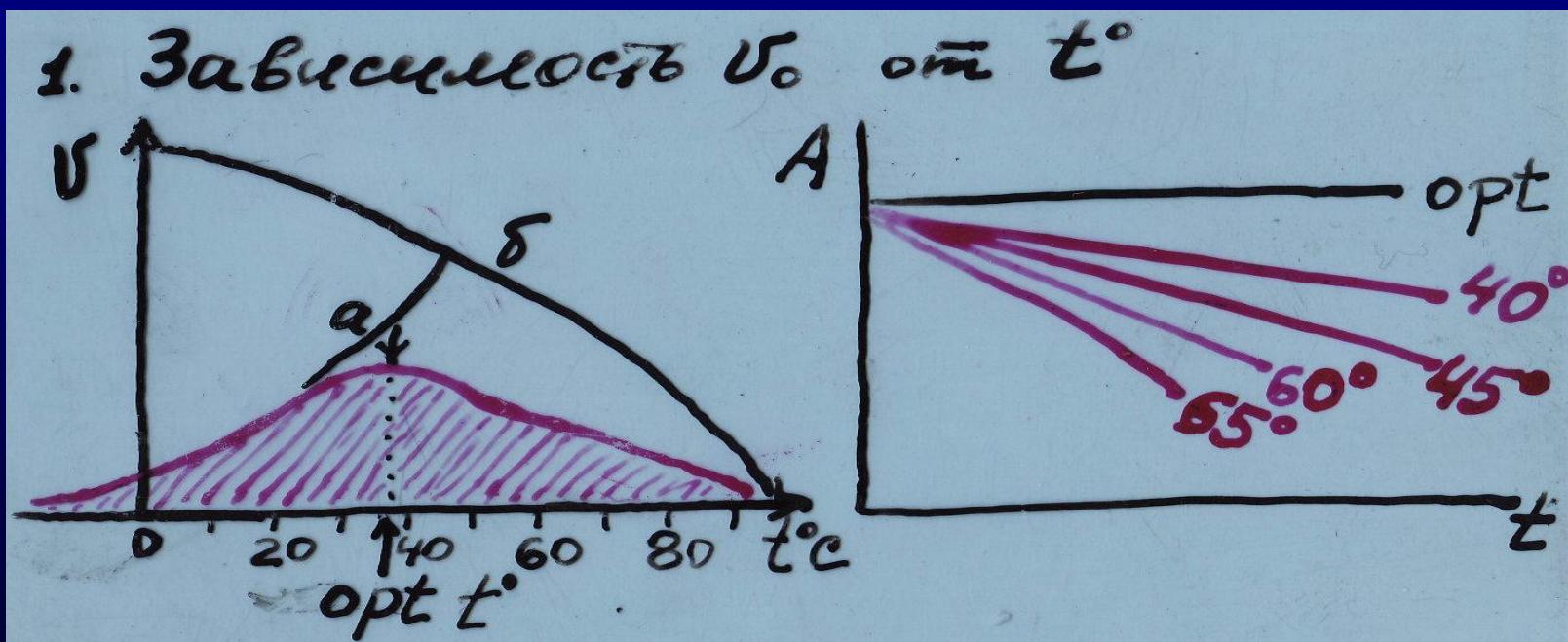
**График Лайнуивера – Берка,  
построенный по методу  
двойных обратных величин.**



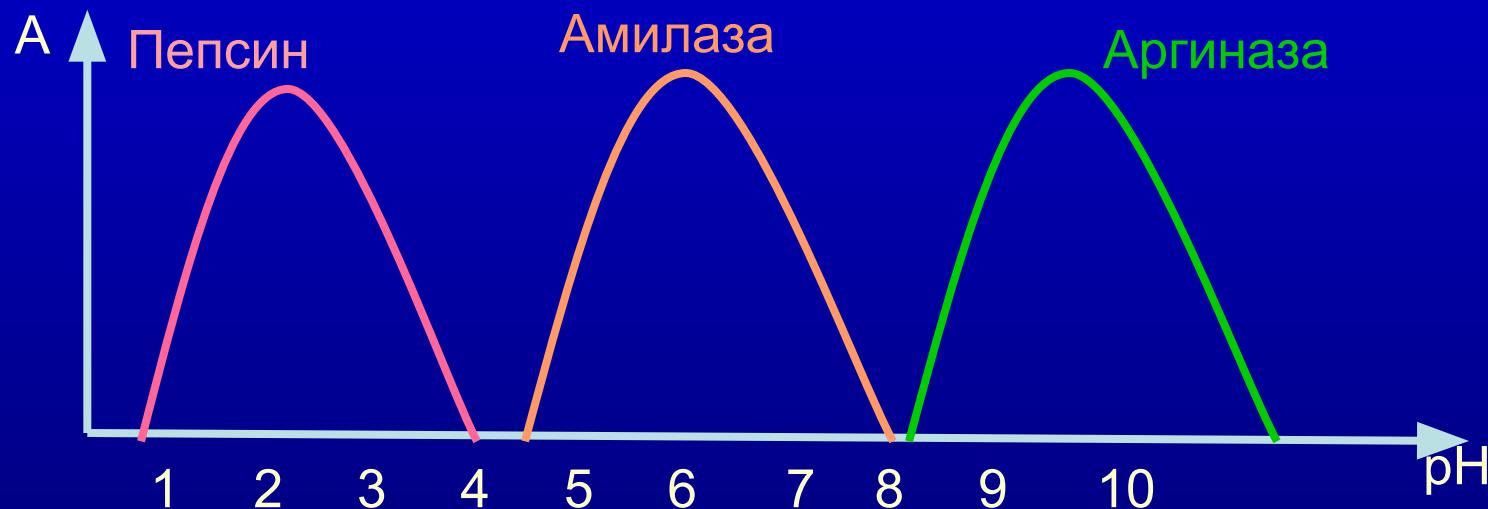
3) Зависимость  
скорости реакции от  
концентрации  
фермента.



4) Зависимость скорости реакции от температуры.

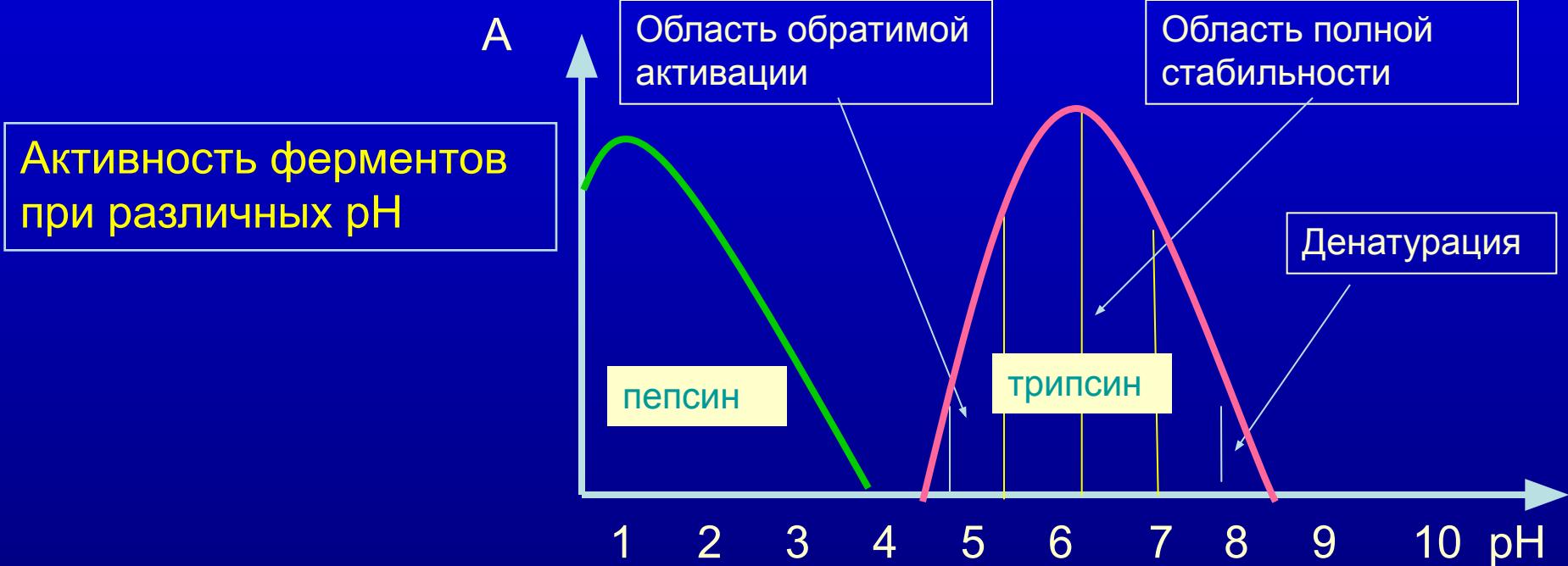


#### 4) Зависимость скорости реакции от pH среды.

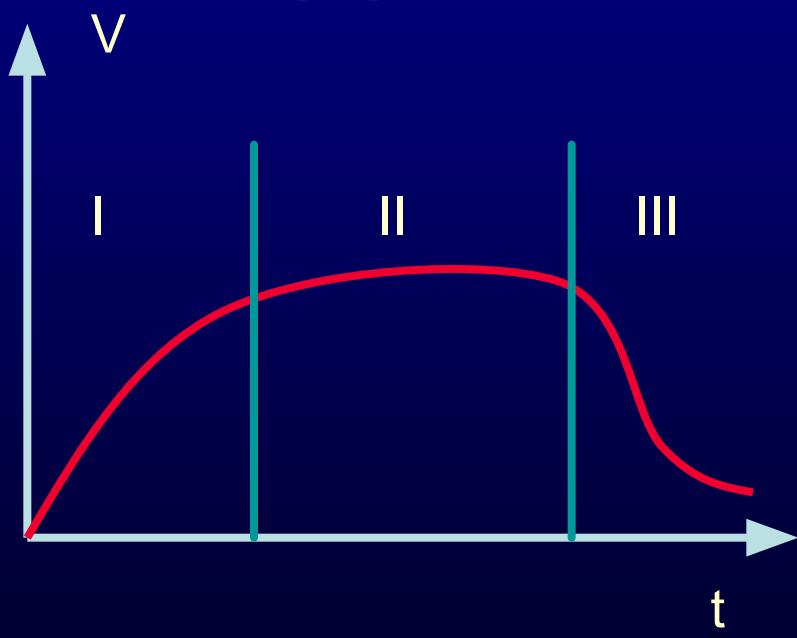


В норме pH цитозоля = 7,2

| ФЕРМЕНТ            | Opt pH    |
|--------------------|-----------|
| Пепсин             | 1,5       |
| Амилаза слюны      | 6,8 – 7,0 |
| Трипсин            | 7,7       |
| Каталаза           | 7,6       |
| Уреаза             | 7,0 – 7,2 |
| Липаза             | 7,0 – 8,5 |
| Щелочная фосфатаза | 10        |



## Ход ферментативной реакции во времени



- I – переходный участок
- II – участок начальной скорости реакции в стационарной фазе
- III – участок основного протекания реакции

# Влияние различных веществ на активность ферментов

## 1. АКТИВАТОРЫ ФЕРМЕНТОВ

### 1.1. Активация ферментов ионами металлов

Ионы  $Mg^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $K^{+}$

- Входят в состав простетической группы фермента, компонент активного центра
- Облегчают образование ES - комплекса
- Способствуют присоединению кофермента к апоферменту
- Обеспечивают становление четвертичной структуры фермента
- Действуют иными путями:
  - создание каталитически активной конформации белка
  - влияние на поверхностный заряд молекулы фермента
  - удаление ингибитора
  - вытеснение неэффективного иона из связи с ферментом

# Механизм активации ферментов металлами

1. В состав активного центра:



Zn:



2. Присоединение к субстрату:

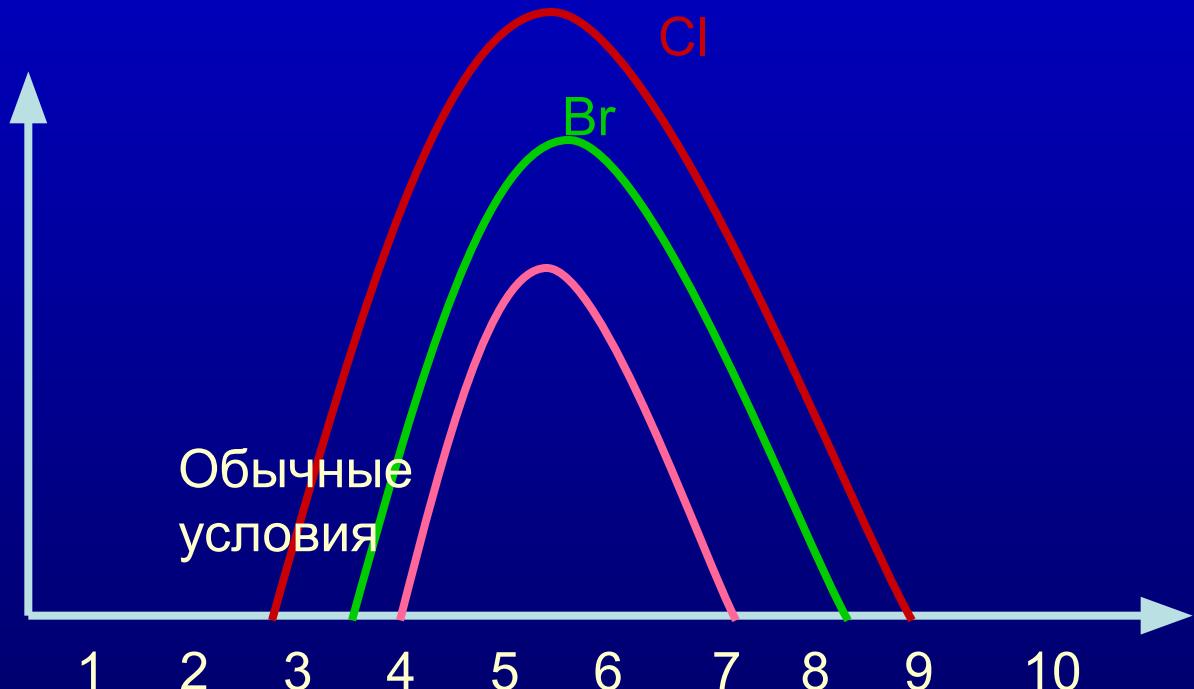


**Комплекс металл - субстрат**



# Регуляция ферментов анионами

Активность амилазы в  
присутствии различных  
ионов

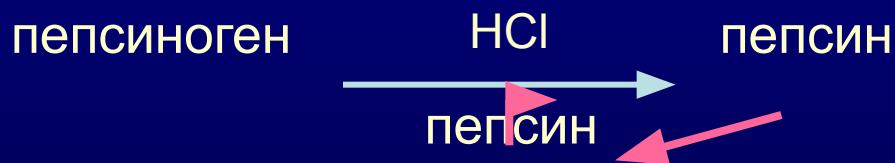


# Активация ферментов

- 1) Ионами металлов
- 2) Восстановленными соединениями



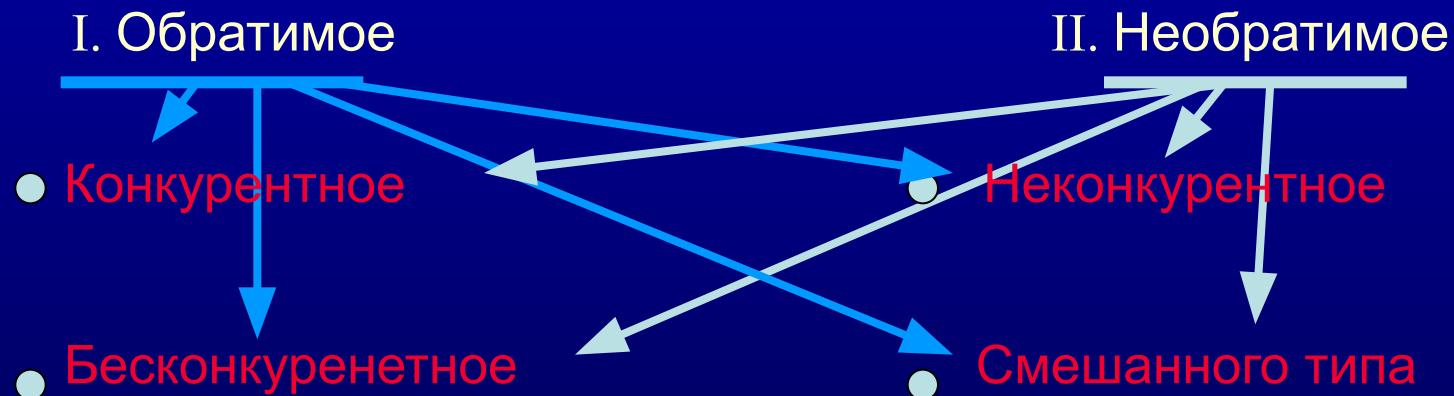
- 3) Частичный протеолиз



- 4) Аллостерическими активаторами ( АДФ, АМФ)
- 5) Гормонами через посредников: цАМФ, цГМФ

# Реакции ингибиования ферментативных процессов.

## ТИПЫ ИНГИБИРОВАНИЯ ФЕРМЕНТОВ

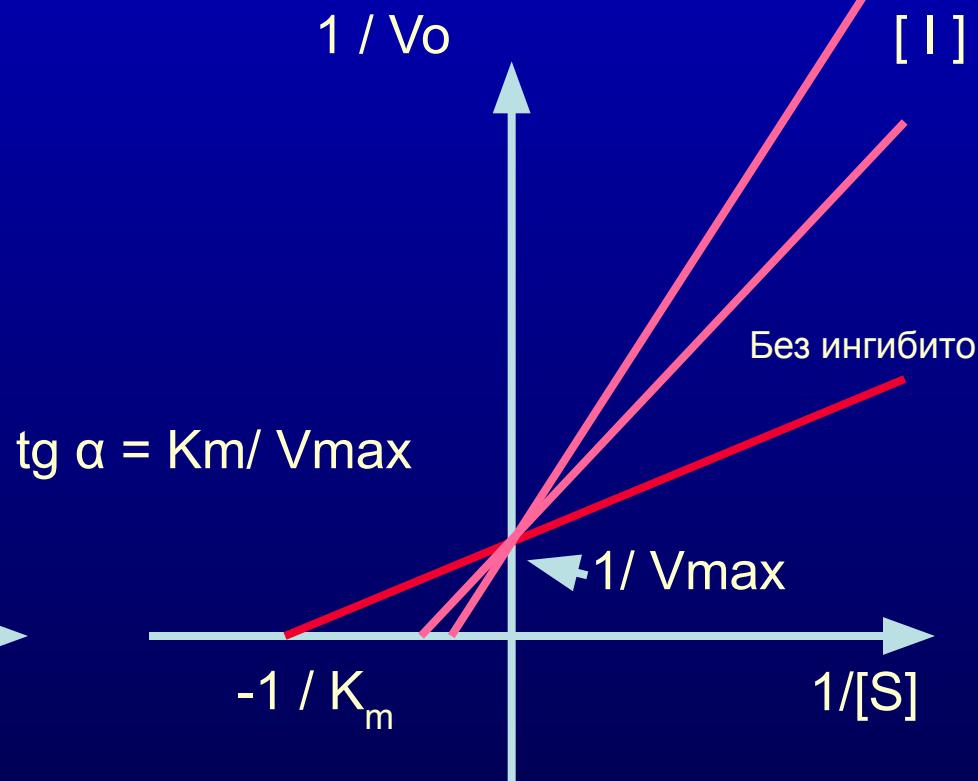
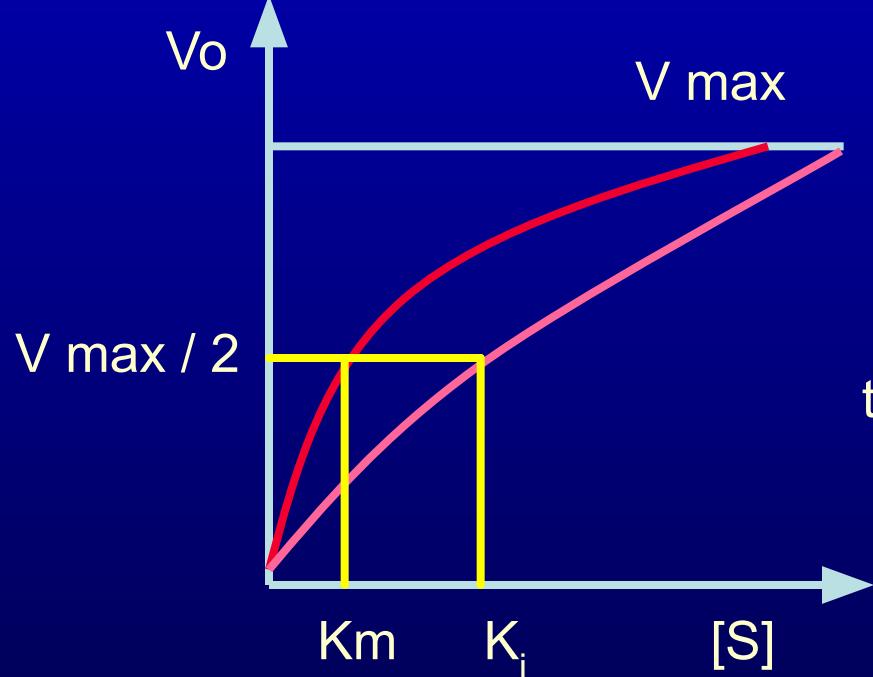


Для определения обратимости ингибиования проводят диализ среды, где есть фермент и ингибитор.

Если после диализа восстанавливается активность фермента, то торможение - **обратимое**.

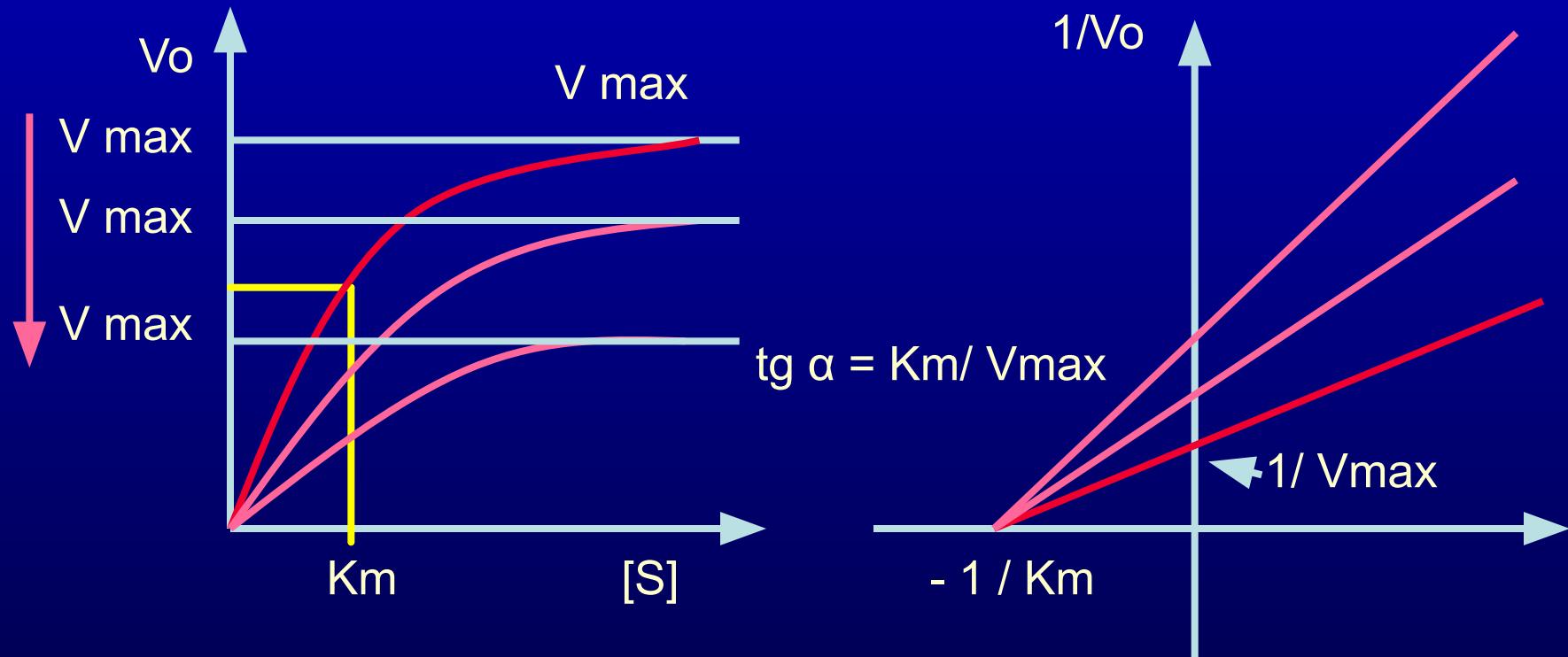
# 1. Конкурентный тип ингибитирования

Осуществляется веществом, близким по химическому строению к субстрату.



## 2. Неконкурентное торможение

Ингибитор реагирует с ферментом иным образом , чем субстрат, и поэтому повышение концентрации субстрата не может вытеснить ингибитор и восстановить активность фермента



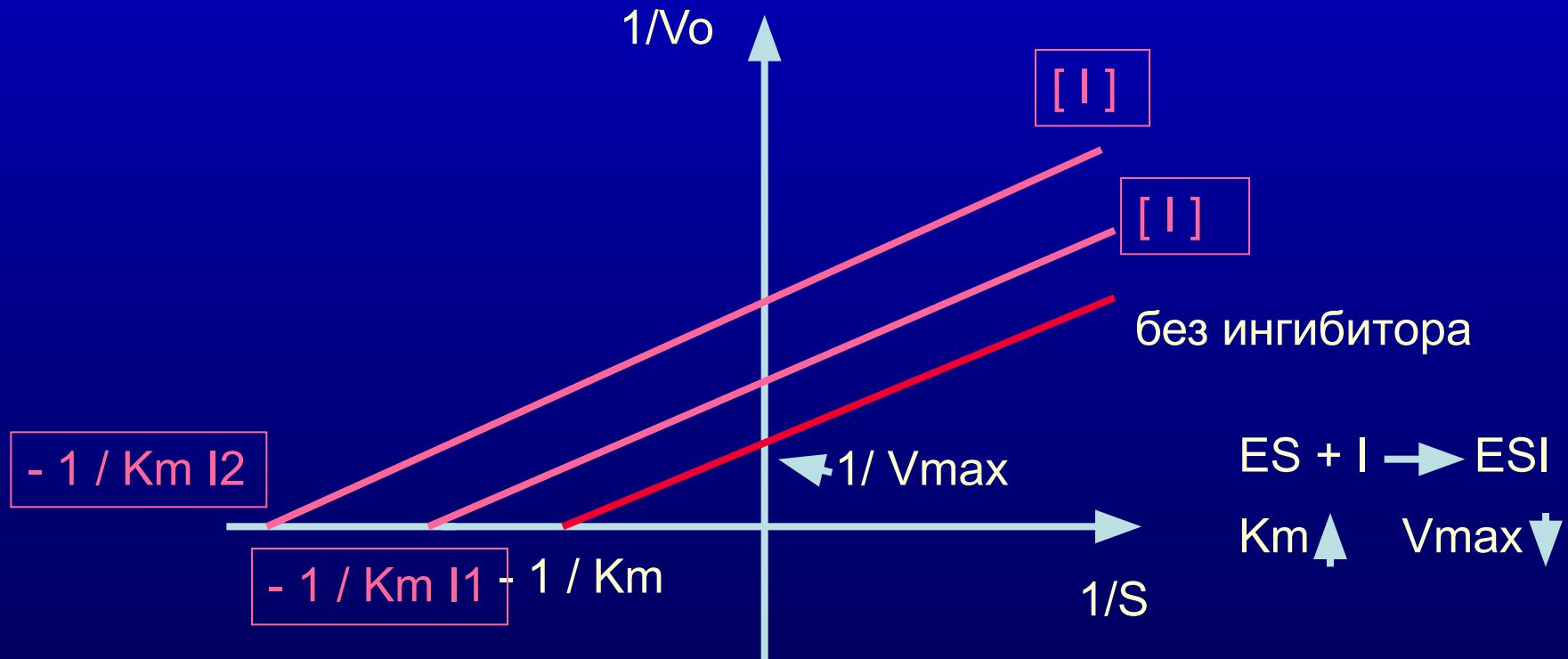
$$V_{max}$$

$$K_m = \text{const}$$



### 3. Бесконкурентное торможение

Ингибитор взаимодействует с фермент – субстратным комплексом.



### 4. Смешанный тип торможения

Ингибитор взаимодействует с ферментом в различных участках молекулы.

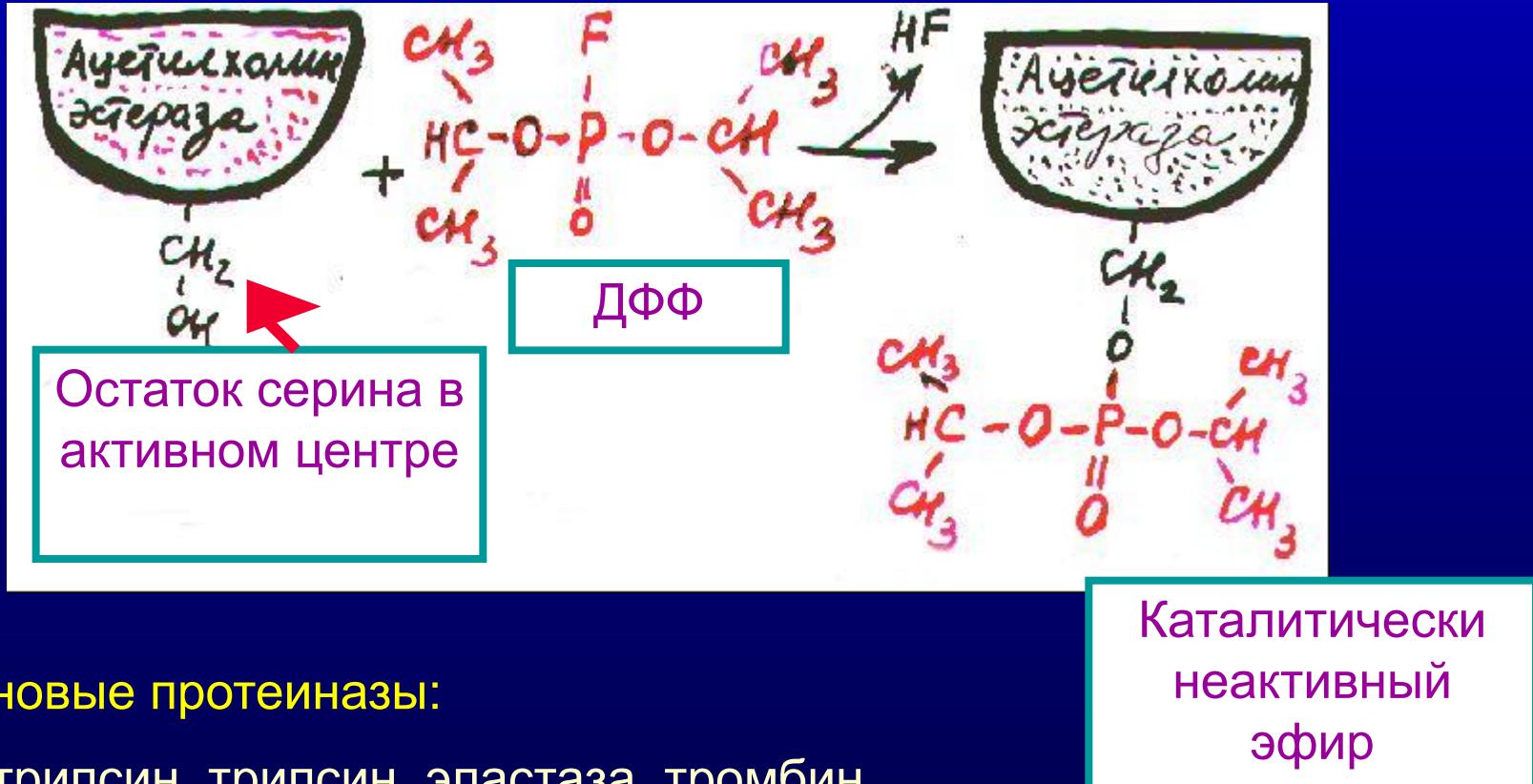
## Ингибиторы взаимодействуют с ферментами различными путями, они могут:

- Блокировать активный центр фермента
- Менять четвертичную структуру фермента
- Блокировать часть фермента, соединяющуюся с коферментом, активатором
- Нарушать взаимодействие фермента с субстратом
- Соединяться с коферментом, активатором
- Вызывать денатурацию фермента (неспецифические ингибиторы)
- Связываться с аллостерическим центром

## Классификация ингибиторов



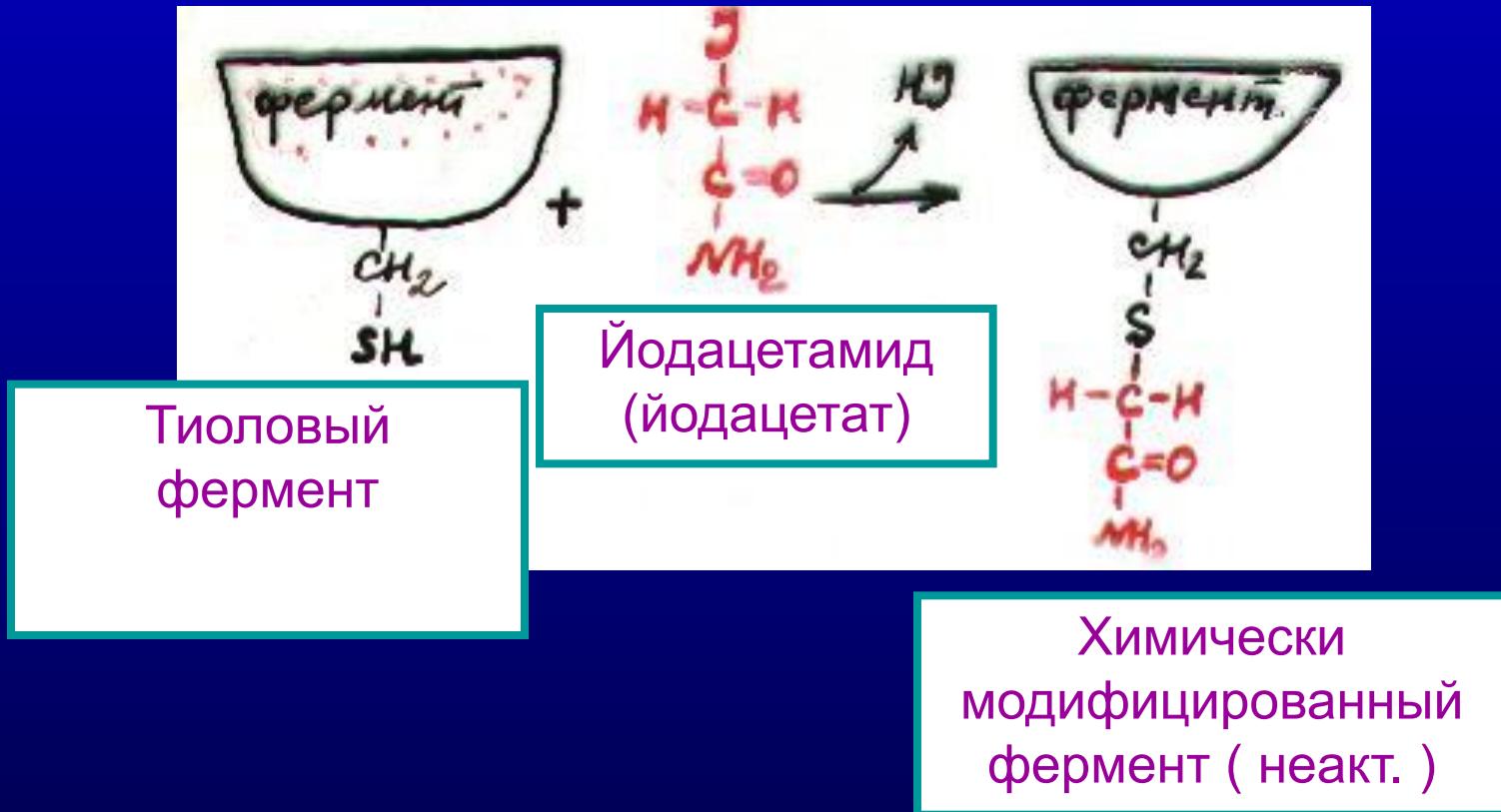
# Ингибиция сериновых гидролаз (АХЭ) дизопропилфторфосфатом (ДФФ)



Сериновые протеиназы:

Химотрипсин, трипсин, эластаза, тромбин,  
субтилизин

# Необратимое ингибиование



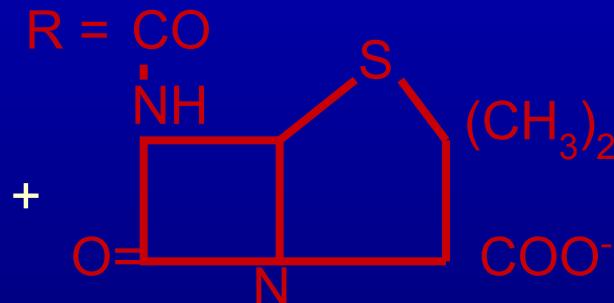
# Необратимое ингибиование

Трансцилаза – один из ферментов, участвующих в биосинтезе клеточной стенки бактерий.



Трансцилаза  
(активен)

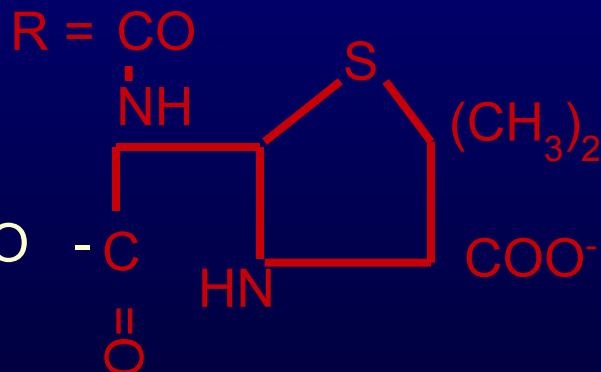
Пенициллиноил –  
ферментный  
комплекс  
(неактивен)



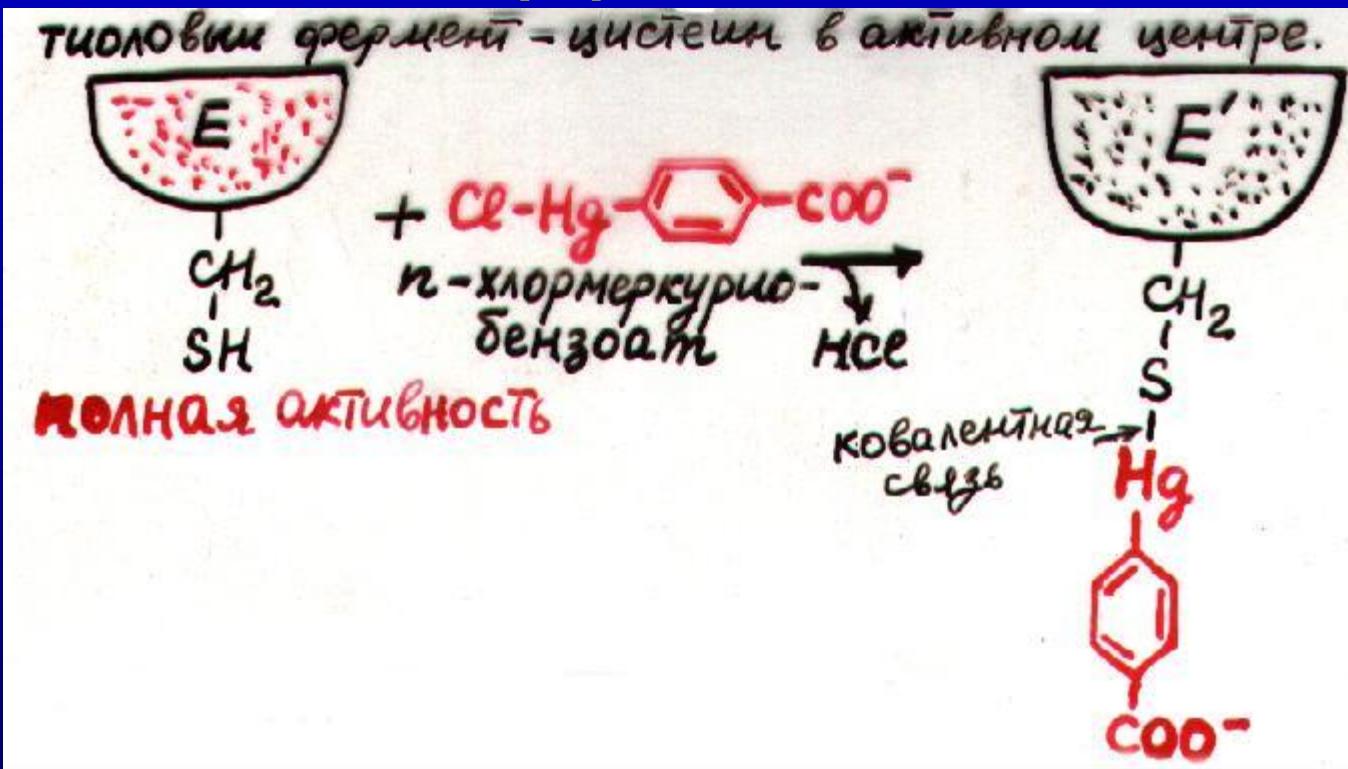
Пенициллин



Необратимое  
ингибиование



# Необратимое ингибиование тиоловых ферментов

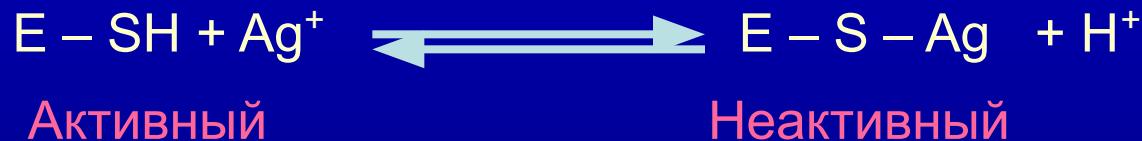


- ТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ Hg<sup>++</sup> Pb<sup>++</sup>, соединений мышьяка объясняется образованием ковалентной связи фермента с ингибитором -> необратимое изменение конформации

Химически  
модифицированный  
фермент (неакт.)

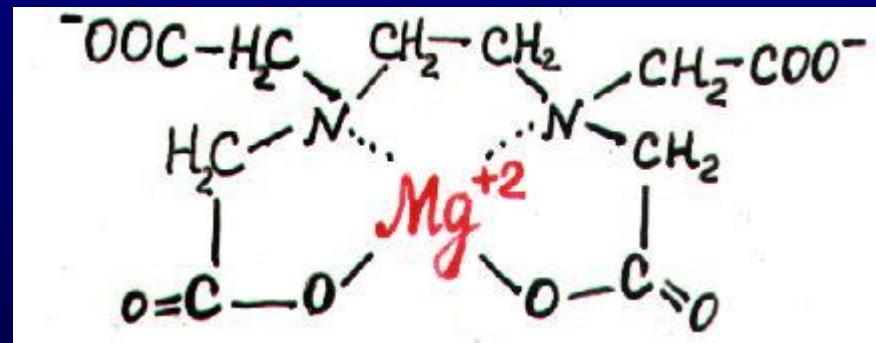
# Неконкурентное ингибиование

- ## 1. SH –групп ионами тяжелых металлов ( $\text{Cu}^{++}$ , $\text{Hg}^{++}$ , $\text{Ag}^{++}$ , $\text{As}^{++}$ , $\text{Pb}^{++}$ )



2. Агентами, связывающими  $\text{Mg}^{++}$ , которые необходимы для активации фермента.

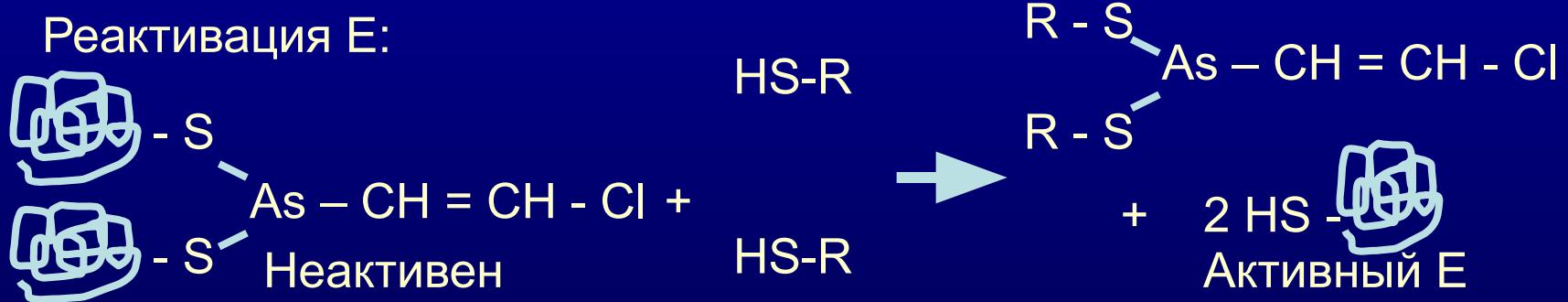
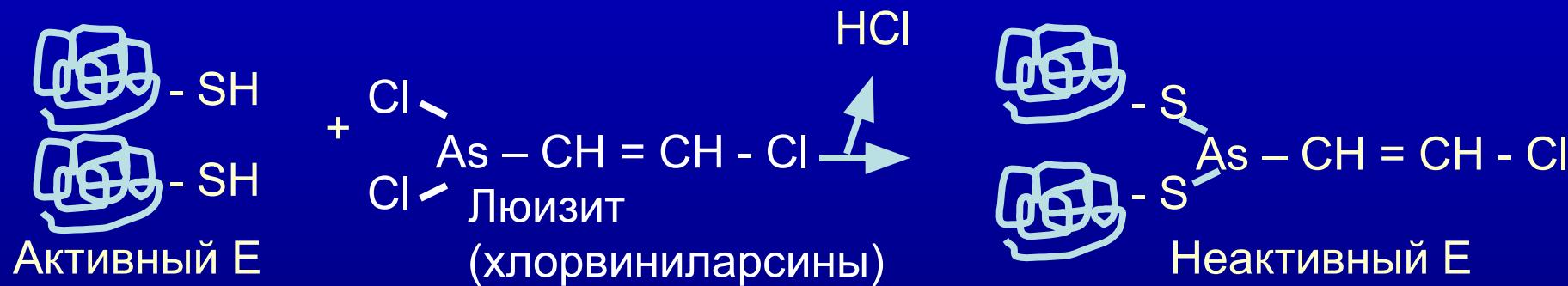
- цианиды образуют комплексы с  $\text{Fe}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{+++}$
  - ЭДТА с  $\text{Mn}^{++}$  -> ингибирование ферментов



- тетрациклины связывают ионы Менгера

3. Синильная кислота, СО сязывают  $\text{Fe}^{++}$  в цитохромоксидазе

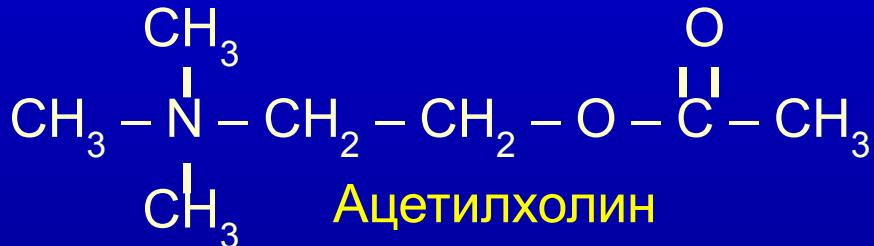
# Неконкурентное ингибирование монотиоловых ферментов



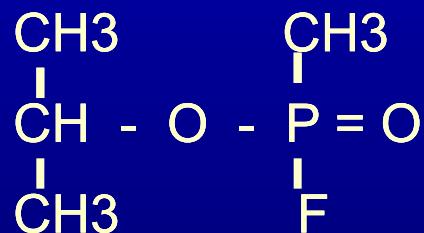
# Конкурентное ингибирирование



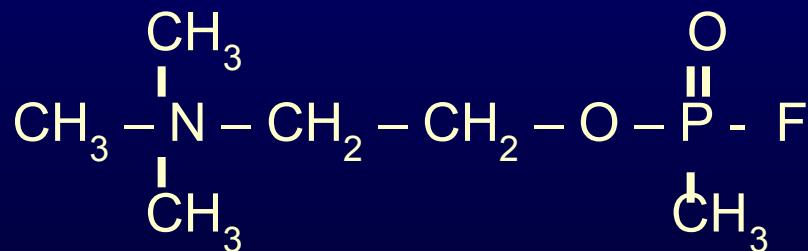
## Структуры основных ингибиторов АхЭ



Ингибиторы обратимого типа



Зарин ( образует продукт фосфорилирования АхЭ)

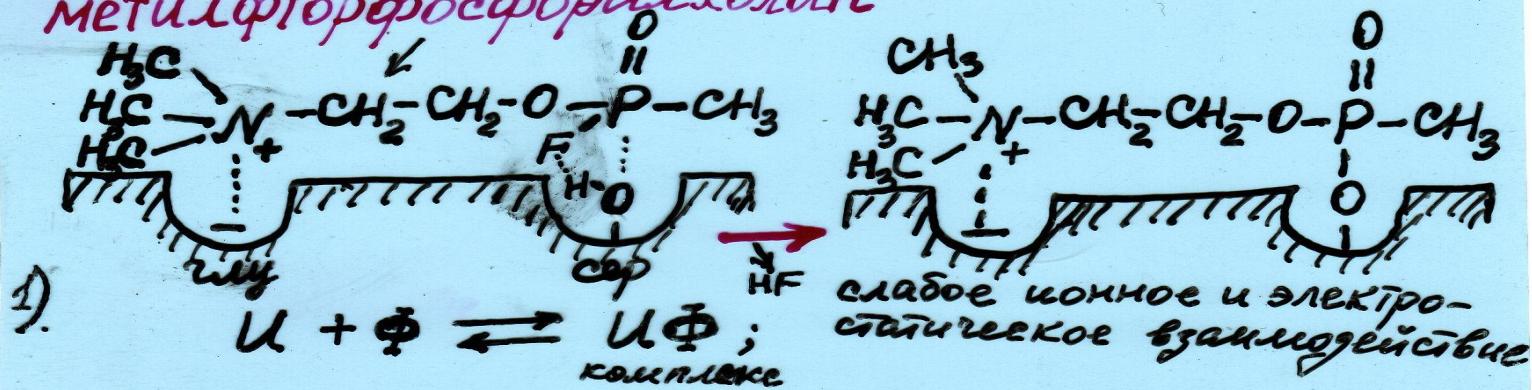


Метилфторfosфорилхолин ( исключительно сильное антиХЭ действие)

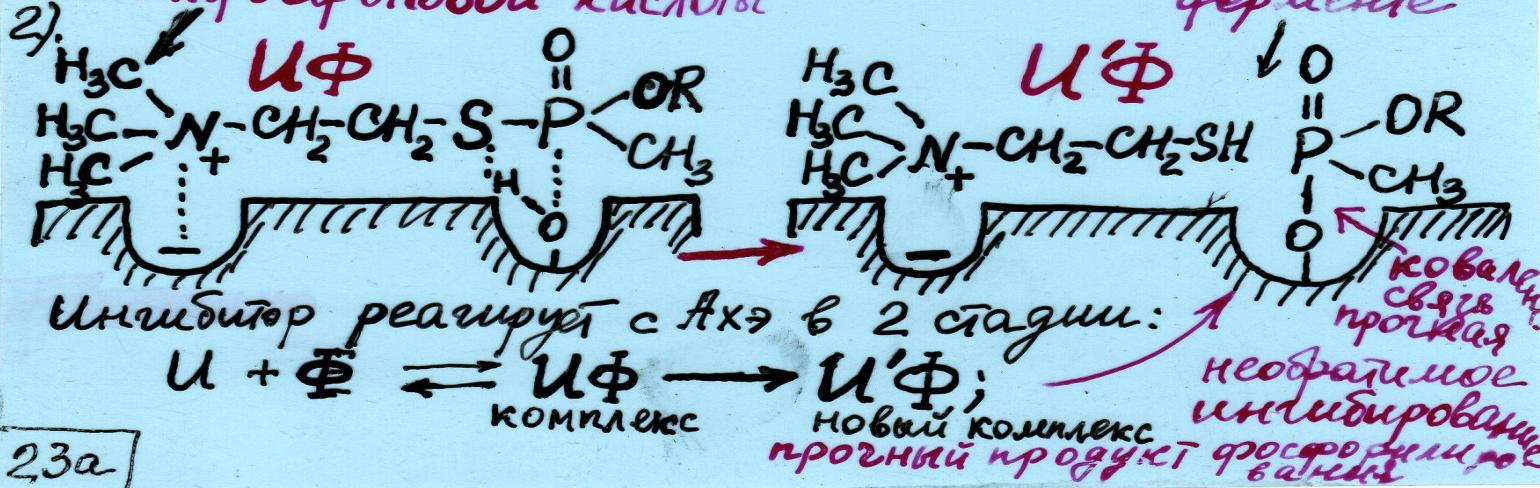
# Инактивация АХЭ

Взаимодействие фосфорилхолинов с Ахэ.

метилфторфосфорилхолин

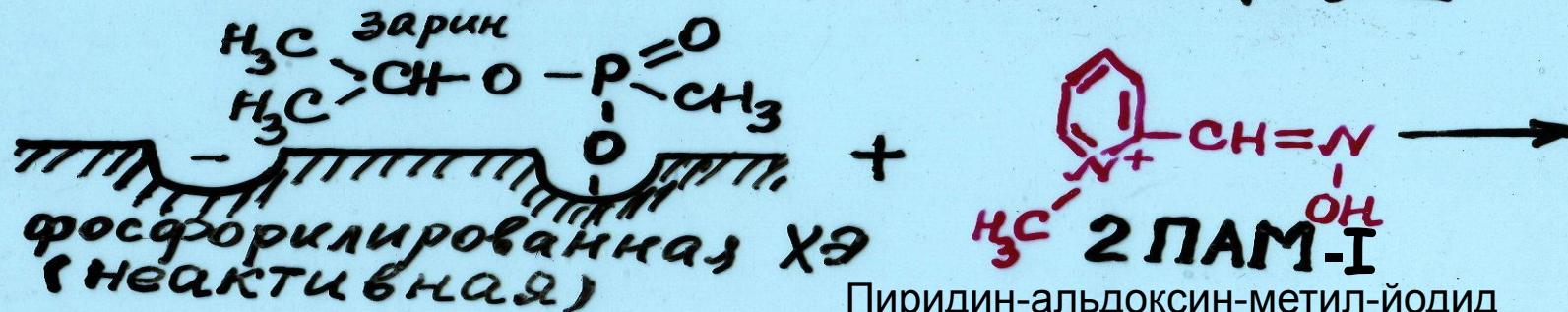


тиохалиновое производное  
метилфосфоновой кислоты

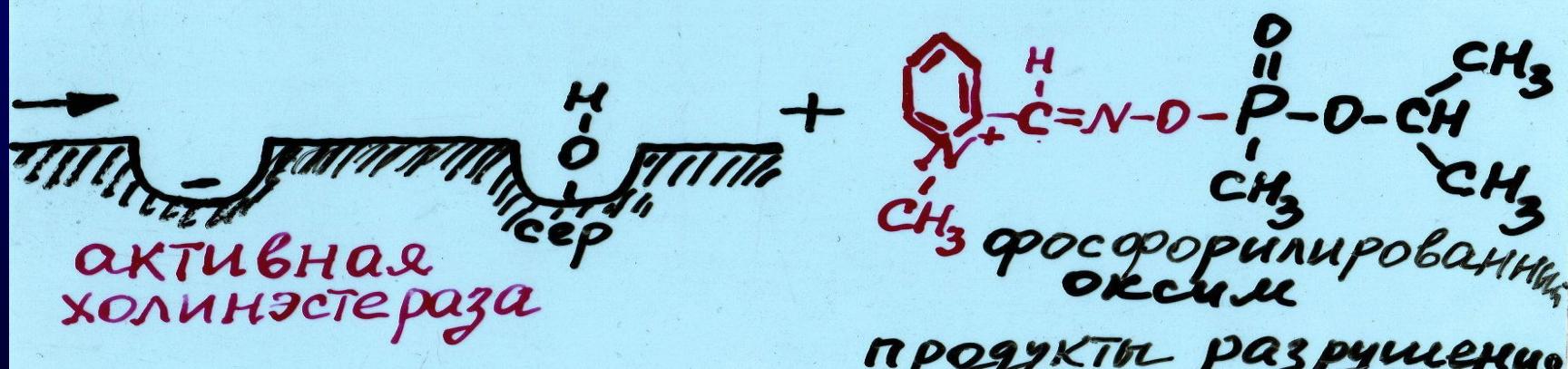
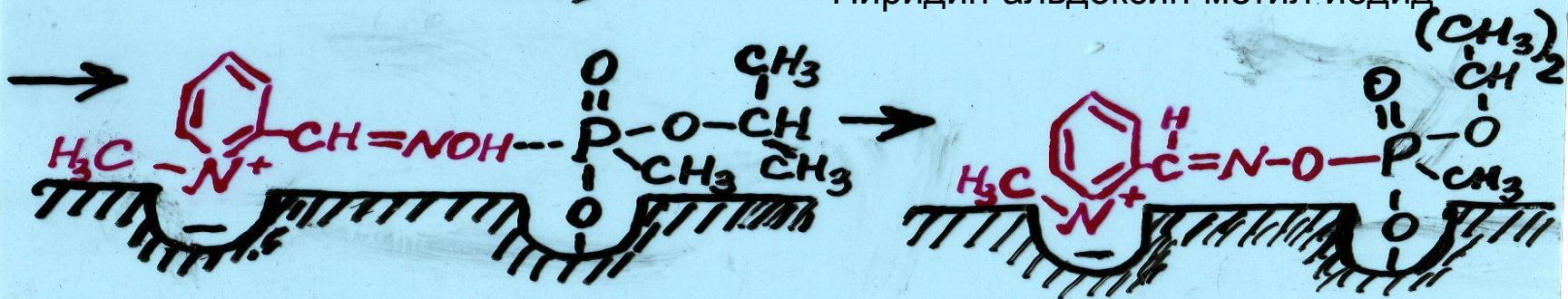


# Реактивация АХЭ

## Реактивация холинэстеразы

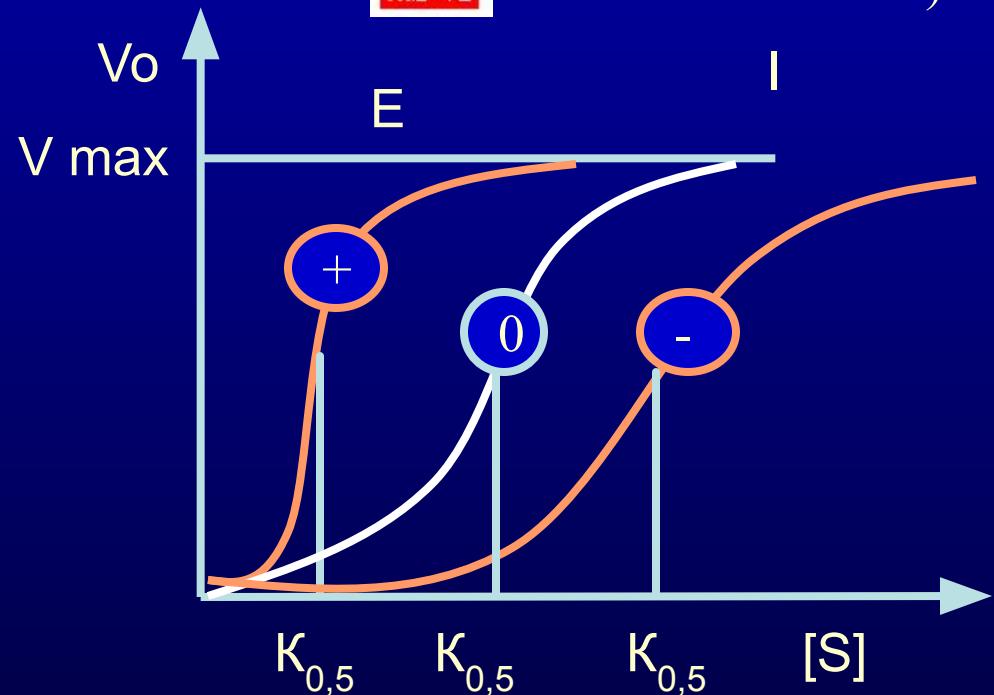
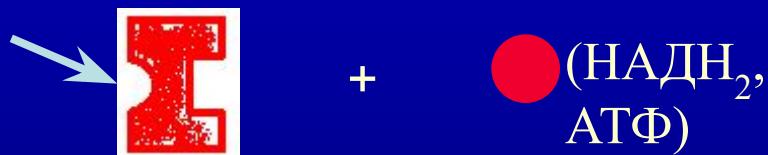


Пиридин-альдоксин-метил-йодид

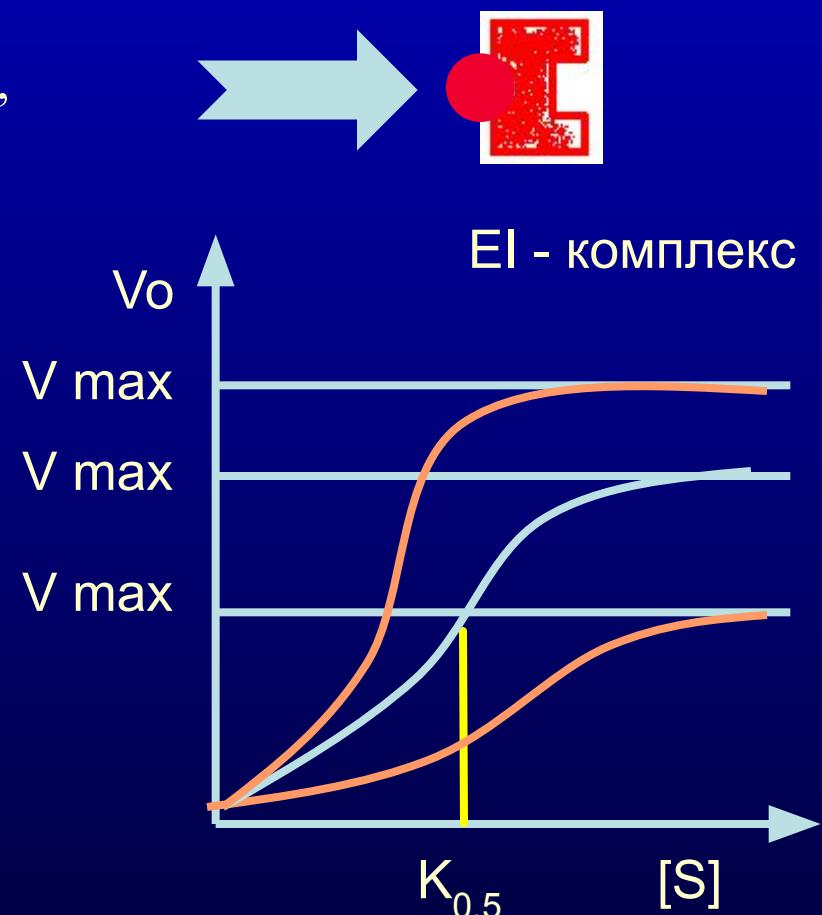


# Аллостерическое ингибиование

Аллостерический центр

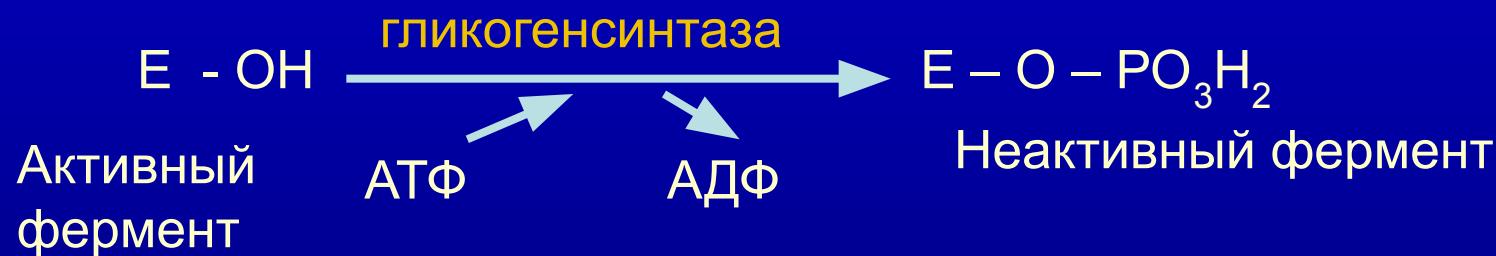


$K_{0,5}$  возрастает под действием отрицательного кодулятора



$V_{max}$  изменяется, а  $K_{0,5}$  почти const

## Фосфатная модификация ферментов



# Ингибиование фермента путем ацетатной модификации

PES - NH<sub>2</sub> + Простагландин-эндопироксид-синтаза (ее циклогеназный компонент)



Блокирование синтеза простагландинов – медиаторов воспаления

Индометацин ингибитирует PES иным путем – не путем ковалентной модификации фермента

Спасибо за внимание