Ферменты
(Энзимы)

Ферменты ***(от лат. fermentum - закваска)*****, или энзимы** ***(от греч. en - внутри, zym - закваска)*** **– биокатализаторы белковой природы.**

Являясь веществами белковой природы, ферменты обладают всеми свойствами белков.

Используются живыми организмами для катализа многих тысяч взаимосвязанных химических реакций, включая синтез, распад и взаимопревращение веществ и др.

Наука о ферментах называется энзимологией.

Отличие ферментов от небиологических катализаторов

1. Высокая эффективность действия (скорость ферментативных реакций в 10^6-10^{12} раз выше, чем соответствующих неферментативных реакций).

2. Высокая специфичность действия (фермент катализирует превращение одного конкретного субстрата, либо схожей группы субстратов).

3. Мягкие условия протекания ферментативных реакций (t ~ 37 °C, нормальное атмосферное давление, pH, близкий к нейтральному).

4. Способность к регуляции.

Подобно всем белкам ферменты избирательно присоединяют определенные вещества – лиганды .

Лиганд, присоединяющийся к ферменту и подвергающийся химическим превращениям, называется субстратом.

Вещества, образовавшиеся из субстрата под действием фермента называются продуктами реакции.

Активный центр фермента:

1. **Участок молекулы фермента, сформированный на уровне третичной структуры, ответственный за связывание с субстратом по принципу комплементарности и участвующий в катализе.**
2. **Расположен в узком гидрофобном углублении (щели) поверхности молекулы фермента.**
3. **Активный центр фермента в отличие от активного центра белка имеет 2 участка:**

   1) Субстратсвязывающий участок (якорный);

   2) Каталитический участок.
4. **В активный центр фермента часто входит участок или домен для связывания кофактора.**

Апофермент + Кофактор $\rightleftharpoons$ Холофермент

Кофактор, в свою очередь, называться может коферментом (НАД+, НАДФ+, ФМН, ФАД, биотин) или простетической группой (гем, ионы металлов Fe^{2+}, Mg^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, олигосахариды).

Деление на коферменты и простетические группы не всегда однозначно:
- если связь кофактора с белком прочная, то в этом случае говорят о наличии простетической группы,
- если в качестве кофактора выступает производное витамина – то его называют коферментом, независимо от прочности связи.

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

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

Апоферменты синтезируются в организме, **термолабильны** и определяют **специфичность** ферментов.

Кофактор термостабилен, не всегда может образоваться в организме и поэтому должен поступать с пищей. Многие коферменты являются производными **водорастворимых витаминов.**

Кофактор входит в состав активного центра, участвует в связывании субстрата или в его превращении.

Схема строения ферментов

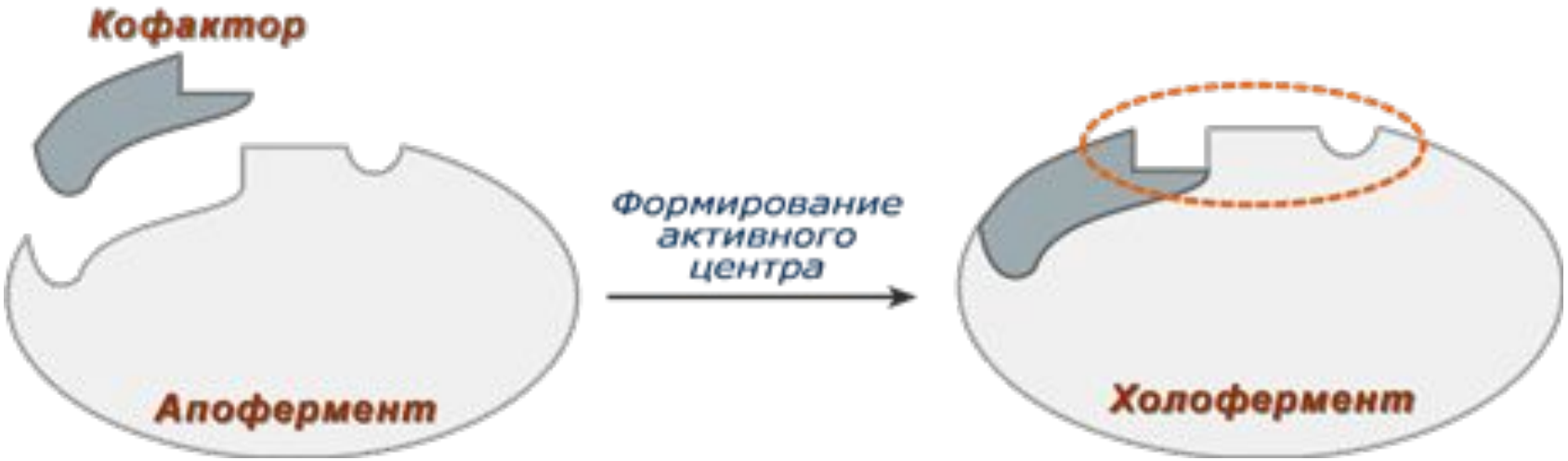


Схема формирования сложного фермента

Механизм действия ферментов

В химическую реакцию могут вступить лишь те молекулы, которые имеют определенный запас энергии.

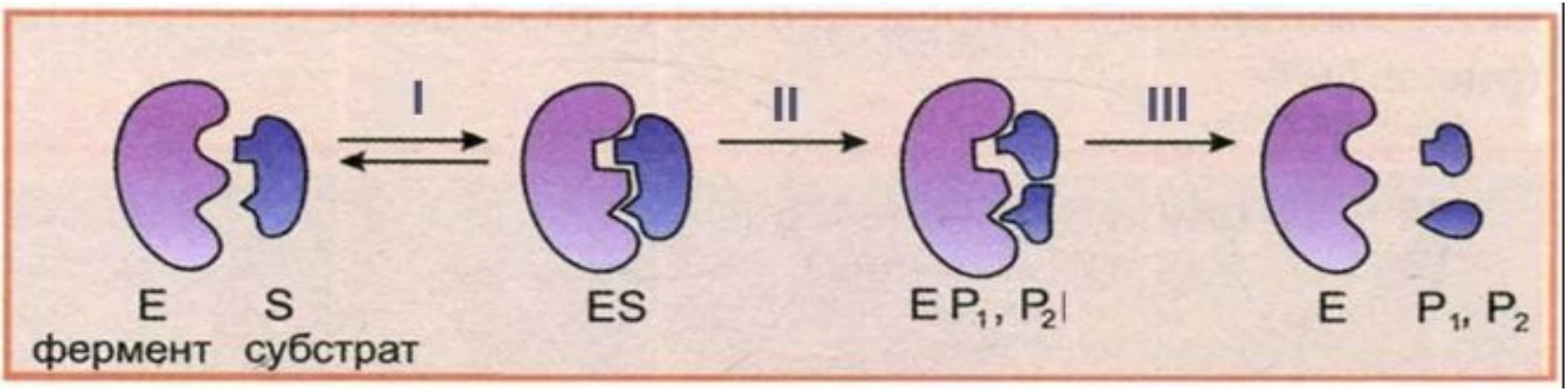
Уровень энергии молекул, необходимый для протекания данной химической реакции, называется энергетическим барьером.

Та избыточная энергия, которая необходима для перевода всех молекул одного моля вещества в активированное состояние для достижения или превышения энергетического барьера при обычной температуре, называется энергией активации.

При участии фермента реакция идет в обход энергетического барьера. Это обусловлено тем, что в ходе реакции фермент вступает во взаимодействие с субстратом с образованием **фермент-субстратного комплекса** (промежуточное соединение).

При этом происходит изменение конформации субстрата, создается напряжение ковалентных связей, в результате чего энергии, необходимой для их разрыва, потребуется значительно меньше, т.е. реакция с высокой энергией активации заменяется реакцией с низкой её величиной **(снижается энергия активации).**

Этапы ферментативного катализа



I – образование фермент-субстратного комплекса:
На этом этапе: а) субстрат приближается к активному центру фермента; б) происходит взаимное изменение конформации E и S, возникает строгая комплементарность между S и активным центром E (индуцированное соответствие).

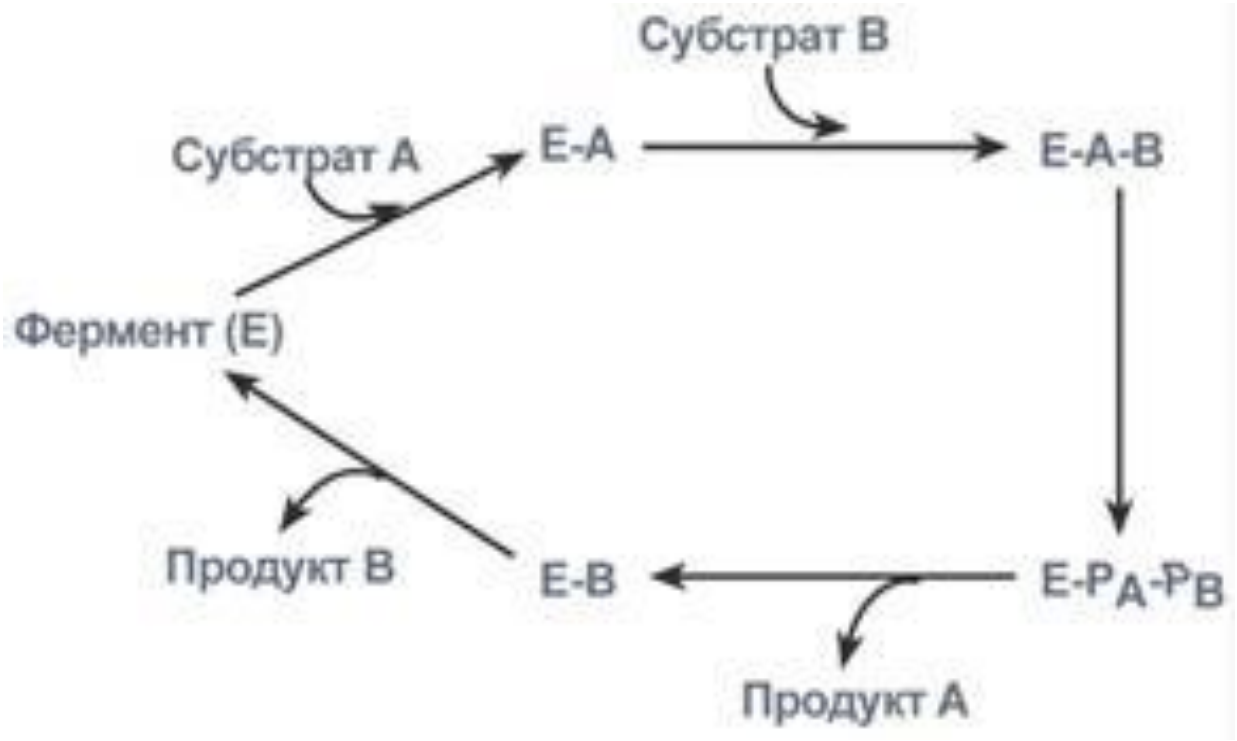
II. Дестабилизация связей в молекуле субстрата.

III. Образование продуктов реакции и выход их из области активного центра фермента.

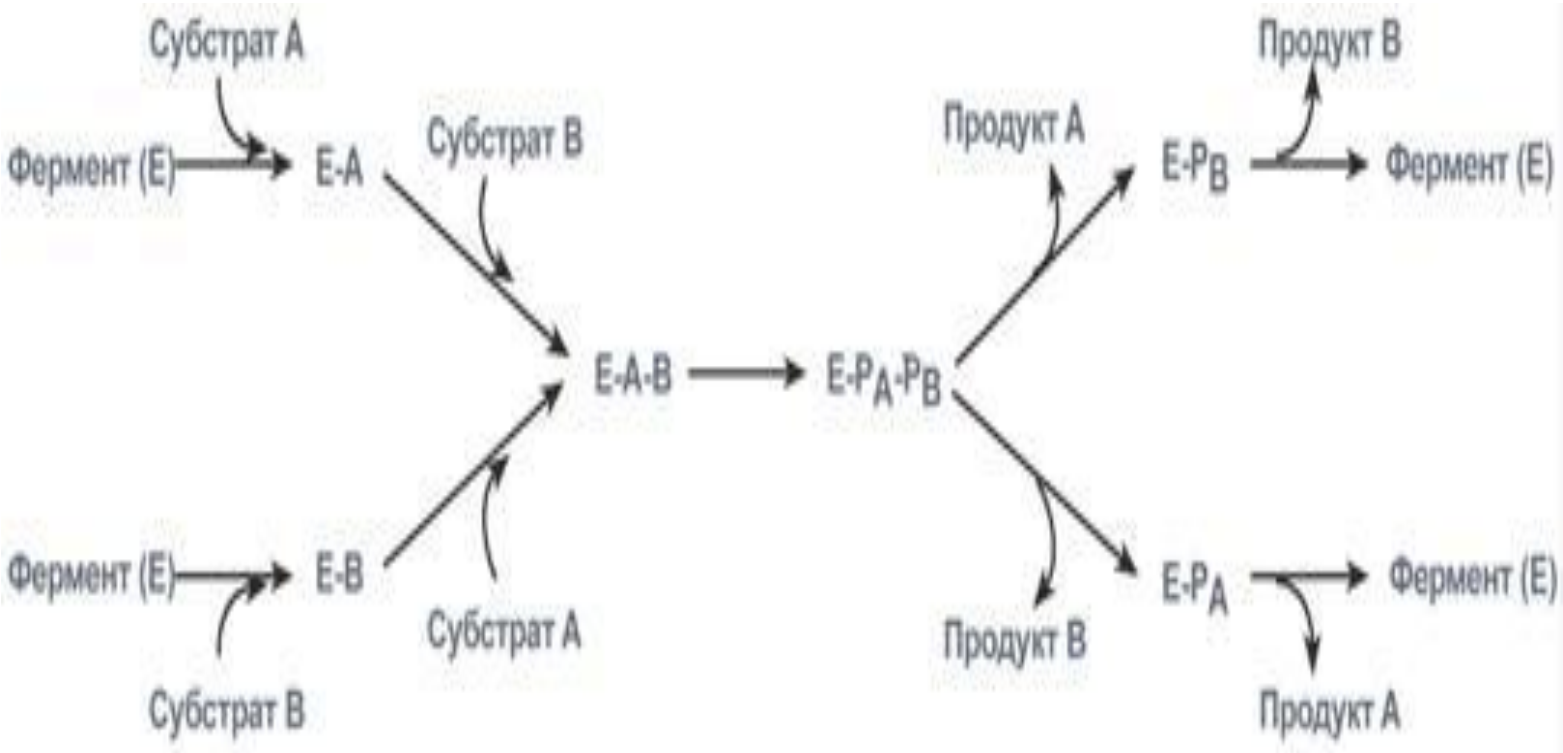
Типы ферментативных реакций

1. Тип "пинг-понг" – фермент сначала взаимодействует с субстратом А, отбирая у него какие либо химические группы и превращая в соответствующий продукт. Затем к ферменту присоединяется субстрат В, получающий эти химические группы. Примером являются реакции переноса аминогрупп от аминокислот на кетокислоты - трансаминирование.

2. Тип последовательных реакций – к ферменту последовательно присоединяются субстраты А и В, образуя "тройной комплекс", после чего осуществляется катализ. Продукты реакции также последовательно отщепляются от фермента.



3. Тип случайных взаимодействий – субстраты А и В присоединяются к ферменту в любом порядке, неупорядоченно, и после катализа так же отщепляются.



•Активный центр фермента

Участок связывания

Обеспечивает субстратную специфичность (выбор субстрата)

Абсолютная специфичность

Групповая специфичность

Стереоспецифичность

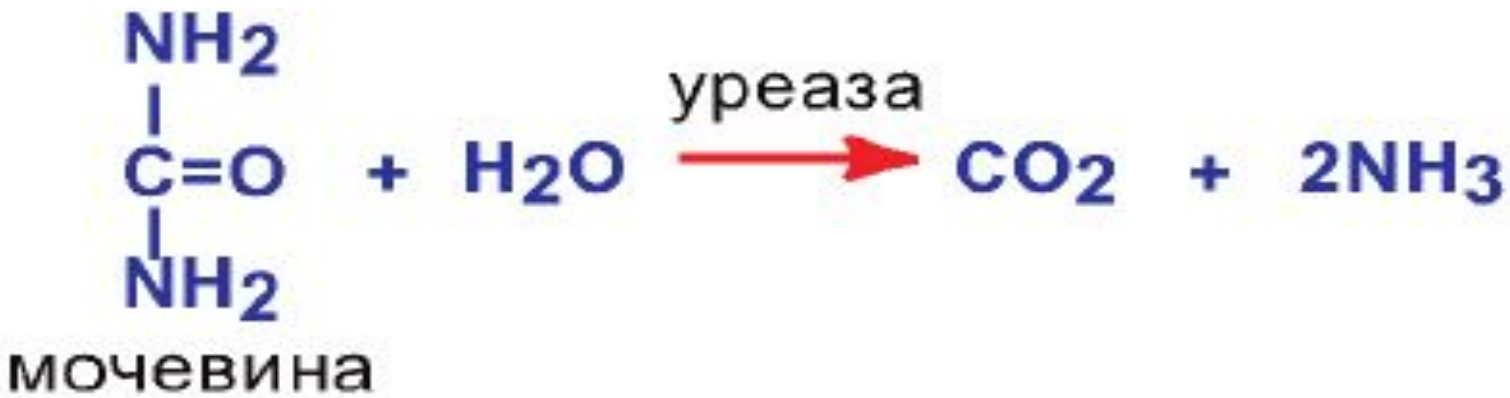
Каталитический участок

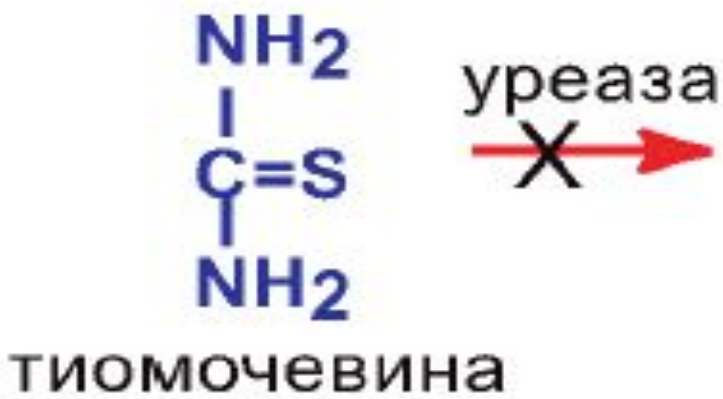
химического превращения

Специфичность пути превращения

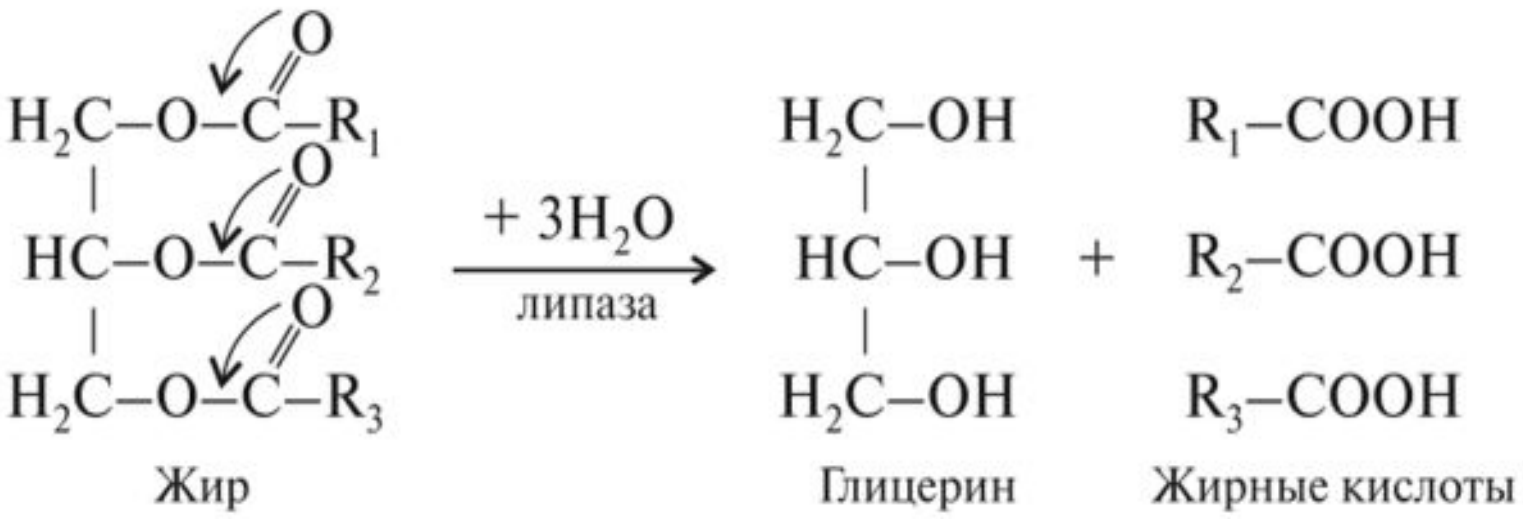
Абсолютная субстратная специфичность – **фермент катализирует превращение только одного конкретного субстрата.**

Пример:

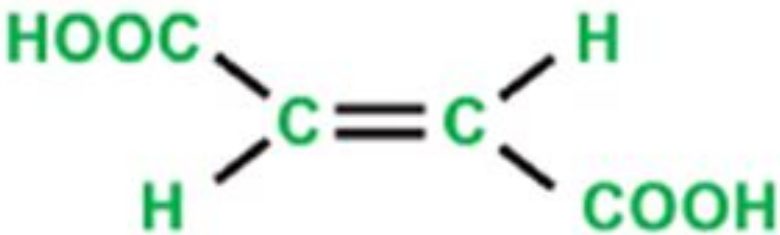




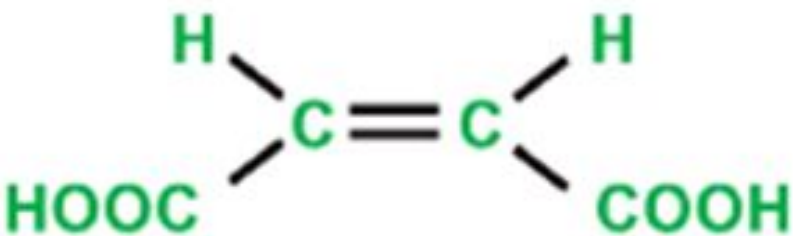
Относительная (групповая) специфичность – **фермент катализирует однотипные превращения схожих по строению веществ. Например, липаза гидролизует жиры:**



Стереоспецифичность – фермент катализирует превращение только одного из стереоизомеров для данного вещества. Например, фермент фумараза оказывает действие только на фумарат. Малеинат (цис-изомер фумарата) не является субстратом фумаразы.

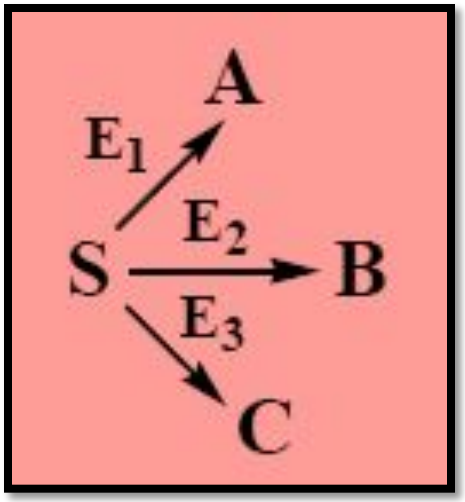


Фумарат
«транс» - изомер

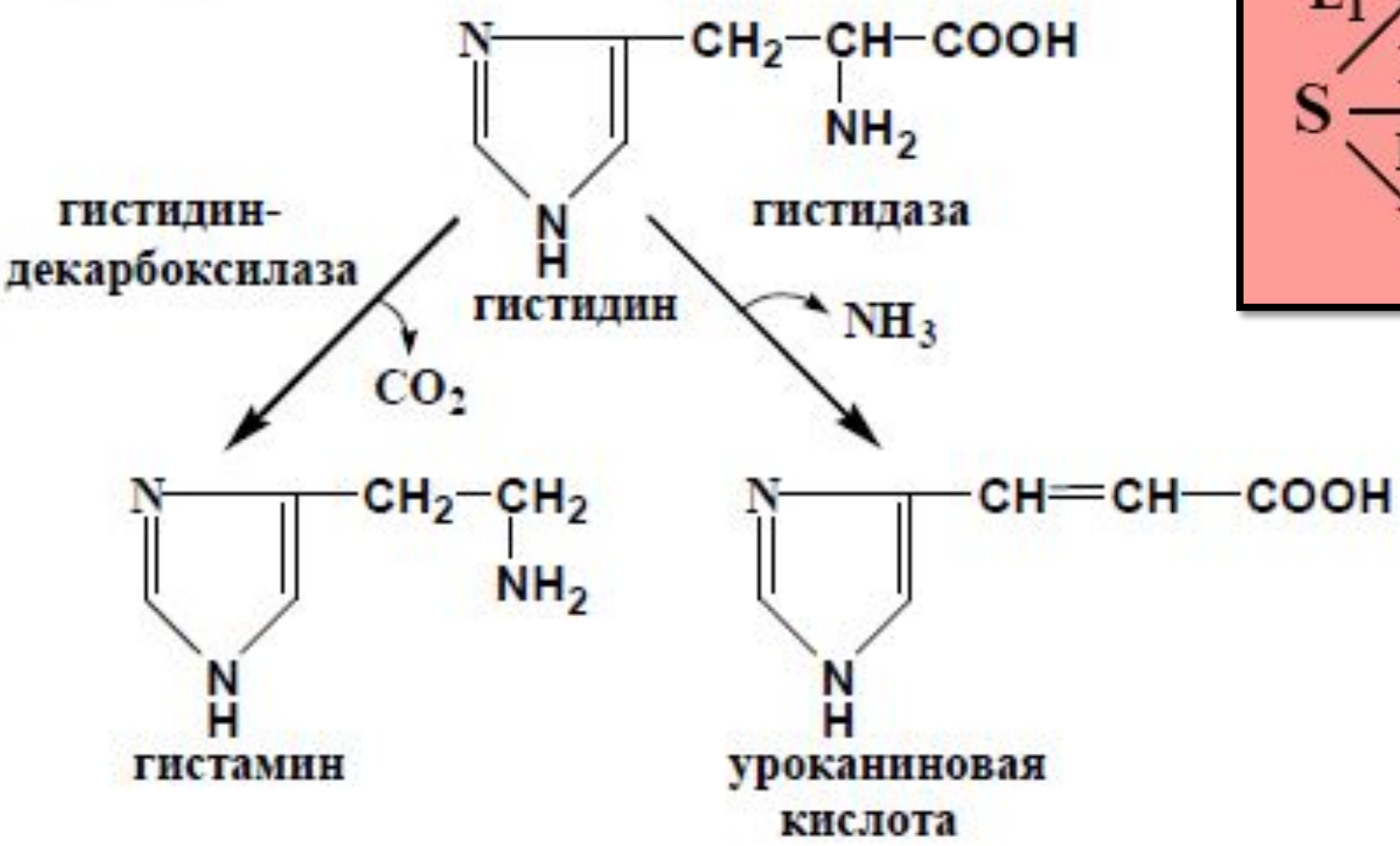


Малеинат
«цис» - изомер

Каталитическая специфичность (специфичность пути превращения) – фермент катализирует только одно превращение субстрата из всех возможных:

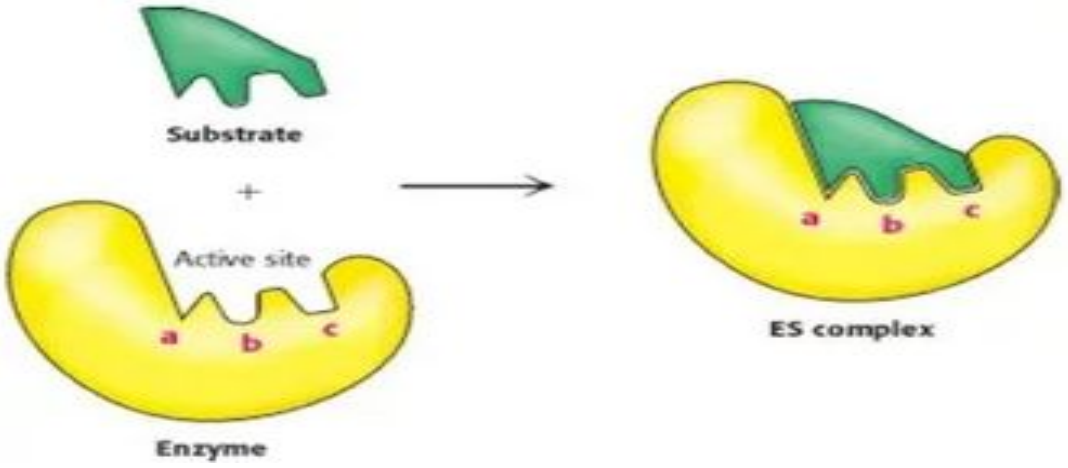


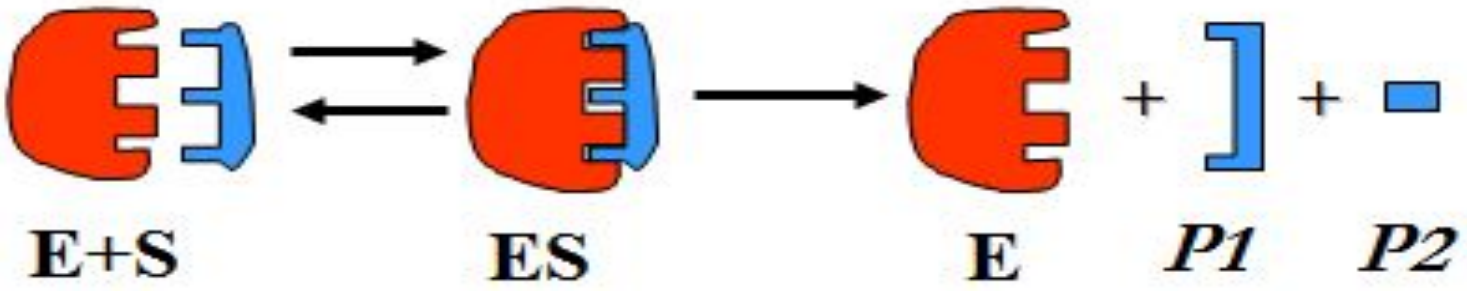
Пример:



Теории о специфичности действия ферментов

1. Теория Фишера (1890г.,модель «ключ – замок», модель "жесткой матрицы«) - активный центр фермента строго соответствует конфигурации субстрата и не изменяется при его присоединении. Эта модель хорошо объясняет абсолютную специфичность, но не групповую.

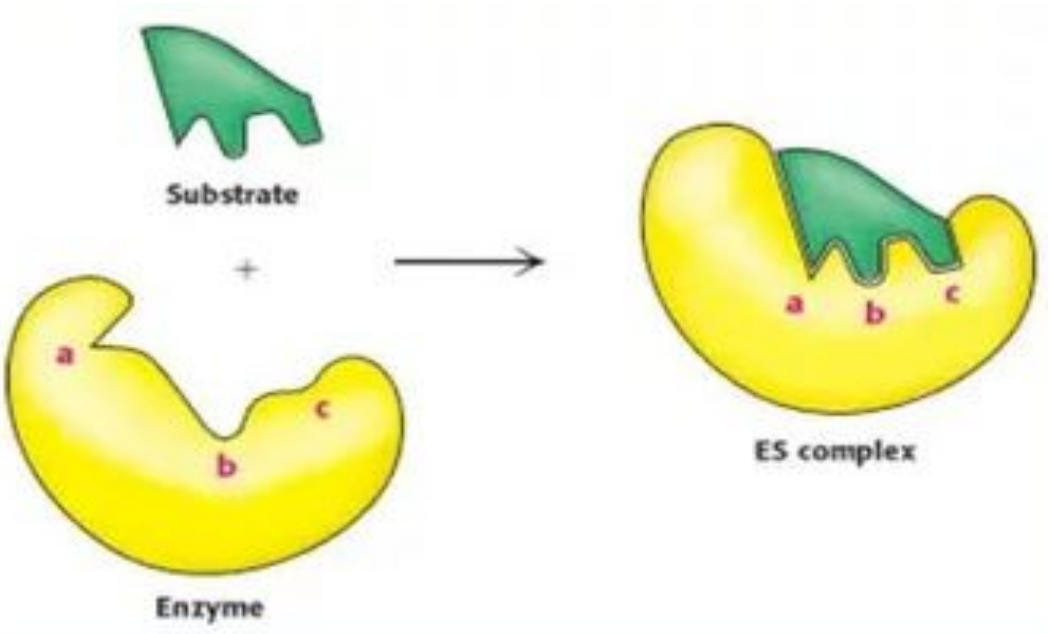




2.Теория Кошланда

(1958г., 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.

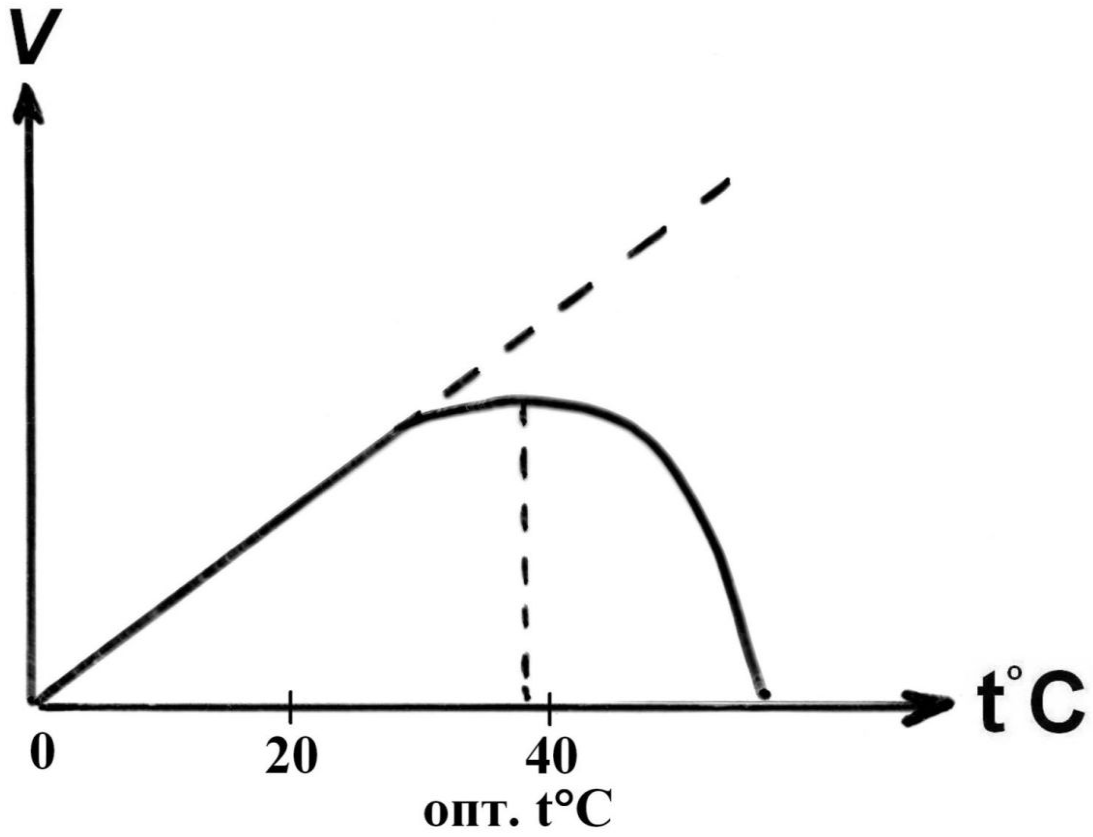
Современные представления - при взаимодействии фермента и субстрата оба подвергаются модификации и подстраиваются друг под друга.



Кинетика ферментативных реакций

Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры среды

Скорость химической реакции, катализируемая ферментами, имеет свой температурный оптимум (температура, при которой фермент обладает максимальной активностью), превышение которого сопровождается понижением ферментативной активности, возникающим из-за термической денатурации белковой молекулы: ***изменяется конформация фермента и его активного центра; нарушается комплементарность активного центра и субстрата; снижается скорость ферментативной реакции.***

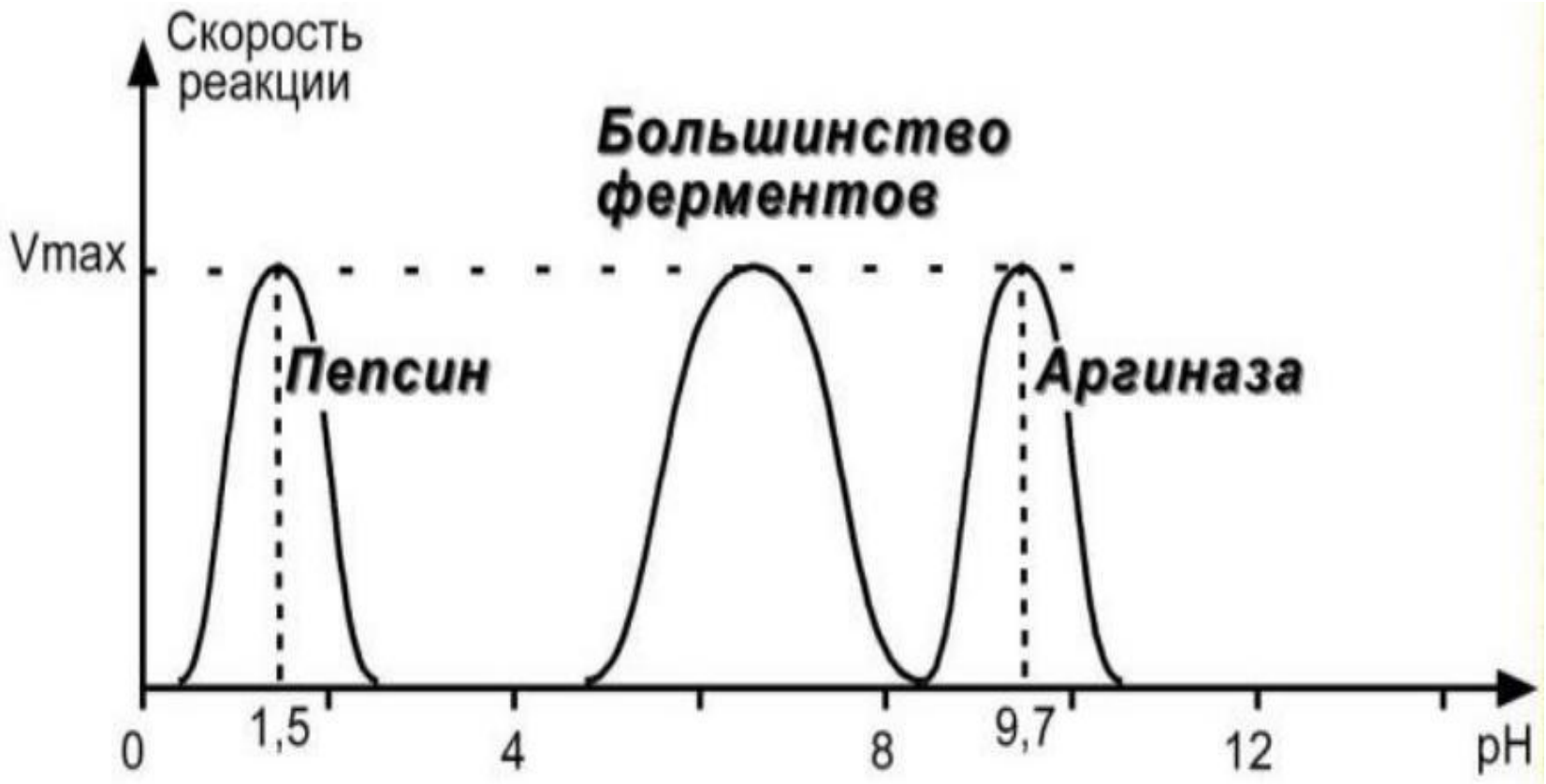


Графмк зависимости скорости реакции от температуры

Зависимость скорости реакции от pH среды

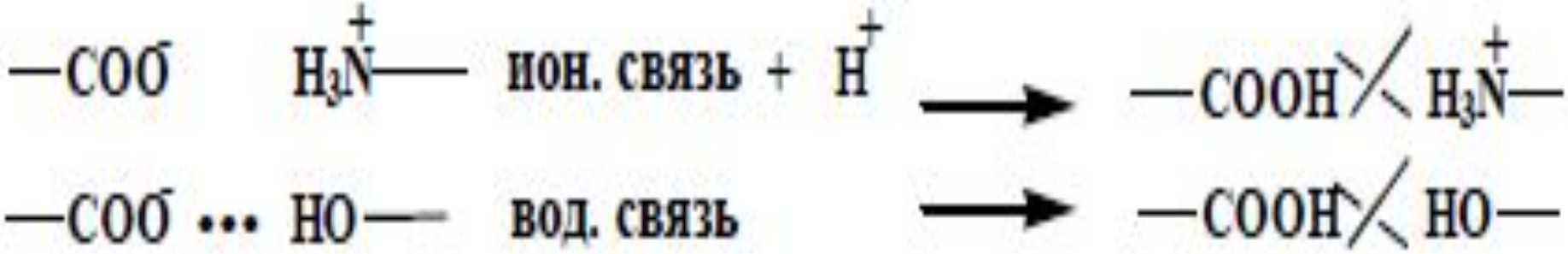
Оптимум pH – это такое значение pH, при котором фермент проявляет максимальную активность.

Для каждого фермента характерен довольно узкий интервал pH, при котором он активен.



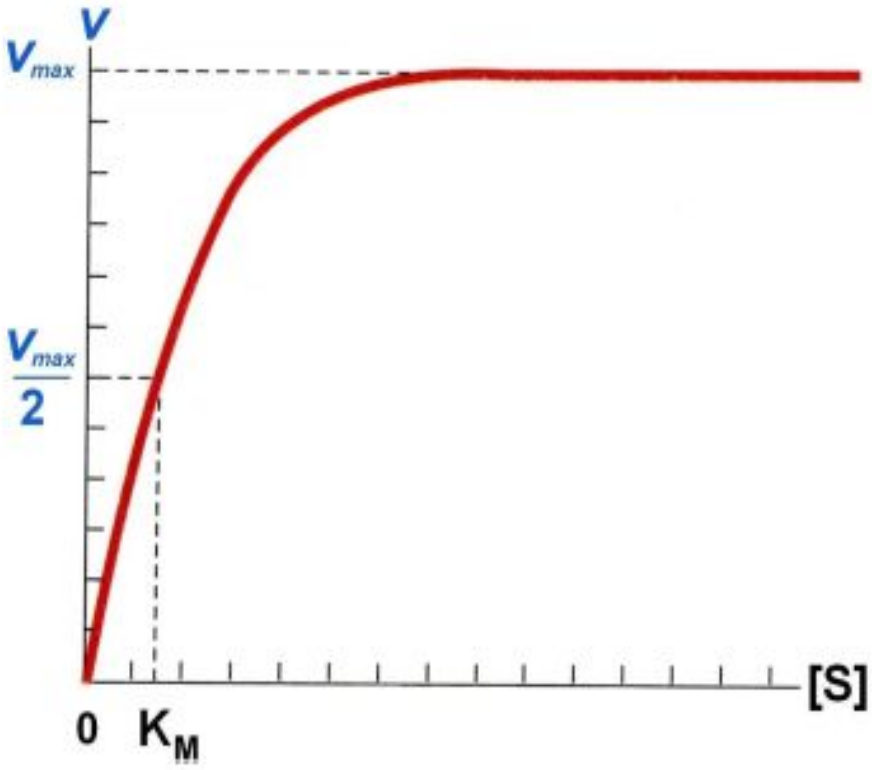
При изменении pH среды в сторону от оптимума активность фермента уменьшается, т.к. происходит изменение ионизации функциональных групп молекулы белка.

Например, при закислении среды происходит протонирование свободных аминогрупп (NH_3^+), а при защелачивании происходит отщепление протона от карбоксильных групп (COO^-). Это приводит к изменению конформации молекулы фермента и конформации активного центра; следовательно, нарушается присоединение субстрата, кофакторов и коферментов к активному центру.



Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата

Если концентрацию ферментов оставить постоянной, изменяя только количество субстрата, то график скорости ферментативной реакции описывают гиперболой:



Vmax – это такая скорость ферментативной реакции, при которой достигается полное насыщение фермента субстратом, т.е. когда все активные центры фермента связаны с субстратом.

KM – *константа Михаэлиса*:

- численно равна концентрации субстрата, при которой скорость реакции равна ½ *V*max.

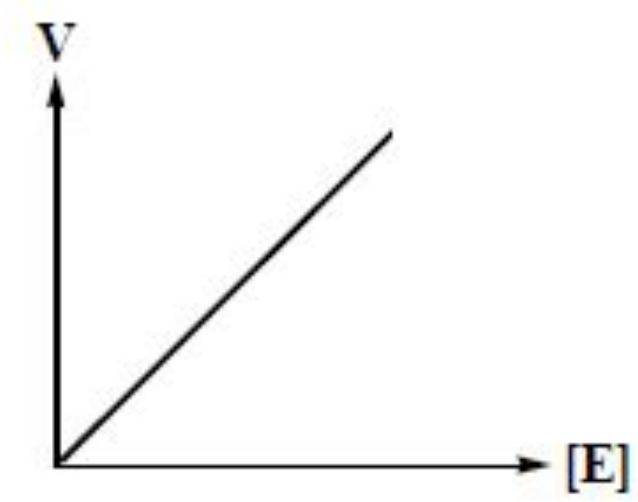
- показывает сродство E к S и является величиной постоянной, не зависящей от концентрации фермента.

Чем меньше KM, тем больше сродство фермента к данному субстрату и наоборот.

Зависимость скорости реакции от концентрации фермента

В условиях избытка субстрата скорость ферментативной реакции прямо пропорциональна концентрации фермента.

Поскольку количества фермента не возможно измерить в абсолютных величинах (н., в граммах), на практике пользуются условными величинами, характеризующими активность фермента.



1 МЕ (международная единица активности) – это такое количество фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата за 1 мин или образование 1 мкмоль продукта за 1 мин при оптимальных условиях:

$$1\text{МЕ} = \frac{1\ \text{мкмоль}\ (S)}{1\ \text{мин}}\ \text{или}\ \frac{1\ \text{мкмоль}\ (P)}{1\ \text{мин}}$$

Для того, чтобы оценить количество молекул фермента среди других белков данной ткани, определяют удельную активность.

Удельная активность – это отношение количества единиц активности фермента в образце ткани к массе белка (в мг) в этой ткани:

$$\frac{\text{количество превращенного субстрата, мкмоль}}{\text{навеска ткани, г*время инкубации, мин}} = A_{уд}$$

По удельной активности часто судят об очистке Е: чем меньше посторонних белков, тем выше Ауд.

В 1973 году была принята новая единица активности – катал (1 моль S/сек.)

Классификация ферментов

В 1961 г в Москве V Международный биохимический союз принял современную классификацию ферментов.

В соответствии с этой классификацией все ферменты делятся:

- на классы – по типу катализируемой реакции,

- каждый класс подразделяется на подклассы – по природе атакуемой химической группы,

- подклассы делятся на подподклассы – по характеру атакуемой связи или по природе акцептора.

Оксидоредуктазы →	Окислительно – восстановительные реакции всех типов
Трансферазы →	Перенос отдельных атомов и групп атомов
Гидролазы →	Гидролитическое расщепление химических связей
Лиазы →	Негидролитическое расщепление двойных связей или их образование
Изомеразы →	Взаимопревращения различных изомеров
Лигазы →	Образование связей при взаимодействии двух или более соединений (с помощью энергии АТФ)

Классификация ферментов

Шифр фермента

Каждому ферменту присвоен четырехзначный классификационный номер(шифр - КФ), включающий класс, подкласс, подподкласс и порядковый номер в подподклассе.

Примеры:

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

- лактатдегидрогеназа – КФ 1.1.1.27, действует на ОН-группу донора с НАД в качестве акцептора с порядковым номером 27 в своем подподклассе

Название фермента

Систематическое – согласно современной классификации, применяемое для однозначной идентификации фермента.

Рабочее - добавляется окончание "-аза" к названию субстрата– уреаза, сахараза, липаза, нуклеаза или к названию химического превращения определённого субстрата, например, лактатдегидрогеназа, аденилатциклаза, фосфоглюкомутаза, пируваткарбоксилаза.

Тривиальное – сложившиеся исторически, которые не дают представления ни о субстрате, ни о типе химического превращения, например, трипсин, пепсин, химозин, тромбин.

1. Оксидоредуктазы

Катализирует различные окислительно-восстановительные реакции с участием двух субстратов (перенос электронов или атомов водорода с одного субстрата на другой).

Систематическое название составляют по формуле :

«донор: акцептор-оксидоредуктаза»

Основные подклассы:

- Дегидрогеназы

- Оксидазы

- Оксигеназы (гидроксилазы)

Дегидрогеназы – катализируют реакции присоединения или отщепления атомов водорода (дегидрирования).

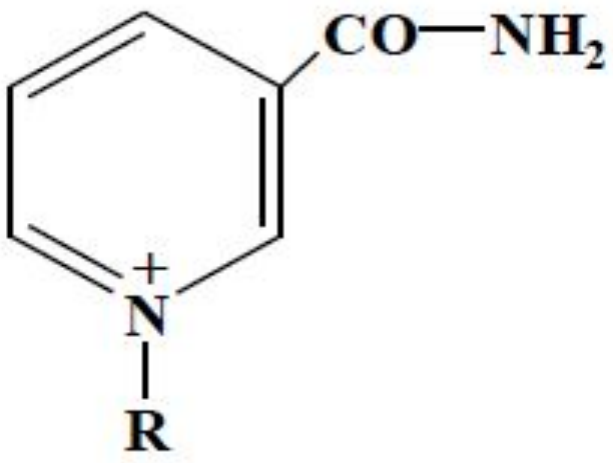
По типу кофермента различают:

- НАД$^+$ и НАДФ$^+$ – зависимые дегидрогеназы (предшественник: витамин PP);

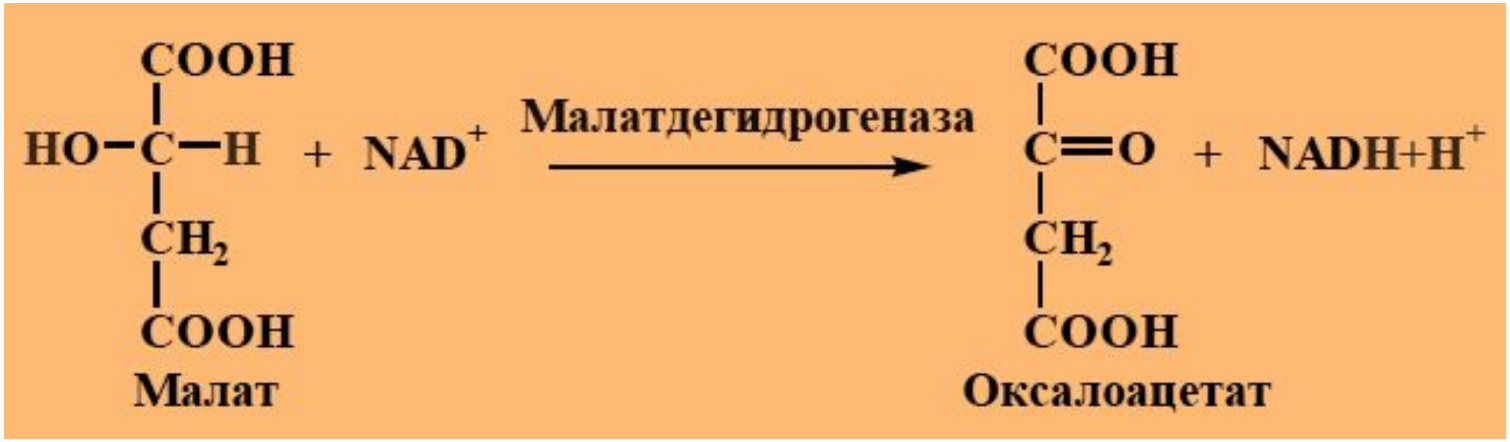
- ФАД и ФМН – зависимые дегидрогеназы (предшественник: витамин B_2)

Коферменты NAD$^+$, NADP$^+$, FAD и FMN выполняют роль акцепторов атомов водорода.

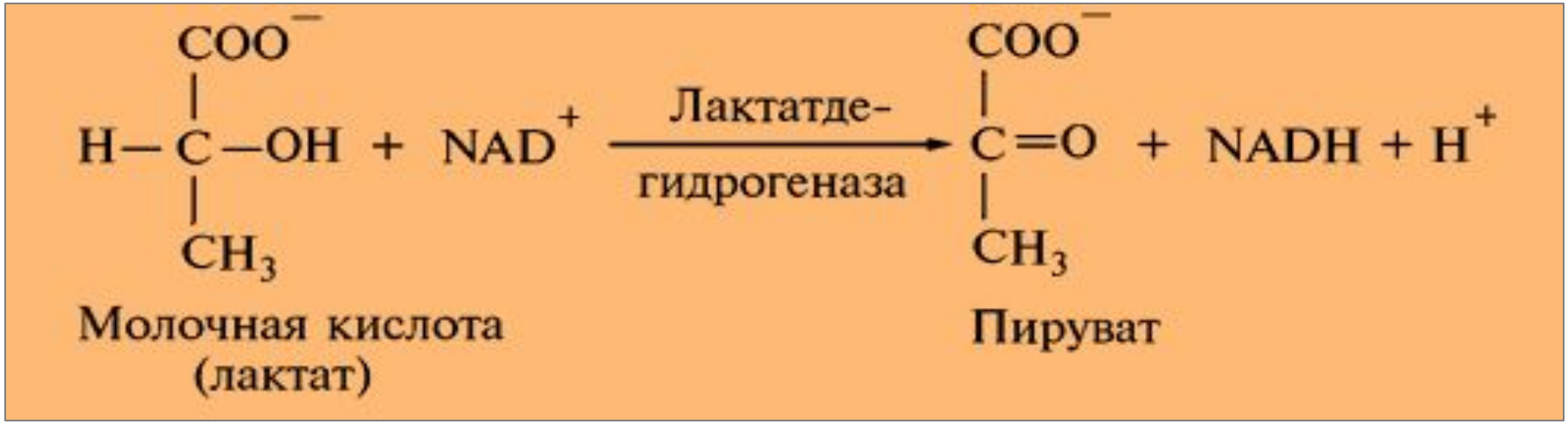
Активная часть коферментов НАД$^+$ и НАДФ$^+$:



Примеры реакций с участием НАД$^+$

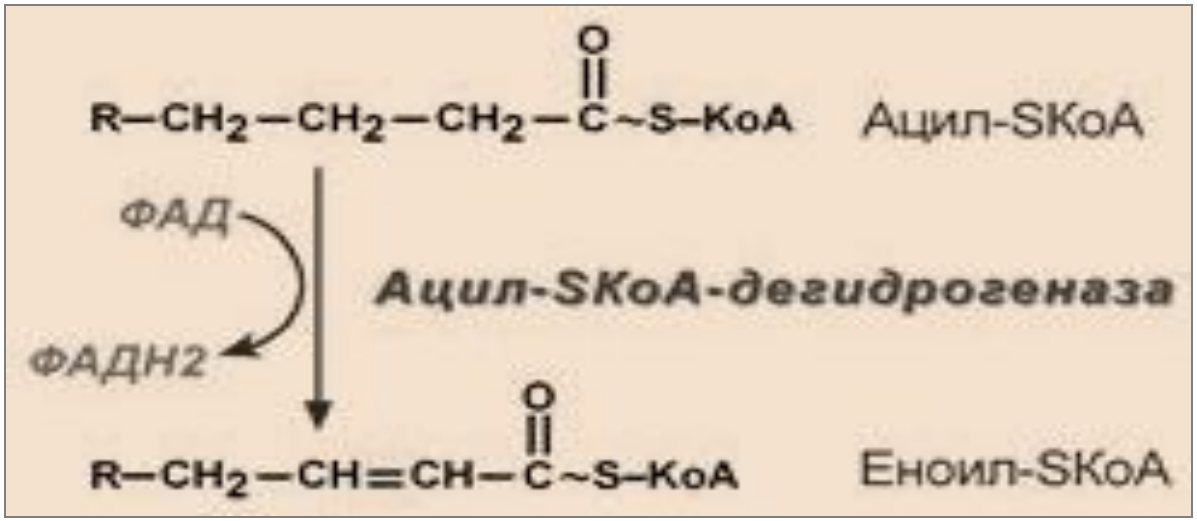


Малат: НАД$^+$ - оксидоредуктаза



Лактат: НАД$^+$ - оксидоредуктаза

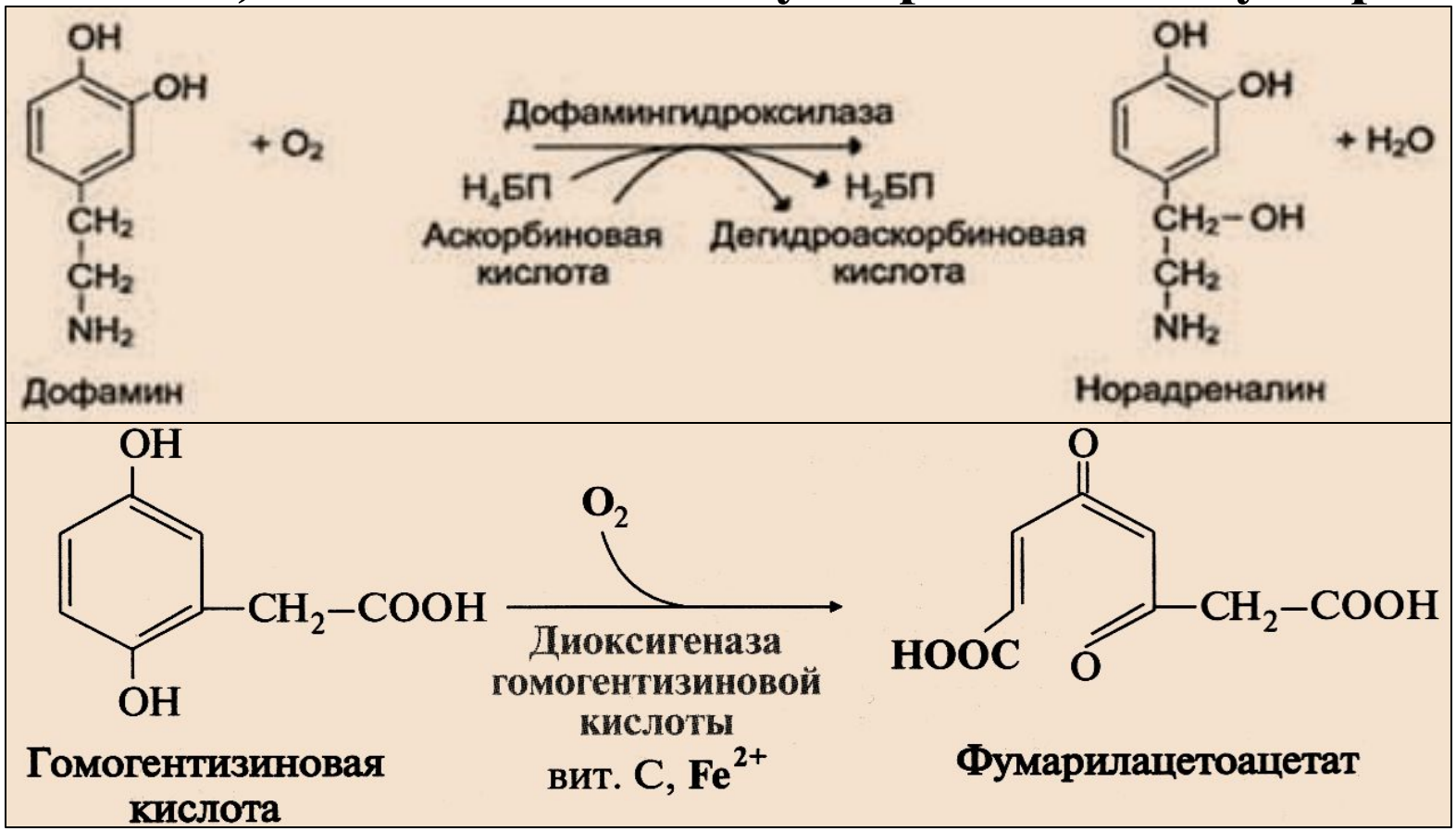
Примеры реакций с участием ФАД:



Оксидазы. Акцептором электрона служит молекулярный кислород (н., цитохромоксидаза).

$$O_2 + 4H^+ + 4\,e^- \rightarrow 2H_2O$$

Оксигеназы - это ферменты, катализирующие активирование O2 и последующее включение 1 (монооксигеназы) или 2 (диосигеназы) его атомов в молекулы различных субстратов



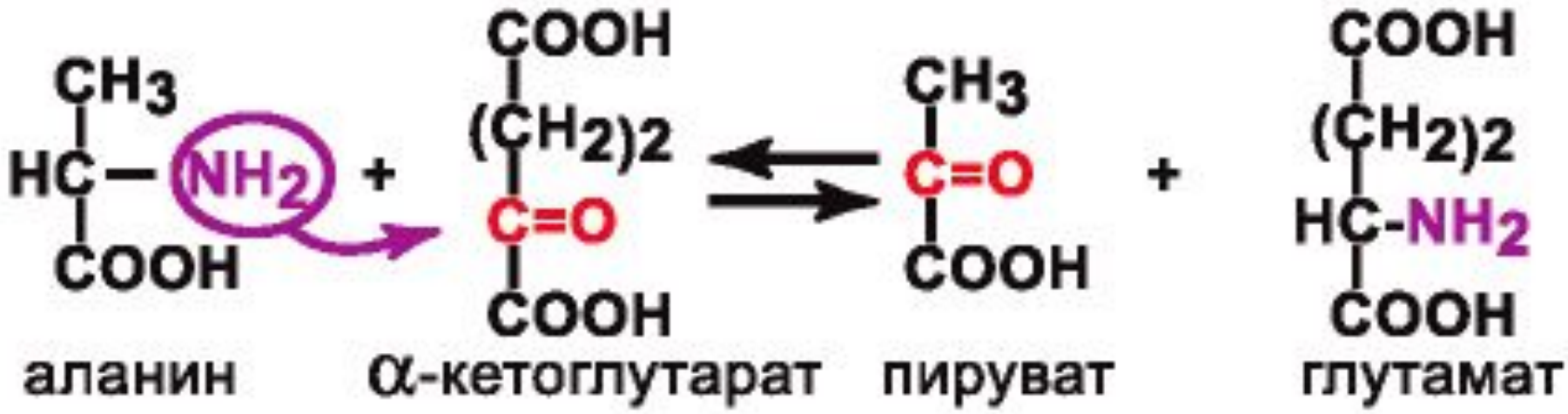
2. Трансферазы. **Катализируют перенос функциональных групп от одного соединения к другому.**

Подразделяют в зависимости от переносимой группы на аминотрансферазы, ацилтрансферазы, метилтрансферазы, гликозилтрансферазы, фосфотрансферазы (киназы).

Название этих ферментов составляют по формуле:

донор: акцептор-транспортируемая группа – трансфераза

Аминотрансферазы – катализируют перенос аминогруппы с аминокислоты на кетокислоту. Пример:



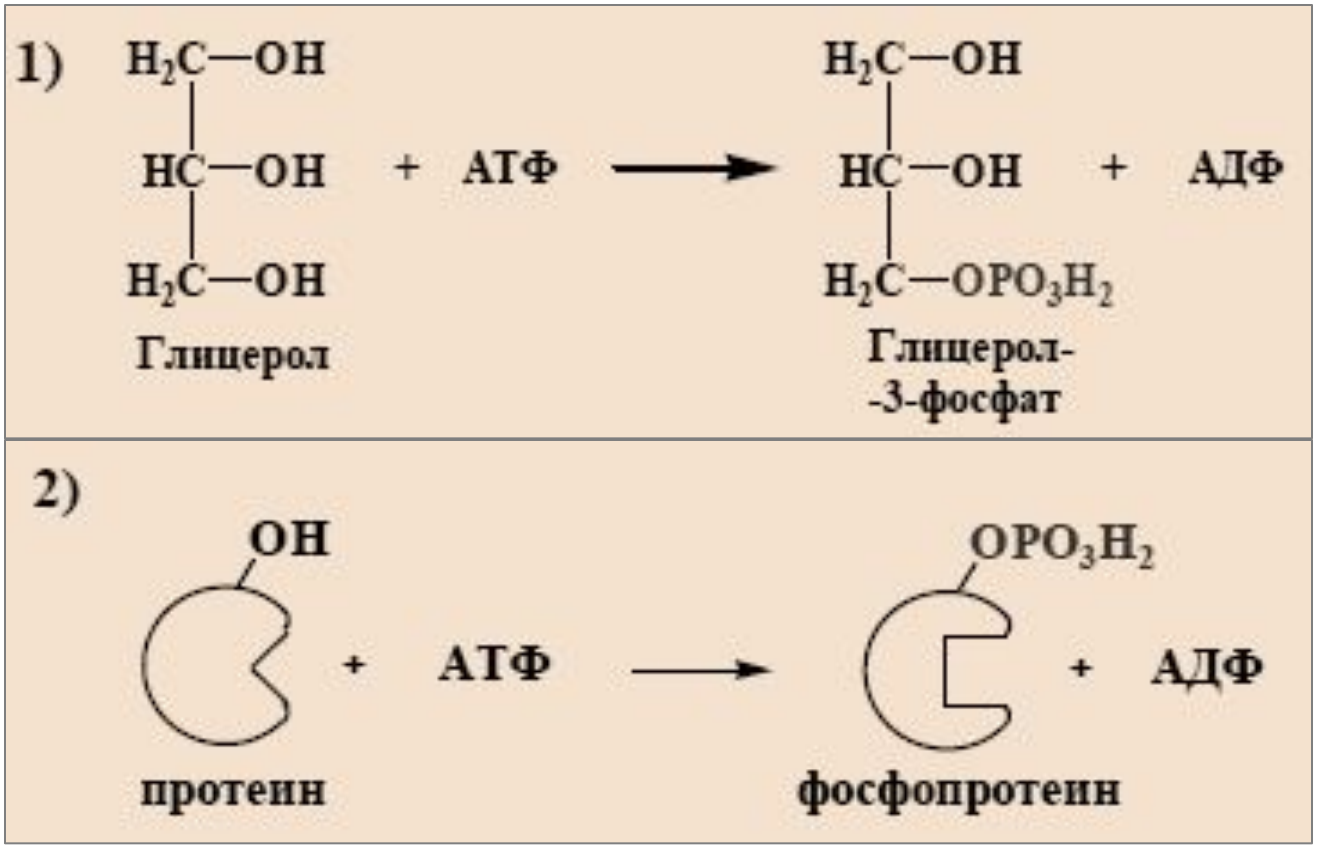
Фермент – Аланин:α-кетоглутарат-аминотрансфераза
Кофермент: Пиридоксальфосфат(витамин B_6).

Фосфотрансферазы (киназы)

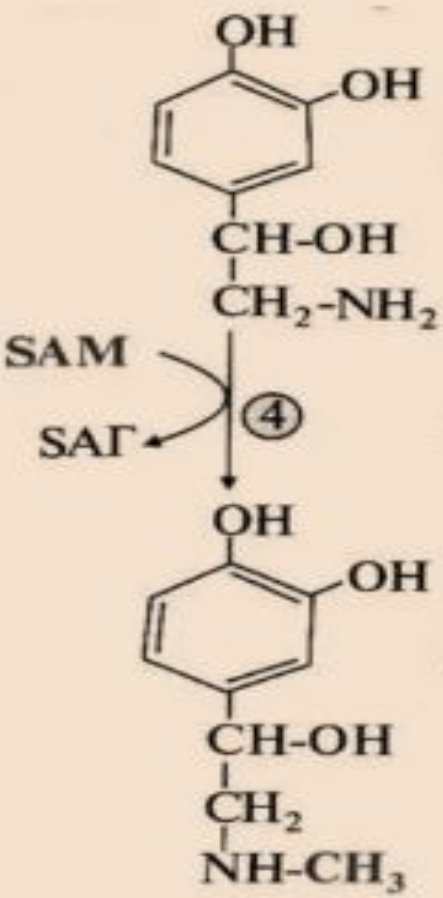
Киназы– катализируют перенос фосфатной группы, донором которой является АТФ (реже ГТФ).

Реакции, катализируемые киназами называются реакциями фосфорилирования.

Кофакторы: ионы Mg^{2+} и Mn^{2+}.



Метилтрансферазы – перенос метильной группы.



НОРАДРЕНАЛИН

Метилтрансфераза

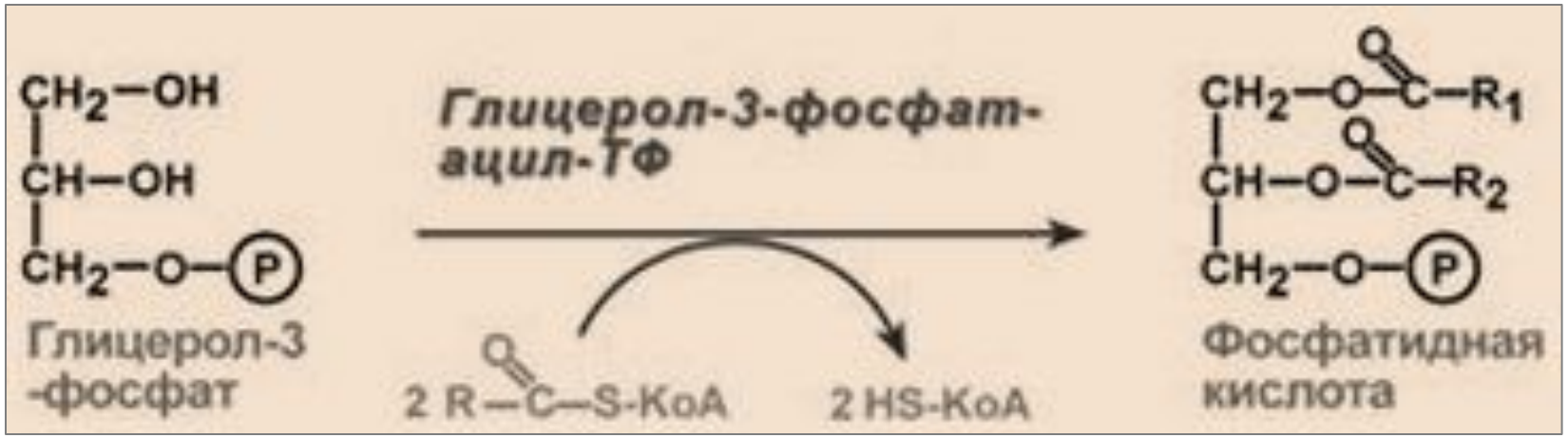
Норадреналин-метилтрансфераза

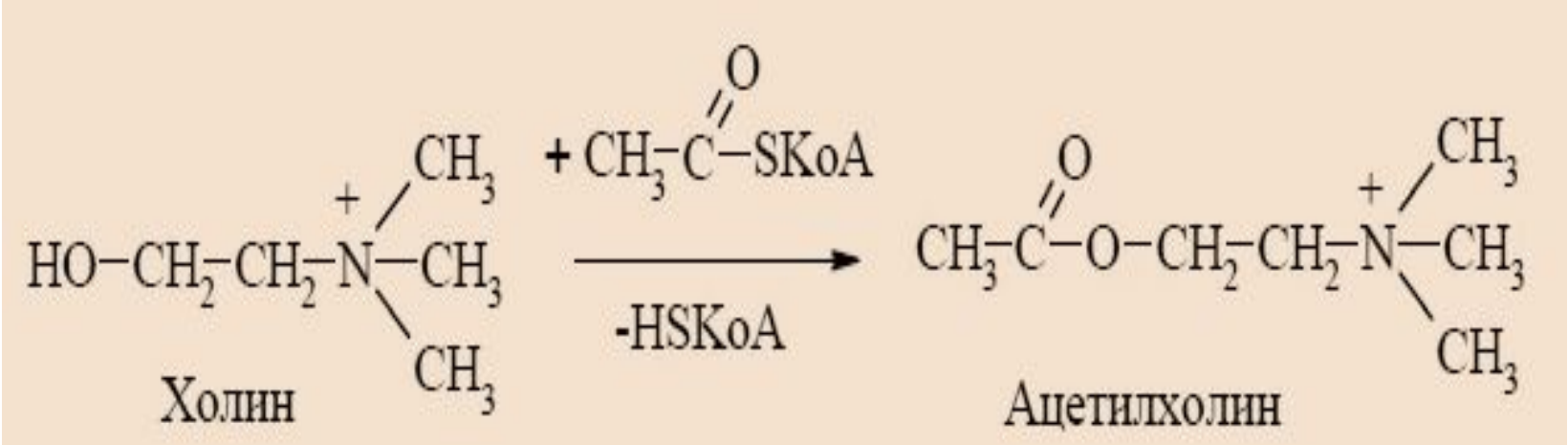
АДРЕНАЛИН

SAM (S-аденозилметионин) – активная форма метионина – донора CH_3

Источник аденозила - АТФ

Ацилтрансферазы – перенос ацильной группы. Коферментную функцию у ацилтрансфераз выполняет коэнзим А.



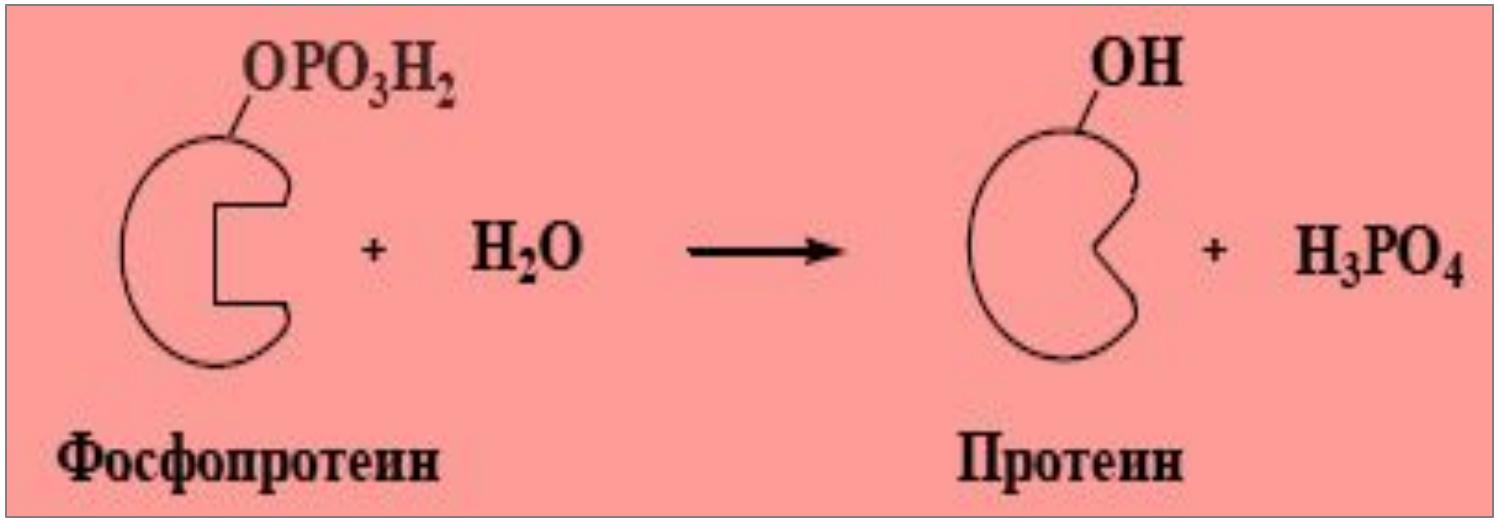


Фермент: холинацетилтрансфераза

3.Гидролазы– катализируют реакции разрыва связей в молекуле с участием воды, т.е. путем гидролиза.

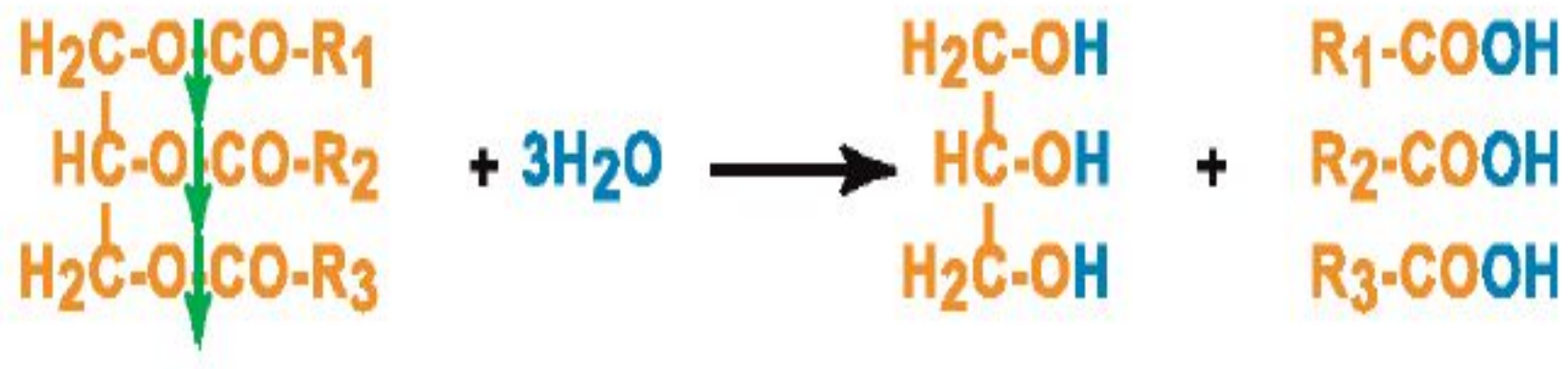
Примеры:

Фосфатазы– катализируют гидролитическое отщепление фосфатной группы:

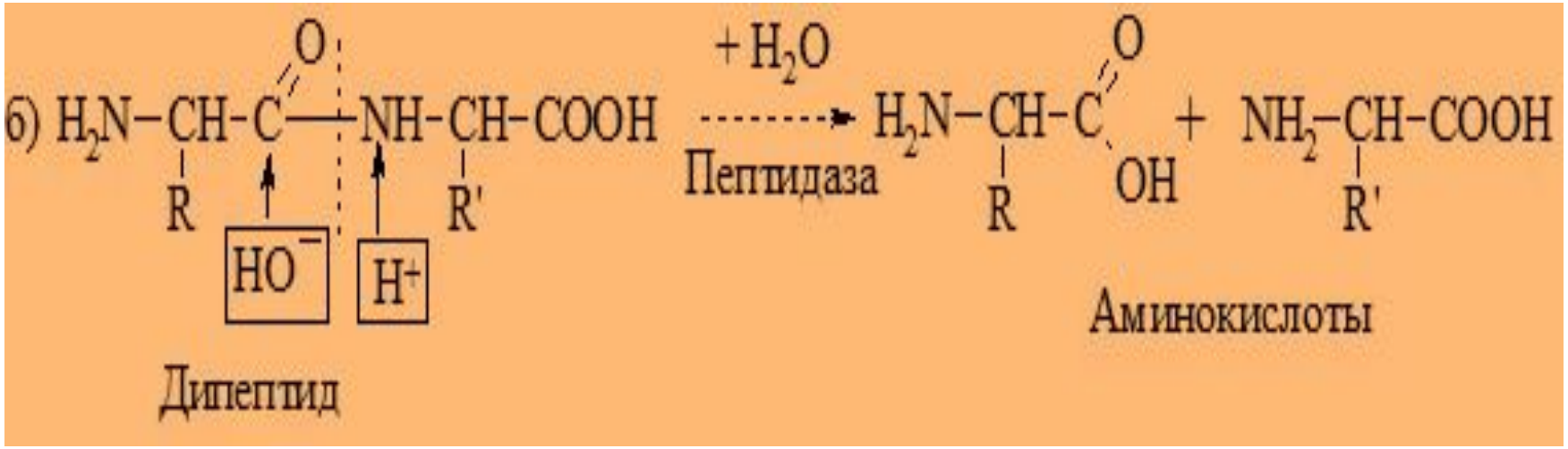


Реакции, которые катализируют фосфатазы, называются реакциями дефосфорилирования.

Липазы– гидролиз связей в жирах:



Пептидазы – гидролизуют пептидную связь:



4. Лиазы

К лиазам относят ферменты, отщепляющие от субстратов негидролитическим путем определенную группу (при этом могут отщепляться CO_2, H_2O, NH_2, SH_2 и др.) или присоединяющие чаще всего молекулу воды по двойной связи.

Наименование ферментов составляют по формуле:

«субстрат-отщепляемая

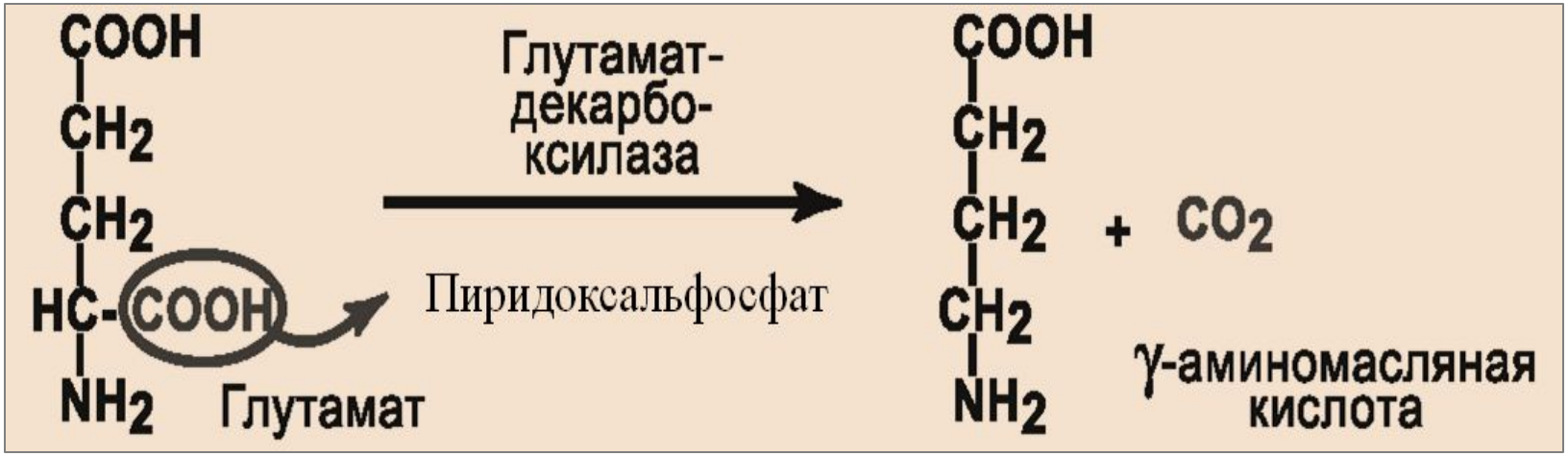
или присоединяемая группировка».

Существует 2 разновидности лиаз:

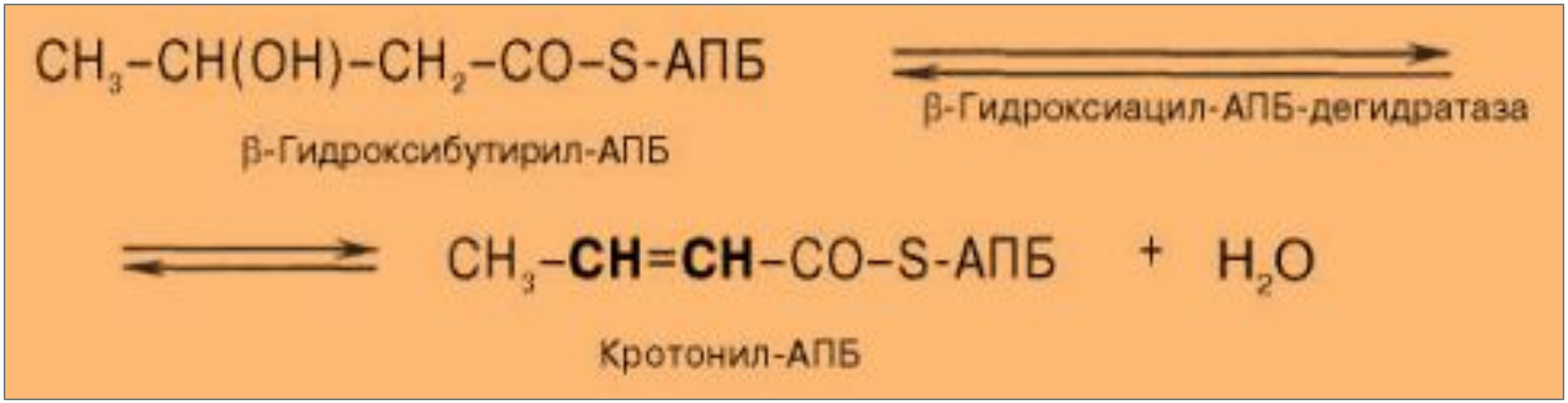
1 разновидность: лиазы, катализирующие реакции разрыва связей способом, отличным от гидролиза и окисления.

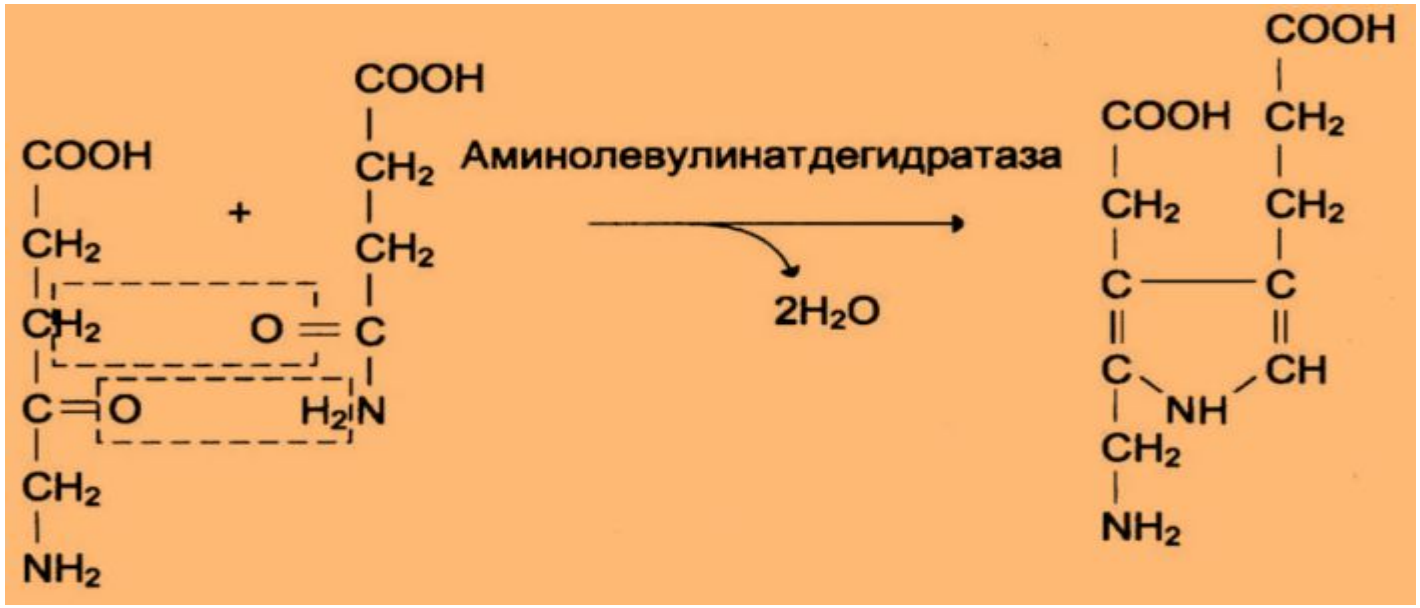
Для этой разновидности лиаз существуют подклассы:

- декарбоксилазы– катализируют реакции отщепления карбоксильной группы в виде CO_2:



- дегидратазы – катализируют реакции отщепления воды от молекулы с образованием двойной связи:

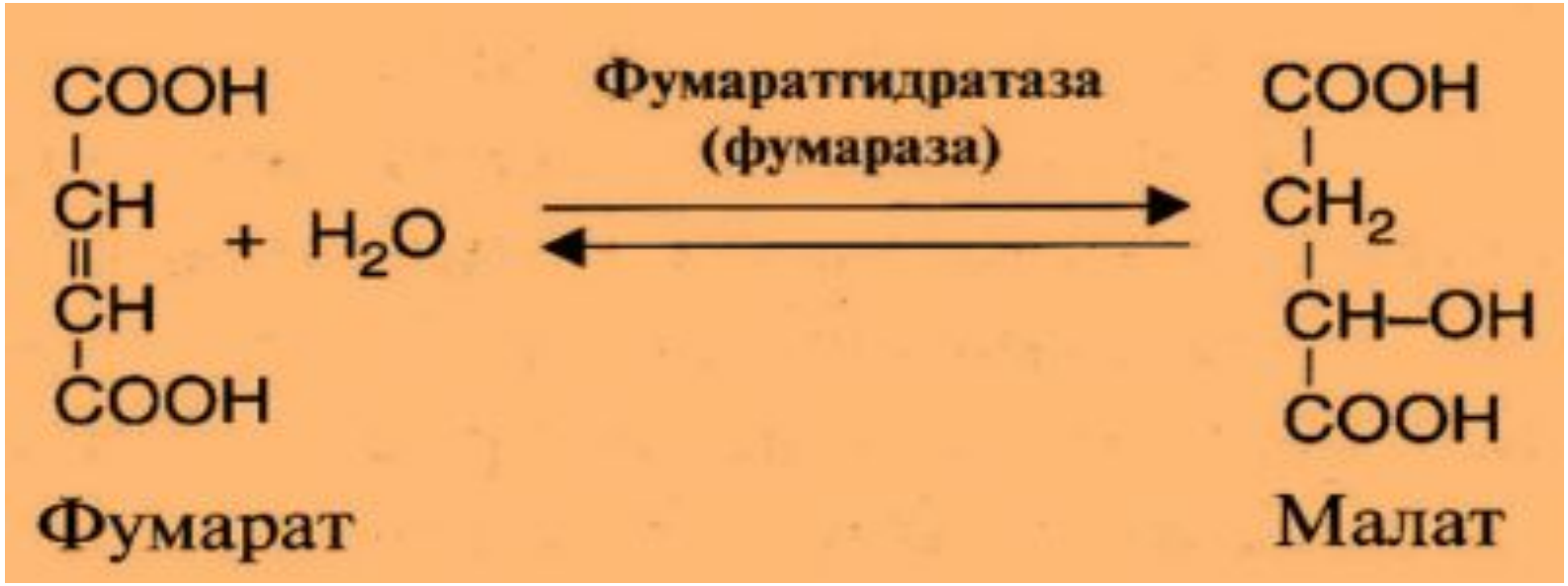




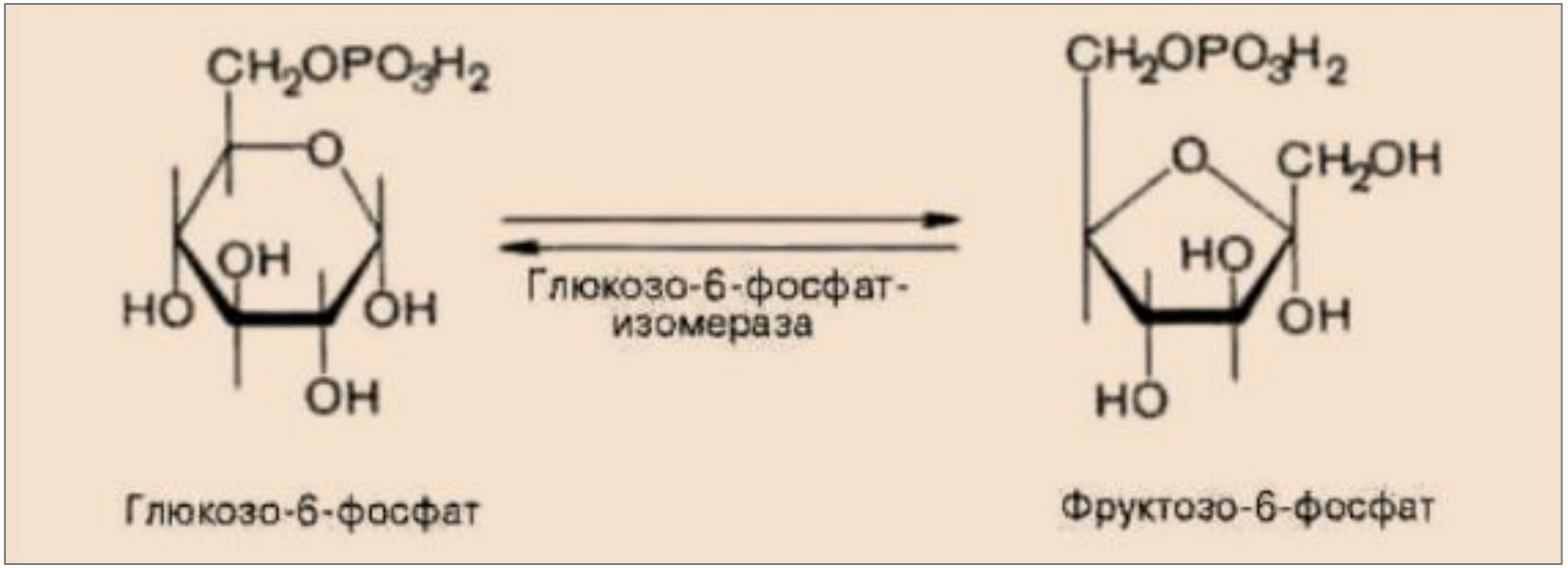
2 разновидность:

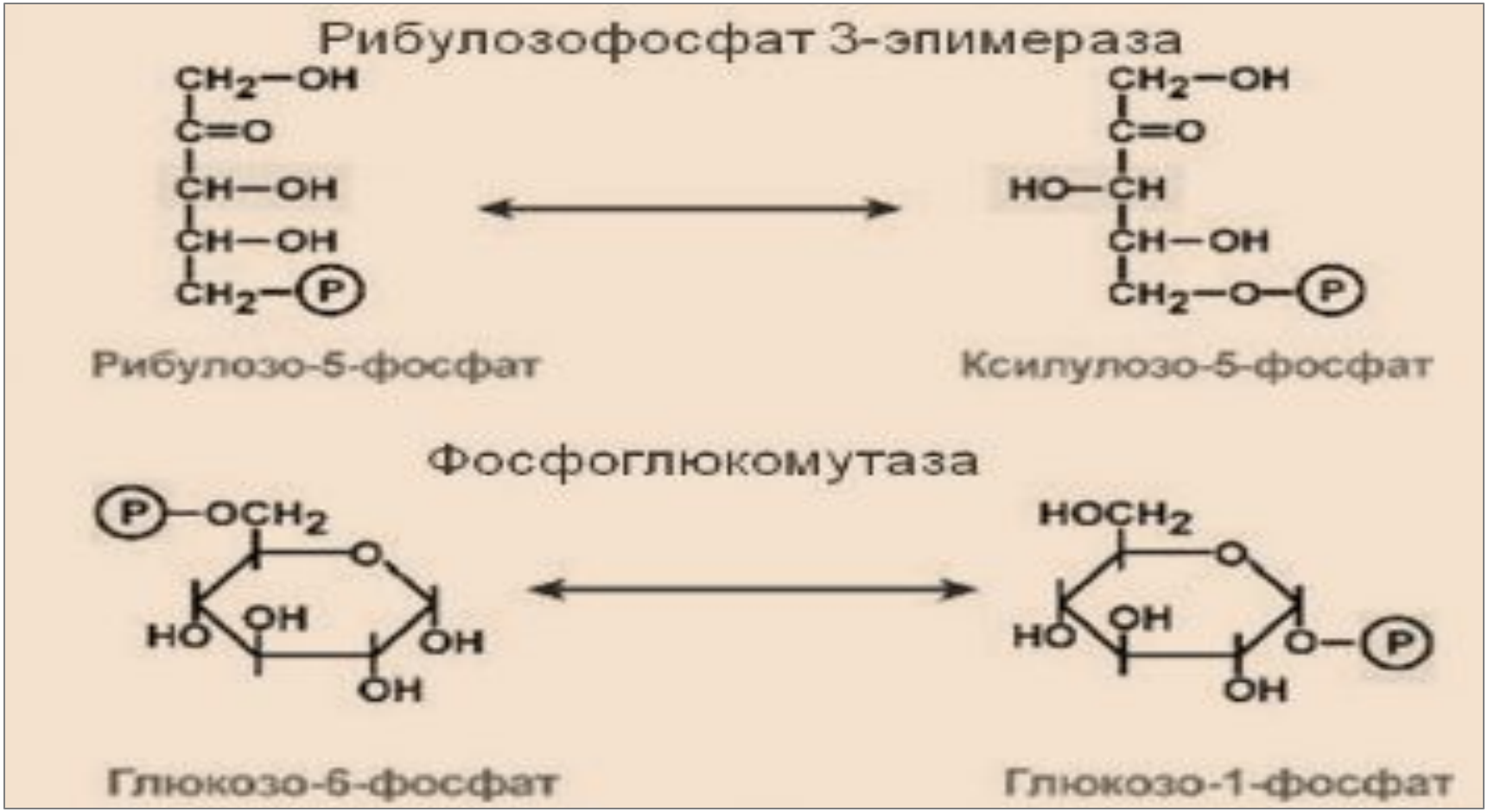
лиазы, катализирующие реакции присоединения молекул по двойной связи.

Подкласс: гидратазы– катализирующие реакции присоединения молекулы воды по двойной связи.



5.Изомеразы – катализируют взаимопревращение изомеров. Подклассы: изомеразы, мутазы.




Рибулозофосфат 3-эпимераза
Рибулозо-5-фосфат
Ксилулозо-5-фосфат
Фосфоглюкомутаза
Глюкозо-6-фосфат
Глюкозо-1-фосфат

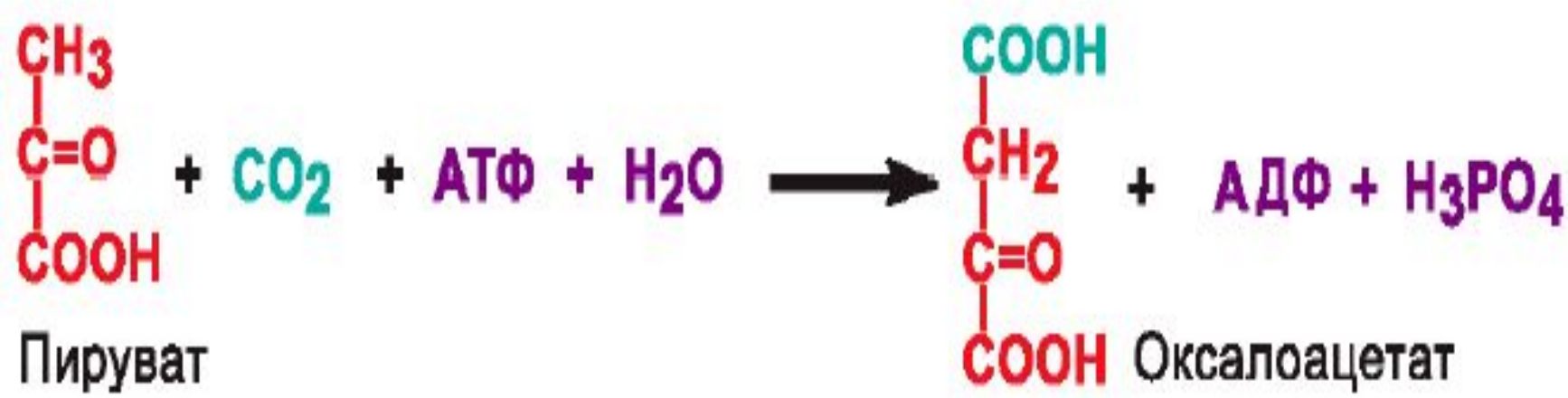
Фосфоглицерат-фосфомутаза
2-Фосфоглицериновая кислота
3-Фосфоглицериновая кислота

6. Лигазы

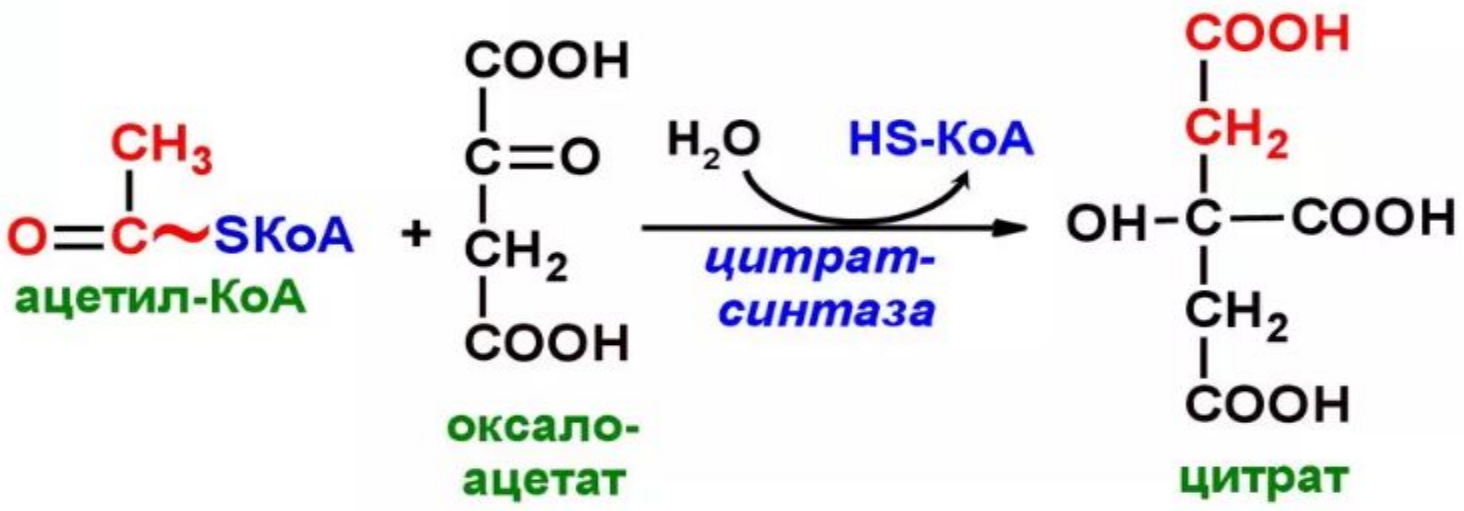
2 разновидности:

1 разновидность: синтетазы– катализируют реакции соединения 2-х молекул при участии энергии АТФ (реже ГТФ).

Подклассы: карбоксилазы– катализируют реакции присоединения карбоксильной группы к молекуле в виде CO_2. Кофермент: биотин (витамин Н).



2 разновидность: синтазы– катализируют соединение молекул при участии энергии макроэргических связей субстрата.



Систематическое название образуется:

Субстрат 1 : субстрат 2 – лигаза