Биологический катализ. Ферменты

«Алиса в стране чудес», иллюстрация John Tenniel, *The Nursery Alice*. (Mary Evans Picture Library, London)

Отличия ферментов от небиологических катализаторов

- Удивительная эффективность ферментов

Число оборотов некоторых ферментов

Фермент	Число оборотов в 1 мин при 37°С
Карбоангидраза	36 000 000
β−Амилаза	1 100 000
Фосфоглюкомутаза	1 240

Отличия ферментов от небиологических катализаторов

- Ферменты обладают высокой субстратной специфичностью
- Ферменты обладают высокой специфичностью к типу катализируемой реакции
- Ферменты обладают высокой региоспецифичностью
- Ферменты обладают высокой стереоспецифичностью

Отличия ферментов от небиологических катализаторов

Составные ферменты: белковая часть обеспечивает связывание субстрата, а катализ осуществляют небелковые (мономерные) соединения, называемые *коферментом* (*кофактором, простетической группой*). Белковая часть такого фермента называется апоферментом, а активный фермент (комплекс апофермента и кофермента) — холоферментом.

Коферменты и витамины

- ***Витаминами*** **можно назвать некую группу низкомолекулярных органических соединений различной химической природы, необходимых для осуществления жизненно важных биохимических процессов *in vivo.***
- **Природные соединения, не являющиеся витаминами, но легко превращающиеся в них в организме человека, называются *провитаминами*.**

Коферменты и витамины

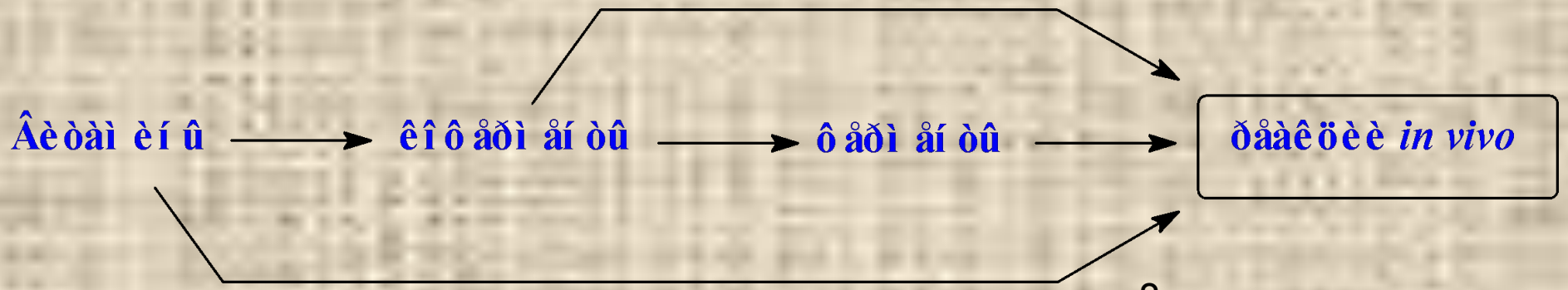
- **Если несколько соединений близкой химической природы выполняют одну и ту же витаминную функцию в организме — их называют *витамерами*.**
- ***Коферменты* — это органические природные низкомолекулярные соединения различной химической природы, необходимые для осуществления каталитического действия ферментов, катализирующих химические процессы *in vivo*.**

Коферменты и витамины

- Собственно витамины — это соединения, выполняющие свою витаминную роль самостоятельно.
- Витамины-коферменты — соединения, выполняющие определенную биохимическую функцию в виде производных, т.е. в виде коферментов.

Коферменты и витамины

- Следует выделить отдельно группу коферментов, т.е. тех соединений, которые образованы из соответствующих витаминов или синтезированы самостоятельно данным организмом для осуществления того или иного химического процесса в живой клетке.



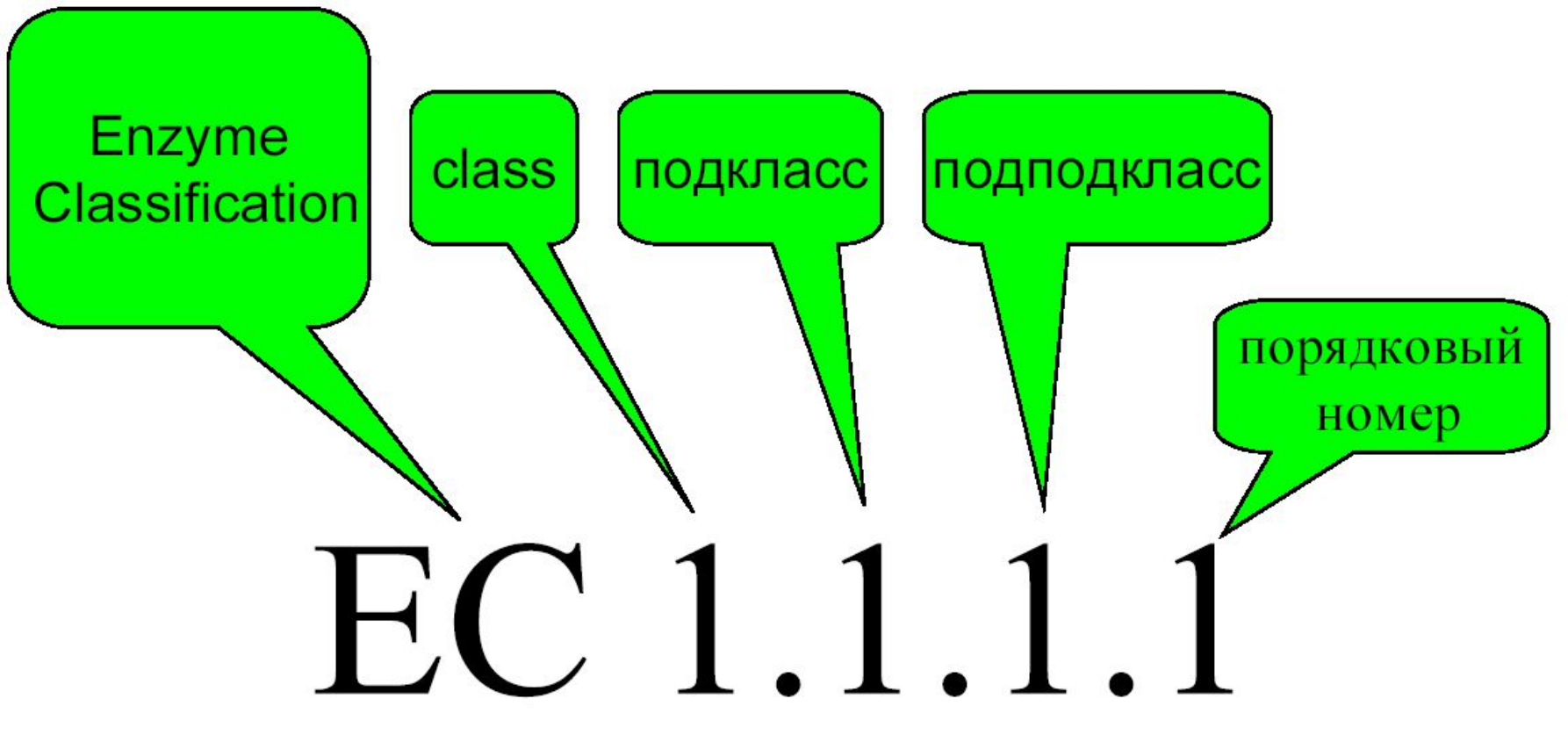
Коферменты и витамины

Витамин	Коферментная форма	Тип катализируемой реакции
Водорастворимые витамины		
Тиамин (B_1)	Тиаминпирофосфат	Декарбоксилирование α-кетокислот
Рибофлавин (B_2)	Флавинмононуклеотид, флавинадениндинуклеотид	Окислительно-восстановительные реакции
Никотиновая кислота	Никотинамидаденин-динуклеотид, никотинамид-адениндинуклеотидфосфат	Окислительно-восстановительные реакции
Пантотеновая кислота	Кофермент (коэнзим) А	Перенос ацильных групп
Пиридоксин (B_6)	Пиридоксальфосфат	Перенос аминогрупп
Биотин (Н)	Биотицин	Перенос CO_2
Фолиевая кислота	Тетрагидрофолат	Перенос одноуглеродных групп
Витамин B_{12}	Дезоксиаденозилкобаламин	Перенос связанного с углеродом атома водорода на соседний атом углерода
Аскорбиновая кислота (С)	Не известна	Реакции гидроксилирования

Коферменты и витамины

Витамин	Коферментная форма	Тип катализируемой реакции
Жирорастворимые витамины		
Витамин А	Ретиналь	Зрительный процесс
Витамин D	1,25-Дигидроксихолекальциферол	Регуляция обмена Са
Витамин Е	Не известна	Защита мембранных липидов
Витамин К	Не известна	Реакции декарбоксилирования

Классификация энзимов – Е.С. (Enzyme Classification)



Классификация энзимов – E.C. (Enzyme Classification)

- **E.C.1. – оксидоредуктазы (*oxidoreductases*).**
- **E.C.2. – трансферазы (*transferases)*.**
- **E.C.3. – гидролазы (*hydrolases)*.**
- **E.C.4. – лиазы (*lyases)*.**
- **E.C.5. – изомеразы (*isomerases)***
- **E.C.6. – лигазы (*ligases)*.**

Оксиредуктазы

Дегидрогеназы (редуктазы)

Оксидазы

Пероксидазы

Гидроксилазы

Оксигеназы

Гидрогеназы

Оксиредуктазы

Е.С.1.1. – действует на СН-ОН функцию

Е.С.1.2. – действует на альдегидную группу

Е.С.1.3. – действует на СН-СН группу

……

Е.С.1.10. – действует на дифенолы и родственные группы

……

Е.С.1.13. – действует на простую связь с внедрением молекулярного кислорода

……

Е.С.1.17. – действует на CH_2 фрагмент

Оксиредуктазы

E.C.1.1.1. – NAD+ или NADP+

E.C.1.1.2. – цитохромом

E.C.1.1.3. – кислородом

E.C.1.1.4. – дисульфидом

E.C.1.1.5. – хиноном

Оксиредуктазы

E.C.1.1.1.1. – алкоголь дегидрогеназа NAD+

E.C.1.1.1.2. – алкоголь дегидрогеназа NADP+

……

E.C.1.1.1.27 – L-лактат дегидрогеназа

……

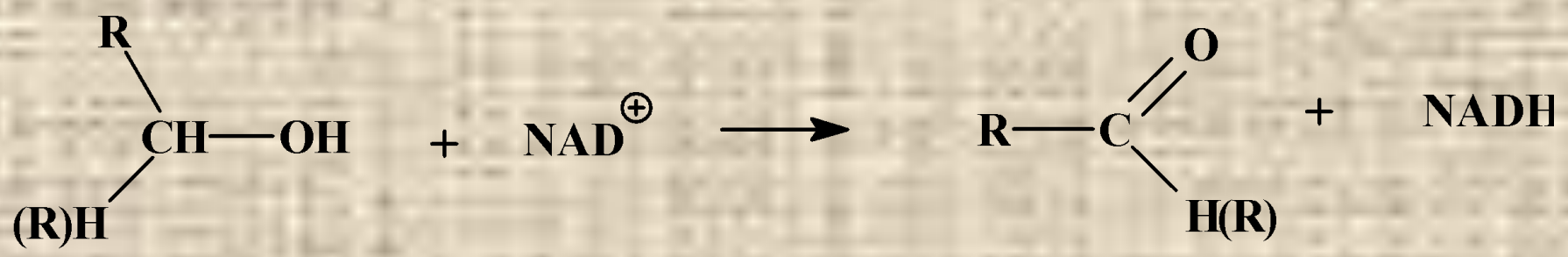
E.C.1.1.1.32 – мевальдат редуктаза

……

E.C.1.1.1.62 – эстрадиол 17-β-дегидрогеназа

Оксиредуктазы

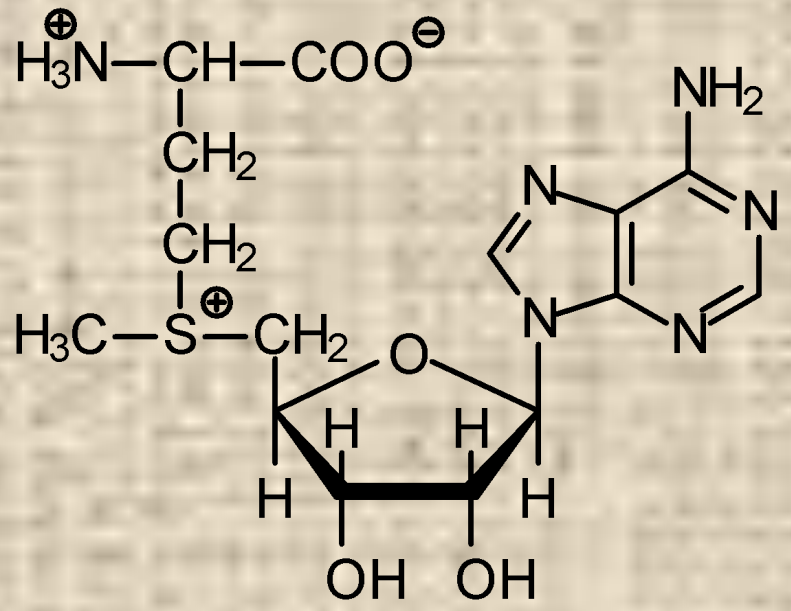
E.C.1.1.1.1



$$H\dot{O}_2 + H\dot{O}_2 \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

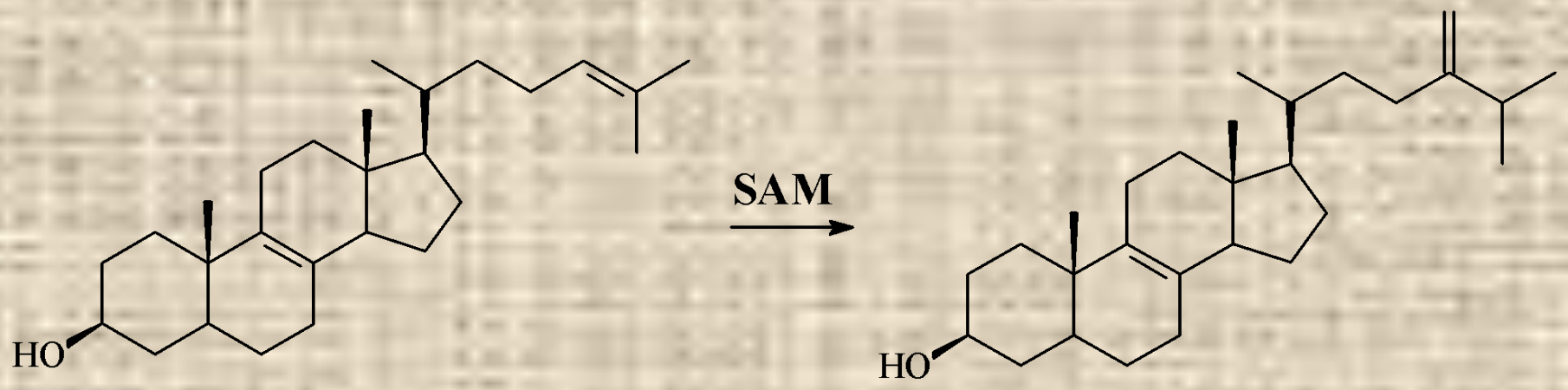
Трансферазы

$$XR + Y \longrightarrow RY + X \quad (X, Y \neq H_2O \text{ или } HO^{\ominus})$$



***S*-Аденозил-метионин**

Трансферазы



Где SAM – S-аденозил-L-метионин

Трансферазы

Е.С.2.1. – переносчики одно-углеродной группы
Е.С.2.2. – переносчики карбонильных функций
Е.С.2.3. – ацетилтрансферазы
Е.С.2.4. – гликозилтрансферазы
Е.С.2.5. – переносчики алкильных (кроме метильных) и арильных групп
Е.С.2.6. – переносчики азотистых функций
Е.С.2.7. – переносчики фосфор-содержащих групп
Е.С.2.8. – переносчики серу-содержащих функций
Е.С.2.9. – переносчики селен-содержащих групп

Трансферазы

E.C.2.1. – трансферазы одноуглеродной группы

E.C.2.1.1. – метилтрансфепразы

E.C.2.1.1.41. – стерол 24-С-метилтрансфераза

Гидролазы

Протеазы – гидролизуют белки

Нуклеазы – гидролизуют нуклеиновые кислоты

Специфические *эндонуклеазы* (так называемые *рестриктазы*) – разрывают полинуклеотиды по строго определенным последовательностям

Гидролазы

E.C.3.1. – действуют на сложноэфирные связи, эстеразы
E.C.3.2. – гликозилазы
E.C.3.3. – действуют на простоэфирные связи
E.C.3.4. – действуют на пептидные связи (пептид гидролазы)
E.C.3.5. – действуют на C – N связи, кроме пептидных
E.C.3.6. – действуют на ангидриды кислот
E.C.3.7. – действуют на углерод-углеродные связи
E.C.3.8. – действуют на связи с галогеном
E.C.3.9. – действуют на связи P – N
E.C.3.10.– действуют на S – N связи
E.C.3.11.– действуют на C – P связи
E.C.3.12.– действуют на S – S связи
E.C.3.13.– действуют на C – S связи.

Гидролазы

E.C.3.1 гидролазы действующие на сложноэфирную связь

E.C.3.1.1. гидролазы эфиров карбоновых кислот

E.C.3.1.1.1 карбоксилэстеразы

$$RCOOR^1 + H_2O = RCOOH + R^1OH$$

Лиазы

Е.С.4.1. – углерод-углеродные лиазы

Е.С.4.2. – углерод-кислородные лиазы

Е.С.4.3. – углерод-азотные лиазы

Е.С.4.4. – углерод-серы лиазы

Е.С.4.5. – углерод-галоген лиазы

Е.С.4.6. – фосфор-кислородные лиазы

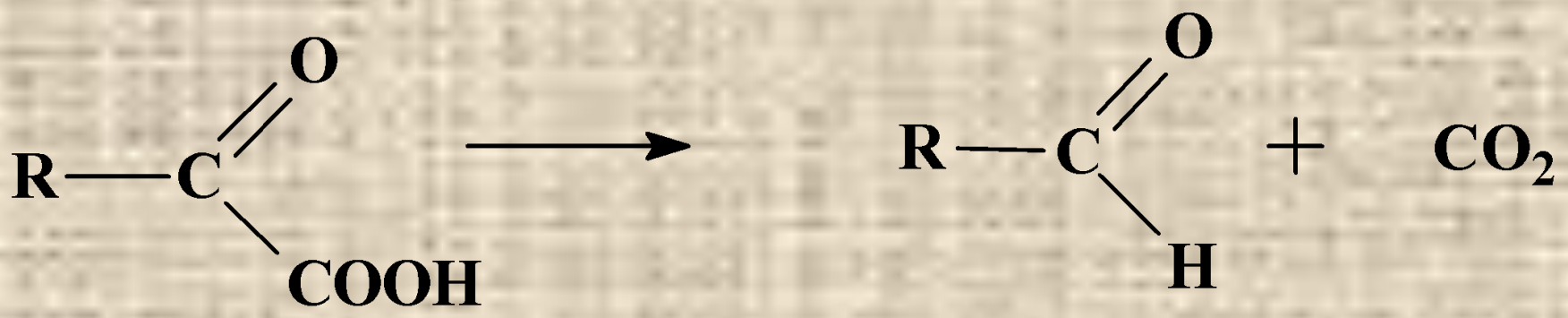
Е.С.4.99.– другие лиазы.

Лиазы

E.C.4.1.1. – карбокси лиазы
E.C.4.1.2. – альдегид лиазы
E.C.4.1.3. – оксо-кислотные лиазы
E.C.4.1.99. – другие углерод-углеродные лиазы

E.C.4.1.1.1. – пируват декарбоксилаза
……..
E.C.4.1.1.23. – оротидин-5-фосфат декабоксилаза
……
E.C.4.1.1.31. – фосфоенолпируват карбоксилаза
……..
E.C.4.1.1.39. – рибулозодифосфат карбоксилаза
……..
E.C.4.1.1.50. – аденозилметионин декарбоксилаза

Лиазы

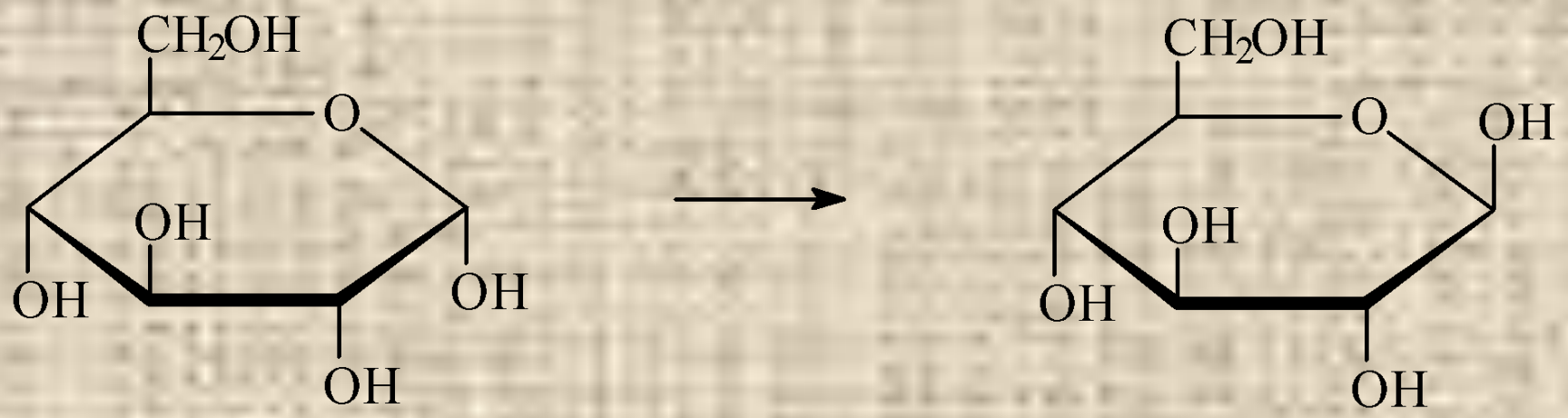


Изомеразы

Е.С.5.1. – рацемазы и эпимеразы
Е.С.5.2. – *цис-трас*-изомеразы
Е.С.5.3. – внутримолекулярные оксидоредуктазы
Е.С.5.4. – внутримолекулярные трансферазы (мутазы)
Е.С.5.5. – внутримолекулярные лиазы
Е.С.5.99. – другие изомеразы.

Изомеразы

E.C.5.1. рацемазы и эримеразы
E.C.5.1.3. действующие на углеводу и их производные
E.C.5.1.3.3. альдоза-1-эпимераза

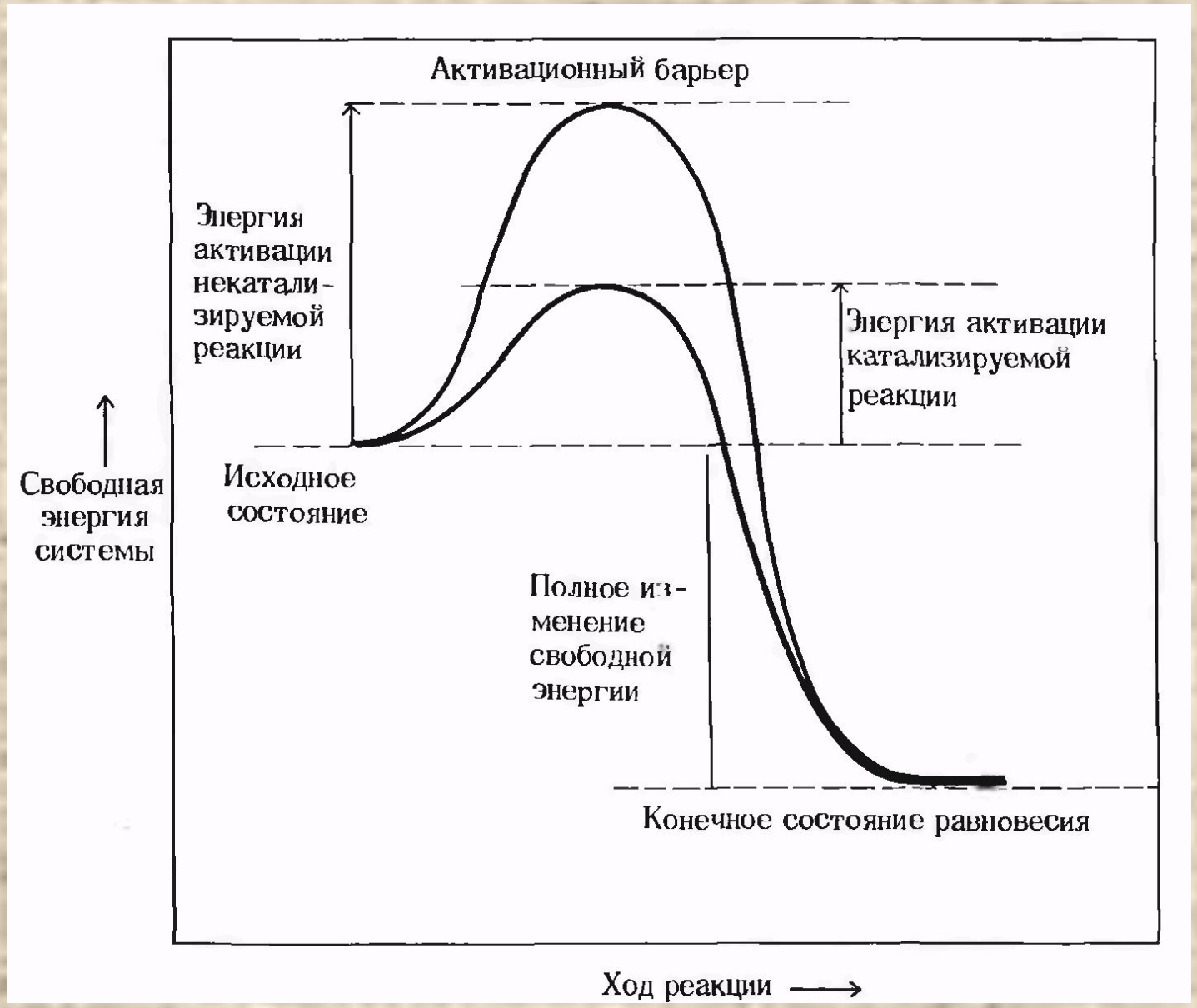


Лигазы (синтетазы)

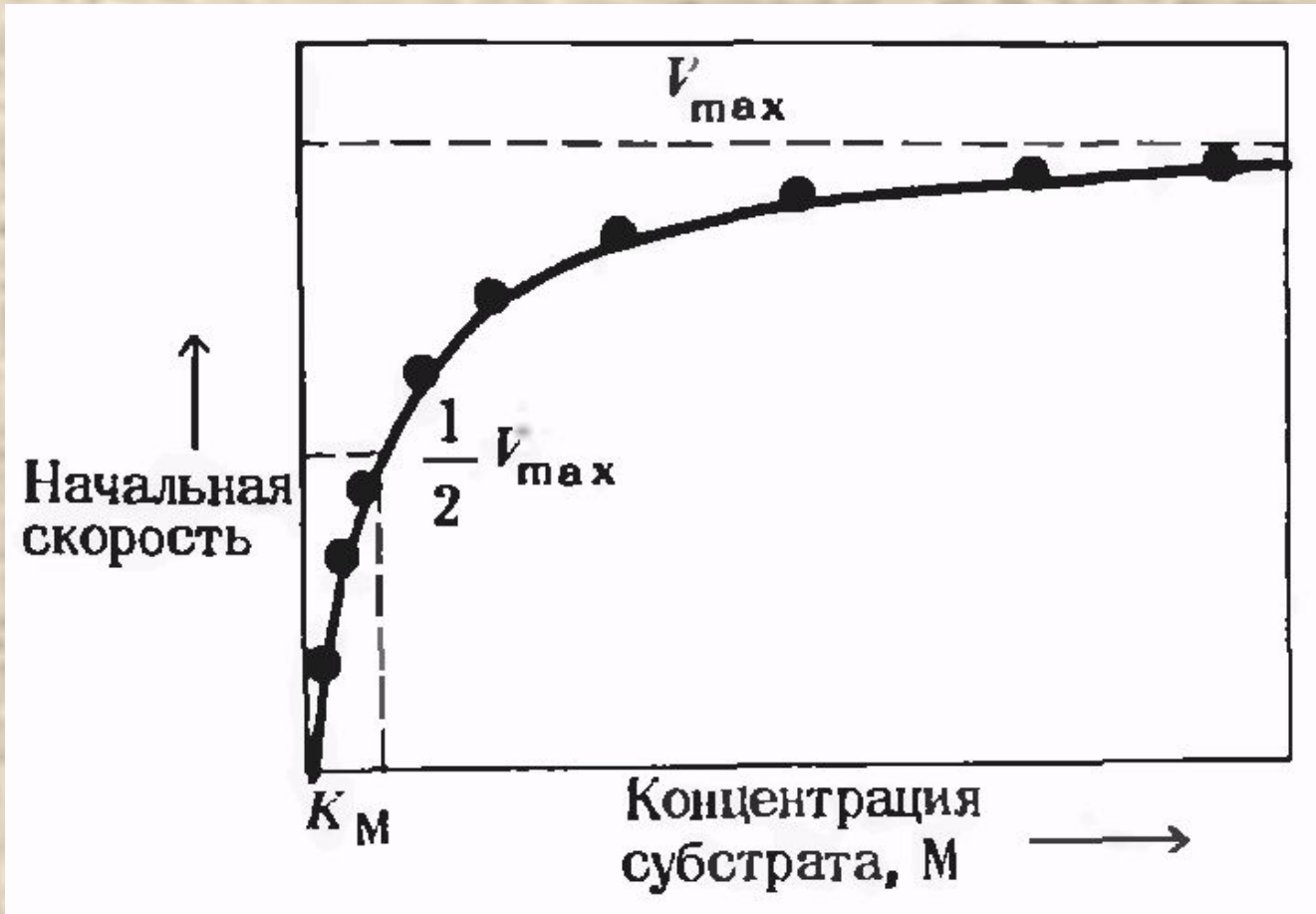
Е.С.6.1. – образуют углерод-кислородные связи
Е.С.6.2. – образуют углерод-сера связи
Е.С.6.3. – образуют углерод-азотные связи
Е.С.6.4. – образуют углерод-углеродные связи
Е.С.6.5. – образуют фосфат эфирные связи.

Е.С.6.3. образующие углерод-азотные связи
Е.С.6.3.1. кислота-аммиак (или амид) лигазы (амид синтазы)
Е.С.6.3.1.1. аспарат-аммиак лигаза.

Кинетика ферментативных реакций



Кинетика ферментативных реакций



Влияние концентрации субстрата на начальную скорость катализируемой ферментом реакции. Из такого графика можно определить величину *V* только путем аппроксимирования. Точное определение этой величины в данном случае невозможно, так как по мере повышения концентрации субстрата начальная скорость реакции лишь приближаете к *V*, но никогда ее не достигает. Концентрация субстрата, при которой скорость реакции составляет половину максимальной, численно равна К'м константе Михаэлиса - Ментен.

Кинетика ферментативных реакций

Виктор Генри (1903 г.)

Леонор Михаэлис, Мод Ментен (1913 г.)

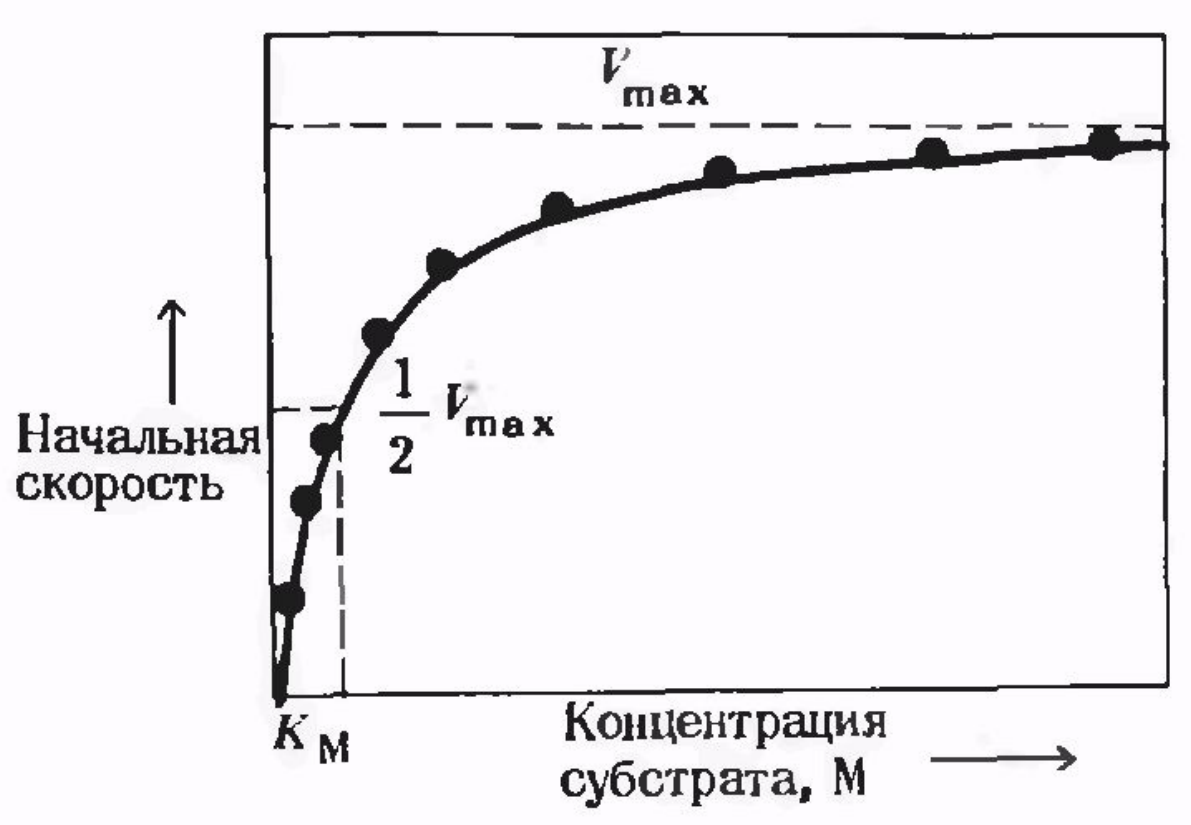
$$E + S \rightleftharpoons ES$$

$$ES \rightleftharpoons E + P$$

$$E + S \rightleftharpoons ES$$

Кинетика ферментативных реакций

Модель Михаэлиса-Ментон



Кинетика ферментативных реакций

Модель Михаэлиса-Ментон

$K_м$* (константа Михаэлиса-Ментен) – *концентрация специфического субстрата, при которой данный фермент обеспечивает скорость реакции, равную половине ее максимальной скорости

Кинетика ферментативных реакций

Модель Михаэлиса-Ментон

Уравнение Михаэлиса-Ментен

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

где v_0 начальная скорость при концентрации субстрата [S], V_{max} – максимальная скорость и $K_м$ – константа Михаэлиса-Ментен для данного фермента, соответствующая определенному субстрату

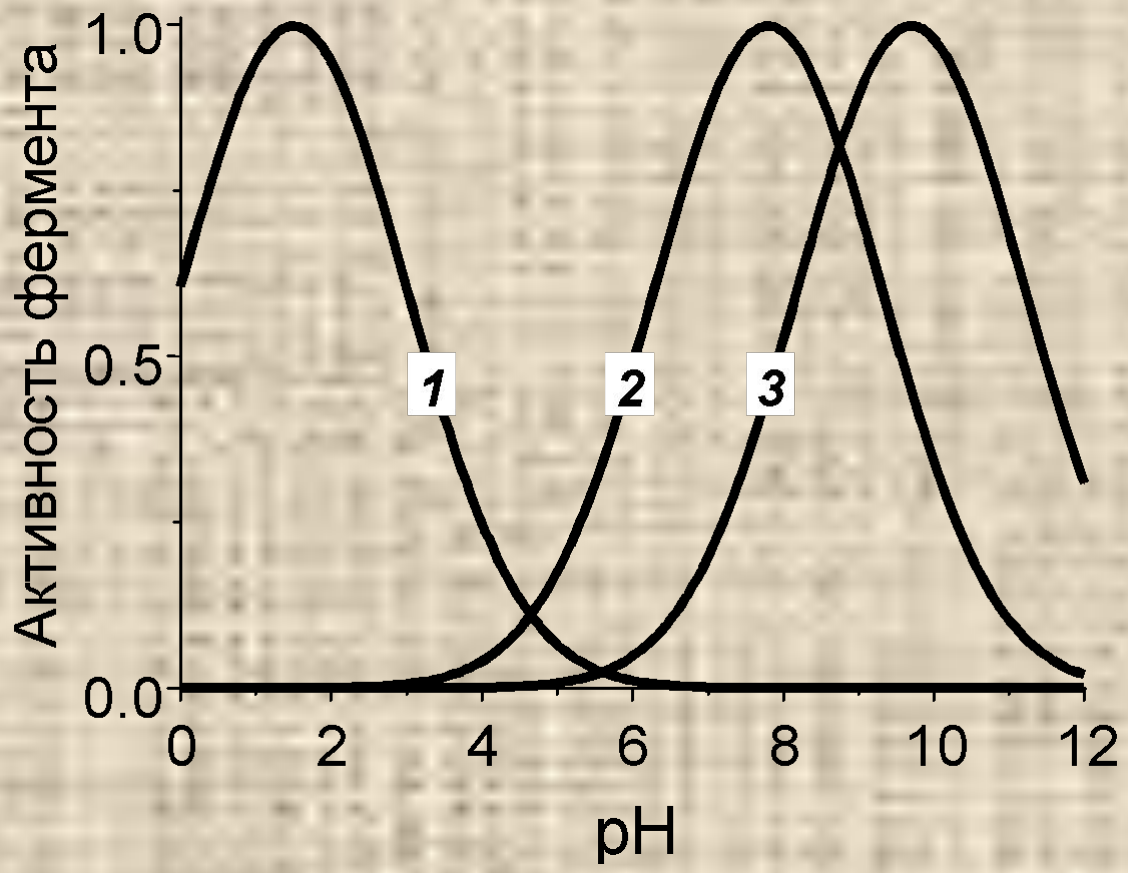
Кинетика ферментативных реакций

Модель Михаэлиса-Ментон

Значения констант Михаэлиса-Ментен ($K_м$) для некоторых ферментов		
Фермент	**Субстрат**	**$K_м$**
Каталаза	H_2O_2	25
Гексокиназа (мозг)	ATP	0,4
	D-глюкоза	0,05
	D-фруктоза	1,5
Карбоангидраза	НСОз	9
Химотрипсин	Глицил-тирозинил-глицин	108
	N-бензоилтирозинамид	2,5
β-Галактозидаза	D-лактоза	4,0
Треониндегидратаза	L-треонин	5,0

Кинетика ферментативных реакций

Зависимость скорости ферментативных реакций от pH



Зависимость активности ферментов (для удобства сравнения приведены активности, нормированные к единице) от pH.
***1* — Пепсин,**
***2* — рибонуклеаза,**
***3* — аргиназа**

Кинетика ферментативных реакций

Зависимость скорости ферментативных реакций от pH

Оптимальные значения pH для некоторых ферментов

Фермент	Оптимум pH
Пепсин	1,5
Трипсин	7,7
Катал аза	7,6
Аргиназа	9,7
Фумараза	7,8
Рибонуклеаза	7,8

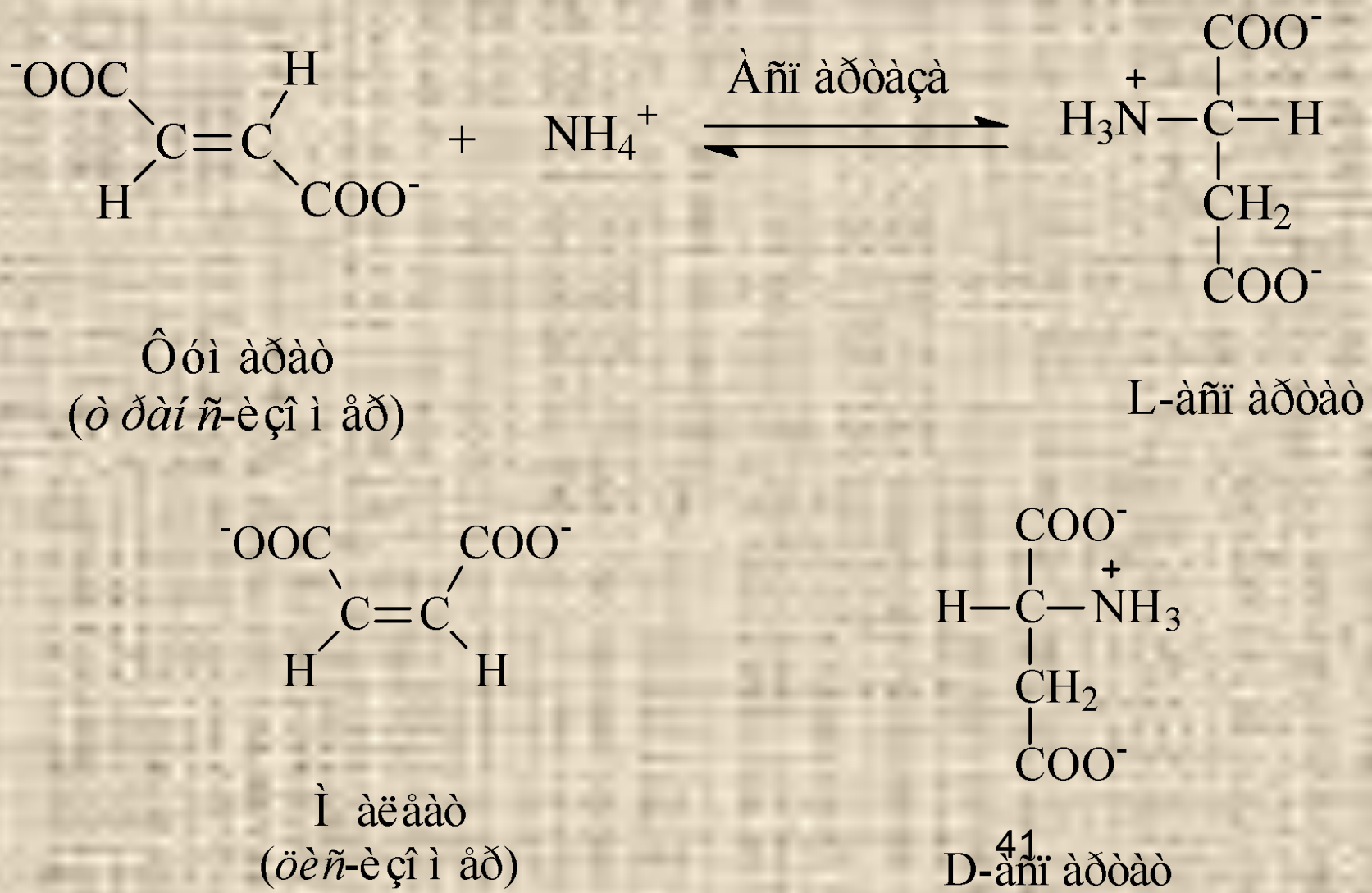
Кинетика ферментативных реакций

Количество фермента можно определить по его активности

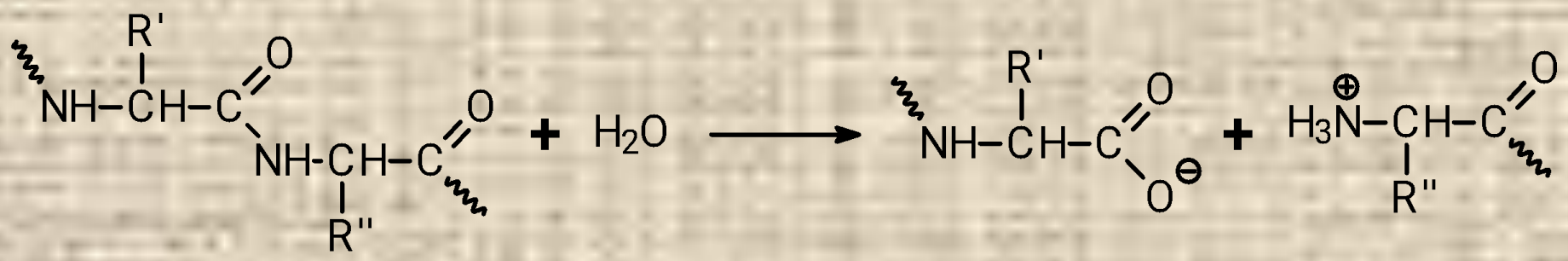
За единицу активности фермента принимается такое количество фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоля субстрата (1 мкмоль = 10–6 моля) в 1 мин при 25°С в оптимальных условиях действия фермента.

Удельной активностью называется число единиц ферментативной активности в расчете на 1 мг белка.

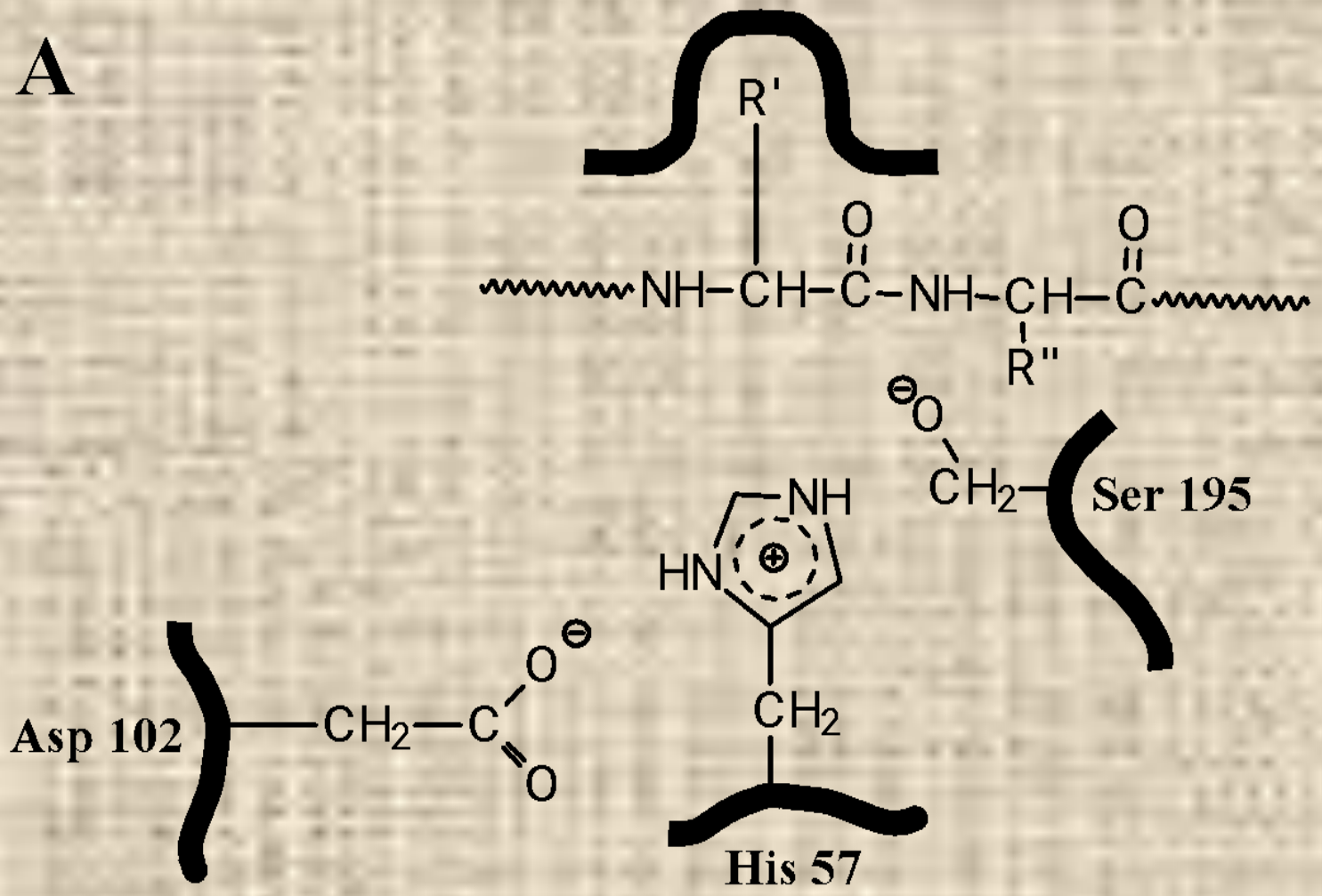
Специфичность ферментов по отношению к субстратам



Пространственное строение активного центра ферментов

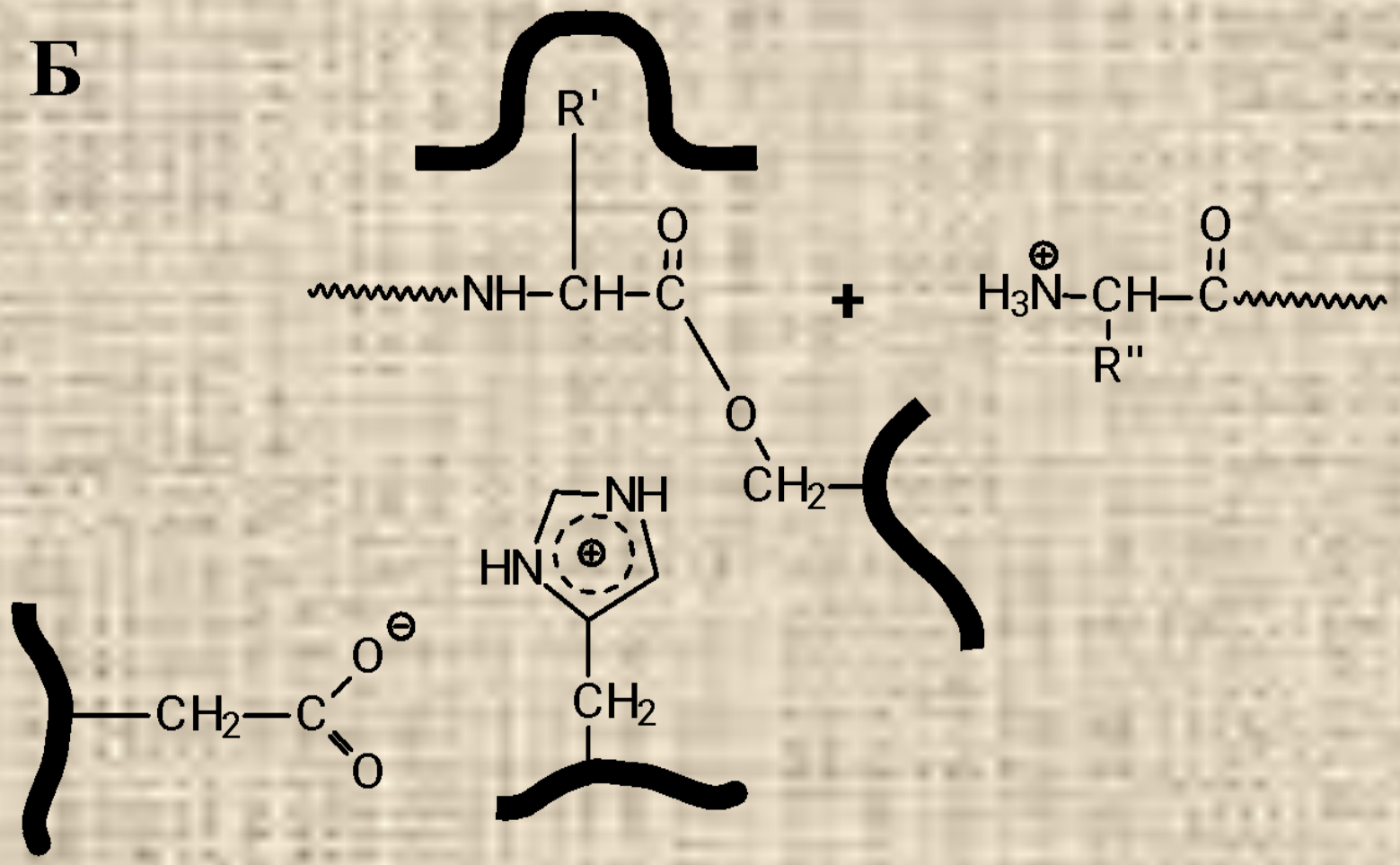


Пространственное строение активного центра ферментов

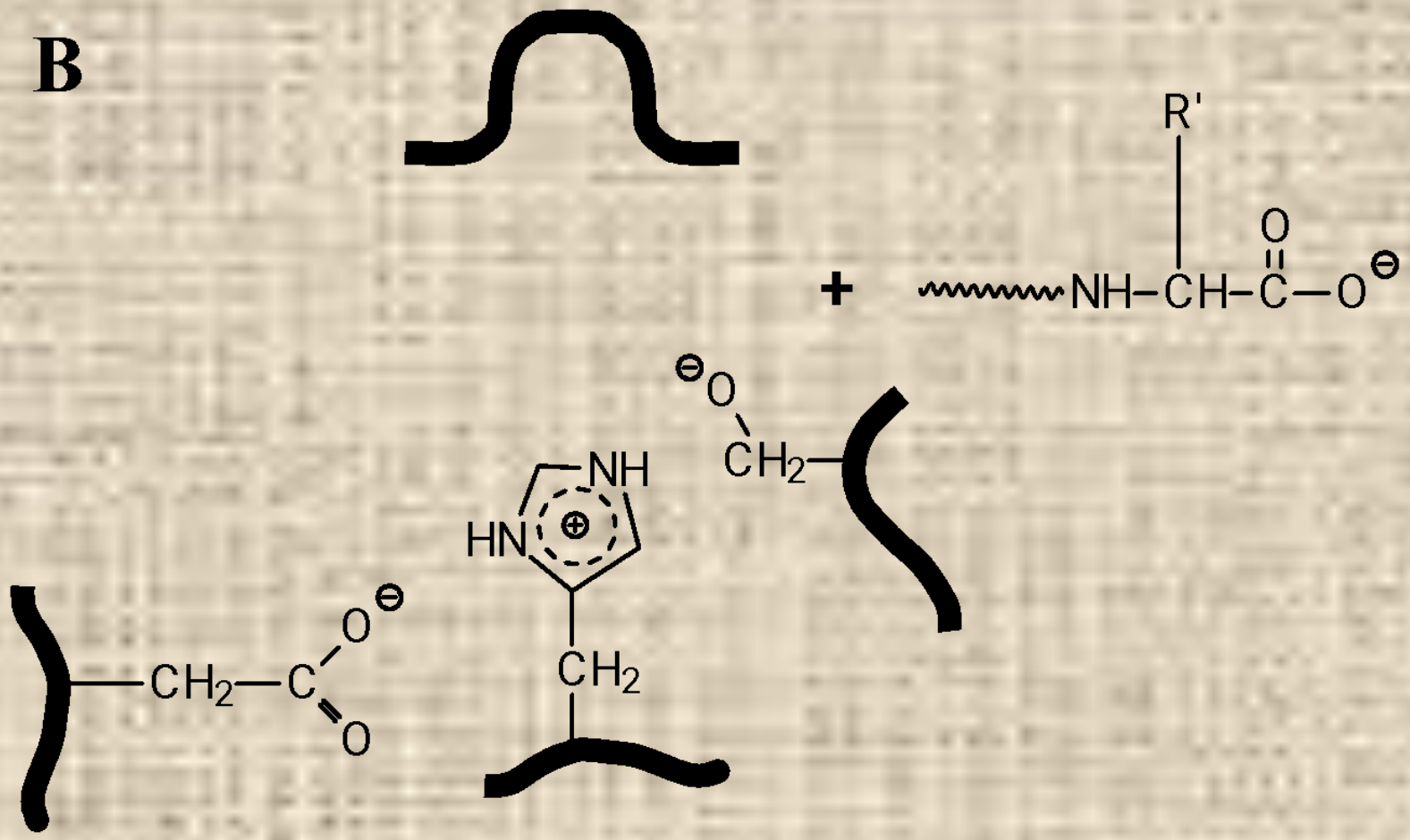


Пространственное строение активного центра ферментов

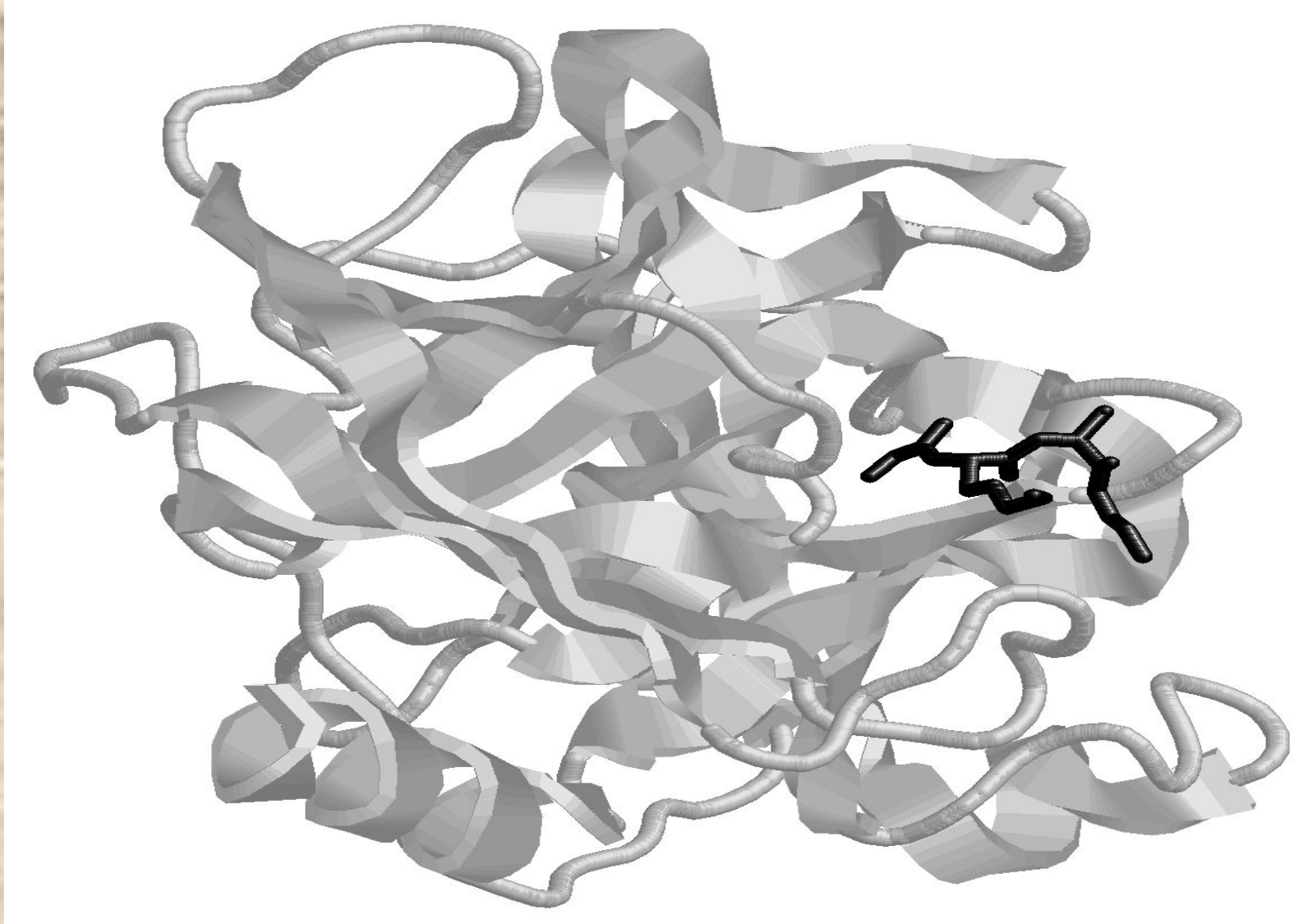
Б



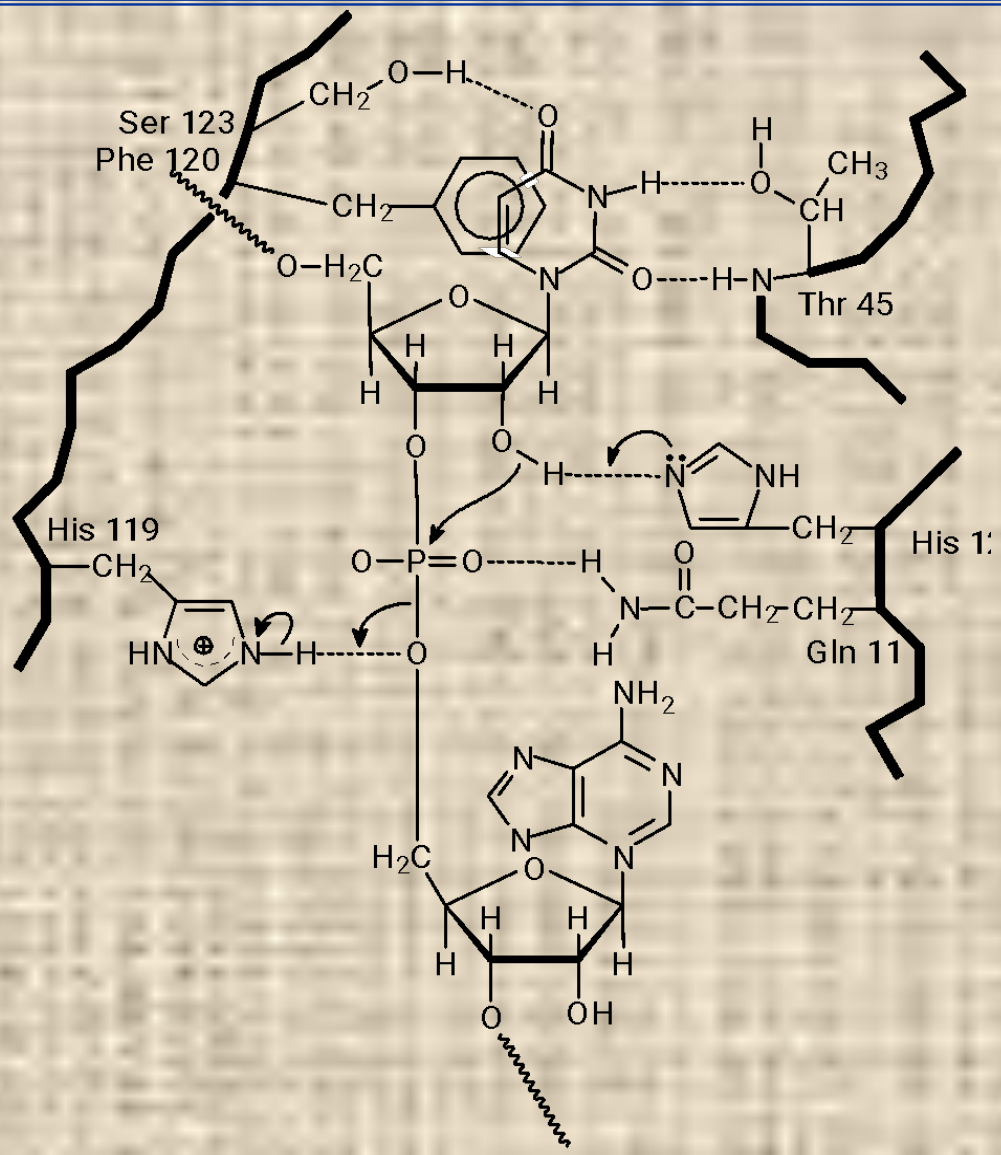
Пространственное строение активного центра ферментов



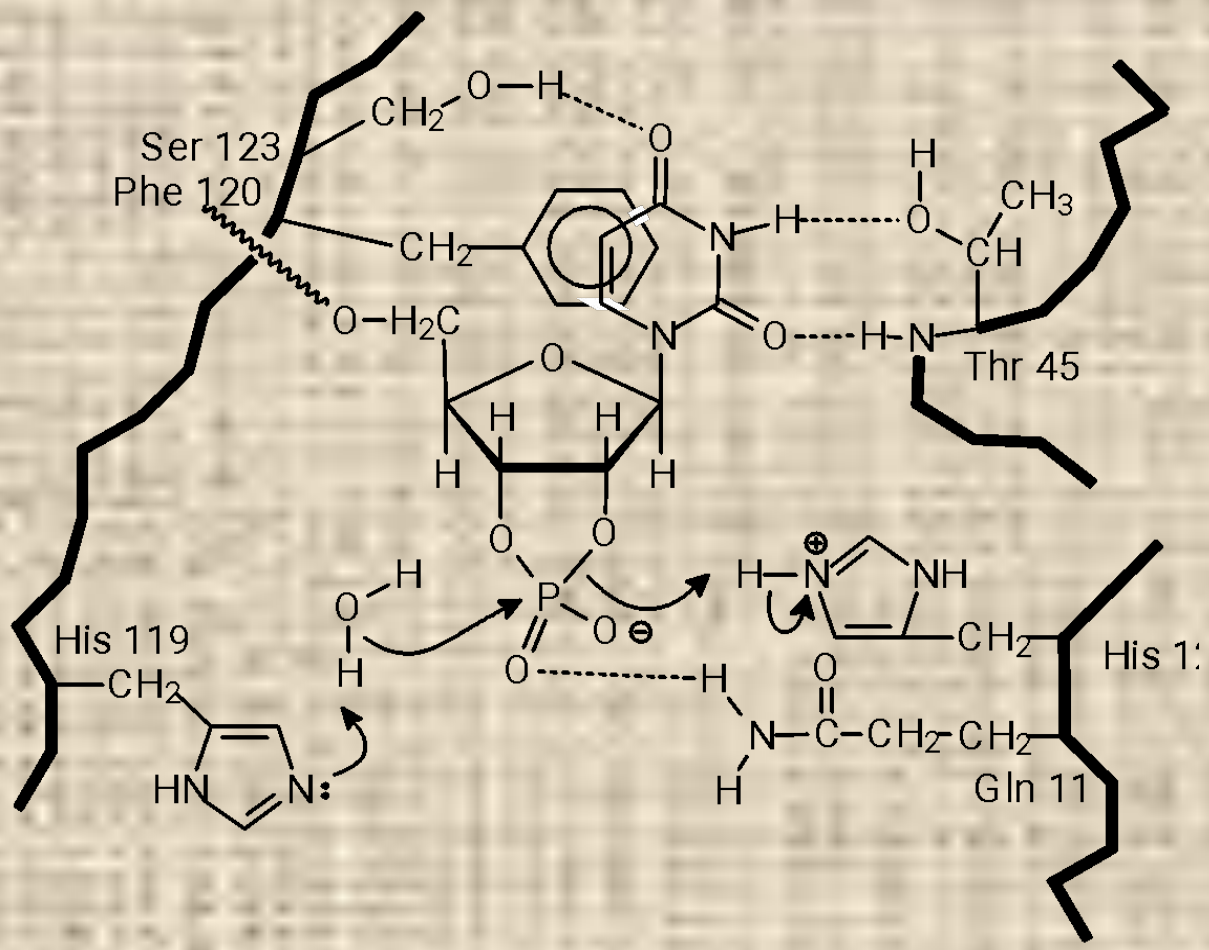
Пространственное строение активного центра ферментов



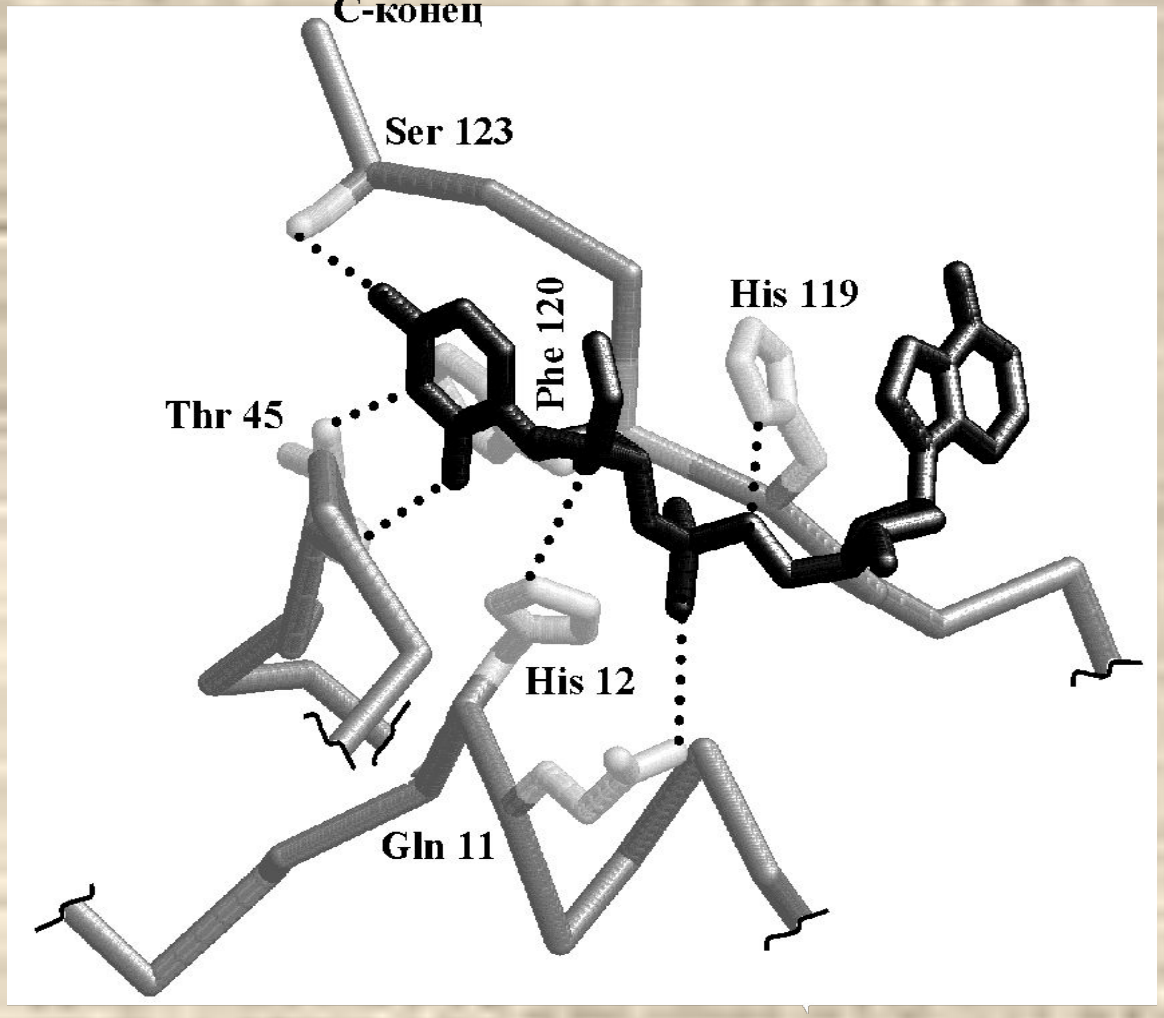
Пространственное строение активного центра ферментов



Пространственное строение активного центра ферментов

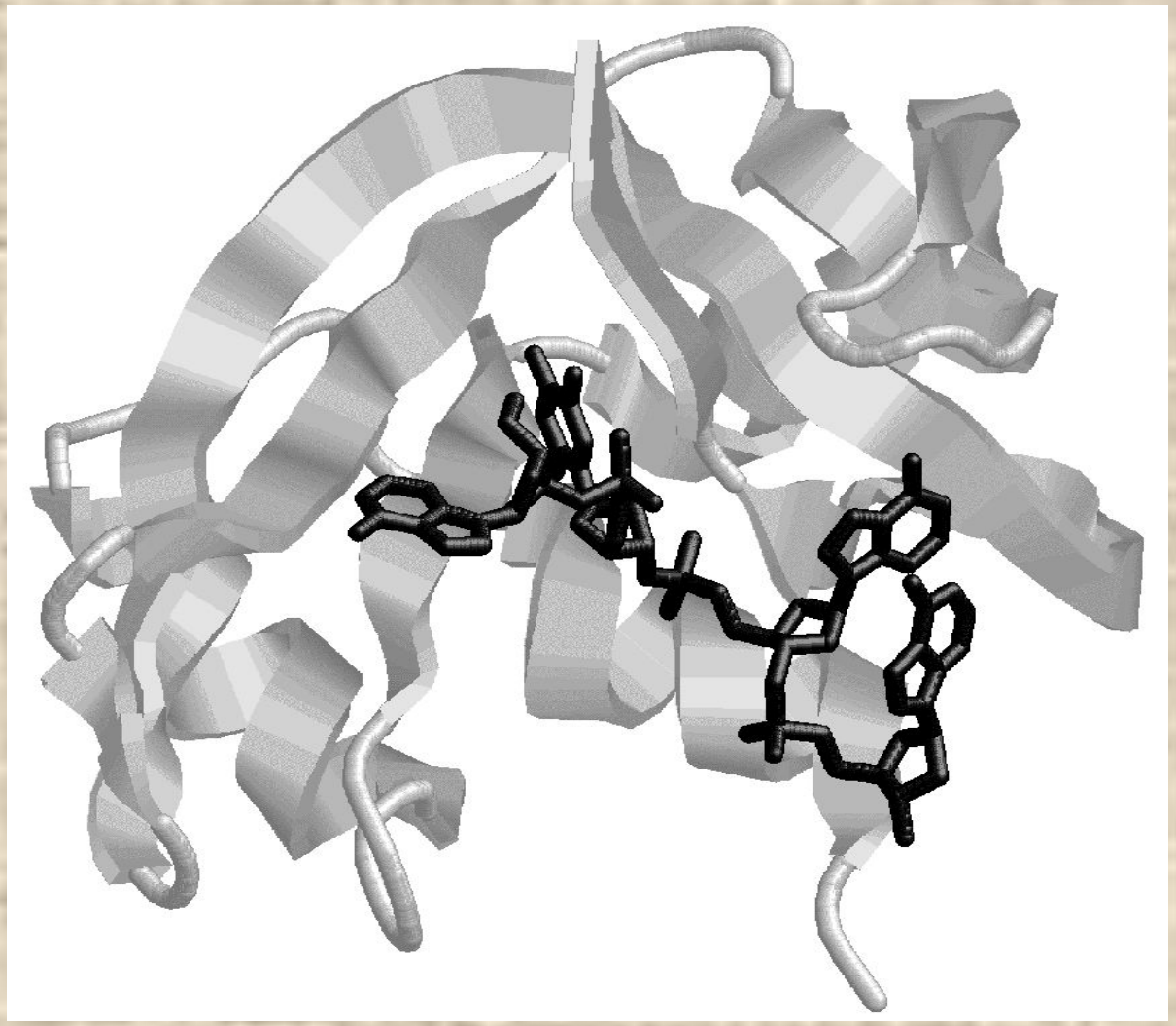


Пространственное строение активного центра ферментов



Трехмерная структура активного центра рибонуклеазы А по данным рентгено-структурного анализа. Для удобства показаны лишь участки полипептидной цепи несущие связывающие и каталитические группы. Полипептидые цепи представлены ходом пептидного остова (темно-серые), связывающие и каталитические группы — палочковыми моделями (светло-серые), модель субстрата [уридилил (3´→5´)аденозин] — черной палочковой моделью. Водородные связи обозначены пунктиром

Пространственное строение активного центра ферментов



Укладка субстрата [аденилил (3´→5´)уридилил (3´→ 5´)аденилил(3´→5´) аденозина] в третичной структуре фермента

Факторы, определяющие каталитическую эффективность ферментов

- Сближение и ориентация
- Напряжение и деформация; индуцированное соответствие
- Общий кислотно-основной катализ
- Ковалентный катализ