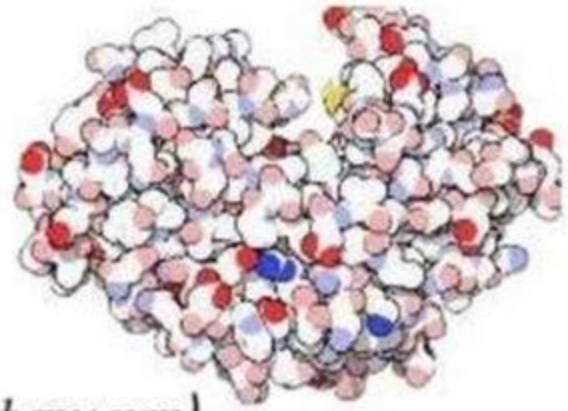
ФЕРМЕНТЫ

- ФЕРМЕНТЫ – это биологические катализаторы белковой природы, ускоряющие все химические реакции, протекающие в живом организме.
- В организме ферменты синтезируются в активной форме и в неактивной форме.
- Неактивная форма – профермент.

Строение фермента

Подавляющая часть ферментов – белки.



ФЕРМЕНТЫ

- Простые → только белок
- Сложные (*холофермент*) → белок (*апофермент*) + небелковая часть (*кофермент*)

Кофермент или кофактор (отделяемая часть)

Простетическая группа (не отделяемая часть)

Коферменты (КоЕ):

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

Особенности действия ферментов

Общее с неорганическими катализаторами:

1. Ускоряют только термодинамически возможные реакции
2. Не изменяют состояние равновесия реакций, а только ускоряют его достижение
3. реакции ускоряют значительно, в 10^8-10^{14} раз
4. Действуют в малых количествах
5. В реакциях не расходуются
6. Чувствительны к активаторам и ингибиторам.
7. Активность ферментов регулируется специфическими и неспецифическими факторами
8. Ферменты действуют только в мягких условиях (t = 36-37°С, pH ~ 7,4, атмосферное давление)
9. Обладают широким диапазоном действия, катализируют большинство реакций в организме
10. Для ферментов характерна высокая специфичность

субстратная специфичность:

- абсолютная (1 фермент - 1 субстрат),
- групповая (1 фермент – несколько похожих субстратов),
- стереоспецифичность (ферменты работают с субстратами L или D).

- ***каталитическая специфичность*** (ферменты катализируют реакции одного из типов химических реакций)

Номенклатура ферментов

1.Рабочая *(удобная)*

Рабочее название фермента

- **= название S + «-аза»**

  мальтоза + «-аза» = мальтаза

- **= название S + *тип реакции* + «-аза»**

  лактат + *дегидрогенизация* + «-аза» = лактатдегидрогеназа (ЛДГ)

- **историческое (тривиальное) название**

  пепсин, тромбин, ренин

Классификация фермента (шифр)

Классификация ферментов

- Каждый фермент имеет номер.

например: α – амилаза КФ 3.2.1.1.,
где КФ – классификация фермента,
3 – класс ф-та (по типу реакции),
2 – подкласс (тип связи в субстрате),
1 – подподкласс (разновидность связи)
1 – номер фермента в подподклассе.

Классификация ферментов

- Согласно международной классификации ферменты делятся на шесть классов по типу катализируемой реакции:
- **1. Оксидоредуктазы**
- **2. Трансферазы**
- **3. Гидролазы**
- **4. Лиазы**
- **5. Изомеразы**
- **6. Лигазы**

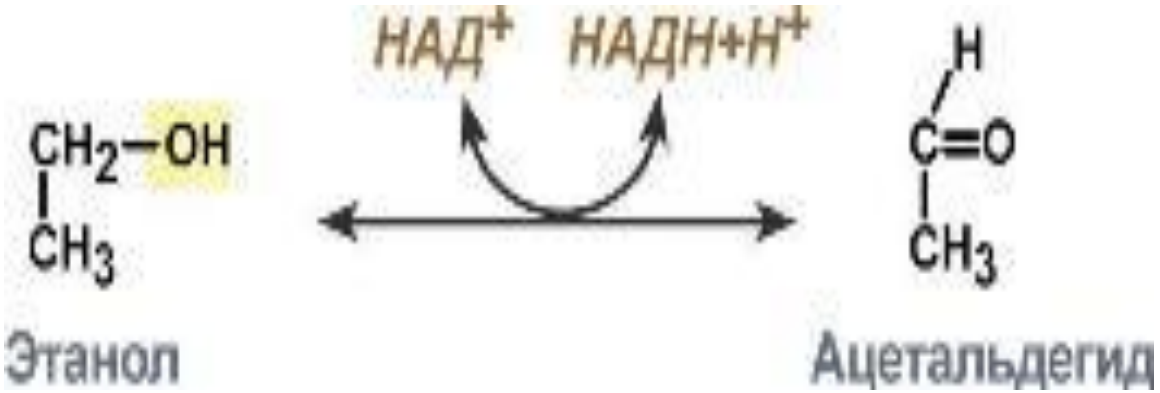
Классификация ферментов

Классы ферментов	Катализируемая реакция	Примеры ферментов
Оксидоредуктазы	Перенос атомов водорода или электронов от одного вещества к другому	Дегидрогеназа, оксидаза
Трансферазы	Перенос группы атомов от одного вещества к другому	Трансминаза, киназа
Гидролазы	Реакции гидролиза	Липаза, амилаза, пептидаза
Лиазы	Негидролитическое присоединение к субстрату или отщепление от него группы атомов	Декарбоксилаза, фумараза, альдолаза
Изомеразы	Внутримолекулярная перестройка	Изомереза, мутаза
Лигазы	Соединение молекул, сопряжённое с распадом АТФ	Синтетаза

Оксидоредуктазы

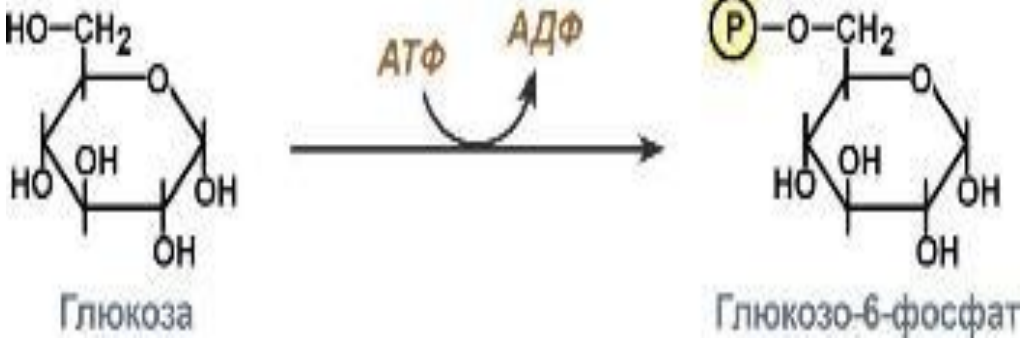
- Ферменты этого **класса** катализируют **окислительно-восстановительные реакции**, лежащие в основе биологического окисления. Класс насчитывает 22 подкласса. Коферментами этого класса являются **НАД, НАДФ**, **ФАД**, **ФМН**, **кислота**.
- На подподклассы деление происходит в зависимости от акцептора протонов и электронов

- Пример



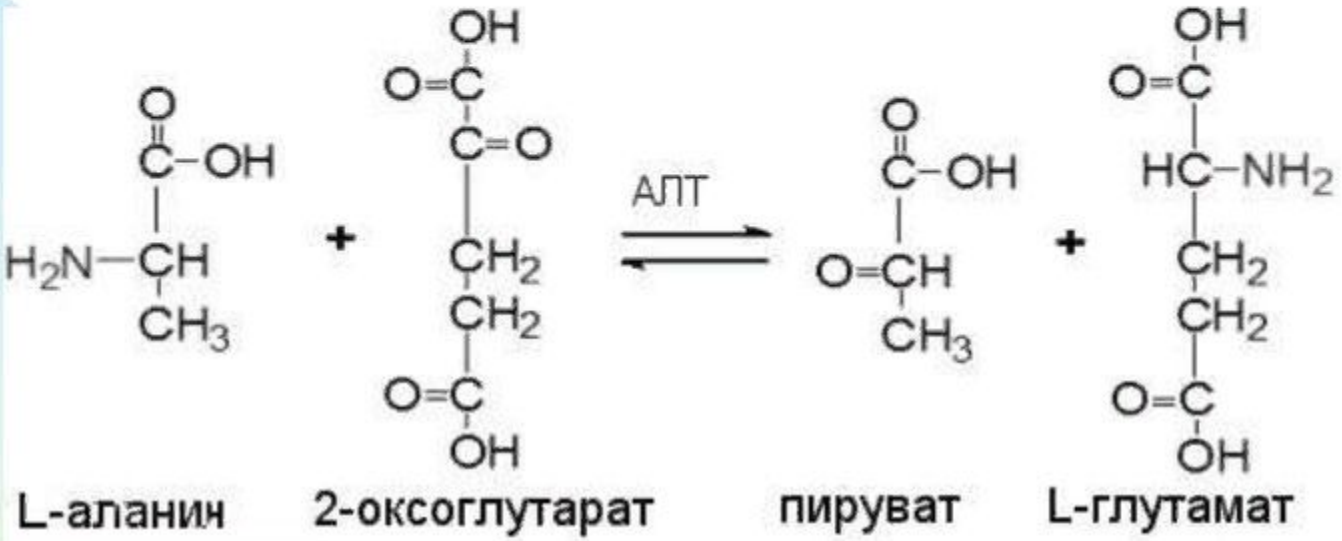
Трансферазы

- Коферментами являются **пиридоксальфосфат**, **коэнзим А**, **тетрагидрофолиевая кислота**, **метилкобаламин**. Класс подразделяется на 9 подклассов в зависимости от строения переносимых групп.
- Часто встречается рабочее название трансфераз – **киназы**. Это трансферазы, катализирующие перенос фосфата от АТФ на субстрат (моносахариды, белки и др), т.е. **фосфотрансферазы**.

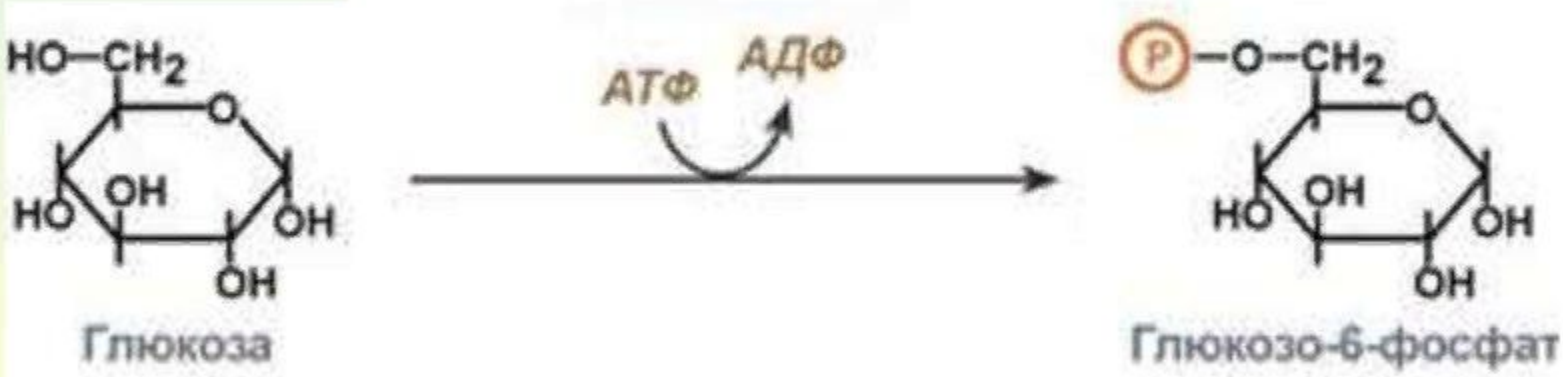


Трансферазы: Примеры.

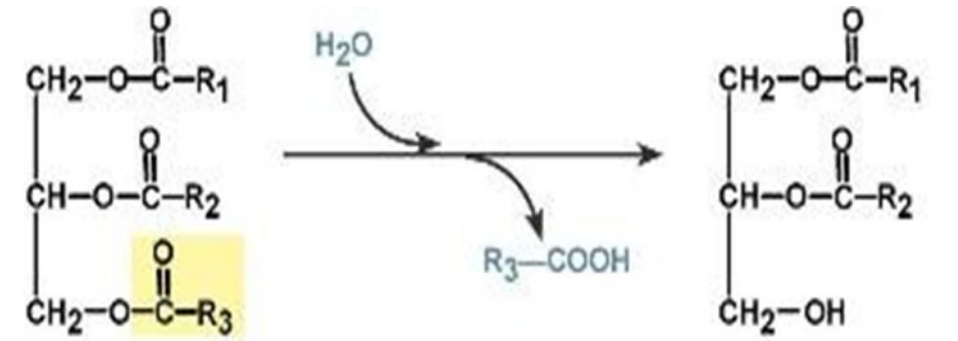
Аланинаминотрансфераза (АлАт)



Гексокиназа (ГК)

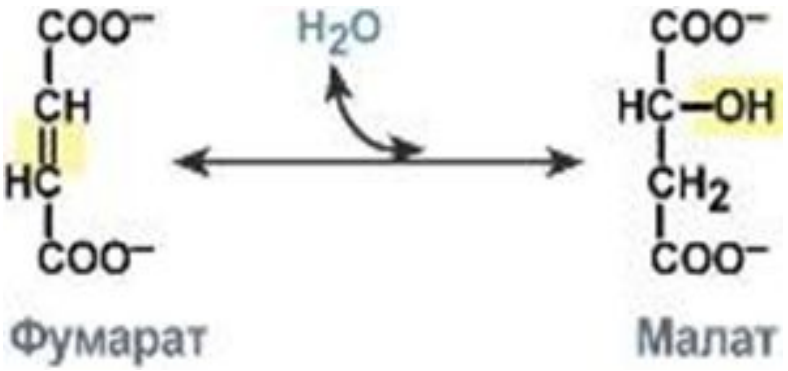


- **Гидролазы**
- Гидролазы – ферменты, осуществляющие разрыв внутримолекулярных связей в субстрате путем присоединения элементов H_2O, подразделяются на 13 подклассов. Сохранены тривиальные названия, например, пепсин, трипсин. Коферменты отсутствуют.
- Гидролазы широко представлены ферментами желудочно-кишечного тракта (пепсин, трипсин, липаза, амилаза и другие).


H2O
R3—COOH
Триацилглицерол
Диацилглицерол

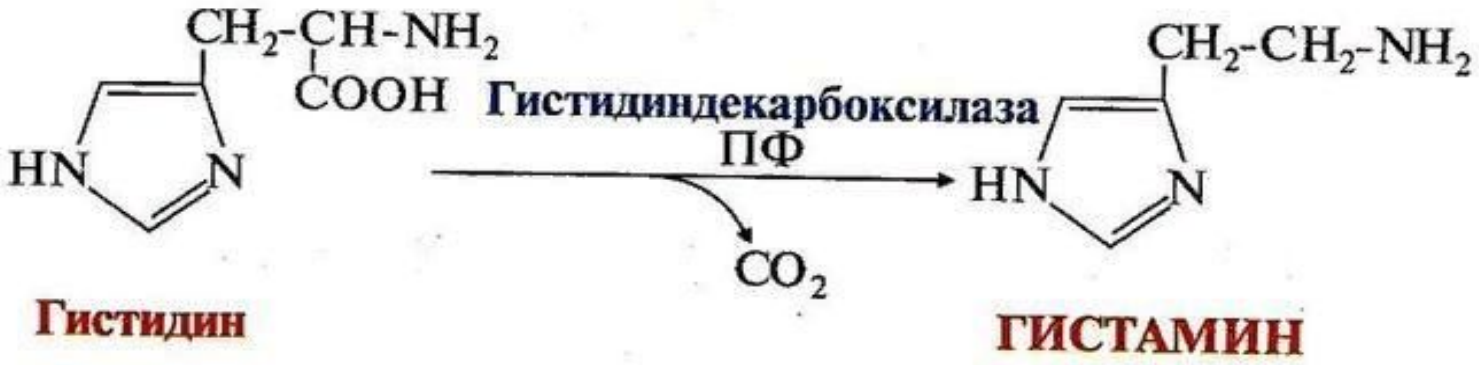
Лиазы

- Лиазы являются сложными ферментами. Коферментами служат **пиридоксальфосфат**, **тиаминдифосфат**, участвует **магний**, **кобальт**.
- Ферменты делятся на **подклассы** в зависимости от природы атакуемой связи.



Класс 4. Лиазы

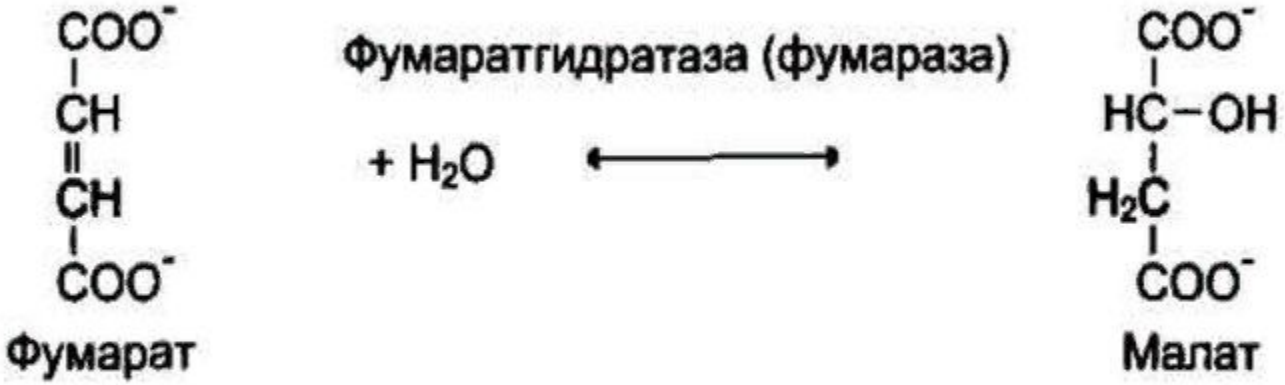
- типы реакций:
- 1) расщепление связей негидролитическим путем, отщепление простых молекул (CO2, H_2O, NH_2, SH_2). Подклассы характеризуют вид расщепляемой связи (C-C, C-N, C-O, C-S, P-O)
- ✓ в реакции декарбоксилирования аминокислот участвует кофермент пиридоксальфосфат (ПФ, vit B6)



Гистидин **ГИСТАМИН**

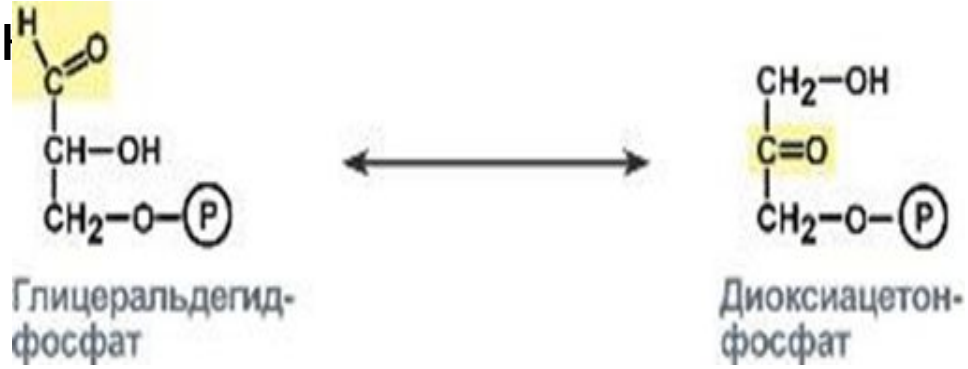
MyShared

Примеры реакций с участием лиаз.



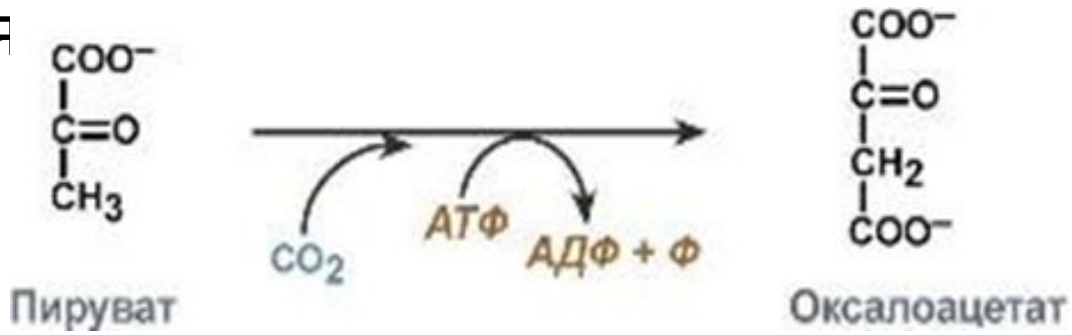
Изомеразы

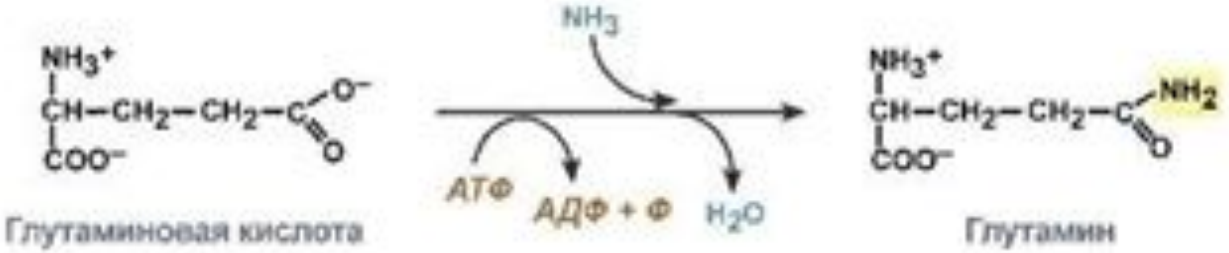
- ферменты, катализирующие изомерные превращения в пределах одной молекулы. Изомеразы – сложные ферменты. К их коферментам относятся **пиридоксальфосфат**, **дезоксиаденозилкобаламин**, **глутатион**, **фосфаты моносахаридов** (глюкозо-1,6-дифосфат) и др.
- Выделяют **подклассы** изомераз в зависимости от типа реак



Лигазы

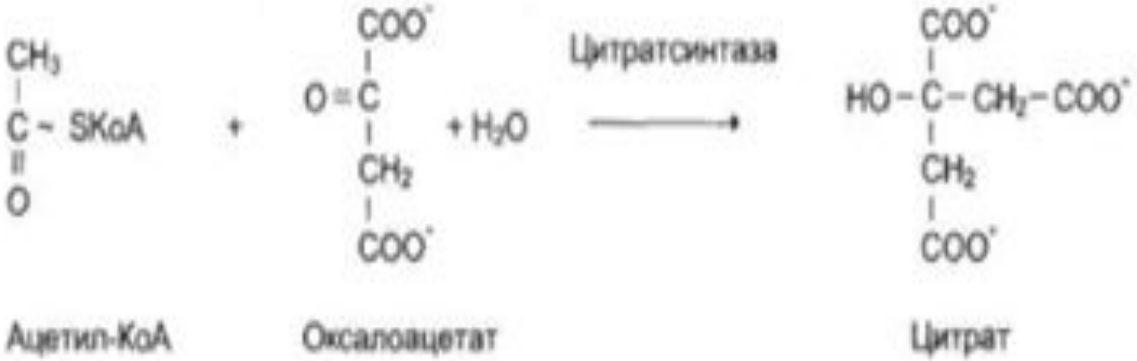
- ферменты, катализирующие присоединение друг к другу двух молекул с использованием энергии высокоэнергетических связей АТФ (или других макроэргов). Лигазы – сложные ферменты. Они содержат **нуклеотидные** (УТФ), **биотиновые** (витамин Н), **фолиевые** коферменты. Выделя





Глутаминсинтета
за

Когда источник энергии другое макроэргическое соединение – **синтазы.**



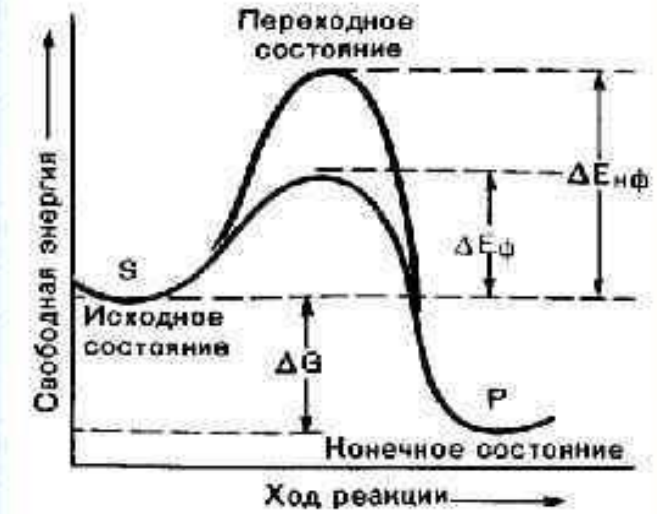
Механизмы ферментативных реакции

При ферментативном катализе реализуются те же механизмы, которые возможны без участия ферментов:

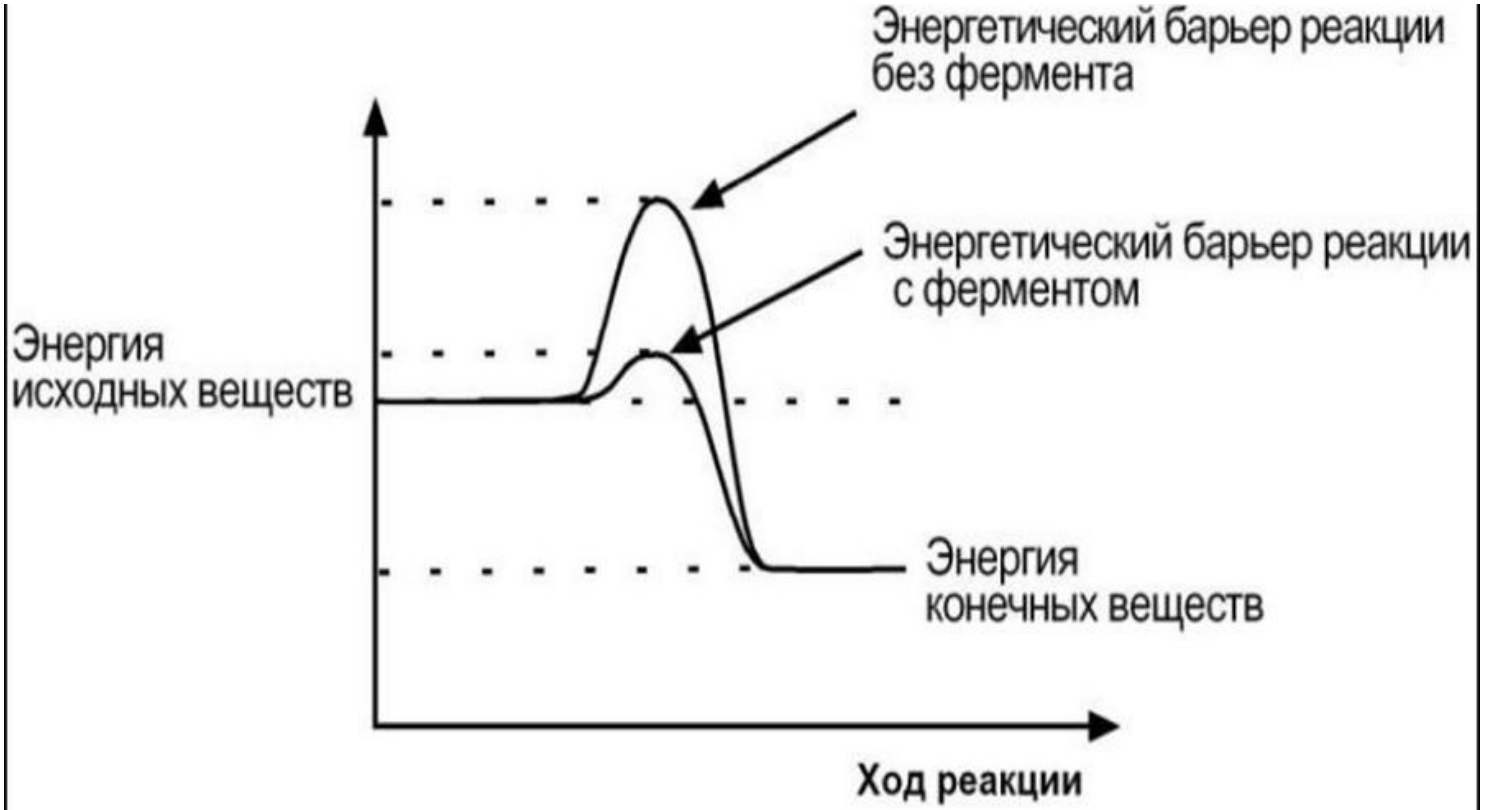
1. **Кислотно-основные реакции** –в активном центре фермента находятся группы $-COO^-$ и $-NH_3^+$, которые способны присоединять и отдавать Н.
2. **Реакции присоединения (отщепления, замещения)** электрофильные, нуклеофильные – в активном центре фермента находятся гетероатомы смещающие электронную плотность.
3. **Окислительно-восстановительные реакции** – в активном центре фермента находятся атомы, имеющую разную электроотрицательность
4. **Радикальные реакции**.

Механизм действия ферментов

Энергия активации – это дополнительное количество энергии, которое необходимо дать молекуле для преодоления энергетического барьера (или для достижения переходного состояния), т.е. это энергия, необходимая для перевода всех молекул моля вещества в активированное состояние. Ферменты ускоряют реакцию путем *снижения энергии активации* за счет увеличения числа активизированных молекул, которые становятся реакционноспособными на более низком энергетическом уровне.

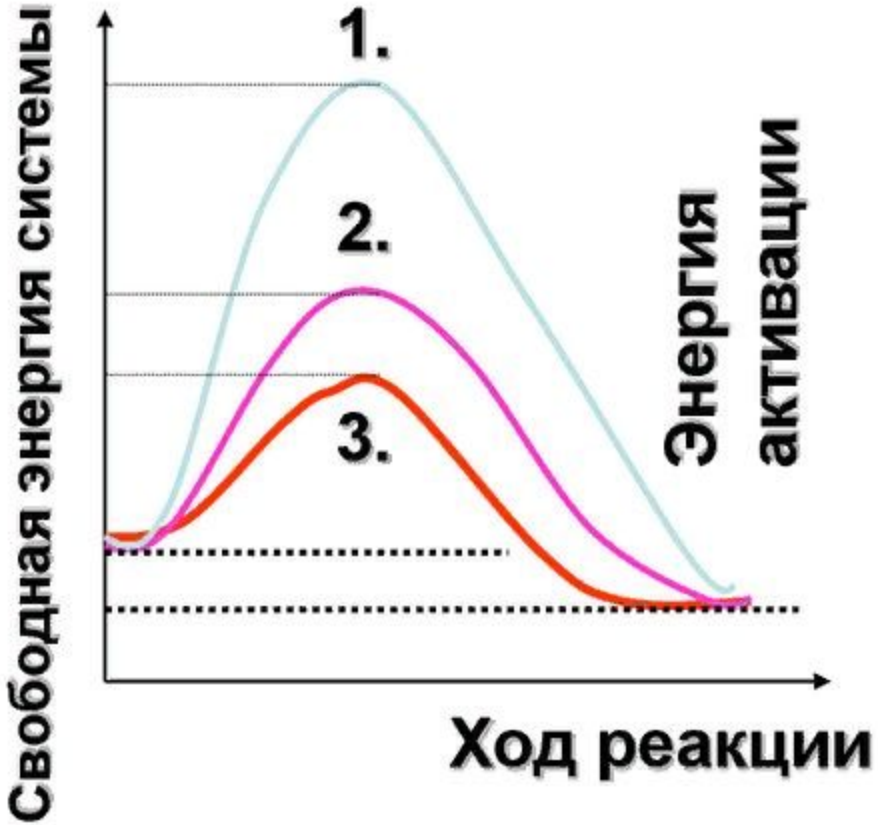


Изменения свободной энергии катализируемой и некаталиируемой реакции. S – исходный субстрат; P – продукт; ΔЕнф – энергия активации неферментативной реакции; ΔЕф – энергия активации ферментативной реакции; ΔG – стандартное изменение свободной энергии.



Величина энергии активации реакции
с ферментом и без него

- **ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ БАРЬЕР РЕАКЦИИ** – кол-во энергии, которое необходимо молекуле, чтобы вступить в химическую реакцию.
- **ЭНЕРГИЯ АКТИВАЦИИ** - кол-во энергии, которое необходимо сообщить молекуле для преодоления энергетического барьера.



Энергия активации:

1. В спонтанной реакции – 18 ккал/моль
2. При использовании катализатора Fe^{2+} – 12 ккал/моль
3. В присутствии фермента каталазы – 5 ккал/моль

Энергетика ферментативных реакций

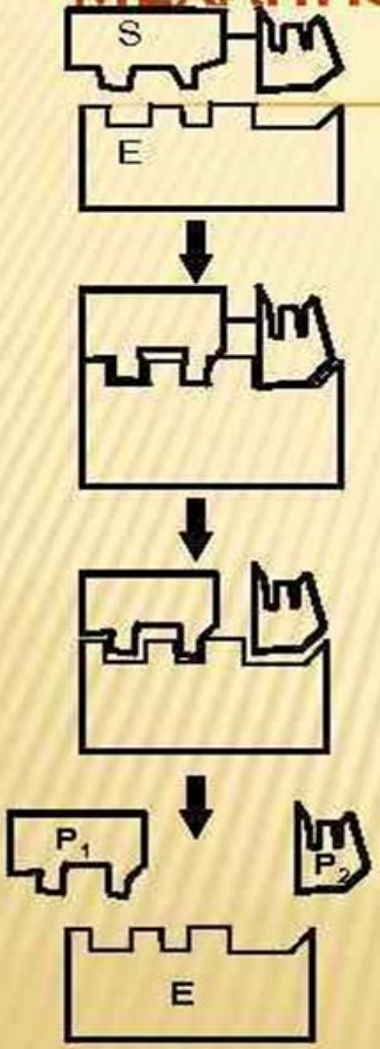
Ферменты снижают энергию активации

- Скорость химической реакции зависит от концентрации реагирующих веществ
- В комплексе с ферментами субстраты превращаются в более устойчивые промежуточные соединения, за счет чего их концентрация резко повышается, что способствует ускорению реакции

Механизм действия ферментов состоит в образовании комплекса между ферментом и субстратом за счет образования нековалентных связей (ионных,водородных, гидрофобных). Для образования фермент-субстратного комплекса необходимо, чтобы пространственная форма активного центра фермента была сходна с формой подходящего к нему субстрата. Этот комплекс вступает в химическую реакцию, после чего он распадается, приводя к образованию фермента и продуктов реакции:

Ф + С → ФС* → Ф + П
Фермент
Субстрат
Фермент-субстратный комплекс
Фермент
Продукты реакции

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ



E + S — 1 — Сближение и ориентация субстрата относительно активного центра

ES — 2 — Образование фермент – субстратного комплекса

EP — 3 — Образование нестабильного комплекса фермент - продукт

E + P — 4 — Распад комплекса с высвобождением продуктов реакции

Активный центр фермента

- Активный центр – это часть молекулы фермента, на которой происходит связывание и превращение субстратов.
- АЦ формируется при скручивании белковой молекулы в третичную структуру.

МЕХАНИЗМЫ СПЕЦИФИЧНОСТИ

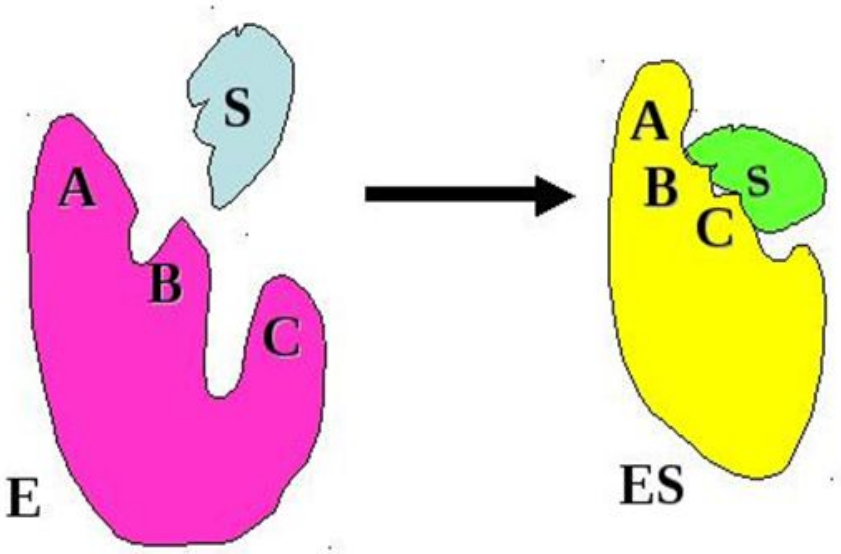
- 1. Теория Фишера (модель «жесткой матрицы» «ключ-замок» – активный центр фермента строго соответствует конфигурации субстрата и не изменяется при его присоединении. Эта модель объясняет абсолютную специфичность.

МЕХАНИЗМЫ СПЕЦИФИЧНОСТИ (II)

- 2. Теория Кошланда – модель («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.

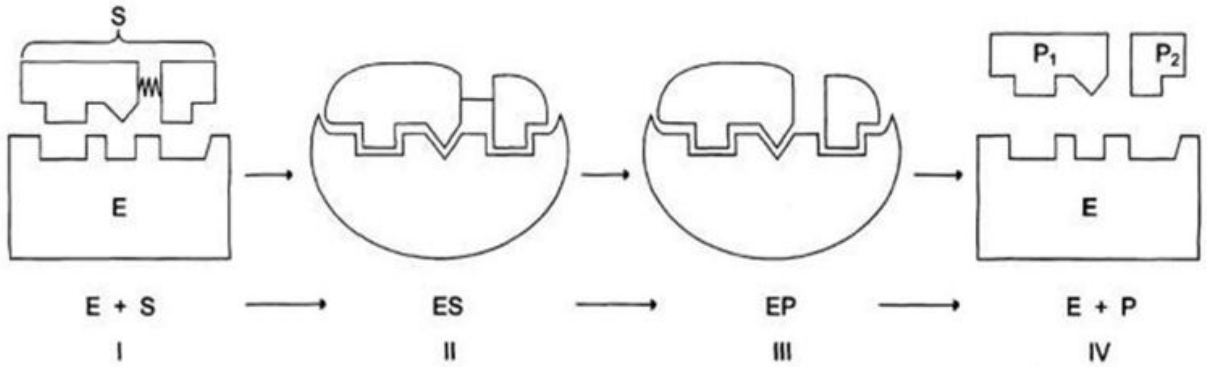
Схематичное представление теории Кошланда

3. Теория «индуцированного соответствия» (современные представления)



При взаимодействии фермента и субстрата оба подвергаются модификации и подстраиваются друг под друга. Возникающие в субстрате изменения способствуют превращению его в продукт.

Этапы ферментативного катализа



- **I** – этап сближения и ориентации субстрата относительно активного центра фермента;
- **II** – образование фермент-субстратного комплекса (ES) (модель Э. Фишера «ключ-замок» и модель Д. Кошленда «индуцированного соответствия»);
- **III** – преобразование субстрата и образование нестабильного комплекса фермент-продукт (EP);
- **IV** – распад комплекса (EP) с высвобождением продуктов из активного центра фермента и освобождением фермента.

Строение ферментов

Ферменты – глобулярные белки, содержащие активный центр

1. Активный центр – это часть молекулы фермента, которая специфически взаимодействует с субстратом и принимает непосредственное участие в катализе

Активный центр, как правило, находиться в нише (кармане)

1. Активный центр

а). Субстратный участок (контактная площадка)

Содержит, не менее трех точек для связывания субстрата, благодаря чему молекула субстрата присоединяется к активному центру единственно возможным способом, что обеспечивает субстратную специфичность фермента

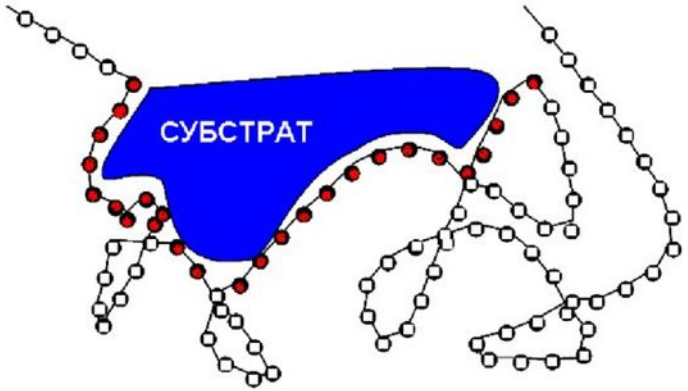
б). Каталитический центр

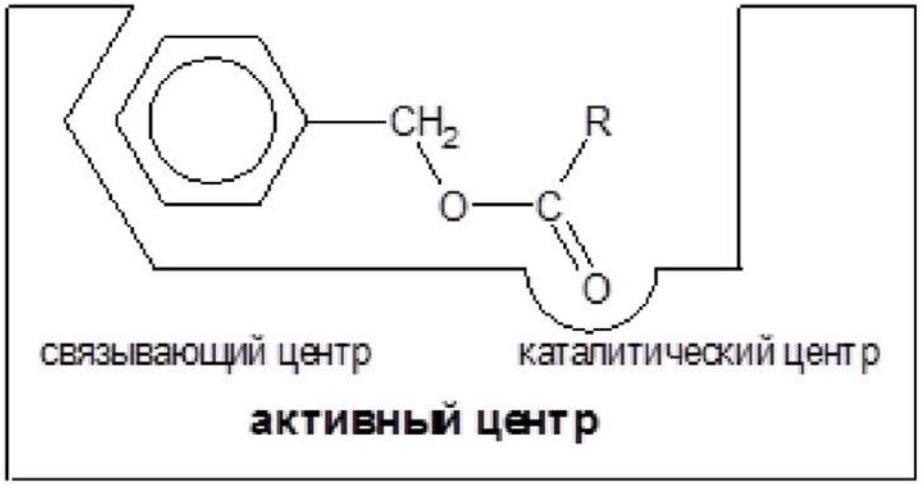
Особенность строения каталитического центра дает возможность ферменту катализировать реакцию с помощью определенного механизма катализа: кислотно-основного, электрофильного, нуклеофильного и т.д.

Т.о. каталитический центр обеспечивает выбор пути химического превращения и каталитическую специфичность фермента

Строение активного центра фермента

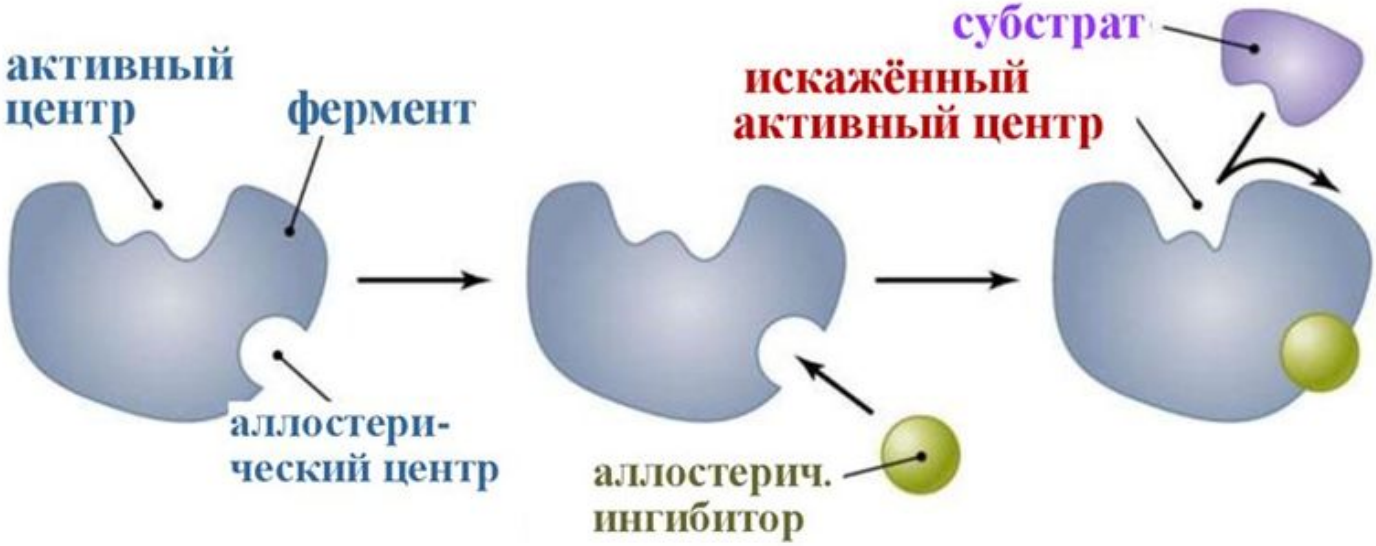
АКТИВНЫЙ ЦЕНТР ФЕРМЕНТОВ



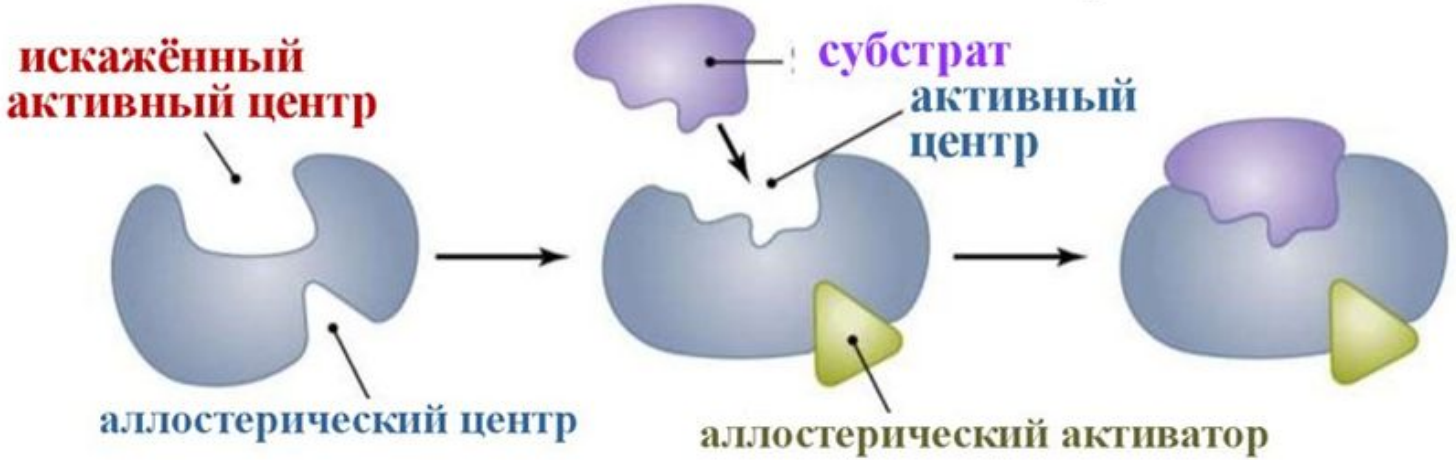


Аллостерическая регуляция активности

Аллостерическое ингибирование



Аллостерическое активирование



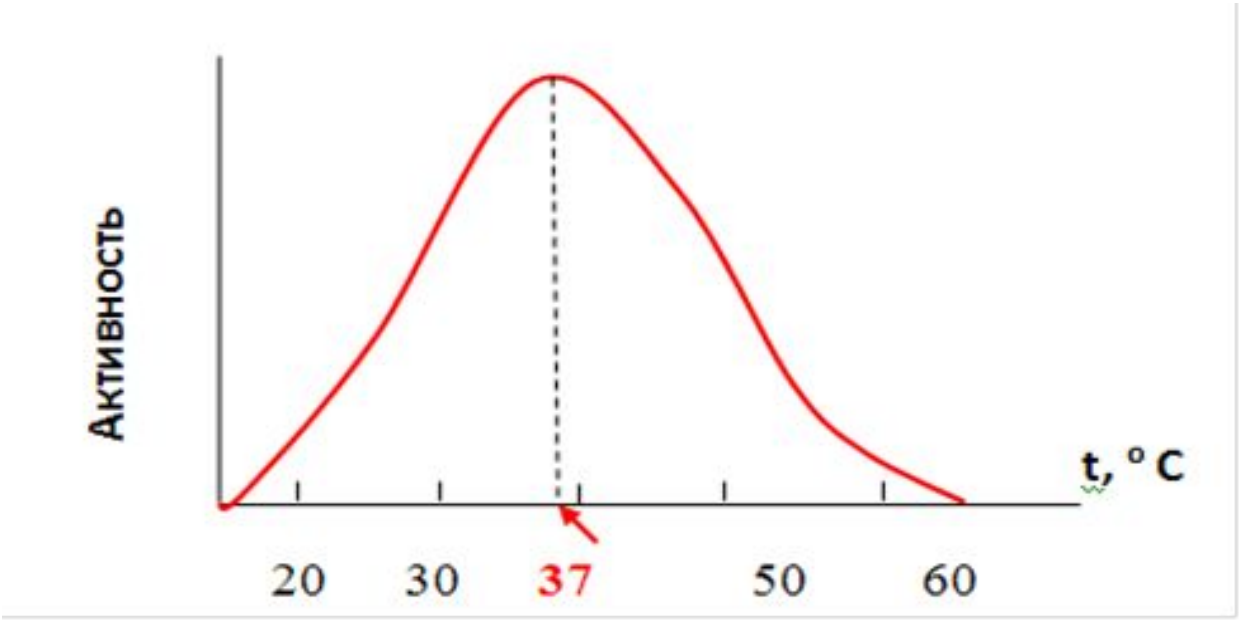
Свойства ферментов

- Ферменты обладают всеми свойствами белков.
- Также обладают уникальными свойствами.
- СПЕЦИФИЧНОСТЬ
- ТЕРМОЛАБИЛЬНОСТЬ
- pH-ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

- Специфичность
- А. Субстратная
- Б. Специфичность действия

1. **Абсолютная** – один фермент действует только на один субстрат (уреаза расщепляет только мочевину; аргиназа расщепляет только аргинин)
2. **Относительная** – один фермент действует на разные субстраты с одинаковым типом связи (пепсин расщепляет пептидный тип связи в молекуле белка, который состоит их различных а/к)
3. **Стереоспецифичность** – некоторые ферменты катализуют превращение только субстратов, которые находятся в конфигурации, цис- или транс-

Термолабильность – это неустойчивость ферментов к действию высоких температур. Это свойство объясняется денатурацией фермента при температурах выше 50оС. При денатурации разрушаются все структуры (кроме первичной) белковой части фермента, полипептидная цепь разворачивается и, следовательно, изменяется пространственная структура фермента и он не может контактировать с субстратом и проявлять свою специфичность.



- Линейное увеличение скорости ферментативной реакции от температуры наблюдается в области 5-25 °С. При дальнейшем повышении температуры скорость увеличивается до определенного максимального значения, а затем происходит ее снижение вследствие тепловой денатурации фермента. Для большинства ферментов ***температурный оптимум*** лежит в области **37-40 °С.**

Зависимость активности ферментов от pH среды

- pH-оптимум действия ферментов лежит в пределах физиологических значений. Исключение составляет пепсин, pH-оптимум которого равен 2.0.

- Влияние изменений pH среды на молекулы фермента заключается в воздействии на состояние и степень ионизации кислотных и основных групп (COOH-группы дикарбоновых аминокислот, SH-группы цистеина, имидазольного азота гистидина и др.).

- При разных значениях pH среды активный центр может находиться в частично ионизированной или в неионизированной форме, что сказывается на третичной структуре белка и соответственно формировании активного фермент-субстратного комплекса.

-COOH АСП или ГЛУ при pH<7 будет нейтральной, а при pH>7 имеет «-» заряд

-NH_2 АРГ, ГИС, ЛИЗ при pH<7 будет имеет «+» заряд, а при pH>7 будет нейтральной

- Кроме того, имеет значение и состояние ионизации субстратов и кофакторов.

- Ферменты проявляют наибольшую активность при ***разном pH*** среды, например пепсин – при pH 1,5, липаза – при pH 8 и т.д.

- pH, при котором наблюдается максимальная активность фермента, называется **pH-оптимумом**. Он зависит от степени ионизации функциональных полярных групп активного центра фермента. При отклонении pH от оптимального значения активность фермента снижается. Это снижение объясняется подавлением ионизации групп активного центра фермента и в результате изменением его пространственной структуры.

АКТИВАЦИЯ И ИНГИБИРОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Активаторы ферментов

- Вещества, повышающие активность ферментов.
- Активаторами могут быть: ионы металлов: натрия, магния, калия, кальция, цинка и др., а также разные химические соединения: белки; желчные кислоты, другие ферменты и пр.

Активаторы ферментов

Фермент	Активатор
Цитохромы	Fe^{2+}
Холинэстераза	Mn^{2+}
Амилаза	Cl^{-}
Липаза	Желчные кислоты

ИНГИБИРОВАНИЕ

Необратимое

Ингибиторы прочно связываются с ферментом

Ингибиторы не имеют физиологического значения (являются ферментными ядами)

Обратимое

Ингибиторы непрочно связываются с ферментом

Конкурентное

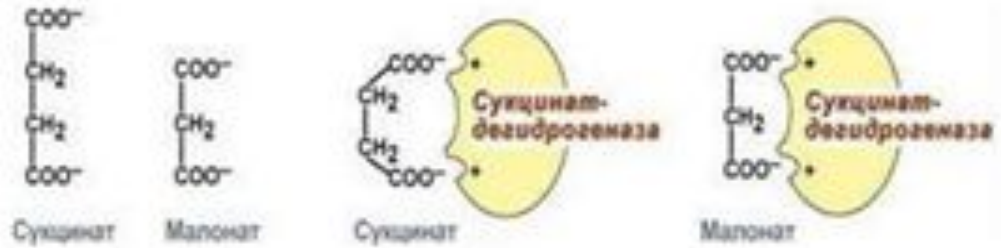
1. *Ингибитор похож на субстрат по форме*
2. *Конкурирует с субстратом за активный центр*

Неконкурентное

1. *Не является структурным аналогом субстрата*
2. *Не присоединяется к активному центру*
3. *Действует на аллостерический центр или как химический модификатор*

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.



Конкурентное ингибирование сукцинатдегидрогеназы

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.

Варианты взаимодействия ингибитора с ферментом

1. Блокируют активный центр фермента
2. Меняют четвертичную структуру фермента
3. Соединяются с коферментом, активатором
4. Блокируют часть фермента, соединяющуюся с коферментом
5. Нарушают взаимодействие фермента с субстратом
6. Вызывают денатурацию фермента (неспецифические ингибиторы)
7. Связываются с аллостерическим центром

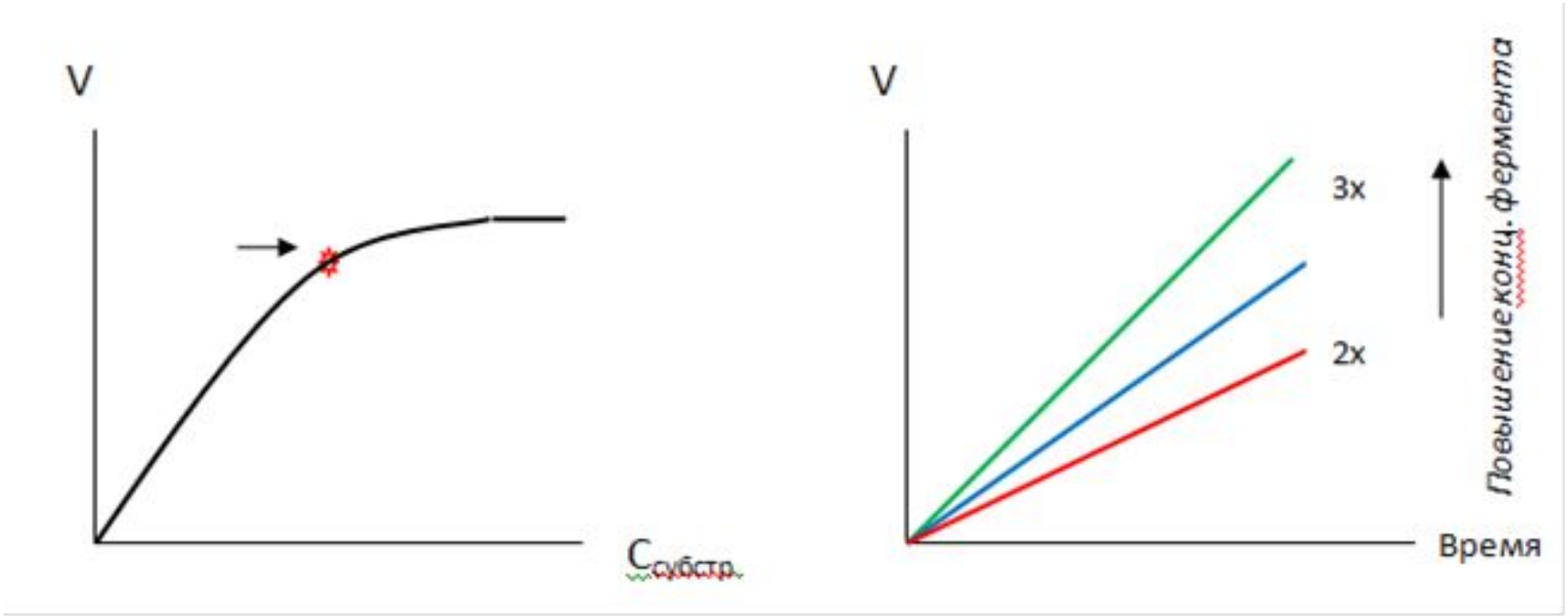
Кинетика ферментативной реакции

- **Активность фермента –** количество фермента, катализирующее превращение 1 моля субстрата за 1 сек.
- За единицу активности фермента принимают **1 катал: 1 катал = 1 моль/сек**
- Активность часто выражают в ***условных единицах***: для амилазы, разрушающей крахмал – в молях глюкозы /сек; для пепсина, разрушающего белок – в молях аминокислоты тирозина/сек (тирозиновые единицы – ТЕ) и т.д.
- ***Удельная активность*** фермента – это число единиц ферментативной активности на 1 мг белка.
- Активность фермента определяют при температуре 37 ^{o} С, оптимуме pH и концентрации субстрата, превышающей концентрацию насыщения
-

ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ФЕРМЕНТА И СУБСТРАТА НА СКОРОСТЬ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ

- При постоянной концентрации фермента скорость реакции при повышении концентрации субстрата увеличивается до достижения определенного максимума. Это состояние насыщения субстрата ферментом. Дальнейшее увеличение концентрации субстрата не приводит к изменению скорости реакции

Влияние концентрации субстрата и фермента на скорость ферментативной реакции



С повышением концентрации фермента при избытке субстрата скорость реакции линейно возрастает

- Количественное соотношение между концентрацией субстрата и скоростью ферментативной реакции выражается ***уравнением Михаэлиса-Ментен***

Уравнение скорости ферментативной реакции

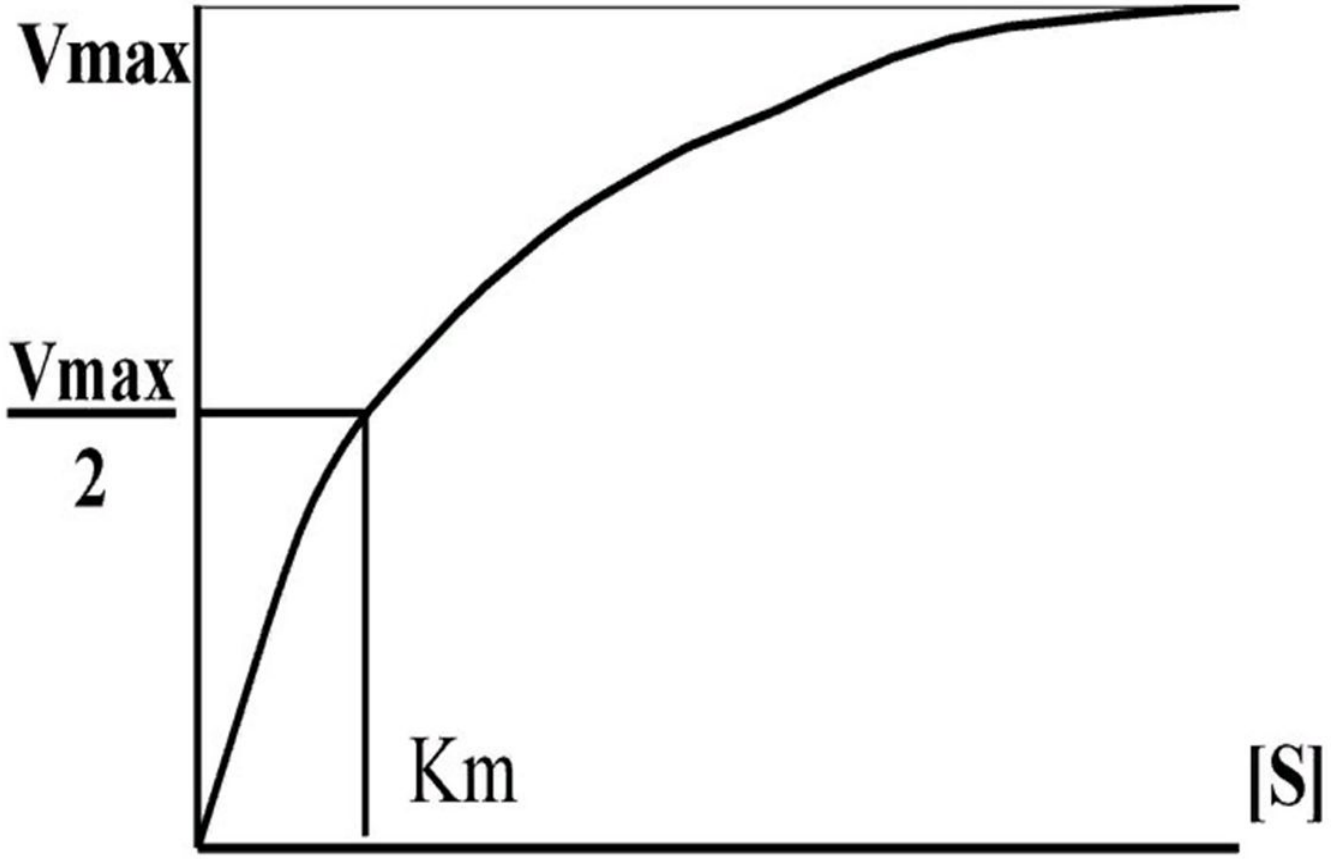
$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

V – скорость реакции

Vmax – максимальная скорость реакции

Km – константа Михаэлиса

[S] – концентрация субстрата

Константа Михаэлиса- Ментен

- **Km** – концентрация субстрата **[S]**, при которой скорость ферментативной реакции **V** равна половине от максимальной