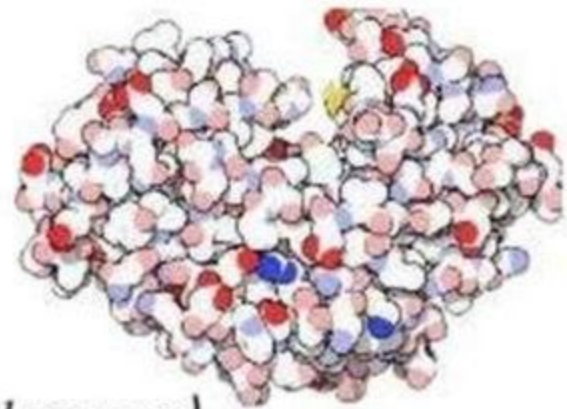


ФЕРМЕНТЫ

- **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



Коферменты (КоЕ):

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

Особенности действия ферментов

Общие 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°C , $\text{pH} \sim 7,4$, 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 (1111111)

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

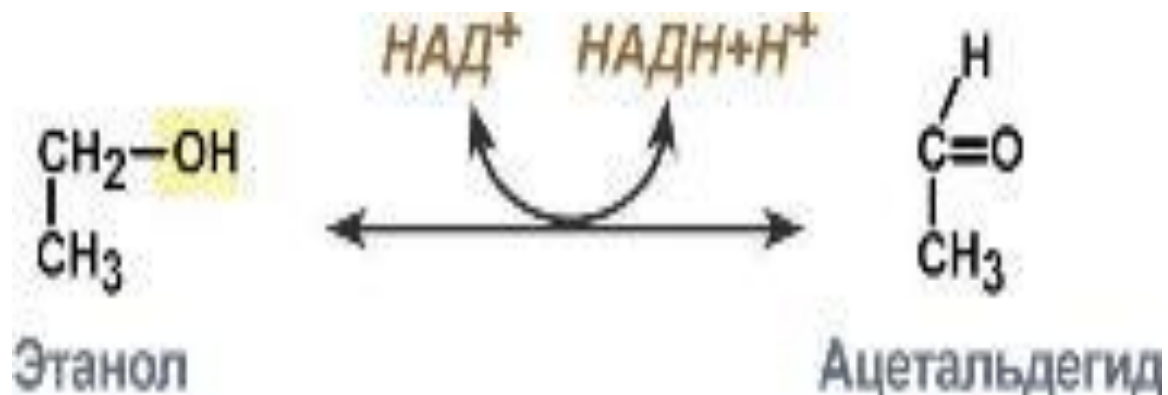
Классификация ферментов

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

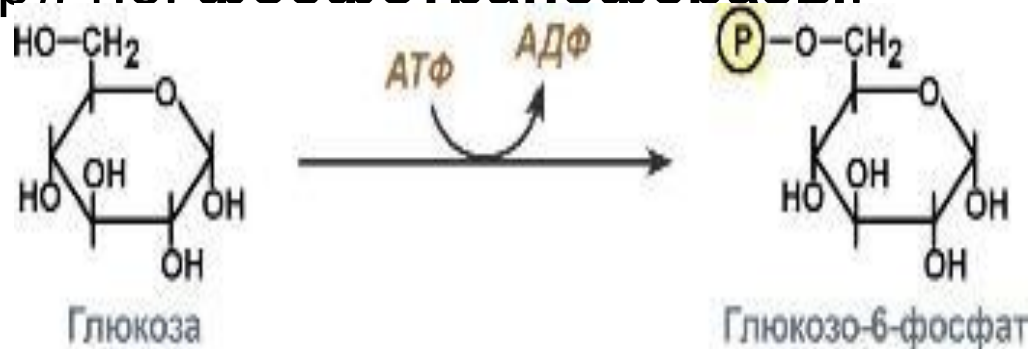
- Ферменты этого **класса** катализируют **окислительно-восстановительные реакции**, лежащие в основе биологического окисления. Класс насчитывает 22 подкласса. Коферментами этого класса являются **НАД, НАДФ, ФАД, ФМН, кислота**.
- На подподклассы деление происходит в зависимости от акцептора протонов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

- Пример



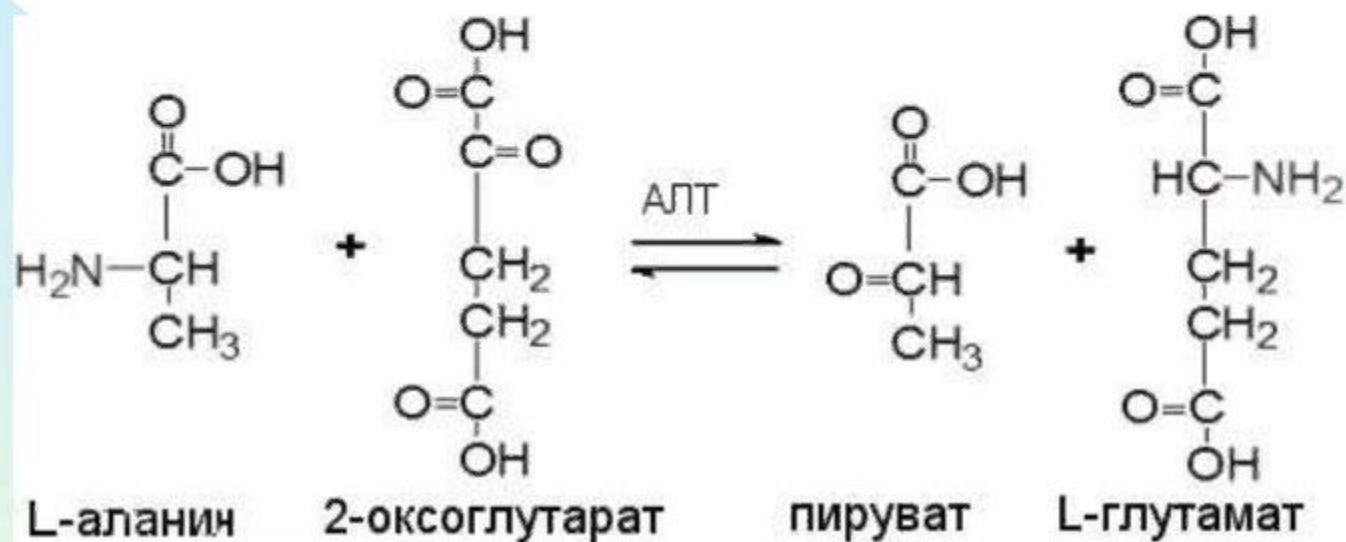
Трансферазы

- 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**.

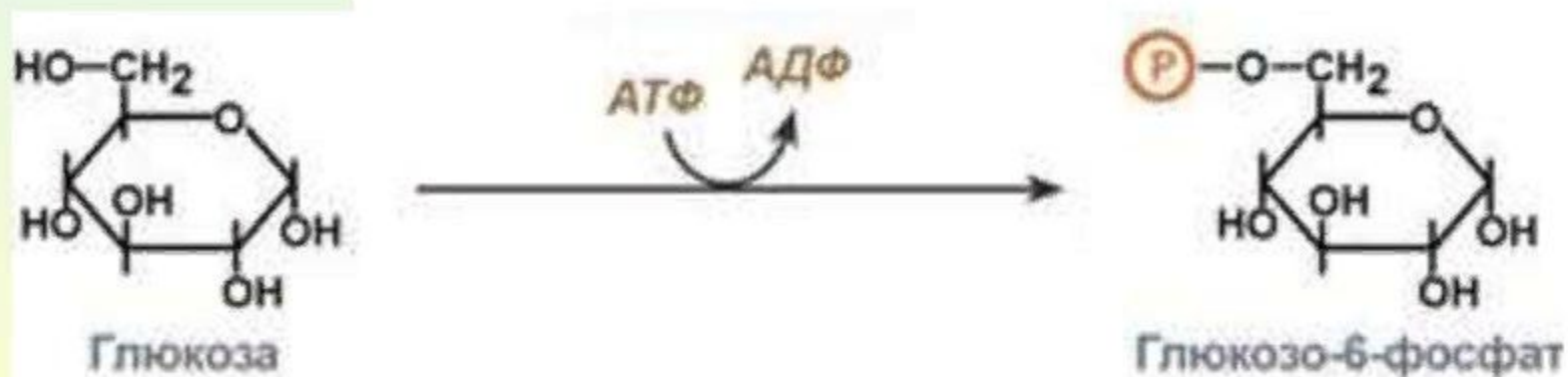


Трансферазы: Примеры.

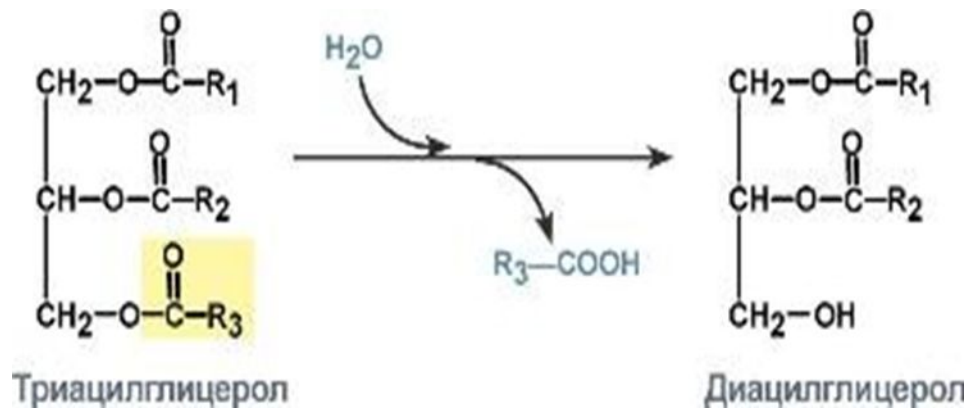
Аланинаминотрансфераза (АлАт)



Гексокиназа (ГК)

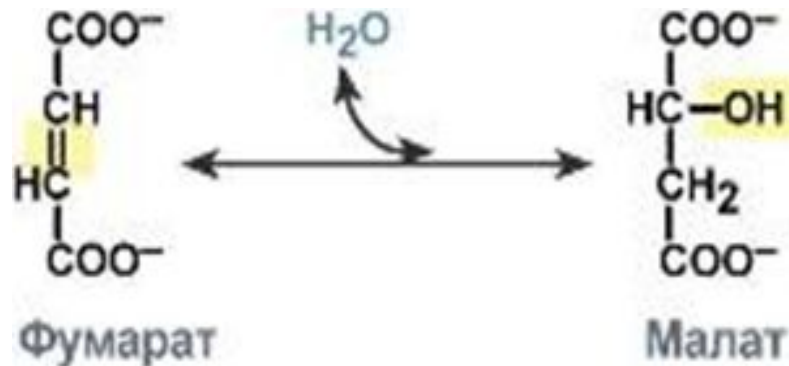


- **Гидролазы**
- Гидролазы – ферменты, осуществляющие разрыв внутримолекулярных связей в субстрате путем присоединения элементов H_2O , подразделяются на 13 подклассов. Сохранены тривиальные названия, например, пепсин, трипсин. Коферменты отсутствуют.
- Гидролазы широко представлены ферментами желудочно-кишечного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



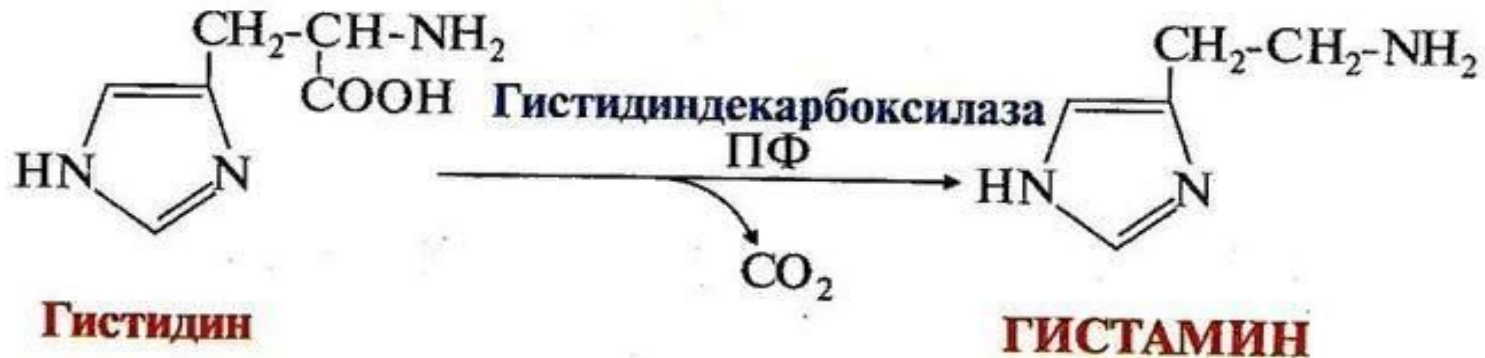
Лиазы

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

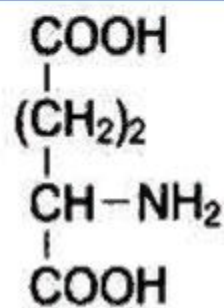


Класс 4. Лиазы

- типы реакций:
 - 1) расщепление связей негидролитическим путем, отщепление простых молекул (CO_2 , 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)

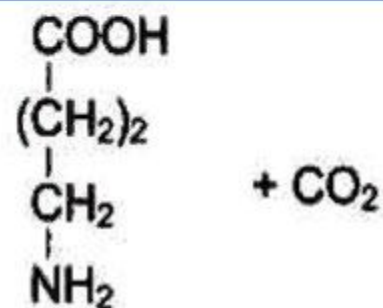


Примеры реакций с участием лиаз.

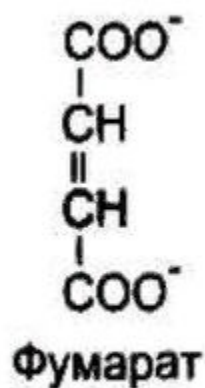


Глутаминовая кислота

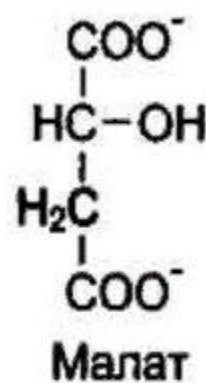
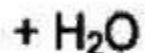
Глутаматдекарбоксилаза



γ -Аминомасляная кислота (ГАМК)

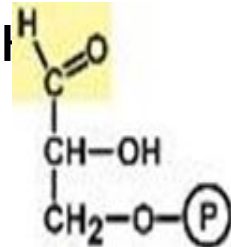


Фумаратгидратаза (фумараза)

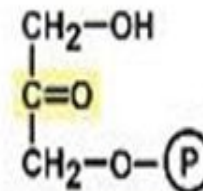


Изомеразы

- 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



Глицеральдегид-фосфат

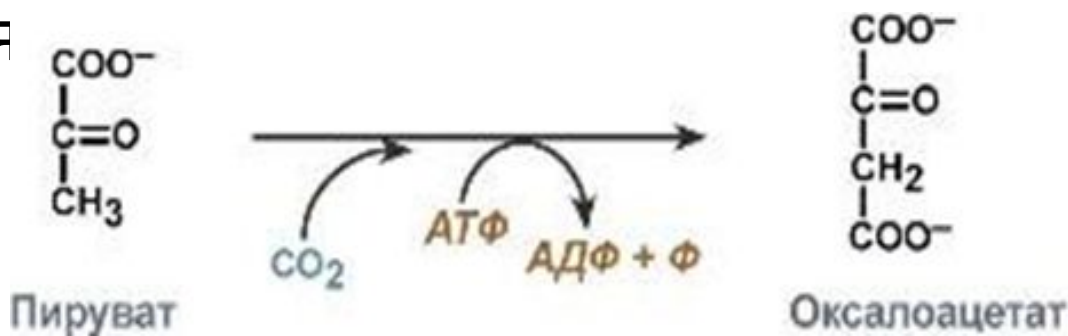


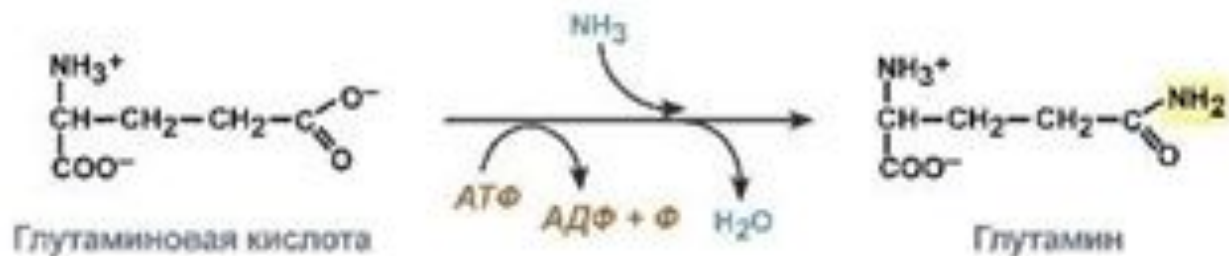
Диоксиацетон-фосфат

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.

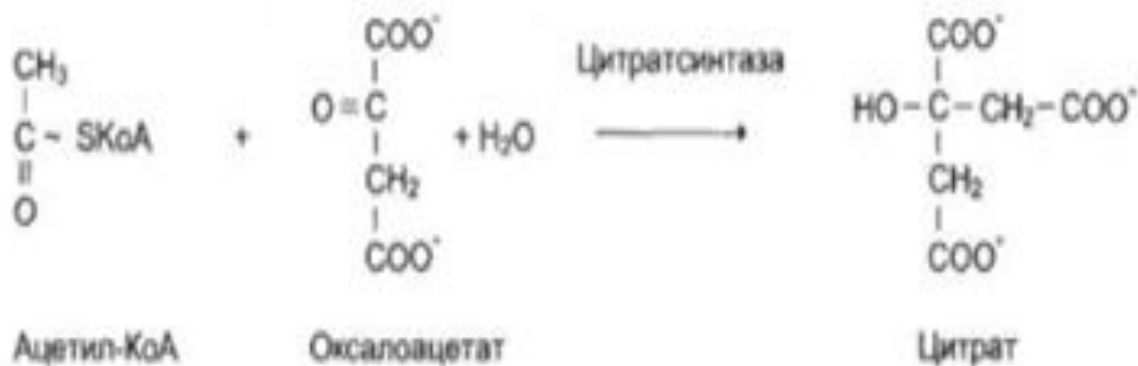
Выделяя





Глутаминсинтета
за

Когда источник энергии другое макроэргическое соединение –
синтазы.



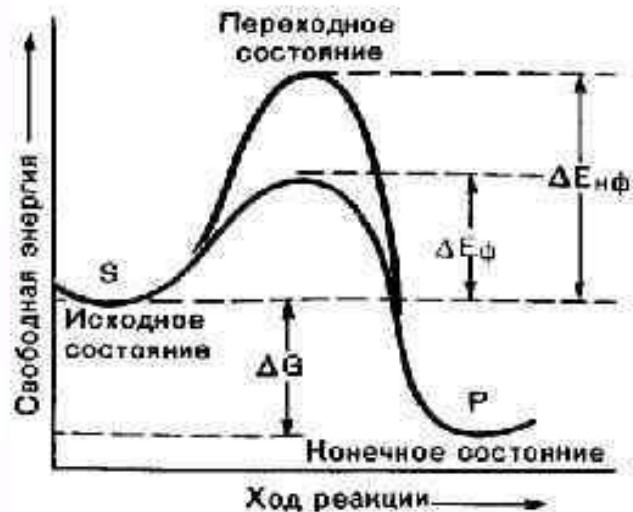
Механизмы ферментативных реакции

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

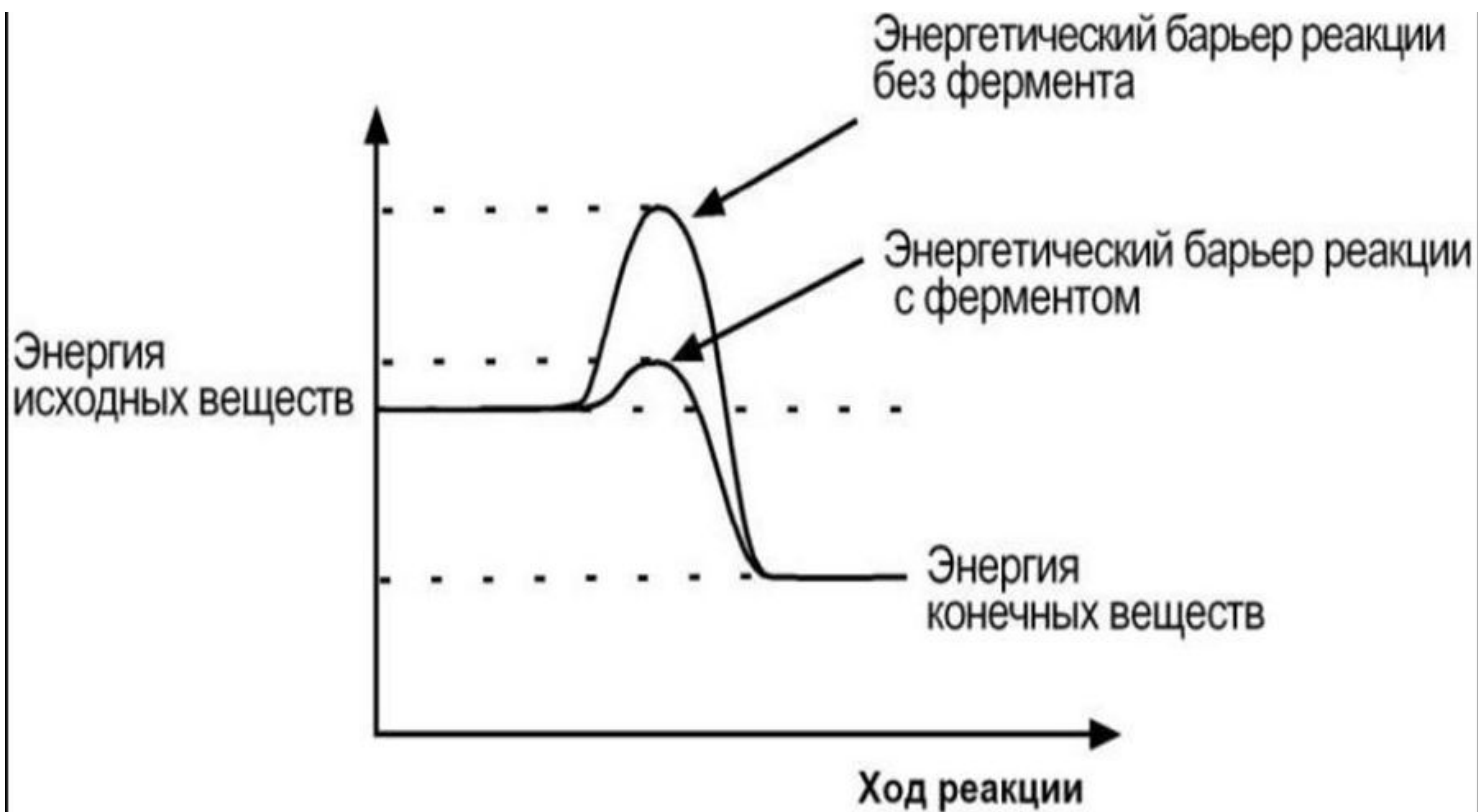
- 1. Кислотно-основные реакции** – в активном центре фермента находятся группы $-\text{COO}^-$ и $-\text{NH}_3^+$, которые способны присоединять и отдавать H .
- 2. Реакции присоединения (отщепления, замещения)** электрофильные, нуклеофильные – в активном центре фермента находятся гетероатомы смещающие 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.



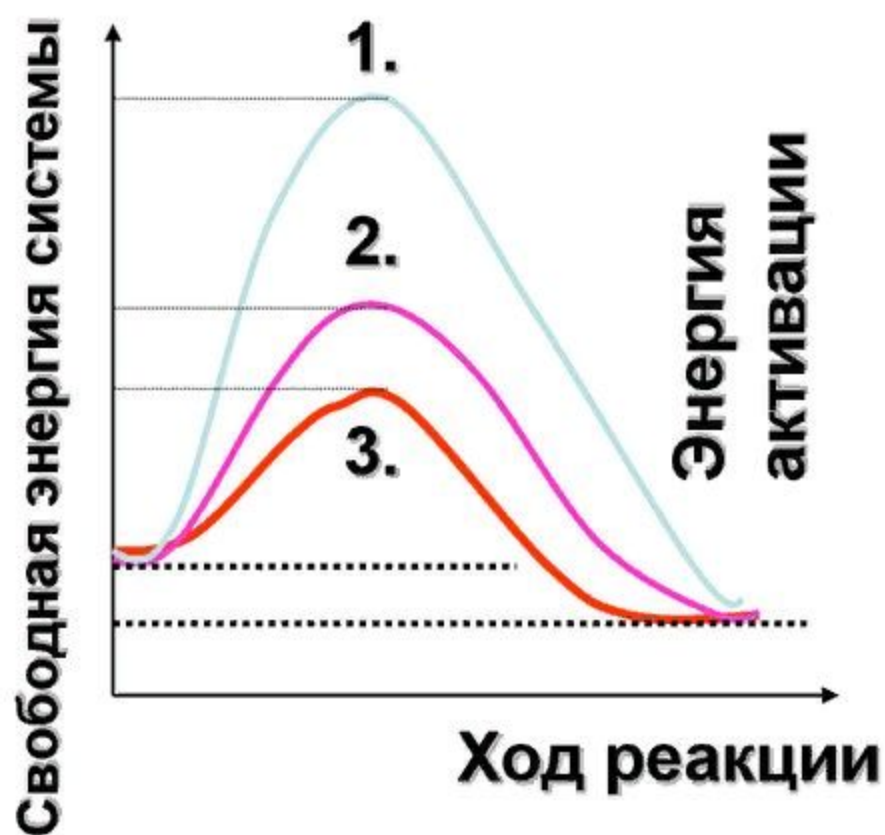
Изменения свободной энергии катализируемой и некатализируемой реакции. S – исходный субстрат; P – продукт; $\Delta E_{нф}$ – энергия активации неферментативной реакции; $\Delta E_{ф}$ – энергия активации ферментативной реакции; ΔG – стандартное изменение свободной энергии.



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

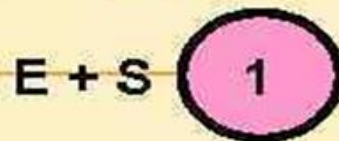
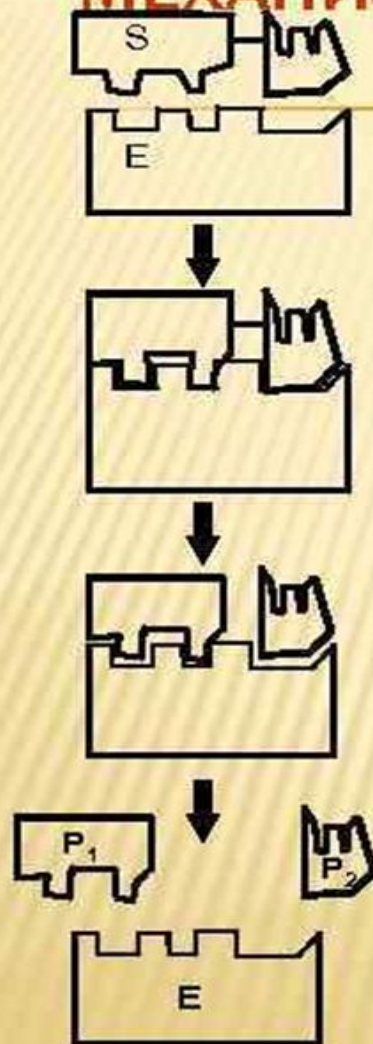
Ферменты снижают энергию активации

- 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:



МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ



Сближение и ориентация субстрата относительно активного центра



Образование фермент – субстратного комплекса



Образование нестабильного комплекса фермент - продукт



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.



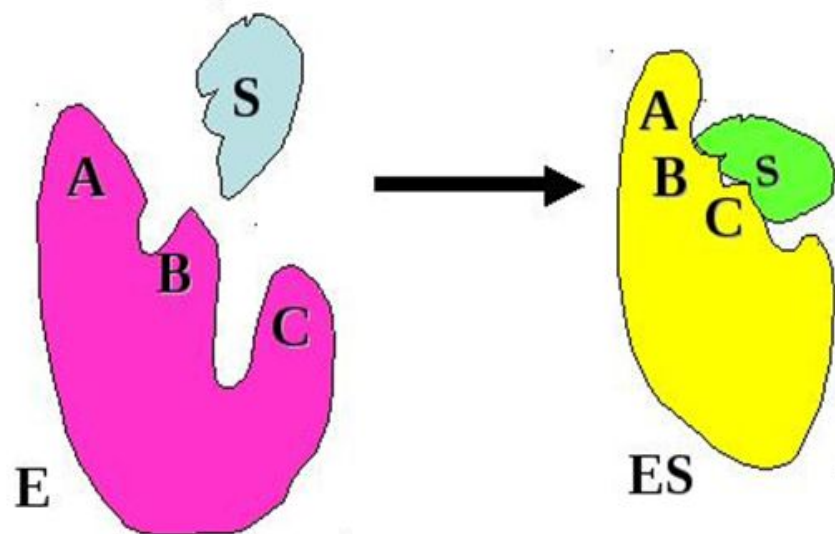
МЕХАНИЗМЫ СПЕЦИФИЧНОСТИ (II)

- **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.



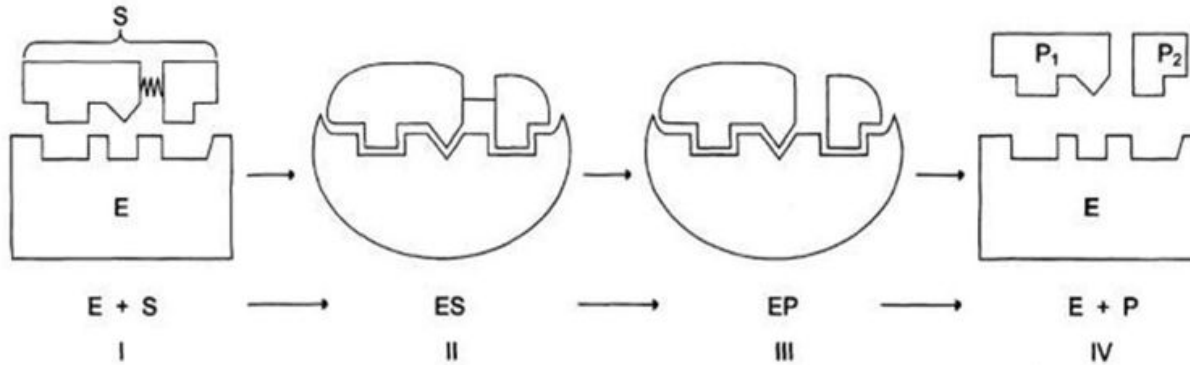
Схематическое представление теории Кошланда

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, находится 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 единственным возможным способом, что обеспечивает **субстратную специфичность фермента**



б). *Каталитический центр*

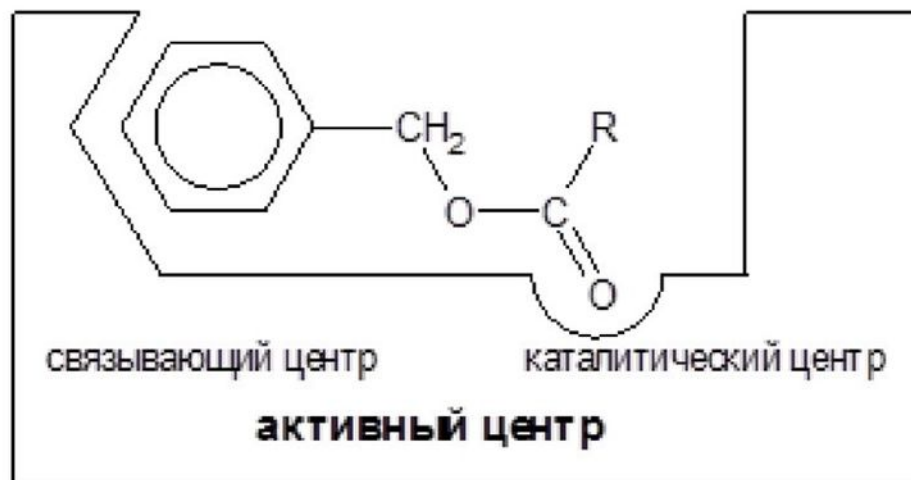
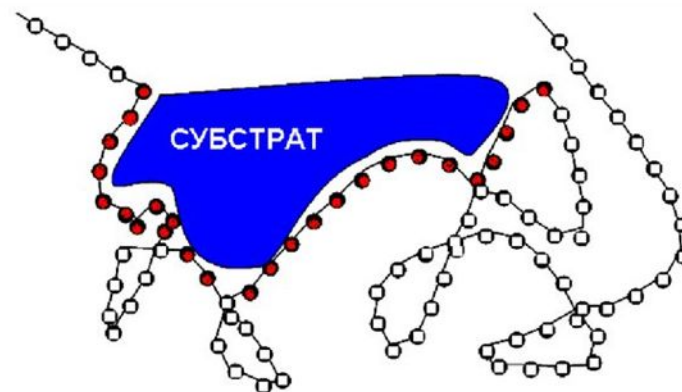
Особенность строения каталитического центра дает возможность ферменту катализировать реакцию с помощью определенного механизма катализа: кислотного-основного, электрофильного, нуклеофильного и т.д.

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

Строение активного центра фермента

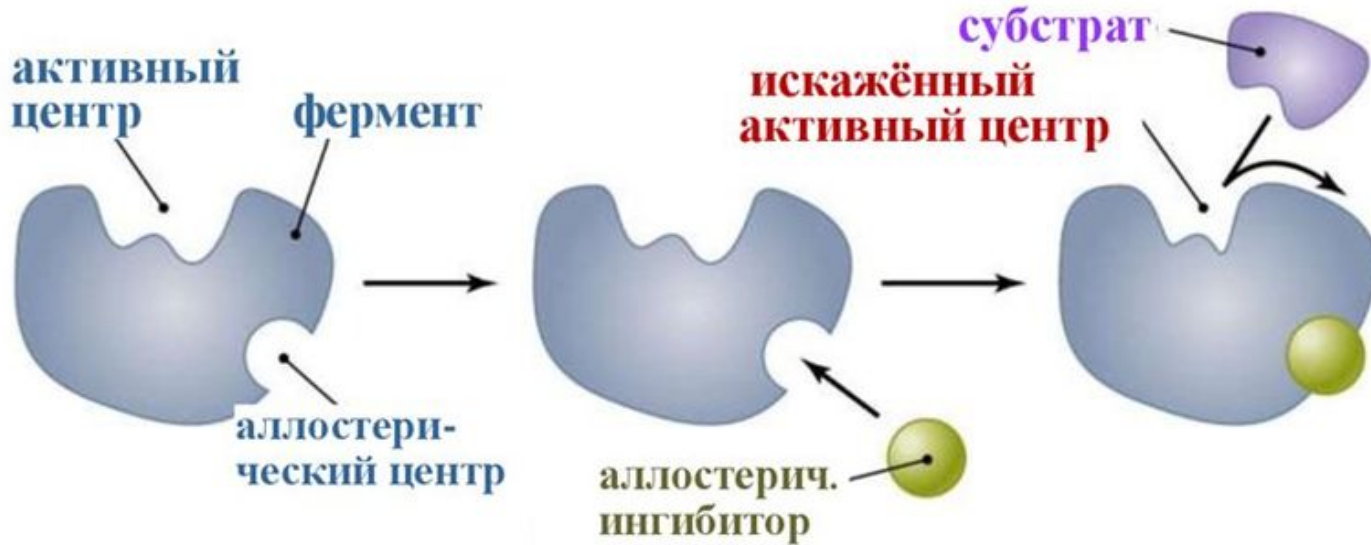


АКТИВНЫЙ ЦЕНТР ФЕРМЕНТОВ

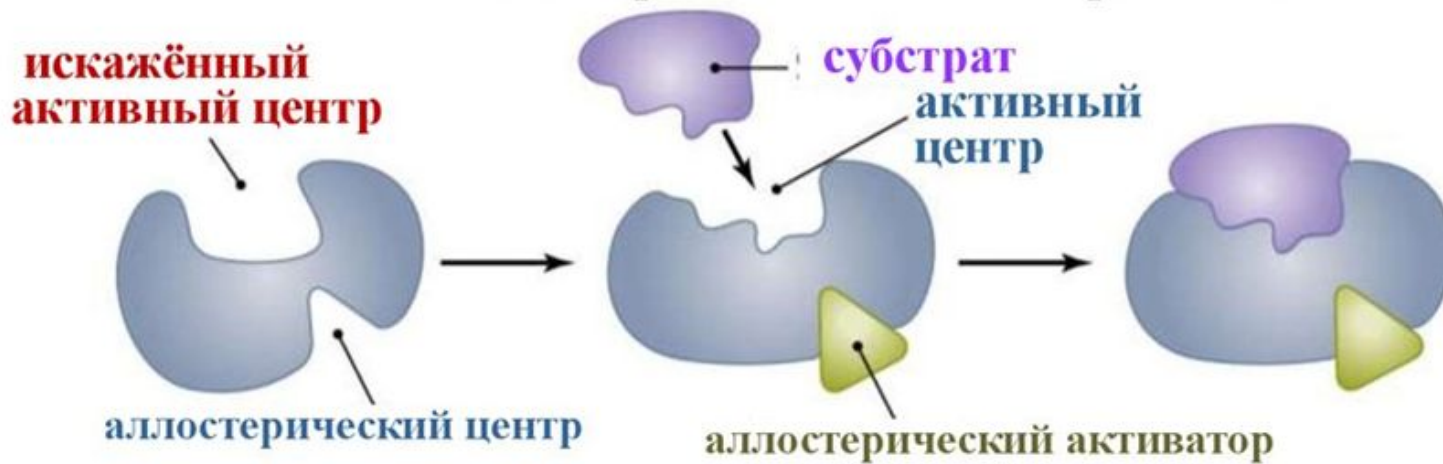


Аллостерическая регуляция активности

Аллостерическое ингибирование



Аллостерическое активирование



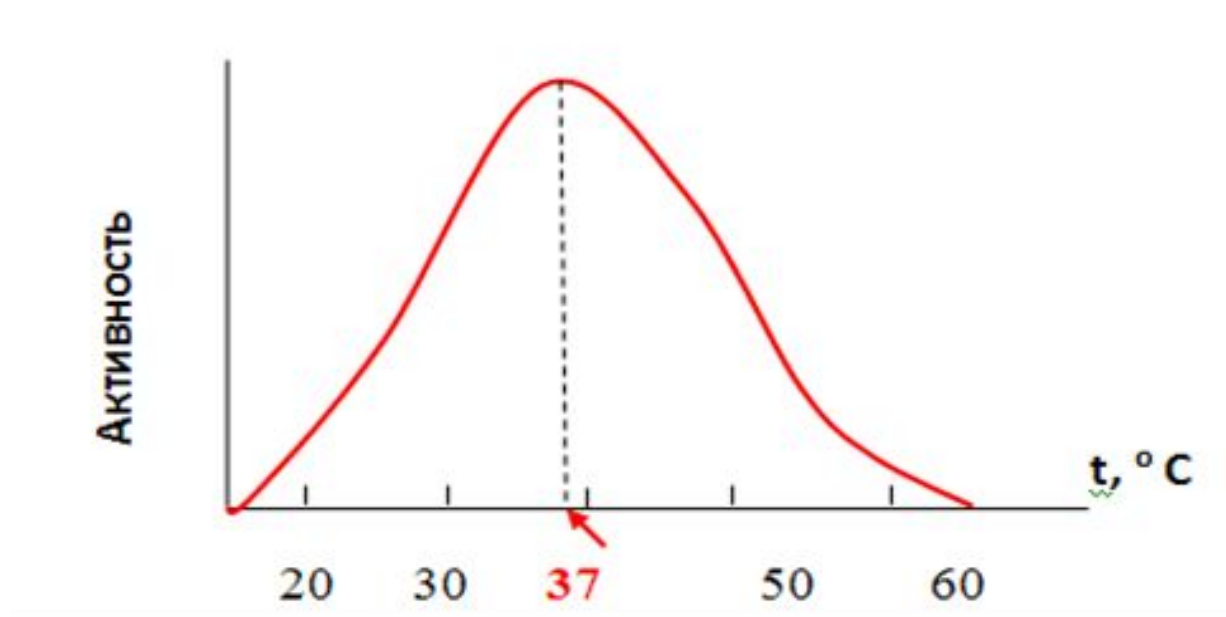
Свойства ферментов

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

- Специфичность
- А. Субстратная
- Б. Специфичность действия

- 1. Абсолютная** - один фермент действует только на один субстрат (уреаза расщепляет только мочевины; 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 из различных а/к)
- 3. Стереоспецифичность** - некоторые ферменты катализуют превращение только субстратов, которые находятся в определенной конфигурации, цис- или транс-

Термолабильность – это неустойчивость ферментов к действию высоких температур. Это свойство объясняется денатурацией фермента при температурах выше 50°C. 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 $\text{pH} < 7$ будет нейтральной, а при $\text{pH} > 7$ имеет «-» заряд
 - NH₂ АРГ, ГИС, ЛИЗ при $\text{pH} < 7$ будет имеет «+» заряд, а при $\text{pH} > 7$ 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.



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

**АКТИВАЦИИ 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

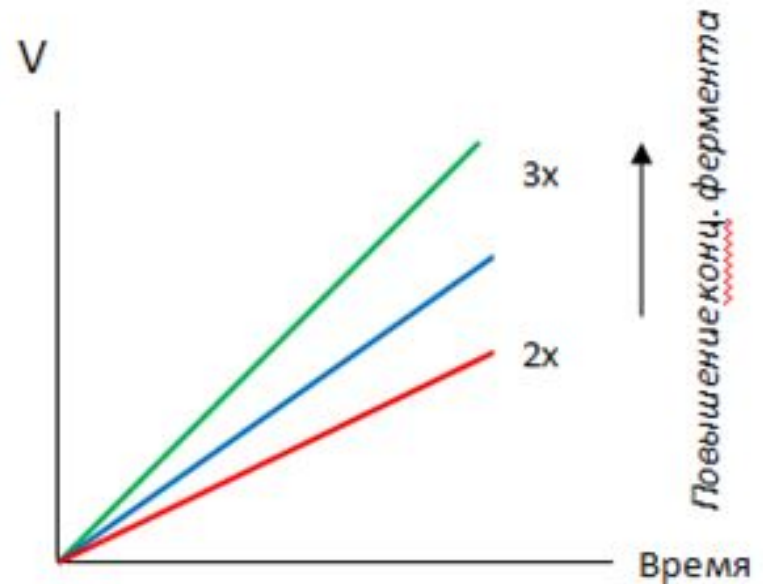
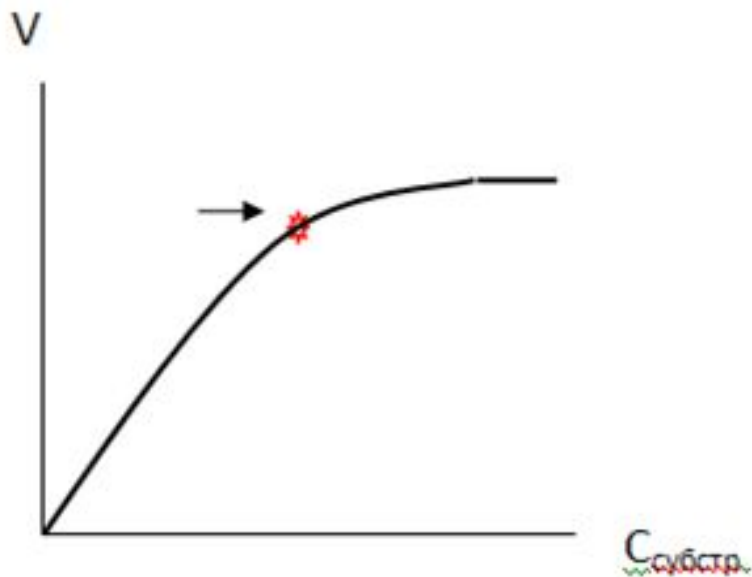
Кинетика ферментативной реакции

- **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 °С, оптимуме рН 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

V_{\max} – максимальная скорость реакции

K_m – константа Михаэлиса

$[S]$ – концентрация субстрата

Константа Михаэлиса- Ментен

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

