

***ФЕРМЕНТЫ***

***ЧАСТЬ 1***

**ФЕРМЕНТЫ** (энзимы) - это высокоспецифичные белки, выполняющие функции биологических катализаторов.

Катализатор - это вещество, которое ускоряет химическую реакцию, но само в ходе этой реакции не расходуется.

**Субстратом** (S) называют вещество, химические превращения которого в **продукт** (P) катализирует фермент (E).

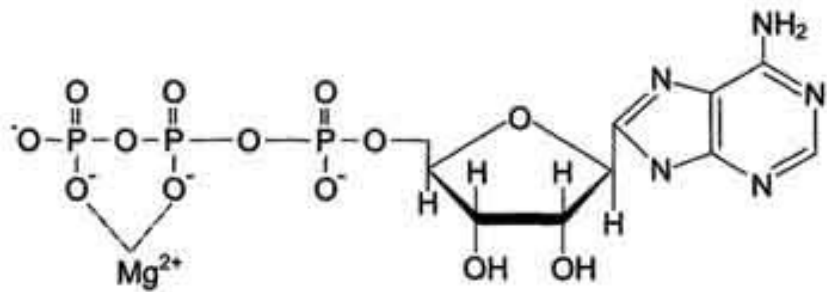
Ферменты могут быть простыми или сложными белками. Если фермент - сложный белок, то его небелковую часть называют **коферментом**, а белковую - **апоферментом**. Апофермент с коферментом образует активную форму катализатора – **холофермент**.

Очень часто кофермент синтезируется из **витаминов**, которые не синтезируются в организме и должны поступать с пищей.

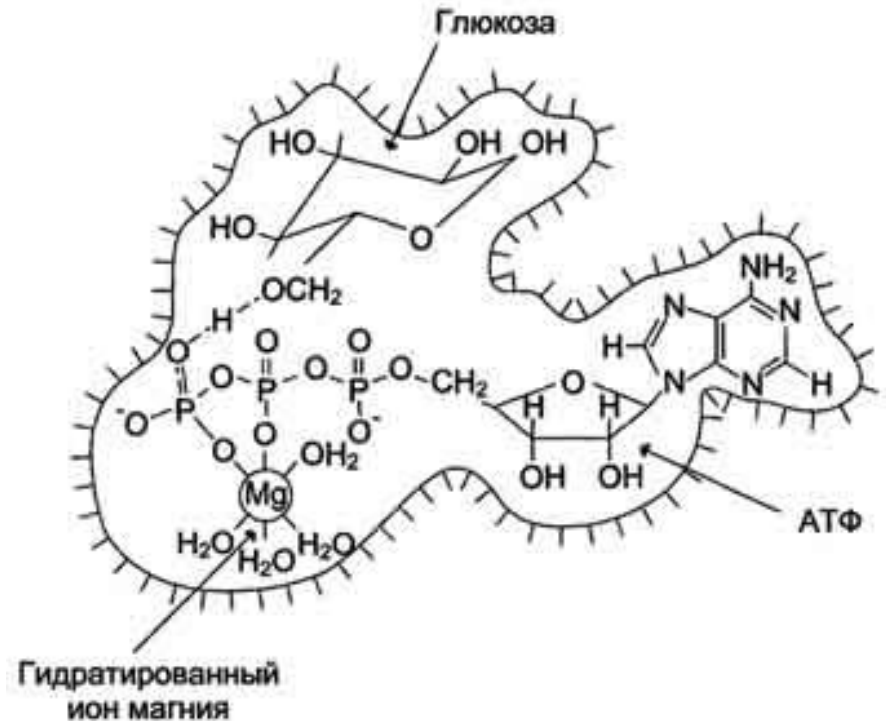
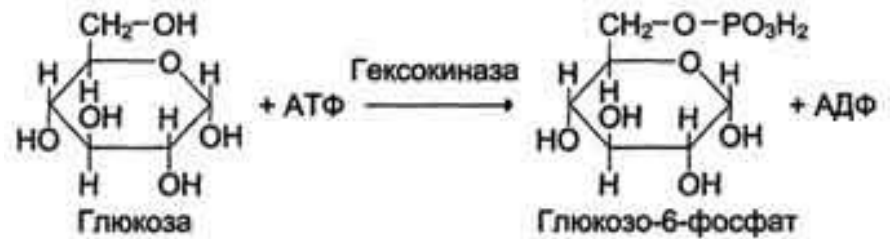
**Роль ионов металлов:**  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  и т.д.

Механизмы участия ионов металлов в ферментативных реакциях различны.

Металл может являться частью активного центра фермента и участвовать в катализе. Он может быть связующим звеном между ферментом и субстратом, может проявлять координирующее свойство, благодаря которому субстрат оказывается в активном центре фермента.



Ион  $Mg^{2+}$  не взаимодействует непосредственно с ферментом, а участвует в стабилизации молекулы АТФ и нейтрализации отрицательного заряда субстрата, что облегчает его присоединение к активному центру фермента и "правильной" ориентации молекулы АТФ в активном центре фермента, ослабляя фосфоэфирную связь и облегчая перенос фосфата на глюкозу.



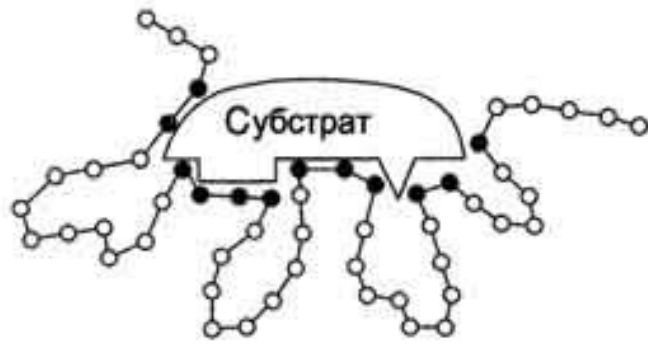
В активном центре гексокиназы есть участки связывания для молекулы глюкозы и комплекса  $Mg^{2+}$ -АТФ. В результате ферментативной реакции происходит перенос конечного,  $\gamma$ -фосфатного остатка молекулы АТФ на глюкозу с образованием глюкозо-6-фосфата.

Поскольку ферменты - белковые молекулы, следовательно, они обладают всеми свойствами, характерными для белков. В то же время они имеют особенности строения, характеризующие их как катализаторы.

## **Основные свойства ферментов как биологических катализаторов**

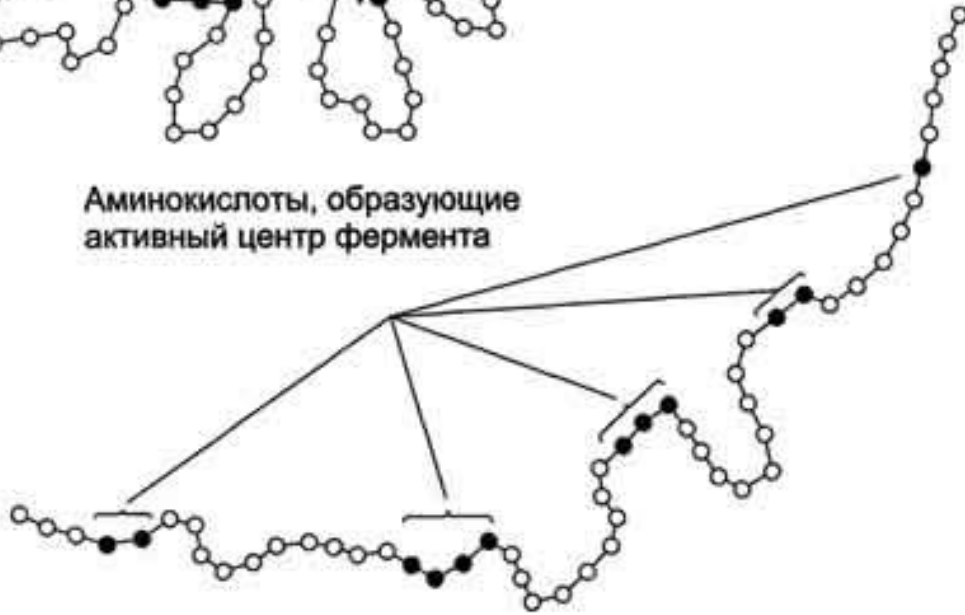
**Активный центр ферментов** - это определенный участок белковой молекулы, способный комплементарно связываться с субстратом и обеспечивающий его каталитическое превращение. Структура активного центра сформирована радикалами аминокислот, так же как и в случае активного центра любого белка. В активном центре фермента имеются аминокислотные остатки, функциональные группы которых обеспечивают комплементарное связывание субстрата (**участок связывания**), и аминокислотные остатки, функциональные группы которых осуществляют химическое превращение субстрата (**каталитический участок**), однако следует помнить, что не всегда эти участки имеют чёткое пространственное разделение и иногда могут "перекрываться".

А



Аминокислоты, образующие активный центр фермента

Б



В



**Строение активного центра фермента.** А - присоединение субстрата к ферменту в активном центре; Б - положение аминокислотных остатков, формирующих активный центр фермента, в первичной структуре белка; В - активный центр фермента условно разделяется на участок связывания и каталитический участок. Участок связывания представлен радикалами аминокислот, функциональные группы которых обеспечивают связывание субстрата. Каталитический участок образован радикалами аминокислотных остатков, функциональные группы которых обеспечивают химическое превращение субстрата.



**Специфичность** - наиболее важное свойство ферментов, определяющее биологическую значимость этих молекул. Различают субстратную и каталитическую специфичности фермента, определяемые строением активного центра.



# Субстратная специфичность

Под субстратной специфичностью понимают способность каждого фермента взаимодействовать лишь с одним или несколькими определёнными субстратами. Различают:

- абсолютную субстратную специфичность;
- групповую субстратную специфичность;
- стереоспецифичность.

## Абсолютная субстратная специфичность

Активный центр ферментов, обладающих абсолютной субстратной специфичностью, комплементарен только одному субстрату. Следует отметить, что таких ферментов в живых организмах мало.



Мочевина

Например:

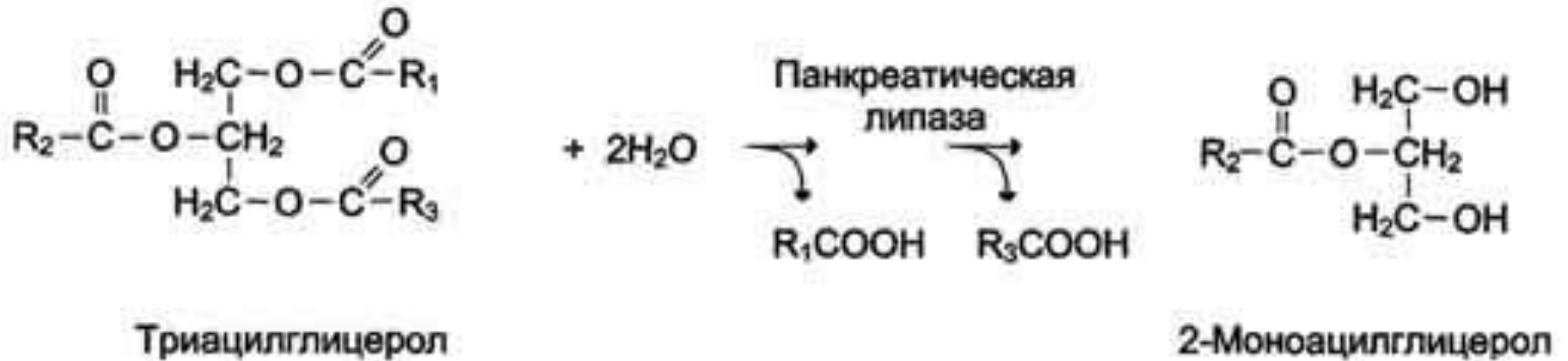


Тиомочевина

## Групповая субстратная специфичность

Большинство ферментов катализируют однотипные реакции с небольшим количеством (группой) структурно похожих субстратов.

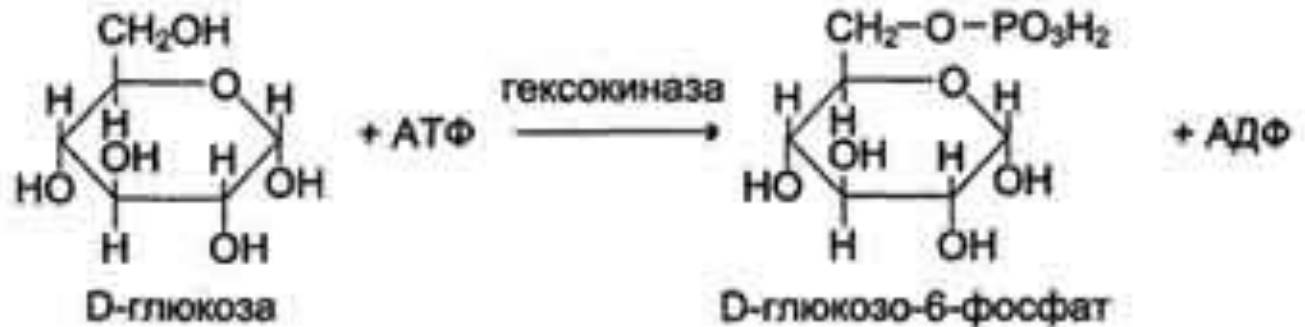
Например:



## Стереоспецифичность

При наличии у субстрата нескольких стереоизомеров фермент проявляет абсолютную специфичность к одному из них. В организме человека наблюдают специфичность ферментов к следующим стереоизомерам.

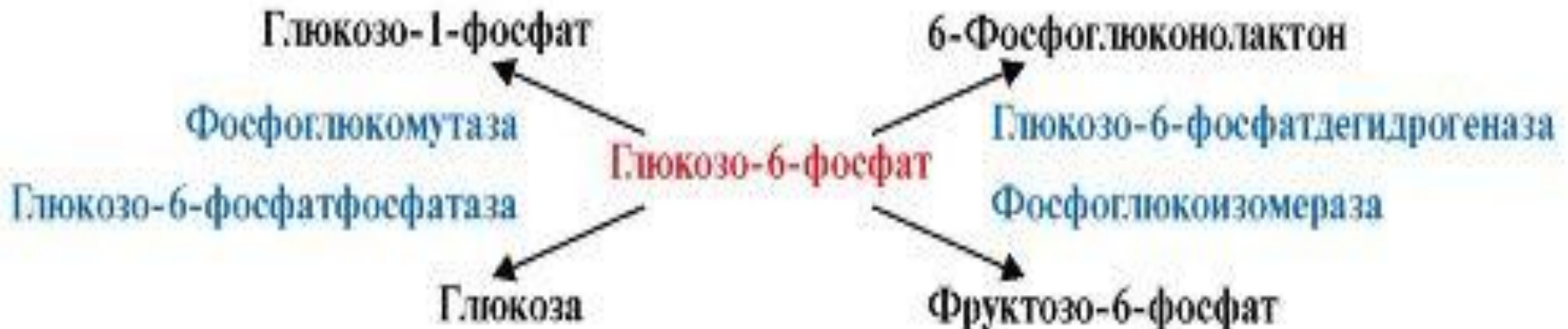
Например:



**Стереоспецифичность к D-сахарам.** Большинство моносахаридов и продуктов их обмена в организме человека и других млекопитающих относят к D-стереоизомерам. Ферменты, осуществляющие их метаболизм, имеют специфичность к D-, а не к L-сахарам.

# Каталитическая специфичность

Фермент катализирует превращение присоединённого субстрата по одному из возможных путей его превращения. Это свойство обеспечивается строением каталитического участка активного центра фермента и называется каталитической специфичностью, или специфичностью пути превращения субстрата. Так, молекула глюкозо-6-фосфата в клетках печени человека - субстрат 4 различных ферментов: фосфоглюкомутазы, глюкозо-6-фосфатфосфатазы, фосфоглюкоизомеразы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Из-за особенностей строения каталитических участков этих ферментов происходит различное превращение этого соединения с образованием 4 различных продуктов.



## ***Для ферментов характерны:***

- **специфичность.**
- **каталитическая эффективность.** Большинство катализируемых ферментами реакций высокоэффективны, они протекают в  $10^8$ - $10^{14}$  раз быстрее, чем некатализируемые реакции.
- **конформационная лабильность.** Каталитическая эффективность фермента, как и любой белковой молекулы, зависит от его конформации и, в частности, от конформации активного центра. В клетках имеются вещества, которые могут вызывать незначительные изменения конформации молекулы фермента за счет разрыва одних и образования других слабых связей; это может вызывать как повышение, так и снижение активности фермента.

- **Активность ферментов может регулироваться.** Действие ферментов в клетке, как правило, строго упорядочено: продукт одной ферментативной реакции является субстратом другой; таким образом образуются **метаболические пути**. Среди множества ферментов практически каждого метаболического пути имеются ключевые, или **регуляторные**, ферменты, активность которых может изменяться в зависимости от потребности клетки в конечном продукте метаболического пути.
- **Оптимальные условия протекания ферментативных реакций:** температура 37-38 °С, нормальное атмосферное давление, рН 6,9-7,7, характерное для большинства тканей. В отличие от этого для эффективного химического катализа часто требуются высокие температура и давление, а также экстремальные значения рН.



# **ОСОБЕННОСТИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА**

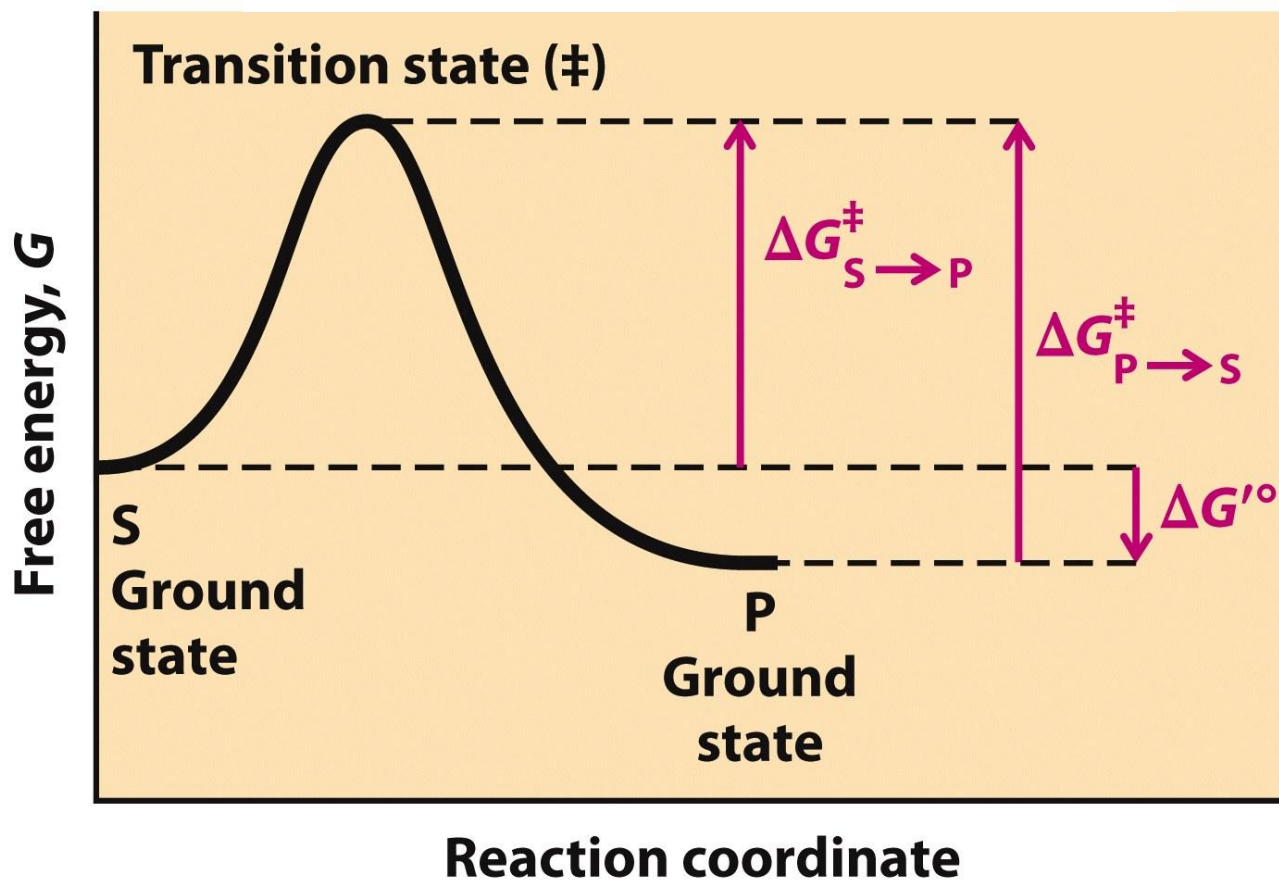
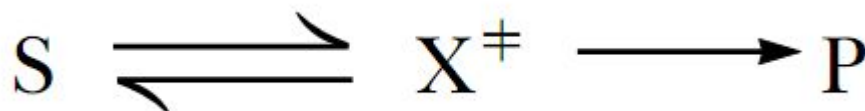
***Условия, необходимы для химического взаимодействия молекул, чтобы произошла химическая реакция:***

1) Молекулы должны сблизиться (столкнуться). Но не всякое столкновение приводит к взаимодействию.

2) Необходимо, чтобы это столкновение стало эффективным - завершилось бы химическим превращением. Обязательное условие для эффективности столкновения: запас энергии молекул в момент столкновения должен быть не ниже энергетического барьера реакции (или энергии активации  $E_a$ ).

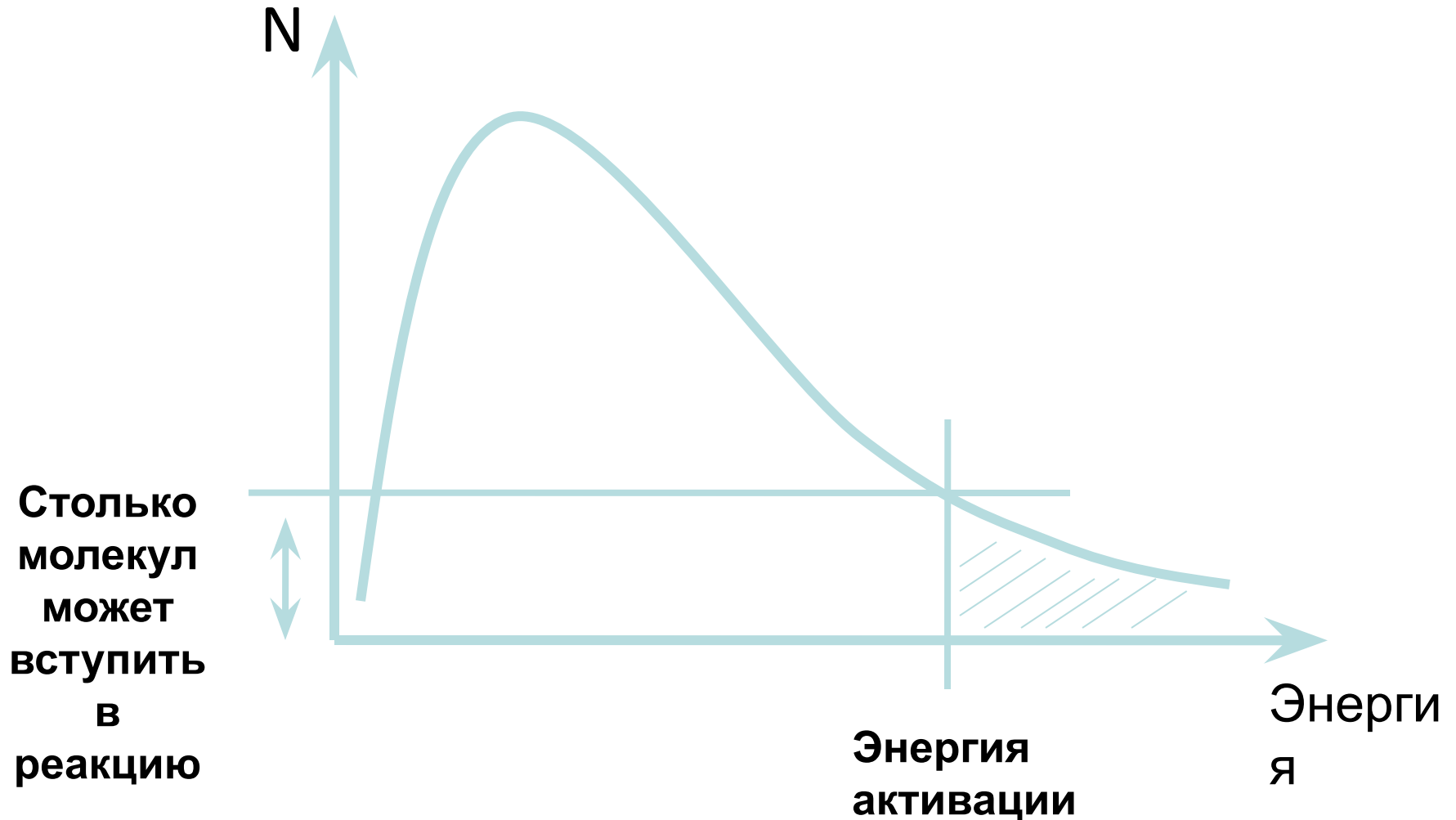
При достижении этого энергетического барьера в молекуле происходят изменения, вызывающие перераспределение химических связей и образование новых соединений. Говорят, что молекулы, обладающие  $E_a$ , находятся в *переходном состоянии*. Разницу энергий между исходным реагентом (реагентами) и конечным соединением (соединениями) называют изменением свободной энергии реакции  $\Delta G$ .

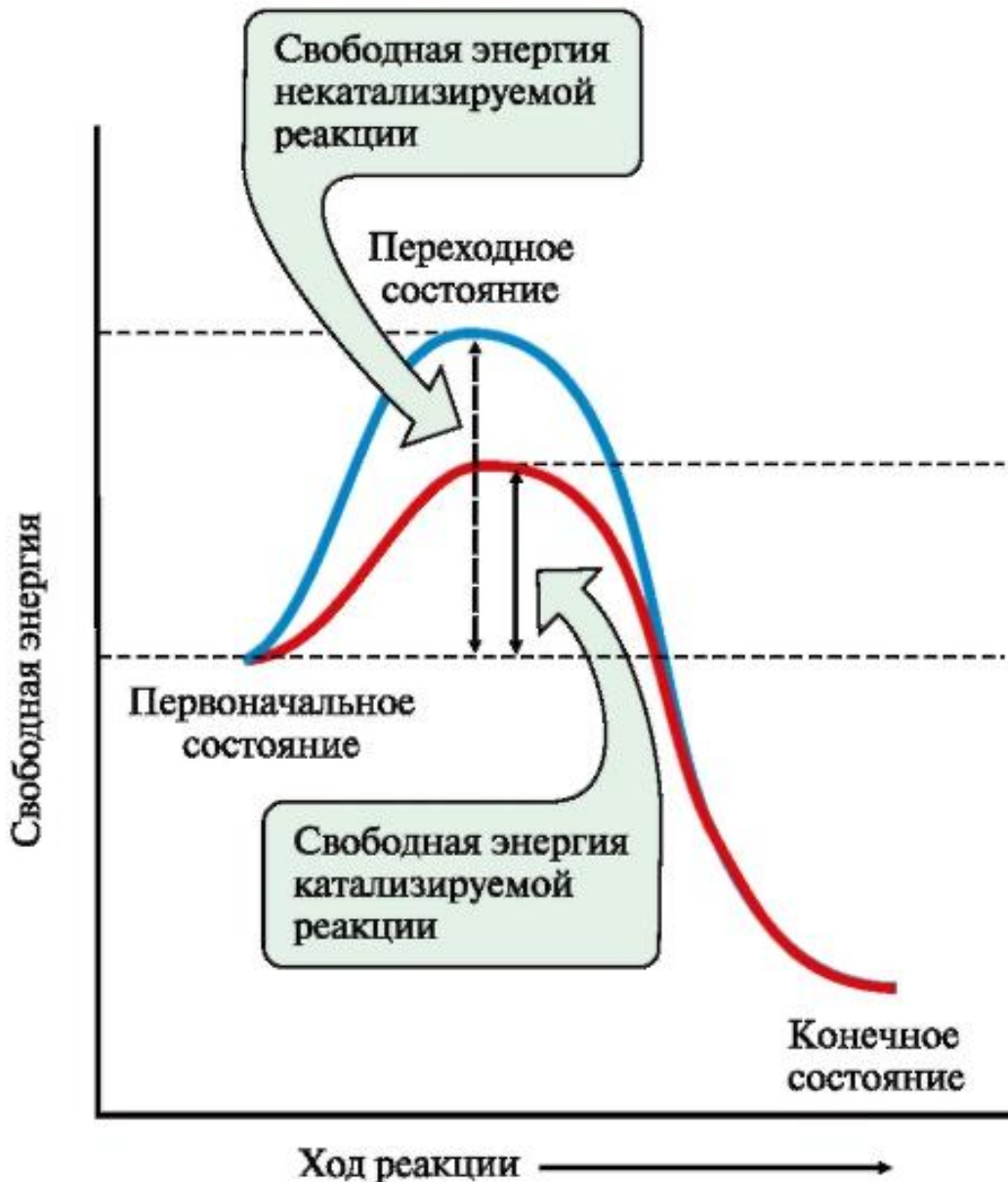
Для превращения субстрата в продукт необходимо, чтобы молекула субстрата преодолела определенный энергетический барьер (энергия активации)



Чем больше молекул обладает энергией, превышающей уровень  $E_a$ , тем выше скорость химической реакции. Повысить скорость химической реакции можно **нагреванием**. При этом увеличивается энергия реагирующих молекул. Однако для живых организмов высокие температуры губительны, поэтому в клетке для ускорения химических реакций используются **ферменты**. Ферменты обеспечивают высокую скорость реакций при оптимальных условиях, существующих в клетке, путём понижения уровня  $E_a$ . Таким образом, ферменты снижают высоту энергетического барьера, в результате возрастает количество реакционно-способных молекул, следовательно, увеличивается скорость реакции.

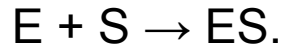
# Энергия активации





Образуется ES-комплекс (фермент-субстратный комплекс), позволяющих молекулам преодолевать активационный барьер на более низком энергетическом уровне. Молекулы S, перед тем как превратиться в продукт реакции, проходят ряд промежуточных этапов, что обеспечивает протекание реакции по другому, обходному пути.

- На первом этапе фермент взаимодействует с субстратом с образованием нового соединения - ES



В ходе этого этапа ферментативного катализа происходит установление комплементарного соответствия между E и S, которое сопровождается небольшими изменениями конформации фермента. Переходному состоянию вещества ES соответствует более низкая энергия активации по сравнению с переходным состоянием вещества S в реакции, идущей без катализатора. Таким образом, ферменты как катализаторы повышают скорость реакций путем снижения активационного барьера. При взаимодействии фермента (E) с субстратом (S) реакция протекает по новому механизму, характеризующемуся более низким уровнем энергии переходного состояния, чем реакции, протекающие в отсутствие фермента.

- Второй этап катализа характеризуется дестабилизацией связей в субстрате (S\*):  
ES → ES\*<sup>\*</sup>; чаще всего процесс идет через образование нескольких новых промежуточных состояний



- В ходе третьего этапа происходит превращение S\* в продукт P:



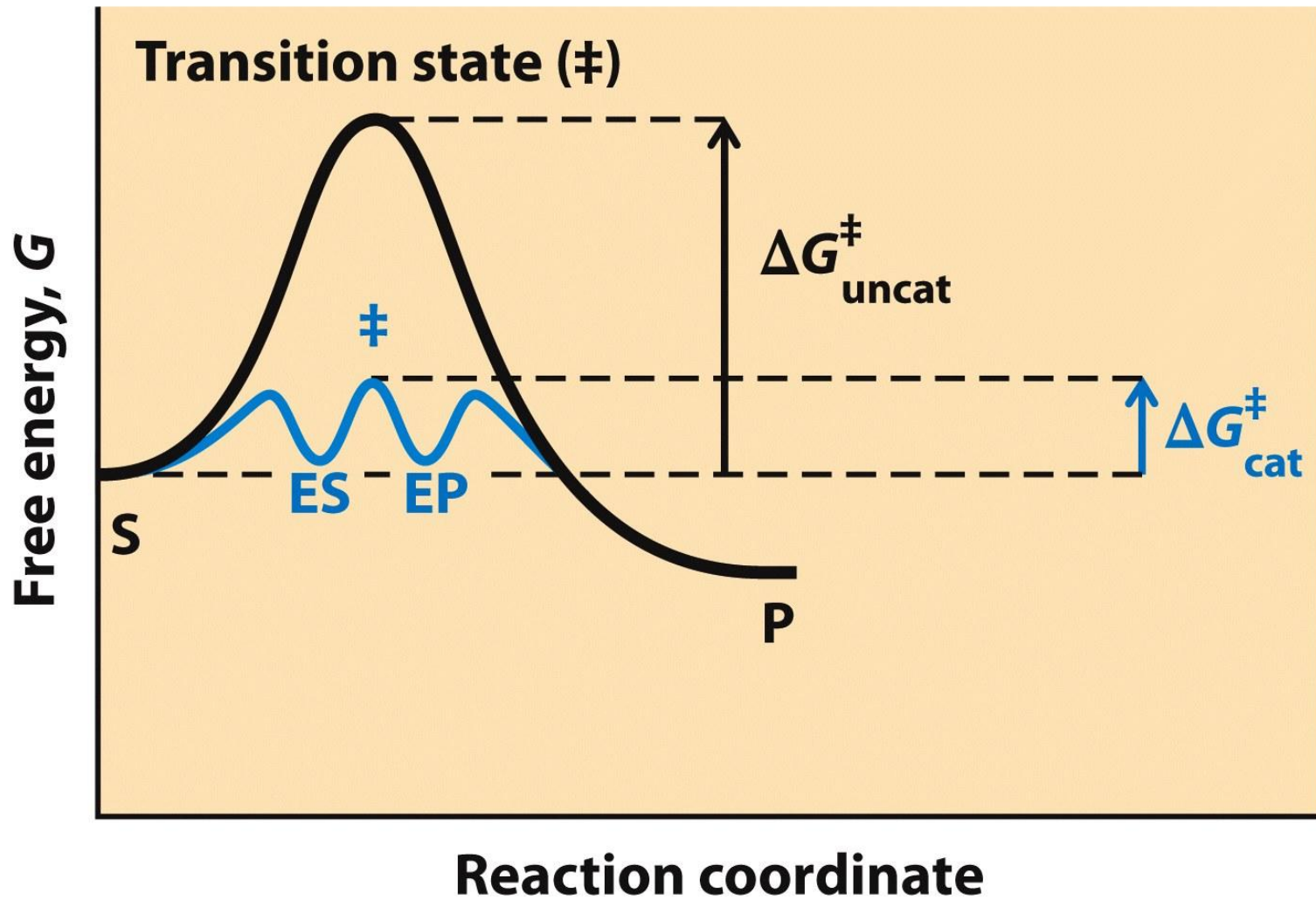
и высвобождение продукта из комплекса с ферментом.

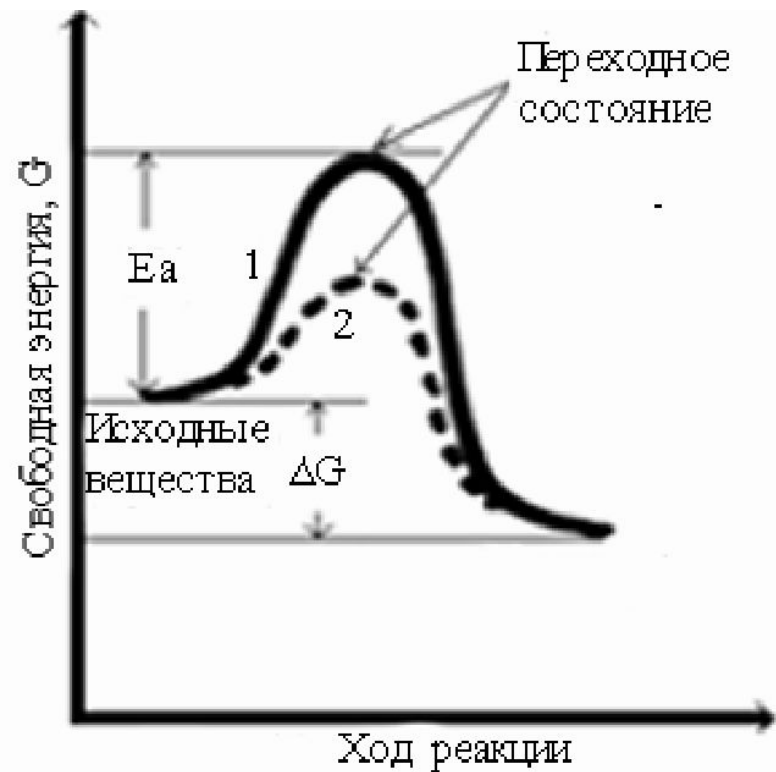
Часто, опуская второй этап, уравнение ферментативного катализа записывают так:





Иначе говоря, катализатор открывает новый, дополнительный путь превращения исходных веществ в продукты реакции через такие состояния, когда энергия активации ниже, и тем самым увеличивается скорость образования продукта. В реакциях, катализируемых ферментами, в промежуточных продуктах возникают как ковалентные, так и нековалентные слабые связи (водородные, ионные, гидрофобные) с ферментом. Но главное, что открывается новый путь превращения вещества через новые промежуточные состояния в те же продукты, которые могут образовываться и без катализатора.





- 1 – некатализируемая реакция  
 2 – катализируемая реакция

**ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ИТОГ РЕАКЦИИ** - разность между энергетическим уровнем исходных веществ (субстратов) и энергетическим уровнем продуктов реакции, не зависит от пути, по которому идет реакция (он одинаков и для реакции с участием катализатора, и для реакции без его участия). Он не зависит и от величины энергии активации - от нее зависит только **скорость** протекания каждого из путей этой реакции. Чем меньше энергия активации реакции, тем выше ее скорость. Эта зависимость выражается уравнением Аррениуса, которое связывает **константу скорости реакции k** с **E<sub>a</sub>**:

$$k = A \cdot e^{-\frac{E_a}{RT}},$$

где **k** - константа скорости реакции;  
**e** - основание натурального логарифма;  
**E<sub>a</sub>** - энергия активации;  
**R** - универсальная газовая постоянная;  
**T** - температура по шкале Кельвина;  
**A** - коэффициент пропорциональности.

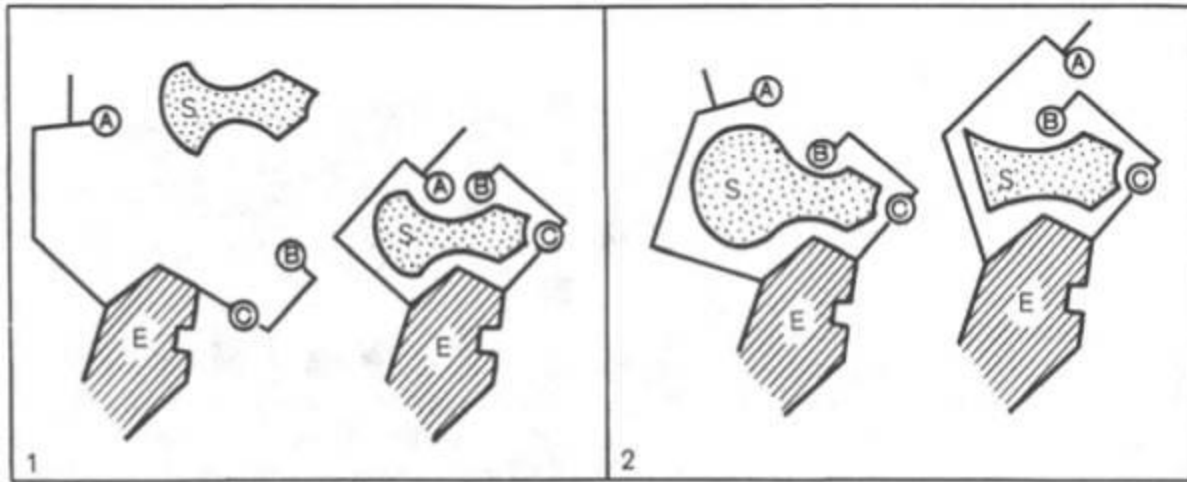
Вывод из уравнения Аррениуса: так как энергия активации в этом уравнении входит в показатель степени, то даже маленькое изменение энергии активации приводит к большим изменениям скорости реакции.

# **Теории узнавания ферментом субстрата**

В 1894 году Э.Фишер предложил определение: «Фермент подходит к субстрату, как ключ к замку», т.е. существует строгое геометрическое соответствие структуры субстрата и активного центра фермента. Иногда эту теорию называют теорией «жесткой матрицы», жесткая структура активного центра оказывается комплементарной молекулярной структуре субстрата, обеспечивая тем самым высокую специфичность фермента. После того, как образуется ES-комплекс, происходит реакция и продукты отделяются от фермента. Образовавшиеся молекулы уже не подходят по форме к активному центру молекулы фермента. Освободившийся фермент может принимать новые молекулы.



В противоположность модели Э. Фишера Д. Кошлендом в 50-е годы 20 века была разработана теория «индуцированного соответствия», допускающая высокую конформационную лабильность молекулы белка-фермента и гибкость и подвижность активного центра. Эта теория была основана на весьма убедительных экспериментах, свидетельствующих о том, что субстрат индуцирует конформационные изменения молекулы фермента таким образом, что активный центр принимает необходимую для связывания субстрата пространственную ориентацию. Иными словами, фермент только в присутствии (точнее, в момент присоединения) субстрата будет находиться в активной форме. Аминокислотные остатки, составляющие активный центр фермента, располагаются в пространстве так, что это расположение дает возможность ферменту наиболее эффективным образом выполнять свою функцию. Подходящей аналогией в данном случае может служить перчатка, которая при надевании на руку соответствующим образом изменяет свою форму.



На рисунке видно, что присоединение субстрата S к ферменту E, вызывая соответствующие изменения конформации активного центра, в одних случаях приводит к образованию активного комплекса, в других – неактивного комплекса вследствие нарушения пространственного расположения функциональных групп активного центра в промежуточном комплексе. Получены экспериментальные доказательства нового положения о том, что постулированное Д. Кошлендом «индуцированное соответствие» субстрата и фермента создается не только изменениями конформации белковой молекулы, но также геометрической и электронно-топографической перестройкой молекулы субстрата. Таким образом, предполагается **взаимноиндуцированная настройка фермента и субстрата**.



# **КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ**

Кинетика ферментативных реакций - это раздел энзимологии, изучающий зависимость скорости химических реакций, катализируемых ферментами, от химической природы реагирующих веществ и факторов окружающей среды.

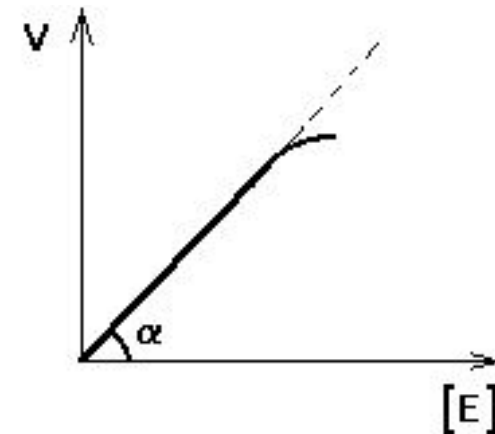
**Скорость ферментативной реакции** определяется уменьшением количества молекул субстрата или увеличением количества молекул продукта за единицу времени.

ИЗМЕРЯЯ СКОРОСТЬ РЕАКЦИИ, ВСЕГДА НАДО ИЗМЕРЯТЬ НАЧАЛЬНУЮ СКОРОСТЬ ПРОЦЕССА, то есть скорость ферментативной реакции, в достаточно короткий промежуток времени, когда концентрация субстрата меняется, не настолько значительно, чтобы это отразилось на скорости процесса.

При проведении ферментативной реакции в условиях избытка субстрата скорость реакции будет зависеть от концентрации фермента. Графическая зависимость такой реакции имеет вид прямой линии.



Отклонение от линейности графика при очень высокой концентрации фермента возникает из-за нехватки субстрата, поэтому снижается скорость поступления субстрата на активный центр фермента. Определять скорость ферментативной реакции надо только в том диапазоне концентраций фермента, в котором график линеен.



Количество фермента часто невозможно определить в абсолютных величинах, поэтому о количестве ферментов судят по скорости катализируемой реакции в определенных, согласованных условиях измерения. При оптимальных условиях температуры, рН среды и полном насыщении фермента субстратом **скорость катализируемой реакции пропорциональна концентрации фермента.**

О скорости ферментативной реакции судят или по скорости убыли субстрата, или по скорости образования продукта реакции.

Для выражения концентрации фермента и количественной оценки его активности в условных единицах Комиссией по ферментам Международного биохимического союза была рекомендована стандартная международная единица (Е или U): за единицу активности любого фермента принимается то количество его, которое в оптимальных условиях катализирует превращение 1 микромоля субстрата или образование 1 микромоля продукта в минуту (мкмоль/мин).

$$1\text{Е} = 1\text{мкмоль превращенного субстрата} / 1\text{ мин}$$

В 1972 г. Комиссия по ферментам Международного биохимического союза предложила выражать активность ферментов в к а т а л а х. Катал (символ - кат - это такое количество фермента, которое способно превращать один моль субстрата за одну секунду (при оптимальных условиях).

Международная единица ферментативной активности Е связана с каталом следующими равенствами:

$$1\text{ кат} = 1\text{ моль S} / \text{с} = 60\text{ моль S} / \text{мин} = 60 \times 10^6\text{ мкмоль} / \text{мин} = 6 \times 10^7\text{ Е},$$
$$1\text{ Е} = 1\text{ мкмоль} / \text{мин} = 1 / 60\text{ мкмоль/с} = 1/60\text{ мкат} = 16,67\text{ нкат}.$$

В медицине активность ферментов выражают чаще всего в единицах активности на 1 л биологической жидкости либо на 1 мг (или 1 г) белка или 1 мг (1 г) препарата фермента. Такая активность носит название «**удельная активность**».

По удельной активности судят об очистке фермента: чем меньше посторонних белков, тем выше удельная активность. В процессе очистки фермента удельная активность увеличивается, становится максимальной и постоянной для очень хорошо очищенного (гомогенного) фермента.

Количество молекул субстрата, подвергающихся превращению одной молекулой фермента в продукт в процессе реакции в единицу времени при полном насыщении фермента субстратом, принято называть **числом оборотов фермента**, или **молярной активностью** (молярная каталитическая активность выражается в каталах на 1 г-моль фермента).

Одна молекула каталазы эритроцитов способна, например, расщепить в 1 с 44000 молекул перекиси водорода.

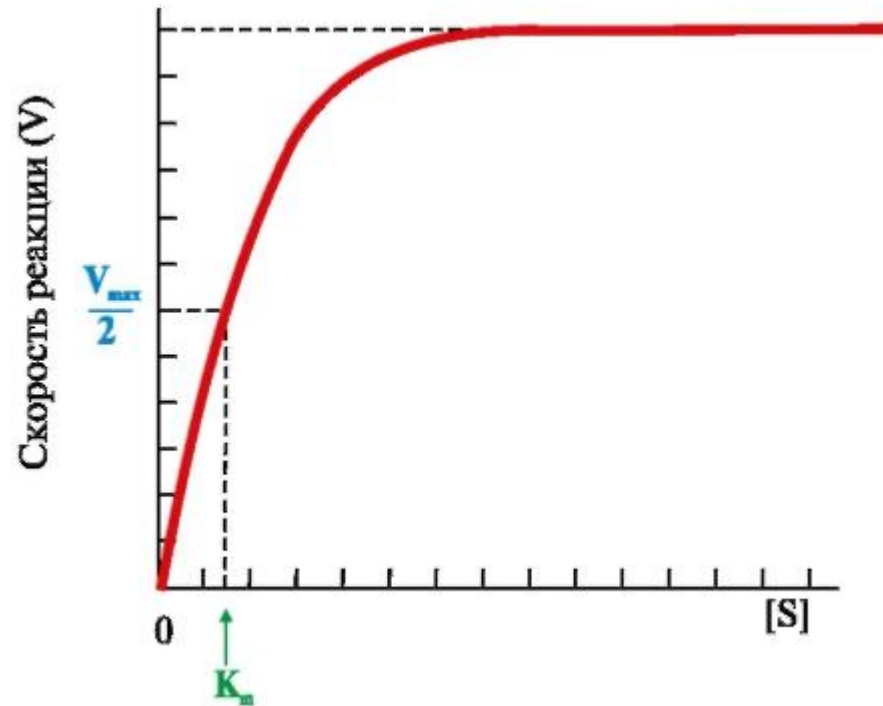
В простейшем случае ферментативную реакцию можно представить как двухстадийный процесс.



Зависимость скорости реакции  $v$  от концентрации субстрата  $C_s$  описывается уравнением Михаэлиса-Ментен, где  $K_m$  (константа Михаэлиса), а  $V_{\max}$  (max) - максимальная скорость ферментативной реакции при полном насыщении фермента субстратом:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot C_s}{K_M + C_s}$$

При постоянной концентрации фермента скорость ферментативной реакции во многом определяется количеством субстрата. По мере увеличения концентрации субстрата нарастает скорость образования продукта, которая постепенно достигает максимальной величины ( **$V_{max}$** ), при которой весь фермент насыщен субстратом и, следовательно, находится в виде фермент-субстратного комплекса (ES). Дальнейшее повышение концентрации субстрата не приводит к увеличению образования продукта, поэтому скорость реакции не возрастает. График зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата имеет вид гиперболы.



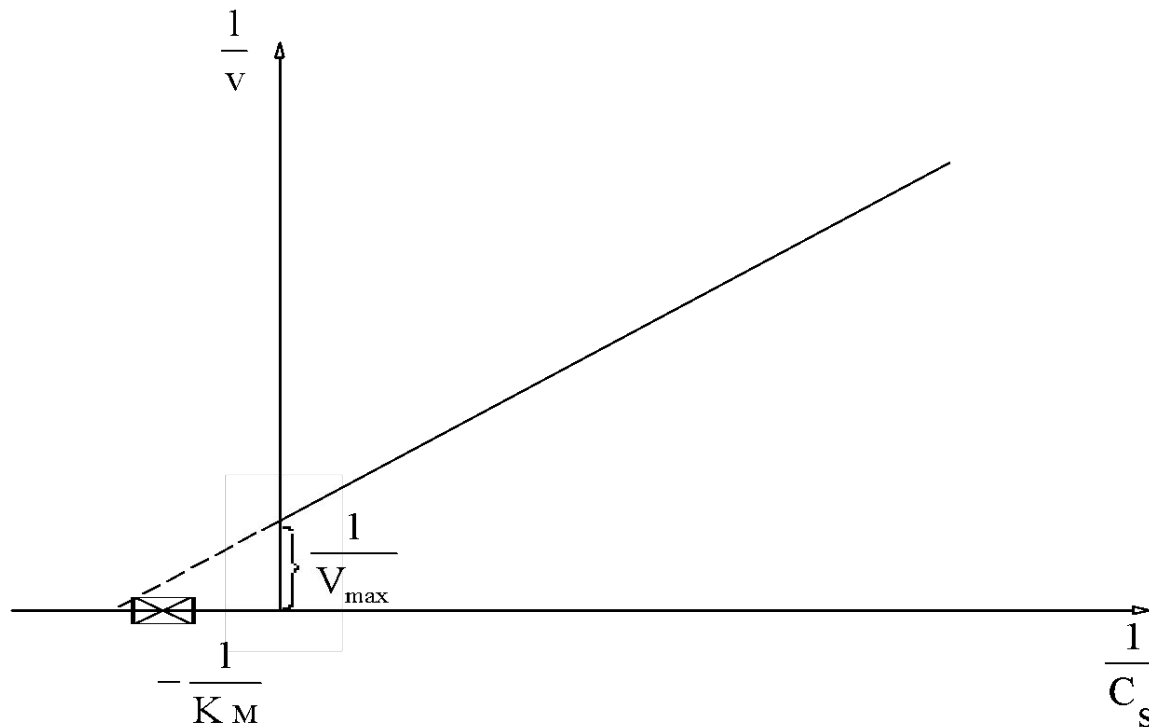


Когда половина молекул фермента находится в комплексе с молекулами субстрата, скорость реакции равна  $1/2 V_{\max}$ . Концентрация субстрата, при которой скорость реакции составляет половину максимальной ( $V_{\max}$ ), называется **константой Михаэлиса-Ментен ( $K_m$ )**. Величина  $K_m$  характеризует **сродство фермента к субстрату**: чем ниже значение  $K_m$  фермента, тем выше его сродство к субстрату, и наоборот.

$V_{\max}$  и  $K_m$  - кинетические характеристики эффективности фермента.

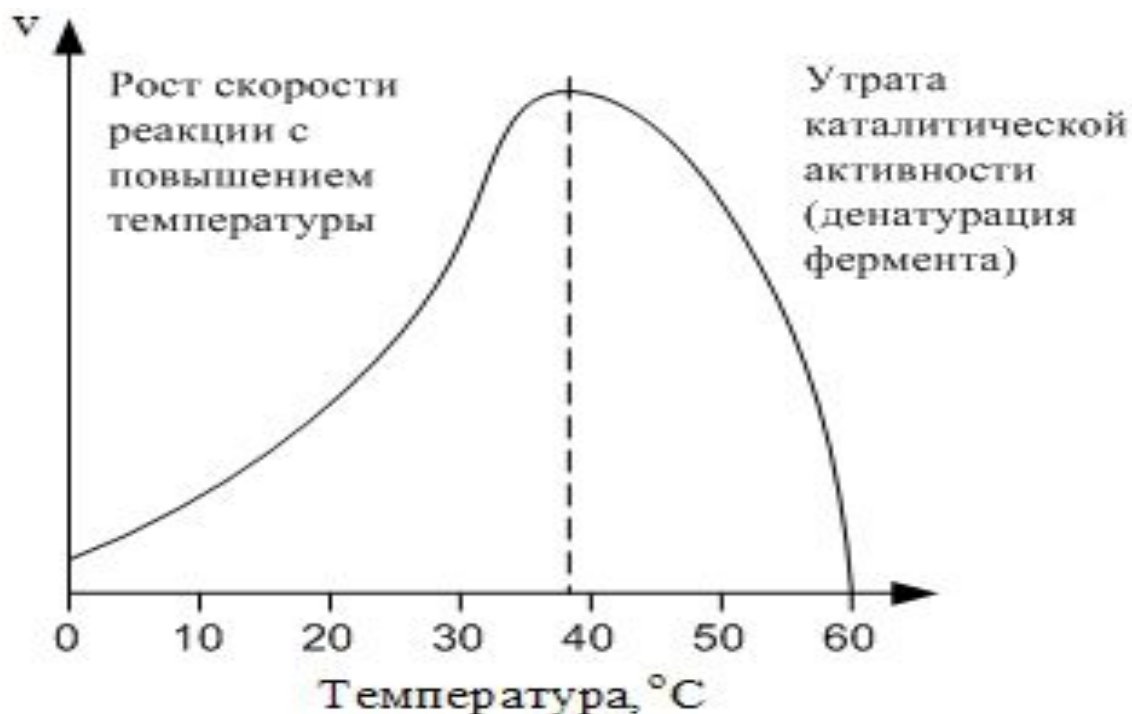
Для более удобного графического представления экспериментальных данных Г. Лайнуивер и Д. Бэрк предложили использовать двойные обратные величины  $1/v$  и  $1/C_s$ , поскольку если существует равенство между двумя какими-либо величинами, то и обратные величины также равны.

Если построить график зависимости  $1/v$  от  $1/C_s$ , получится прямая линия, отсекающая на оси ординат отрезок  $1/V_{\max}$ , а на оси абсцисс – отрезок, равный  $-1/K_M$ .



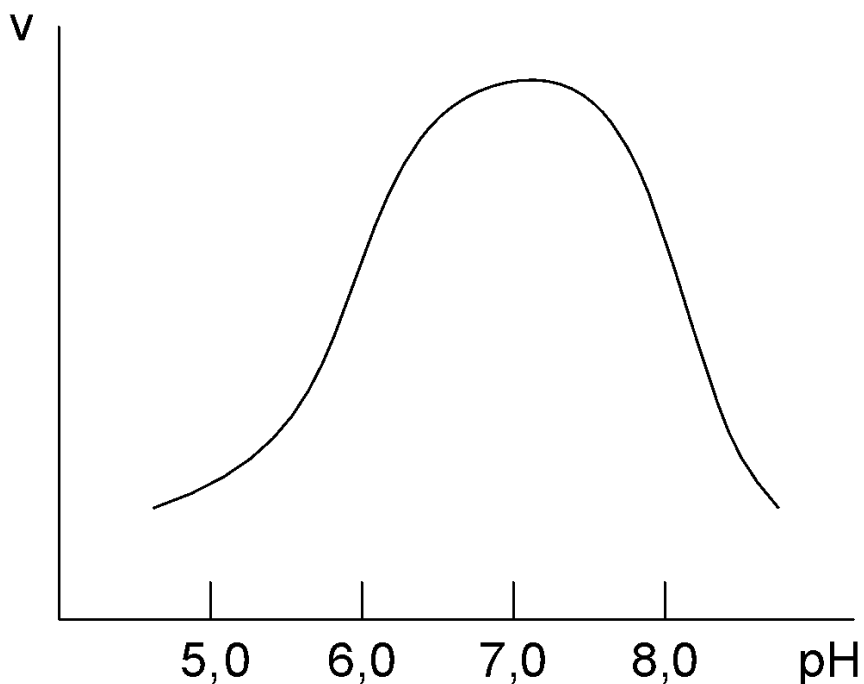
# Влияние температуры на скорость ферментативной реакции

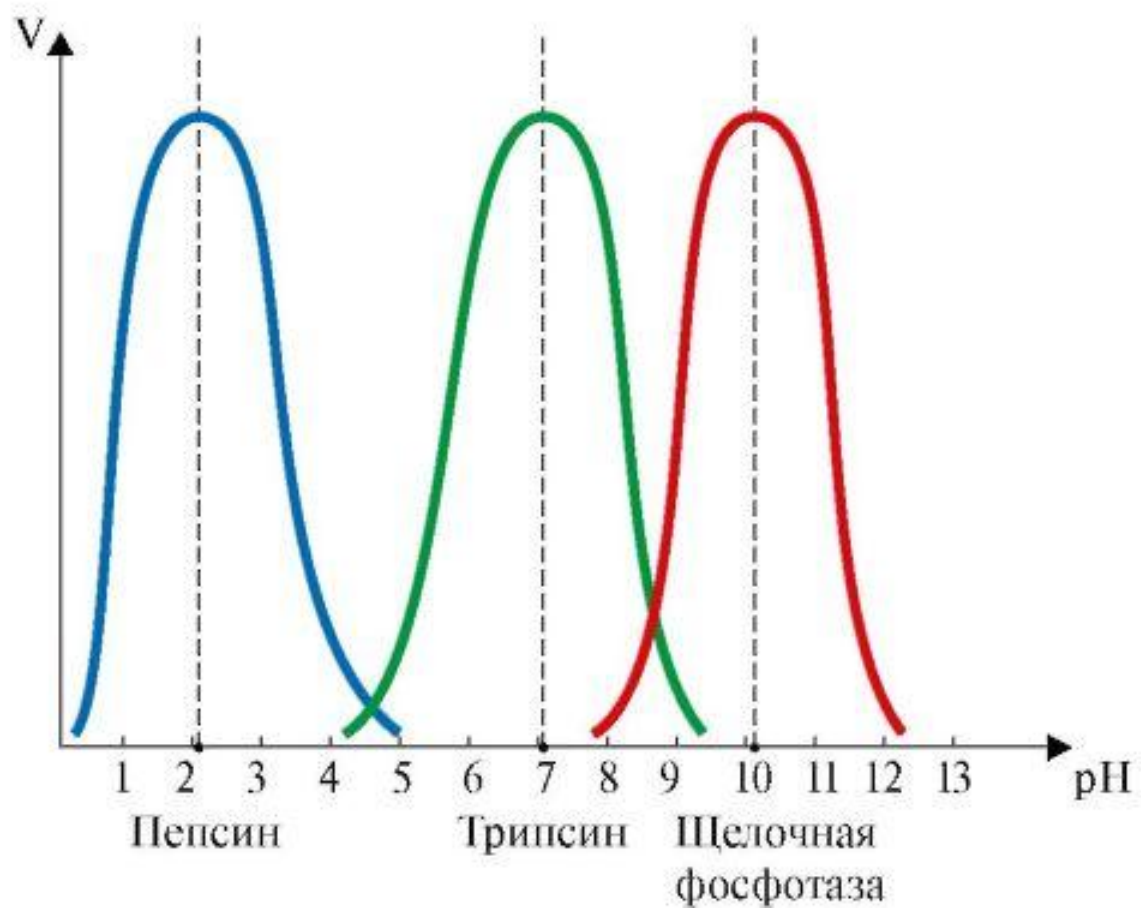
Скорость ферментативных реакций, как и любых химических реакций, зависит от температуры. При повышении температуры на  $10^{\circ}\text{C}$  скорость реакции увеличивается в 2-4 раза согласно правилу Вант-Гоффа. Однако при температурах выше  $40^{\circ}\text{C}$  существенной становится денатурация ферментов, что приводит к уменьшению суммарной активности.



## Влияние pH на активность ферментов

Зависимость скорости ферментативной реакции от pH имеет колоколообразный вид. Значения pH, при которых наблюдается наиболее высокая скорость ферментативной реакции, называют оптимальными (pH-оптимум). Характер кривых и значение pH-оптимума зависит от природы заряженных групп субстрата и заряженных групп фермента (особенно тех, которые входят в активный центр). Оптимум pH для большинства ферментов лежит в пределах от 6,0 до 8,0.





Отклонение рН среды от оптимального вызывает изменение:

- ионизации функциональных групп фермента, а иногда и субстрата;
- заряда фермента и его конформации;
- конформации активного центра фермента;
- сродства фермента к субстрату.

То есть нарушается комплементарность активного центра фермента субстрату и снижается скорость ферментативной реакции.

## Сходство и отличие каталитического действия ферментов и неорганических катализаторов.

Сходство ферментов	Отличие ферментов
<p>1. Ускоряют только термодинамически возможные реакции</p>	<p>1. Высокая специфичность. Каталитическая специфичность (катализ по 1 из возможных путей), лежит в основе классификации ферментов. Субстратная специфичность (абсолютная (1 субстрат), групповая (похожие субстраты), стереоспецифичность (L,D ряд)).</p>
<p>2. В случае обратимых реакций, ускоряют и прямую и обратную реакцию, т.е. не меняют направление реакции.</p>	<p>2. Высокая эффективность действия (в <math>10^8</math>-<math>10^{14}</math> раз быстрее некатализируемых реакций).</p>
<p>3. Чувствительны к активаторам и ингибиторам</p>	<p>3. Ферменты действуют в мягких условиях (<math>t = 36</math>-<math>37^\circ\text{C}</math>, <math>\text{pH} \sim 7,4</math>, атмосферное давление), т.к. они обладают конформационной лабильностью – способностью к изменению конформации молекулы под действием денатурирующих агентов (<math>\text{pH}</math>, <math>T</math>, химические вещества). В результате этого каталитическая активность фермента снижается.</p>
<p>4. Действуют в малых количествах</p>	<p>4. В организме действие ферментов регулируется.</p>
<p>5. В реакциях не расходуются</p>	<p>5. Широкий диапазон действия (все процессы в организме катализируются ферментами).</p>