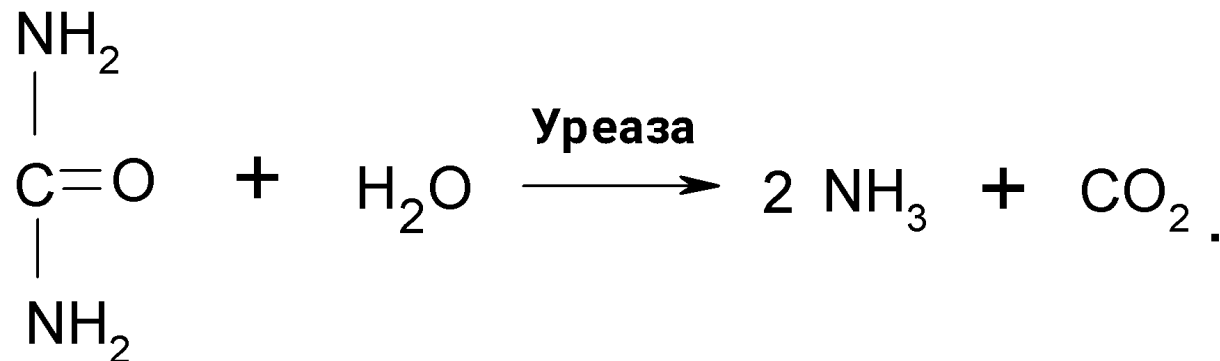


ФЕРМЕНТЫ

• ОБЩИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ФЕРМЕНТАХ

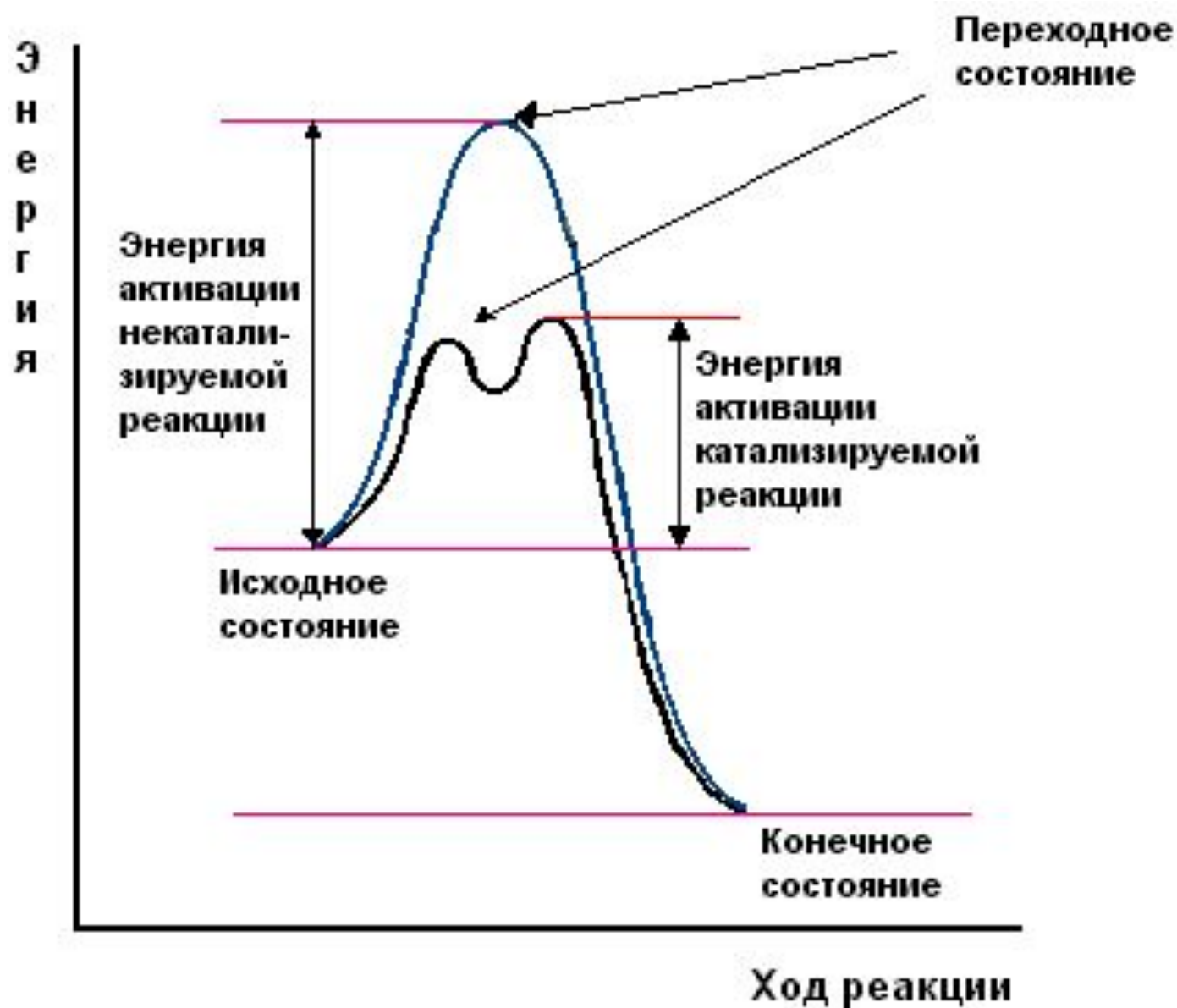
- *Ферменты*, или *энзимы*, – это биологические катализаторы, ускоряющие химические реакции.
- Общее число известных ферментов составляет несколько тысяч.
- Практически все химические реакции, протекающие в живых организмах, осуществляются при их участии.

- Ферменты ускоряют химические реакции в 10^8 – 10^{20} раз.
- Слово фермент произошло от латинского fermentum – закваска, энзим в переводе с греческого означает «в дрожжах».
- В 1926 году Джеймс Самнер впервые получил очищенный фермент в кристаллическом виде – уреазу:



- Большинство ферментов по своей природе являются белками.
- У некоторых РНК обнаружена способность осуществлять катализ; такие РНК получили название *рибозимов*, или *РНК-ферментов*.

- Ферменты имеют ряд общих свойств с химическими небелковыми катализаторами:
- не расходуются в процессе катализа и не претерпевают необратимых изменений;
- ускоряют как прямую, так и обратную реакции, не смещая при этом химического равновесия;
- катализируют только те реакции, которые могут протекать и без них;
- повышают скорость химической реакции за счет снижения *энергии активации*



Ферменты от химических катализаторов отличаются по ряду параметров:

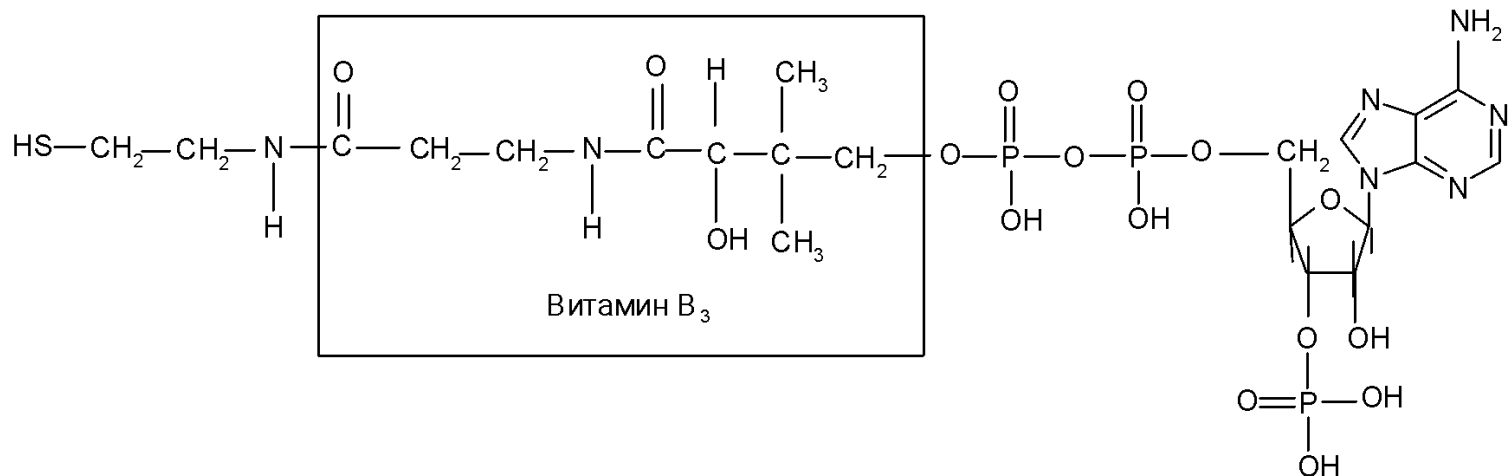
- ферменты обладают более высокой эффективностью действия;
- ферменты обладают более высокой специфичностью в сравнении с небелковыми катализаторами, они ускоряют более узкий круг химических реакций;

- ферменты эффективно действуют в мягких условиях: при температуре 0 – 40 °С, при атмосферном давлении, при значениях рН, близких к нейтральным, в более жестких условиях ферменты денатурируют и не проявляют своих каталитических качеств;
- активность ферментов регулируется активаторами и ингибиторами.

Структура ферментов

- Относительная молекулярная масса ферментов может колебаться от 10^4 до 10^6 и более.
- Ферменты – это, как правило, глобулярные белки.
- Одни ферменты являются простыми белками - состоят только из аминокислотных остатков (рибонуклеаза, пепсин, трипсин),
- активность других зависит от дополнительных химических компонентов - *кофакторов*.

- В качестве кофакторов могут выступать ионы металлов Fe^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+}
- или сложные органические вещества, которые называют также *коферментами*.
- В состав многих коферментов входят витамины.



- Если кофермент прочно связанный с ферментом называется простетической группой сложного белка.
- Кофактор легко диссоциирует из комплекса с ферментом.

Кофакторы могут выполнять следующие функции:

- участие в катализе;
- осуществление взаимодействия между субстратом и ферментом;
- стабилизация фермента.

- Каталитически активный комплекс фермент – кофактор называют *холоферментом*.
- Отделение кофактора от холофермента приводит к образованию неактивного *апофермента*:

Холофермент $\leftrightarrow$ апофермент + кофактор.

В молекуле фермента присутствует *активный центр*.

Активный центр – это область молекулы фермента, в которой происходит связывание субстрата и его превращение в продукт реакции.

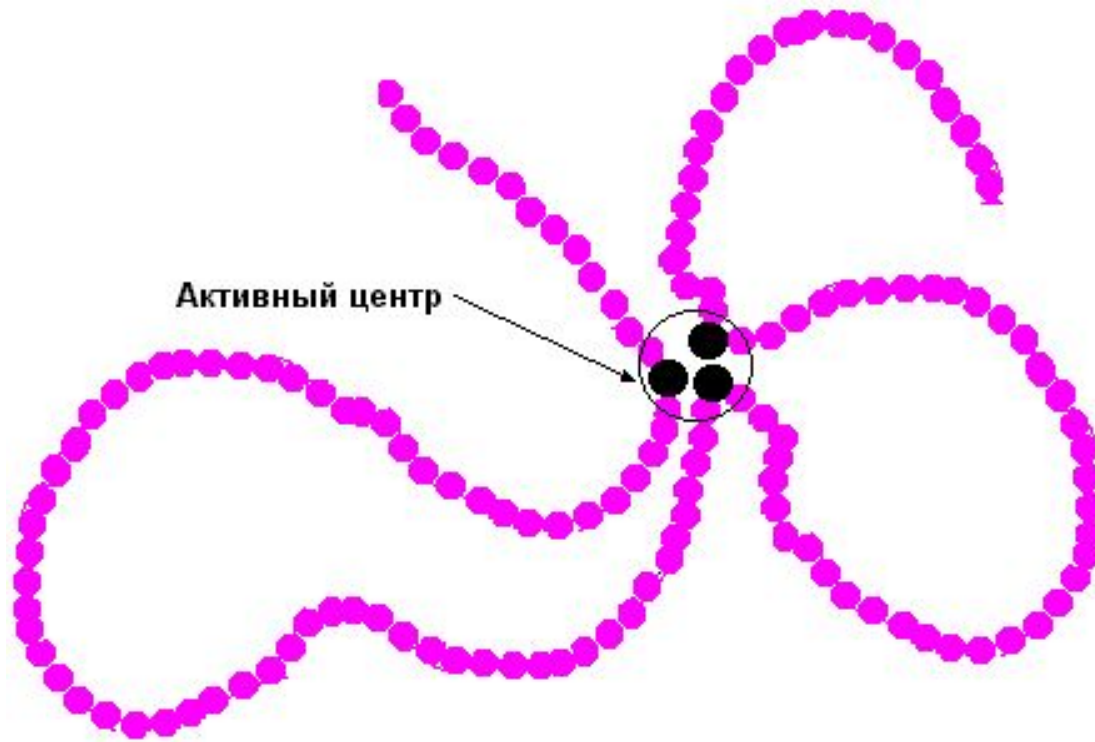
В активном центре выделяют два участка:
якорный (контактный, связывающий) – отвечает за связывание и ориентацию субстрата в активном центре,
каталитический – непосредственно отвечает за осуществление реакции.

Фермент может иметь аллостерический центр, служащий для контакта с регуляторной молекулой.



- Активный центр образуют аминокислотные остатки полипептидной цепи.
- В состав активного центра может входить и небелковый компонент.
- Наиболее часто в составе активного центра содержатся полярные (серин, треонин, цистеин) и заряженные (лизин, гистидин, глутаминовая и аспарагиновая кислоты) аминокислотные остатки.

- Аминокислотные остатки, образующие активный центр, в полипептидной цепи находятся на значительном расстоянии и оказываются сближенными при формировании третичной структуры.



- Некоторые ферменты синтезируются в неактивной форме в виде *проферментов*, которые затем под действием определенных факторов активируются.
- Например, пищеварительные ферменты химотрипсин и трипсин образуются в результате активации химотрипсиногена и трипсиногена.

Изоферменты – это группа ферментов, выполняющих идентичную каталитическую функцию у представителей одного биологического вида, но отличающихся по структуре и физико-химическим свойствам (генетически детерминированы).

Множественные формы ферментов – это группа ферментов, выполняющих идентичную каталитическую функцию у представителей одного биологического вида, образовавшиеся в результате различных посттрансляционных модификаций.

Номенклатура и классификация ферментов

- ***Тривиальная номенклатура.***

- Например,

пепсин (от греч. “пепсис” – “пищеварение”),
трипсин (от греч. “трипсис” – “разжижаю”),
папаин (от названия дынного дерева *Carica papaya*).

- Рациональная номенклатура.

Название фермента составляется из названия субстрата и характерного окончания “-аза”.

Например,

амилаза - катализирует гидролиз крахмала (от греч. “амилон” – “крахмал”),

липаза - гидролиз липидов (от греч. “липос” – “жир”),

уреаза – гидролиз мочевины (от греч. “уреа” – “мочевина”) и т.д.

Существуют и систематические названия ферментов, включающие названия субстратов и отражающие характер катализируемой реакции:

АТФ + D-глюкоза $\leftrightarrow$ АДФ + D-глюкоза – 6 – фосфат,

АТФ: гексоза 6-фосфотрансфераза.

В соответствии с катализируемой реакцией все ферменты делятся на 6 классов.

- *Оксидоредуктазы.*

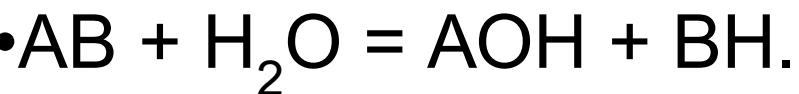
Катализируют окислительно-восстановительные реакции

- *Трансферазы.*

Катализируют реакции межмолекулярного переноса групп: $AB + C = AC + B$.

- *Гидролазы.*

Катализируют реакции гидролиза:



- *Лиазы.*

Катализируют реакции присоединения групп по двойным связям и обратные реакции.

- *Изомеразы.*

Катализируют реакции изомеризации (внутримолекулярный перенос групп).

- *Лигаза.*

Катализируют реакции синтеза, сопряженные с распадом макроэргов (АТФ).

- В свою очередь каждый класс подразделяют
 - на подклассы,
 - подклассы – на подподклассы.
- Ферментам, образующим подподклассы, присваивается порядковый номер.
- В итоге фермент имеет свой четырехзначный номер:

КФ 2.7.1.1. означает:

класс 2 – трансферазы;

подкласс 7 – перенос фосфата;

подподкласс 1 – алкогольная группа – акцептор фосфата.

Название – гексокиназа, или АТФ:D-гексоза-6-фосфотрансфераза.

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

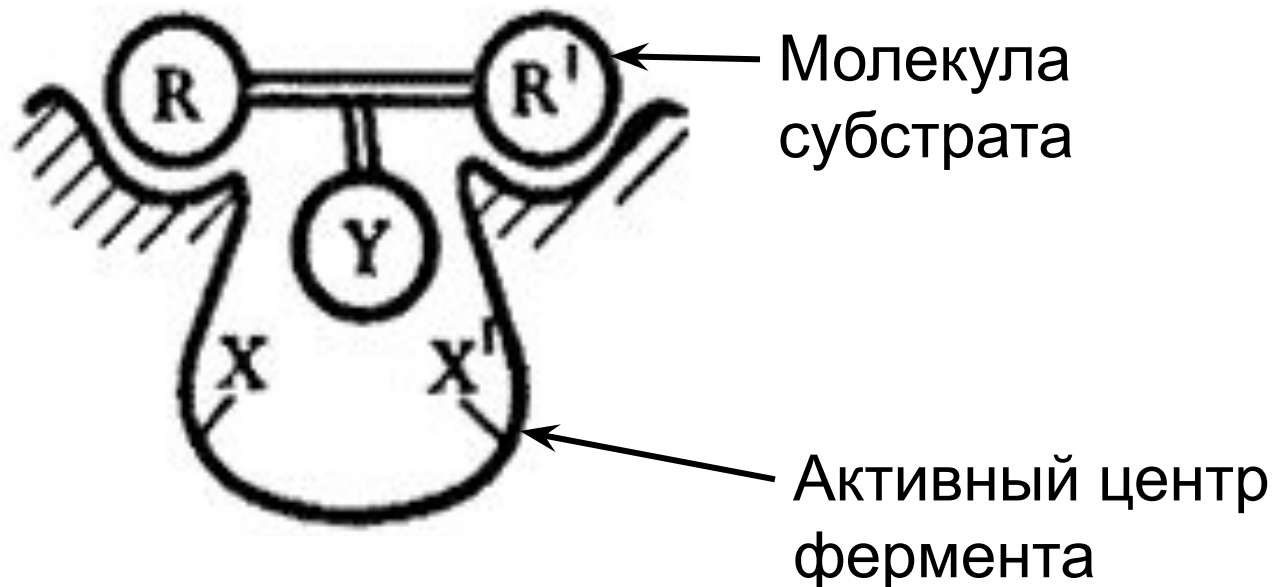
Последовательность стадий катализа:

1. Взаимодействие субстрата с ферментом в активном центре.
2. Химическое превращение субстрата в продукт реакции.
3. Освобождение продукта реакции из активного центра фермента.

Взаимодействие фермента E с субстратом S приводит к образованию промежуточного фермент-субстратного комплекса ES .

При взаимодействии фермента с субстратом, реагирующие вещества сближаются и удерживаются в таком положении, чтобы реакционноспособные группы могли провзаимодействовать;

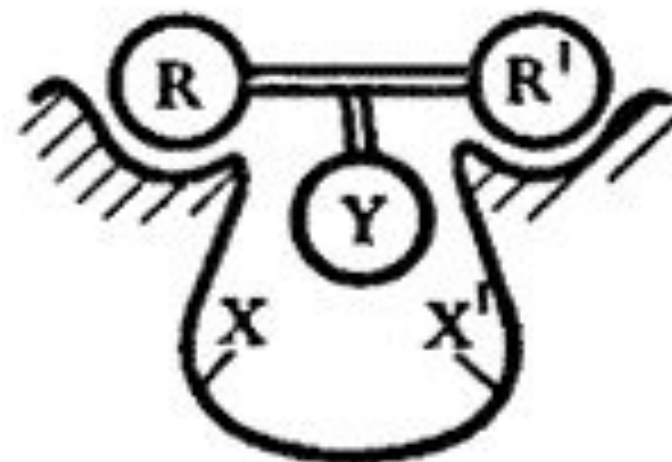
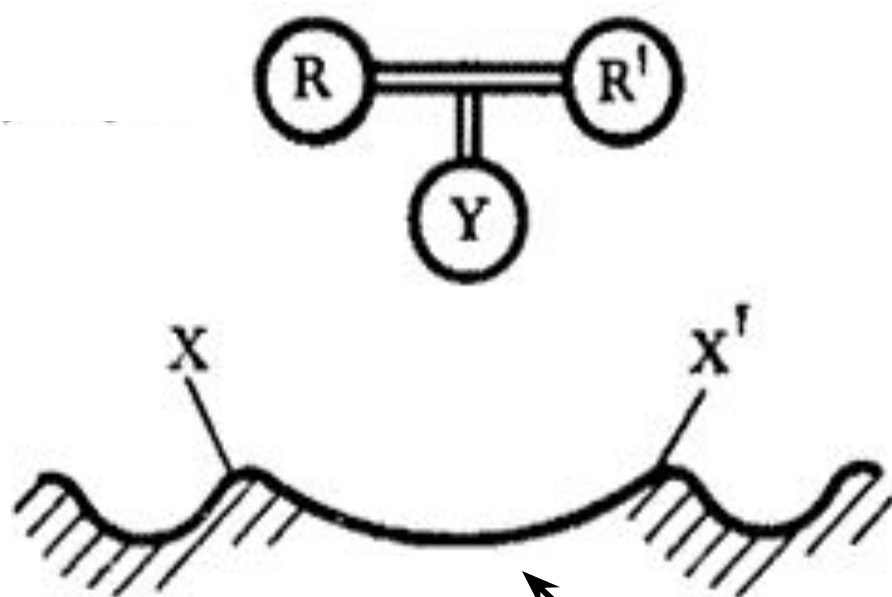
- Модель жесткой матрицы Э. Фишера (1894) (модель «ключ-замок») основана на теории существования конформационного соответствия между Е и S: «активный центр организован так, что субстрат входит в него как ключ в замок».



- Модель и теория индуцированного конформационного соответствия между Е и S Д. Кошланда (1958) (модель «рука-перчатка»).

Взаимодействие субстрата с ферментом вызывает конформационные изменения в молекуле фермента: функциональные группы принимают ориентацию, необходимую для связывания субстрата и катализа.

Молекула
субстрата



Активный центра
фермента

В катализе принимают участие:

- функциональные группы, которые могут быть донорами или акцепторами H^+ (кислотами и основаниями);
- группы, которые могут участвовать в образовании ковалентных связей с молекулами субстрата.

КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

- Кинетика ферментативных реакций – наука о скоростях ферментативных реакций, их зависимости от различных факторов.
- Скорость ферментативной реакции:

$$v = \Delta c / t .$$

Скорость ферментативной реакции зависит от природы фермента, которая определяет его активность.

Способы выражения ферментативной активности:

- *Единица активности фермента* – количество фермента, которое в стандартных условиях катализирует превращение 1 мкмоль субстрата в 1 мин (1 МЕ = 1 мкмоль/мин).
- *1 КАТАЛ* – количество фермента, способное в течение 1 с обеспечить превращение 1 моль субстрата в стандартных условиях.
 $1 \text{ КАТАЛ} = 6 \cdot 10^7 \text{ МЕ.}$

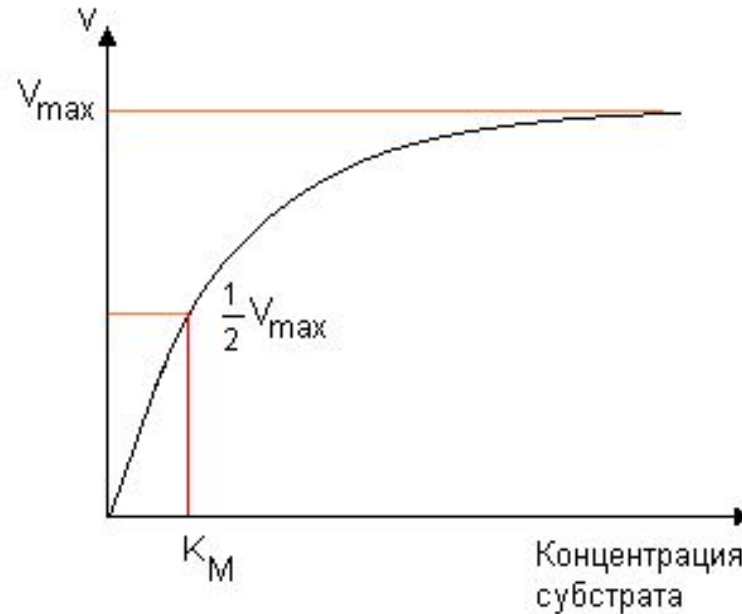
- *Удельная активность* – число единиц ферментативной активности, приходящееся на 1 мг белка ($1 \text{ мкмоль/мин} \cdot \text{мг}$ белка).
- *Активность каталитического центра* – число молекул субстрата, которые претерпевают превращение за 1 мин в расчете на 1 каталитический центр.
- *Число оборотов фермента* – число молекул субстрата, претерпевающих превращение за 1 мин в расчете на 1 активный центр или 1 активную молекулу фермента.

- В процессе ферментативной реакции фермент (E) взаимодействует с субстратом (S) с образованием фермент-субстратный комплекс, который затем распадается с высвобождением фермента и продукта (P) реакции:



- Скорость ферментативной реакции зависит от концентрации субстрата и фермента, температуры, pH среды, наличия различных регуляторных веществ.

Влияние концентрации субстрата на скорость ферментативной реакции (Уравнение Михаэлиса-Ментен)



- При низких концентрациях субстрата скорость прямо пропорциональна его концентрации, с ростом концентрации скорость реакции увеличивается медленнее, при очень высоких концентрациях субстрата скорость практически не зависит от его концентрации и достигает своего максимального значения ($V_{\max}$).

При высоких концентрациях субстрата все молекулы фермента находятся в составе фермент-субстратного комплекса, и достигается полное насыщение активных центров фермента, именно поэтому скорость реакции практически не зависит от концентрации субстрата.

- График зависимости активности фермента от концентрации субстрата описывается уравнением Михаэлиса – Ментен, которое получило название в честь выдающихся ученых Л.Михаэлиса и М. Ментен:

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

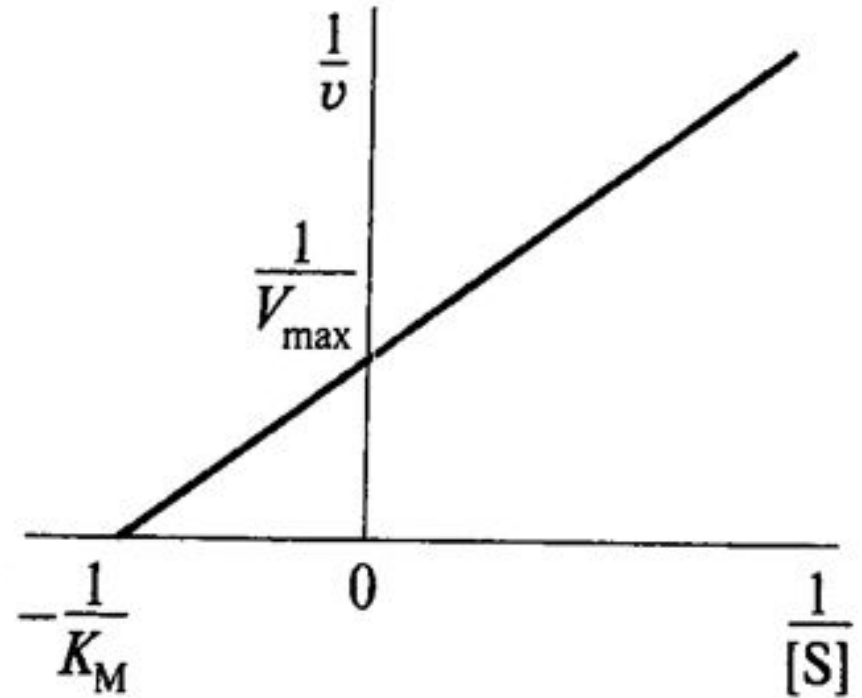
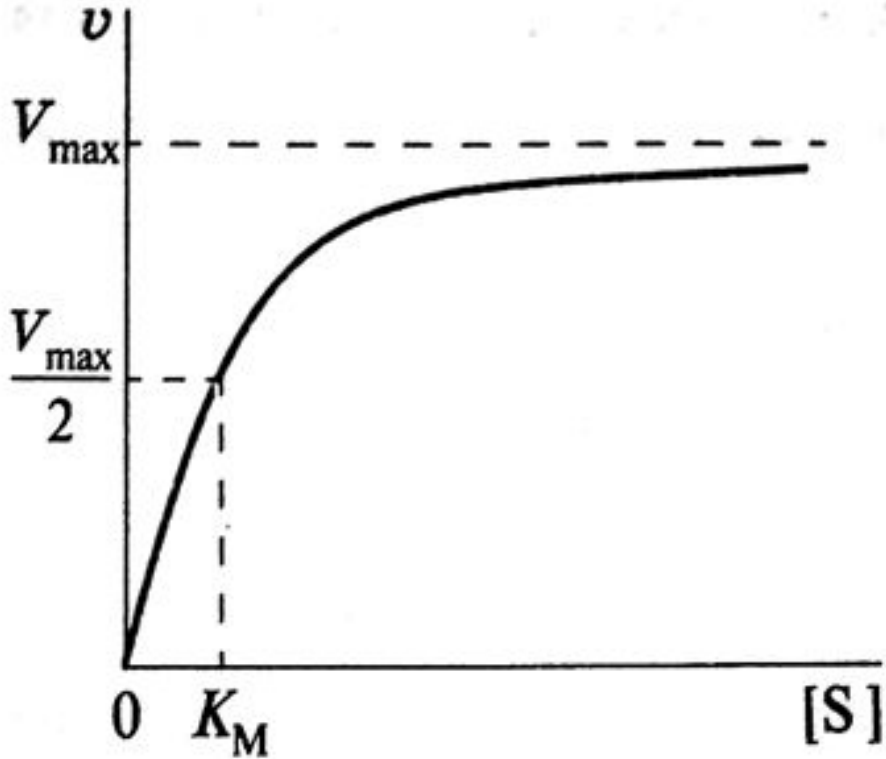
- где v – скорость ферментативной реакции; $[S]$ – концентрация субстрата; K_M – константа Михаэлиса.

- *Физический смысл константы Михаэлиса:*

При условии, что $v = \frac{1}{2} V_{max}$, получаем $K_M = [S]$.

Константа Михаэлиса равна концентрации субстрата, при которой скорость реакции равна половине максимальной.

Определение K_M



Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата в двойных обратных координатах (уравнение Лайнуивера-Бэрка)

Зависимость скорости реакции от концентрации фермента

Зависимость скорости реакции от концентрации фермента является прямолинейной.



Не прямолинейная зависимость

- *при высоких концентрациях фермента* наблюдается вследствие нехватки субстрата или агрегации молекул фермента и др.,

- *при небольших концентрациях фермента* может быть результатом присутствия в инкубационной среде токсических примесей, связывающихся с ферментом и инактивирующих его.

Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры

Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры представлена на графике

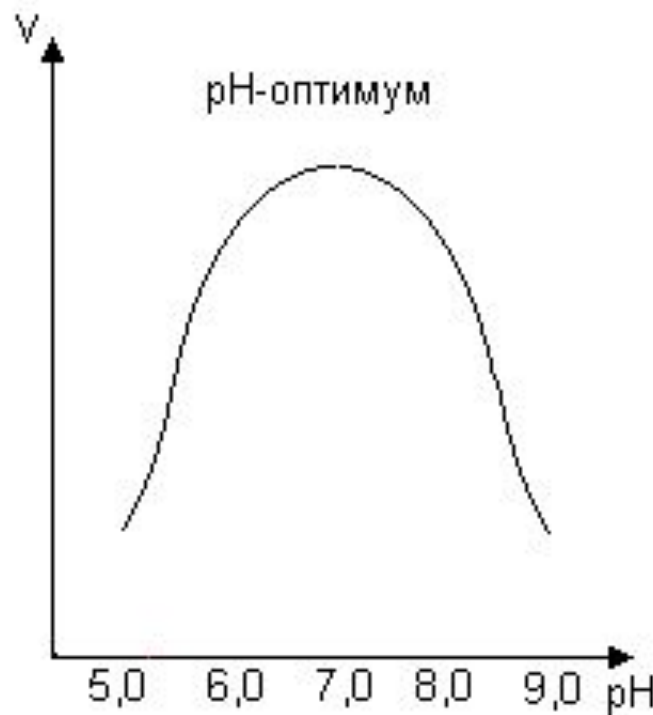


- При низких температурах (приблизительно до 40 – 50 °C) повышение температуры на каждые 10 °C в соответствии с правилом Вант-Гоффа сопровождается увеличением скорости химической реакции в 2 – 4 раза.
- При высоких температурах более 55 – 60 °C активность фермента резко снижается из-за его тепловой денатурации.
- Максимальная активность ферментов наблюдается обычно в пределах 40 – 60 °C.

- Температура, при которой активность фермента максимальна, называется температурным оптимумом.
- Температурный оптимум ферментов термофильных микроорганизмов находится в области более высоких температур.

Зависимость скорости ферментативной реакции от pH

График зависимости от pH имеет колоколообразную форму



Значение pH , при котором активность фермента максимальна, называется *pH -оптимумом* фермента

Значения pH-оптимума для различных ферментов колеблются в широких пределах.

Фермент	pH-оптимум
Пепсин	1,5
Фосфатаза	5,8
Уреаза	6,7
Трипсин	7,7
Каталаза	7,6
Аргиназа	9,7

Характер зависимости ферментативной реакции от рН определяется тем, что этот показатель оказывает влияние на:

- ионизацию аминокислотных остатков, участвующих в катализе,
- ионизацию субстрата,
- конформацию фермента и его активного центра.

Ингибирование ферментов

Скорость ферментативной реакции может быть снижена при участии *ингибиторов*.

Ингибитор – вещество, специфически уменьшающее скорость ферментативной реакции.

Различают ингибиторы:

- .связывающиеся с апоферментом,
- .образующие комплекс с субстратом,
- .связывающие кофермент,
- .связывающие активатор,
- .взаимодействующие с фермент-субстратными комплексами.

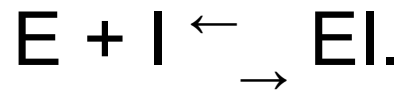
- Ингибиторы можно разделить на два основных типа: *необратимые* и *обратимые*.
- Необратимые ингибиторы (I) связываются с ферментом с образованием комплекса, диссоциация которого с восстановлением активности фермента невозможна:



Примером необратимого ингибитора является диизопропилфторфосфат (ДФФ). ДФФ ингибирует фермент ацетилхолинэстеразу, играющего важную роль в передаче нервного импульса. Этот ингибитор взаимодействует с серином активного центра фермента, блокируя тем самым активность последнего. Вследствие этого нарушается способность отростков нервных клеток нейронов проводить нервный импульс. ДФФ является одним из первых веществ нервно-паралитического действия. На его основе создан ряд относительно нетоксичных для человека и животных *инсектицидов* - веществ, ядовитых для насекомых.

Обратимые ингибиторы при определенных условиях могут быть легко отделены от фермента.

Активность последнего при этом восстанавливается:

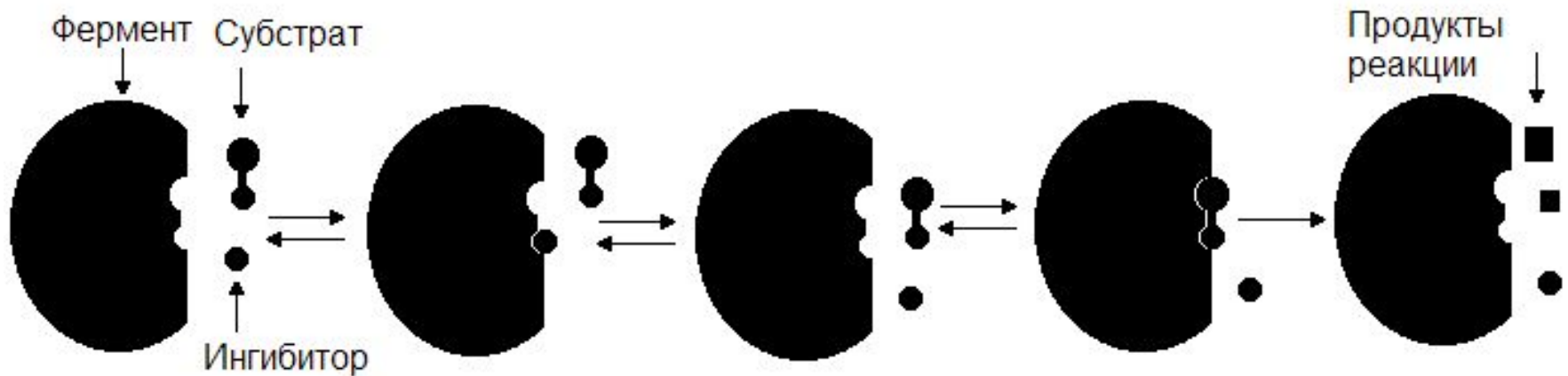


Обратимое ингибирование активности фермента подразделяется на: конкурентное, неконкурентное, бесконкурентное и смешанное.

Типы ингибирования

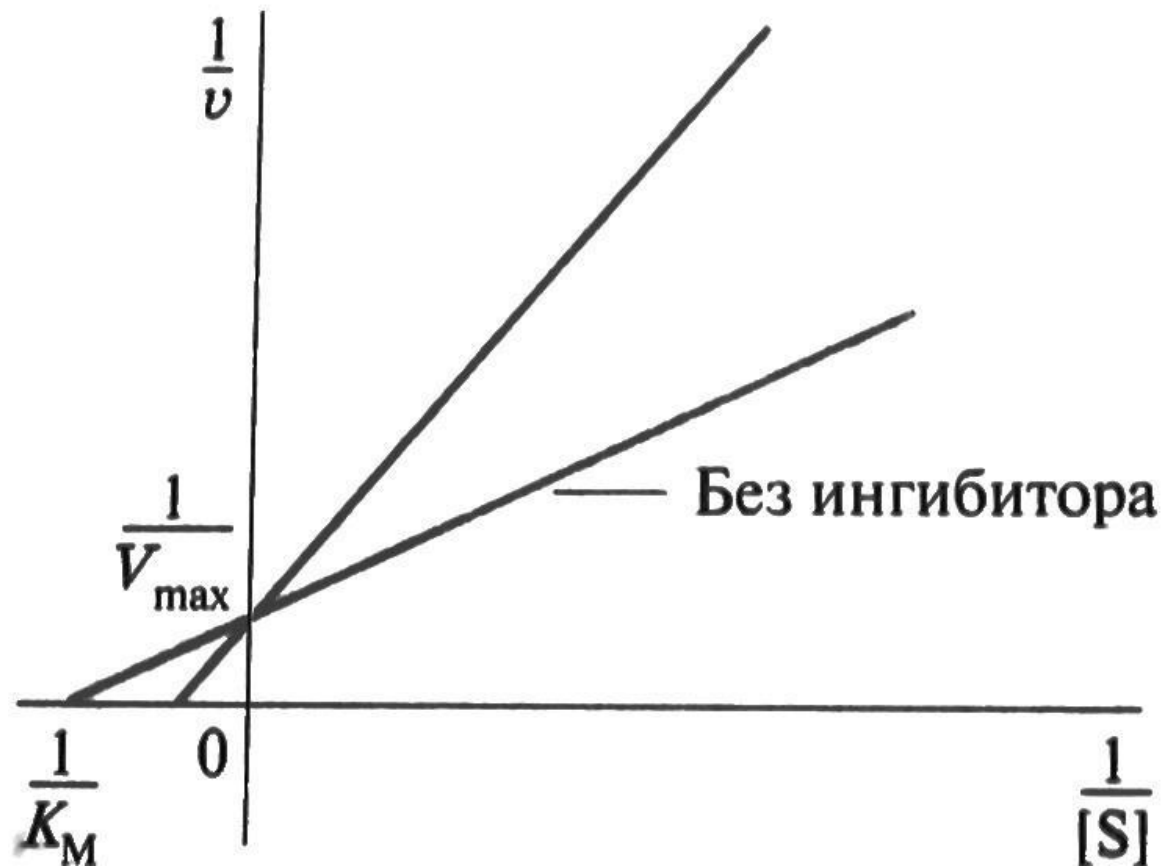
Конкурентное ингибирование.

- Конкурентный ингибитор, являясь структурным аналогом субстрата, взаимодействует с активным центром фермента и таким образом перекрывает доступ субстрата к ферменту.
- При этом ингибитор не подвергается химическим превращениям и связывается с ферментом обратимо.
- После диссоциации комплекса EI фермент может связаться либо с субстратом и преобразовать его, либо с ингибитором.
- Поскольку и субстрат и ингибитор конкурируют за место в активном центре, такое ингибирование называется конкурентным.



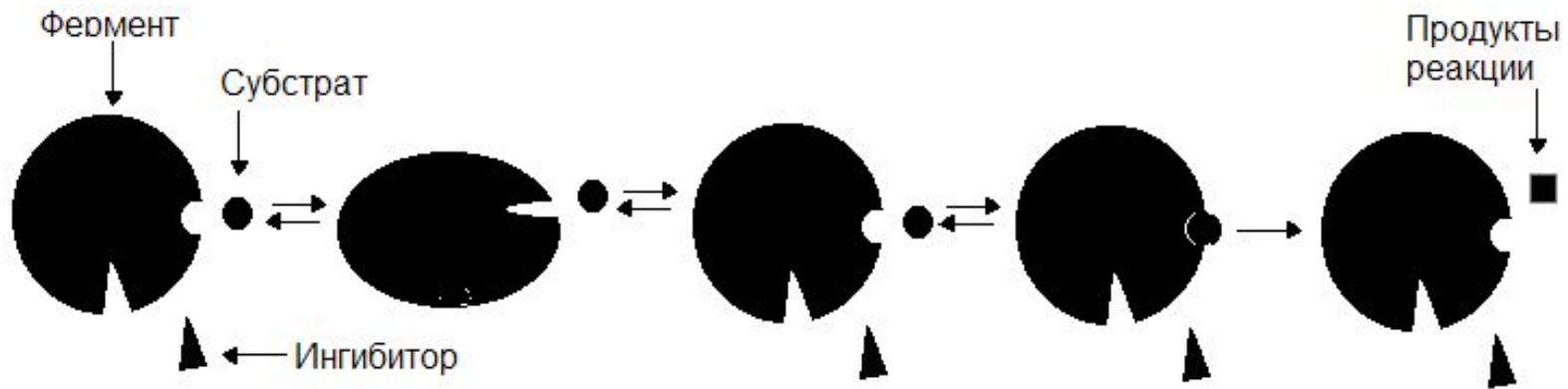
- Конкурентные ингибиторы используются в медицине. Для борьбы с инфекционными болезнями ранее широко применялись сульфаниламидные препараты. Они близки по своей структуре к *пара-аминобензойной кислоте* (ПАБК), необходимому фактору роста многих патогенных бактерий. ПАБК является предшественником фолиевой кислоты, которая служит кофактором ряда ферментов. Сульфаниламидные препараты выступают в качестве конкурентного ингибитора ферментов синтеза фолиевой кислоты из ПАБК и тем самым подавляют рост и размножение патогенных бактерий.

В присутствии конкурентного ингибитора
 V максимальная = const,
 K_m увеличивается



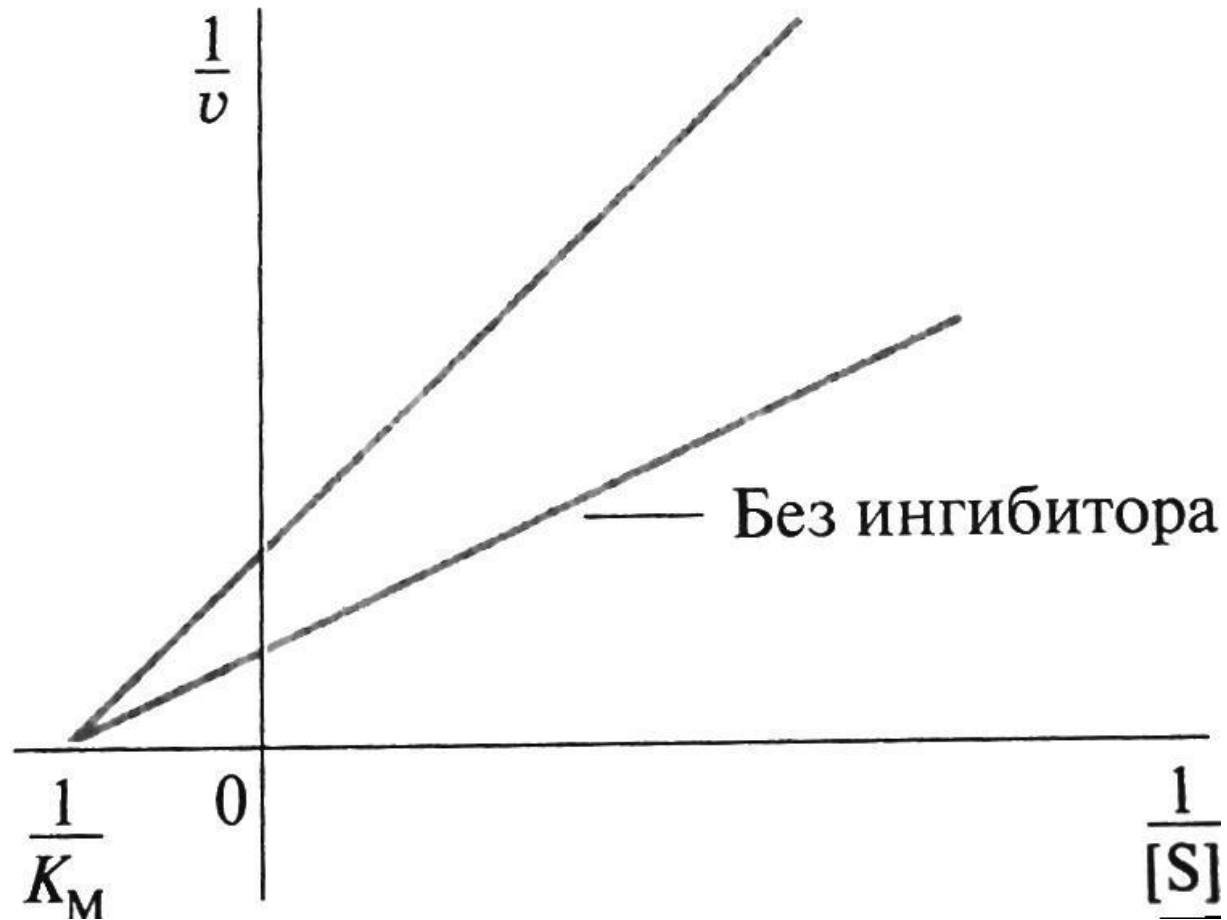
Неконкурентное ингибирование

- Неконкурентные ингибиторы по структуре не сходны с субстратом и при образовании EI взаимодействуют не с активным центром, а с другим участком фермента.
- Взаимодействие ингибитора с ферментом приводит к изменению структуры последнего.
- Образование EI-комплекса является обратимым, поэтому после его распада фермент вновь способен атаковать субстрат



- В качестве неконкурентного ингибитора может выступать цианид CN^- . Он связывается с ионами металлов, входящими в состав простетических групп и подавляет активность этих ферментов. Отравления цианидами крайне опасны. Они могут привести к летальному исходу.

В присутствии неконкурентного ингибитора
 V максимальная уменьшается,
 $K_M = \text{const}$



Бесконкурентное ингибирование

Ингибитор обратимо взаимодействует с ферментом только после образования фермент-субстратного комплекса.

Образующийся в этом случае тройной комплекс фермент-субстрат-ингибитор не подвергается дальнейшему превращению.

Смешанное ингибирование

сочетает в себе конкурентное и неконкурентное торможение.

Ингибитор, присоединяется в активном центре фермента, изменяет сродство фермента к субстрату и каталитическую активность фермента.

Регуляция каталитической активности ферментов

- Регуляция путём посттрансляционной ковалентной модификации молекулы фермента (ограниченный протеолиз, фосфорилирование, метилирование, гликозилирование и др.).
- Изменение физико-химических условий внутриклеточной среды (pH, температура и др.).
- Белок-белковое взаимодействие (регуляция специфическими белками).

Регуляция функционирования ферментных систем

Ферментные системы обладают способностью поддерживать необходимую скорость суммарного процесса преобразования исходного субстрата в конечный продукт.

При накоплении конечного продукта он может оказывать ингибирующее действие на первый фермент системы. Происходит ингибирование по типу обратной связи, или ретро-ингибирование.

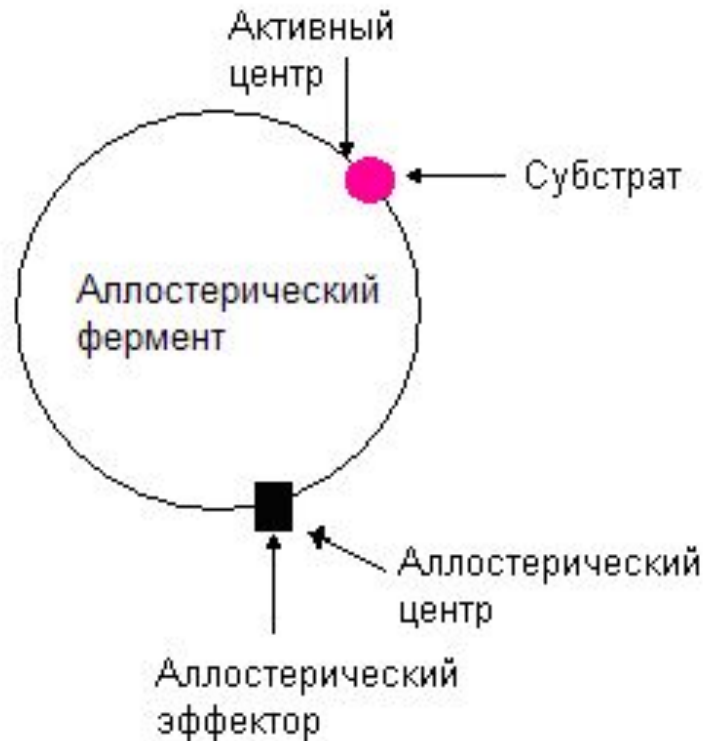
Регуляция биосинтеза ферментов

- Индукция фермента (синтез de novo) происходит при повышении концентрации субстрата в клетке.
- Репрессия фермента (снижение скорости синтеза) происходит при повышении концентрации продуктов ферментативной реакции.

Сущность регуляции биосинтеза сводится к “включению” или “выключению” генов, ответственных за синтез фермента.

Аллостерические ферменты

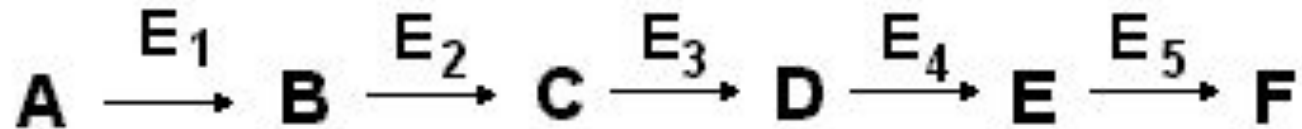
- Термин «аллостерический» происходит от греческих слов allo – другой, stereo – участок.
- Аллостерические ферменты наряду с активным центром имеют *аллостерический центр*.



- С аллостерическим центром связываются *аллостерические эффекторы* - вещества, способные изменять активность ферментов.
- Эффекторы бывают
 - положительными, активирующими фермент,
 - отрицательными – ингибирующими фермент.
 - Некоторые аллостерические ферменты могут подвергаться действию двух и более эффекторов.

Регуляция мультиферментных систем

- Некоторые ферменты действуют согласованно, объединяясь в мультиферментные системы, в которых каждый фермент катализирует определенную стадию метаболического пути:



- В мультиферментной системе есть фермент, который определяет скорость всей последовательности реакций.
- Этот фермент, как правило, бывает аллостерическим и находится в начале матаболического пути.
- Он способен, получая различные сигналы, как повышать, так и понижать скорость катализируемой реакции, тем самым регулируя скорость всего процесса.

Применение ферментов

Отрасли промышленности, в которых применяются ферменты:

- хлебопечение, пивоварение, виноделие, чайное, кожевенное и меховое производства, сыроварение, кулинария (для обработки мяса) и т.д.;
- в химической индустрии для разделения стереоизомеров;
- сельском хозяйстве;
- медицине.

Применение ферментов в медицине

Энзимопатология - изучает молекулярные основы развития патологического процесса, исходя из данных о нарушениях механизмов регуляции активности или синтеза ферментов.

Энзимодиагностика— это использование ферментов в качестве избирательных реагентов для определения метаболитов, а также определение самих ферментов в биологических жидкостях при патологии.

Энзимотерапия – использование ферментов, активаторов и ингибиторов в качестве лекарственных средств.

Например: протеолитические ферменты: пепсин, трипсин, химотрипсин и их смеси.

Спасибо за внимание