

Министерство сельского хозяйства и продовольствия
республики Беларусь

Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия
ветеринарной медицины

Кафедра химии

Учебно-методическое пособие
по теме: «Ферменты»

Витебск 2000

Учебное пособие по теме ферменты подготовили старшие преподаватели кафедры химии Котович И.В., Баран В.П.

Рецензенты: зав. кафедрой терапии, профессор, член-корр. ААН РБ

Карпуть И.М.;

зав. кафедрой нормальной и патологической физиологии, профессор, член-корр. РААН Гусаков В. К.

Настоящее учебно-методическое пособие предназначено для студентов 2-х курсов факультета ветеринарной медицины и зооинженерного факультета .

Данное пособие содержит сведения по строению, свойствам , регуляции активности , классификации и номенклатуре, применению ферментов в ветеринарной медицине и в животноводстве. Отдельные разделы пособия проиллюстрированы схемами и рисунками , что позволяет лучше осмыслить изучаемый материал.

Материал пособия дает возможность студенту приобрести знания , необходимые для изучения закономерностей протекания процессов в организме животных , что позволит будущему врачу ветеринарной медицины понять патогенез многих заболеваний.

Пособие одобрено и рекомендовано к печати учебно-методической комиссией факультета ветеринарной медицины Витебской государственной академии ветеринарной медицины (протокол №3 от 30.03.1999 г.) .

Содержание

1.Понятие о ферментах. Краткая история развития энзимологии.	4
2.Применение ферментов в ветеринарной медицине и в животноводстве.	5
3.Номенклатура ферментов.	6
4.Классификация ферментов и характеристика отдельных классов.	6
5.Строение ферментов	10
6.Основные свойства ферментов.	13
7.Механизм действия ферментов	14
8.Пути регуляции активности ферментов.	17
Список литературы	24

1. Понятие о ферментах. Краткая история развития энзимологии.

Ферменты - это специфические белки, образующиеся в клетках живых организмов и катализирующие происходящие в них химические реакции.

Еще с глубокой древности человек использовал ферментативные процессы в хлебопечении, виноделии, обработке кож и т.д., но не понимал их сущности.

Первые попытки сделать это относятся к XVII веку, когда, пытаясь объяснить механизм пищеварения, его сравнивали с процессом брожения - так появился термин «фермент», введенный Я. ван Гельмонтом (от лат. *fermentatio* - брожение). В 1814 году русский химик К.Кирхгоф показал, что крахмал превращается в мальтозу под действием проросших зерен ячменя (солода), а в 1833 году А.Пайен и Ж.Пирсо это вещество выделили и назвали его диастазой (в последствие оно получило название амилаза).

Т.Шванн в 1836 году открыл в желудочном соке фермент пепсин.

В 1837 году Й.Берцелиус показал, что ферменты это катализаторы, поставляемые живыми клетками. В 1862 году А.Я. Данилевский выделил из сока поджелудочной железы амилазу, липазу и трипсин. По мере открытия и изучения ферментов назрела необходимость объяснить природу их действия. Л.Пастер считал, что ферментативные процессы неотделимы от жизнедеятельности дрожжевой клетки, с другой стороны Ю.Либих отстаивал химическую природу брожения, считая, что ферменты могут проявлять свое каталитическое действие как вместе с клетками, так и вне их. Авторитет Пастера, однако, был велик, к тому же все экспериментальные данные того времени говорили, что брожения не может быть без живых дрожжевых клеток и Пастер победил. После этого появились понятия «организованные» и «неорганизованные» ферменты. Организованными называли те ферменты, каталитическая активность которых проявляется лишь при наличии живых организмов (например, ферменты, вызывающие различные виды брожения), а неорганизованными – те, которые структурно не связаны с клетками (например, ферменты, содержащиеся в желудочном и кишечном соках). В 1878 году Ф. Кюне предложил неорганизованные ферменты называть *энзимами*, а за организованными сохранить название ферменты. Спор между Пастером и Либихом был разрешен в результате работ М. Манассеиной и Э. Бухнера. Русский врач М.М.Манассеина в 1871 году показала, что дрожжевой сок обладал такой же способностью сбраживать углеводы, как и сами дрожжевые клетки. Эти опыты в последствии были подтверждены Э.Бухнером. Термины «*фермент*» и «*энзим*» стали употребляться как синонимы.

В 1894 году Э.Фишер предложил гипотезу, объясняющую специфичность действия ферментов «*ключ - замок*». В начале XX века И.П.Павлов, работая с пищеварительными ферментами, впервые доказал, что они в живом организме могут существовать в неактивной форме - в виде *проферментов*, им также были предложены первые методы определения активности ферментов.

В 1913 году Л.Михаэлис и М.Ментен разработали *теорию механизма действия ферментов и кинетику ферментативных реакций*.

Важным шагом в изучении активности ферментов явилось их получение в кристаллическом виде - *уреаза* (Д.Самнер, 1926 г.); *пепсин* (1930), *трипсин* (1931, Д.Нортроп), что подтвердило *белковую природу ферментов*.

В 1960 году Д.Филлипс впервые расшифровал трехмерную структуру *лизоцима* с помощью рентгено-структурного анализа. В 1969 году была синтезирована *рибонуклеаза* (Р.Мерифилд).

Основными направлениями современной энзимологии являются:

- исследования механизмов синтеза ферментов и регуляция их активности;

- изучение более тонких деталей молекулярного механизма действия ферментов;
- создание синтетических аналогов ферментов, наделенных аналогично нативным ферментам высокой активностью и специфичностью действия.

2. Применение ферментов в ветеринарной медицине и в животноводстве .

Ферменты широко применяются в различных отраслях народного хозяйства, в том числе *в ветеринарной медицине и в животноводстве*.

В связи с высокой специфичностью действия ферменты используются *в диагностических целях*. Разделом клинической биохимии является энзимология, которая изучает изменение ферментного спектра организма и активности ферментов при патологических процессах. Так, например, при паренхиматозной желтухе в сыворотке крови резко возрастает активность *аланинаминотрансферазы*, а при механической желтухе и патологии костной ткани - *щелочной фосфатазы*, при заболеваниях поджелудочной железы – *амилазы*, при *патологии печени и миокарда – лактатдегидрогеназы и аминотрансфераз*.

Широко распространено в медицине применение ферментативных препаратов при лечении различных заболеваний (*энзимотерапия*). Например, *гиалуронидаза* применяется при артритах, глазных заболеваниях, она также ускоряет всасывание различных солевых растворов, вводимых подкожно, т.к. происходит деполимеризация мукополисахаридов и увеличивается проницаемость тканей и сосудистых стенок. Препараты *трипсина* в сочетании с антибиотиками используют для лечения хронических воспалений конечностей. *Панкреатическая ДНК-аза* применяется для лечения некоторых респираторных заболеваний. При лечении заболеваний желудочно-кишечного тракта применяются ферментативные препараты пепсина, трипсина, химотрипсина и их смеси. *РНК-аза, гиалуронидаза, эластаза, коллагеназа* применяются для обработки ран, воспалительных очагов, ожогов, устранения отеков, гематом. *Аспарагиназа*, расщепляющая аспарагин, необходимый для синтеза белков раковыми клетками, используется при лечении злокачественных образований.

Использование очищенных индивидуальных ферментов длительное время сдерживалось их дороговизной и невысокой устойчивостью. Применение ферментов, достаточно прочно связанных (*иммобилизованных*) с нерастворимыми полимерными матрицами, прежде всего, сделало процессы более технологичными. Появилась возможность использовать непрерывные процессы, основанные на пропускании раствора субстрата через колонку с иммобилизованным ферментом. Исчезла проблема отделения прореагировавших компонентов от фермента, резко повысилась эффективность использования фермента. Оказалось также, что связывание с носителем часто повышает термическую устойчивость фермента.

Применение иммобилизованных ферментов вместо растворимых оказалось в ряде случаев предпочтительным и при использовании ферментов в качестве медицинских препаратов, которые в силу большей устойчивости дольше удерживаются в организме. Иммобилизованные ферменты в качестве лекарственных средств начали применять в специальных аппаратах типа «искусственной почки». Такое лечение полностью исключает нежелательные воздействия чужеродного белка и может проводиться в течение длительного времени.

Кроме того, можно создавать разнообразные удобные для применения формы иммобилизованных ферментов. Например, иммобилизация протеаз на целлюлозе позволяет получать обладающие протеолитической активностью повязки и тампоны, что удобно при использовании таких ферментов для заживления ран, язв и прочих поврежденных тканей.

В клинике практике кроме ферментов используют и их *ингибиторы*. Например, для *снижения свертываемости крови* применяют ингибитор фибринолизина - *ε-аминокапроновую кислоту*. При лечении *острых панкреатитов* применяют препарат *тразилол*, который ингибирует протеолитические ферменты.

В животноводстве ферментные препараты используются для *повышения эффективности использования питательных веществ корма*. Эти ферментные препараты дополняют выделяемые организмом ферменты и значительно ускоряют расщепление питательных веществ корма, повышая полноту усвоения компонентов корма.

3. Номенклатура ферментов.

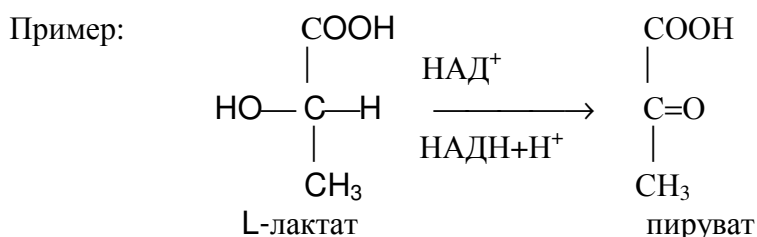
Для названия ферментов используются *тривиальная, рациональная и систематическая номенклатура*.

Тривиальная номенклатура употребляется для ограниченного числа ферментов (пепсин, трипсин, химотрипсин и некоторых других). Ее достоинство - краткость.

Более распространенной и употребляемой в практике является *рациональная номенклатура*. Название ферментов по ней складывается из корня латинского названия субстрата с прибавлением суффикса - аза (амилаза, мальтаза и др.). В ряде случаев в названии фермента может быть отражен тип катализируемой реакции (лактатдегидрогеназа, пируватдекарбоксилаза и др.). Достоинством этой номенклатуры является краткость, а недостатком - ограниченная, а в ряде случаев и отсутствие информации о химической природе субстрата и типе реакции.

В 1961 году была принята *международная (систематическая) номенклатура*, названия ферментов по которой складываются из названий субстратов, типа катализируемой реакции с прибавлением суффикса - аза.

Каждому ферменту присваивается шифр, основанный на четырехзначном десятичном коде. 1-я цифра указывает номер класса, к которому относится фермент, 2-я - номер подкласса, 3-я - номер подподкласса и 4-я - порядковый номер фермента в подподклассе. Вначале шифра ставятся буквы КФ (классификация ферментов).



Название фермента катализирующего вышеуказанную реакцию по рациональной номенклатуре - *лактатдегидрогеназа* (отщепление двух атомов водорода от молочной кислоты), а по международной - *L-лактат: НАД-оксидоредуктаза* (в качестве субстратов выступают молочная кислота и кофермент НАД, а тип реакции - окислительно-восстановительная, т.е. оксидоредукция). Шифр фермента КФ 1.1.1.27.

Достоинство систематической номенклатуры - полная информация о химической природе субстратов и типе катализируемой ферментом реакции, а недостаток - громоздкость, поэтому она применяется в основном в научных исследованиях при первом упоминании того или иного исследуемого фермента.

4. Классификация и характеристика отдельных классов ферментов.

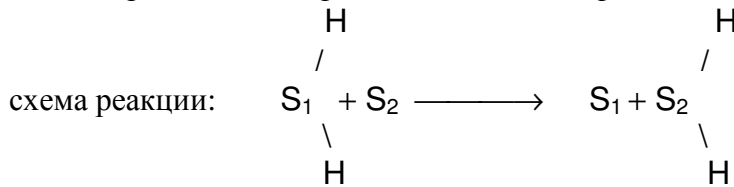
По мере открытия новых ферментов, изучения их свойств возникла необходимость в классификации ферментов. *В зависимости от типа катализируемой реакции все ферменты делятся на 6 классов:*

- 1) оксидоредуктазы;
- 2) трансферазы;
- 3) гидролазы;
- 4) лиазы;
- 5) изомеразы;
- 6) лигазы (синтетазы).

Классы ферментов делятся на подклассы, а те в свою очередь на подподклассы. Подкласс уточняет действие фермента, так как указывает в общих чертах на природу химической группы субстрата, атакуемой ферментом. Подподкласс еще более конкретизирует действие фермента, уточняя природу атакуемой связи субстрата или природу акцептора, который участвует в реакции.

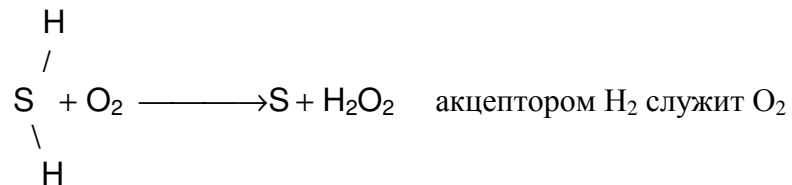
Ферменты класса оксидоредуктаз катализируют окислительно-восстановительные реакции.

К этому классу относятся ферменты *дегидрогеназы*, участвующие в переносе атомов водорода. Они подразделяются на *анаэробные*:



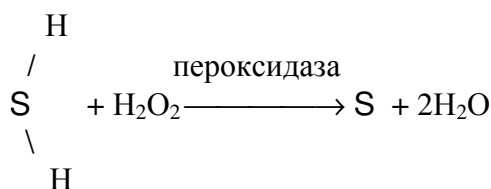
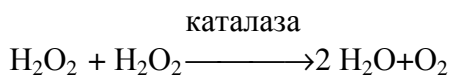
перенос атомов H₂ на любой S кроме O₂

и *аэробные*:



К классу оксидоредуктаз также относятся *цитохромы*. Эти ферменты участвуют в переносе электронов. Например, цитохромы **a**, **b**, **c**. Цитохромоксидаза (цитохром a₃) переносит электроны на O₂.

Ферменты *каталаза* и *пероксидаза*, относящиеся к классу оксидоредуктаз, участвуют в переносе атомов водорода на акцептор, которым является пероксид водорода:



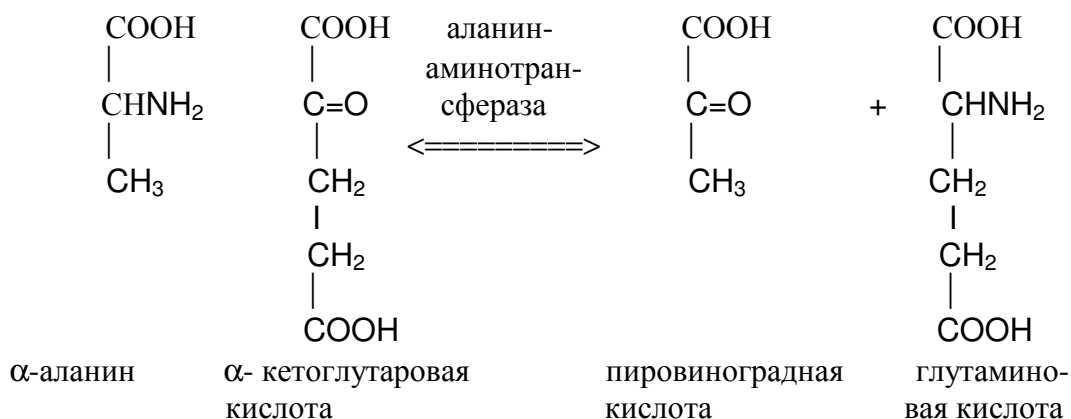
Трансферазы катализируют реакции межмолекулярного переноса различных групп и остатков.

В зависимости от типа переносимой группировки различают:
 - *метилтрансферазы* (перенос групп -CH₃);

- *ацилтрансферазы* (перенос ацильных групп R-C=O);

- *гликозилтрансферазы* (перенос остатков углеводов, например, фермент гликогенфосфорилаза переносит остаток глюкозы с гликогена на фосфорную кислоту с образованием глюкозо-1-фосфата в процессе расщепления гликогена);

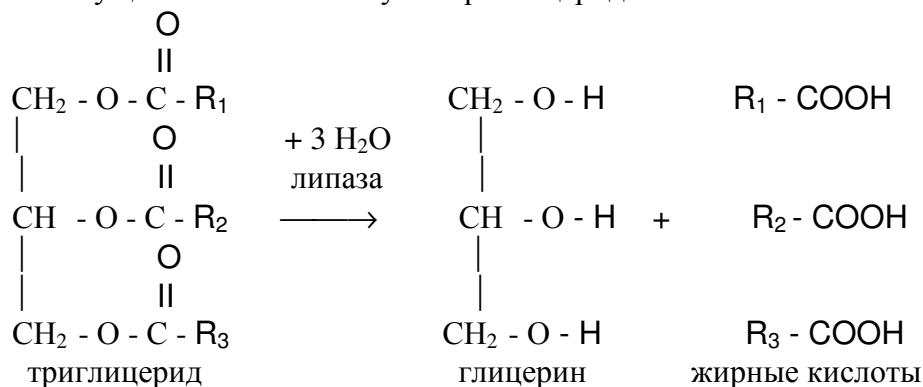
- *аминотрансферазы* (перенос аминогрупп -NH₂ с аминокислоты на кетокислоту в процессе синтеза заменимых аминокислот):



- *фосфотрансферазы* (перенос фосфатных групп). Перенос фосфатных групп с АТФ на субстрат или с субстрата на АДФ осуществляют ферменты киназы (например, гексокиназа переносит фосфатную группу с АТФ на глюкозу с образованием глюкозо-6-фосфата в процессе гликолиза).

Гидролазы участвуют в расщеплении внутримолекулярных связей (кроме -C-C-) в органических веществах гидролитическим путем, т.е. с участием воды. Важное место среди ферментов этого класса занимают пищеварительные ферменты, участвующие в переваривании липидов (липазы), белков (пептидазы) и углеводов (гликозидазы).

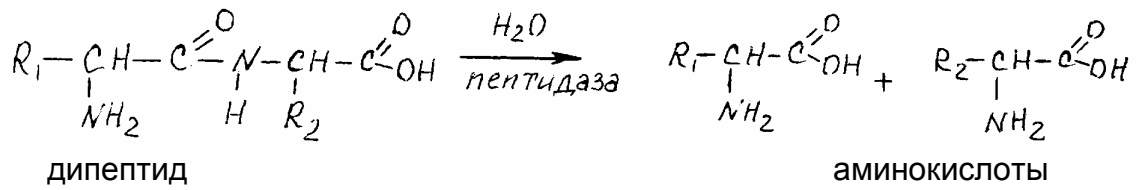
Липазы, относящиеся к подклассу эстераз, осуществляют гидролиз сложноэфирных связей осуществляют в молекулах триглицеридов:



В данном случае расщепляются сложноэфирные связи, образованные спиртом и карбоновыми кислотами - такой гидролиз осуществляют *карбоксиэстеразы*.

К классу гидролаз относятся *гликозидазы*. Они расщепляют гликозидные связи в молекулах ди- и полисахаридов. Примеры: *Сахараза* расщепляет сахарозу на α-Д-глюкозу и β-Д-фруктозу, *амилаза* расщепляет крахмал до мальтозы.

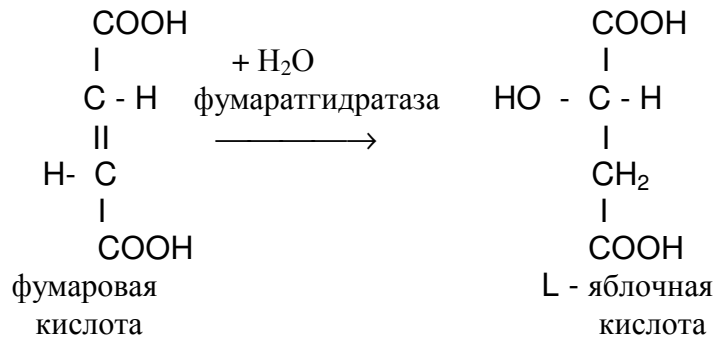
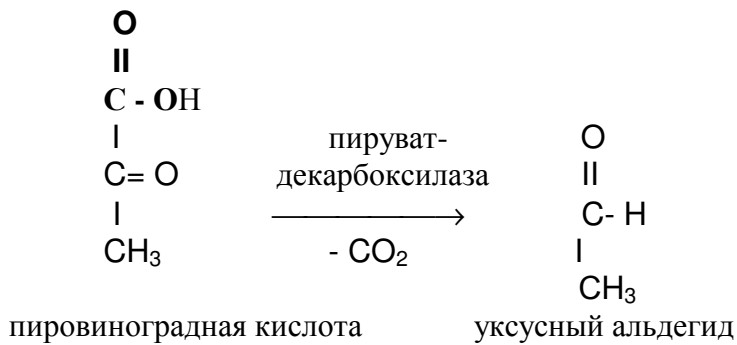
Ферменты *пептидазы* осуществляют гидролиз пептидных связей в молекулах белков и пептидов:



Эндопептидазы расщепляют пептидные связи внутри молекул (например, пепсин). *Экзопептидазы* делятся на карбоксипептидазы (расщепляют пептидные связи с С-конца цепи) и аминопептидазы (расщепляют пептидные связи с N-конца цепи).

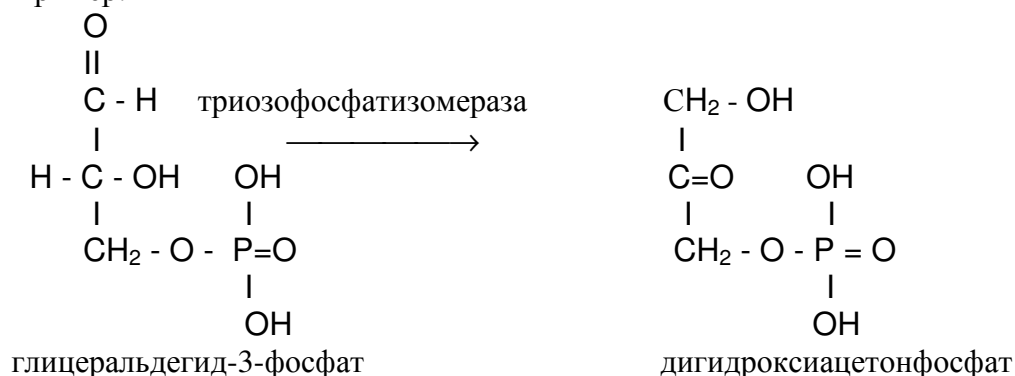
Лиазы расщепляют внутримолекулярные связи в органических веществах (включая -C-C-) не гидролитическим путем, а также катализируют реакции присоединения группировок по месту разрыва двойных связей.

Примеры:



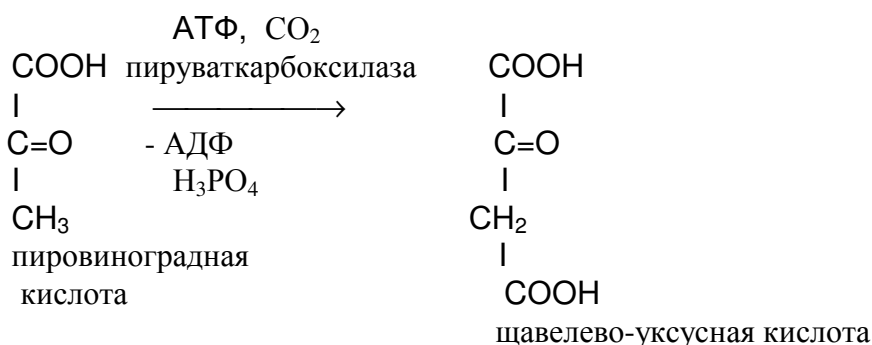
Изомеразы катализируют реакции взаимопревращения изомеров.

Пример:



Ферменты класса лигаз катализируют реакции присоединения 2-х молекул друг к другу сопряженное с разрывом пирофосфатной связи в молекуле АТФ или ее аналогов, т.е. они осуществляют синтез сложного вещества из более простых с использованием энергии АТФ или ее аналогов.

Пример:



5.Строение ферментов

Химическая природа ферментов.

По химической природе ферменты являются белками и подразделяются на простые и сложные. Простые ферменты при гидролизе расщепляются до аминокислот. Примеры простых ферментов: трипсин, уреазы, рибонуклеаза.

Большинство природных ферментов относится к сложным белкам, содержащим кроме белкового компонента, называемого апоферментом, и небелковую часть - кофактор. Апофермент и кофактор отдельно друг от друга не могут обеспечивать катализ химической реакции. Объединение их дает активную молекулу фермента - холофермент.

Кофакторы могут быть неорганической природы (представлены ионами металлов Zn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} и др.) и органической природы (коферменты, которые в большинстве случаев в своей структуре содержат остатки водорастворимых витаминов, например тиаминпирофосфат содержит остаток витамина В₁, флавиномононуклеотид и флавинадениндинуклеотид - остаток витамина В₂, кофермент ацилирования - остаток витамина В₃, никотинамидадениндинуклеотид и никотинамидадениндинуклеотидфосфат - остаток витамина В₅, пиридоксальфосфат - остаток витамина В₆).

Кофакторы в процессе катализа выполняют следующие функции:

- изменяют трехмерную структуру фермента или субстрата для улучшения взаимодействия между ними;
- многие из них служат основой для формирования активного центра фермента;
- участвуют в процессе переноса протонов, электронов, атомов и атомных групп;
- могут выступать в реакции в роли дополнительного субстрата.

В зависимости от строения ферменты делятся на мономерные и олигомерные. Мономерные ферменты (например, рибонуклеаза, трипсин) содержат одну полипептидную цепь и имеют первичную, вторичную и третичную структуры. Олигомерные ферменты содержат 2 и более полипептидных цепей (субъединиц) и имеют помимо вышеуказанных и четвертичную структуру. Чаще всего встречаются олигомерные ферменты с четным числом субъединиц (лактатдегидрогеназа - 4, уреаза - 8).

Если различные олигомерные ферменты катализируют разные, но взаимосвязанные между собой реакции, то они образуют мультиферментный комплекс (например, пируватдегидрогеназный комплекс содержит 3 фермента - пируватдегидрогеназу, дигидролипоилдегидрогеназу, дигидролипоилтрансацилазу, катализирующие связанные между собой реакции в процессе аэробного окисления пировиноградной кислоты).

Изоферменты, их строение и биологическая роль.

Изоферменты - это разновидности одного и того же олигомерного фермента, катализирующие одну и ту же реакцию, но различающиеся между собой физическими и химическими свойствами.

Одним из наиболее изученных олигомерных ферментов является лактатдегидрогеназа (ЛДГ), представляющий собой тетрамер (т.е. состоящий из 4-х субъединиц). ЛДГ катализирует обратимое превращение пировиноградной кислоты в молочную.

ЛДГ существует в виде 5 изоферментов, которые образуются в результате различного сочетания субъединиц 2-х типов: Н (сердечного) и М (мышечного):

- ЛДГ₁ - Н₄
- ЛДГ₂ - Н₃М
- ЛДГ₃ - Н₂М₂
- ЛДГ₄ - НМ₃
- ЛДГ₅ - М₄

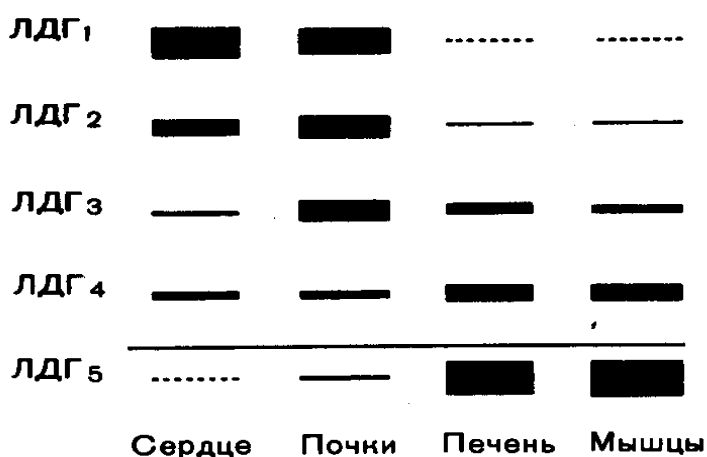


Рис 5.1. Изоферментный спектр лактатдегидрогеназы в различных органах.

Для каждого органа, ткани, биологической жидкости характерен свой изоферментный спектр (рис 5.1), т.е. определенное содержание и соотношение изоферментов, что связано с направленностью обмена веществ в этих органах и тканях.

Например, ЛДГ₁ преобладает в сердечной мышце, а ЛДГ₅ - в печени. Изучение картины изоферментного спектра широко используется в клинической диагностике, что позволяет определить характер патологического процесса, а также контролировать ход лечения. Так, при инфаркте миокарда в плазме крови будут преобладать изоферменты ЛДГ с Н-типом субъединиц, а при воспалительных процессах печени - М-типа.

Активный и аллостерический центры, их роль в процессе ферментативного катализа.

Активный центр фермента - это участок фермента, который специфически взаимодействует с субстратом и в котором осуществляется процесс катализа химической реакции.

На активный центр приходится относительно малая доля общего объема фермента, большая часть аминокислотных остатков в молекуле фермента не контактирует с субстратом. Активный центр представляет собой трехмерное образование, пространственная структура его стереохимически комплементарна субстрату (рис. 5.2), определяя природу химических превращений. Активный центр фермента специфически связывается с субстратом, что обусловлено строго определенным расположением аминокислотных остатков и их функциональных групп, называемых каталитическими.

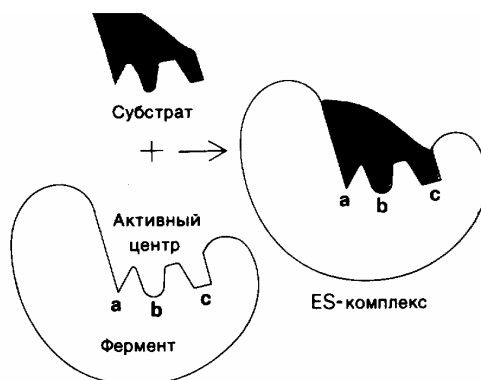


Рис . 5.2. Взаимодействие субстрата с ферментом согласно модели «ключ-замок»(активный центр фермента комплементарен субстрату)

Активные центры некоторых ферментов представляет собой нежесткую структуру, а форма его становится комплементарной форме субстрата только после связывания этого субстрата (рис. 5.3). Этот процесс называется «индукцией соответствия».

Помимо активного центра в молекуле многих ферментов присутствует также аллостерический центр. Это пространственно удаленный от активного центра участок молекулы, с которым связываются определенные химические вещества, называемые аллостерическими эффекторами. Они могут быть положительными или отрицательными. Присоединение эффектора к аллостерическому центру приводит к изменению пространственной структуры фермента, в том числе и активного центра, что отражается на каталитической активности фермента.

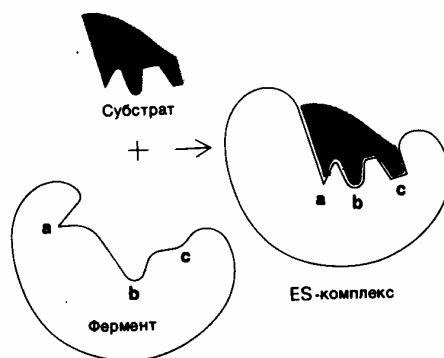


Рис .5.3. Взаимодействие субстрата с ферментом согласно модели «индуцированного соответствия».

Положительные эффекторы переводят фермент в активное состояние и называются активаторами, отрицательные - в неактивное и называются ингибиторами. Чаще всего в роли эффекторов выступают гормоны.

6.Основные свойства ферментов

Ферменты обладают высокой каталитической активностью, ускоряя химические реакции в миллионы раз. Так фермент карбоангидраза за 1 сек. способен гидратировать 10^5 молекул CO_2 . Скорость этой реакции в отсутствие фермента в 10^7 раз ниже. Активность фермента можно определить по скорости убыли субстрата или по интенсивности образования продукта реакции.

В 1972 году Международным биохимическим союзом была предложена единица активности фермента - катал.

Катал - это такое количество фермента, которое катализирует превращение 1 моль субстрата (S) или образование 1 моль продукта реакции (P) за 1 сек. В практике активность фермента чаще выражается в милликаталах (мкат), микрокаталах (мккат) и нанокаталах (нкат).

Употребляется также и интернациональная единица активности фермента (E) . 1 E - это количество фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата или получение 1 мкмоль продукта реакции за 1 мин. $1 E = 16,67$ нкат

Для выражения активности ферментов употребляется также удельная и молекулярная активность.

Удельная активность - это число единиц активности фермента в расчете на 1 мг белка.

Молекулярная активность - это число молекул субстрата, превращенное 1 молекулой фермента за 1 мин.

Ферменты ускоряют наступление химического равновесия, катализируют как прямую, так и обратную реакцию.

Ферменты проявляют высокую специфичность действия в отношении катализируемой реакции и субстрата. Фермент катализирует строго определенную химическую реакцию или несколько очень сходных химических реакций. Если фермент катализирует превращение только одного субстрата, то он обладает абсолютной специфичностью (например, уреазы расщепляет только мочевину). Если же фермент действует на несколько сходных по строению субстратов, то он обладает относительной специфичностью (например, алкогольдегидрогеназа катализирует окисление одноатомных спир-

тов, а фермент пепсин расщепляет определенные пептидные связи в белках как растительного, так и животного происхождения).

Активность ферментов регулируется. Ряд ферментов синтезируется в неактивной форме и переходит в активное состояние в физиологически соответствующем месте и времени. Например, неактивный трипсиноген, образующийся в поджелудочной железе, активируется в тонком кишечнике в результате отщепления гексапептида.

Ферменты осуществляют трансформацию различных видов энергии.

Например, при фотосинтезе энергия света превращается в химическую энергию. При мышечном сокращении энергия АТФ превращается в механическую энергию.

7.Механизм действия ферментов

Общее представление о катализе и биокатализе

Вероятность протекания химической реакции определяется разницей между свободной энергией исходных веществ и продуктов реакции. Если она больше у исходных веществ, то возможно самопроизвольное течение реакции. Скорость ее зависит от *энергетического барьера*, который необходимо преодолеть реагирующим веществам, причем высота его неодинакова для разных реакций. *Энергетический барьер* - это разница между средней энергией реагирующих молекул и минимальной энергией, необходимой для протекания химической реакции.

Кинетическая энергия реакционно-способных молекул достаточна для преодоления энергетического барьера, однако в обычных условиях лишь небольшая доля молекул обладает такой энергией. Для преодоления этого барьера молекулам вещества нужно сообщить какое-то количество энергии. *Дополнительное количество энергии, которое нужно сообщить молекулам 1 моль вещества для перевода их в реакционно-способное состояние при данной температуре, называется энергией активации.* Во всякой химической реакции существует переходное состояние, которое характеризуется высокой свободной энергией и определяется как состояние взаимодействующих молекул, соответствующее вершине энергетического барьера. *Чем выше энергия активации, тем выше высота энергетического барьера и тем ниже скорость реакции.* Скорость реакции пропорциональна концентрации молекул в переходном состоянии. Связывание реагирующих веществ с катализатором приводит к появлению нового переходного состояния, характеризующегося меньшей энергией активации по сравнению с переходным состоянием не катализируемой реакции (рис.7.1).

Ферменты и небиологические катализаторы, подчиняясь общим законам катализа, имеют следующие общие признаки:

- они катализируют только энергетически возможные реакции;
- не изменяют направления реакции;
- ускоряют наступление равновесия обратимой реакции и не сдвигают его;
- не расходуются в процессе реакции.

Однако ферменты обладают особыми качествами, отличающими их от небиологических катализаторов. Эти отличия связаны с особенностями строения ферментов, как веществ белковой природы:

- скорость ферментативного катализа намного выше, чем небиологического, так как ферменты сильнее снижают энергию активации. Так, например, энергия активации реакции разложения пероксида водорода без катализатора составляет 75,6 кДж/моль, с участием катализатора платины - 49,14 кДж/моль, а с участием фермента каталазы - 23,1 кДж/моль;

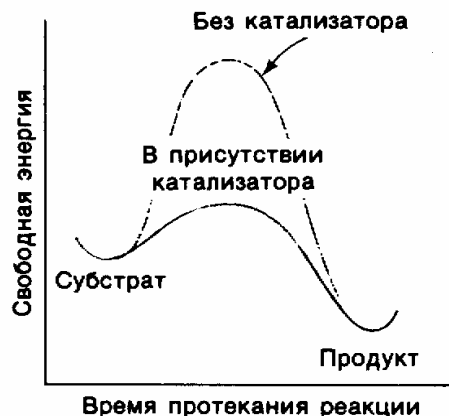


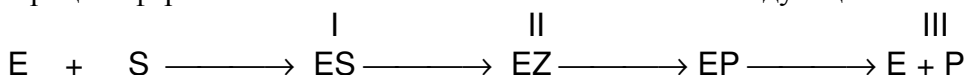
Рис. 7.1. Энергетический барьер не катализируемой и катализируемой реакций

- ферменты обладают высокой специфичностью действия;
- ферменты катализируют реакции в «мягких» условиях, т.е. при обычном давлении, температуре тела и рН, близкому к нейтральной среде, в то время как небиологические катализаторы действуют при высоком давлении, температуре и крайних значениях рН;
- активность ферментов регулируется, что позволяет изменять скорость превращения веществ в организме, т.е. приспосабливаться к действию различных факторов;
- скорость ферментативной реакции прямопропорциональна количеству фермента, тогда как для небиологического катализатора не существует строгой зависимости скорости реакции от количества катализатора, поэтому недостаток фермента означает низкую скорость превращения вещества в организме и наоборот, одним из путей приспособления клеток организма является образование дополнительных количеств фермента.

Стадии ферментативного катализа.

Большую роль в развитии представлений о механизме действия ферментов сыграли классические работы Л. Михаэлиса и М.Ментен, развивших положение о фермент-субстратных комплексах.

Процесс ферментативного катализа можно описать следующей схемой:



На 1-й стадии, обычно непродолжительной по времени, происходит связывание субстрата с активным центром фермента с образованием фермент-субстратного комплекса ES. На этой стадии изменение энергии активации незначительно (рис.7.2)

Вторая стадия лимитирует скорость всего катализа. Она наиболее медленная и длительность её зависит от энергии активации данной химической реакции. На этой стадии происходит расщепление связей субстрата, их разрыв и образование новых связей. Благодаря образованию активированных переходных комплексов EZ снижается энергия активации субстрата.

3-я стадия, как и 1-я, непродолжительна по времени, на ней осуществляется отделение продукта реакции от активного центра фермента.

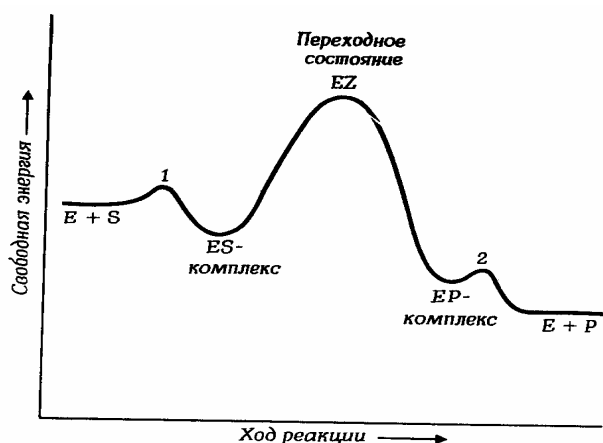


Рис. 7.2. Энергетическая схема ферментативной реакции. В точках 1 и 2 имеются малые энергетические барьеры.

Кинетика ферментативных реакций.

Ферментативная кинетика занимается исследованием закономерностей влияния химической природы реагирующих веществ (фермента и субстрата), условий их взаимодействия (концентрации веществ, pH среды, температуры, влияния активаторов и ингибиторов) на скорость ферментативной реакции.

Общие принципы кинетики химических реакций применимы и к ферментативным реакциям, однако при изучении кинетики последних следует учитывать одну важную особенность этих реакций - явление насыщения фермента субстратом.

При низкой концентрации субстрата скорость реакции пропорциональна концентрации субстрата - это реакция 1-го порядка (рис. 7.3. участок а).

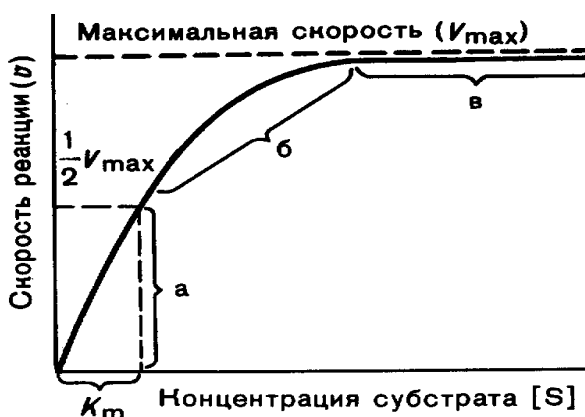


Рис. 7.3. Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата при постоянной концентрации фермента.

Реакция смешанного порядка (участок б) характеризуется постепенным снижением роста скорости реакции при дальнейшем увеличении концентрации субстрата. Наконец, при определенной концентрации субстрата, скорость реакции достигает максимума и не зависит от концентрации субстрата (участок в графика) - реакция нулевого порядка. В этом случае происходит полное насыщение активного центра фермента субстратом и скорость реакции зависит только от концентрации фермента.

Математическое выражение зависимости скорости реакции от концентрации субстрата описывается уравнением Михаэлиса-Ментен:

$$V = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_m + [S]} ; \text{ где } V_{\max} - \text{максимальная скорость реакции};$$

K_m - константа Михаэлиса

Константа Михаэлиса показывает концентрацию субстрата при которой скорость реакции равна половине максимальной. Чем выше константа Михаэлиса, тем ниже сродство фермента к субстрату и наоборот.

Так, гексокиназа имеет более высокое сродство к глюкозе, чем глюкокиназа и работает при невысоких концентрациях глюкозы. Фермент глюкокиназа работает при больших концентрациях глюкозы, имея невысокое сродство к глюкозе.

8. Пути регуляции активности ферментов.

Регуляция скорости ферментативного катализа осуществляется 2-мя способами:

- 1) количеством фермента на уровне его биосинтеза;
- 2) активностью фермента.

Существуют следующие пути регуляции активности ферментов:

- ковалентная модификация;
- ассоциация и диссоциация;
- ингибирование;
- аллостерическая регуляция;
- влияние pH и температуры.

Ковалентная модификация заключается в присоединении к определенной части молекулы фермента или отщеплении от нее какой-либо группировки, что приводит к изменению активности фермента. Наиболее распространенными видами ковалентной модификации являются *фосфорилирование* и *дефосфорилирование*. При фосфорилировании происходит перенос фосфатной группы с АТФ на определенный остаток серина или треонина в молекуле фермента, этот процесс катализируют фосфопротеинкиназы. Дефосфорилирование сопровождается отщеплением фосфатной группы от молекулы фермента при участии фосфопротеинфосфатаз (рис. 8.1)

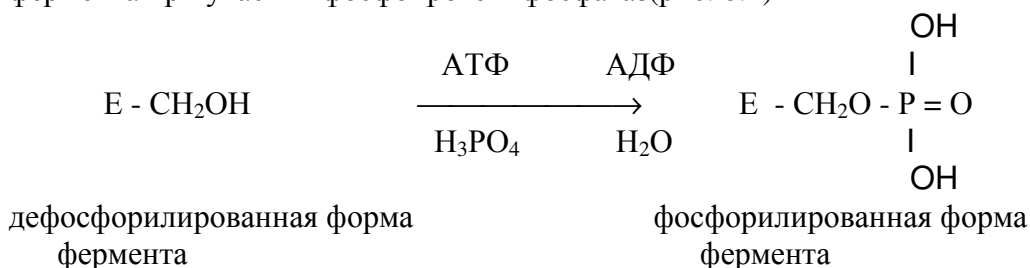


Рис. 8.1. Фосфорилирование и дефосфорилирование ферментов как разновидность ковалентной модификации

В ходе этих процессов изменяется активность ферментов.

Пример: гликогенфосфорилаза, участвующая в расщеплении гликогена, активна только в фосфорилированной форме, а гликогенсинтаза, принимающая участие в синтезе гликогена, активируется путем дефосфорилирования.

Разновидностью ковалентной модификации является регуляция активности ферментов на уровне профермента. Ряд ферментов синтезируется в неактивной форме, в виде профермента, переходящего в активное состояние в соответствующем месте и времени. Примером регуляции такого типа могут служить *пищеварительные ферменты*.

Например, *трипсиноген*, синтезирующийся в поджелудочной железе, активируется в тонком отделе кишечника в результате отщепления гексапептида с образованием активной формы - *трипсина* (рис.8.2.). Такой же тип регуляции используется в

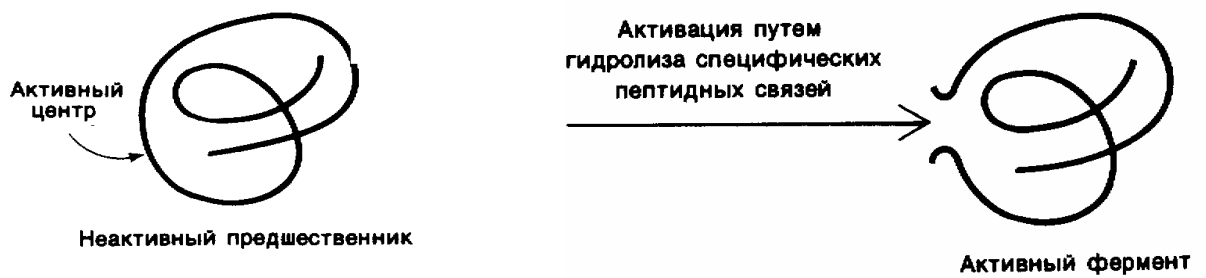


Рис. 8.2. Активация профермента путем гидролиза специфических пептидных связей.

последовательности ферментативных реакций, ведущих к свертыванию крови.

Ассоциация и диссоциация характерны для олигомерных ферментов (имеющих 2 и более субъединиц). Ассоциация субъединиц чаще всего приводит к активации фермента, а диссоциация олигомерного фермента на отдельные субъединицы в большинстве случаев ведет к потере ферментом активности.

Часто ассоциация и диссоциация связаны с процессами *фосфорилирования и дефосфорилирования*. Пример: фосфорилирование каждой из субъединиц гликогенфосфоорилазы способствует их ассоциации с образованием активного тетрамерного фермента.

Процесс торможения ферментативной активности называется ингибированием, а вещества его вызывающие - ингибиторами.

В зависимости от характера связывания фермента с ингибитором различают *обратимое и необратимое ингибирование*.

Обратимое ингибирование делится на конкурентное и неконкурентное.

При конкурентном ингибировании ингибитор, будучи близким по химической структуре с субстратом, конкурирует с ним за связывание с активным центром фермента (рис 8.3.).

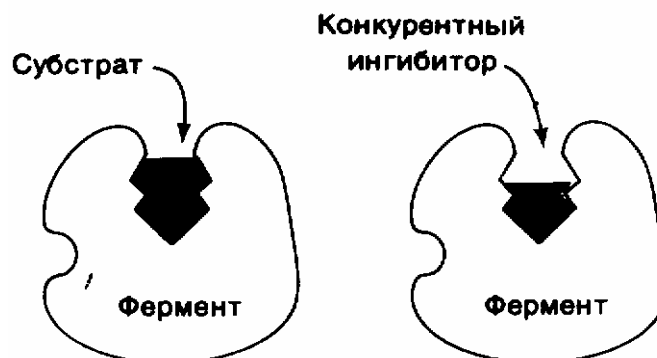
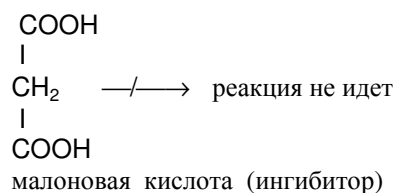
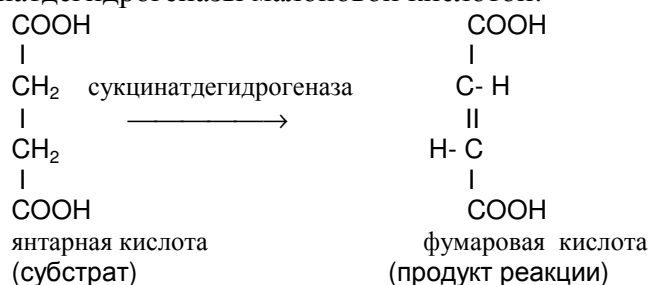


Рис. 8.3. Схема конкурентного ингибирования. Конкурентный ингибитор препятствует связыванию фермента с субстратом

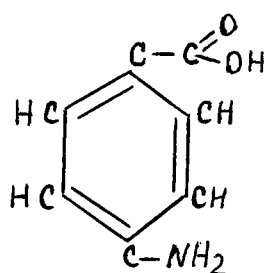
При более высокой концентрации ингибитора образуется *фермент-ингибиторный комплекс* ($E+I = EI$), не дающий продукта реакции. Тройной (фермент-ингибитор-субстрат) комплекс образоваться не может, так как и субстрат и ингибитор конкурируют между собой за один и тот же участок фермента, т.е. его активный центр. *Конкурентное ингибирование преодолевается повышением концентрации субстрата.*

В этом случае происходит взаимодействие фермента и субстрата с образованием продукта реакции ($E+S = ES \rightarrow E + P$).

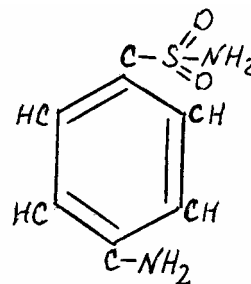
Классическим примером конкурентного ингибирования является ингибирование сукцинатдегидрогеназы малоновой кислотой:



На принципе конкурентного ингибирования основано действие многих фармакологических препаратов. Например, для лечения некоторых инфекционных заболеваний применяют сульфаниламидные препараты, имеющие структурное сходство с пара-аминобензойной кислотой, которую бактерии используют для синтеза фолиевой кислоты.



пара-аминобензойная кислота



сульфаниламид

Применение сульфаниламидных препаратов ингибирует фермент, синтезирующий фолиевую кислоту (путем вытеснения пара-аминобензойной кислоты), что ведет к торможению роста бактерий.

При неконкурентном ингибировании действие ингибитора не преодолевается повышением концентрации субстрата.

Ингибитор не имеет структурного сходства с субстратом и связывается либо непосредственно с каталитическими группами активного центра фермента (рис.8.4) или с другим участком фермента, изменяя конформацию активного центра таким образом, что затрагивает структуру каталитического участка, мешая его взаимодействию с субстратом (рис. 8.5.).

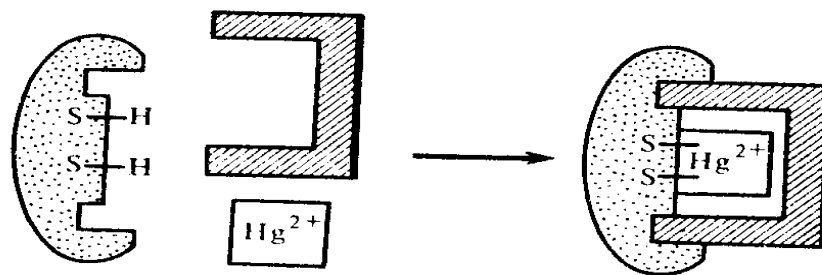


Рис.8.4. Связывание ингибитора (Hg^{2+}) с каталитическими группами (-SH) активного центра фермента.

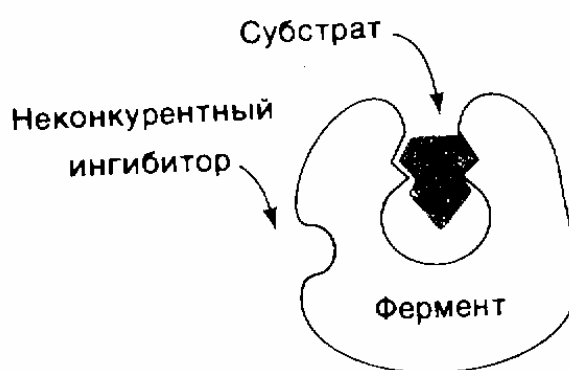


Рис. 8.5. Неконкурентный ингибитор связывается с ферментом вне активного центра.

Поскольку неконкурентное ингибирование не влияет на связывание субстрата, то в отличие от конкурентного ингибирования наблюдается образование тройного комплекса ($E+I+S = EIS$), однако продукта реакции он не дает. Снять действие неконкурентного ингибитора можно веществами, связывающими этот ингибитор (рис.8.6.). Примерами неконкурентных ингибиторов являются ионы ртути, кадмия, мышьяка, свинца и их органические соединения. Эти ионы блокируют, например -SH группы каталитического участка фермента. Комплекс фермент-ингибитор может присоединять субстрат, но превращения последнего не происходит, так как каталитические группы активного центра фермента заблокированы.

Неконкурентные ингибиторы применяются в качестве фармакологических средств. Препараты, содержащие ртуть, мышьяк, висмут неконкурентно ингибируют ферменты в клетках организма или болезнетворных бактерий, чем и определяется их лечебный эффект.

При интоксикации вытеснение ингибитора, являющегося ядом, возможно с помощью реактиваторов или противоядий. К ним относятся тиолсодержащие соединения, лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота.

При необратимом ингибировании ингибитор необратимо связывается с ферментом ($E + I \rightarrow EI$).

Примером такого ингибирования является связывание пенициллина с ферментом, участвующим в синтезе клеточных стенок бактерий.

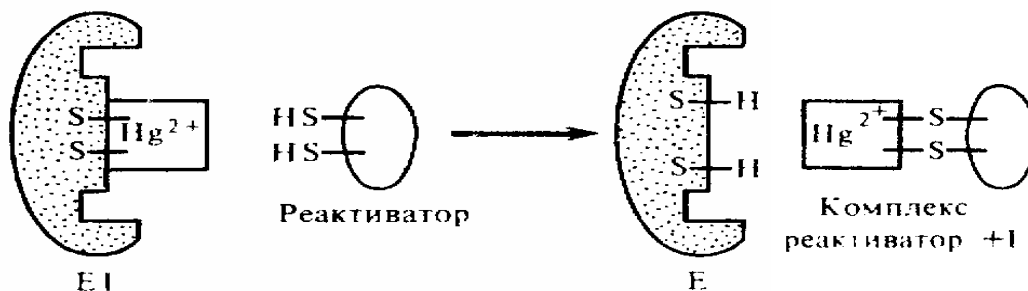


Рис.8.6. Снятие действия неконкурентного ингибитора (Hg^{2+}) с помощью реактиватора.

Важное место в регуляции обмена веществ принадлежит *аллостерической регуляции*, характерной для аллостерических (регуляторных) ферментов. Эти ферменты помимо активного имеют также *аллостерический центр*, с которым связываются положительные или отрицательные аллостерические эффекторы. В качестве эффекторов могут выступать гормоны, различные метаболиты, ионы металлов, коферменты, иногда молекулы субстратов. *Аллостерические эффекторы* влияют на конформацию активного центра фермента - положительные изменяют ее таким образом, что активный центр фермента взаимодействует с субстратом и осуществляет катализ химической реакции (рис.8.7.), а отрицательные действуют противоположным образом, переводя фермент в неактивное состояние (рис.8.8.).

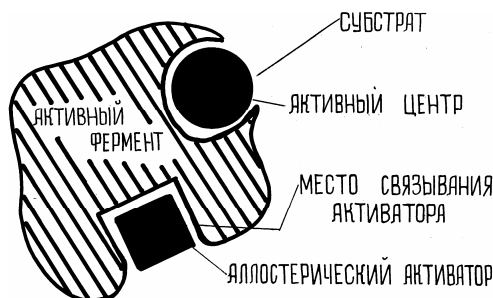
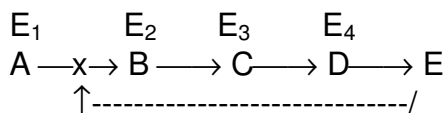


Рис. 8.7 Перевод фермента в активное состояние при действии положительного аллостерического эффектора (активатора).



Рис.8.8. Перевод фермента в неактивное состояние при помощи отрицательного аллостерического эффектора (ингибитора).

Аллостерические ферменты занимают ключевое положение в метаболизме, поскольку тонко реагируют на изменения в обмене веществ и регулируют скорость прохождения веществ по целой системе ферментов.



Исходное вещество (А) превращается в конечное (Е) через промежуточные (В, С, D) под действием соответственно ферментов E₁, E₂, E₃, E₄.

Вещество Е - конечный метаболит этого пути, накапливаясь в больших количествах (превышающих потребности в нем клеток), ингибирует первый фермент E₁ этого пути, являющийся аллостерическим. *Это аллостерическая регуляция по принципу обратной связи.*

Для каждого фермента существует свой *оптимум рН* (табл. 1), при котором скорость катализируемой им реакции максимальна. Для большинства ферментов оптимум рН близок к нейтральному, хотя имеются ферменты, функционирующие при других значениях рН .

Таблица 1

Оптимальные значения рН для некоторых ферментов.

Фермент	рН	Фермент	рН
Пепсин	1,5-2,5	Уреаза	7,0-7,2
Сахараза кишечника	5,8-6,2	Липаза панкреатина	7,0-8,5
Амилаза слюны	6,8-7,0	Трипсин	7,5-8,5
Каталаза	6,8-7,0	Аргиназа	9,5-10,0

Изменение рН среды влияет на ионизацию кислотных (-COOH) и основных (-NH₂, -SH, N имидазольного кольца гистидина) групп аминокислотных остатков активного центра фермента, что сопровождается изменением активности фермента.

При оптимуме рН функциональные группы фермента и субстрата находятся в наиболее реакционно-способном состоянии.

Знание оптимумов рН ферментов имеет важное значение для практической медицины. Например, пепсин, расщепляющий пептидные связи в белках, функционирует в сильно кислой среде, поэтому для восстановления нарушенной активности эндогенного пепсина применяют препарат пепсина с соляной кислотой, создающей нужный рН.

Оптимумом температур для большинства ферментов является температура тела 37 - 40°C (рис.8.9.) Более высокие температуры приводят к денатурации ферментов, так как по химической природе они являются белками.

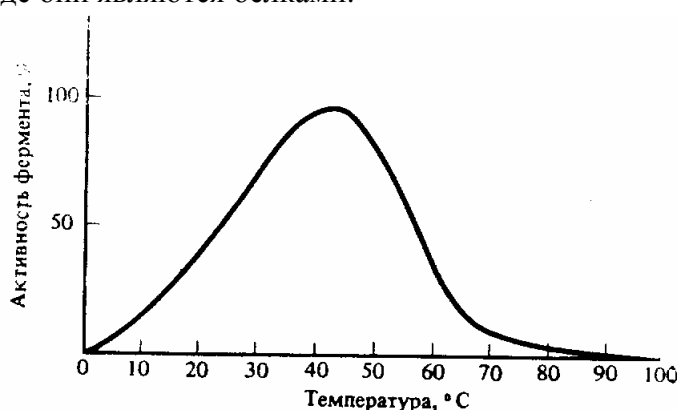


Рис. 8.9. Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры.

Влияние температуры на активность ферментов имеет существенное значение для понимания процессов жизнедеятельности. При понижении температуры скорость ферментативных реакций снижается, в результате снижается активность клеточ-

ных функций. Повышение температуры тела, например при инфекционных заболеваниях, ускоряет химические реакции в организме, что влечет за собой расточительное использование эндогенных субстратов в клетках больного организма.

Термозависимость ферментов широко используется в практике (искусственное охлаждение организма при проведении хирургических операций; хранение спермы, необходимой для искусственного осеменения с.-х. животных, осуществляется при температуре - 196°C; сохранность пищевых продуктов при низких температурах является результатом низкой активности ферментов микроорганизмов, способных вызвать порчу этих продуктов).

Основная литература

1. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. -М.: Медицина, 1990.- 528 с.
2. Биохимия животных./ Под редакцией проф. А.В. Чечеткина. - М.: Высш. Шк., 1982.- 511 с.
3. Кононский А.И. Биохимия животных. -Киев: Выща школа. Головное Издательство, 1980.-432 с.
4. Строев Е.А. Биологическая химия. -М.: Высш. шк., 1986.- 479 с.

Дополнительная литература

1. Горячковский А.М. Справочное пособие по клинической биохимии.- Одесса, 1994.- 416с.
2. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. в 3-х томах. - М.: Мир, 1982.
3. Коэн Ф. Регуляция ферментативной активности. - М.: Мир, 1986.
4. Ленинджер А. Биохимия. - М.: Мир, 1976. -957 с.
5. Страйер Л. Биохимия. - М.: Мир, 1984. - т.1.- 232 с.