

Ферменты

Лекция №4

Автор Е.А. Кузнецова, 2020
Ред. О.В.Стронин, 2024

Enzymes

Third Edition

Malcolm Dixon Sc. D., F. R. S.
Emeritus Professor of Enzyme Biochemistry,
University of Cambridge
Honorary Fellow of King's College,
Cambridge

and

Edwin C. Webb M. A., Ph. D.,
Hon. D. Sc., F.R.A.C.I.
Vice-Chancellor, Macquarie University
Emeritus Professor of Biochemistry
University of Queensland

assisted by

C. J. R. Thorne M. A., Ph. D.
Lecturer in Biochemistry,
University of Cambridge
Fellow of St Catharine's College,
Cambridge

and

K. F. Tipton M. A., Ph. D.
Professor of Biochemistry,
Trinity College, Dublin

Longman

485952

**М. ДИКСОН
Э. УЭББ**

Ферменты 1

В трех томах

Перевод с английского
доктора хим. наук Л. М. Гинодмана
и
канд. биол. наук М. И. Левянт
под редакцией
доктора хим. наук В. К. Антонова
и
акад. А. Е. Браунштейна



Методы очистки и выделения белков (в частности ферментов)

ROBERT K. SCOPES

PROTEIN PURIFICATION

Principles and Practice

With 145 Figures

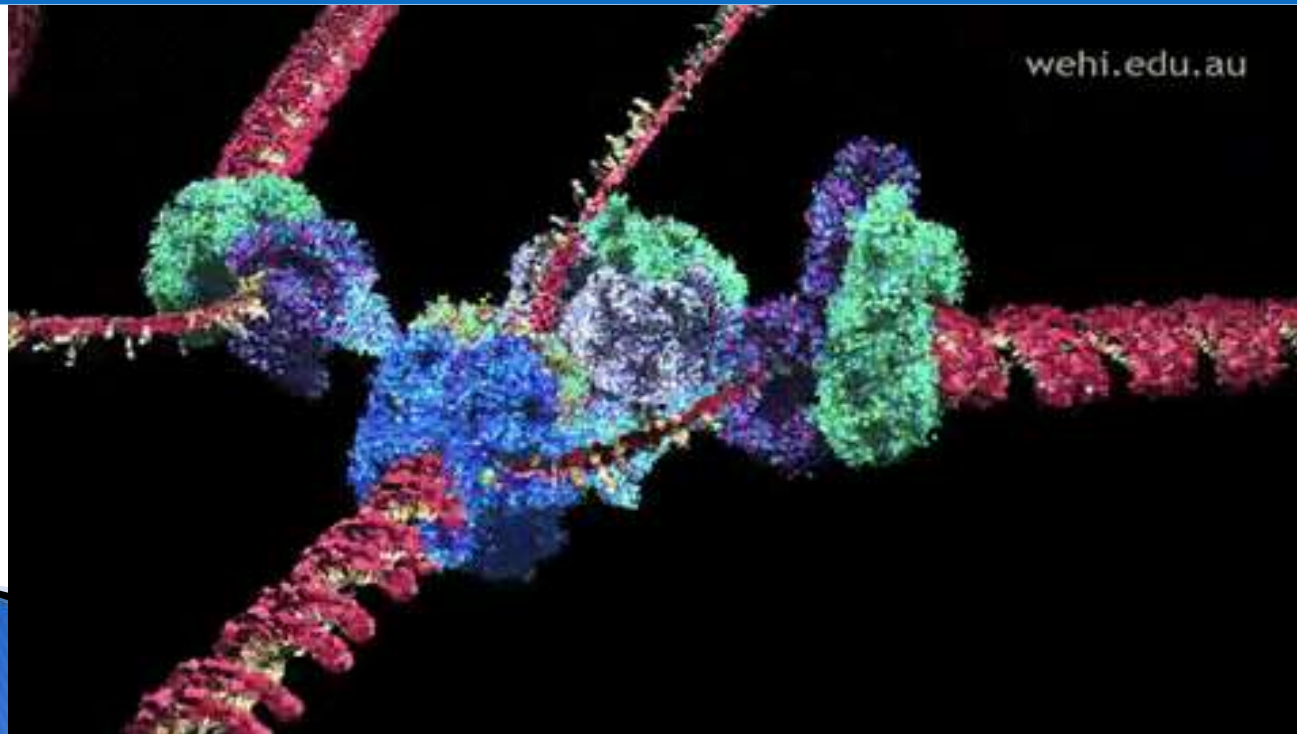
Скоупс Р.

С 44 Методы очистки белков: Пер. с англ.—М.: Мир, 1985.—
358 с., ил.

Ферменты

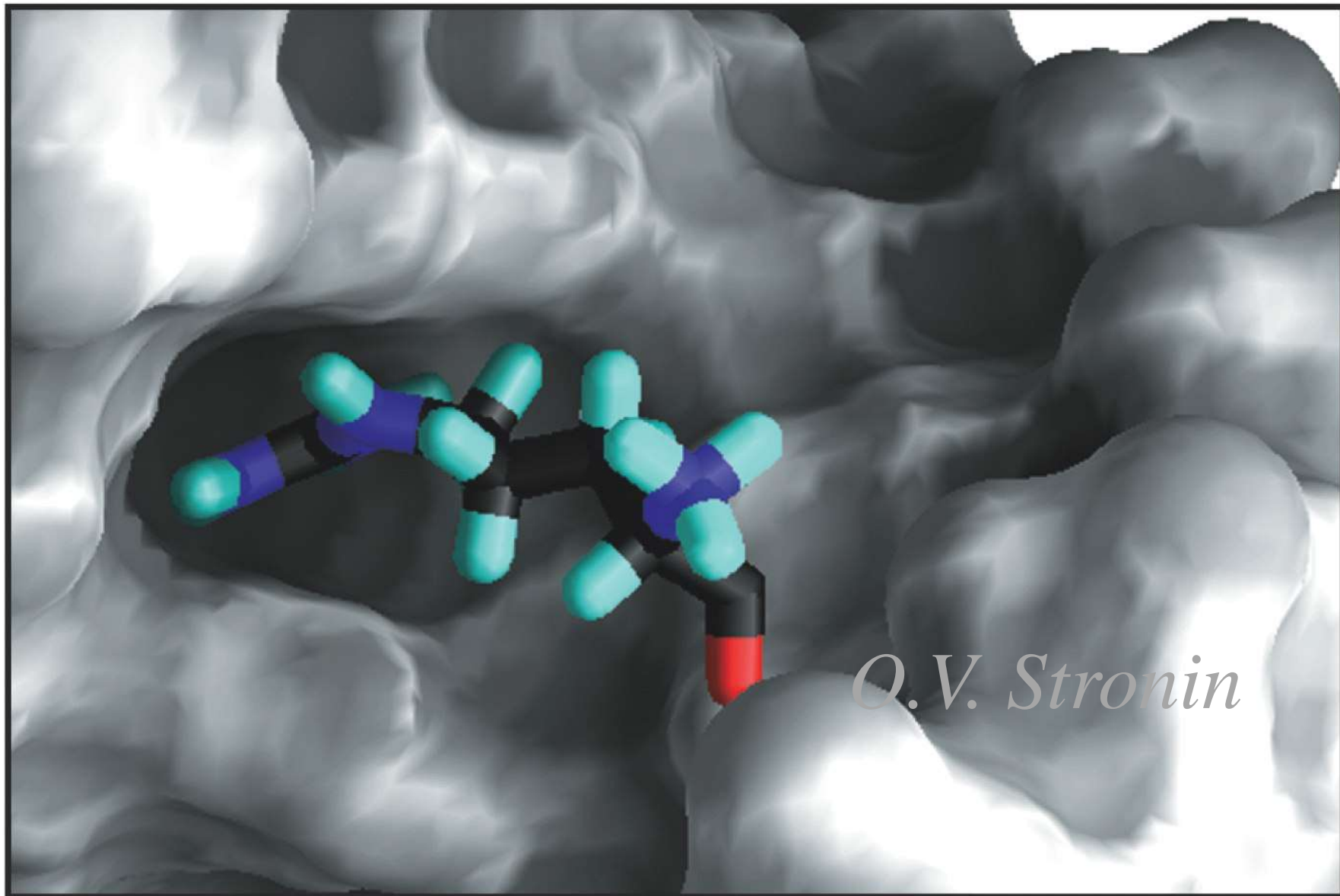
Это биокатализаторы преимущественно белковой природы.

Существует немногочисленная группа молекул РНК, обладающих каталитической активностью (**рибозимы**). Они гидролизуют фосфодиэфирные связи в нуклеиновых кислотах.



Химическая природа ферментов.

Одно из главных отличий от неорганических катализаторов:
Специфичность, в т.ч. к оптическим изомерам



Роль и значение ферментов в клетке.

Ферменты участвуют в:

- Синтезе и распаде веществ;
- Переваривании и всасывании;
- Высвобождении и сохранении энергии;
- Координации химических реакций
- Репликации генома, транскрипции, трансляции
- Регуляция генома, метаболизма и физиол. активности (фосфорилазы, гликозилазы, метилазы)

- Передача нервных импульсов (Na/K-АТФаза, Ах-эстераза)
- Движение (миозин – Е-активность)

Ферменты

Простые

Состоят только из белковой цепи

Сложные

Белковая часть (апофермент/апопротеин)
Кофактор:

-Ионы Me (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+});
-Кофермент - сложные металлорганические вещества; если кофактор и апофермент связаны ковалентной связью, то кофермент называют простетической группой

Холофермент

Кофактор

Фермент

Cu^{2+}	Цитохромоксидаза
Mn^{2+}	Аргиназа
Fe^{2+} Fe^{3+}	Цитохромоксидаза, каталаза, пероксидаза
Mg^{2+}	Гексокиназа, Глюкозо-6-фосфатаза
Кофермент А	Ацил-коэнзим А-синтетаза
Флавинадениндинуклеотид	Сукцинатдегидрогеназа
Пиродаксальфосфат	Трансаминазы

Примеры коферментов:

- Производные витаминов;
- Гемы;
- Нуклеотиды – доноры и акцепторы остатка фосфорной кислоты;
- Убихинон, участвующий в переносе электронов в ЦПЭ;
- S-аденозилметионин (SAM)-донор метильной группы;
- Глутатион, участвующий в ОВР

Номенклатура и классификация ферментов.

Номенклатура и классификация ферментов. Семь классов ферментов. Принципы деления на подклассы и подподклассы.

Классификация ферментов

Класс ферментов

Тип катализируемой реакции

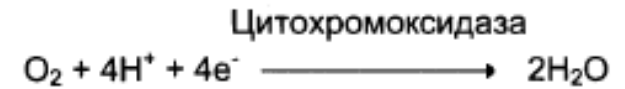
Примеры

Пример реакции

1.Оксидоредуктазы

Перенос e^- , гидрид-ионов, атомов H

Дегидрогеназы;
Оксидазы;
Оксигеназы.



2.Трансферазы

Перенос функциональных групп от одного соединения к другому

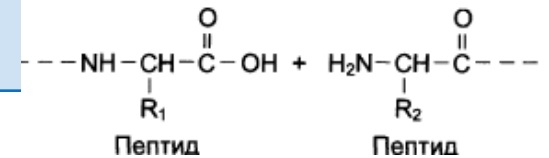
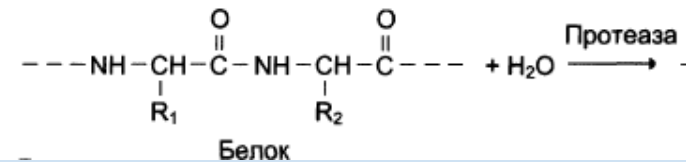
Аминотрансферазы;
Ацилтрансферазы
Метилтрансферазы
Гликозилтрансферазы
Киназы
(фосфотрансферазы)



3.Гидролазы

Катализируют реакции гидролиза с участием молекулы воды

Протеаза;
Липаза;
Фосфолипаза;
Рибонуклеаза;
Эстераза;
Фосфатаза.



Классификация ферментов

Класс ферментов

Тип катализируемой реакции

Примеры

Пример реакции

4. Лиазы

Присоединение групп к двойной связи или отщепление групп (CO_2 , H_2S и т.д.) с образованием двойной связи

Дегидротазы;
Декарбоксилазы;
Альдегидлиазы.



5. Изомеразы

Изомерные превращения в пределах одной молекулы

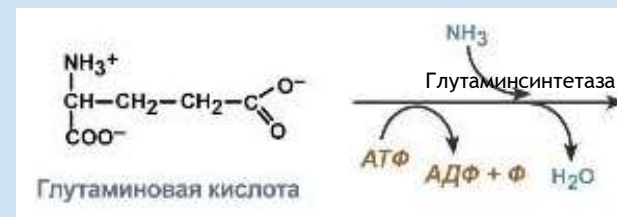
Рацемазы;
Эпимеразы;
Мутазы
(внутримолекулярные трансферазы);
Изомеразы.



6. Лигазы

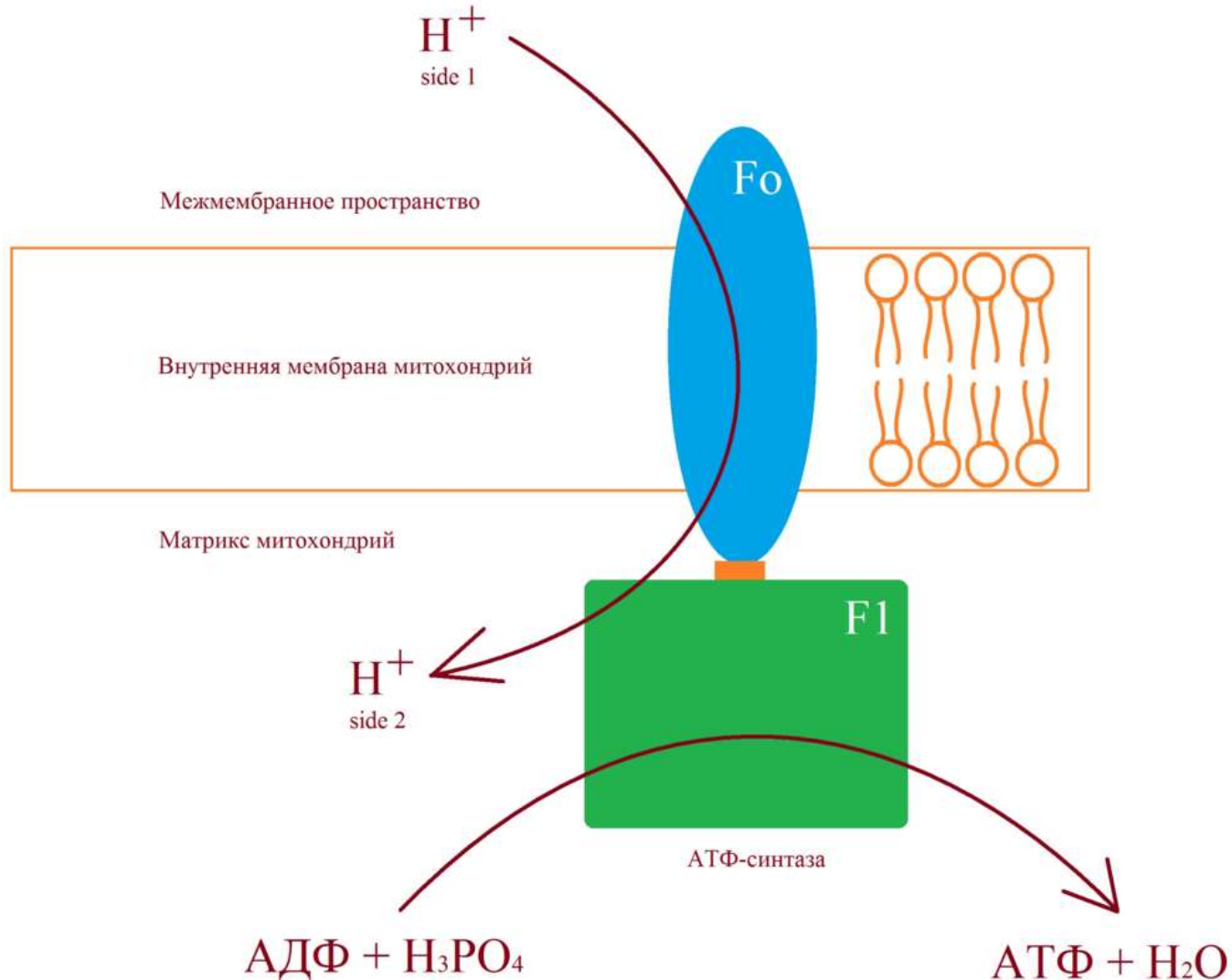
Катализируют реакции присоединения двух молекул друг к другу, с образованием ковалентной связи, протекающее с разрывом макроэргических связей в высокоэнергетических соединениях (АТФ, ГТФ и т.д.)

Карбоксилазы;
Синтетаза.



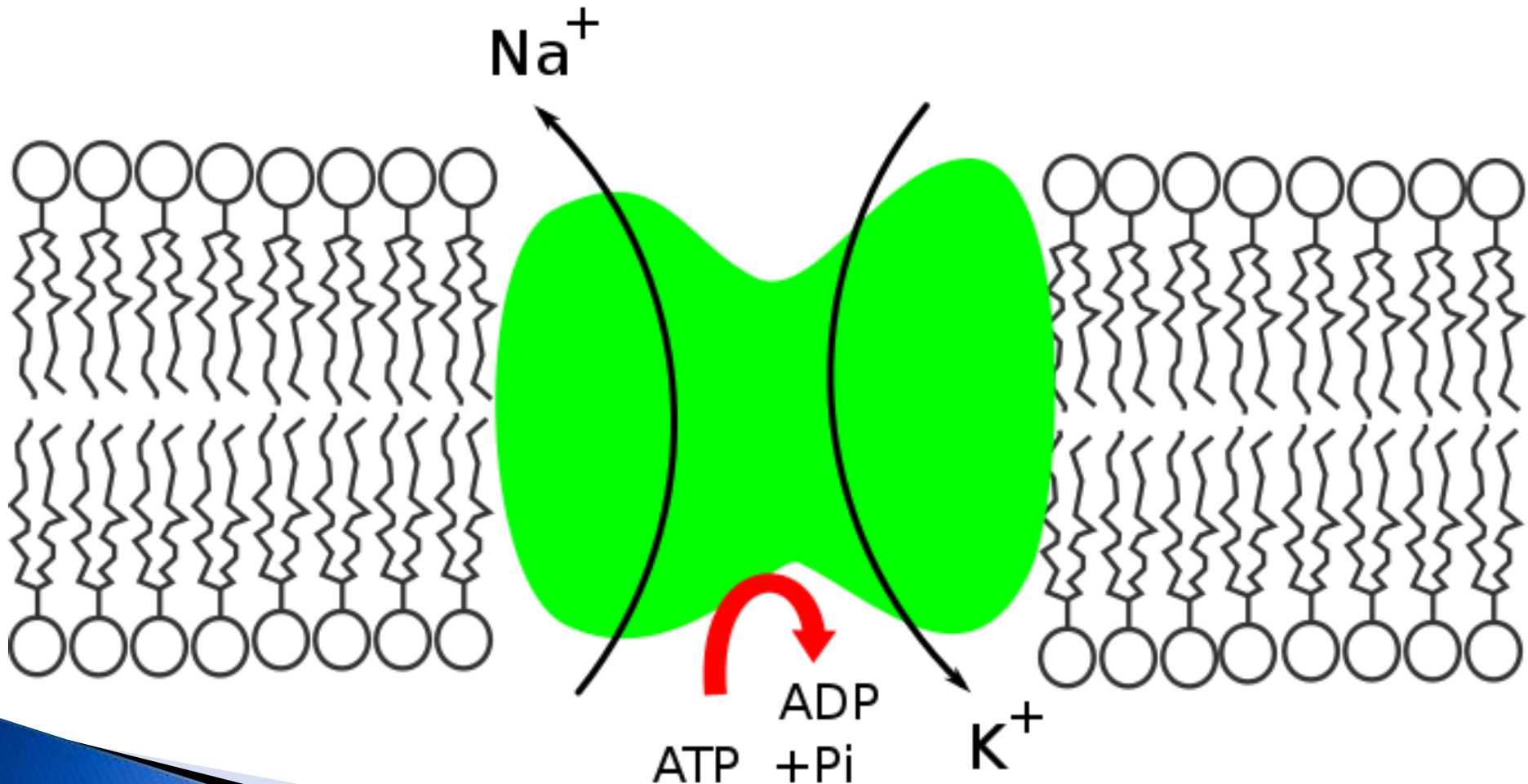
Классификация ферментов

7. В 2018 году было предложено ввести новый, **седьмой** класс ферментов – **Транслоказы**. Ни один из принятых классов не может описать группу ферментов, катализирующих движение ионов или молекул через мембраны, или их разделение внутри мембран.



Классификация ферментов

В 2018 году было предложено ввести новый, **седьмой** класс ферментов – **Транслоказы**. Ни один из принятых классов не может описать группу ферментов, катализирующих движение ионов или молекул через мембраны, или их разделение внутри мембран.



Номенклатура ферментов

Тривиальная
Пепсин; Трипсин.

Рациональная (рабочая)
Название субстрата+ «аза»
Аргиназа

Систематическая
названия субстратов + характер катализируемых реакций
АТФ + гексоза → гексозо-6-фосфат + АДФ
Фермент: АТФ-гексоза-6-фосфотрансфераза или гексозо-6-фосфотрансфераза (рабочее название)

Индексирование ферментов
Каждому ферменту присваивается номер из 4-х цифр (Е.С.)

2. 7. 1. 1

Класс фермента
(Трансферазы)

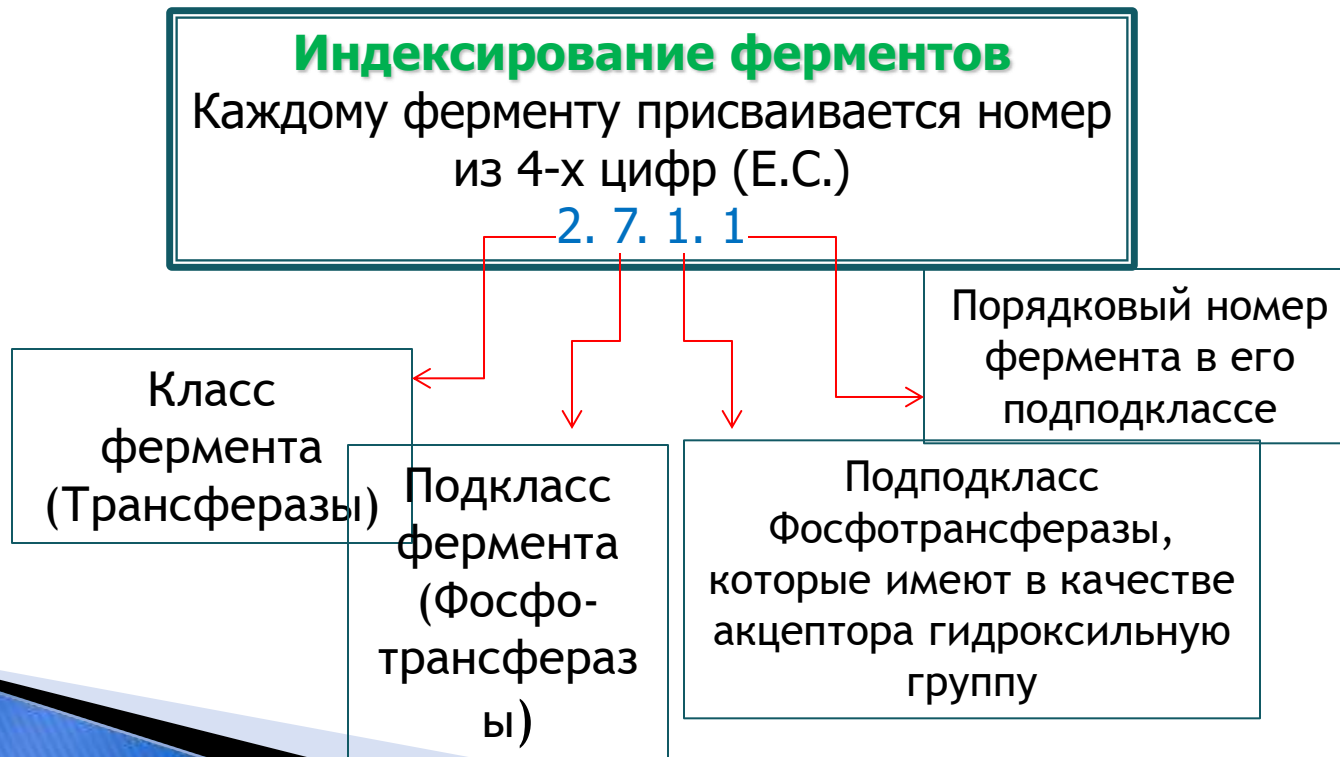
Подкласс фермента
(Фосфо-
трансферазы)

Подподкласс
Фосфотрансферазы,
которые имеют в качестве акцептора
гидроксильную группу

Порядковый номер
фермента в его
подподклассе

Номенклатура ферментов

A complete list and description of the thousands of known enzymes is maintained by the **Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology** (www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme).



Строение ферментов

Активный центр - это участок в молекуле фермента, где происходит связывание и превращение субстрата.

Активный центр

Каталитический центр

область (зона) активного центра фермента, непосредственно участвующая в химических преобразованиях субстрата.

Субстратный центр (якорный, контактный)

участок активного центра фермента, на котором происходит связывание и ориентация молекулы субстрата



Схема формирования сложного фермента

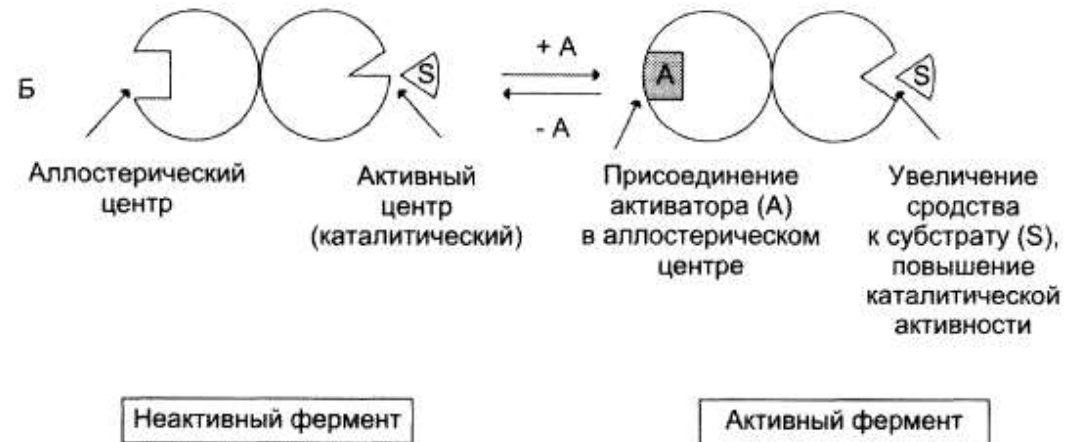
Строение ферментов

Алlostерический (Регуляторный) центр

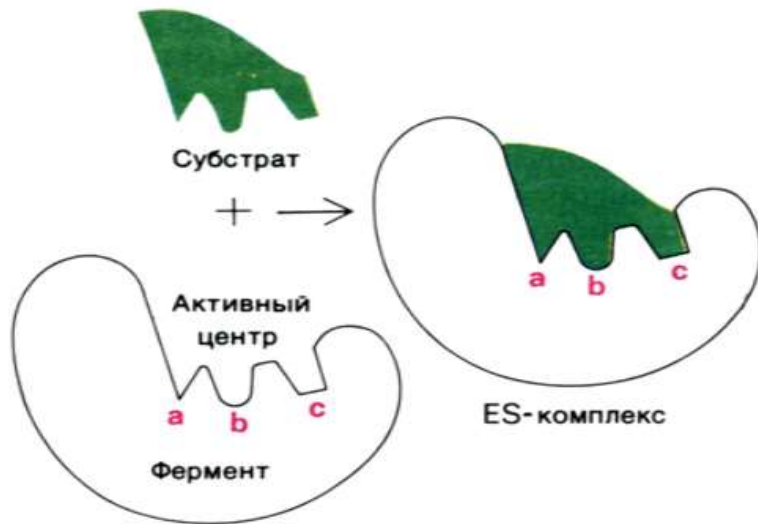
Это центр регуляции активности фермента, который пространственно отделен от активного центра и имеется не у всех ферментов.

Связывание алlostерического центра с молекулой эффектором приводит к изменению каталитической активности фермента.

+Эффектор – активатор (повышает каталитическую активность);
-Эффектор – ингибитор (снижает каталитическую активность).

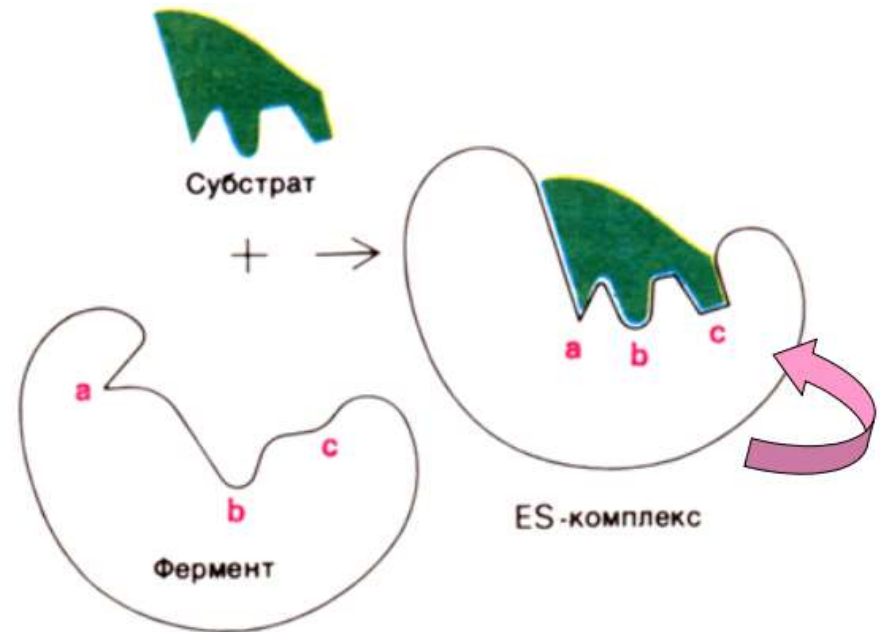


Теории комплементарности



Теория «Ключ-замок», 1894 г.

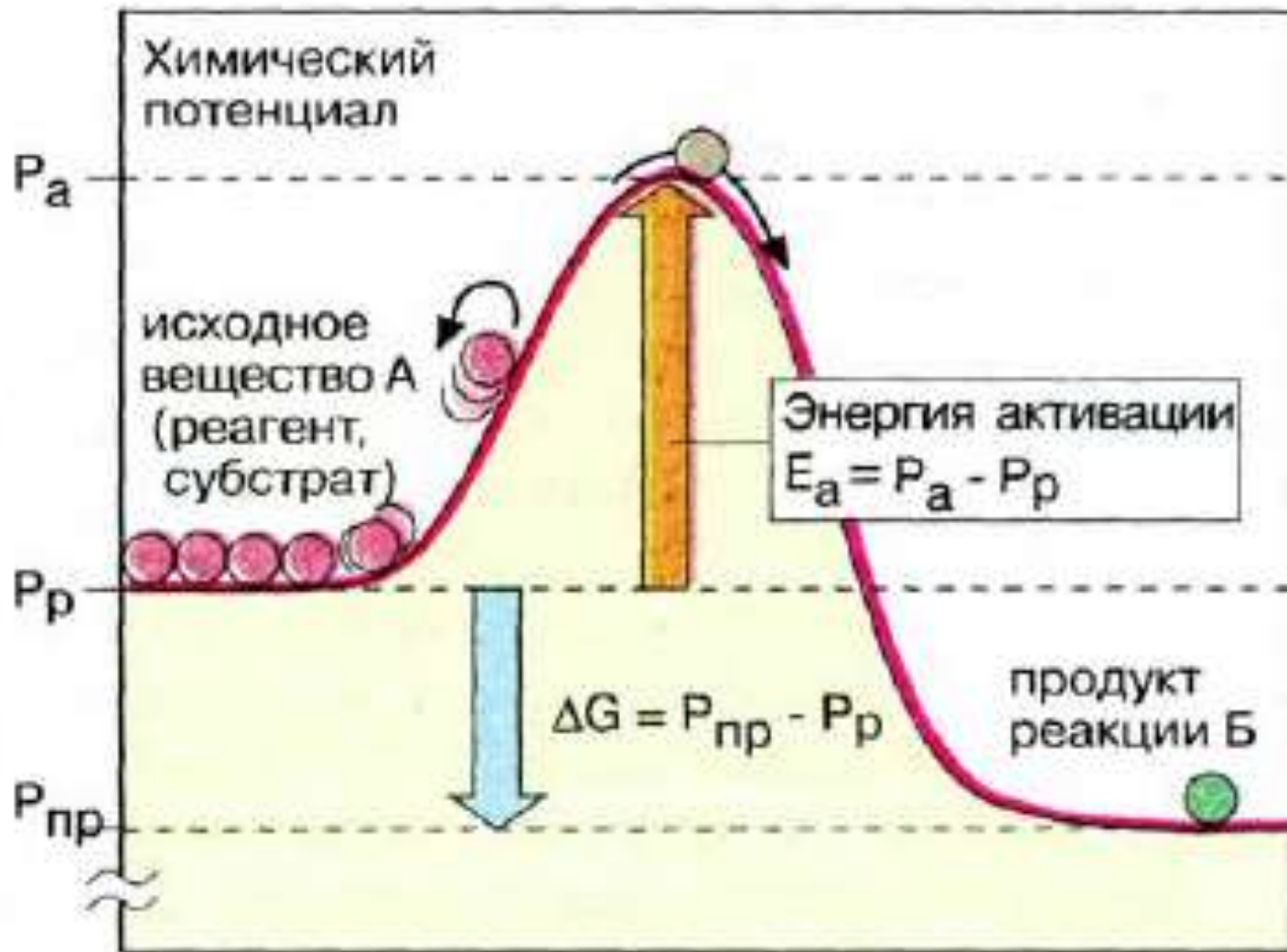
Теория индуцированного соответствия, 1958 г.
«Рука-перчатка»



Термодинамика химических реакций.

Свободная энергия Гиббса (потенциал Гиббса)

Энергия активации - T



А. Энергия активации

1.

Термодинамика химических реакций.

Свободная энергия Гиббса (потенциал Гиббса)

$\Delta G = \Delta U + P\Delta V - T\Delta S$ где P и T – const, U – внутренняя энергия молекул,

$\Delta U + P\Delta V = \Delta H$ - энтальпийный фактор (энергетическая мера)

$T\Delta S$ – энтропийный фактор (мера беспорядка)

В самопроизвольных реакциях

$$\Delta G < 0$$

$$\Delta S > 0$$

Термодинамика ферментативных реакций.

Теория переходного состояния

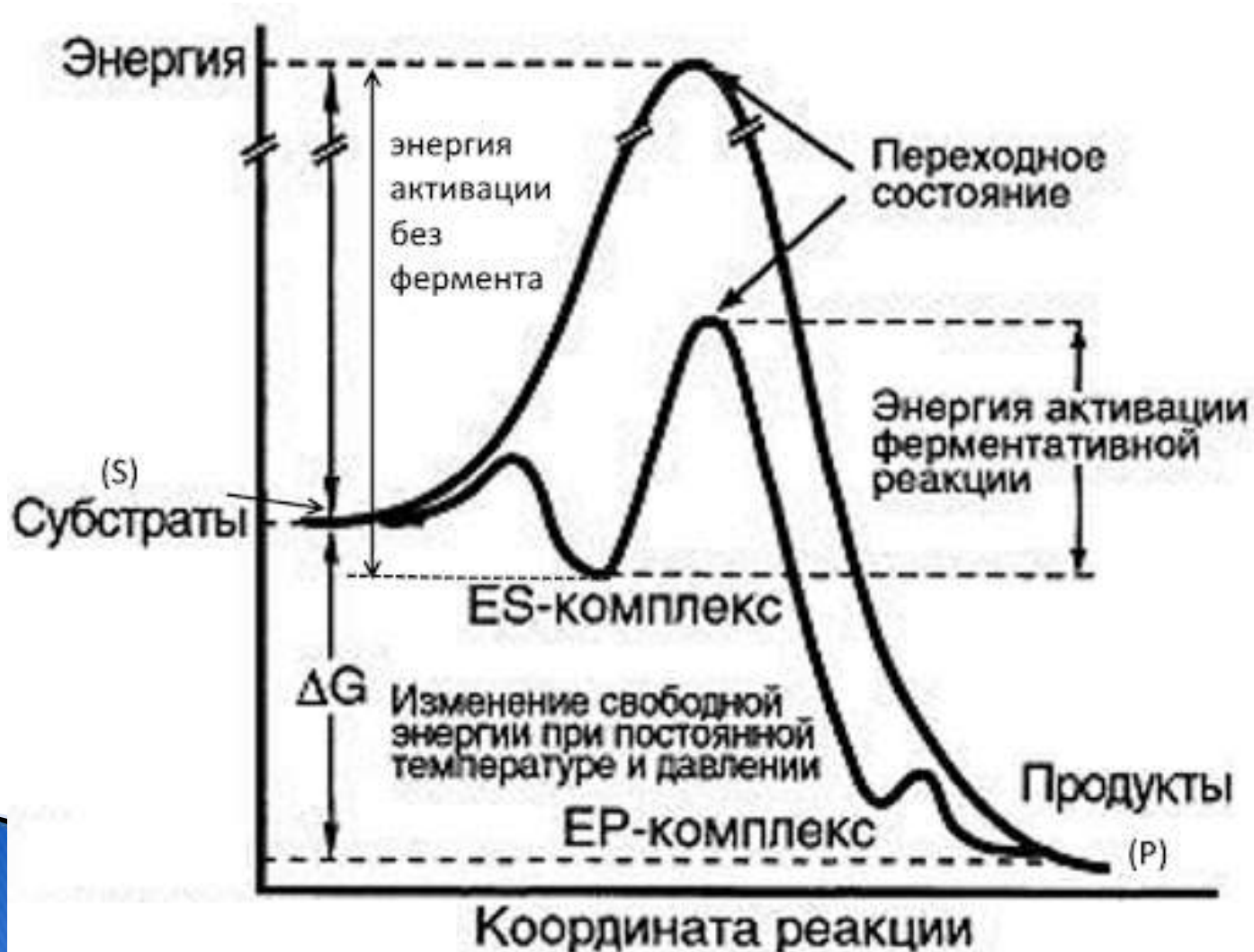


где E - фермент, S - субстрат, P - продукт.

Термодинамика ферментативных реакций.



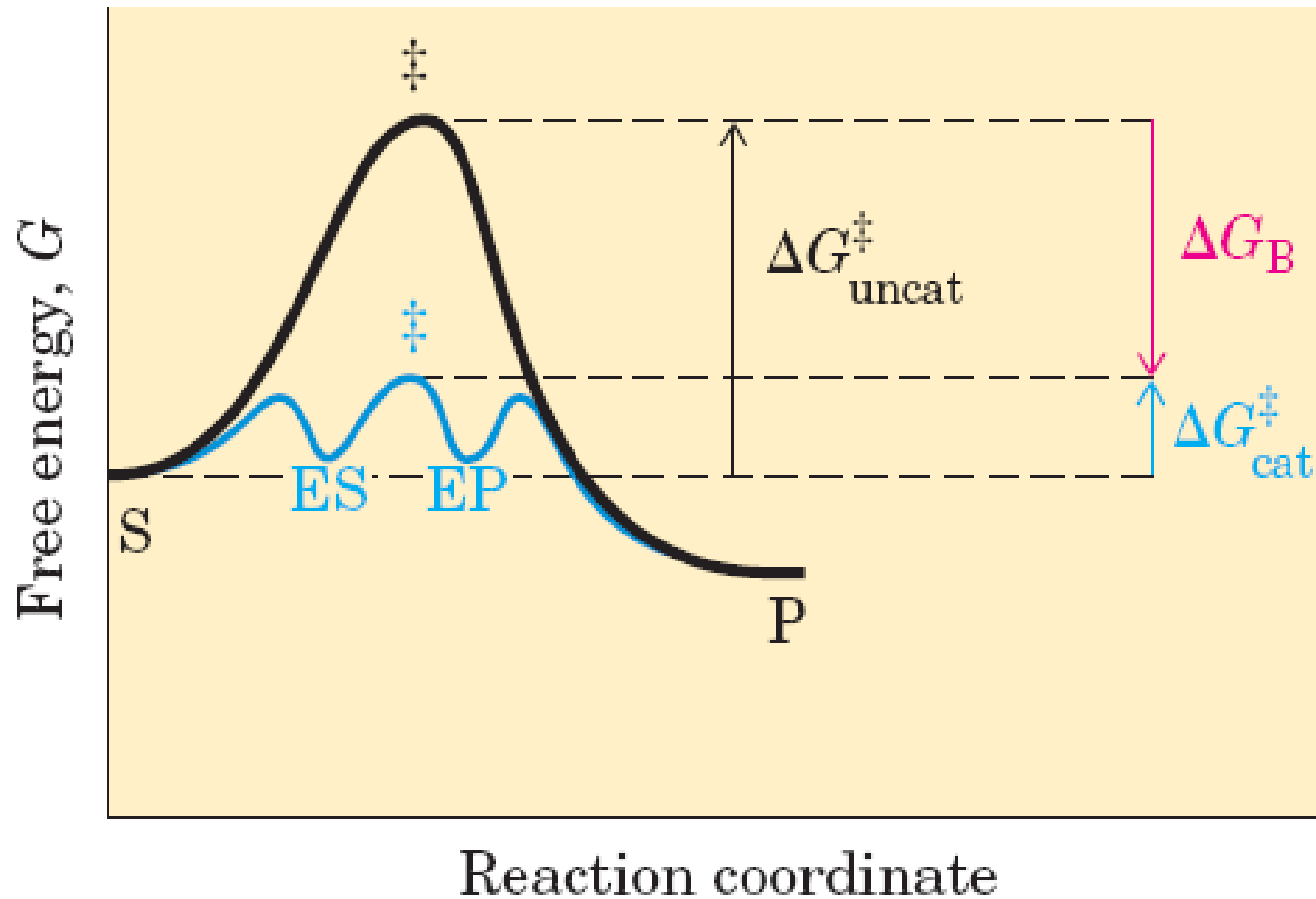
Теория переходного состояния



Термодинамика ферментативных реакций.



Теория переходного состояния



Термодинамика ферментативных реакций.

Свободная энергия Гиббса (потенциал Гиббса)

$\Delta G = \Delta U + P\Delta V - T\Delta S$ где P и T – const, U – внутренняя энергия молекул,

В самопроизвольных реакциях

$$\Delta G < 0$$

$$\Delta S > 0$$

Почему идут реакции с образованием полипептидов $\Delta S < 0$?

Сопряженные мультиферментные реакции

Расход 1 АТФ на активацию АА и присоединение к тРНК

2 ГТФ на образование пептидной связи

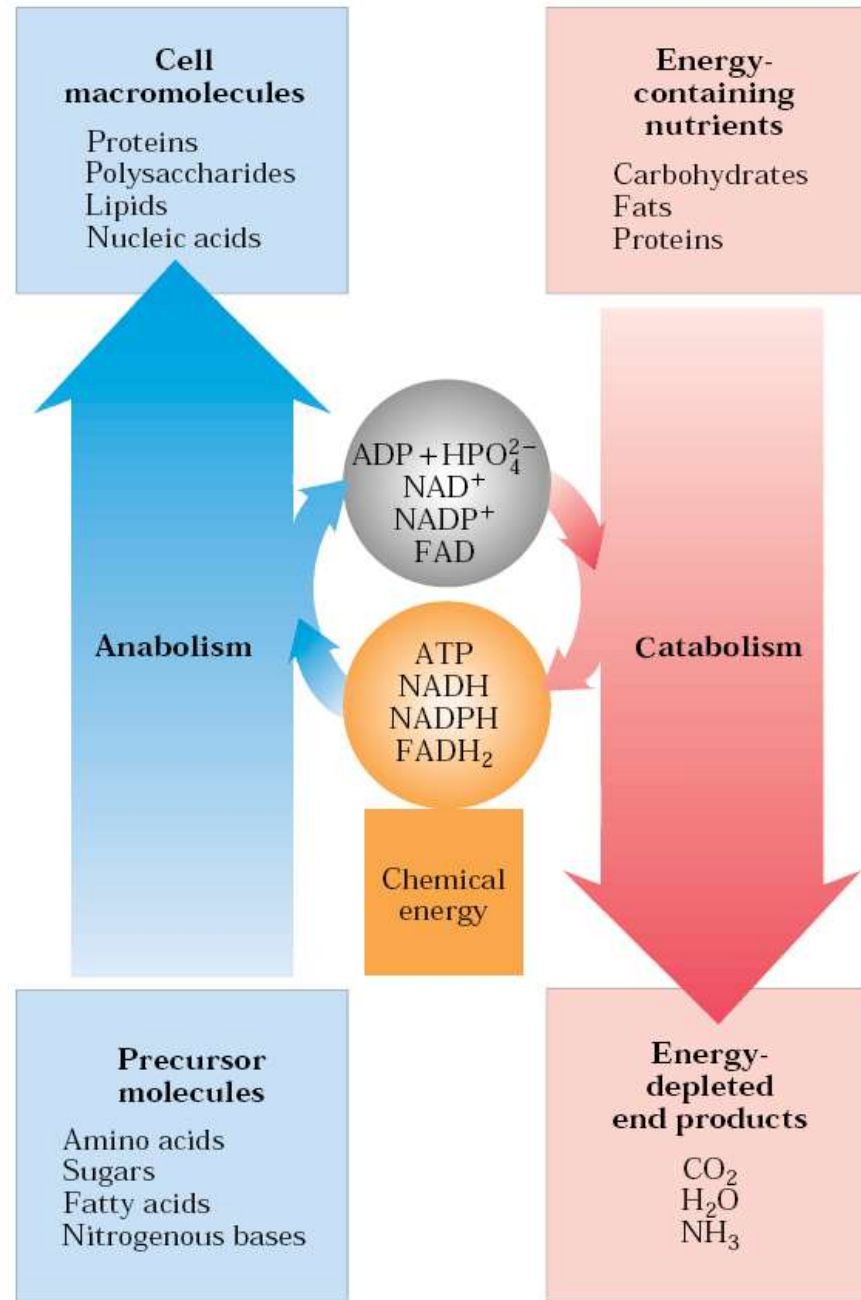
Почему идут реакции синтеза АТФ, $\Delta G > 0$, $\Delta S < 0$?

Сопряженные мультиферментные реакции

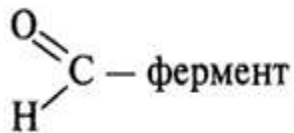
Окисление углеводов и жирных кислот, транспорт H^+ через митохондр.

мембрану, E мембранного потенциала расход на синтез АТФ

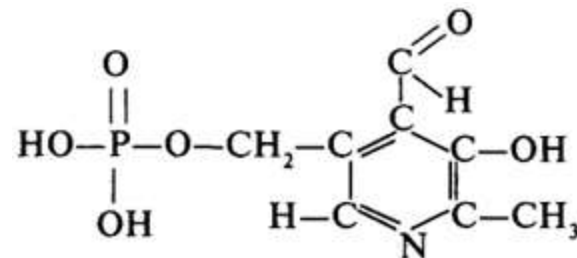
Термодинамика.



Механизм действия некоторых ферментов



Аминотрансфераза
 пиридоксальфосфат (В6)



Реакция Трансаминирования. 1 стадия

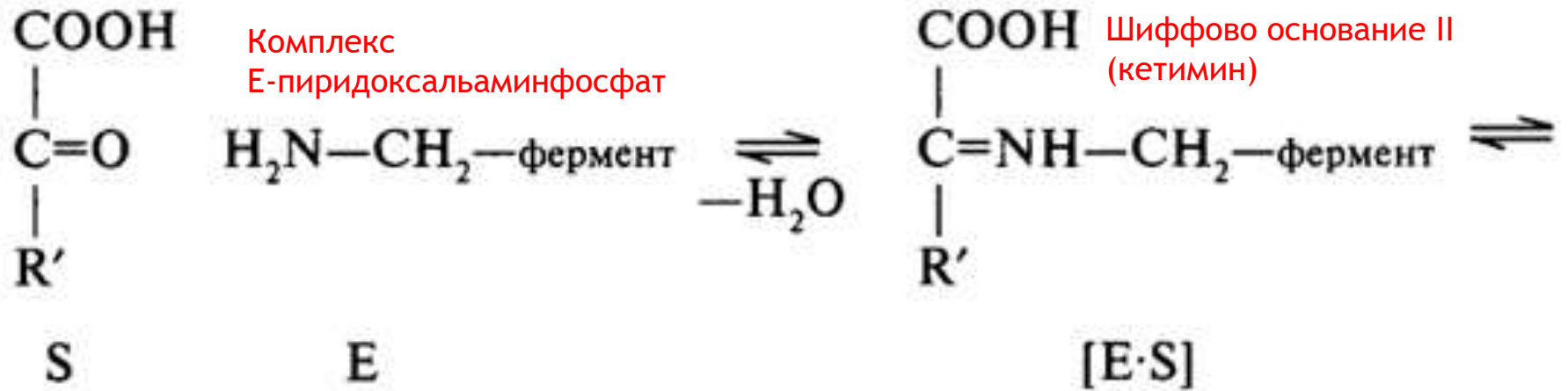
α -аминокислота (субстрат 1)



Механизм действия ферментов

Обратная реакция трансаминирования (2 стадия трансаминирования)

α-кетокислота (субстрат2)



Сравнительная характеристика ферментов и небиологических катализаторов

Общие черты	Отличительные черты
Повышают скорость реакции	Обладают более высокой эффективностью действия
Не расходуются в реакциях	Обладают высокой специфичностью действия (выбирают определенный субстрат и катализируют специфическую реакцию)
Не изменяют состояния химического равновесия, ускоряя прямую и обратную реакцию в равной степени	Работают в более мягких условиях (нейтральное pH, температура $\sim 37^\circ\text{C}$, $p_{\text{атм}}$)
	Регулируемая каталитическая активность (активность некоторых ферментов будет изменяться в зависимости от концентрации веществ регуляторов)

Пример:

Фермент каталаза ускоряет реакцию распада перекиси водорода в 10^{12} раз. Энергия активации реакции $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + 1/2\text{O}_2$ составляет 18 ккал/моль. Мелкодисперсная платина снижает её до 12 ккал/моль, ускоряя реакцию на 6 порядков. Фермент каталаза снижает энергию активации до 5,6 ккал/моль, что ускоряет реакцию на 12 порядков.

Изоферменты

Изоферменты - формы фермента, которые катализируют одну и ту же реакцию и отличаются по:

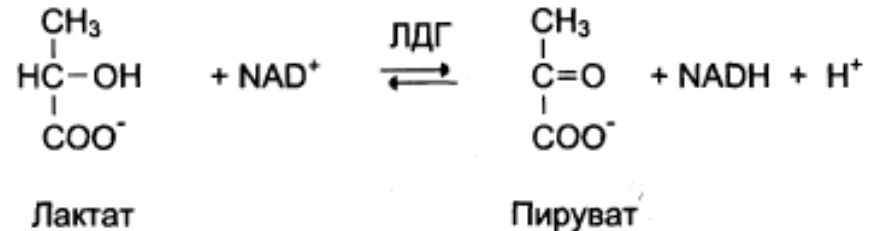
- сродству** к субстрату;
- скорости** катализируемой реакции,
- чувствительности** к ингибиторам и активаторам,
- условиям** работы (оптимум pH и температуры).

Формы **ЛДГ-4** и **ЛДГ-5** работают эффективно в анаэробных условиях, содержатся в печени, скелетных мышцах, коже. Они катализируют превращение пирувата в лактат.

Формы **ЛДГ-1** и **ЛДГ-2** работают эффективно в аэробных условиях, содержатся в миокарде, мозге. Катализируют превращение лактата в пируват.

ЛДГ преобладает в тканях с промежуточным типом обмена – селезенка, поджелудочная железа.

Пример: Существует пять изоферментов **лактатдегидрогеназы**.



Фермент состоит из нескольких субъединиц. Отличие между изоферментами заключается в разном соотношении субъединиц Н и М.



Н - Heart, сердце

М - Muscle, мышца

Изоферменты лактатдегидрогеназы

Мультиферментные комплексы

Это комплекс, в котором несколько ферментов прочно связаны между собой. Они осуществляют ряд последовательных реакций, в которых продукт реакции передается на следующий фермент и является **только его** субстратом.

Примеры:

- **пируватдегидрогеназный комплекс**, превращающий пируват в ацетил-SКоА,
- **α -кетоглутаратдегидрогеназный комплекс** превращающий α -кетоглутарат в сукцинил-SКоА,
- комплекс под названием "**синтаза жирных кислот**", синтезирующий пальмитиновую кислоту



Кинетика ферментативных реакций

Основные условия: $[E] \ll [S]$, P , $T = \text{const}$, водный раствор

Определения:

Скорость реакции $V = k \cdot C_1 \cdot C_2 \cdot C_3 \dots C_m$

Молекулярность реакции (число молекул, участвующих, уни-, бимолекулярные)

Порядок реакции (число концентрационных членов)

Примеры:

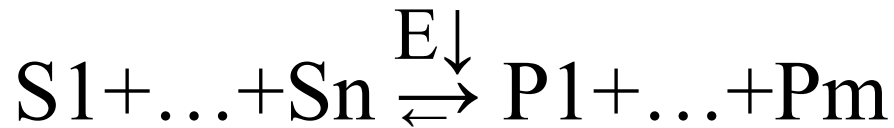
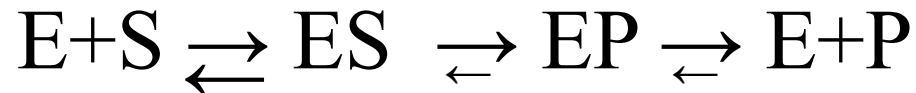
Бимолекулярные II порядка

Бимолекулярные I порядка (гидролиз или гомоэтерификация)

Унимолекулярные в начале - 0 порядка

Кинетика ферментативных реакций

общее уравнение ферментативного катализа



O.V. Stronin

Единицы активности ферментов.

Активность E определяется чаще всего
по превращению S

Стандартная единица активности (международная):
характеризует количество молекул S , превращаемых в
единицу времени при 25 градС в оптимальных условиях.

$$\text{M.E.} = 1 \text{ мкмоль/мин}$$

(она же E , U)

Производная – активность в единице объема: м.е./мл

Единицы активности ферментов.

Активность в СИ (катал): характеризует превращение количества вещества S за единицу времени (как и стандартная активность).

$$1 \text{ кат(kat)} = 1 \text{ моль/с} = 6 * 10^7 \text{ м.е.(U)}$$

Единицы активности ферментов.

Удельная активность: Отношение стандартной активности к количеству общего белка (либо на количество ткани).

Характеризует чистоту фермента.

$\text{E}/\mu\text{г}$ ($\text{U}/\mu\text{g}$)

Единицы активности ферментов.

Молекулярная активность: число каталитических актов в единицу времени на 1 молекулу Е (близко к числу оборотов Варбурга).

$$\text{МИН}^{-1}$$

Практически определяется как произведение удельной активности высокоочищенного препарата Е на его M_r и число активных центров Е.

Например, ДНК-полимераза – 667 нуклеотидов/мин

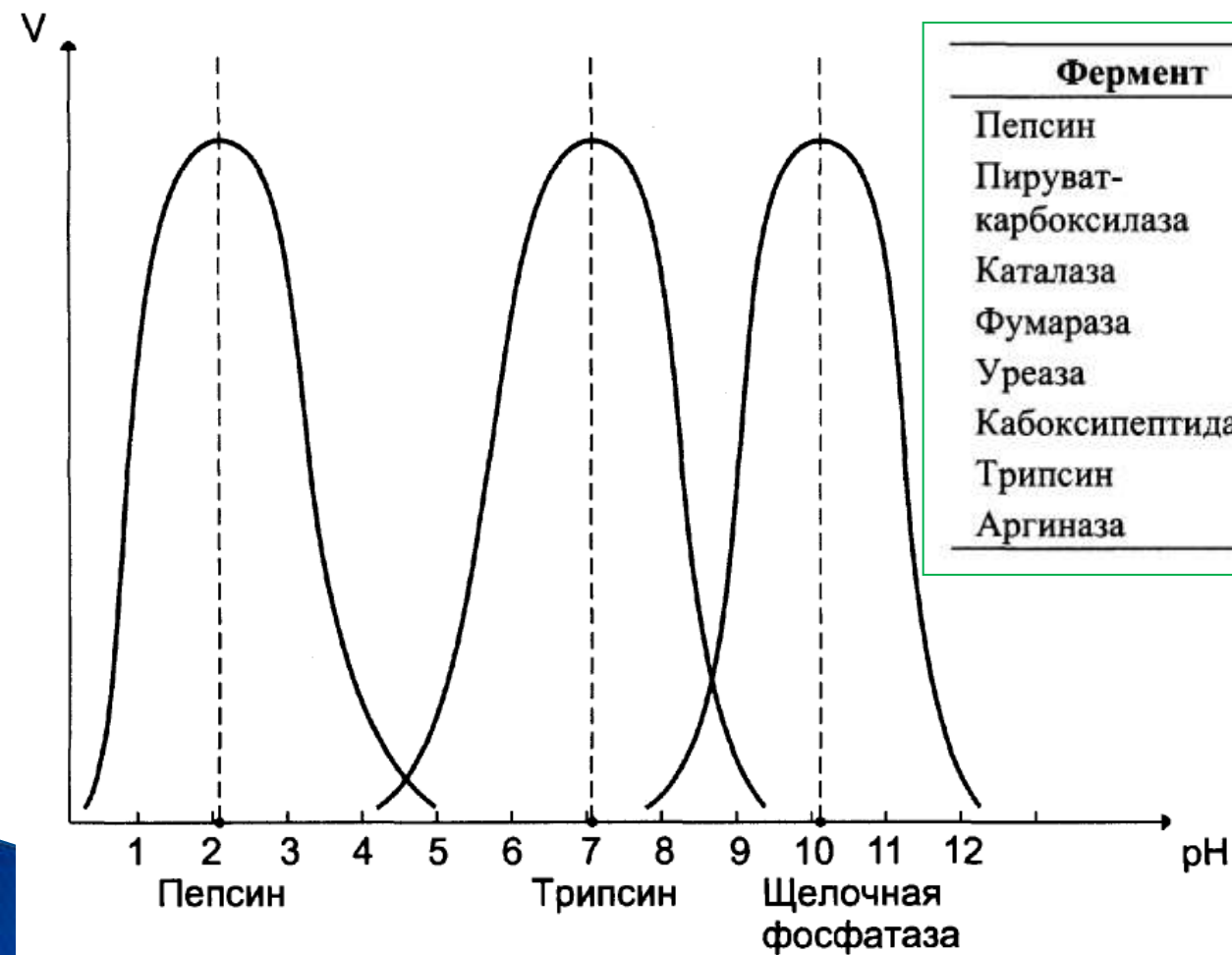
Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации фермента



Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры



Зависимость скорости ферментативной реакции от pH среды



Фермент	Оптимальное значение pH
Пепсин	1,5–2
Пируват-карбоксилаза	4,8
Каталаза	6,8–7
Фумараза	6,5
Уреаза	6,8–7,2
Кабоксипептидаза	7,5
Трипсин	6,5–7,5
Аргиназа	9,5–9,9

Кинетика ферментативных реакций

Уравнение Михаэлиса-Ментен.

Уномолекулярная реакция 1 порядка в стационарных условиях.



Leonor Michaelis,
1875–1949



Maud Menten,
1879–1960

Кинетика ферментативных реакций (если есть время)

Уравнение Михаэлиса-Ментен. Вывод.

Кинетика ферментативных реакций (если есть время)

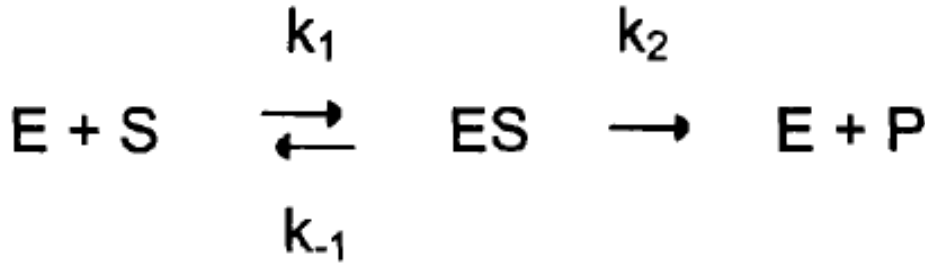
Уравнение Михаэлиса-Ментен. Вывод.

Кинетика ферментативных реакций (если есть время)

Уравнение Михаэлиса-Ментен. Вывод. Смысл K_m

Зависимость скорости ферментативной реакции от C субстрата

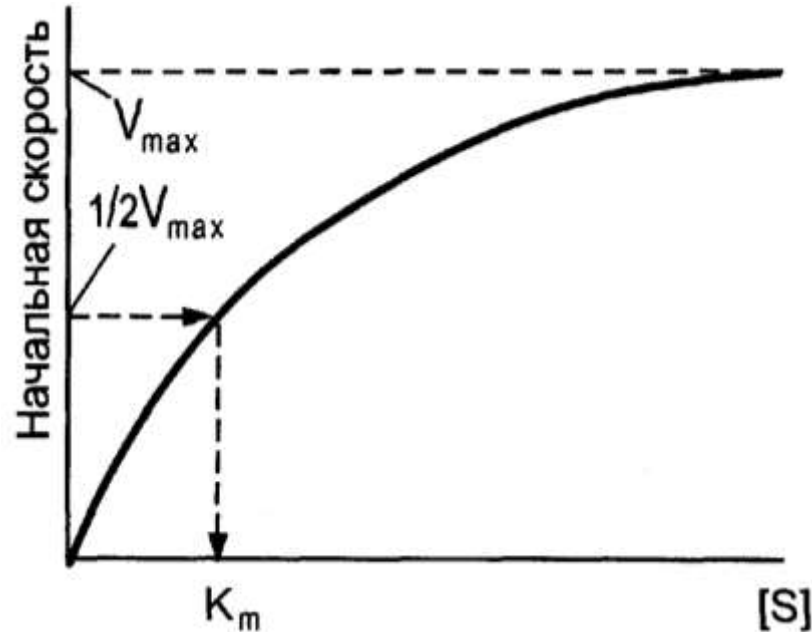
Концентрация фермента - лимитирующий фактор в образовании продукта!



Соотношение констант скоростей
 $(k_{-1} + k_2)/k_1 = K_m$ – константа Михаэлиса

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

Уравнение Михаэлиса-Ментен



V_{\max} характеризует каталитическую активность фермента, определяет максимальную возможность образования продукта при данной концентрации фермента и в условиях избытка субстрата.

K_m характеризует сродство данного фермента к данному субстрату и является величиной постоянной. Если K_m велика, то комплекс ES непрочный и легко распадается — реакция идет медленно, при низких значениях K_m , то комплекс устойчив и реакция идет быстро.

Зависимость скорости ферментативной реакции от присутствия активаторов и ингибиторов

Активаторы

повышают активность ферментов

- Ионы Me ;
- Органические вещества, например желчные кислоты активируют липазу.
- Неорганические вещества, например HCl активирует пепсин.

Специфические активаторы
Субстраты

Ингибиторы

снижают активность ферментов.

Виды ингибирования:

- Обратимое: $E+I \leftrightarrow EI$
- Необратимое: $E+I \rightarrow EI$

По механизму действия:

- Конкурентное
- Неконкурентное
- Бесконкурентное
- Смешанное

- В качестве ингибитора:
- Избыток субстрата
- Продукт

Ингибиторы

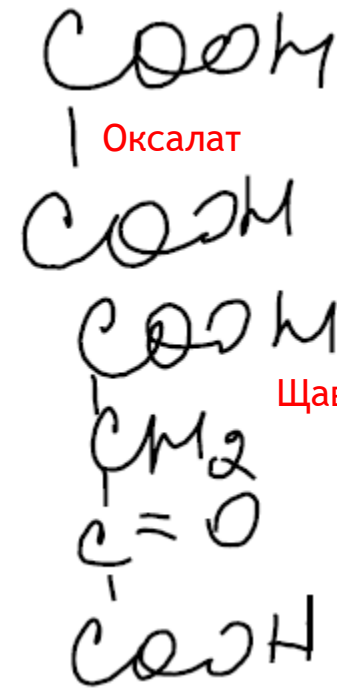
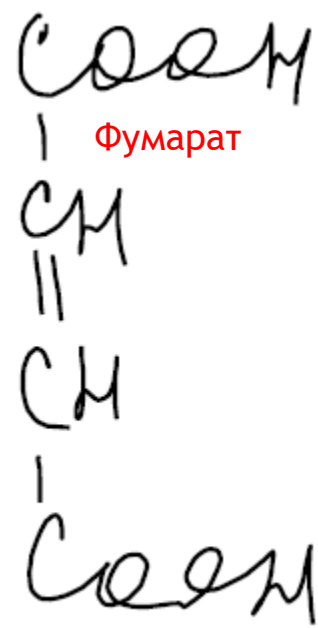
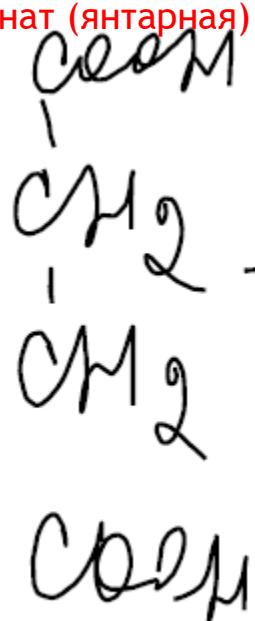
Лекарственные препараты

Яды

Ингибиторы ферментов

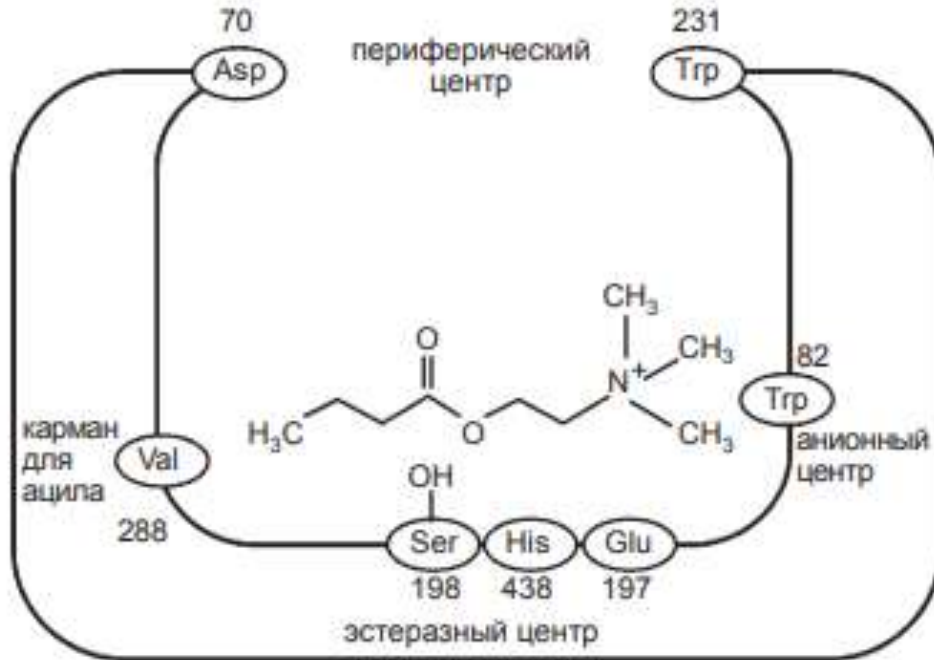
Конкурентное ингибирование. Сукцинатдегидрогеназа

Сукцинат (янтарная)

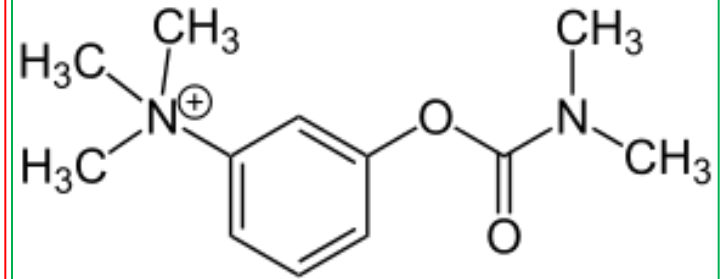


Ингибиторы ферментов

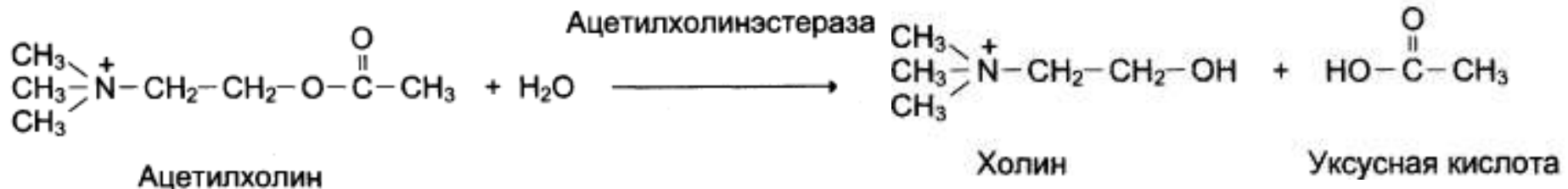
Конкурентное ингибирование,
 K_m увеличивается



Обратимое
ингибирование



«Прозерин»

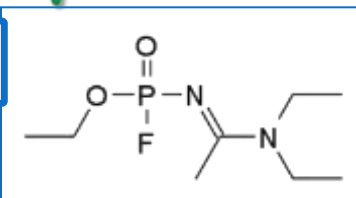


Ингибиторы ферментов

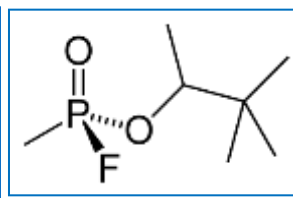
Конкурентное

Необратимое ингибирование

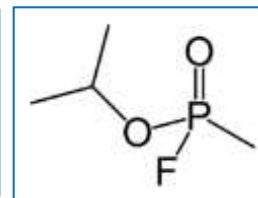
Органофосфат сначала связывается с остатком серина в эстеразном участке холинэстеразы, а после превращения в молекулу фосфата он связывает остаток гистидина. Это приводит к занятию эстеразного участка и ингибированию расщепляющей активности холинэстеразы



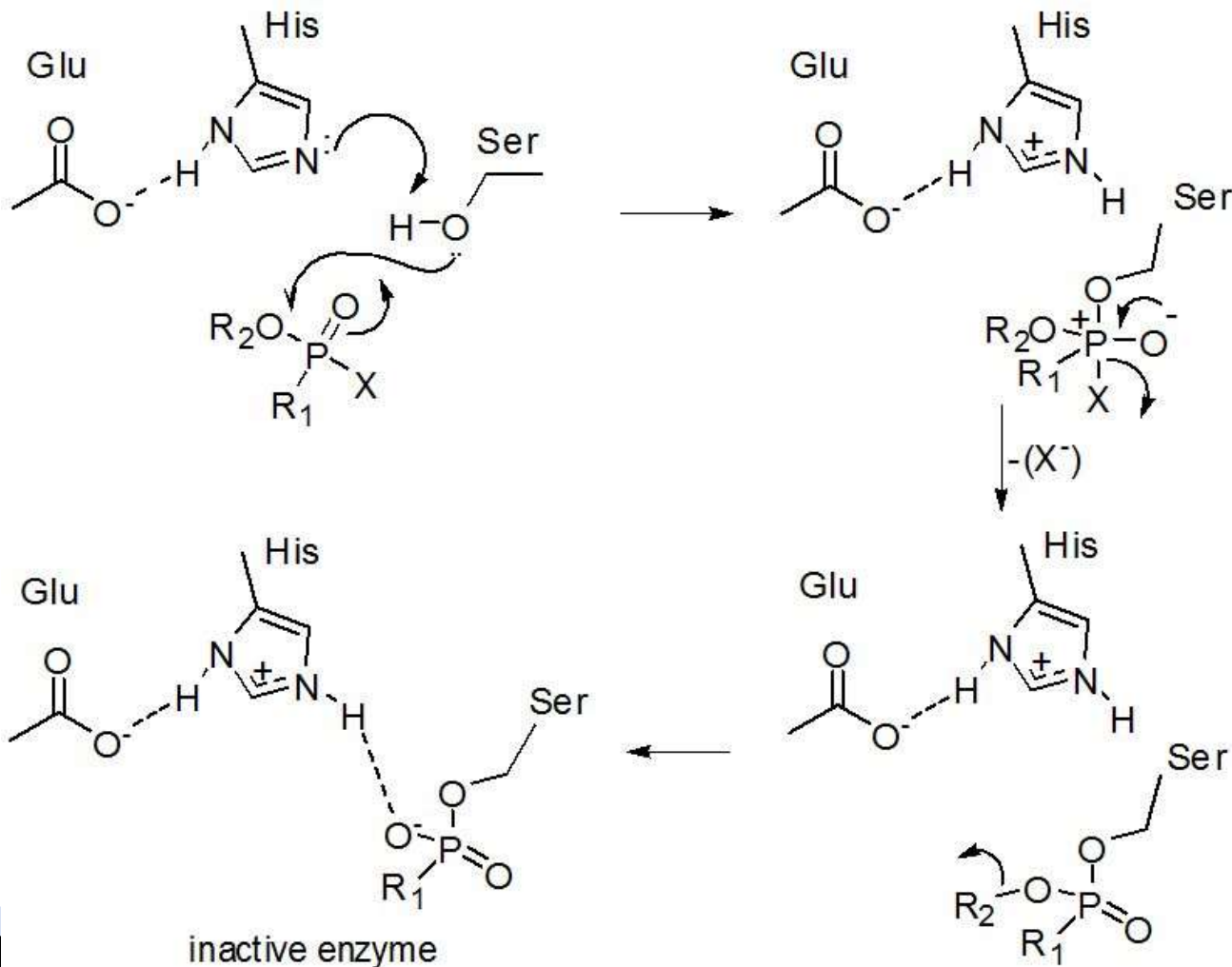
«А-234»



«Зоман»



«Зарин»



Ингибиторы ферментов

Неконкурентное ингибирование

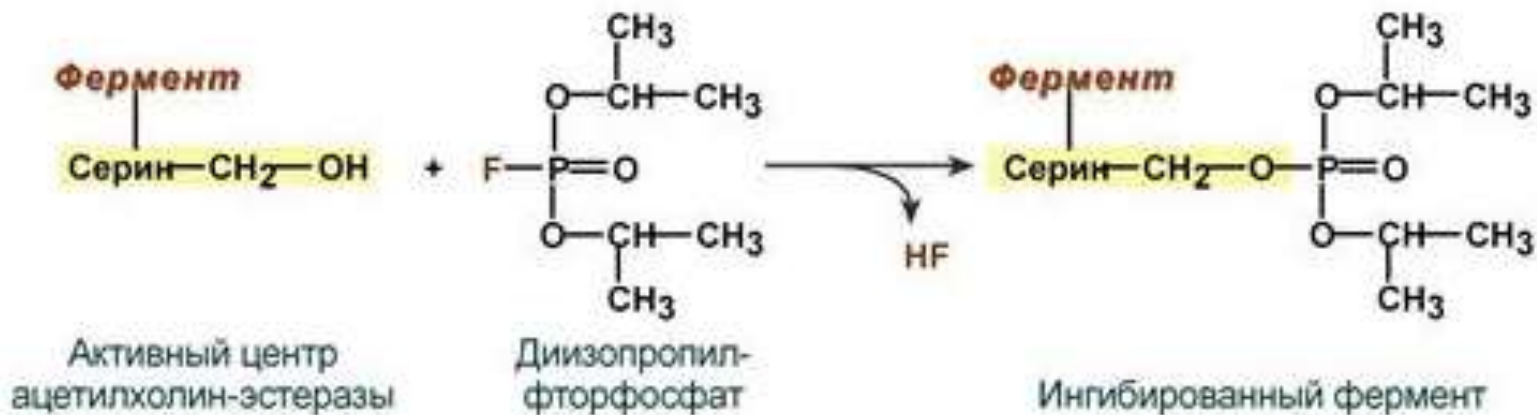
обратимое ингибирование

Комплексообразователи. Связывают металлы-кофакторы

Необратимое ингибирование

Синильная кислота связывается с гемовым железом в ферментах в ЦПЭ (ингибирование клеточного дыхания)

Тиоловые яды - Тяжелые металлы (Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ag^{+}) реагируют с **-SH**



Применение ферментов

- **В пищевой промышленности** (хлебопекарной, молочной промышленности, в мясной для улучшения качества мяса, производстве соков, пивоварение). сыр (сычужный Е, химозин), переработка жиров (липазы).
- **В легкой промышленности.** Для удаления волосяного покрова со шкур, для размягчения кожи в меховом производстве (коллагеназы).
- **В химической промышленности.** Иммуобилизованные ферменты.
- **Бытовая химия:** моющие средства (протеазы, липазы);

Использование и значение ферментов:

Медицина: маркеры в диагностике (АсТ, АлТ, ЩФ), инструменты в диагностике (ИФА, ПЦР, глюкозооксидазный метод определения глю), лекарственные препараты (Е и ингибиторы), яды (в основном ингибиторы);

Промышленность:

фармацевтическая (эндонуклеазы, протеазы), целлюлозно-бумажная (гидролиз и модификация целлюлозы);

Инструменты молекулярной биотехнологии
(ферменты НК, протеазы и т.д.)

O. V. Stronin