

Ферментативный катализ

Ферменты – биологические катализаторы, способные многократно изменять скорость метаболических реакций.

Отличия ферментов от небиологических катализаторов:

- 1. Ферменты обладают субстратной специфичностью (селективностью). Это универсальное свойство ферментов.**
- 2. Ферментативный катализ чрезвычайно эффективен: ускоряет превращения в 10^6 – 10^{11} раз.**
- 4. Фермент никогда не расходуется в ходе катализируемой реакции.**
- 5. Скорость ферментативной реакции пропорциональна количеству фермента.**
- 6. Ферментативный катализ происходит в особых условиях: температура $+37^\circ\text{C}$, оптимальное значение pH, давление – 1 атмосфера.**

Ферментативный катализ подчиняется законам термодинамики:

- Фермент может катализировать только **термодинамически вероятную реакцию** (т.е. **спонтанные** или **самопроизвольно протекающие** в данных условиях реакции).
- Фермент **не изменяет направление** биохимической реакции и **не сдвигает ее равновесие**. При участии фермента **равновесие достигается во много раз быстрее (секунды)**, чем в его отсутствие (**часы**).
- Фермент в **одинаковой степени ускоряет как прямую, так и обратную реакции**.

1 класс: ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ

Катализируют окислительно-восстановительные реакции. Содержит 17 подклассов (самый многочисленный класс ферментов):



- **Дегидрогеназы** – если субстрат является донором H^+
- **Оксидазы** – если акцептором электрона является молекулярный кислород.
- **Оксигеназы** – если молекулярный кислород непосредственно включается в молекулу субстрата.

2 класс: ТРАНСФЕРАЗЫ

Переносят хим. группы (**R**) от молекулы-донора к молекуле-акцептору. Содержит 8 подклассов (один из самых многочисленных классов):



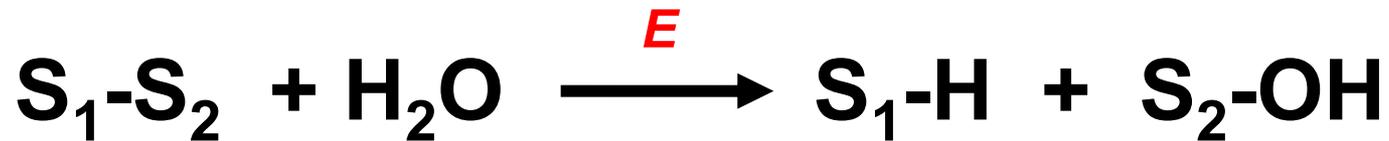
В зависимости от переносимой группы, имеются специфические названия:

- перенос P_n – **киназа**; $\begin{array}{c} \text{O}^- \\ \diagup \\ \text{— P} \\ \diagdown \\ \text{O}^- \end{array} \quad \text{(фосфорильная гр.)}$
- перенос аминогрупп – **аминотрансферазы**

(АсАТ/АлАТ)

3 класс: ГИДРОЛАЗЫ

Разрывают химические связи с присоединением воды. Содержит 11 подклассов (известно около 500 ферментов):

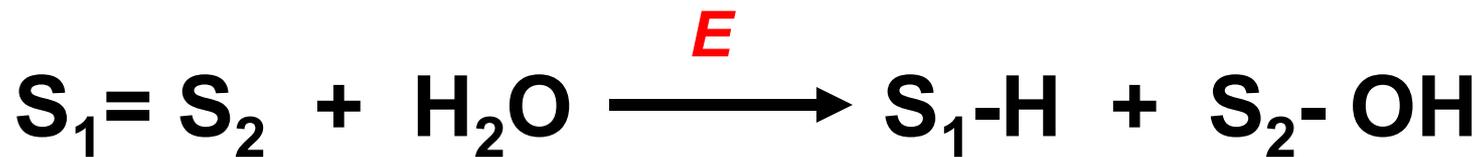


В этот класс входят все пищеварительные ферменты и ферменты лизосом.

Пример: гидратазы, липазы, эстеразы, фосфатазы, пептидазы, уреаза, АТФазы.

4 класс: ЛИАЗЫ

Отщепляют (*не гидролитически*) от субстрата хим. группу, или присоединяют воду по двойной связи. Содержат 4 подкласса (известно около 230 ферментов):



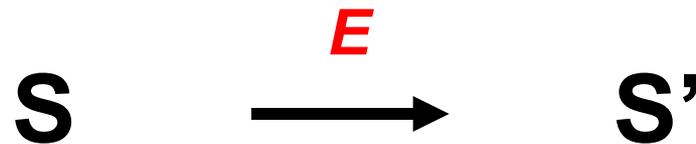
В основном это ферменты, работающие при синтезе или расщеплении промежуточных продуктов обмена.

Пример: декарбоксилазы, гидратазы.

5 класс: ИЗОМЕРАЗЫ.

Катализируют внутримолекулярные перестройки (превращения в пределах одной молекулы).

Содержит 5 подклассов (известно около 100 ферментов):



изомер молекулы S

Пример: изомеразы, рецемазы, эпимеразы, мутазаы.

Глюкозо-6-Ф → *фосфоглюкомутаза* → Фруктозо-6-Ф.

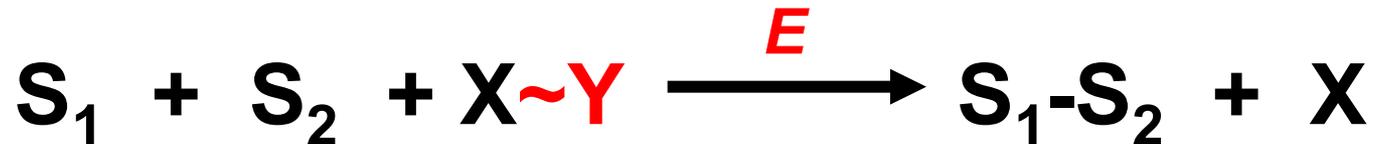
6 класс: ЛИГАЗЫ

Катализируют присоединение друг к другу двух разных молекул с образованием ковалентной связи. Процесс идет с потреблением энергии.

Если источниками являются АТФ или другие нуклеозидТФ, то СИНТЕТАЗА:



Если источниками являются высокоэнергетические фосфаты (ФЕП, креатин-Ф и др.), то СИНТАЗА:



Содержит 5 подклассов (известно менее 100 ферментов).

ФЕРМЕНТЫ

ПРОСТЫЕ БЕЛКИ
(протеазы,
липазы,
рибонуклеаза)

СЛОЖНЫЕ БЕЛКИ

Белковая часть
(апофермент)

+

Небелковая часть
(простетическая
группа
или кофермент)

=

Холофермент
Только он обладает
ферментативной
активностью

Кофермент – небелковая, но органическая молекула,
как правило, легко отделяется от апофермента.

**НЕБЕЛКОВА ЧАСТЬ
МОЛЕКУЛЫ СЛОЖНОГО
ФЕРМЕНТА**

```
graph TD; A[НЕБЕЛКОВА ЧАСТЬ МОЛЕКУЛЫ СЛОЖНОГО ФЕРМЕНТА] --> B[КОФЕРМЕНТ:]; A --> C[КОФАКТОР:];
```

КОФЕРМЕНТ:

небелковая, но органическая молекула, легко отделяется от апофермента.

КОФАКТОР:

присутствующий в активном центре ион металла. Около 25% известных ферментов нуждаются в кофакторах.

Классификация коферментов:

Витаминные коферменты

НАД, НАДФ, ФМН, КоА и др.,
Их предшественниками являются витамины.

Невитаминные коферменты

1. Нуклеотидные коферменты.
2. Металлопорфириновые коферменты.
3. Пептидные коферменты.
4. Ионы металлов.

Роль металлов в ферментативном катализе:

1. Металлы образуют электрофильные группы в составе активного центра: они связываются с «-» зарядами в молекуле субстрата.
2. Металлы с переменной валентностью сами участвуют в переносе электронов (прямое участие в катализе).
3. Металлы участвуют в формировании и стабилизации пространственной конфигурации молекулы фермента, включая четвертичную структуру.
4. Металлы формируют «мостик», соединяющий апо- и ко-фермент.

Активный (каталитический) центр фермента

В нём происходят два важнейших события:

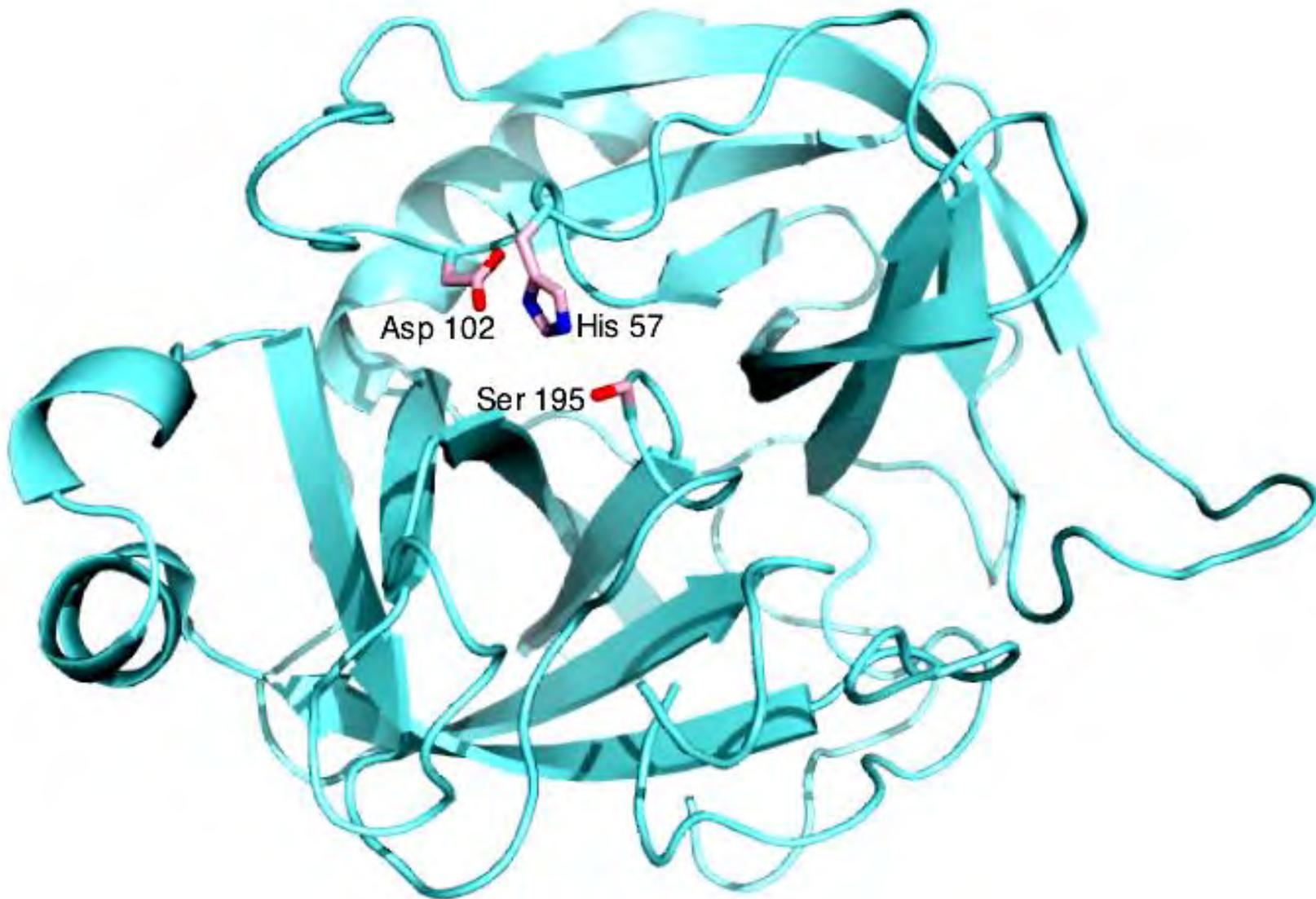
- связывание молекулы субстрата
- превращение субстрата(ов) в продукт(ы).

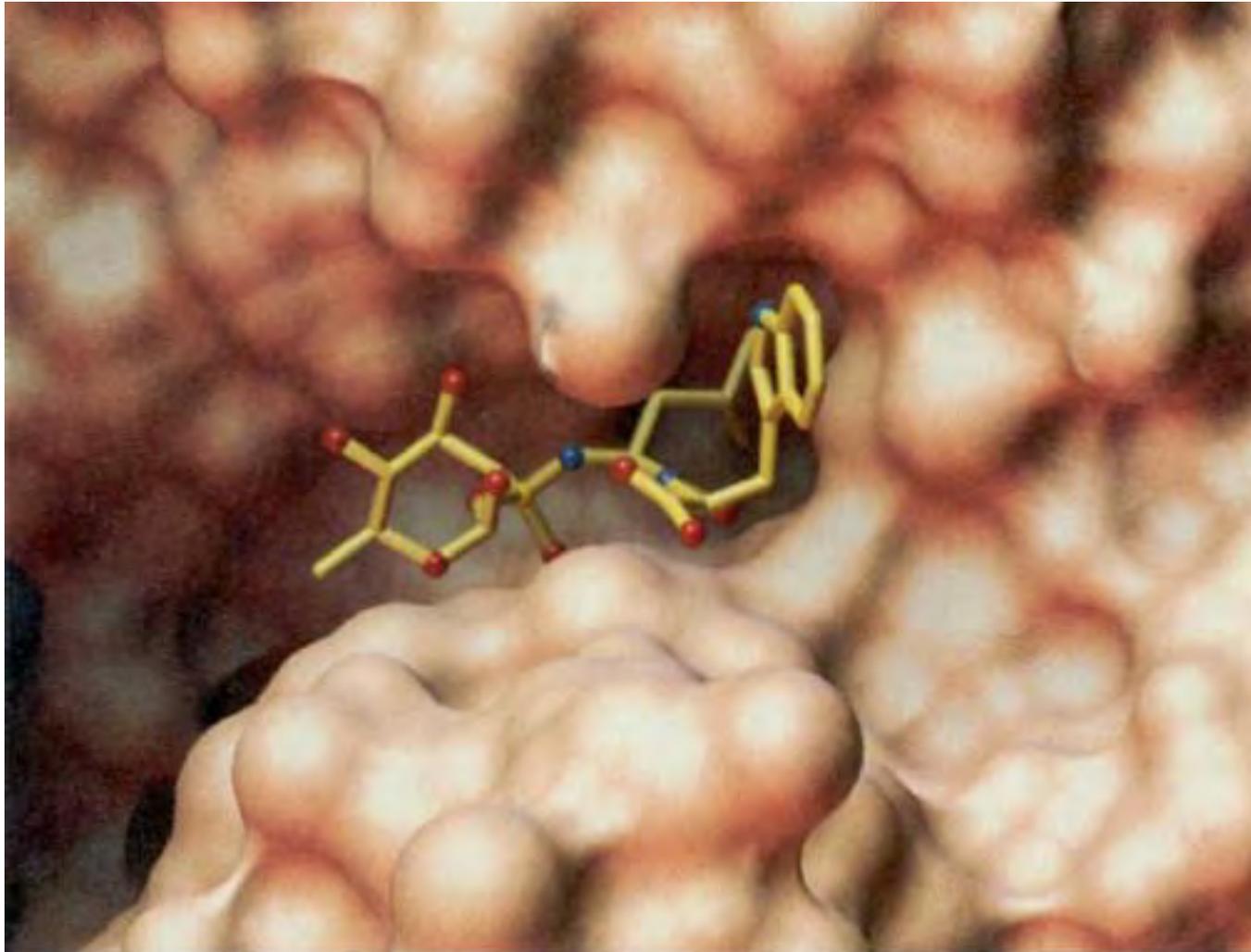
В сложных ферментах, неотъемлемой частью активного (каталитического) центра является кофактор.

Активный (каталитический) центр, чаще всего, формируется **12 - 16 аминокислотами**, которые в первичной структуре полипептидной цепи расположены на значительном расстоянии друг от друга.

После того, как полипептидная цепь фермента образует **нативную пространственную конфигурацию (конформацию)**, аминокислоты **сближаются и занимают в пространстве определенное (уникальное) положение.**

Химотрипсин: активный (каталитический) центр





Активный центр – трехмерное образование. Для некоторых ферментов активный центр имеет форму щели или углубления.

Структура активного центра фермента:

Контактный (якорный) участок – служит для связывания молекулы субстрата, размещения её в строго определенной позиции и **определяет субстратную специфичность фермента**. Образующаяся связь примерно в 50-100 раз слабее ковалентной. Каталитического превращения в этом участке не происходит.

Каталитический участок – служит для превращения субстрата в продукт. Этот участок **определяет путь превращения субстрата**.

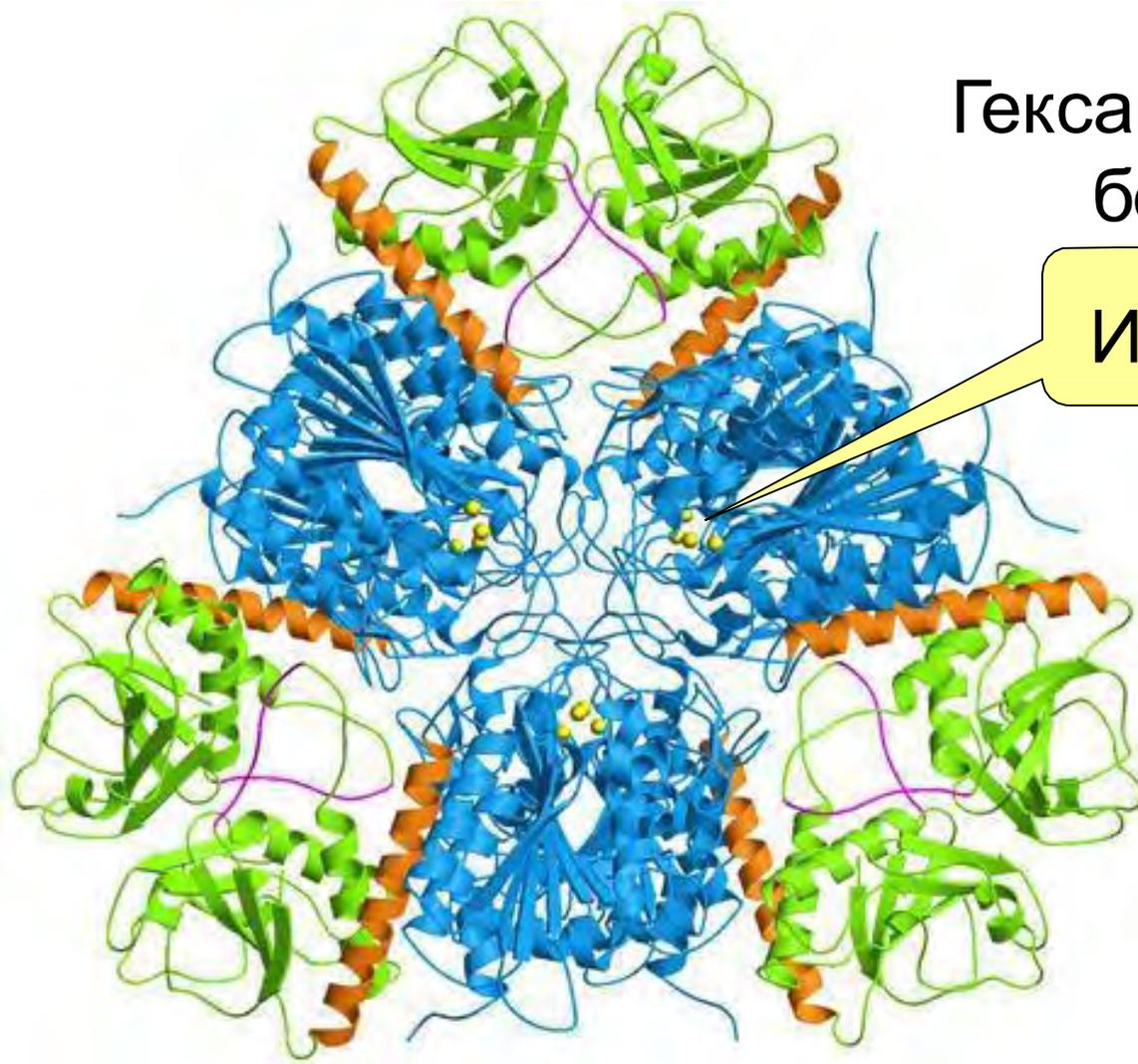
Примеры функциональных групп аминокислотных остатков, участвующих в катализе:

- карбоксильная гр. (**АСП, ГЛИЦ**)
- аминогруппа (**ЛИЗ**)
- имидазольная гр. (**ТРИПТ**)
- индольная гр. (**ТИР**)
- ароматическое кольцо (**ф-АЛА**)
- сульфгидрильная гр. (**ЦИС**)
- тиоэфирная гр. (**МЕТ**) и др.

Гидрофобные функц. группы аминокислот в составе активного центра фермента проявляют сродство к неполярным группам в молекуле субстрата.

Полярные функц. группы – сообщают кислотно-основные свойства.

Структура фермента аминопептидазы А *E. coli* (PerA)



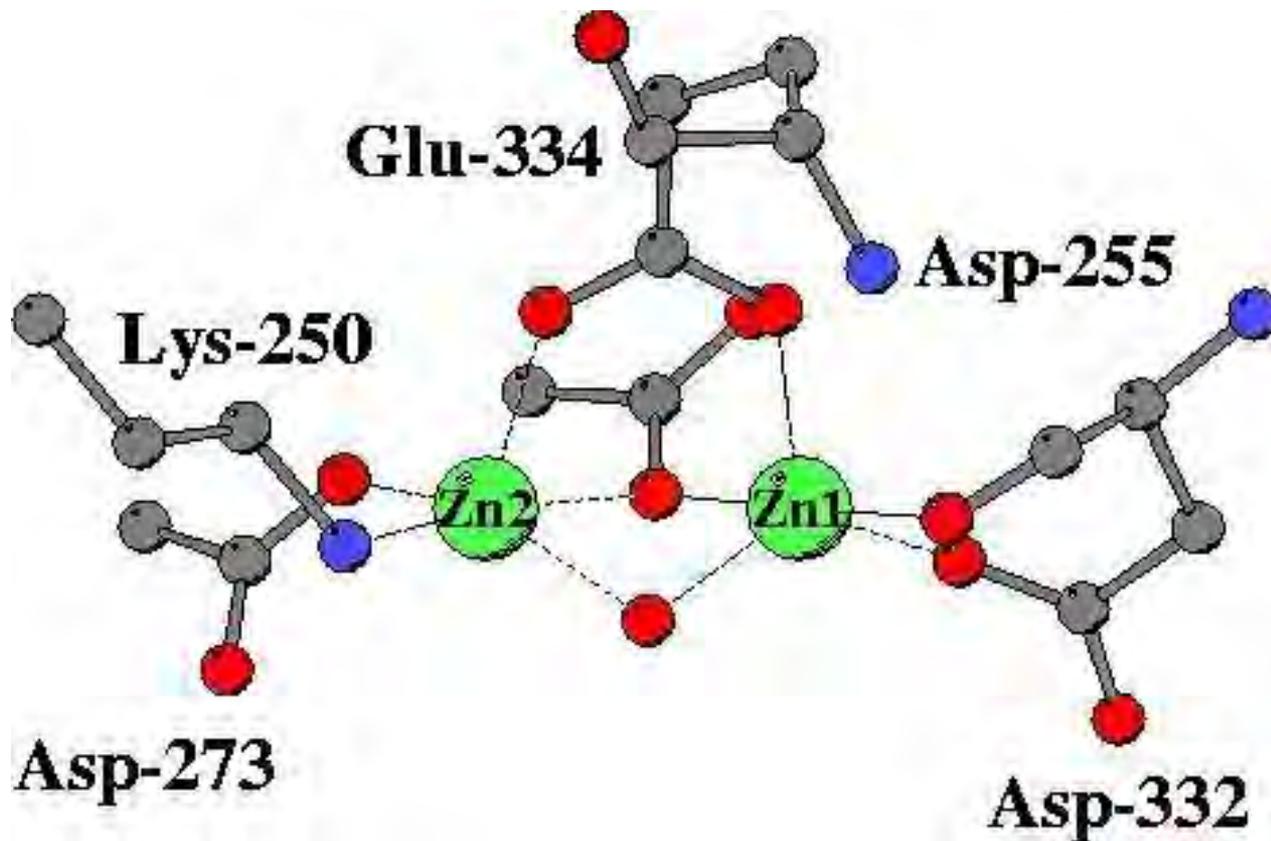
Гексамерный
белок

Ионы Zn²⁺

Активные центры лейцинаминопептидазы (LAP)

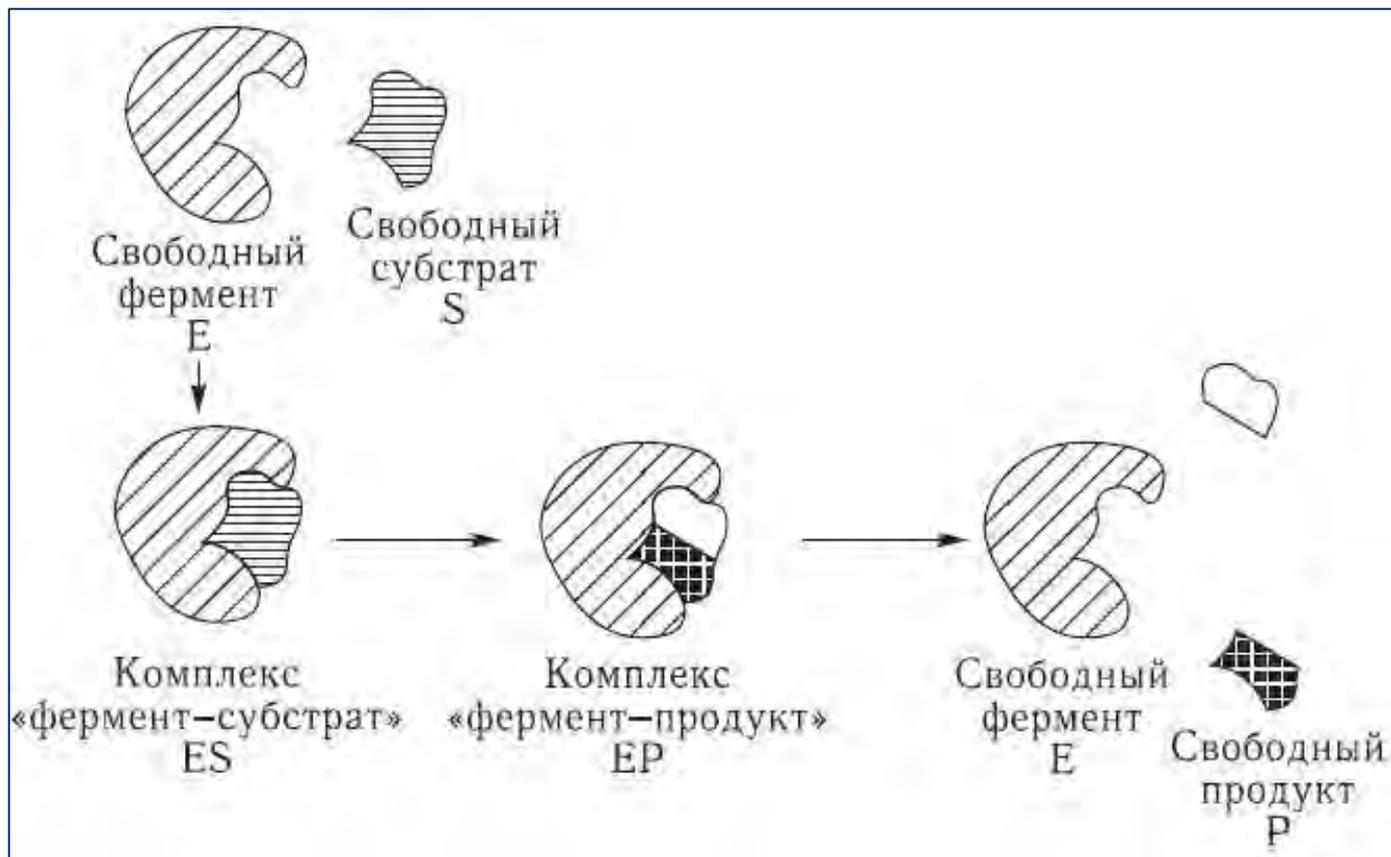
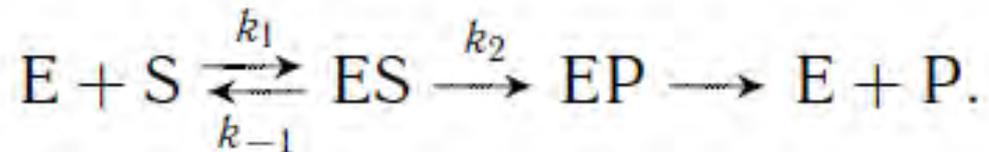


Фрагмент активного центра



Оба цинка пятивалентны.
Zn1 связан с пятью атомами O
Zn2 – с четырьмя O и одним N

Ферментативный катализ. Общая схема



Механизмы ферментативного катализа

1. Кислотно-основной катализ.

В состав активного центра входят аминокислотные остатки, содержащие функциональные группы, которые проявляют кислотно/основные свойства: доноры/акцепторы H^+ .

Молекула субстрата, связавшись в активном центре, индуцирует перераспределение плотности электронного облака групп активного центра. Это приводит к разрыву химических связей в молекуле субстрата и его превращение в продукт.

Кислотно/основные свойства особо выражены у аминокислот:
цис, гис, тир, сер, лиз, глу.

Ферменты, для которых характерен этот механизм катализа:

- Гидролазы (3 класс)
- Изомеразы (5 класс)
- Лиазы (4 класс)

Механизмы ферментативного катализа

2. Ковалентный катализ.

В активном центре между молекулой субстрата (S) и каталитическими функциональными группами аминокислот образуется ковалентная связь. В результате этого **образуется промежуточный фермент-субстратный комплекс (ES)**.

Этот комплекс высокоактивен и неустойчив, он быстро распадается с освобождением продукта ферментативного катализа (P) и свободную молекулу фермента:



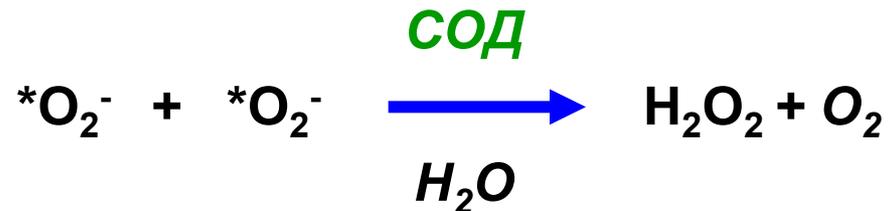
Ферменты, для которых характерен этот механизм катализа:

- трипсин
- эластаза
- ЩФ

Субстратная специфичность ферментов

1. Абсолютная субстратная специфичность.

Активный центр фермента **комплементарен** только **одному субстрату**. В природе явление сравнительно редкое.



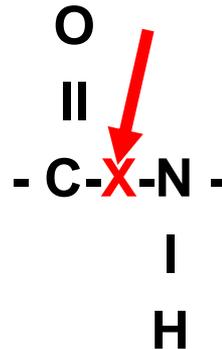
2. Групповая субстратная специфичность.

Этот вид специфичности характерен для большей части ферментов. Фермент катализирует **однотипные реакции** в группе **структурно сходных субстратов**.

панкреатическая липаза

ТАГ -----→ Моноацилглицерол + 2 СЖК

Протеазы – гидролиз **пептидной связи**:



3. Стереоспецифичность.

Субстрат может иметь несколько стереоизомеров, но фермент взаимодействует только с каким-то одним определенным стереоизомером.

D- и L- сахара. *Гексокиназа* активна только по отношению к *D-глюкозе*.

α - и β -гликозидные связи. *Амилаза* активна только по отношению к α -1,4-гликозидной связи (крахмал, гликоген), но не клетчатки.

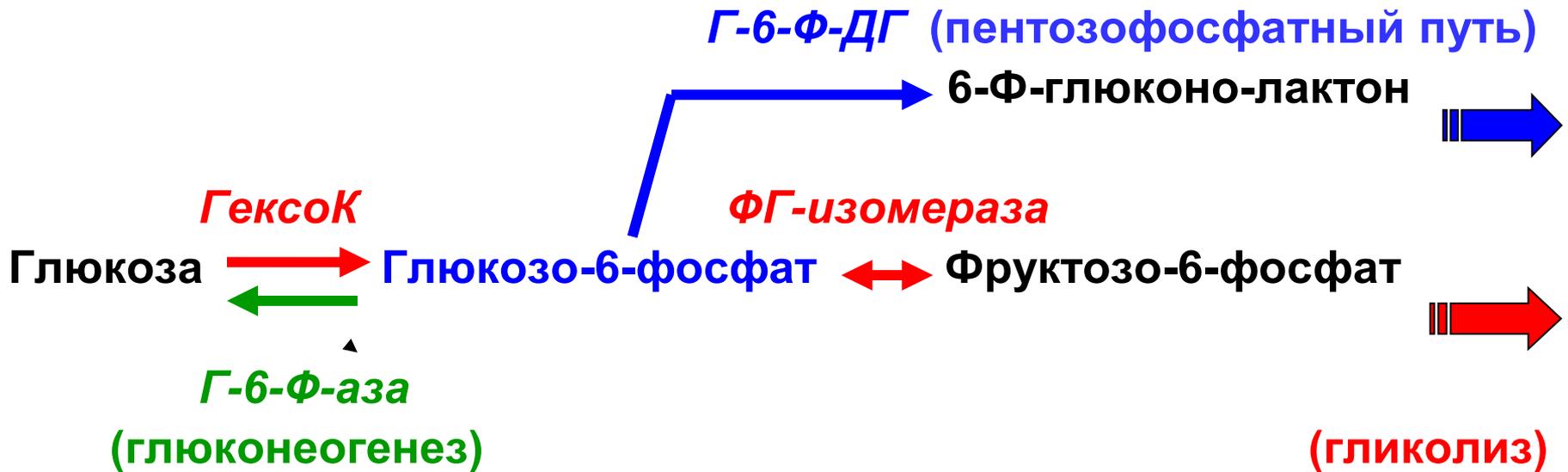
D- и L- аминокислоты.

Цис / Транс – изомеры.

4. Каталитическая субстратная специфичность.

Одна молекула служит субстратом для нескольких ферментов.

Пример: глюкозо-6-фосфат.



Ферменты, использующие один и тот же субстрат, имеют **активные центры, строение которых существенно отличаются**. Этим определяется различие путей превращения одного и того же субстрата.

Гипотезы, объясняющие механизм субстратной специфичности ферментативного катализа

1. Гипотеза Э.Фишера «Ключ – замок» (1890 г.)

Структура активного центра фермента – жесткая. **Силуэт активного центра - «слепок» силуэта молекулы субстрата.** Молекула субстрата – «ключ», активный центр фермента – «замок». Гипотеза может объяснить только феномен абсолютной субстратной специфичности ферментативного катализа.

2. Гипотеза Кошланда «Вынужденное соответствие»

Структура активного центра не жесткая (способна деформироваться). **Когда молекула субстрата присоединяется к активному центру фермента, то он деформируется.**

Происходит «подстраивание» конформации активного центра под силуэт молекулы субстрата. **Субстрат «вынуждает» активный центр менять свою конформацию для того, чтобы «соответствовать» структуре субстрата.**

Таким образом, «замок» (активный центр) меняет свою конформацию, сообразно форме «ключа» (молекулы субстрата).

Зависимость V ферментативной реакции от pH

В зависимости от pH среды, различные функциональные группы аминокислот фермента будут ионизированы в разной степени.

Пути влияния на каталитические свойства фермента:

- изменение ионизации функц. групп аминокислот в активном центре, **ответственных за катализ**.
- изменение ионизации функц. групп аминокислот в активном центре, **ответственных за связывание молекулы субстрата**.
- изменение конформации части или большей части молекулы фермента.

Влияние на сродство субстрата к ферменту:

- изменение ионизации молекулы субстрата

Кинетика ферментативных реакций

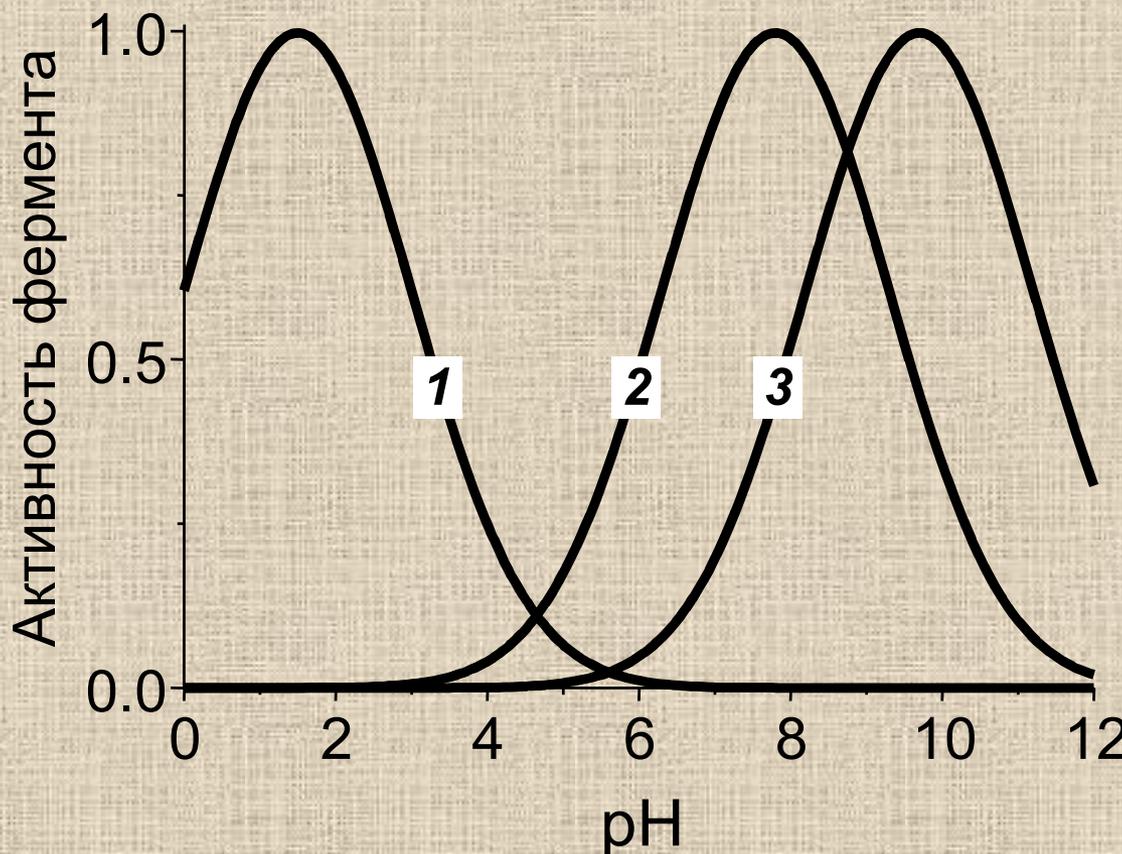
Зависимость скорости ферментативных реакций от pH

Оптимальные значения pH для некоторых ферментов

Фермент	Оптимум pH
Пепсин	1,5
Трипсин	7,7
Катал аза	7,6
Аргиназа	9,7
Фумараза	7,8
Рибонуклеаза	7,8

Кинетика ферментативных реакций

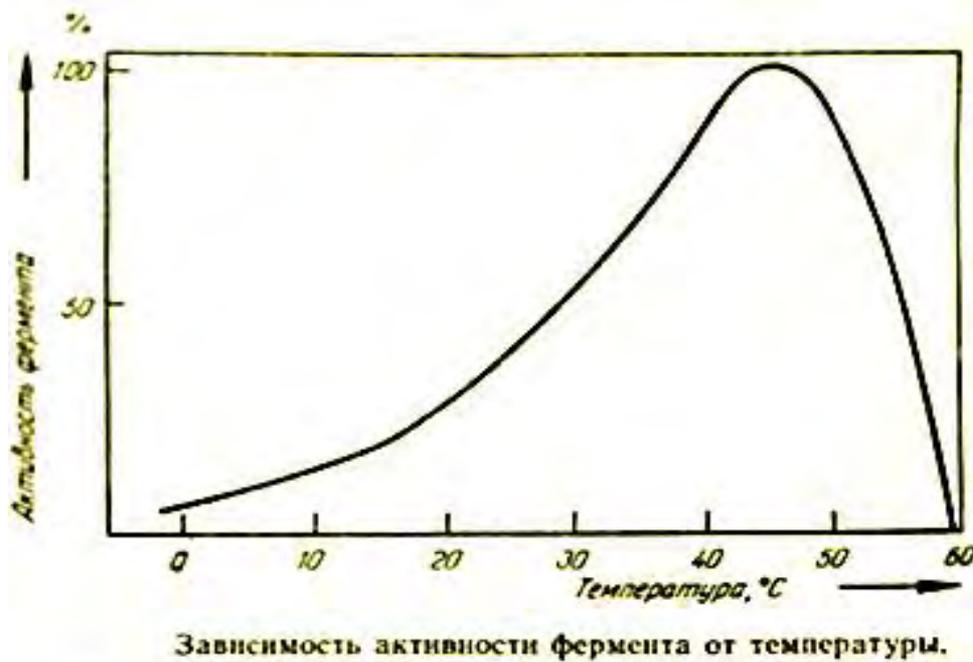
Зависимость скорости ферментативных реакций от pH



Зависимость активности ферментов (для удобства сравнения приведены активности, нормированные к единице) от pH.

1 — Пепсин,
2 — рибонуклеаза,
3 — аргиназа

Зависимость V ферментативной реакции от температуры



Исключение составляет термофильная ДНК-полимераза (Taq-полимераза).

Фермент выделен из бактерий

Thermus aquaticus.

T-оптимум для них +72° C

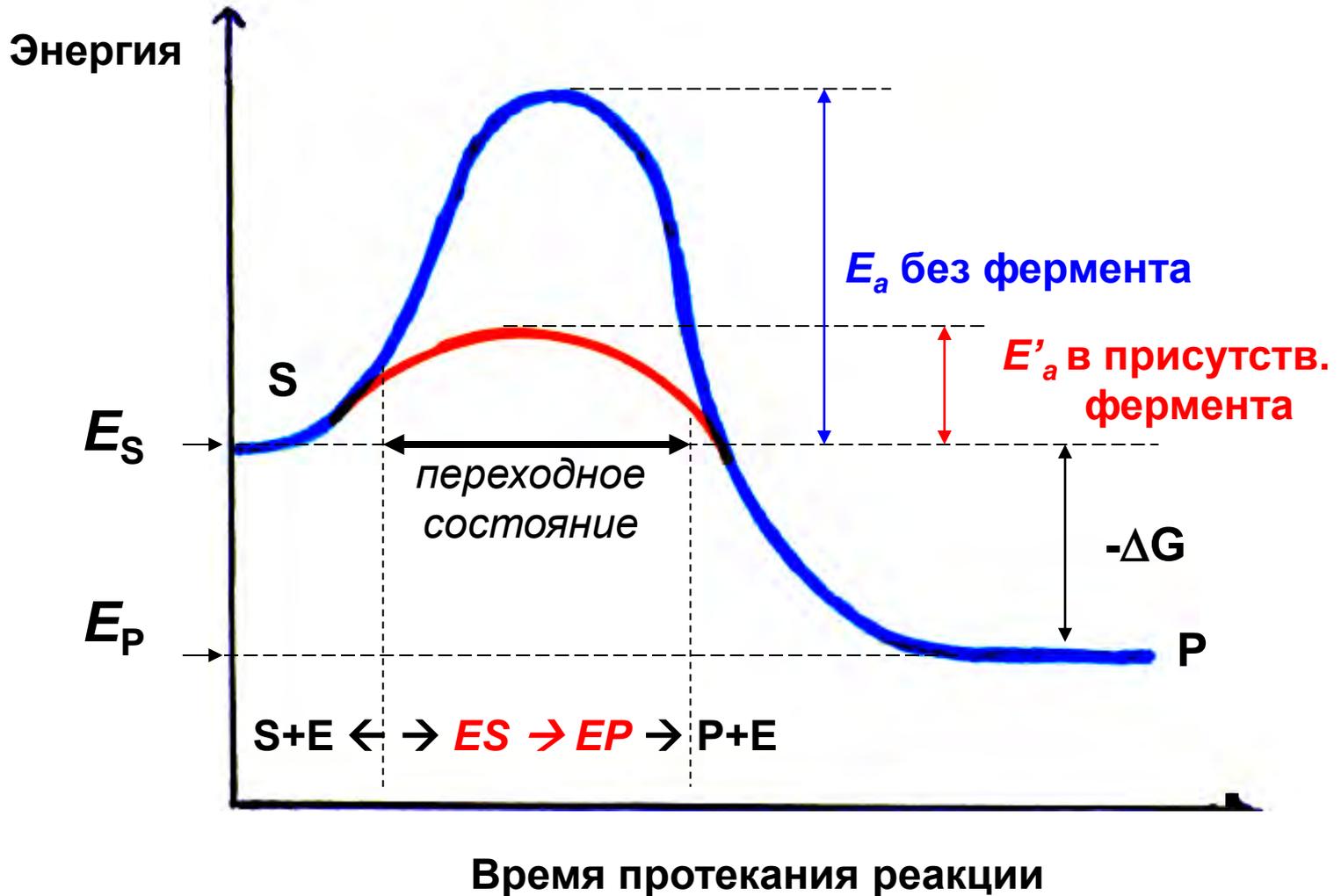
При более низкой T понижение V реакции обусловлено:

- замедлением диффузии молекул субстрата и уменьшением частоты столкновения субстрата с ферментом;
- денатурацией фермента.

При более высокой T понижение V реакции обусловлена:

- денатурацией фермента;
- разрушением фермента.

Влияние фермента на величину энергии активации, E_a



Переходное состояние и фермент-субстратный комплекс (ES)



Время существования ES совпадает с временем продолжительности переходного состояния.

Образование ES – способ уменьшения E_a , в условиях, при которых нельзя повышать T более $+37^\circ \text{C}$.

Стадия образования «первичного» ES комплекса протекает сравнительно быстро (зависит от $[S]$).

Стадия превращения «первичного» ES комплекса в «активированный» ES комплекс – *лимитирующая*. На этой стадии происходит превращение $S \rightarrow P$.

Стадия диссоциации EP-комплекса: выход P и освобождение E , протекает сравнительно быстро.

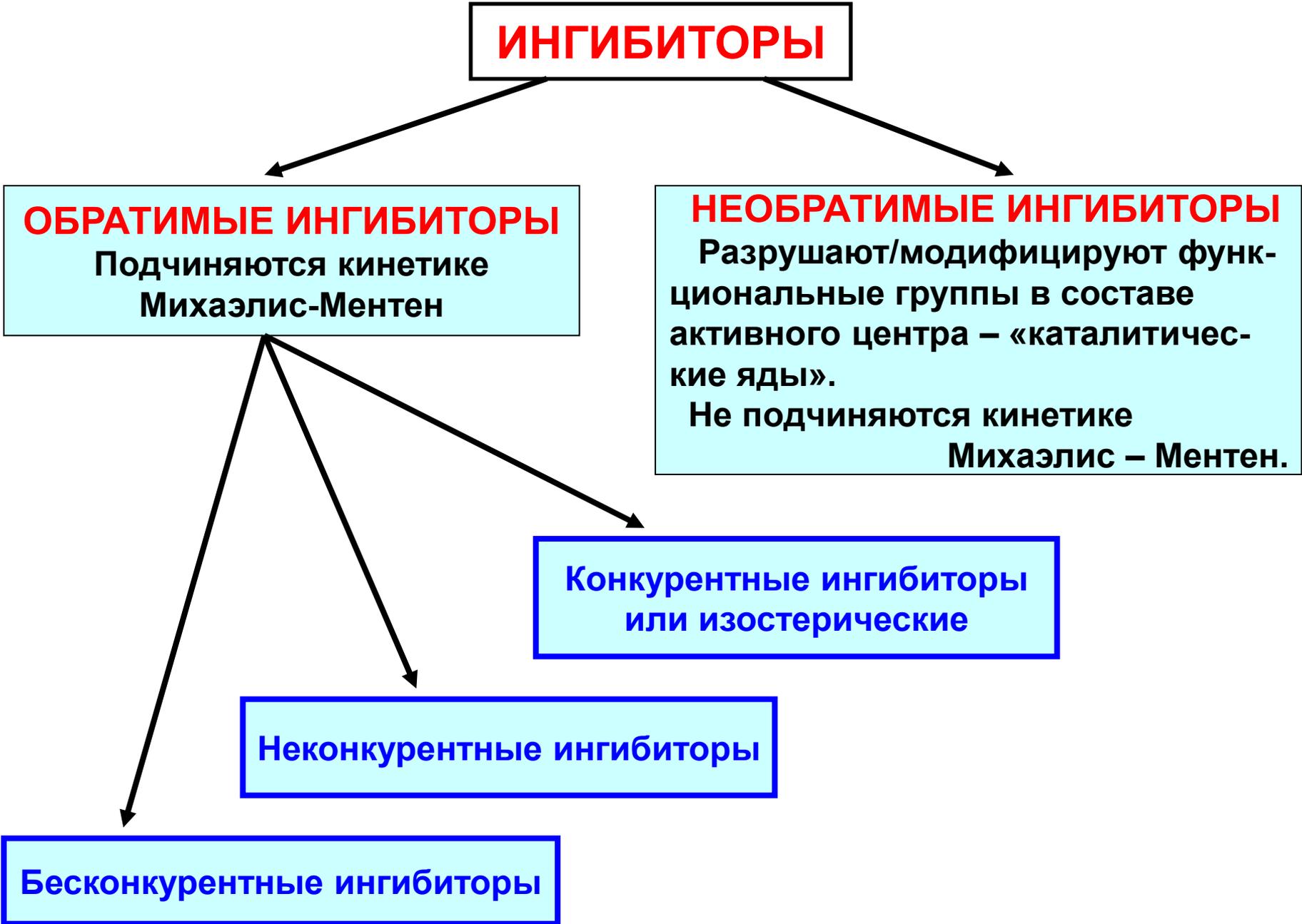
ИНГИБИРОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ

Ингибирование \neq Инактивация

Ингибитор – соединение, специфически снижающее активность Е, путём прямого или косвенного влияния на его активный центр.

Под влиянием ингибитора активность Е может существенно уменьшаться, но **никогда не становится равно нулю.**

ИНГИБИТОРЫ



```
graph TD; A[ИНГИБИТОРЫ] --> B[ОБРАТИМЫЕ ИНГИБИТОРЫ  
Подчиняются кинетике  
Михаэлис-Ментен]; A --> C[НЕОБРАТИМЫЕ ИНГИБИТОРЫ  
Разрушают/модифицируют функ-  
циональные группы в составе  
активного центра – «каталитичес-  
кие яды».  
Не подчиняются кинетике  
Михаэлис – Ментен.]; B --> D[Бесконкурентные ингибиторы]; B --> E[Неконкурентные ингибиторы]; B --> F[Конкурентные ингибиторы  
или изостерические];
```

ОБРАТИМЫЕ ИНГИБИТОРЫ

Подчиняются кинетике
Михаэлис-Ментен

НЕОБРАТИМЫЕ ИНГИБИТОРЫ

Разрушают/модифицируют функ-
циональные группы в составе
активного центра – «каталитичес-
кие яды».

Не подчиняются кинетике
Михаэлис – Ментен.

Конкурентные ингибиторы
или изостерические

Неконкурентные ингибиторы

Бесконкурентные ингибиторы

Инактиваторы – комплекс химических, биологических, физических факторов, которые способны деструктурировать молекулу фермента. **Под влиянием инактиваторов активность фермента становится равна нулю.**

- **Экстремальные температуры**
 - **жёсткое УФ излучение**
 - **УЗ высокой мощности**
 - **Экстремальные рН**
- **Протеолитические ферменты**
 - **Ионизирующая радиация**