

ФЕРМЕНТЫ

2 часть

Измерение ферментативной активности

Определение активности ферментов

осуществляется пу-

тем измерения скорости катализируемых реакций.

Скорость ферментативных реакций измеряют по убыли концентрации субстрата или увеличению концентрации продукта за единицу времени:

$v = -\Delta CS / \Delta t$, $v = \Delta CP / \Delta t$, где ΔCS – изменение молярной концентрации субстрата (моль/л), ΔCP - изменение молярной концентрации продукта реакции (моль/л),

Δt - изменение времени (мин, с).

Кинетические исследования желательно проводить при насыщающей концентрации субстрата, в

Единицы активности ферментов:

Международная единица фермента (U) - это такое **ко-**

личество фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата за 1 минуту при температуре 25°C и оптимальном pH среды.

В системе СИ единицей фермента является **катал (кат)** –

это такое **количество фермента, которое катализирует превращение одного моль субстрата за 1 секунду.** Нетрудно подсчитать, что:
$$1 \text{ U} = (1 \cdot 10^{-6} \text{ M}) / 60 \text{ с} = 1,67 \cdot 10^{-8} \text{ M с}^{-1} = 1,67 \cdot 10^{-8} \text{ кат} = 16,7 \text{ нкат}.$$

Часто определяют **удельную активность** препаратов

Для оценки активности высокоочищенных, гомогенных препаратов ферментов *делением числа международных единиц (U) фермента в образце на количество вещества фермента (мкмоль) в этом образце рассчитывают молярную активность* (число оборотов). По физическому смыслу **молярная активность - это число молекул субстрата, подвергающихся превращению на одной молекуле фермента за 1 минуту или за 1 секунду.**

Например: для уреазы молярная активность составляет 30000, трипсина - 102, глюкоксидазы - 17000 циклов в секунду

Ингибирование ферментов

Все типы ингибирования ферментов можно разделить на две большие группы:

необратимое и обратимое ингибирование.

Необратимые ингибиторы *прочно связываются с молекулой фермента, и после удаления ингибитора (например, с помощью диализа), активность фермента не восстанавливается*

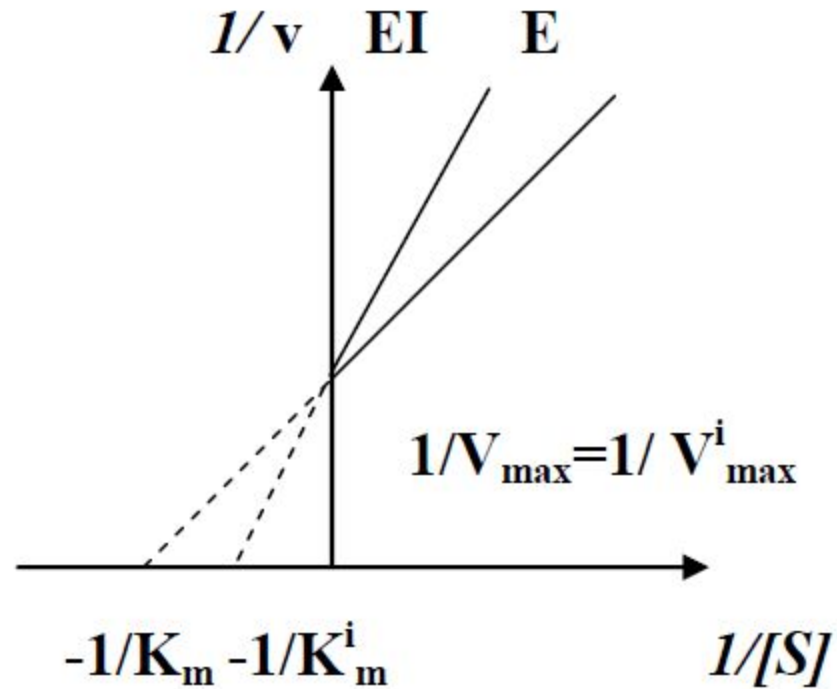
Например: цианиды и ионы тяжелых металлов, например, ртути, кадмия, меди, свинца, связывающиеся с *карбоксильными и сульфгидрильными (-SH) группами в белках.*

Обратимые ингибиторы *отделяются от комп-лекса фермента с ингибитором при понижении их концентрации, и фермент восстанавливает свою каталитическую активность.*

Конкурентные ингибиторы являются структур-ными аналогами субстрата и **связываются в активном центре фермента, конкурируя с субстратом за место связывания.**

Они вызывают **увеличение константы Михаэлиса, но не влияют на максимальную скорость реакции**

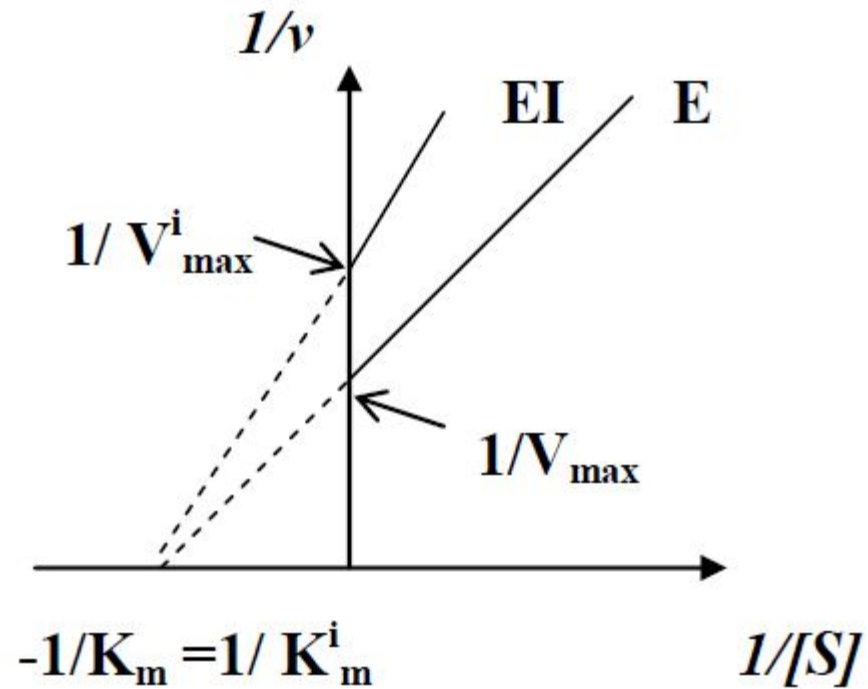
Конкурентные ингибиторы



Неконкурентное ингибирование наблюдается, если **ингибитор связывается вне активного центра**. К неконкурентным ингибиторам относятся, например, тиоловые яды.

Неконкурентные ингибиторы не влияют на константу Михаэлиса, но уменьшают максимальную скорость ферментативной реакции.

Неконкурентное ингибирование

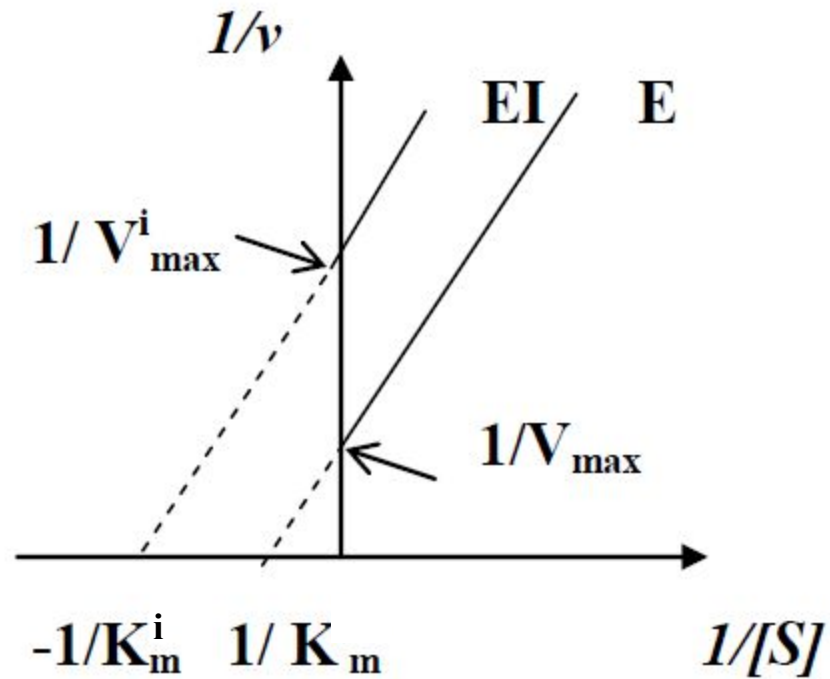


Бесконкурентное ингибирование -

*ингибитор связывается только с фермент-субстратным комплексом, но не со свободным ферментом, изменяя его конформацию, что затрудняет катализ. Это связывание происходит **вне** активного центра фермента. **Повышение концентрации субстрата увеличивает ингибирование фермента.***

Максимальная скорость реакции и константа Михаэлиса уменьшаются в одинаковое количество раз и на графике в двойных обратных координатах наблюдаются

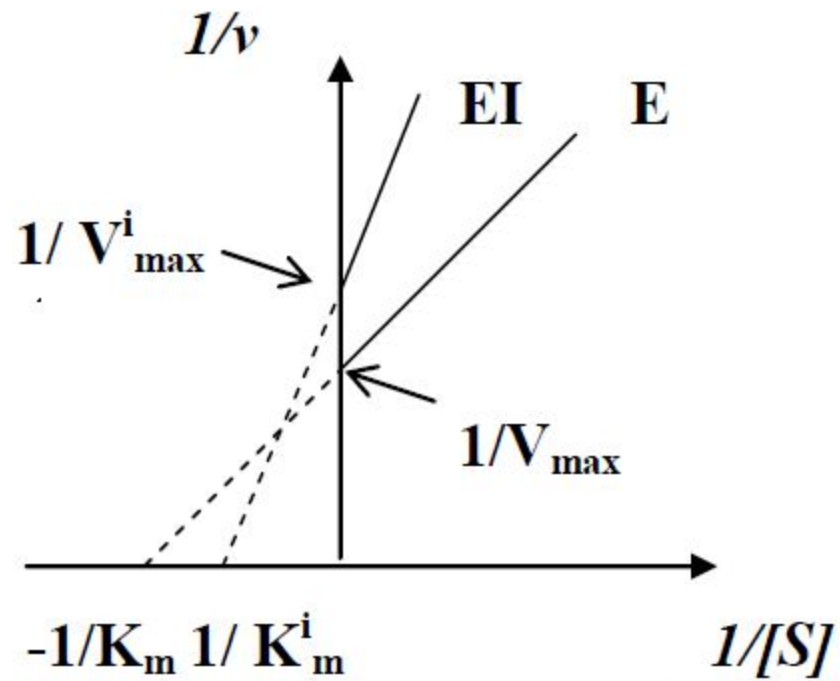
Бесконкурентное ингибирование



Смешанное ингибирование встречается, если *ингибитор связывается как в активном центре, так и вне его, а комплекс E_i сохраняет частичную активность по сравнению с нативным ферментом.*

Такие ингибиторы **увеличивают константу Михаэлиса и уменьшают максимальную скорость ферментативной реакции.**

Смешанное ингибирование

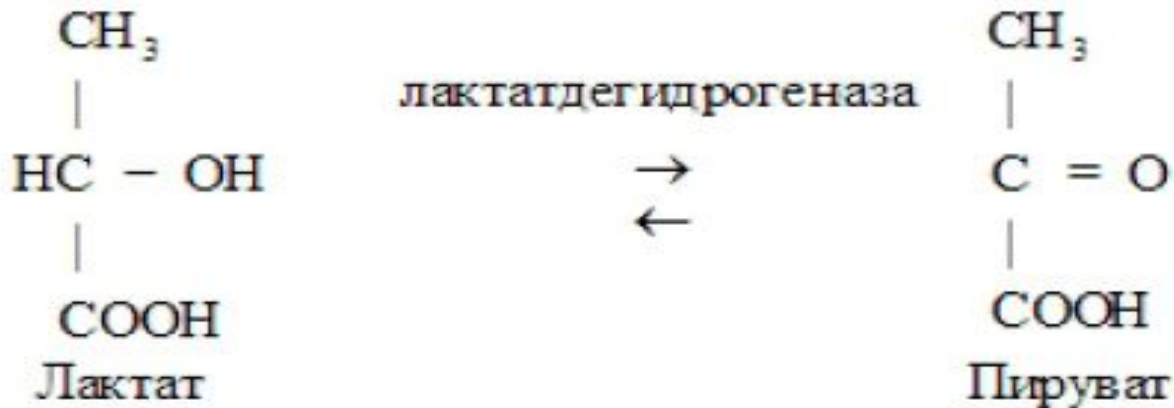


Классификация ферментов

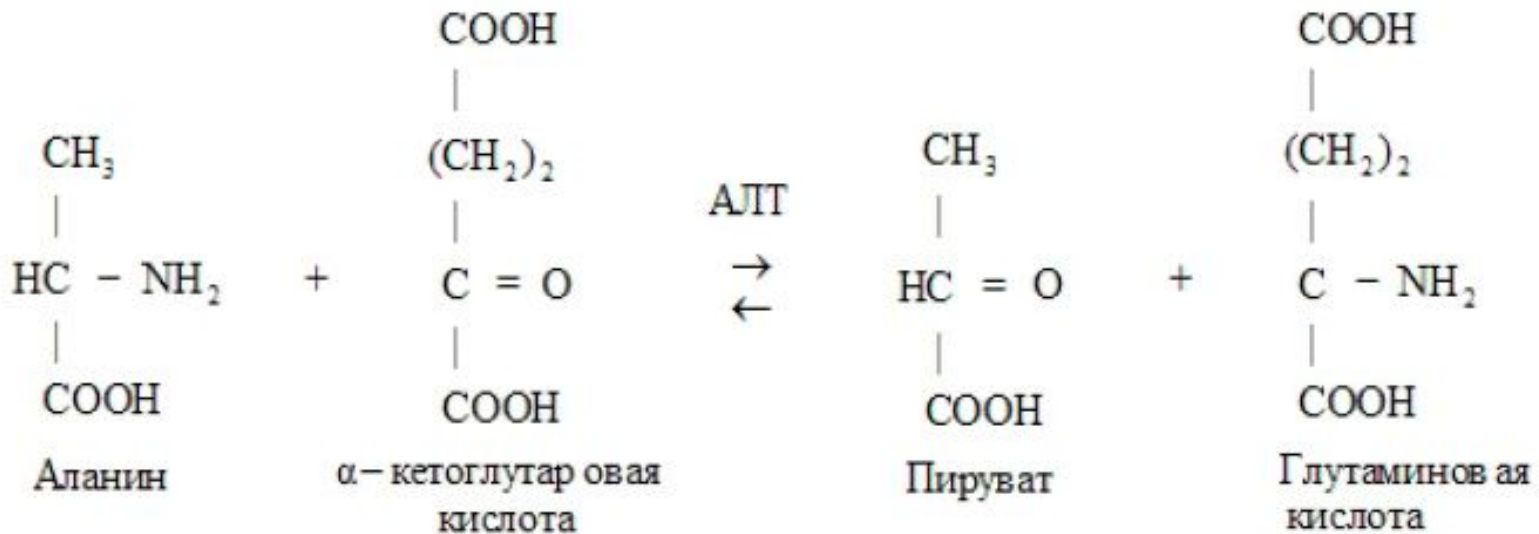
В основе современной классификации ферментов лежит их **разделение на шесть классов в зависимости от типа катализируемой реакции:**

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

Оксидоредуктазы катализируют *окислительно-восстановительные реакции.*



Трансферазы катализируют *реакции межмолекулярного переноса различных групп атомов*



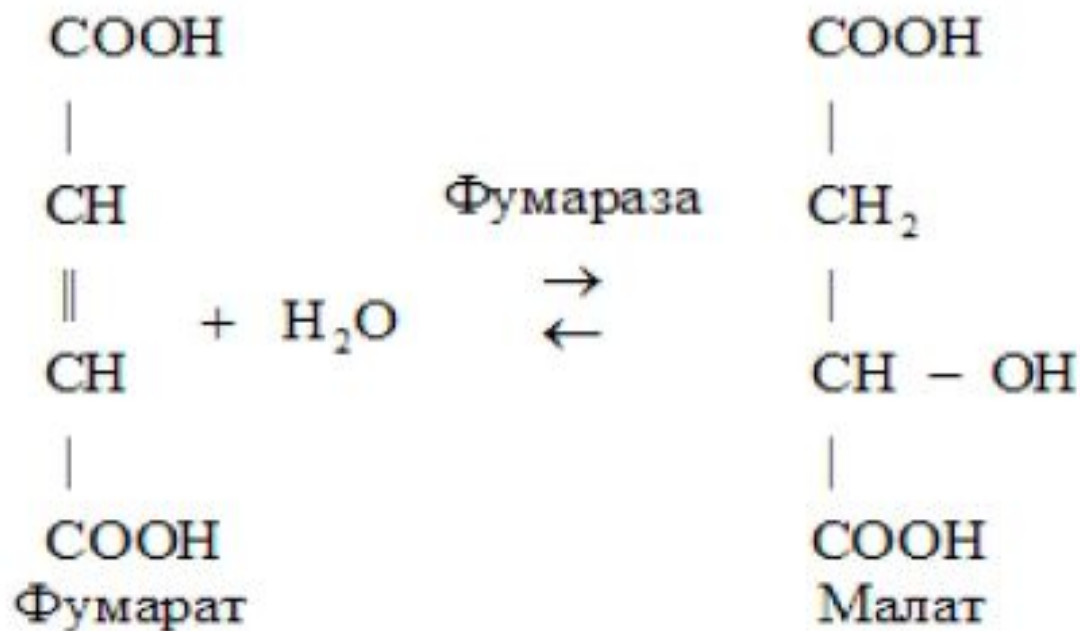
Например: перенос альфа-аминогруппы аминокислот на место альфа-кетогруппы в кетокислотах аминотрансферазами (АЛТ – аланинаминотрансферазой)

Гидролазы катализируют *расщепление внутримолекулярных связей с присоединением воды по разорванной связи:*

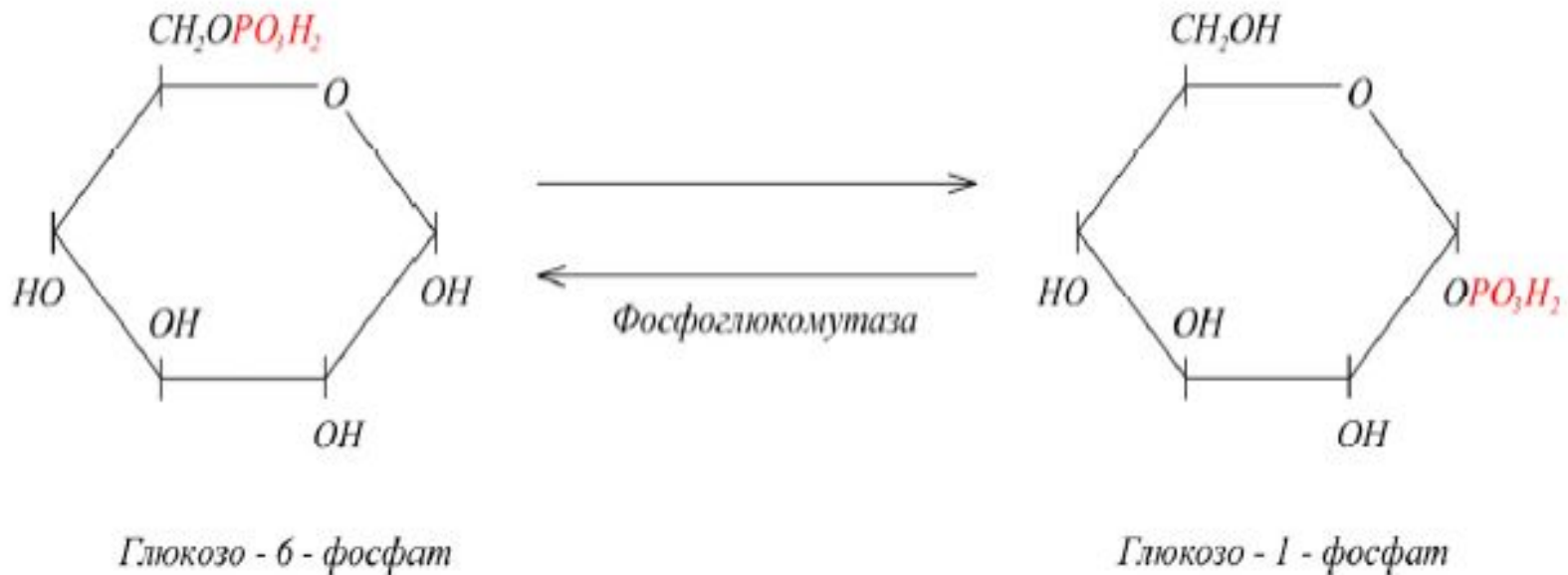
$A-B + H_2O \rightarrow A-H + B-OH$, где A-B – субстрат

В качестве примеров гидролаз можно привести **протеиназы**, катализирующие расщепление белков и пептидов; **эстеразы**, гидролизующие сложноэфирные связи, **гликозидазы**, разрывающие гликозидные связи с присоединением воды. Все **пищеварительные ферменты** относятся к классу гидролаз (некоторые из них: пепсин, трипсин, химотрипсин, амилаза, липаза, рибонуклеаза).

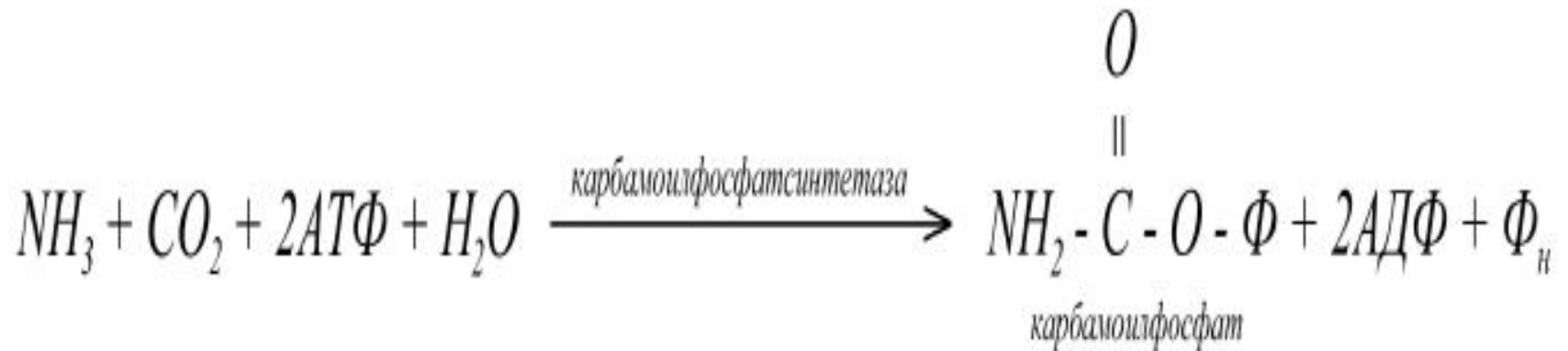
Лиазы катализируют *разрыв и синтез связей С-О, С-Н, С-С*, а также обратимые реакции *отщепления групп с образованием двойной связи*.



Изомеразы. К классу изомераз относят ферменты, катализирующие *обратимые взаимопревращения* изомеров:



Лигаза (синтетаза) катализируют *реакции синтеза различных веществ с использованием энергии АТФ или других макроэнергических молекул*. В качестве примера можно привести синтез карбамоилфосфата:



На основании приведенной системы классификации ферментов (КФ) был издан **список ферментов, где каждому ферменту присвоен четырехзначный номер (номенклатура ферментов)**.

Первая цифра номера указывает на принадлежность фермента к одному из шести классов.

В пределах классов ферменты группируются в подклассы и подподклассы в соответствии с особенностями катализируемых реакций, *четвертое число — порядковый номер фермента в его подподклассе.*

Например, **кислая фосфатаза** имеет шифр **3.1.3.2**; это означает, что она относится к **классу гидролаз (3.)**, подклассу этих ферментов, действующих на **сложноэфирные связи (3.1.)**, к подподклассу ферментов, **гидролизующих моноэфиры фосфорной кислоты (3.1.3.)**, а **порядковый номер фермента в данном подподклассе — 2 (3.1.3.2)**.

Типы регуляции ферментативной активности без изменения количества молекул фермента

Влияние концентрации субстрата

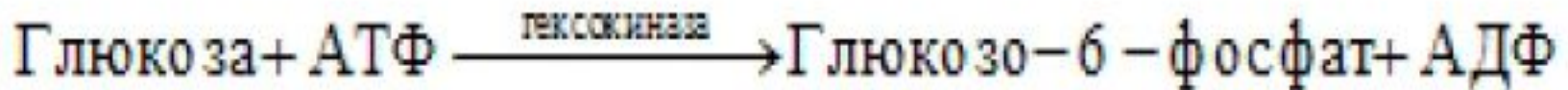
Скорость ферментативной реакции

возрастает с увеличением

концентрации субстрата согласно уравнению Михаэлиса-Ментен.

Рост концентрации субстрата в клетке может быть результатом интенсификации его синтеза, увеличения внеклеточных концентраций или действия регулируемых мембранных белков-переносчиков.

Иногда **субстрат может выступать в роли аллостерического активатора фермента**. В этом случае зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата **не подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен**, а график этой зависимости представляет S-образную кривую. Примером аллостерической активации субстратом является влияние глюкозы на активность гексокиназы:



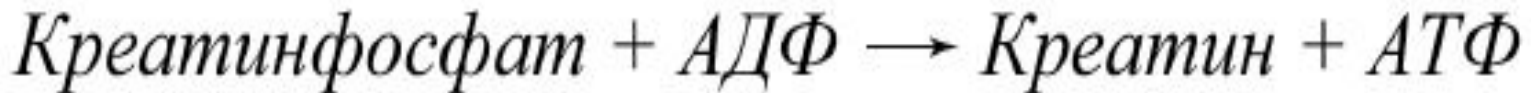
Влияние концентрации кофермента, кофакторов

Скорость ферментативной реакции прямо пропорциональна концентрации фермента. Однако, могут наблюдаться ***ситуации, когда ферменты не имеют возможности полностью проявлять свою активность.***

Например, если в организме ***не хватает витаминов***, то не синтезируется достаточное количество коферментов, тогда будет наблюдаться заниженная ферментативная активность. Такая же ситуация может иметь место при ***недостаточности ферментов синтеза коферментов из витаминов.***

Важно помнить также, что для проявления активности многих ферментов ***необходимо***

Влияние pH В ряде ситуаций значение **pH** в клетке изменяется весьма существенно. Например, в мышечных клетках **при физической работе** происходит расщепление АТФ до АДФ (или АМФ), высвобождается фосфорная кислота и **накапливается лактат. В результате накопления лактата pH понижается до 5,0**, и в этих условиях фермент креатинкиназа **начинает катализировать синтез АТФ**, необходимого клетке

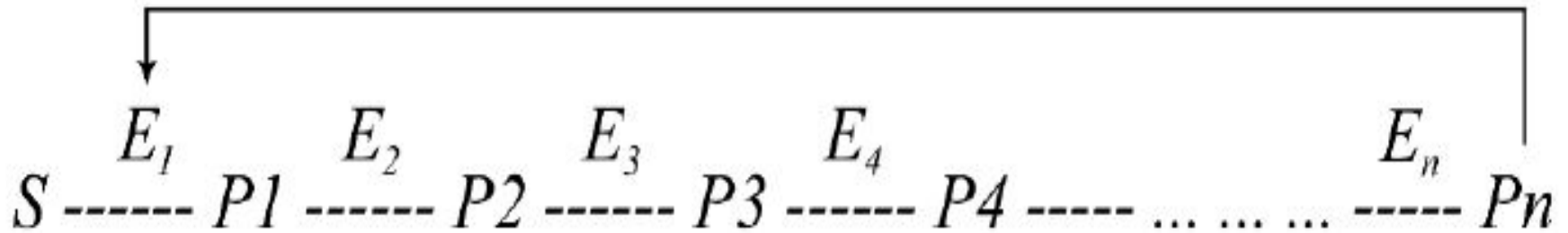


В **состоянии покоя pH внутри клеток повышается до 9,0** и реакция протекает в **противоположном направлении, приводя к накоплению креатинфосфата.**

Изменение концентрации ингибиторов и активаторов

Иногда в клетке резко изменяются концентрации тех или иных метаболитов, которые могут выступать в роли аллостерических эффекторов. В качестве активаторов фермента, как было сказано выше, часто выступают молекулы субстрата. **Для многих процессов, включающих последовательные ферментативные реакции, характерным является так называемое ингибирование по типу обратной связи или ретроингибирование, заключающееся в торможении одного из первых ферментов конечным продуктом цепи превращений.**

Ретроингибирование позволяет затормозить процесс в самом начале, если синтезируемый продукт имеется в достаточном количестве:



Часто такое ингибирование происходит по аллостерическому механизму. Пример ретроингибирования – синтез гема. Первую, *ключевую реакцию синтеза гема катализирует фермент аминолевулинатсинтаза, аллостерическим ингибитором которого является сам гем.*

