



# Кафедра биологической химии Астраханского ГМУ

---

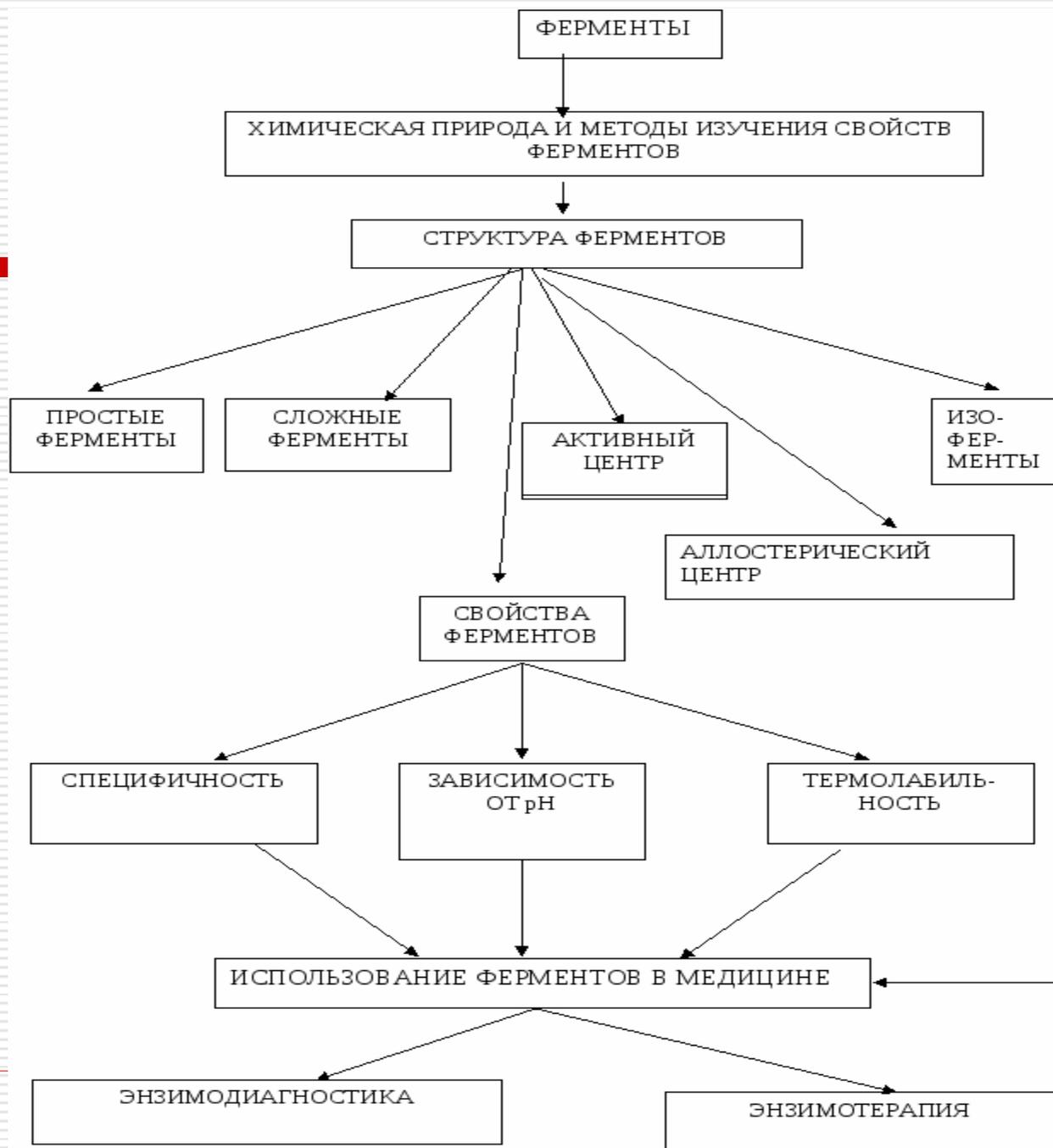
## Курс лекций по биологической химии

### Раздел 2. ФЕРМЕНТЫ

2020

---

Профессор Д.М. Никулина



## Раздел 2. ФЕРМЕНТЫ

---

### Лекция 1.

- ❑ Номенклатура
  - ❑ Строение: апофермент, кофермент, холофермент
  - ❑ Изоферменты, изоформы
  - ❑ Структура и функция
-

# ВВЕДЕНИЕ

---

- ● Живые организмы имеют огромное число разнообразных биохимических реакций.
  - ● Эти реакции проходят в "мягких" условиях ( $t$ ,  $H_2O$ , малая энергия), при которых, как правило, реакции невозможны или протекают медленно.
  - ● В организме реакции возможны потому, что их катализируют биологические макромолекулы – белки с особой функцией: ферменты.
-

# История изучения

---

- Термин «**фермент**», начало XVII века (1600), Ван Гельмонт сравнил процесс пищеварения с процессом брожения (*fermentatio* – брожение, лат.)
- Л. Спаланцани, 1783 г., опыт с кусочком мяса в металлич. сеточке. В желудке мясо растворилось.
- 1814 г., К.С. Кирхгоф, водная вытяжка солода при обычной  $t$  расщепляла крахмал до сахара и декстринов.
- В XIX в. Луи Пастер при изучении превращения углеводов в этиловый спирт под действием дрожжей, пришел к выводу, что этот процесс (брожение) катализируется некой жизненной силой, находящейся в дрожжевых клетках. Более ста лет назад термины фермент и энзим отражали различные точки зрения в теоретическом споре Л.Пастера с одной стороны, и М. Бертло и Ю. Либиха с другой, о природе спиртового брожения.

# История изучения

---

- Собственно ферментами (от лат. fermentum закваска) называли «организованные ферменты» (то есть сами живые микроорганизмы),
  - а термин **«ЭНЗИМ»** предложен в 1876 году В. Кюне для «неорганизованных ферментов», секретлируемых клетками, например, в желудок (пепсин) или кишечник (трипсин, амилаза).
  - Через два года после смерти Л. Пастера в 1897 году Э. Бухнер опубликовал работу «Спиртовое брожение без дрожжевых клеток», в которой экспериментально показал, что бесклеточный дрожжевой сок осуществляет спиртовое брожение так же, как и неразрушенные дрожжевые клетки. В 1907 году за эту работу он был удостоен Нобелевской премии.
-

# **Ферменты – самая большая функциональная группа белков**

---

- Фермент играет роль биологического катализатора (биокатализатора), который облегчает биохимические реакции и не входит в конечные продукты.**
  - Он способен понижать энергию активации реакции и, таким образом, ускорять ее. Из миллионов биохимических реакций формируется сбалансированный обмен веществ (метаболизм).**
  - Ферменты действуют при низких концентрациях и остаются неизмененными в конце реакции.**
-

# Некоторые интересные сведения

---

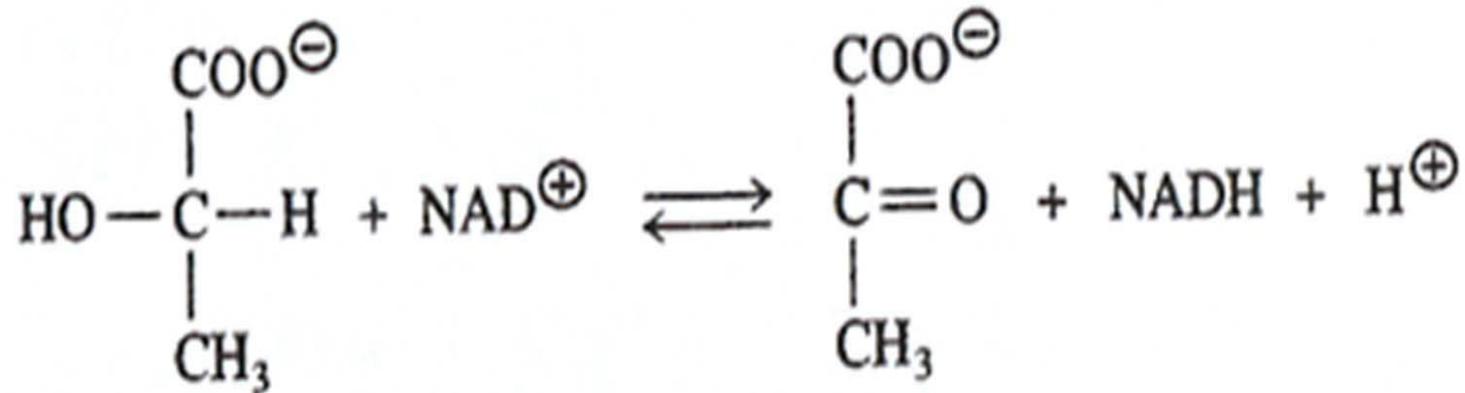
- Фермент, как и любой белок, синтезируется живыми клетками по информации, закодированной в ДНК (или РНК у вирусов).
  - В 2012 году в базе данных Mascie на сайте Института европейских биоинформатики в Великобритании уже были указаны аминокислотные последовательности 4585 различных ферментов.
-

# Классы Ферментов по катализируемой реакции

## 1) Оксидоредуктазы:

– дегидрогеназы, оксидазы, пероксидазы, оксигеназы, редуктазы

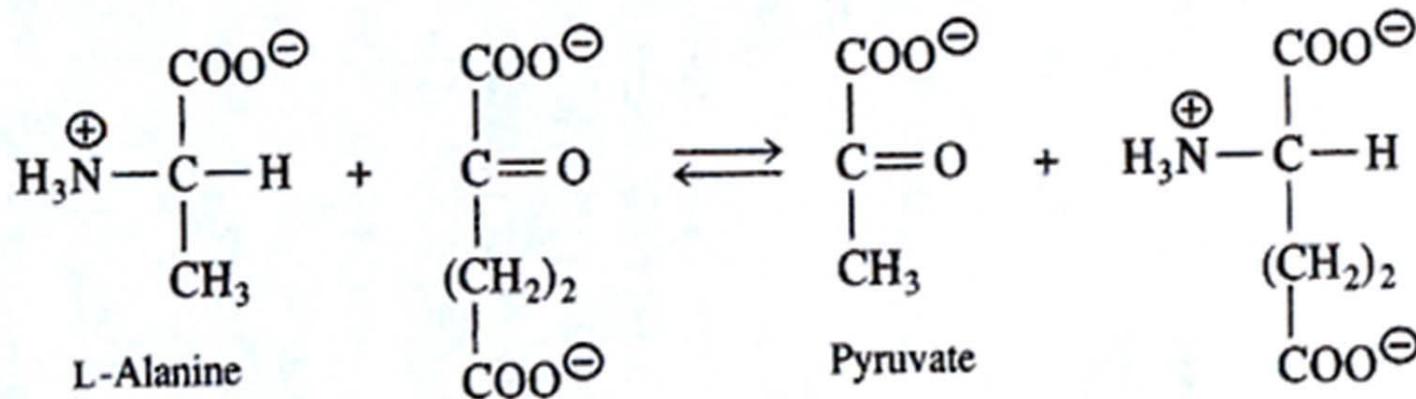
Лактатдегидрогеназа: окисление лактата (мол. К-ты) в пируват(пиров. К-та)



## (2) Трансферазы: осуществляют реакции переноса групп

- Аланинаминотрансфераза (трансаминазы) : переносит аминогруппу

Коэнзим (кофермент) : пиридоксальфосфат (производное витамина B6)

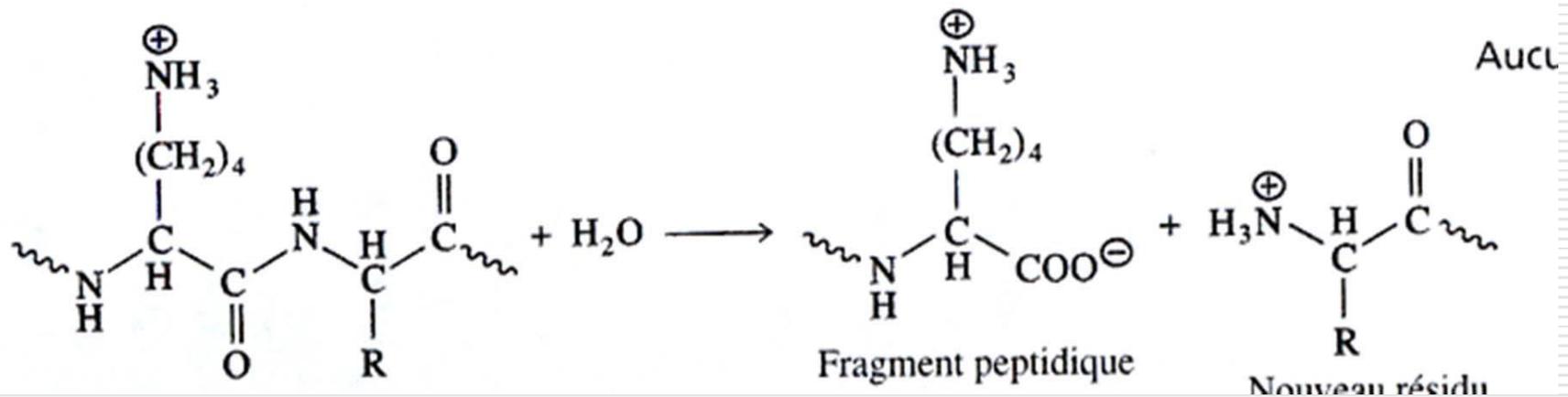


## (3) Гидролазы: реакции гидролиза

Класс особых трансфераз, Вода содержит переносимую группу

Протеазы: трипсингидролаза действует на пепт. связь между Lys-x, или Arg-x, или x=Pro

Без кофермента, иногда кофактором явл-ся ион металла



## **(4) Лиазы: реакции негидролитического или неокислительного лизиса**

---



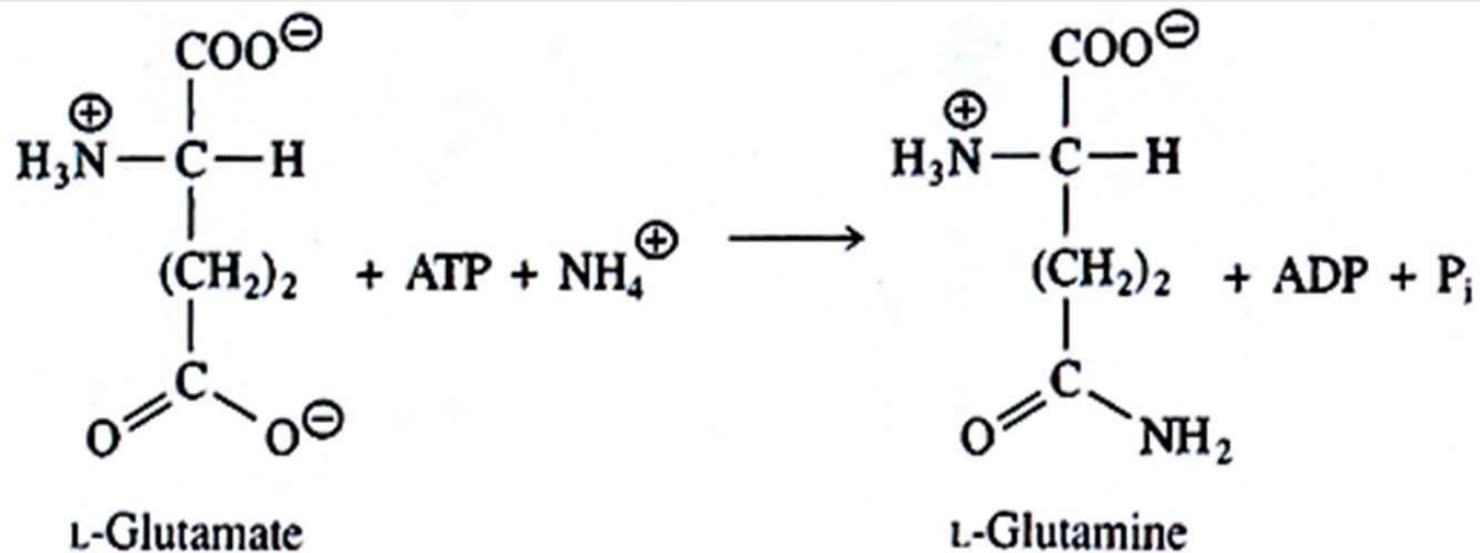
- **(5) Изомеразы : реакции  
изомеризации**

**Простая формула: один  
субстрат – один продукт**

---

## (6) Лигаза (синтетаза) : соединение двух субстратов с использованием энергии АТФ

### Глутаминсинтетаза: АТФ-зависимый синтез L-глутамина



# Номенклатура

---

- **Оксидоредуктазы**
  - **ЕС1.1,....**
  - **ЕС 2 Трансферазы**
  - **ЕС 3 Гидролазы**
  - **ЕС 3.1** Acting on ester bonds
  - **ЕС 3.2** Glycosylases
  - **ЕС 3.3** Acting on ether bonds
  - **ЕС 3.4** Acting on peptide bonds (peptidases)
  - **ЕС 3.4.1**
  - ....
  - **ЕС 3.4.21** Serine endopeptidases
  - **ЕС 3.4.21.1** chymotrypsin
-

# Номенклатура

---

- .....
  - **ЕС 3.5** Acting on carbon-nitrogen bonds, other than peptide bonds
  - **ЕС 3.6** Acting on acid anhydrides
  - **ЕС 3.7** Acting on carbon-carbon bonds
  - ....
  - **ЕС 4** Лиазы
  - **ЕС 5** Изомеразы
  - **ЕС 6** Лигазаы
  -
-

# Строение ферментов

---

## ФЕРМЕНТЫ

- ❑ Простые состоят из аминокислот
  - ❑ Сложные (**холофермент**) – кроме белковой части (**апофермент**) содержат небелковый компонент (**кофактор**).
-

# Апофермент, кофермент, холофермент, etc.

---

Ферменты часто состоят только из аминокислот. Многие из них имеют дополнительные химические компоненты, называемые кофакторами.

Кофакторы могут быть неорганическими, например, ионы  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  или  $\text{Mg}^{2+}$  частые кофакторы.

Они также могут быть органической природы, такими как биотин или кофермент А.

Если кофактор является сложной органической молекулой, он называется **коферментом**.

Большинство витаминов являются кофакторами фермента.

# Апофермент, кофермент, холофермент, etc.

---

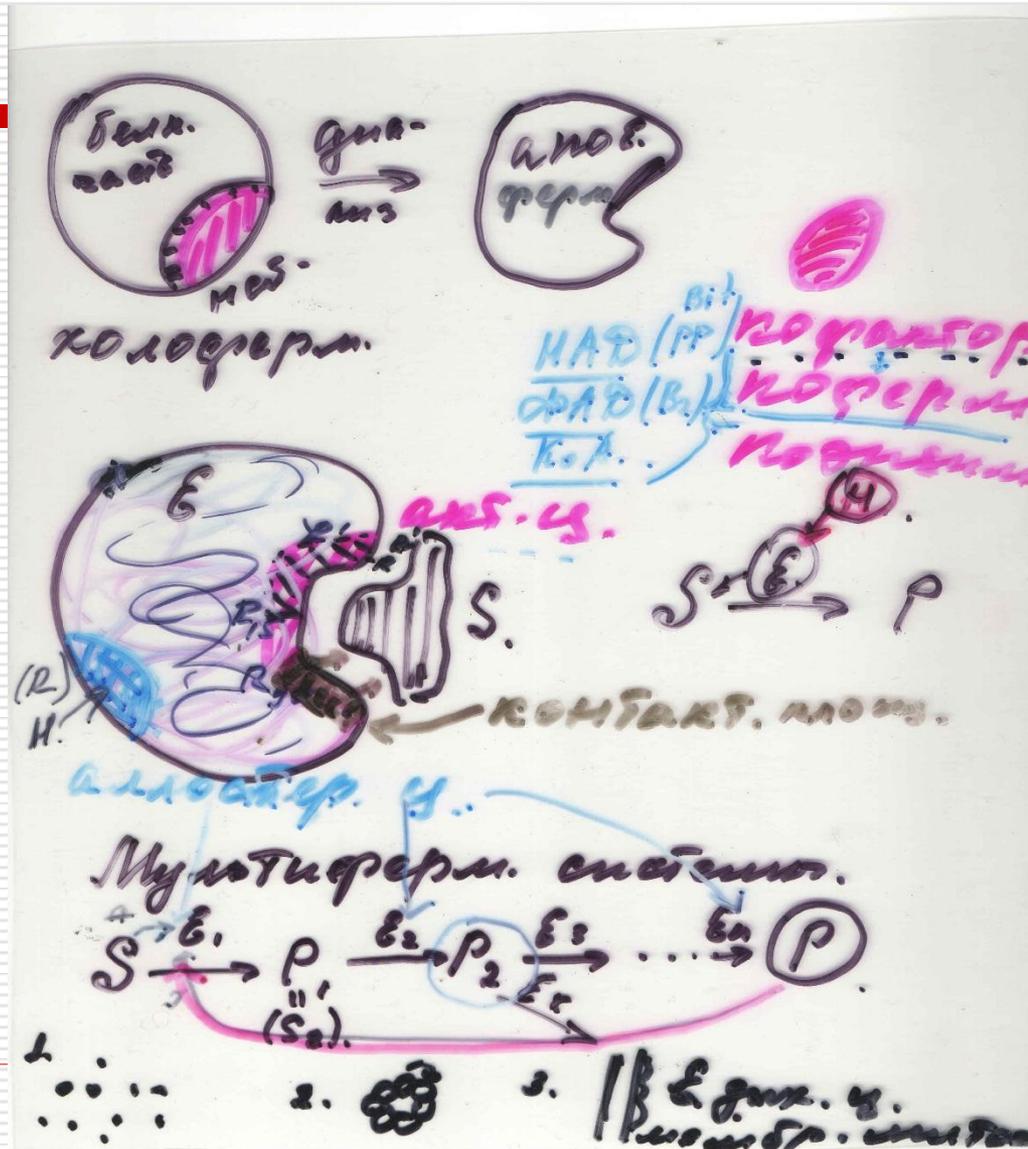
Белковая часть фермента называется **апоферментом**, небелковая – **кофактором** объединение апофермента и кофермента является холоферментом (сложный белок).

Кофактор, малый как ион или комплексный как кофермент, может быть присоединен к апоферменту временно или он может быть ковалентно связан с ним, тогда это **простетическая группа**.

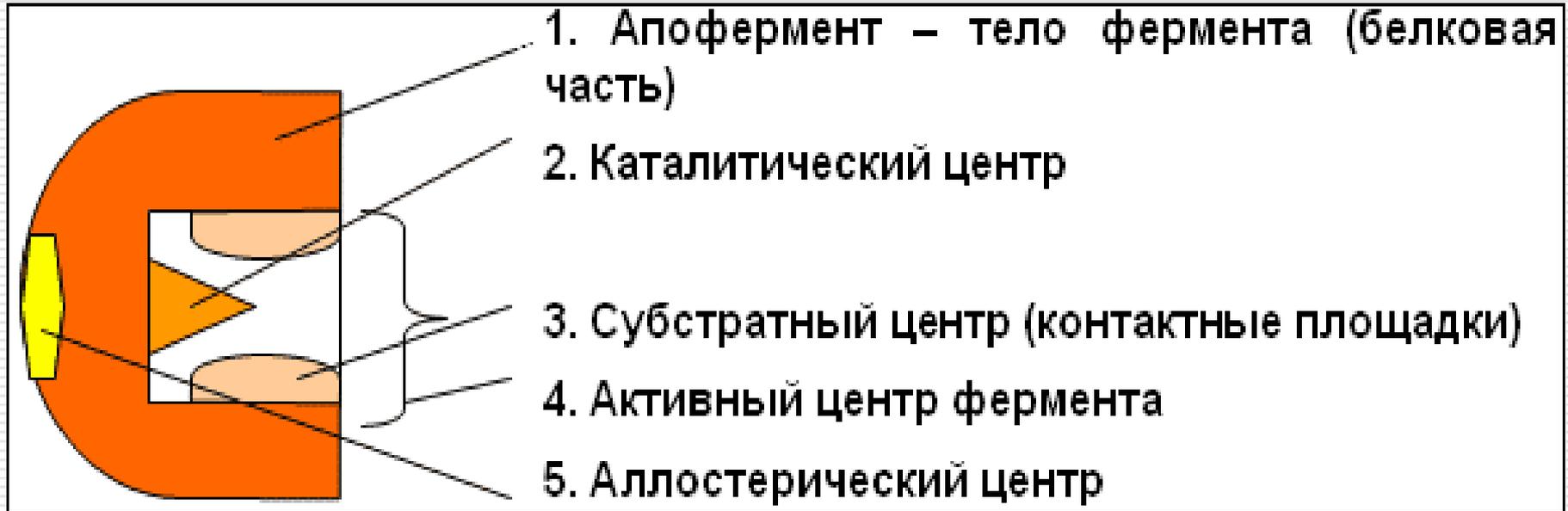
Наконец, фермент, который синтезируется в неактивной форме, должен быть активирован путем частичного протеолиза (профермент, зимоген).

---

# Структура ферментов



# Структура ферментов



**Аллостерические ферменты – полимерные белки, в которых активный и регуляторный центры находятся в разных субъединицах.**

---

# Структура активного центра фермента

---



# Активный центр фермента



# **Роль коферментов в формировании активного центра**

---

- в состав активного центра ферментов, как правило, входят кофакторы, которые имеют важное значение для протекания реакции**
  - кофакторами часто являются витамины**
  - поэтому качество продуктов питания играет огромную роль в поддержании здоровья: недостатки витаминов вызывают заболевания**
-

# Основные коферменты

---

## Кофактор/Коэнзим

- Тиаминпирофосфат
- Флавинадениндинуклеотид
- Никотинамидадениндинуклеотид
- Коэнзим А (CoA)

и другие

## Энзим

Пируватдегидрогеназа

Моноаминоксидаза

Лактатдегидрогеназа

Ацетил-CoA карбоксилаза

---

# Основные кофакторами ферментов

---

## **Metal**

**Zn<sup>2+</sup>**

**Zn<sup>2+</sup>**

**Mg<sup>2+</sup>**

**Mg<sup>2+</sup>**

**Ni<sup>2+</sup>**

**Mo**

**Se**

**Mn**

**K<sup>+</sup>**

**Carbonic anhydrase**

**Carboxypeptidase**

***EcoRV***

**Hexokinase**

**Urease**

**Nitrate reductase**

**Glutathione peroxidase**

**Superoxide dismutase**

**Propionyl CoA carboxylase**

# Изоферменты, изоформы

---

## □ ● **Изоферменты**

– состоят из разных генов,

– «ЛДГ»

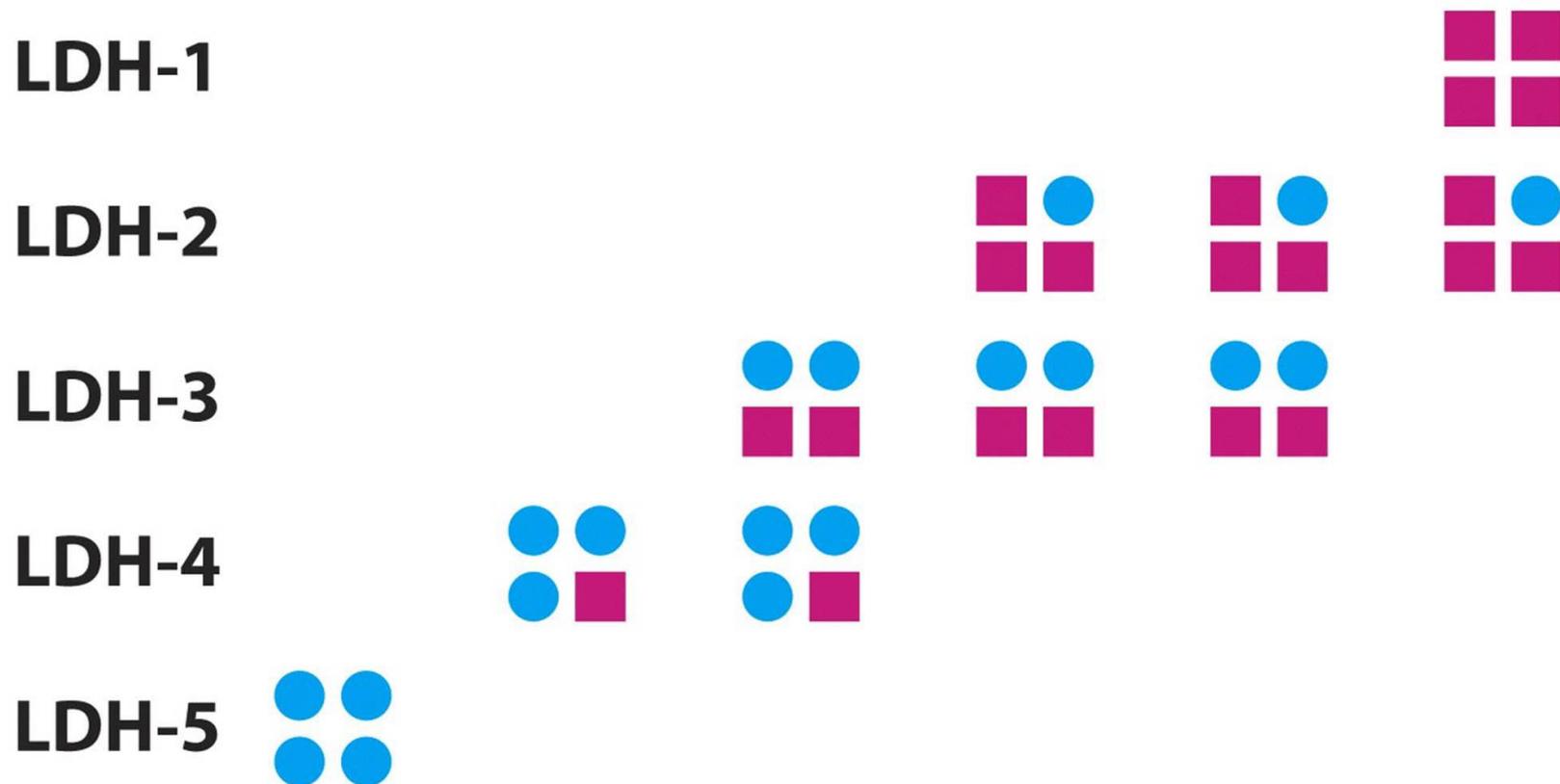
## □ ● **Изоформы ферментов : модификации одного гена**

□ ● **Изоферменты или изоформы присутствуют в различных клетках; тканях**

□ ● **Катализируют одну и ту же реакцию**

---

# Изоэнзим (изофермент) : лактатдегидрогеназа



# Изоэнзим (изофермент): лактатдегидрогеназа

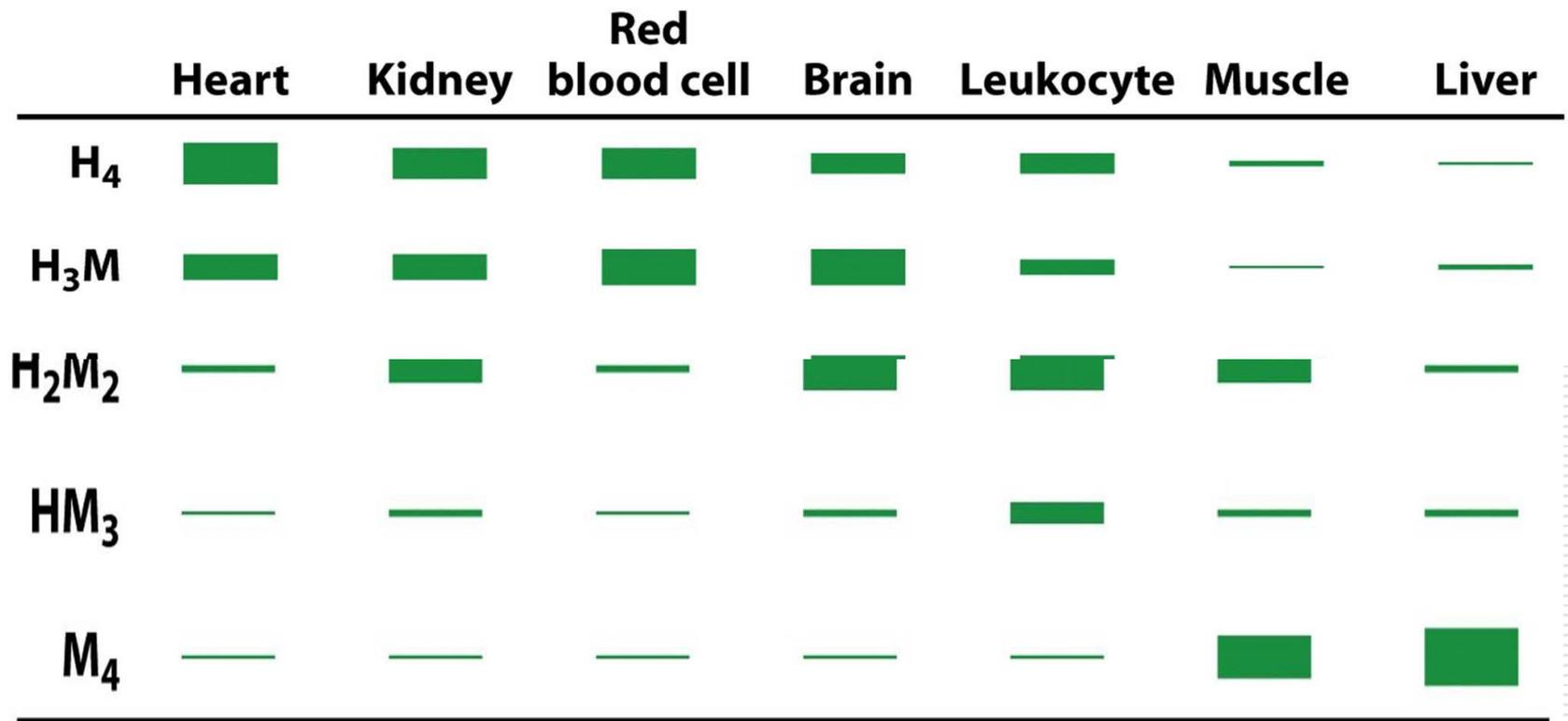


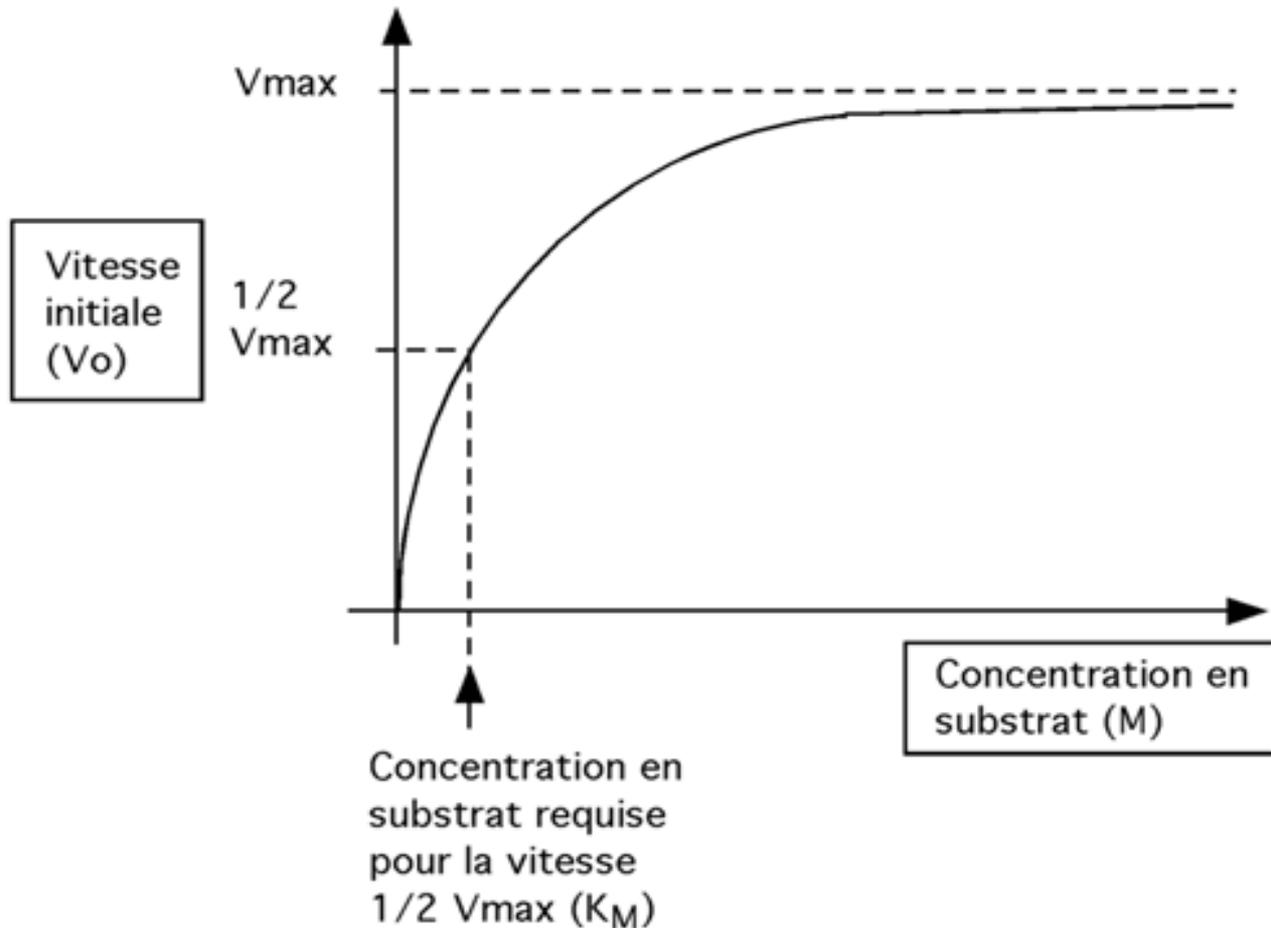
Figure 10-16b  
*Biochemistry, Sixth Edition*  
© 2007 W. H. Freeman and Company

# Факторы, влияющие на скорость реакции

---

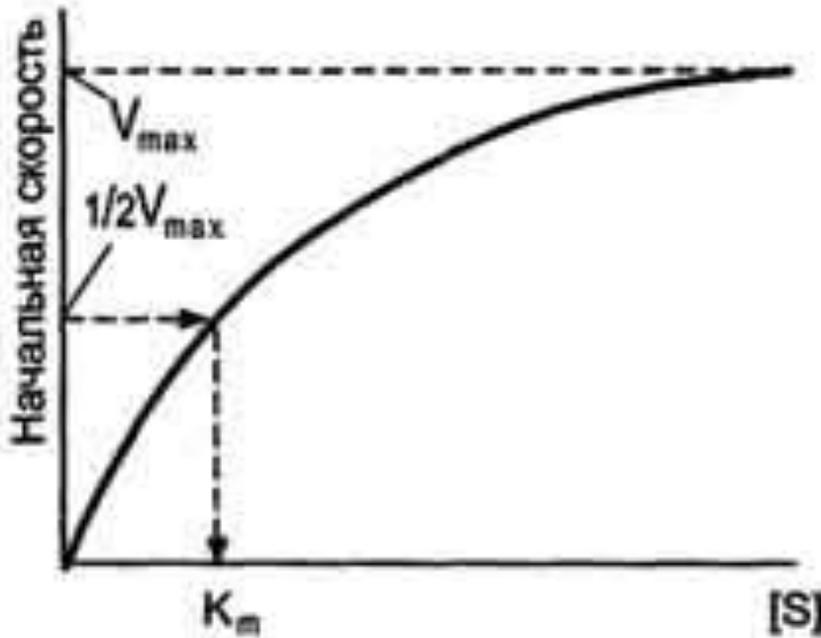
- температура
  - концентрация взаимодействующих веществ
  - присутствии катализаторов
  - свойства раствора
-

# Кинетика ферментативной реакции



**Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата выражается следующим уравнением:**

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



Это уравнение получило название уравнения Михаэлиса-Ментен. В случае, когда скорость реакции равна половине максимальной,  $K_m = [S]$ . Т.е., константа Михаэлиса численно равна концентрации субстрата, при которой достигается половина максимальной скорости.

# Температура

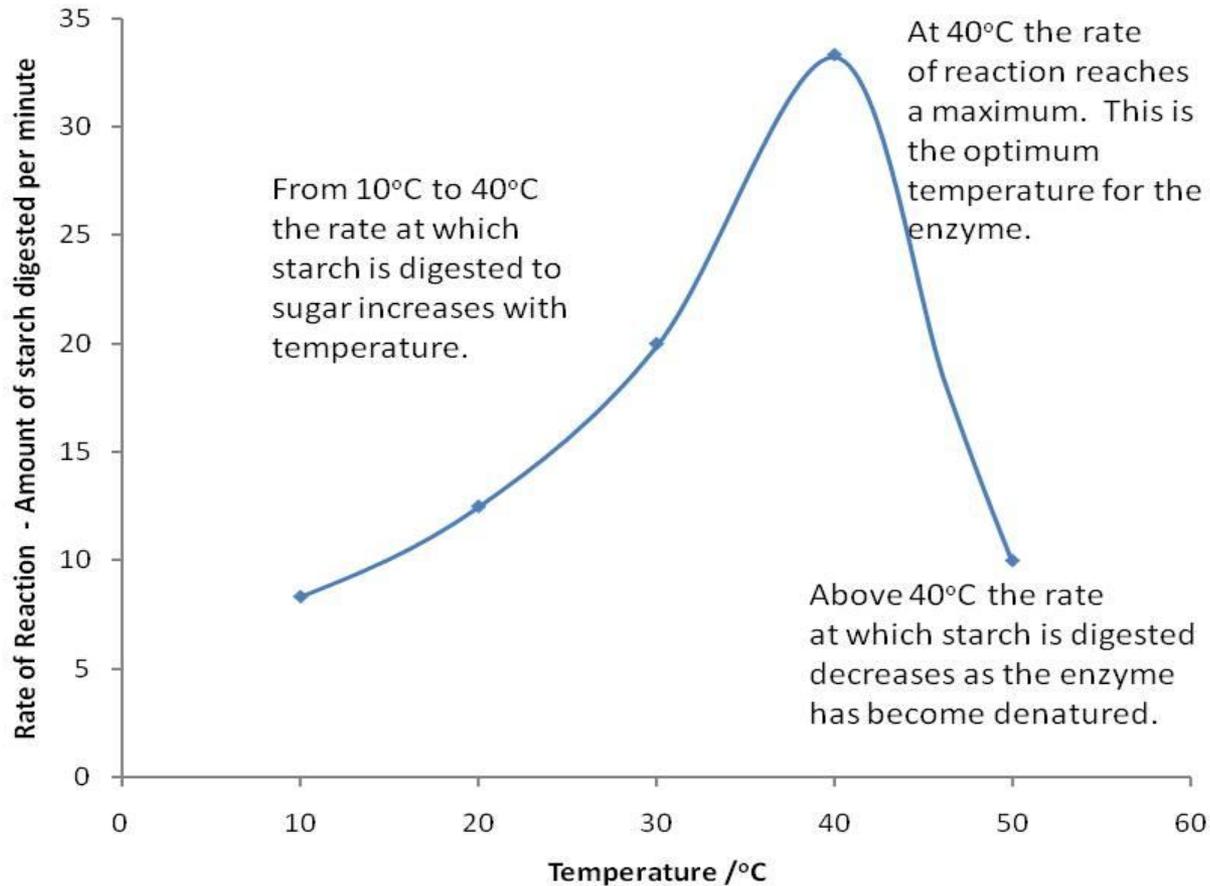
---

- Для большинства ферментов человека оптимальна температура 37-38 °С (внутри организма, кожная  $t$  на 1°С ниже).

Однако в природе существуют и термостабильные ферменты. Например, Taq-полимераза, выделенная из микроорганизмов, живущих в горячих источниках, не инактивируется при повышении температуры до 95 °С. Этот фермент используют в научно-практической медицине для молекулярной диагностики заболеваний с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР).

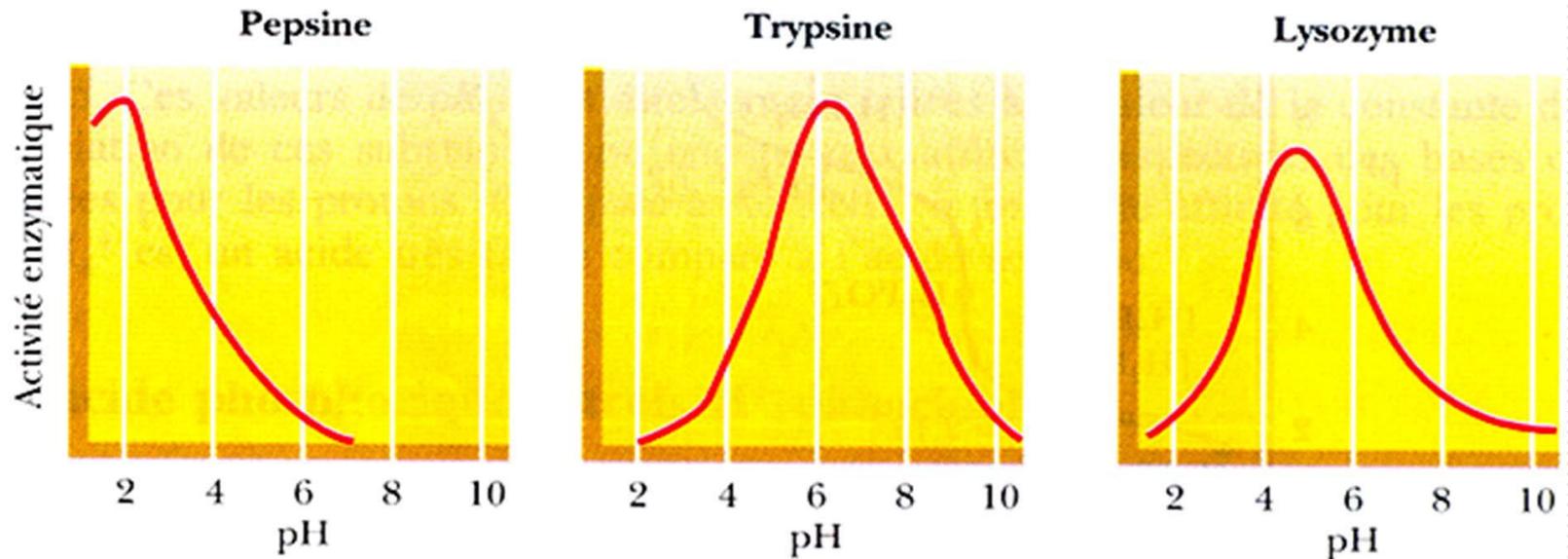
---

# Температура



# pH оптимум для каждого фермента

Оптимум pH фермента является одним из наиболее важных характеристик



Пепсин является ферментом желудочного сока для переваривания белков.

Трипсин также является протеолитическим ферментом, но он действует в щелочной среде тонкого кишечника.

Лизоцим переваривает бактериальные стенки; он присутствует в слюне, слезах

# Основной механизм ферментативного катализа

---

- Фермент ускоряет реакцию без изменения ее равновесия
- Ферменты снижают энергию активации реакции
- Первый этап включает формирование фермент-субстратного комплекса
- Специфическое взаимодействие субстрата с активным центром фермента обеспечивается снижением энергии
- Ферменты также стабилизируют переходное состояние Ф-С комплекса
- Преобразование субстрата в продукт с освобождением фермента

---

□ **Ферменты снижают энергию активации!**

# **Ферменты снижают энергию активации!**

---

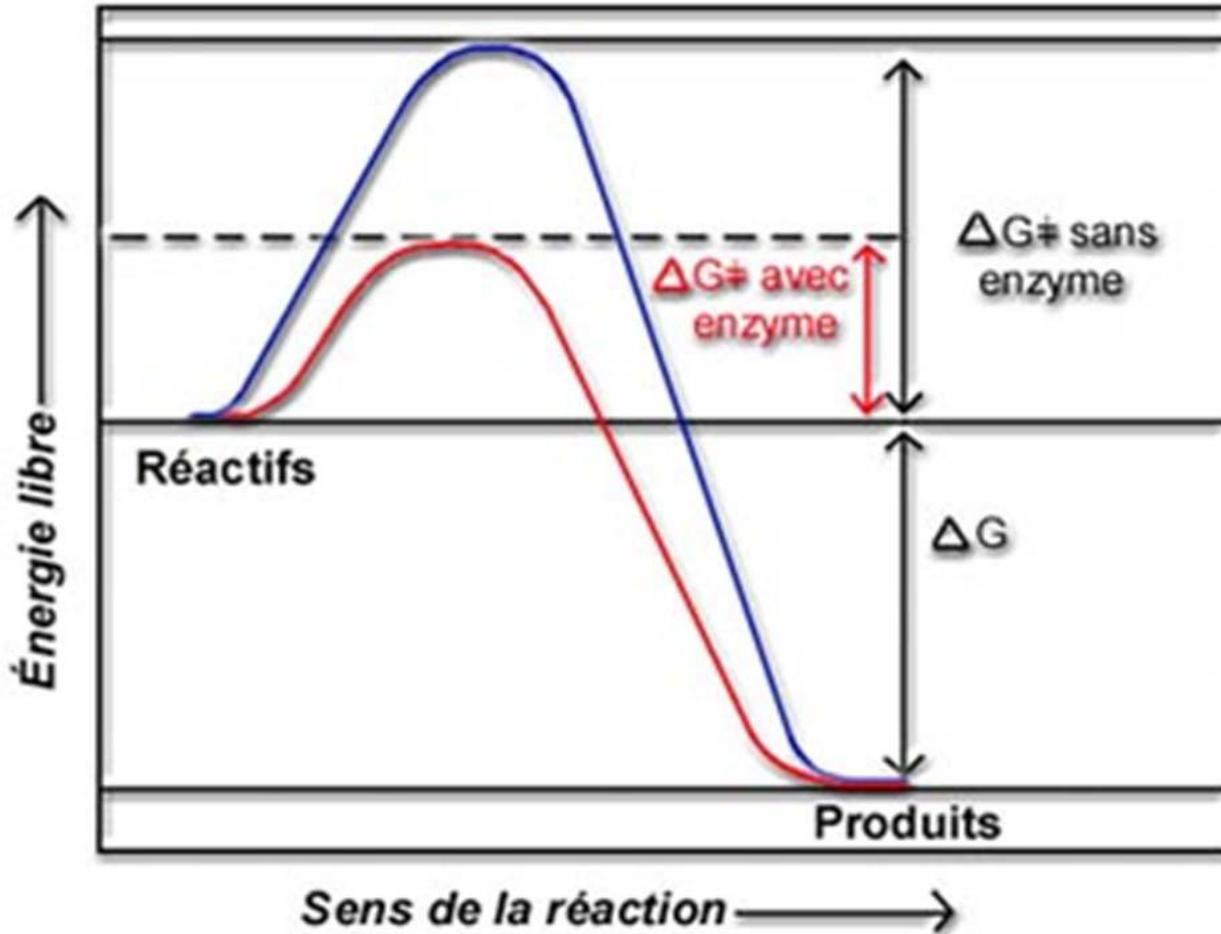
- Энергия, необходимая для возбуждения всех молекул одного моля называется энергией активации или энергетическим барьером биохимической реакции.**
-

**Энергия активации или свободная энергия активации ( $\Delta G$ ) - энергия, необходимая для формирования (разрыва) связей при изменении субстрата**

---

- Реагирующие в-ва должны достичь нестабильного переходного состояния, в котором они являются менее устойчивыми и легче изменяются.**
  - Даже экзэргонические реакции, где  $\Delta G$  отрицательная, требуется поглощение энергии, чтобы достичь переходного состояния.**
-

# Энергия активации

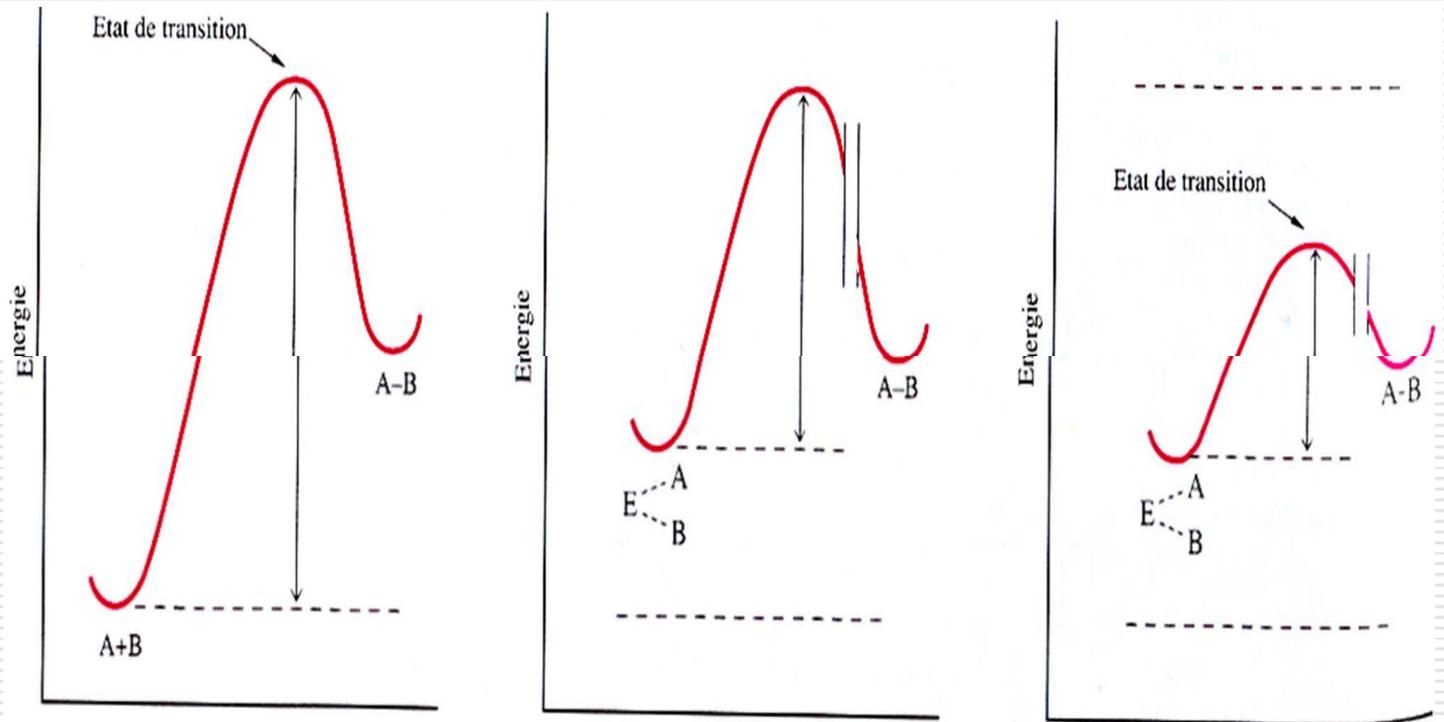


Высокий  
уровень

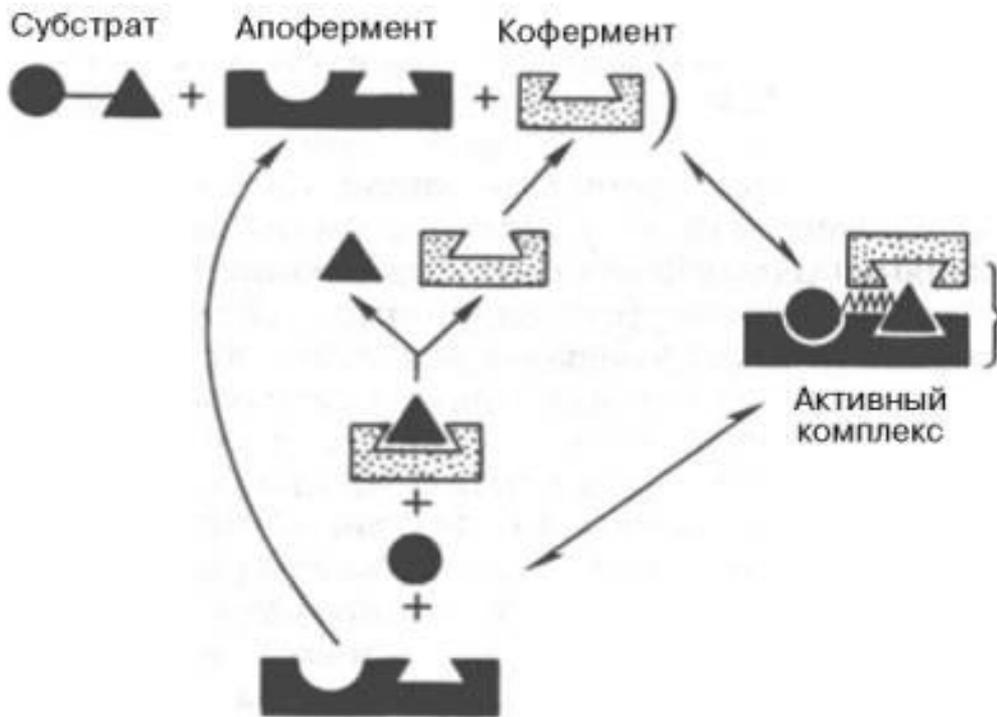
Сниженный  
уровень

# Энергетический барьер активации

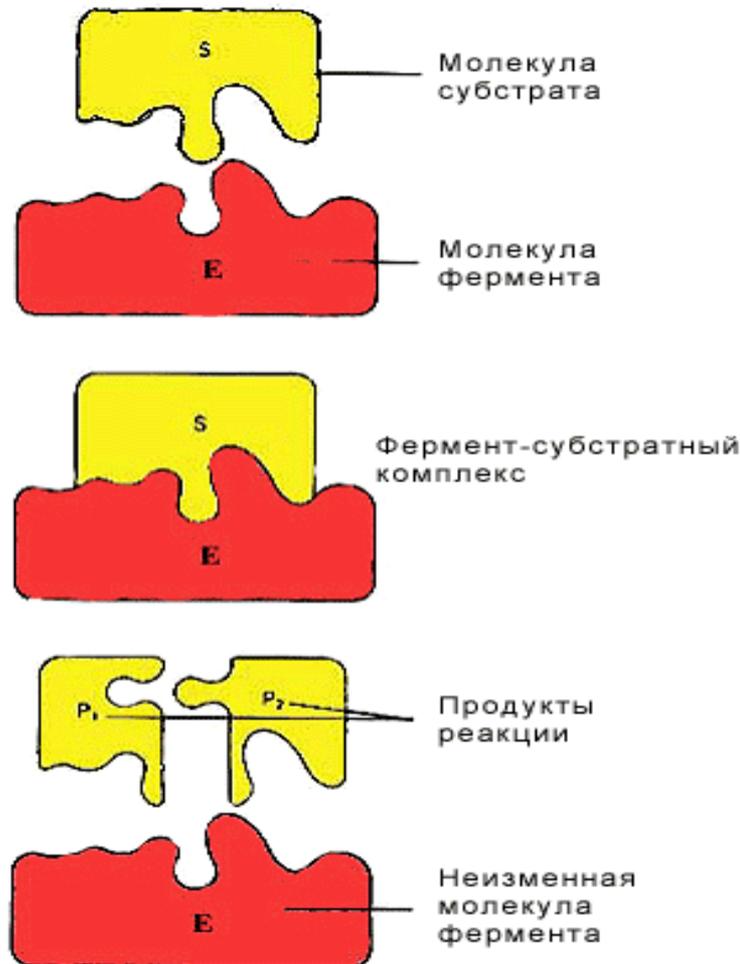
Сущность эффективности ферментативного катализа основана на сродстве фермента и субстрата, с одной стороны, и для его переходного состояния, с другой.



# Схема формирования фермент-субстратного комплекса в процессе реакции



# Формирование фермент-субстратного комплекса (связывание в активном центре фермента)



**I. Активация фермента**

**II. Узнавание ферментом своего субстрата**

**III. Образование неактивного фермент-субстратного комплекса с помощью слабых водородных связей между субстратом и аминокислотами контактных участков**

**IV. Образование активного фермент-субстратного комплекса за счет каталитического участка**

**V. Образование продуктов реакции.**

# Механизм действия ферментов

---

## Теории механизма действия ферментов:

- 1. Теория Фишера «ключа и замка» -**  
полного исходного структурного соответствия  
активного центра и субстрата
- 2. Теория Кошланда «руки и перчатки» -**  
т. наведенного соответствия
- 3. Теория Михаэлиса и Ментен, выдвинувших**  
понятие о F-S комплексе.

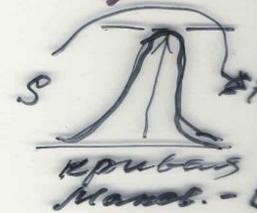
*Фермент взаимодействует с субстратом, образуя нестойкий промежуточный F-S комплекс, который затем распадается с образованием продуктов реакции (P) и освобождением фермента.*

---

# Механизм действия ферментов

Механизм действия катализатора  
 В реакции участвует только активированное мол. - м. - 1.

Чем ↑ активир-х мол.-л, тем ↑ скорость реакции — 2.



В основе всех теорий мех. д. ф. - образование ES

Т. катализа  
 1) на пов-ти



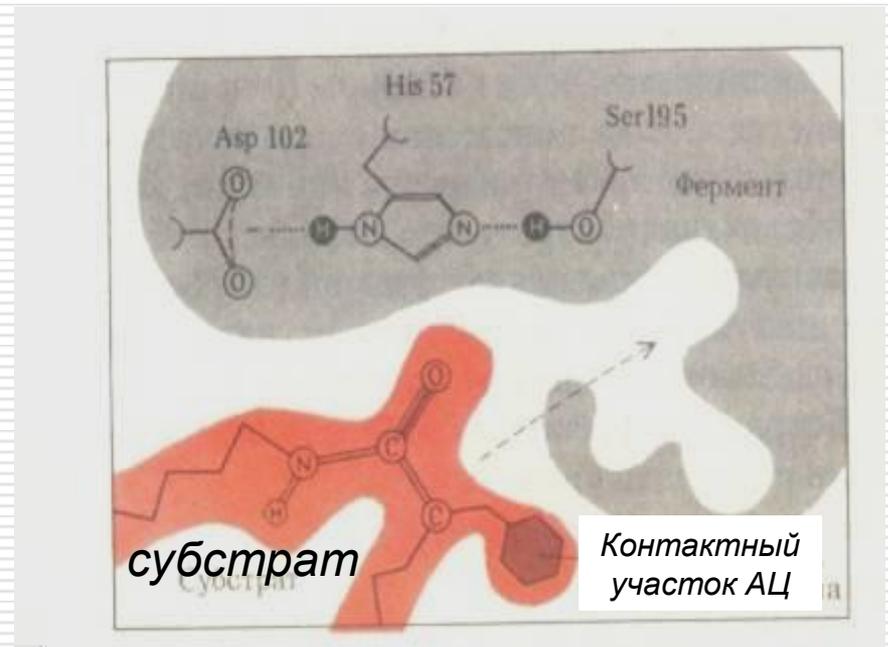
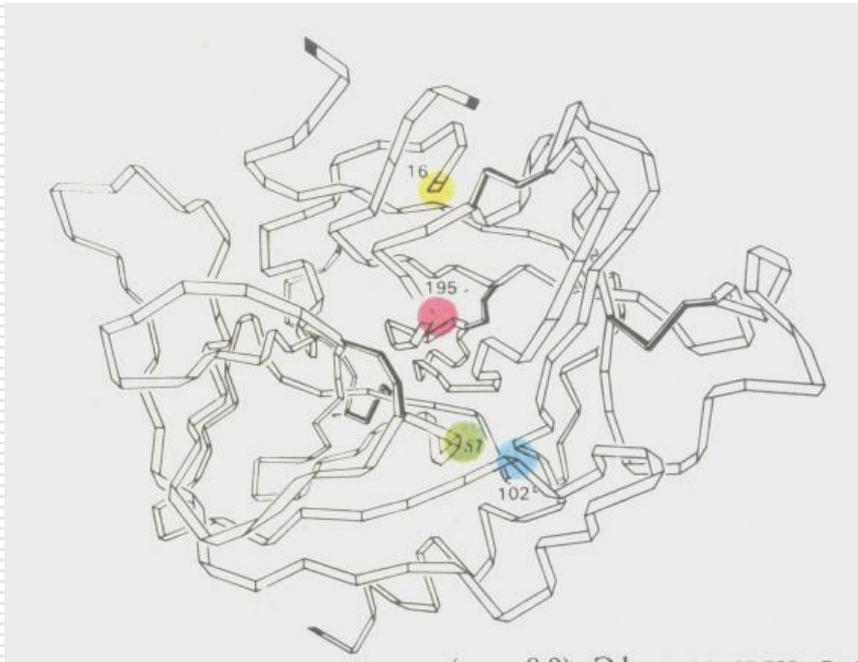
Эффект катализа и фермент.

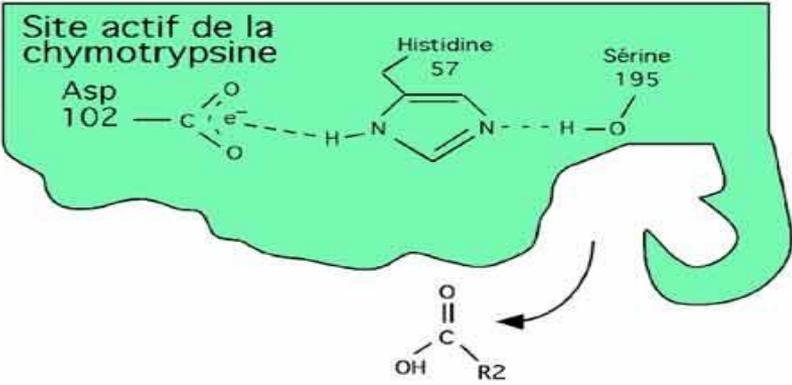
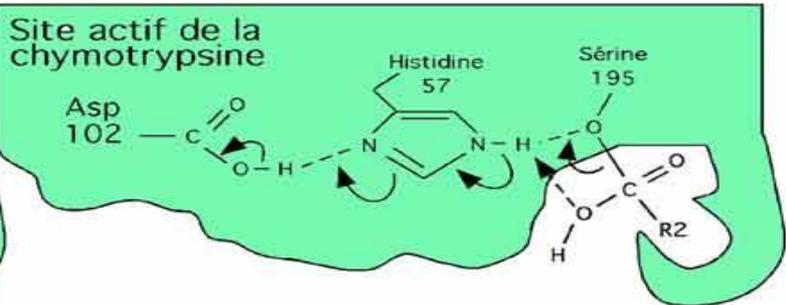
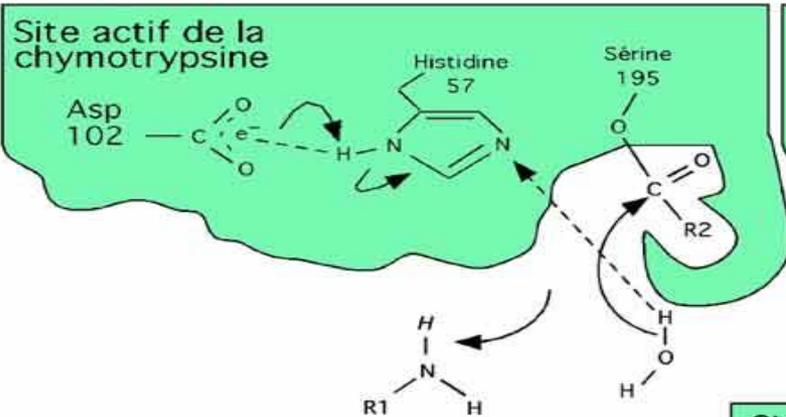
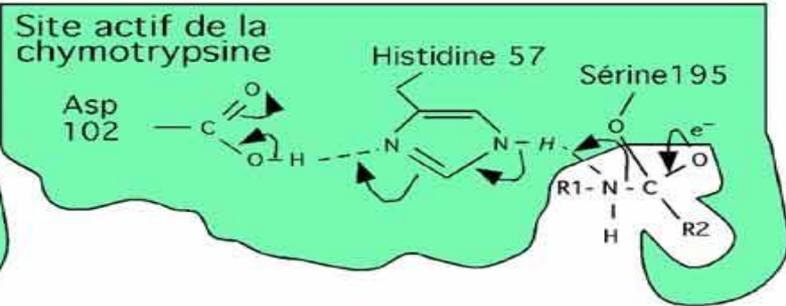
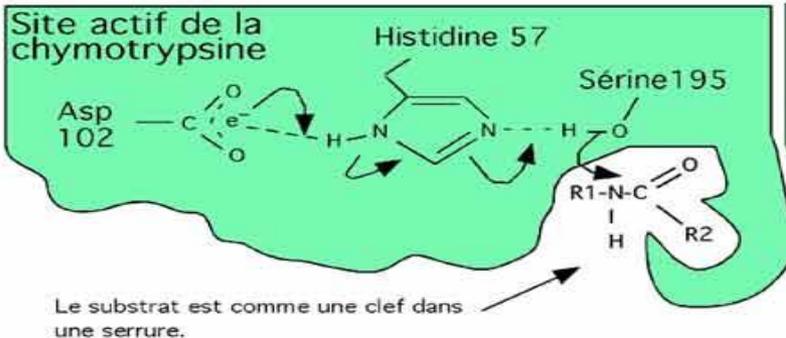
2) Т. протесиса  
 соери. катал.



↑ мех. барьеров  
 барьер протесиса

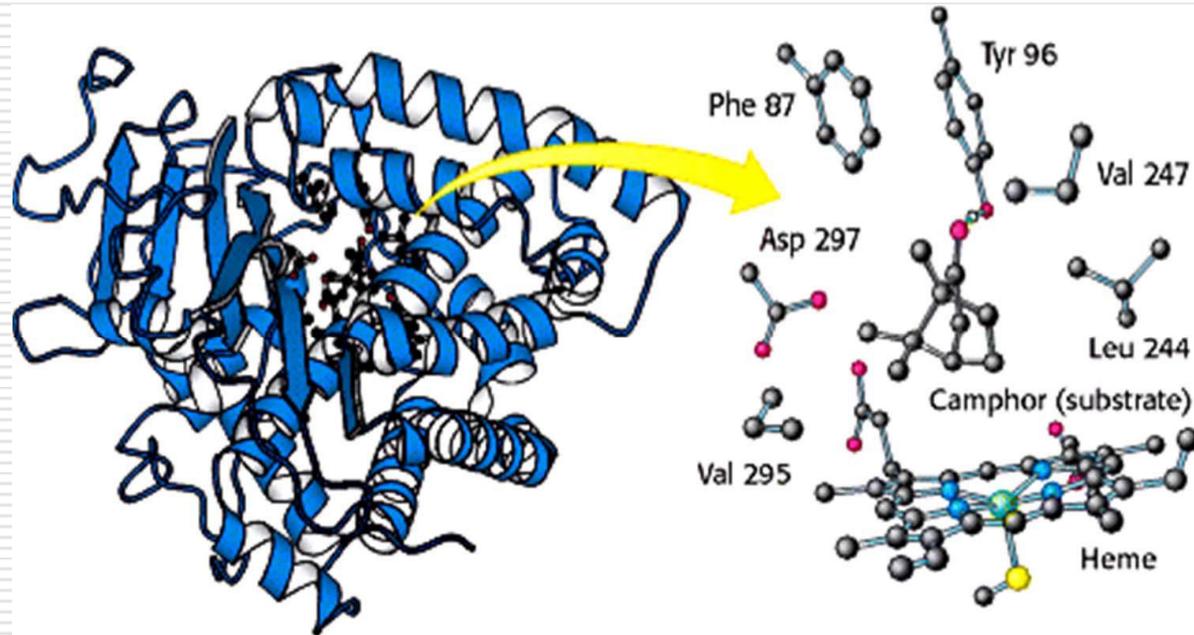
**Функция зависит от пространственной конформации (упаковки полипептидной цепи) с формированием центра связывания или активного центра белковой молекулы, способной специфично связываться с лигандом по принципу стехиометрического соответствия**



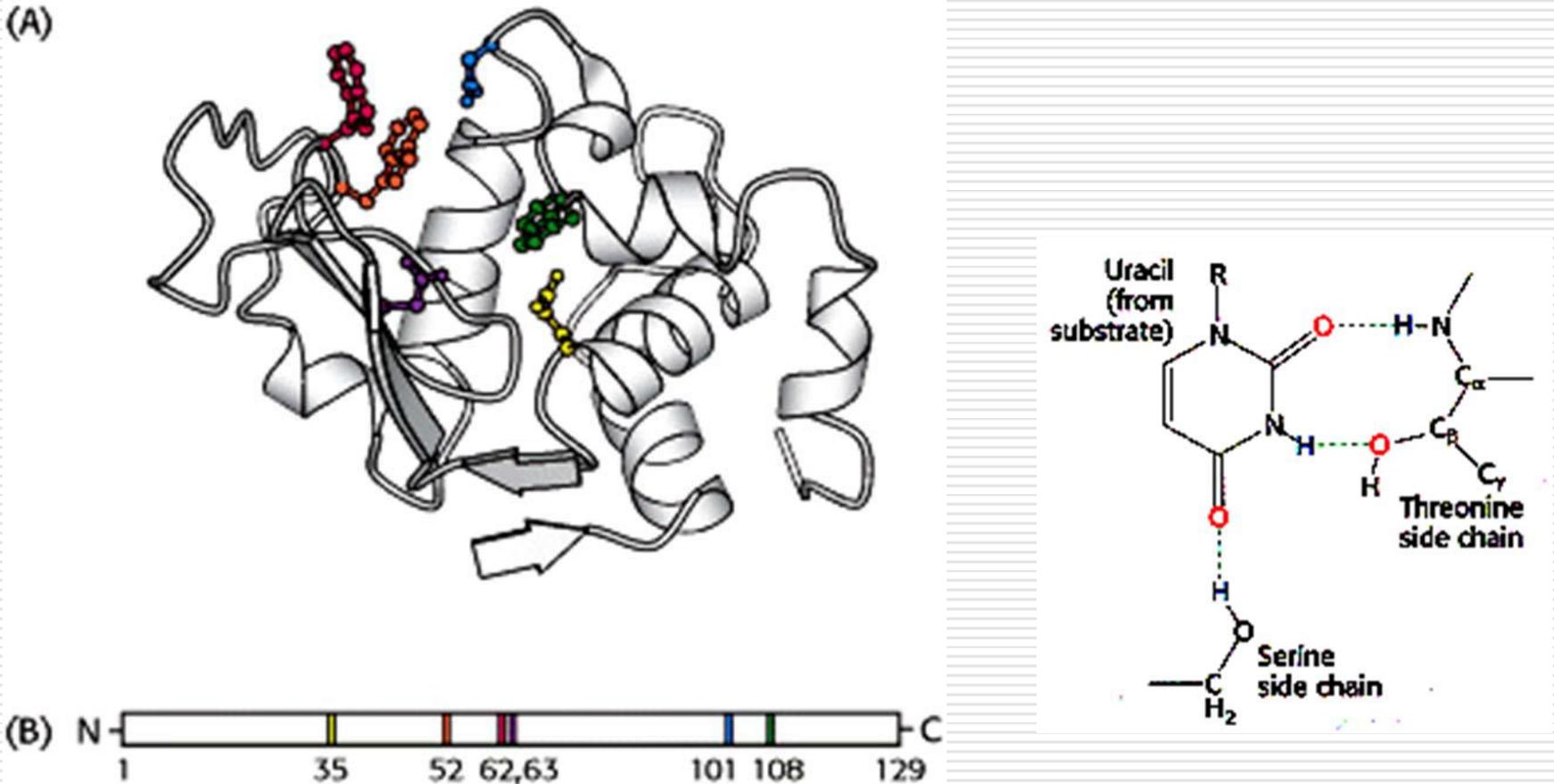


# Наличие структурного сродства фермента и субстрата для формирования фермент-субстратного комплекса

---



# Формирование слабых связей фермент-субстрата



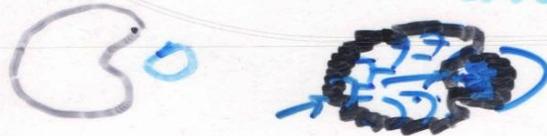
# Механизм действия ферментов

3. Т. фермент. катализа



1) изменение электрон. плотности,  
2) геометрическая деформация,  
способствующая преодолению активационного барьера переходного сост.  $SE^*$ -компл.

Эффект конформационн. катализа обеспечивается разнообразием амплитуд - к обратн.



# Механизм действия ферментов

По Льюису

**Кислотно-основный катализ**

Кислотный участок (электрофил. группа) стремится оттянуть на себя электроны

( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $-NH_3^+$ )

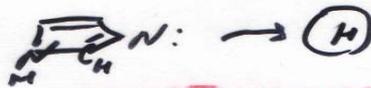
Основание - донор электрон. пары стремится к взаимодействию с положит. заряженным ядром (нуклеофильная группа)

(гидроксигруппа серина, или вода и сульфгидрильная группа)



серин

цистеин



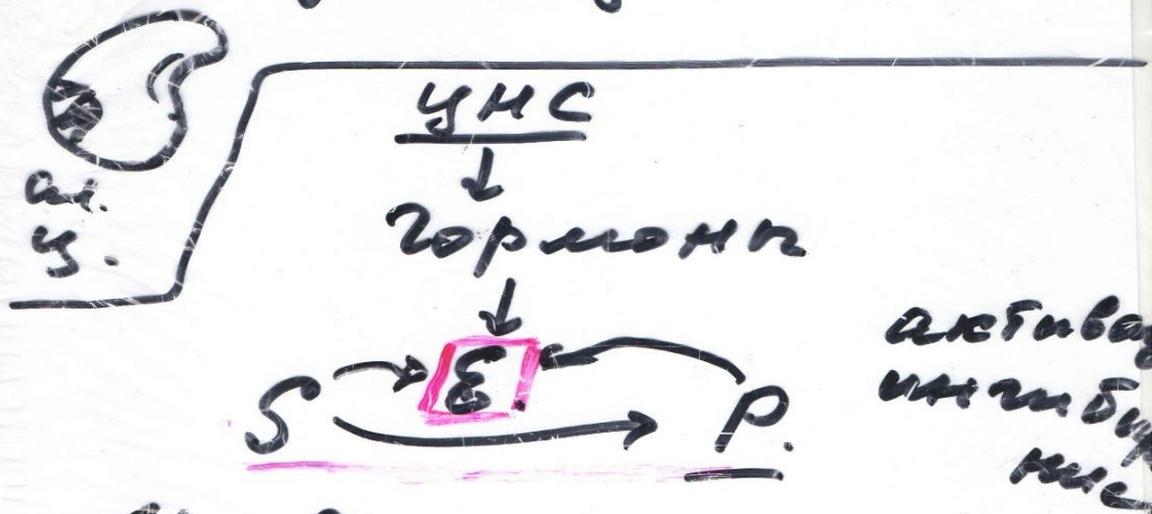
гистидин

По Бренстеду и Лоурри

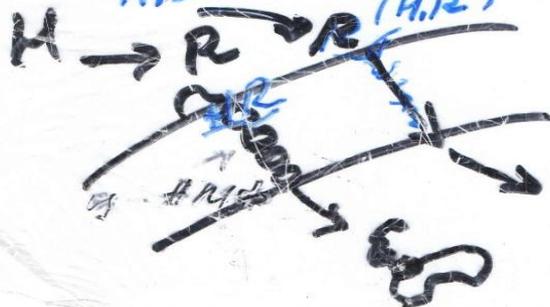
кислота - донор протонов  
основание - акцептор протонов !

# Регуляция действия ферментов

Регул.-я действия ферментов



Уровни регуляции ферментов  
- на уровне структуры.  
коп. вставки (мембрана,  
и.р. (и.р.)

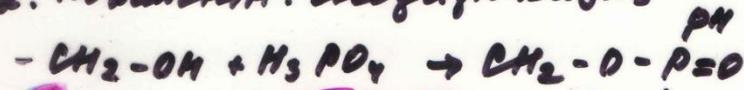


Механизм регуляции активности  $E$ .

1. Путь активации прог.  $\rightarrow$  ферм.

Тензион  $\rightarrow$  пепсин-инг-р + пепт. А  $\rightarrow$  пепсин + пепт. Б.

2. Ковалентн. модификация

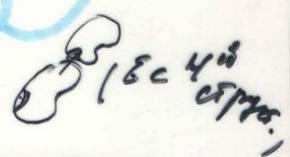


3. Структурн. модификация

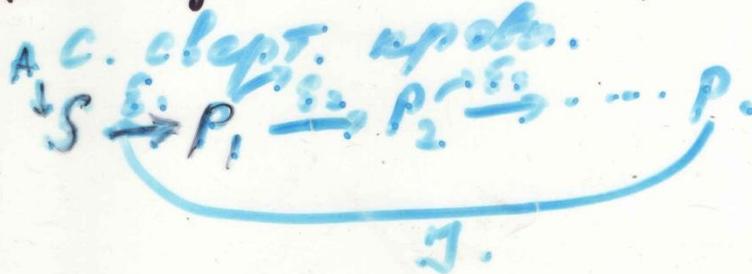
3.1.  $\alpha$ -АМН

3.2. гидролиз белков. цепи.

3.3. Амплитуд. ион-а в

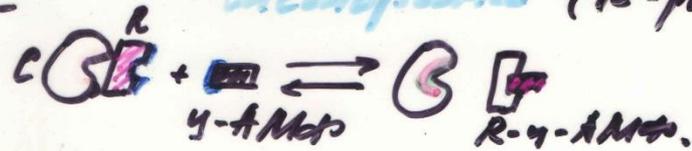


4. Каскадная активация прогорм.



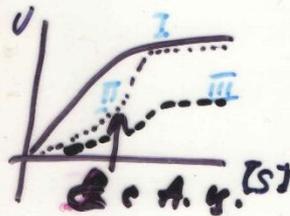
Уровни регуляции:

- мембрана (R-рецепторы)



-  $\alpha$  (сигналы. М) - увелич. кол-во E.

-  $\epsilon$  (S  $\xrightarrow{\epsilon}$  P)



ингибированное

Обратимое

необратим.

конкур.



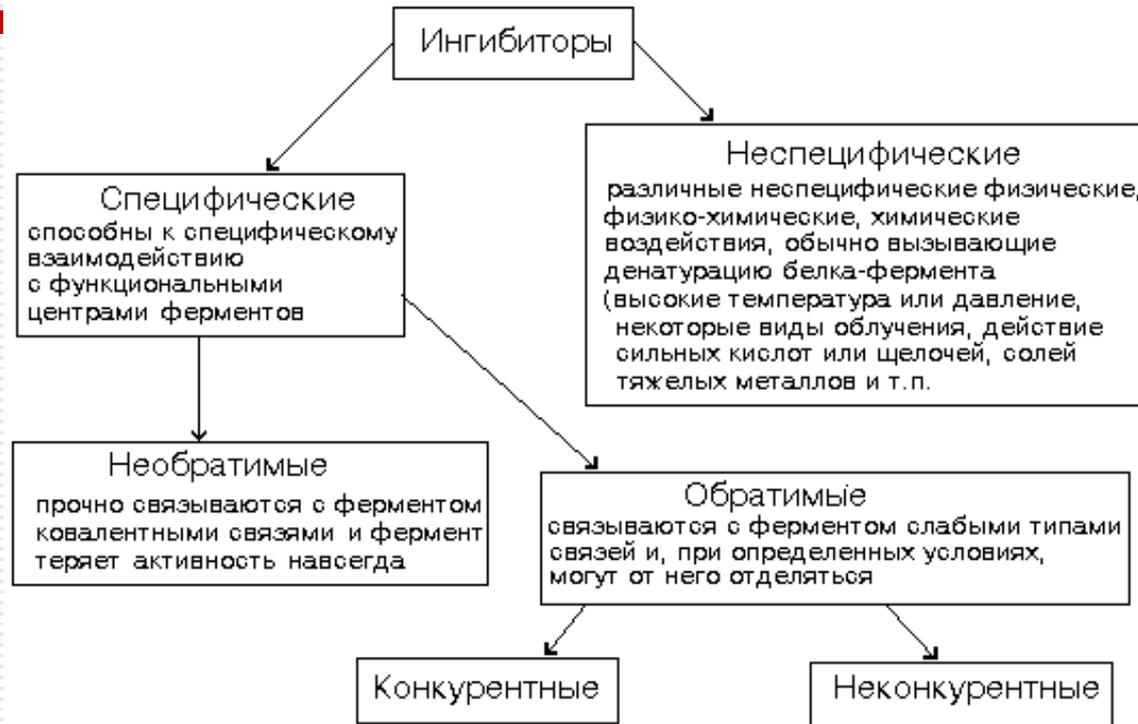
или



неконкур.



## Классификация ингибиторов



# ИНГИБИТОРЫ ФЕРМЕНТОВ

## КОНКУРЕНТНЫЕ

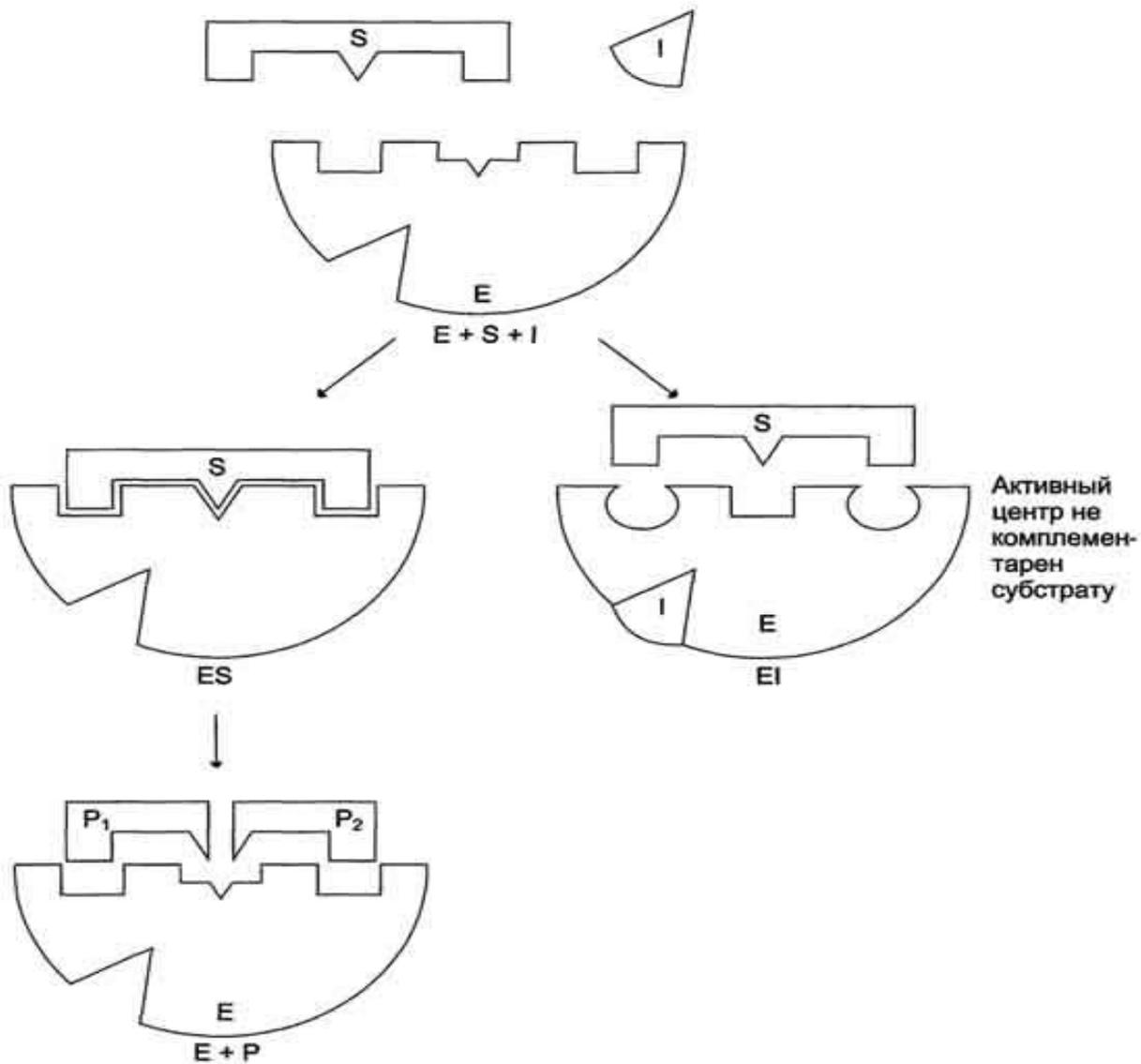
СВЯЗЫВАЕТСЯ С АКТИВНЫМ  
ЦЕНТРОМ ФЕРМЕНТА

↓ СКОРОСТЬ КАТАЛИЗА, СНИЖАЯ  
ДОЛЮ МОЛЕКУЛ ФЕРМЕНТА,  
СВЯЗЫВАЮЩИХ СУБСТРАТ

## НЕКОНКУРЕНТНЫЕ

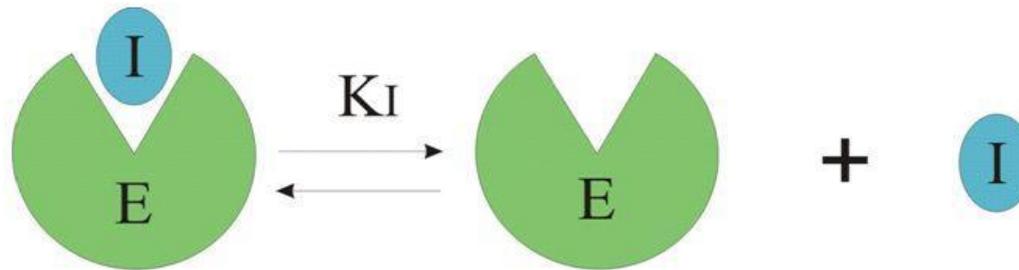
СВОЙ УЧАСТОК СВЯЗЫВАНИЯ  
НА МОЛЕКУЛЕ ФЕРМЕНТА

↓ СКОРОСТЬ КАТАЛИЗА, ИЗМЕНЯЯ  
СТРУКТУРУ АКТИВНОГО  
ЦЕНТРА ФЕРМЕНТА



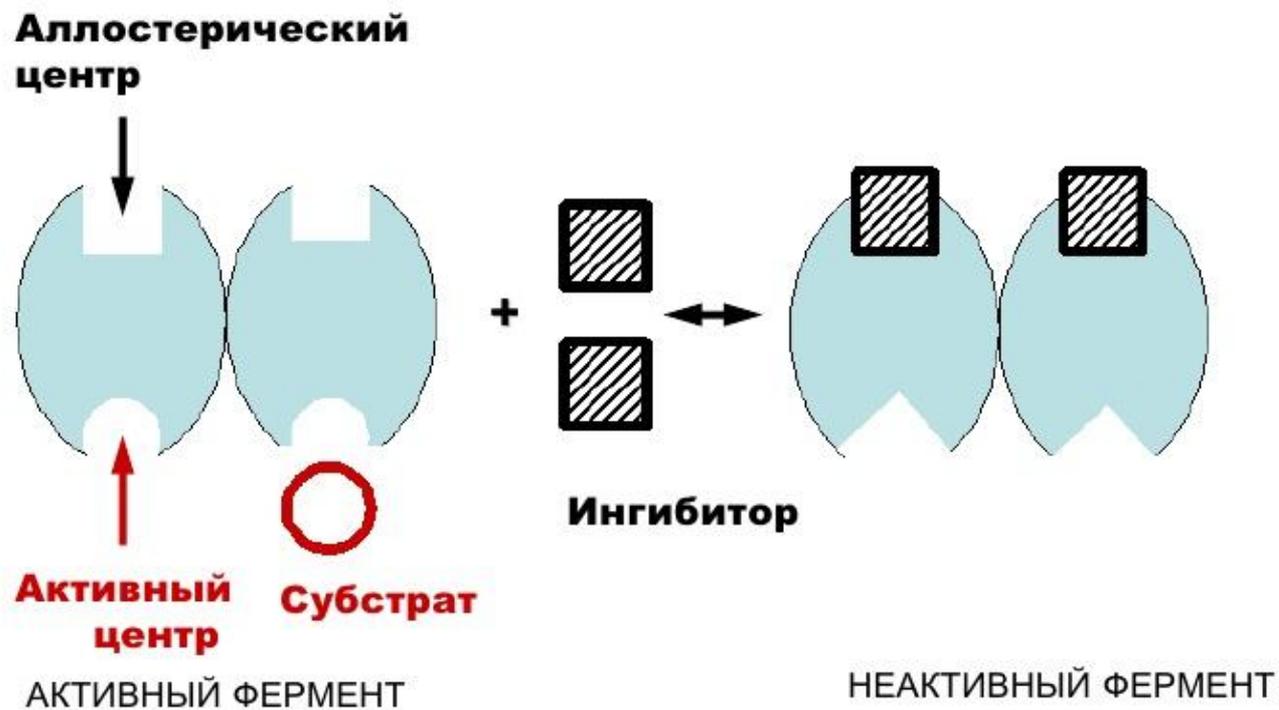


## Обратимое связывание ингибитора с ферментом



Активность фермента  
восстанавливается при  
удалении ингибитора

## Схема механизма аллостерического ингибирования

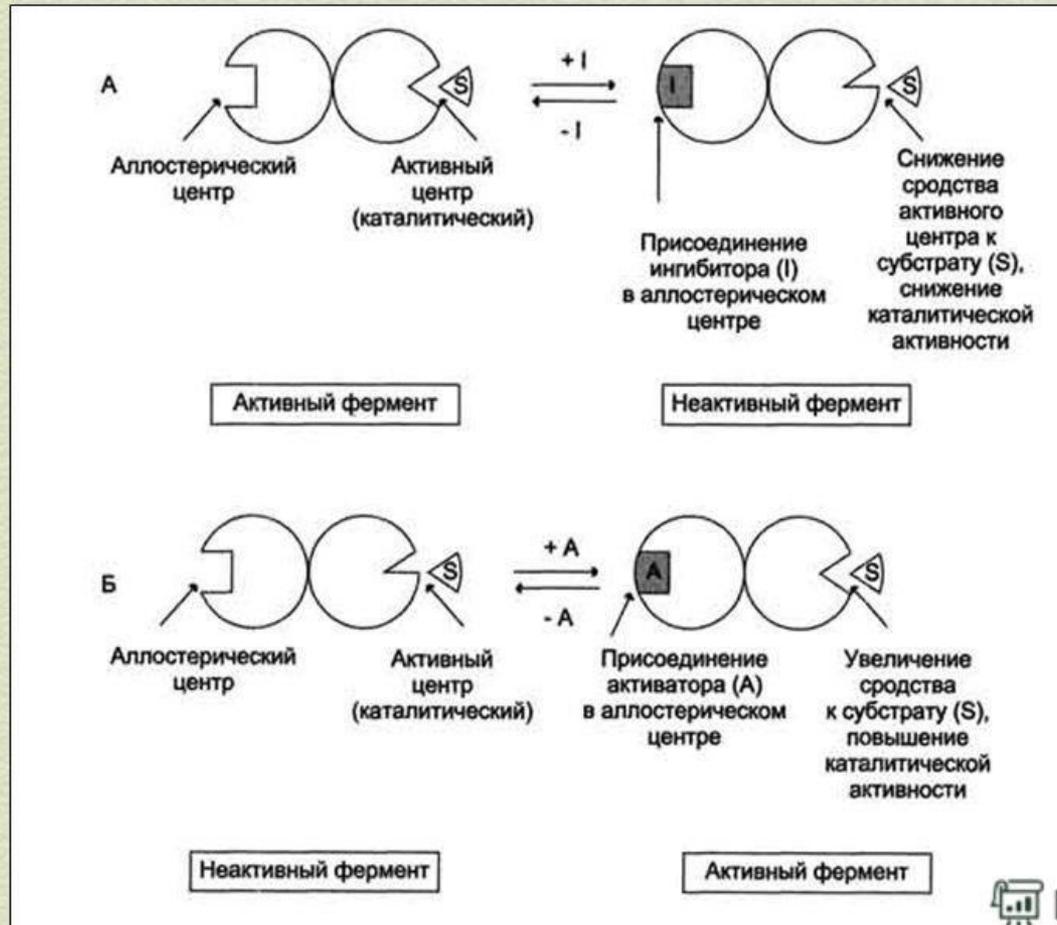


10/08/11

Авторы: Ельчанинова С.А., Галактионова Л.П., Кареновский Ю.В.

19

## Функционирование аллостерических ферментов, при взаимодействии с аллостерическим ингибитором (А) и аллостерическим активатором (Б)



# Биохимические основы лекарственного применения ферментов и их ингибиторов, витаминов и гормонов

---

## Энзимотерапия

- ❑ **Заместительная энзимотерапия** (компенсации врожденной или приобретенной функциональной недостаточности определенных органов, тканей или систем, например, поджелудочной железы, печени, желудка).
- ❑ **Использование специфических свойств отдельных ферментов для устранения патологического процесса** (Широкое применение в лечебной практике находят ферментные препараты, растворяющие сгустки и тромбы крови, антитела против ферментов -таргет терапия, ингибиторы и активаторы ферментов и пр.)
- ❑ **Иммобилизованные ферменты.**

## Энзимодиагностика

---

- ❑ **Использование ферментов в диагностике:**

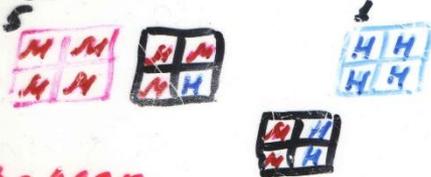
# ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АКТИВАТОРОВ, ИНГИБИТОРОВ И КОФАКТОРОВ:

- 1) при панкреатите - ингибиторы протеолитических ферментов (**контрикал, трасилол**), которые являются субстратными конкурентами.
- 2) **прозерин** - конкурентный ингибитор ацетилхолинэстеразы - при миастении, мышечной слабости, когда нарушается проведение нервного импульса.
- 3) при подагре **аллопуринол** – ингибитор ксантиноксидазы
- 4) **кокарбоксилаза (ТДФ)** - при различных патологических процессах, требующих улучшения углеводного обмена.

# Иммобилизованные ферменты используются для разработки диагностических и лекарственных средств

## Изоферменты

ЛДГ, <sup>1-5</sup> изо,  
М, Н (4 суб'єд.)

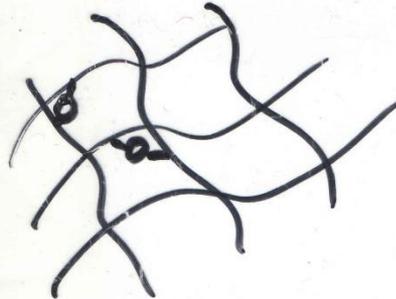
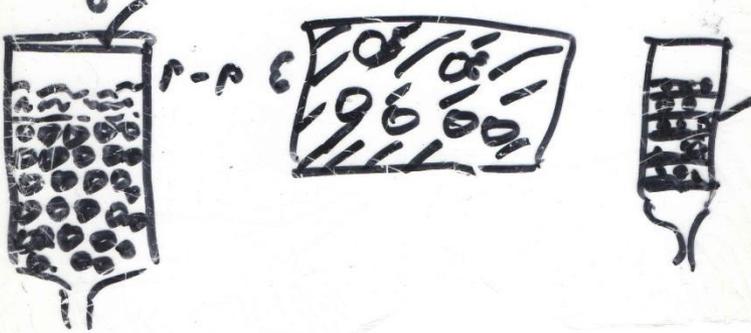


1. ↑ способность к связыванию
2. Дифференциальная

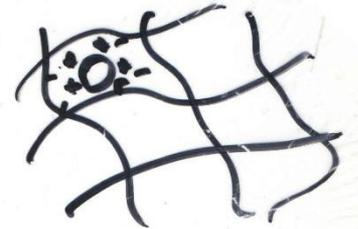
1-2 (H).  
4-5 (M, H).  
нес.

3-легко.

Иммобилизованные в.  
Обезвредить в на носители



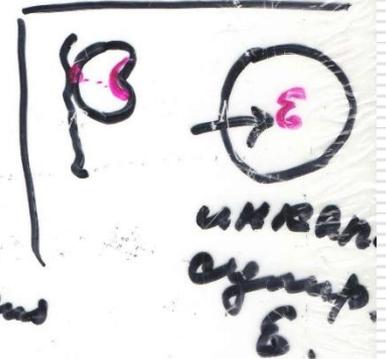
1. Ковалентное  
связ - с в с  
коллагеном.  
Биотехнология



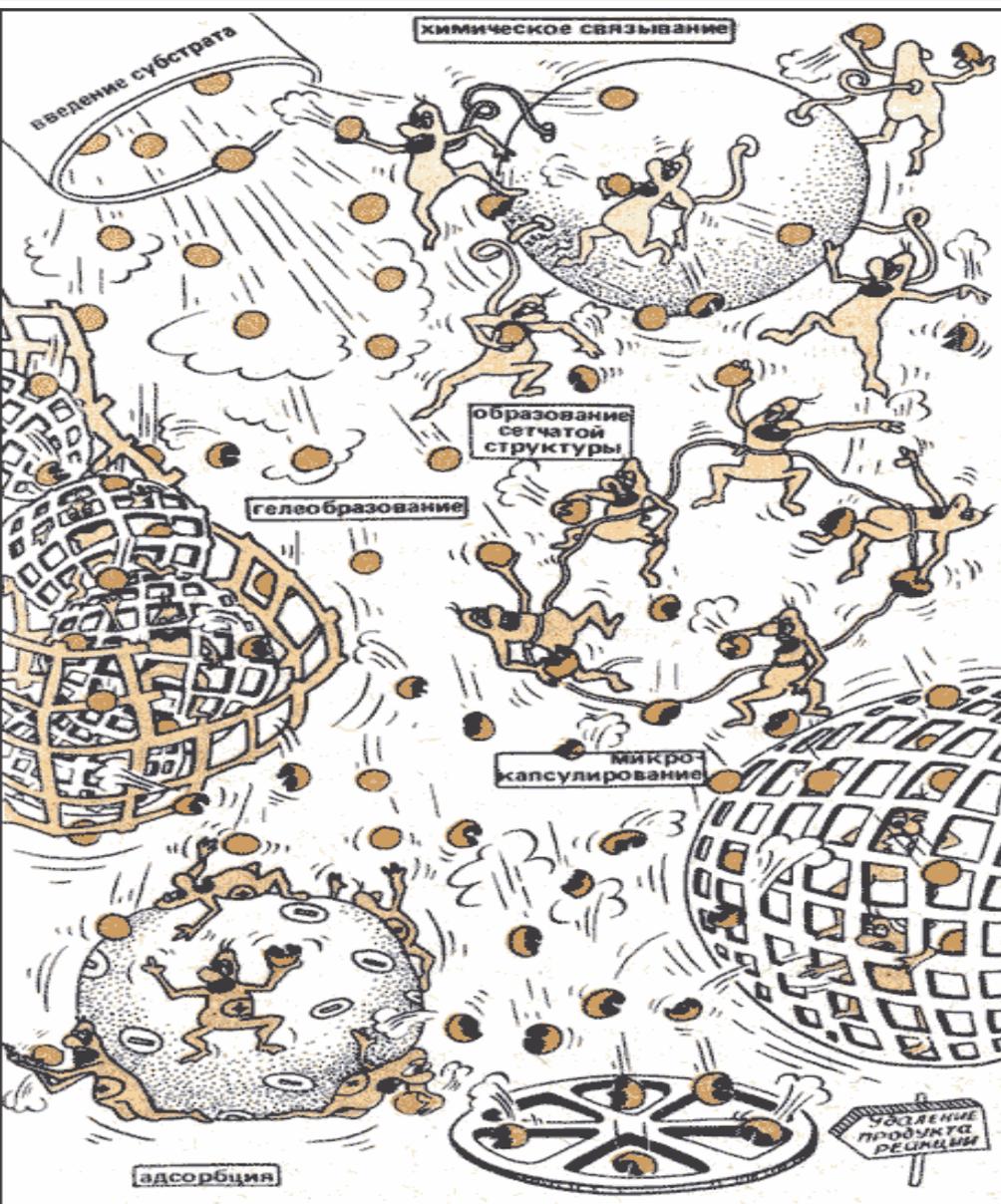
2. Электростаб.  
Связь - с.



3. Сополимеризация



форма



**Физическая адсорбция.**

**Ковалентное связывание с активированными полимерами.**

**Сополимеризация с помощью многофункциональных групп.**

**Пространственное разделение.**

