

Ферменты

А. А. Чиркин, заведующий кафедрой химии, доктор биологических наук, профессор;
Е. О. Данченко, профессор кафедры, доктор медицинских наук, доцент
(Витебский государственный университет им. П. М. Машерова)

Одной из важнейших функций белков является катализ химических реакций. Подавляющее число химических превращений в организме носит каталитический характер. Именно благодаря белкам-катализаторам на Земле удалось реализовать генетическую информацию, записанную в виде нуклеотидного кода, в разнообразные структуры и функции живых организмов.

Ферменты (от греч. *enzyme* — в дрожжах или от лат. *fermentatio* — брожение) — биологические катализаторы белковой природы.

Представление о том, что в живых системах химические реакции протекают с помощью каких-то факторов, возникло более 200 лет назад. В начале XIX века господствовало мнение о наличии «жизненных сил», управляющих процессами жизнедеятельности. Более чёткие и однозначные химические представления об этом сформировались в связи с развитием теории химического катализа, выдвинутого шведским химиком Й. Я. Берцелиусом, который первым отметил высокую производительность биологических катализаторов на примере диастазы.

В 50-х годах XIX века Л. Пастер показал, что сбраживание сахара в спирт с помощью дрожжей катализируется веществами белковой природы — ферментами. Ошибка Пастера заключалась в том, что он не отделял ферменты от живых клеток (в данном случае дрожжевых). Это представление разделялось многими его современниками. Поэтому открытие Э. Бухнера, первым показавшего, что в водных экстрактах дрожжевых клеток находится набор ферментов, катализирующих превращение сахара в спирт, послужило началом формирования науки энзимологии. В 20-х годах XX века Р. Вильштеттер впервые получил ряд ферментов в высокоочищенном состоянии. Однако их хими-

ческую природу он не идентифицировал, так как ошибочно полагал, что ферменты — это особый класс низкомолекулярных веществ, сорбированных на белках. В 1926 году Дж. Самнер впервые получил растительную уреазу в виде белковых кристаллов. Четыре года спустя Дж. Нортроп и М. Кунитц представили данные о получении кристаллов пепсина и трипсина, доказав их исключительно белковую природу. В конце прошлого века появились сведения о каталитических антителах (абзимах) и РНК (рибозимах).

Идея В. Дженкса (W. Jencks, 1969) о способности белков-антител катализировать химические реакции была подтверждена в конце 80-х годов прошлого века. Были введены термины «каталитические антитела», или «абзимы» (от *antibody enzyme*). В настоящее время известно несколько классов химических реакций, катализируемых антителами: ацилтрансферазные, изомеразные, бимолекулярной ассоциации и окислительно-восстановительные.

Каталитические РНК (рибозимы) были описаны в 80-х годах прошлого века Томас Чек (T. R. Chech et al.) и Сидни Олтмен (S. Altman et al.). Рибозимы достаточно широко представлены в природе и играют важную роль в эволюции живых организмов, поскольку могут обеспечивать репродукцию и процессинг РНК без участия белков-ферментов. В частности, рибозимы участвуют в удалении неинформативных

интронов из пре-м-РНК на этапе синтеза белков путём созревания тРНК с помощью рибонуклеазы Р, а также в процессе саморепликации вирусного РНК генома (патогенные вирусы для растений и человека). Ранее неоднократно сообщалось, что синтез белка в рибосомах зависит от уровня рРНК. Активность рибозимов можно контролировать с помощью антибиотиков, что открывает новую страницу в профилактике и лечении вирусных заболеваний, включая вакцинацию.

Ферменты ускоряют реакции в миллионы раз. Многие реакции в организме не могут протекать из-за отсутствия ферментов. Например, гидратация углекислоты, катализируемая карбоангидразой, является одной из наиболее быстрых реакций: каждая молекула фермента гидрирует 10^6 молекул CO_2 за секунду. Эта катализируемая реакция протекает в 10^7 раз быстрее, чем не катализируемая. Ферментативный гидролиз пептидной связи происходит за миллисекунды, а без фермента для разрыва пептидной связи при нейтральном значении рН потребуется от 10 до 1000 лет.

Для выделения ферментов используются методы препаративной химии белков в специальных щадящих условиях (низкая температура, отсутствие эффектов необратимой денатурации). Оптимальным способом выделения ряда ферментов является биоспецифичная аффинная хроматография. Из более 3800 ферментов, включённых в список, три четверти выделены и очищены, у 500 ферментов изучена первичная структура и охарактеризованы гены и только у десятков из них постулирована третичная структура.

Характеристика ферментов

Сходства между ферментами и химическими катализаторами

1. Не расходуются и не образуются в процессе реакции.
2. Катализируют только энергетически возможные реакции.

3. Не изменяют свободную энергию субстратов и продуктов реакции.

4. Не смещают равновесия реакции, а ускоряют его наступление.

Различия между ферментами и химическими катализаторами

1. Ферменты являются белками и поэтому катализируют реакции в «мягких» условиях (давление 1 атм, $t = 37^\circ\text{C}$ и нейтральное значение рН).

2. Ферменты обладают *физико-химическими свойствами*, характерными для белков: высокой молекулярной массой, амфотерностью, не способны к диализу, подвергаются высаливанию, денатурируют.

3. Для ферментов характерна *более высокая эффективность*. Например, энергия активации разложения перекиси водорода $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2}\text{O}_2$ равна 75,2 кДж/моль. При добавлении неорганического катализатора платины энергия активации снижается до 50,2 кДж/моль. Фермент каталаза снижает энергию активации до 8,3 кДж/моль.

4. Активность фермента *регулируется* и контролируется на генетическом уровне и посредством низкомолекулярных соединений (субстратов и продуктов реакции).

5. Ферменты *обладают специфичностью*. Различают 4 вида специфичности ферментов:

- *абсолютная специфичность* — фермент катализирует превращение только одного субстрата. Например, аргиназа расщепляет аргинин, уреазы — мочевину;

- *относительная специфичность* — фермент расщепляет определённый тип связи. Например, липаза гидролизует жиры по месту сложноэфирной связи на глицерин и жирные кислоты;

- *относительная групповая специфичность* — фермент расщепляет связь, образованную определёнными функциональными группами. Эти ферменты обычно участвуют в процессе пищеварения. Например, пепсин расщепляет пептидную связь, образованную аминокислотной группой ароматических аминокислот,

трипсин — образованную карбоксильной группой основных аминокислот, а химотрипсин — карбоксильной группой ароматических аминокислот;

- *стереохимическая специфичность* — фермент катализирует превращение определённого стереоизомера. Например, оксидаза L-аминокислот превращает только L-аминокислоты.

6. В организме действуют, как правило, полиферментные системы, в результате чего происходит многоэтапное превращение вещества с допустимыми для организма перепадами энергии. Полиферментные системы (комплексы) представляют собой несколько ферментов, катализирующих ряд согласованных реакций, причём конечные продукты одной ферментативной реакции являются субстратами для следующей. Различают три типа мультиферментных комплексов:

а) ферменты растворены в цитоплазме и контакт субстратов с ними осуществляется посредством диффузии;

б) ферменты соединены друг с другом за счёт белок-белковых взаимодействий;

в) ферменты соединены друг с другом и иммобилизованы на внутриклеточных или цитоплазматических мембранах.

Классификация и номенклатура ферментов

1. Ферменты называются добавлением суффикса *-аза* к названию субстрата, на который данный фермент действует. Например, уреаза катализирует гидролиз мочевины; ферменты, гидролизующие крахмал (амилон), называются амилазами; гидролизующие жиры (липос) — липазами; ферменты, гидролизующие белки (протеины) — протеиназами.

2. Названия используются также для групп ферментов, катализирующих сходные реакции. Например, ферменты, которые переносят остаток фосфорной кислоты от АТФ на другую молекулу, носят название киназы.

3. Тривиальные названия не показывают механизма действия, но они ши-

роко используются, например пепсин, трипсин и др.

4. Международный совет биохимиков (IUB) предложил систематическое название и классификацию ферментов по типу и механизму катализируемой реакции.

Согласно этой системе все ферменты разделены на 6 классов, каждый из которых имеет определённый номер: 1) *оксидоредуктазы* (окислительно-восстановительные реакции); 2) *трансферазы* (реакции межмолекулярного переноса различных групп); 3) *гидролазы* (разрыв связей в субстратах с присоединением воды); 4) *лиазы* (разрыв связей в субстратах без присоединения воды); 5) *изомеразы* (реакции изомеризации); 6) *лигазы (синтетазы)* (реакции синтеза с использованием энергии АТФ). Название класса указывает на тип химической реакции, катализируемой ферментами. Классы делятся на подклассы, а те, в свою очередь, на подподклассы. Подкласс уточняет действие фермента, так как указывает на природу химической группы субстрата, атакуемой ферментом. Подподкласс уточняет природу атакуемой связи субстрата или природу акцептора, который участвует в реакции.

Систематическое название фермента складывается из *названия субстратов (субстрата)*, участвующих в химической реакции, которую катализирует фермент, *названия типа химической реакции* и суффикса *-аза*. Например, систематическое название лактатдегидрогеназы следующее:

L-лактат: NAD^+ – Оксидоредуктаза.
I субстрат II субстрат тип реакции

Дополнительная информация, если она необходима для уточнения, заключается в скобки. Например, фермент, катализирующий реакцию $L\text{-малат} + \text{NAD}^+ = \text{пируват} + \text{CO}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+$, имеет номер 1.1.1.37 и называется L-малат: NAD^+ оксидоредуктаза (декарбоксилирующая).

Каждый фермент имеет специальный шифр, состоящий из четырёх ко-

довых чисел, разделённых точками: первая цифра характеризует класс реакции, вторая — подкласс, третья — подподкласс, четвёртая указывает порядковый номер фермента в его подподклассе. Например, лактатдегидрогеназа имеет шифр 1.1.1.27, т. е. фермент относится к 1-му классу (оксидоредуктазы), к 1-му подклассу (оксидоредуктазы, действующие на СН—ОН-группировки в качестве доноров атомов водорода), к 1-му подподклассу (акцептором атомов водорода служит никотинамидадениндинуклеотид) и занимает 27-ю позицию в перечне ферментов упомянутого подкласса.

В связи со значительным усложнением названий ферментов в новой номенклатуре и живучестью тривиальных названий иногда в публикациях допускается использование последних.

Структурная организация ферментов

По строению ферменты делятся на *простые (однокомпонентные)* и *сложные (двухкомпонентные) белки*. Простые белки-ферменты состоят из аминокислот, сложные — из белковой части —

апофермента и небелковой части — *кофактора*. Кофактор, прочно связанный с апоферментом, называется *простетической группой*. Комплекс апофермента и прочно связанного кофактора носит название *холофермент*. Кофактор, который связан с апоферментом нековалентными связями и легко отделяется при диализе, называется *коферментом*. Он присоединяется во время реакции к молекуле фермента подобно субстрату, химически изменяется, а затем снова освобождается.

Роль коферментов выполняют две группы веществ: 1) витамины и их производные и 2) вещества невитаминной природы (нуклеотиды (УДФ-глюкоза), фосфаты моносахаридов (2,3-бисфосфоглицерат), металлопорфирины (гем, хлорофилл) и пептиды (глутатион)). Кофактором могут быть неорганические ионы, например Mg^{2+} . Роль металлов: участвуют в образовании фермент-субстратного комплекса; металлы с переменной валентностью участвуют в транспорте электронов; способствуют формированию нативной структуры фермента; участвуют в образовании связи между апоферментом и коферментом (табл. 1).

Таблица 1 — Кофакторы некоторых ферментов

Кофактор	Фермент
Тиаминпирофосфат	Пируватдегидрогеназа
Флавинаденинмононуклеотид (ФМН)	Моноаминоксидаза
Никотинамидадениндинуклеотид (НАД)	Лактатдегидрогеназа
Пиридоксальфосфат	Гликогенфосфорилаза
Кофермент А (КоА)	Ацетил-КоА-карбоксилаза
Биотин (витамин Н)	Пируваткарбоксилаза
5'-дезоксиаденозилкобаламин	Метилмалонилмутаза
Тетрагидрофолиевая кислота (витамин B ₉)	Тимидилатсинтаза
Zn ²⁺	Карбоксипептидаза
Mg ²⁺	Гексокиназа
Ni ²⁺	Уреаза
Se	Глутатионпероксидаза
Mn ²⁺	Супероксиддисмутаза
K ⁺	Пропионил-КоА-карбоксилаза

Кофакторы ферментов поступают в организм с пищей, а апофермент синтезируется непосредственно в нём. Апофермент определяет специфичность фермента.

Функциональная организация ферментов

Превращаемые вещества называются *субстратами*. В трёхмерной структуре

фермента выделяют несколько участков, несущих определённую функцию. В молекуле фермента присутствует *активный центр*, т. е. участок, с которым связывается субстрат и протекает каталитическая реакция.

Характеристика активного центра

1. Активный центр фермента формируется при образовании *третичной структуры* белка за счёт пространственного сближения радикалов аминокислот (чаще сер, гис, тре, цис, глу, асп, арг). Потеря конформации фермента в результате денатурации приводит к разрушению активного центра.

2. Активный центр образуется *боковыми радикалами* аминокислот, которые могут располагаться на значительном расстоянии в первичной структуре. Например, в активный центр хитотрипсина входят гис-57, асп-102 и сер-195. В состав фермента входят 246 аминокислотных остатков. Лизоцим осуществляет разрушение клеточных стенок некоторых бактерий благодаря активному центру, образованному 35, 52, 62, 63, 101 и 108 остатками аминокислот полипептидной цепи, которая включает 129 аминокислот.

3. Активный центр представляет собой полость, щель или карман, который занимает малую область фермента. Большинство ферментов состоит из более чем 100 аминокислотных остатков, имеют молекулярную массу более 10 кДа и диаметр более 2,5 нм. На область активного центра приходится всего лишь 25—100-я часть от объёма фермента.

4. Активный центр не является жёсткой структурой. Его конформация изменяется при связывании субстрата. В связывании субстрата со структурами активного центра вода обычно не участвует, за исключением случаев, когда она является реагентом.

5. У сложных ферментов в состав активного центра входят кофакторы.

6. В активном центре выделяют *контактный (якорный)* участок, связывающий субстрат и *каталитический* участок, в котором происходит превращение субстрата.

7. Субстрат связывается с активным центром фермента *нековалентными* связями. Фермент-субстратные комплексы характеризуются константами равновесия от 10^{-2} до 10^{-8} М, что соответствует свободной энергии взаимодействия от -3 до -12 ккал/моль (от -13 до 50 кДж/моль). Для ковалентных связей свободная энергия связи составляет от -50 до -110 ккал/моль (от -210 до -460 кДж/моль).

Единицы энергии: калория (кал) эквивалентна количеству тепла для подъёма температуры 1 г воды от 14,5 до 15,5 °С. Килокалория (ккал) равна 1000 кал. Джоуль (Дж) равен работе, совершаемой силой 1 Н при перемещении точки её приложения на 1 м в направлении действия силы. Килоджоуль (кДж) равен 1000 Дж. 1 ккал = 4,184 кДж.

8. Взаимодействие между ферментом и активным центром является необходимым условием для формирования переходного состояния. Взаимодействие субстратов и активного центра ферментов требует сближения (для реализации слабых взаимодействий) и наличия комплементарных функциональных групп. Субстраты связываются с активным центром, образуя фермент-субстратный комплекс. Продукт высвобождается и фермент снова используется для реакции.

Кроме активного центра у ряда ферментов имеется *регуляторный*, или *аллостерический* (от греч. *allos* — иной, чужой), центр, который в молекуле фермента пространственно разделён с активным центром. К аллостерическому центру присоединяются вещества — *эффекторы*, которые делятся на *активаторы* и *ингибиторы*. Присоединение эффектора к аллостерическому центру приводит к изменению третичной и четвертичной структур молекулы фермента и соответственно конфигурации активного центра, вызывая снижение или повышение ферментативной активности. Ферменты, имеющие аллостерический центр, называются *аллостерическими*.

Механизм действия ферментов

Изменение свободной энергии при катализируемой и некатализируемой реакциях представлено на рисунке 1.

Энергия активации — это дополнительное количество энергии, которое необходимо дать молекуле для преодоления энергетического барьера (или для достижения переходного состояния), т. е. это энергия, необходимая для перевода всех молекул моля вещества в активированное состояние. Ферменты ускоряют реакцию путём *снижения энергии активации* за счёт увеличения числа активированных молекул, которые становятся реакционноспособными на более низком энергетическом уровне.

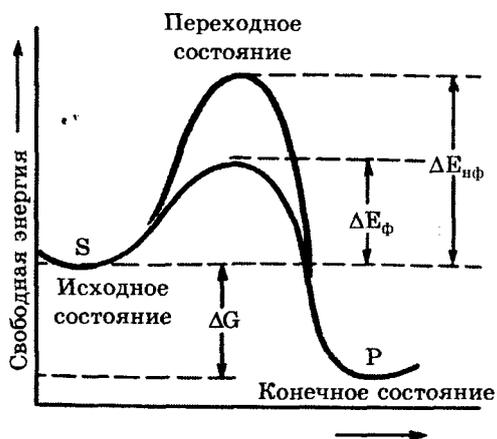
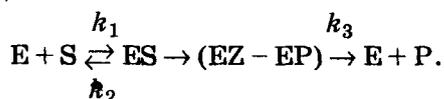


Рисунок 1 — Изменения свободной энергии катализируемой и некатализируемой реакций: S — исходный субстрат; P — продукт; $\Delta E_{нф}$ — энергия активации неферментативной реакции; $\Delta E_{ф}$ — энергия активации ферментативной реакции; ΔG — стандартное изменение свободной энергии

Ферментативный катализ идёт в три стадии:



I стадия — присоединение молекулы субстрата к молекуле фермента и образование фермент-субстратного комплекса: $E + S \rightleftharpoons ES$.

Изменение энергии активации на этой стадии незначительно. В образовании фермент-субстратного комплекса участвуют водородные связи, электростатические и гидрофобные взаимодействия. Для этой стадии важно сближение и правильная ориентация фермента и субстрата, которые значительно повышают вероятность образования продуктивного фермент-субстратного комплекса. Кроме того, связывание субстрата в активном центре приводит к удалению гидратной оболочки субстрата. В результате удаления молекул воды в активном центре фермента во время катализа создаются совершенно другие условия, чем в растворе.

Существуют две теории, объясняющие взаимодействие фермента и субстрата.

1. В соответствии с теорией Э. Фишера (1890) фермент и субстрат подходят друг к другу, как *ключ к замку*. Это означает, что структуры фермента и субстрата строго комплементарны.

2. Согласно гипотезе Д. Кошланда (1958) «*индуцированного*» или «*вынужденного*» соответствия, фермент изменяет конформацию активного центра при присоединении субстрата, в результате чего происходит перестройка молекул субстрата.

Доказательства существования фермент-субстратного комплекса

1. При одинаковой концентрации фермента скорость реакции повышается с увеличением концентрации субстрата по гиперболической зависимости, а не катализируемая ферментом реакция не даёт такого эффекта насыщения, наличие которого свидетельствует в пользу образования дискретного ES-комплекса. Если все каталитические центры фермента будут заняты, скорость реакции не будет повышаться, а останется постоянной.

2. С помощью современных рентгеновских кристаллографических исследований доказано наличие фермент-субстратных комплексов при действии многих ферментов.

3. Методы спектроскопического анализа доказали наличие фермент-субстратных комплексов по изменениям спектров поглощения или флуоресценции в процессе катализируемой реакции.

II стадия — преобразование фермент-субстратного комплекса в один или несколько последовательных (переходных) комплексов с формированием на поверхности фермента конечного продукта реакции:



Эта стадия протекает наиболее медленно. В её процессе происходит образование переходных состояний, при этом важным фактором является их стабилизация вследствие взаимодействия функциональных групп субстрата и фермента. Переходное состояние в случае ферментативной реакции требует меньшей энергии активации.

Механизмы действия ферментов на этой стадии объясняются *эффектом деформации субстрата, кислотно-основным и ковалентным катализом*. Эффект деформации субстрата (или так называемая теория «дыбы») объясняет действие гидролаз, лиаз и трансфераз.

После связывания с активным центром молекула субстрата как бы растягивается на активном центре фермента. Чем больше длина межатомной связи в субстрате, тем меньше энергия её разрыва.

Многие ферменты во время катализа переносят специфические группировки с субстрата или на него. Особенно часто осуществляется перенос протонов. Этот ферментативный *кислотно-основный катализ* более эффективен, чем обмен протонов с кислотами и основаниями в растворе. При закреплении субстрата в активном центре на его молекулу влияют электрофильные и нуклеофильные группы каталитического участка, что вызывает перераспределение электронной плотности на участках субстрата, атакуемого кислотно-основными группами. Отсюда понятно, что кислотно-основный катализ заключается в том, что молекулы, отличные от воды, могут играть роль доноров или акцепторов протонов в процессе катализа. Так, в активном центре химотрипсина остаток гистидина повышает нуклеофильную мощь остатка серина (рис. 2).

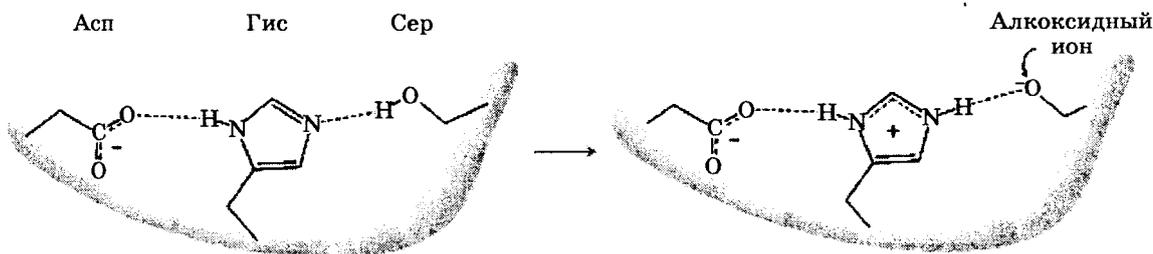


Рисунок 2 — В активном центре химотрипсина 3 аминокислотных остатка (асп 102, гис 57 и сер 195)

Часто химические группировки ковалентно присоединяются к остаткам фермента. Это явление называют *ковалентным катализом*, который подразумевает наличие реактивных групп в активном центре, чаще всего нуклеофильного типа. Они вступают во временные ковалентные связи с субстратом в процессе катализа (так реализуется протеолитическое действие химотрипсина). Ковалентные фермент-субстратные комплексы очень неустойчивы и легко распадаются.

Роль ионов металлов заключается в том, что они могут быть электрофильными участниками превращений; участвовать в стабилизации отрицательного заряда в промежуточном метаболите; обеспечивать связывание субстрата и др.

Правильная ориентация двух разных субстратов путём связывания их с соответствующими функциональными группами активного центра существенно повышает скорость ферментативной реакции.

Вторая стадия лимитирует скорость всего катализа.

III стадия — отделение продукта реакции от фермента: $EP \rightarrow E + P$.

Стадия непродолжительна и определяется скоростью диффузии продуктов реакции в окружающую среду.

Кинетика ферментативных реакций

Основная функция ферментов заключается в повышении скорости химических реакций в соответствии с потребностями живого организма. Для понимания функционирования ферментов изучают кинетику их активности.

В 1913 году Леонор Михаэлис и Мауд Ментен предложили простую модель расчёта кинетических характеристик. По их представлениям, для ферментативного катализа необходимо ввести понятие фермент-субстратного комплекса (ES).

Скорость ферментативных реакций зависит от концентрации фермента, субстрата, температуры, pH, наличия активаторов и ингибиторов.

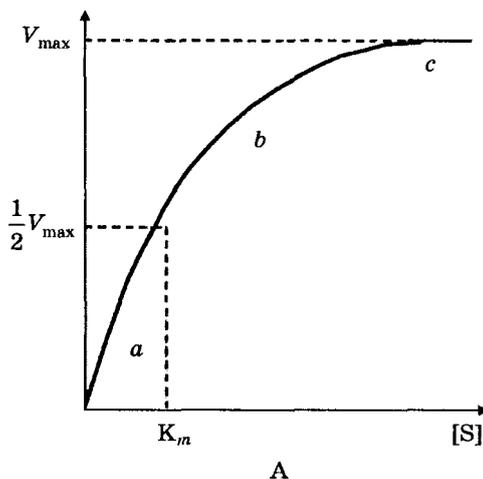


Рисунок 4 — Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата

На графике выделяют три участка. При низкой концентрации субстрата (участок a) скорость реакции прямо пропорциональна концентрации субстрата и подчиняется кинетике первого порядка. На участке b (реакция смешанного порядка) эта зависимость нарушается, на участке c скорость реакции максимальна и не зависит от концентрации субстрата.

Зависимость скорости реакции от концентрации фермента

В условиях избытка субстрата скорость реакции прямо пропорциональна концентрации фермента (рис. 3).

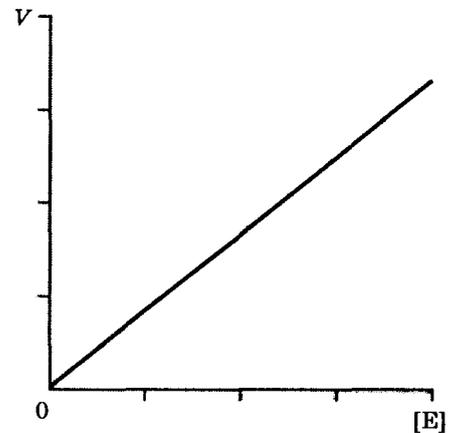
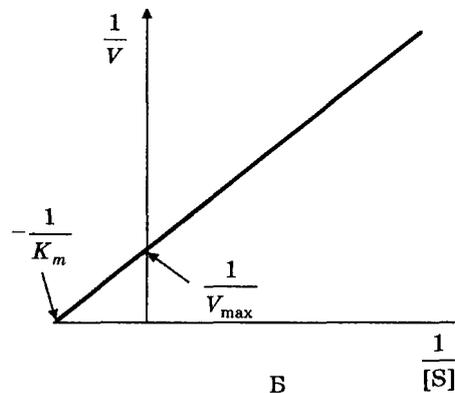


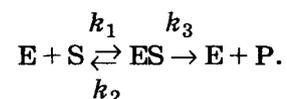
Рисунок 3 — Зависимость скорости реакции от концентрации фермента

Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата

Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата представлена на рисунке 4.



Ферментативная реакция характеризуется формированием фермент-субстратного комплекса [ES], который распадается с образованием свободного фермента и продукта реакции:



В этом уравнении k_1 — константа скорости образования фермент-субстратного комплекса, k_2 — константа диссоциации фермент-субстратного комплекса с образованием свободного фермента и субстрата и k_3 — константа скорости диссоциации фермент-субстратного комплекса до свободного фермента и продукта реакции.

Михаэлис и Ментен предложили уравнение, которое описывает зависимость скорости реакции от концентрации субстрата:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_s + [S]}, \text{ или } v = \frac{V_{\max}}{K_s + \frac{1}{[S]}}$$

где v — скорость реакции при данной концентрации субстрата; K_s — константа диссоциации фермент-субстратного комплекса; V_{\max} — максимальная скорость реакции.

$$K_s = \frac{k_2}{k_1}, \text{ т. е. отношение константы}$$

обратной реакции к константе прямой реакции.

Однако данное уравнение описывает только участок *a* на графике и не учитывает влияния на скорость ферментативного процесса продуктов реакции.

Холдейн и Бриггс заменили в уравнении константу диссоциации на константу Михаэлиса (K_m):

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}, \text{ или } v = \frac{V_{\max}}{K_m + \frac{1}{[S]}}$$

Зависимость скорости реакции от температуры

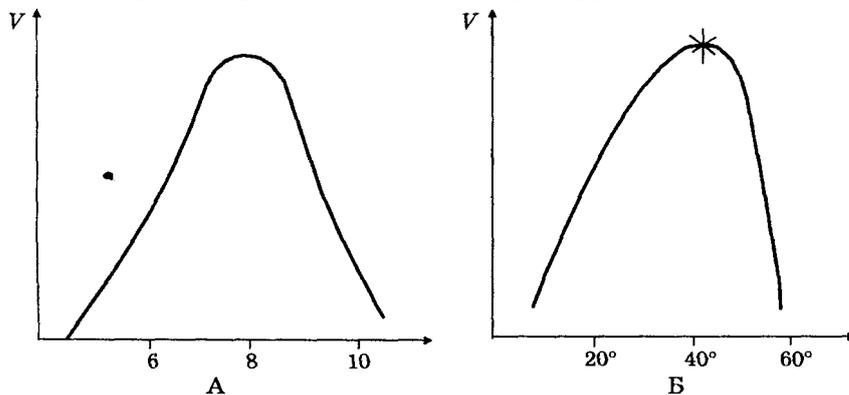


Рисунок 5 — Зависимость скорости реакции от pH (А) и температуры (Б)

Константа Михаэлиса численно равна концентрации субстрата, при которой скорость реакции равна половине максимальной. Константа Михаэлиса характеризует сродство фермента к субстрату. Высокое сродство фермента к субстрату характеризуется низкой величиной K_m и наоборот. Этот подход можно использовать при анализе любых взаимодействий между молекулами и лигандами, характеризующихся гиперболической зависимостью (эффекты насыщения мест связывания).

Использование графика, предложенного Михаэлисом и Ментен, неудобно. Для более удобного графического представления Г. Лайнуивер и Д. Бэрк преобразовали уравнение Холдейна и Бриггса по методу двойных обратных величин, исходя из того принципа, что если существует равенство между двумя величинами, то и обратные величины также будут равны (рис. 4, Б):

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max} \cdot [S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Зависимость скорости реакции от pH среды

Графическое изображение зависимости скорости реакции от температуры имеет колоколообразную форму. Значение pH, при котором фермент проявляет максимальную активность, называется *оптимумом pH* (рис. 5, А). Для большинства ферментов оптимум pH равен 6—8. Исключение составляет пепсин, оптимум которого составляет 2,0. При изменении pH в ту или другую сторону от оптимума скорость реакции уменьшается вследствие ионизации функциональных групп фермента и субстрата, что нарушает образование фермент-субстратного комплекса.

Скорость химической реакции увеличивается в 2 раза при повышении температуры на 10 °С. Однако вследствие белковой природы фермента при её дальнейшем увеличении наступает денатурация фермента. Температура, при которой скорость реакции максимальна, называется *температурным оптимумом* (рис. 5, Б). Для большинства ферментов оптимум температуры равен 37—40 °С. Исключение составляет миокиназа мышц, которая выдерживает нагревание до 100 °С.

Регуляция активности ферментов

Главным в регуляции жизнедеятельности клетки является её способность адаптировать активность ферментов в ответ на внутренние и внешние сигналы. Скорость биохимических реакций внутри организма регулируется поступлением питательных веществ и потребностями в метаболитах для роста и деления клетки.

Активность ферментов в клетке может регулироваться двумя основными путями: 1) присоединением эффекторных молекул, которые повышают или понижают активность ферментов и 2) путём ковалентной модификации (фосфорилирование, ацетилирование, метилирование). Регуляция активности ферментов путём связывания эффекторных молекул является универсальным и основным механизмом контроля метаболической активности клеток. Эффекторными молекулами являются низкомолекулярные органические молекулы, ионы металлов и белки. Связываясь со специфическими ферментами, эффекторы активируют или ингибируют ферментативную активность.

Активаторы ферментов — это вещества, формирующие активный центр фермента (Co^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+}), облегчающие образование фермент-субстратного комплекса (Mg^{2+}), восстанавливающие SH-группы (глутатион, цистеин, меркаптоэтанол), стабилизирующие нативную структуру белка-фермента. Активируют фермента-

тивные реакции обычно катионы (в таблице Менделеева с 19 по 30 элемент). Анионы менее активны, хотя ионы хлора и анионы некоторых других галогенов могут активировать пепсин, амилазу, аденилатциклазу. Активаторами могут выступать белки — апопротеин А-I (ЛХАТ) и апопротеин С-II (ЛПЛ).

Механизм действия активаторов:

- участвуют в формировании активного центра ферментов;
- облегчают связывание субстрата и фермента;
- участвуют в формировании нативной структуры фермента.

Ингибиторы — вещества, вызывающие частичное или полное торможение реакций, катализируемых ферментами. Они классифицируются на *неспецифические* и *специфические*. Действие неспецифических ингибиторов не связано с механизмом действия ферментов, они вызывают денатурацию белка-фермента (нагревание, кислоты, щёлочи, соли тяжёлых металлов и др.).

Специфические ингибиторы влияют на механизм действия ферментов. Они делятся на две группы: *обратимые* и *необратимые*. *Необратимые* ингибиторы вызывают стойкое необратимое изменение или модификацию функциональных групп фермента путём прочного или ковалентного связывания. К этой группе относятся:

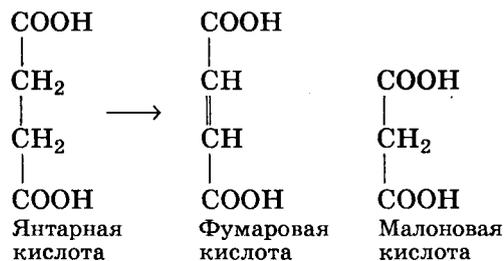
- ингибиторы металлосодержащих ферментов (HCN , RCN , HF , CO и др.). Эти соединения связываются с металлами с переменной валентностью (Cu или Fe), в результате чего нарушается процесс переноса электронов по дыхательной цепи ферментов. Поэтому их называют дыхательными ядами;
- ингибиторы ферментов, содержащих SH-группы (моноиодацетат, диiodацетат, иодацетамид, соединения мышьяка и ртути);
- ингибиторы ферментов, содержащих OH-группу в активном центре (фосфоорганические соединения, инсектициды). Они тормозят, прежде всего, активность холинэстеразы — фер-

мента, играющего первостепенную роль в деятельности нервной системы.

Обратимое ингибирование поддается количественному изучению на основе уравнения Михаэлиса—Ментен. Обратимые ингибиторы делятся на *конкурентные и неконкурентные*.

Конкурентные ингибиторы — это вещества, по структуре похожие на субстрат. Ингибитор связывается с активным центром фермента и препятствует образованию фермент-субстратного комплекса.

Классическим примером конкурентного ингибирования является торможение сукцинатдегидрогеназы малоновой кислотой. Сукцинатдегидрогеназа катализирует окисление янтарной кислоты (сукцината) путём дегидрирования в фумаровую кислоту.



Если в среду добавить малоновую кислоту (ингибитор), то в результате структурного сходства с истинным субстратом сукцинатом она будет реагировать с активным центром, образуя фермент-ингибиторный комплекс, однако реакция происходить не будет.

Действие ингибитора устраняется *увеличением концентрации субстрата*. При конкурентном ингибировании изменяется кинетика ферментативных реакций: *увеличивается K_m , V_{max} остаётся постоянной* (рис. 6).

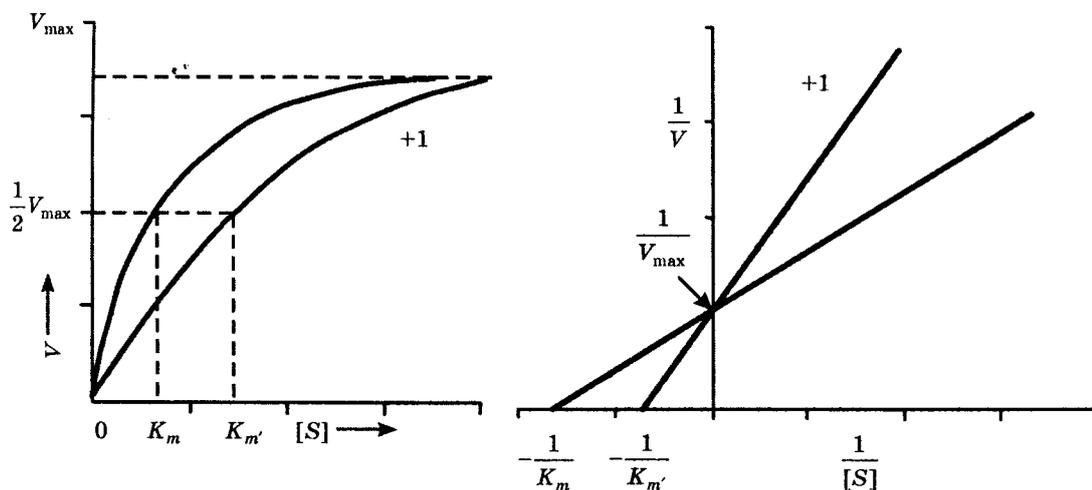
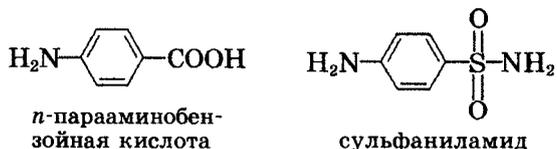


Рисунок 6 — Влияние конкурентных ингибиторов на скорость ферментативной реакции

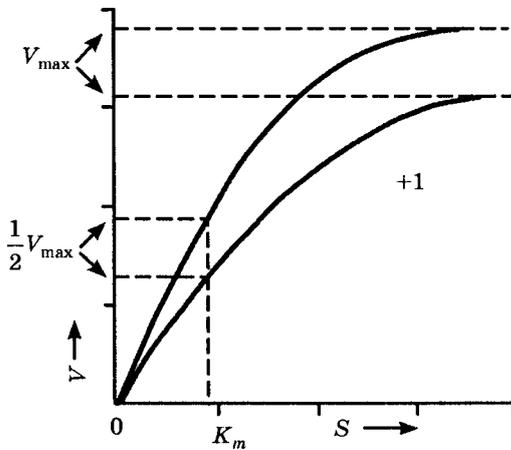
Метод конкурентного ингибирования нашёл применение в медицинской практике, в качестве *антиметаболитов*. Многие лекарственные вещества ингибируют ферменты человека и животных по конкурентному типу. Примером являются сульфаниламидные препараты, которые имеют структурное сходство с парааминобензойной кислотой (ПАБК).



Бактериальная клетка использует ПАБК для синтеза фолиевой кислоты, необходимой для образования нуклеиновых кислот. Благодаря структурному сходству сульфаниламид ингибирует ферменты метаболизма парааминобензойной кислоты, что приводит к снижению синтеза фолиевой кислоты, нуклеиновых кислот и гибели микроорганизма.

Неконкурентные ингибиторы — вещества, не имеющие структурного сходства с субстратами. Они связываются не в активном центре, а в другом месте молекулы фермента, например в аллостерическом центре.

ком центре. Это изменяет конформацию активного центра, что приводит к нарушению взаимодействия с ним субстрата.



При неконкурентном ингибировании V_{max} уменьшается, а K_m не изменяется (рис. 7).

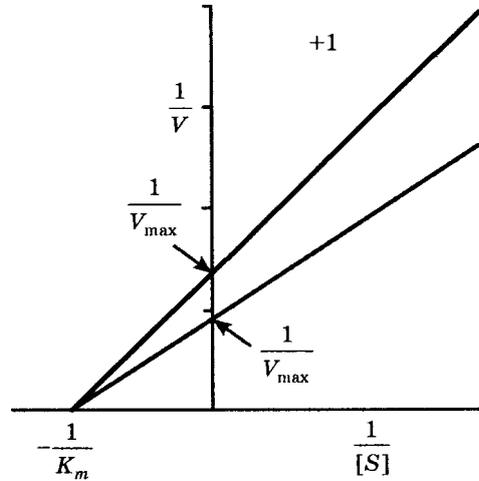


Рисунок 7 — Влияние неконкурентных ингибиторов на скорость реакции

Активация проферментов происходит путём отщепления части полипептидной цепи от молекулы предшественника с образованием активного центра фермента. Этот путь характерен для протеолитических ферментов, которые синтезируются в неактивной форме (проферменты) в желудке и поджелудочной железе и участвуют в переваривании белков. Синтез в виде проферментов исключает самопереваривание органов. Например, в поджелудочной железе вырабатывается химотрипсиноген. В кишечнике под действием трипсина последовательно происходит отщепление двух дипептидов и образуются три полипептидные цепи, соединённые дисульфидными мостиками. Это изменяет конформацию молекулы и формирует её активный центр, в состав которого входит серин, гистидин и аспарагиновая кислота.

Химическая модификация заключается в присоединении к ферменту или отщеплении от него низкомолекулярной молекулы (чаще фосфорной кислоты), при котором происходит активация или ингибирование фермента. Например, фермент, участвующий в синтезе гликогена — гликогенсинтаза — при присоединении фосфорной кисло-

ты становится неактивным, а фермент распада гликогена — фосфорилаза — активным.

Аллостерическая регуляция происходит путём присоединения к аллостерическому центру фермента эффекторов — активаторов и ингибиторов. Если в роли активатора выступают молекулы субстрата — происходит гомотропная активация, если какой-то другой метаболит — гетеротропная. Для аллостерических ферментов кривая насыщения субстратом представляет собой сигмовидную кривую, а не гиперболу, как для нерегуляторных ферментов.

Признаки аллостерической регуляции

1. Аллостерические ферменты состоят из двух или более, часто симметричных, субъединиц, т. е. имеют четвертичную структуру.

2. Субъединицы фермента могут находиться в двух конформациях: R и T. Конформация R (relax — расслабление) обладает высоким сродством к субстрату, конформация T (tense — напряжение) — низким сродством. Формы R и T могут переходить друг в друга.

3. Эффекторы связываются с T- и R-конформациями фермента. Аллостерический ингибитор связывается преимущественно с T-конформацией и стабилизирует её.

лизирует её. В присутствии ингибитора большая часть молекул находятся в Т-конформации, что снижает сродство фермента к субстрату. Аллостерический активатор связывается преимущественно с R-формой.

4. Субъединицы аллостерических ферментов связаны между собой нековалентными связями. Изменение конформации одной субъединицы приводит к изменению конформации соседних субъединиц (кооперативный эффект).

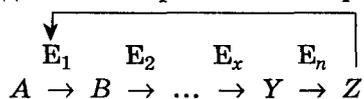
Предложено две модели кооперативного эффекта.

Симметричная модель (Ж. Моно, Д. Уайман, Ж.-П. Шанжэ) — субъединицы должны находиться в одном и том же конформационном состоянии, т. е. возможны состояния RR и TT и невозможно состояние RT. В отсутствие субстрата почти все молекулы фермента находятся в Т-форме. Добавление субстрата приводит к переходу Т-формы в R-форму одновременно всех субъединиц.

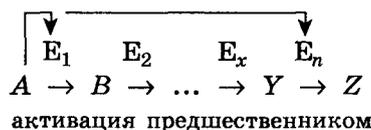
Последовательная модель (Д. Кошланд), согласно которой каждая субъединица может существовать в одном из возможных конформационных состояний (R или T). Связывание субстрата изменяет форму той субъединицы, к которой он присоединяется. Конформация другой субъединицы при этом не меняется. Конформационные изменения, вызванные связыванием субстрата на одной субъединице, могут увеличить или уменьшить сродство к субстрату другой субъединицы той же молекулы фермента.

Регуляция активности по принципу обратной связи (ретроингибирование). Во многих биосинтетических процессах основным типом регуляции скорости многоступенчатого процесса является ингибирование по принципу обратной связи, когда конечный продукт связы-

вается с активным центром фермента и ингибирует его. Такие ферменты называются ключевыми, находятся на первых этапах метаболического пути и определяют скорость всего процесса.



Активация предшественником (фрактивация) — первый метаболит в многоступенчатом процессе активирует фермент, катализирующий последнюю стадию.



Единицы измерения активности ферментов

Для выражения концентрации фермента используют стандартную международную единицу и катал.

Стандартная международная единица (Е или U) — количество фермента, которое в оптимальных условиях катализирует превращение 1 мкмоль субстрата в минуту (мкмоль/мин).

Катал — количество фермента, которое в оптимальных условиях катализирует превращение 1 моль субстрата в секунду (моль/сек). 1 Е фермента соответствует 16,67 катал.

Для выражения активности фермента используют удельную и молярную активности.

Удельная активность — число единиц ферментативной активности на 1 мг белка.

Молярная активность (число оборотов) — число молекул субстрата, подвергающихся превращению одной молекулой фермента в секунду (табл. 2).

Таблица 2 — Взаимосвязь между числом оборотов и величиной Км

Фермент	Субстрат	Км (мкмоль)	Число оборотов (с)
Лизоцим	Гекса-N-ацетилглюкозамин	6	0,5
Пенициллиназа	Бензилпенициллин	50	2000
Карбоангидраза	CO ₂	8000	600 000

Применение ферментов

Ферменты в течение многих лет применяются в различных областях практической деятельности человека: в кожевенной, пищевой, текстильной, фармацевтической и других отраслях промышленности, а также в медицине, сельском хозяйстве. Эффективность действия ферментов многократно выше по сравнению с химическими катализаторами, однако их промышленное применение затруднено из-за их неустойчивости при хранении и температурных воздействиях.

Применение ферментов в медицине

Энзимодиагностика — исследование ферментов в биологических средах организма с диагностической целью.

Нормальные уровни активности ферментов в сыворотке крови отражают соотношение между биосинтезом и высвобождением ферментов (при обычном обновлении клеток), а также их клиренсом из кровотока. Повышение скорости обновления ферментов, повреждения клеток или индуцирование синтеза обычно приводят к повышению активности ферментов в сыворотке крови, в которой выделяют три группы ферментов: **клеточные, секреторные и экскреторные.**

1 Н Н Н Н; 2 Н Н Н М; 3 Н Н М М; 4 Н М М М; 5 М М М М
 СЕРДЦЕ —————> ЛЁГКИЕ <————— ПЕЧЕНЬ

В зависимости от физиологического состояния, возраста, особенностей среды обитания в организме устанавливаются определённые соотношения изоферментов, что оптимизирует катализируемые превращения веществ. Следовательно, изменение соотношения изоферментов во всём организме или в отдельных тканях и органах является способом регуляции действия ферментов. Исследование множественных молекулярных форм ферментов и изоферментов используется в медицине для поиска повреждённых тканей.

4) ферменты, локализованные в органеллах клеток (окислительно-вос-

становительные в митохондриях; кислые гидролазы в лизосомах и др.), выходя в кровь, сигнализируют о глубоком поражении клетки. В сыворотке крови активность клеточных ферментов низкая или вообще отсутствует. При патологических процессах активность ферментов этой группы в сыворотке крови зависит от скорости их высвобождения из клеток, которая, в свою очередь, определяется скоростью повреждения клеток, и от степени повреждения клетки.

Клеточные ферменты в зависимости от локализации в тканях делятся на несколько групп:

1) неспецифические ферменты, которые катализируют общие для всех тканей реакции обменов белков, углеводов, липидов и находятся в большинстве органов и тканей. При повреждении мембран клеток и гистогематических барьеров эти ферменты появляются в крови или их количество повышается. Определение повышенного количества этих ферментов в крови не позволяет локализовать патологический процесс;

2) органоспецифические, или индикаторные, ферменты специфичны только для определённого типа тканей. Как правило, они катализируют реакции, обеспечивающие специфические функции органа. В клетках других органов этих ферментов нет или находятся лишь их следы. Выход органоспецифических ферментов в кровь сигнализирует о поражении определённого органа;

3) изоферменты — группа или семейство ферментов с четвертичной структурой, которые катализируют одну и ту же реакцию, но отличаются по строению (т. е. первичной структуре) субъединиц и физико-химическим свойствам. Например, фермент лактатдегидрогеназа состоит из четырёх субъединиц двух типов Н (от *heart* — сердце) и М (от *muscle* — мышца) и возможно 5 вариантов, т. е. изоферментов:

Секреторные ферменты (псевдохолинэстераза) поступают непосредственно

в плазму крови и выполняют в ней специфические функции. Синтезируясь в печени, они постоянно высвобождаются в плазму. Их активность в сыворотке крови выше, чем в клетках или тканях. Для судебно-биохимических исследований они представляют интерес в случае снижения их активности в сыворотке крови (ниже нормы) за счёт нарушения функции печени.

Экскреторные ферменты образуются органами пищеварительной системы (поджелудочной железой, слизистой оболочкой кишечника, печенью, эндотелием желчных путей). К ним относятся α -амилаза, щелочная фосфатаза. В норме их активность в сыворотке крови низкая и постоянная. Однако при патологии, когда блокирован любой из обычных путей экскреции, активность этих ферментов в сыворотке крови значительно увеличивается.

Наследственные энзимопатии. Ряд пороков обмена веществ является результатом наследственного дефицита определённых ферментов. В этом случае диагноз ставится, главным образом, на основе исследования показателей обмена этих ферментативных реакций (биохимический диагноз).

Энзимотерапия — использование ферментов и метаболитов в качестве лечебных средств:

- в заместительной терапии при болезнях желудочно-кишечного тракта (пепсин, трипсин, химотрипсин, амилаза, липаза);

- для очистки ран, воздействия на избыточно разрастающуюся соединительную ткань (гиалуронидаза, трипсин, химотрипсин);

- в качестве регуляторов (активаторы и ингибиторы) ферментов, например ингибиторы моноаминоксидазы при нервных и психических заболеваниях; тканевые ингибиторы протеиназ (трасилол, инипрол, контрикал и др.) используют при лечении панкреатита, эмфиземы лёгких, инфаркте миокарда. Ингибиторы протеолитических ферментов играют важную роль в медицине. По своему строению они похожи на

истинные субстраты ферментов. Например, каптоприл является ингибитором ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) и используется для лечения артериальной гипертензии; криксиван является ингибитором HIV-протеазы и используется при лечении СПИДА (HIV — вирус иммунодефицита человека); ингибитор трипсина животного и растительного происхождения используется при лечении панкреатита;

- иммобилизованные ферменты — это ферменты, связанные с твёрдым носителем или спрятанные в полимерную капсулу. При их введении в кровь они не разрушаются, а, накопившись в патологическом очаге (например, у тромба), оказывают определённый эффект.

Для получения иммобилизованных ферментов используются многочисленные носители различной природы, которые должны быть устойчивы к воздействию химических и биологических факторов, иметь высокую проницаемость для ферментов и субстратов, а также переходить в активированное состояние.

Органические полимерные носители разделяют на природные и синтетические. К природным носителям относятся полисахариды, белки и липиды. Наиболее часто для иммобилизации на основе полисахаридов используют агарозу, целлюлозу, декстран и их производные. Нередко для целей иммобилизации применяют хитин.

Белки как носители представляют наибольший интерес для использования их в медицине, однако они обладают высокой иммуногенностью и быстро деградируют при применении *in vivo*. Наиболее часто для иммобилизации ферментов применяют фибриллярные белки, например кератин и коллаген.

Наиболее эффективны капсулы из липидов — липосомы: ферменты внутри липосом транспортируются через клеточные мембраны и оказывают действие в клетке.

К синтетическим полимерным носителям относятся полимеры на основе стирола, производные акриловой кислоты, а также полиамидные носители.

Ферменты как аналитические реагенты широко применяются в практике лабораторных исследований при определении субстратов, нуклеотидов и пр. В настоящее время выпускается ряд наборов для определения глюкозы, этанола, молочной кислоты, АТФ и пр. Принцип их действия заключается в следующем. В исследуемом материале содержится неизвестное количество

субстрата. Чтобы определить его количество, вводят фермент, катализирующий превращение только этого субстрата, создают оптимальные условия реакции (рН, t° и др.) и регистрируют скорость реакции (по образованию продукта или изменению кофермента). Затем определяют концентрацию искомого субстрата по скорости реакции, используя калибровочный график.

Список использованной литературы

1. Филиппович, Ю. Б. Основы биохимии / Ю. Б. Филиппович. — М., Агар, Фланта, 1999. — 512 с.
2. Чиркин, А. А. Биохимия с основами молекулярной биологии : учебно-методический комплекс для студентов биологического факультета / А. А. Чиркин, Е. О. Данченко. — Витебск : ВГУ, 2006. — 295 с.
3. Berg, J. M. Biochemistry / J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer. — N.-Y. : W. H. Freeman and Company, 2002. — 1514 p.
4. Ganten, D. Encyclopedic reference of genomics and proteomics in molecular medicine / D. Ganten, K. Ruckpaul. — N.-Y. : Springer, 2006. — 4378 p.

Найден фермент, способный побороть кариес

Слизистая оболочка ротовой полости человека населена огромным количеством бактерий — около 700 видов. Наиболее опасными из них являются стрептококки (*Streptococcus mutans*), колонии которых прикрепляются к поверхности зубов в виде тончайших биоплёнок, формирующих основу зубного налёта. *S. mutans* переваривают попадающие в ротовую полость сахара и продуцируют кислоты, разрушающие зубную эмаль и вызывающие кариес.

Однако у зубов есть и бактерии-защитники. Например, в 2009 году учёные установили, что другой вид обитающих на поверхности языка и других мягких тканей ротовой полости стрептококков — *Streptococcus salivarius* — подавляет формирование бактериальных биоплёнок на поверхности зубов.

Исследователи Национального института инфекционных заболеваний в Токио, работающие под руководством Хиденобу Сенпуку (Hidenobu Senpuku), с помощью хроматографии выделили индивидуальные белки, синтезируемые *S. salivarius*, и изучили влияние каждого из них на процесс формирования разрушающих зубы биоплёнок. В результате они установили, что наиболее выраженной способностью блокировать их формирование обладает фермент FruA, расщепляющий сложные углеводы.

Более того, оказалось, что вариант фермента FruA, продуцируемый распространённым грибом аспергиллусом чёрным (*Aspergillus niger*) и производимый в форме коммерческого продукта, также подавляет формирование биоплёнок, несмотря на определенное отличие его аминокислотного состава от состава бактериального фермента. Исследователи считают, что наличие готового коммерческого фермента FruA ускорит процесс разработки антикариесных зубных паст нового поколения.

http://rnd.cnews.ru/natur_science/news
Подготовила Н. А. Ильина