

**Учреждение образования  
«БЕЛОРУССКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ  
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ»**

**Кафедра химии**

# **ХИМИЯ**

**Теоретический раздел  
Лекция  
Ферменты. Строение и свойства.  
Кинетика ферментативных реакций.**

## Ферменты

Большинство реакций в живых организмах являются ферментативными, то есть протекают при участии ферментов – катализаторов белковой природы. Все реакции в живых организмах протекают в водной среде, в том числе и реакции окисления, при относительно невысоких температурах. Энергия в организмах выделяется при окислении питательных веществ (углеводов, белков, жиров) и значительная ее часть аккумулируется в виде макроэргических связей АТФ.

Материал для биохимических исследований: кровь, моча, желудочный сок, спинномозговая жидкость, синовиальная жидкость, слюна, биоптаты органов.

**Ферменты, энзимы** – специфические белки всех живых клеток, играющие роль биологических катализаторов. С их помощью осуществляется обмен веществ и энергии в организмах. Открытие ферментов было связано с процессами, идущими с выделением газов (приготовление теста, вина и т. д.). Таким образом, данное явление человек наблюдал и использовал тысячелетиями. Известно более 2000 ферментов.

*Отличие ферментативного катализа от неорганического заключается в следующем:*

- 1) ферменты действуют в мягких условиях организма ( $p$ ,  $t^\circ$ ,  $pH$ );
- 2) белки-ферменты чувствительны к денатурирующим агентам;
- 3) для действия ферментов характерна высокая эффективность;
- 4) активность ферментов контролируется (генетически на уровне строения и различными биорегуляторами);
- 5) в организме, как правило, действуют полиферментные (т. е. поликаталитические) системы, в результате чего достигается многоэтапное направленное превращение вещества с доступными для организма уровнями передачи энергии. Например, в пробирке происходит следующая реакция:  $H_2 + O_2 \rightarrow H_2O + \text{взрыв (гремучий газ)}$ ; в организме та же реакция, но за счет разбиения ее на фазы протекает без взрыва, а с запасанием энергии в виде аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ).
- 6) для действия ферментов характерна специфичность: а) *абсолютная* – фермент катализирует превращение строго определенного вещества (уреаза расщепляет только мочевины на  $CO_2$  и  $NH_3$ ); б) *относительная* – фермент катализирует превращения одного типа связей в ряду близких по химическому строению веществ (например, липаза катализирует разрыв сложноэфирных связей независимо от типа радикала).

По строению ферменты-белки бывают простыми (целиком состоят из активного центра (АК) и сложными (содержат также небелковую группу). Для сложных белков-ферментов используют следующие обозначения: *апофермент* – полипептидная часть молекулы фермента; *кофактор* – небелковая часть сложного белка-фермента; *холофермент* – прочный природный комплекс апофермента и небелковой части; *простетическая группа* – прочно связанный с апоферментом кофактор (металлы и др.); *кофермент* – легко определяемый от апофермента, например диализом, кофактор. Апофермент всегда синтезируется в организме, кофакторы должны поступать с пищей.

Ферментативный катализ идет на поверхности фермента. Превращаемые вещества называются *субстратами*. Превращение субстрата происходит в области активного центра, который сформирован в третичной структуре большинства ферментов. У простых белков-ферментов активный центр образован сближенными в пространстве радикалами аминокислот первичной структуры. У сложных белков-ферментов здесь находятся кофакторы. В активном центре выделяют две части: якорная (радикалы аминокислот обеспечивают фиксацию субстрата) и каталитическая (радикалы аминокислот и кофакторы обеспечивают катализ).

Участок молекулы фермента, который специфически взаимодействует с субстратом, называется активным центром. Активный центр – это уникальная комбинация аминокислотных остатков в молекуле фермента, обеспечивающая непосредственное взаимодействие её с молекулой субстрата и принимающая прямое участие в акте катализа. У сложных ферментов в состав активного центра входит также кофактор. В активном центре условно различают каталитический участок, непосредственно вступающий в химическое взаимодействие с субстратом и участок связывания, который обеспечивает специфическое сродство к субстрату и формирование его комплекса с ферментом.

Свойства активных центров ферментов:

1. На активный центр приходится относительно малая часть общего объема фермента.
2. Активный центр имеет форму узкого углубления или щели в глобуле фермента.
3. Активный центр – это трехмерное образование, в формировании которого участвуют функциональные группы линейно удаленных друг от друга аминокислот.

4. Субстраты относительно слабо связываются с активным центром.

5. Специфичность связывания субстрата зависит от строго определенного расположения атомов и функциональных групп в активном центре.

У некоторых регуляторных ферментов имеется еще один центр, называемый аллостерическим или регуляторным. Он пространственно разделен с активным центром.

Аллостерический центр – это участок молекулы фермента, с которым связываются определенные обычно низкомолекулярные вещества (аллостерические регуляторы), молекулы которых не сходны по строению с субстратом. Присоединение регулятора к аллостерическому центру приводит к изменению третичной и четвертичной структуры молекулы фермента и, соответственно, конформации активного центра, вызывая снижение или повышение ферментативной активности.

### Механизмы действия ферментов

Ферментативная реакция протекает в три стадии:

1) образование фермент-субстратного комплекса:  $E+S \leftrightarrow ES$  – быстрая стадия, соответствующая фиксации субстрата на якорном участке активного центра. Ускорение реакции достигается за счет сближения и правильной ориентации субстратов относительно друг друга и увеличения их эффективной концентрации;

2) происходит химическая реакция через переходное состояние с образованием продукта реакции на поверхности фермента:  $ES \rightarrow EZ \rightarrow EP$  (где  $ES$  – комплекс фермента с субстратом,  $EZ$  – комплекс истинного переходного состояния,  $EP$  – комплекс между ферментом и продуктом реакции). Как правило, субстрат вступает во временные промежуточные реакции (взаимодействия) с определенными группами активного центра, в результате чего реакция требует более низкой энергии активации;

3) продукт отделяется, а фермент в неизменном виде может вновь вступать в катализ:  $EP \rightarrow E + P$ .

Факторы, влияющие на скорость ферментативных реакций

1. *Концентрация субстрата.* При увеличении концентрации субстрата и постоянной концентрации фермента скорость реакции вначале увеличивается линейно, затем переходит в реакцию смешен-

ного порядка и, достигнув максимума, превращается в реакцию нулевого порядка.

Энергия активации – это энергия, которая необходима для перевода всех молекул моля вещества в активированное состояние при данной температуре.

Таким образом, ферменты обладают высокой каталитической активностью, которая обусловлена снижением энергетического барьера – уменьшением энергии активации при образовании фермент-субстратного комплекса.

2. *Концентрация фермента.* При условии избытка скорость ферментативной реакции зависит от концентрации фермента. Эта зависимость подчиняется уравнению прямой.

3. *Температура.* Скорость химической реакции повышается в 2-4 раза при повышении температуры на 10°C. Однако из-за белковой природы фермента повышение температуры приведет к тепловой денатурации молекул фермента. Поэтому оптимум температуры для ферментов растений при 45-50°C, а для ферментов теплокровных ≈37°C. Исключение: миокиназа мышц, выдерживает температуру 100°C.

4. *pH среды.* Ферменты подобно всем белковым молекулам несут заряженные группы. Общий заряд белковой молекулы зависит от pH среды. Зависимость скорости ферментативной реакции от величины pH среды носит колоколообразный характер. Основное количество ферментов проявляют максимальную активность в узком диапазоне pH – оптимум pH. Для большинства из них оптимум pH 7,4, однако для пепсина – 1-1,5, для трипсина – 8,6.

Активаторы ферментов – это вещества: 1) формирующие активный центр фермента (Co, Mg, Zn, Fe, Ca ); 2) облегчающие образование фермент-субстратного комплекса (Mg); 3) восстанавливающие – группы (глутатион, цистеин); 4) стабилизирующие нативную структуру белка-фермента.

Ингибиторы ферментов – это соединения, которые, взаимодействуя с ферментом, препятствуют образованию нормального фермент-субстратного комплекса, уменьшая тем самым скорость реакции или прекращение ее. Ингибиторы делят на две группы: **неспецифические**, вызывающие денатурацию белка-фермента (соли тяжелых металлов, кислоты, щелочи и др.); их действие не связано с механизмами ферментативного катализа; **специфические**, действие которых связано с механизмами ферментативного катализа.

#### 4. Классификация ферментов.

Ранее ферменты назывались по наименованию субстрата с добавлением суффикса – *аза*. Позже ферменты, катализирующие сходные реакции, получили название по типу реакции: дегидрогеназы, оксидазы, декарбоксилазы и др. Международный совет биохимиков предложил положить в основу наименования и классификации ферментов тип химической реакции и ее механизм.

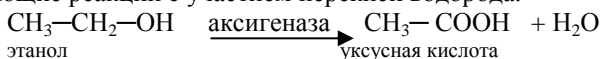
Реакции и ферменты, их катализирующие, делят на 6 классов, каждый из которых состоит из 4-13 подклассов: оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы, лигазы (синтетазы).

Таблица 4.5. Международная классификация ферментов

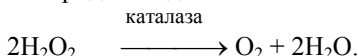
№	Класс	Тип катализируемой реакции
1	Оксидоредуктазы	Перенос электронов и протонов
2	Трансферазы	Перенос групп атомов, отличных от атомов водорода
3	Гидролазы	Гидролиз различных связей (с участием молекулы воды)
4	Лиазы	Образование двойных связей за счет удаления групп или добавление групп за счет разрыва двойных связей
5	Изомеразы	Внутримолекулярный перенос групп с образованием изомерных форм
6	Лигаза (синтетазы)	Соединение двух молекул и образование связей C–C, C–O, C–S и C–N, сопряженных с разрывом пирофосфатной связи АТФ

Класс	Реакции	Основные подклассы, группы.
Оксидоредуктазы.	Окислительно-восстановительные реакции. Авосст + Вокис → Аокис + Ввосст	Дегидрогеназы, оксидазы, редуктазы, гидроксилазы: никотинамидадениндинуклеотид (НАД), тиаминпирофосфат, флавинонуклеотид (ФМН) и флавинадениндинуклеотид (ФАД).
Трансферазы	Перенос групп А-В + С → А + В-С	Киназы (фосфатные группы), трансминазы (аминогруппы)
Гидролазы	Гидролиз связей (эфирных, пептидных, гликозидных связей C-C, P-N) А-В + Н <sub>2</sub> O → А-Н + В-ОН	Эстеразы, фосфатазы, протеазы, липазы, нуклеазы, тилолазы
Лиазы	Разрыв связей C-C, C-O, C-N, C-S путем элиминирования молекулы с образованием двойных связей. В обратной реакции ускоряют присоединение воды, аммиака и т.д. по двойной связи А(ХН) – В → А-Х + В –Н	Альдегидлиазы, (альдолазы), углерод-кислородлиазы (фумараза), дегидратазы (енолаза), декарбоксилазы
Изомеразы	Взаимопревращения изомеров А ↔ Изо -А	Изомеразы, мутазы.
Лигаза (синтетазы)	Соединение двух молекул, сопряжен с гидролизом АТФ А + В+ АТФ → А – В + АДФ + Ф	Карбоксилазы, синтетазы

1.1. **Оксидоредуктазы** катализируют окислительно-восстановительные реакции с участием двух субстратов А и В: А восст. + В окисл.  $\leftrightarrow$  А окисл. + В восст. Различают следующие основные оксидоредуктазы: оксидазы (аэробные дегидрогеназы), которые катализируют перенос протонов (электронов) на кислород; анаэробные дегидрогеназы, катализирующие перенос протонов (электронов) на промежуточный субстрат, но не на кислород; цитохромы, обеспечивающих перенос только электронов; каталаза и пероксидаза, катализирующие реакции с участием перекиси водорода.

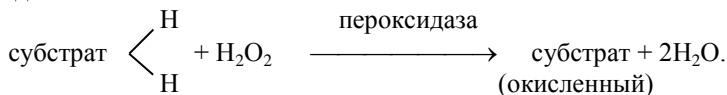


Каталаза – фермент, катализирующий окисление пероксида водорода с образованием кислорода и воды

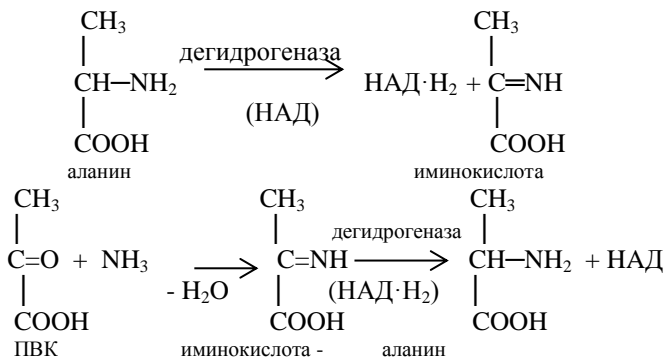


Фермент присутствует во многих тканях и эритроцитах крови, где обезвреживает постоянно образующийся в процессе окисления веществ пероксид водорода.

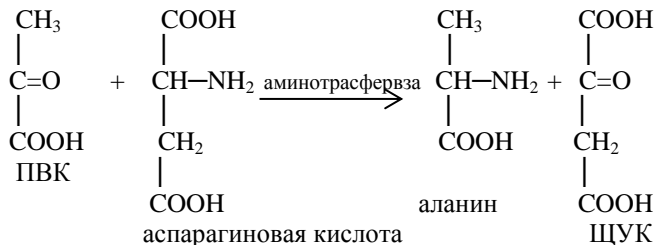
Пероксидаза – фермент, ускоряющий реакцию окисления веществ (фенолов, аминов, альдегидов и т. д.) в присутствии пероксида водорода по схеме:



Фермент содержится во многих тканях, в молоке, лейкоцитах, корне хрена. Обнаружить пероксидазу крови можно бензидином, который в присутствии пероксидазы окисляется до соединения оранжевого цвета.

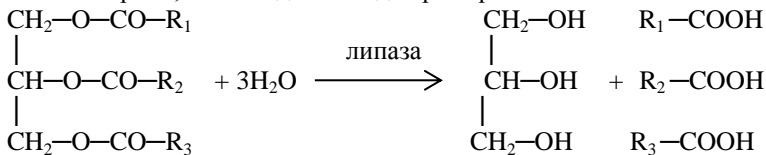




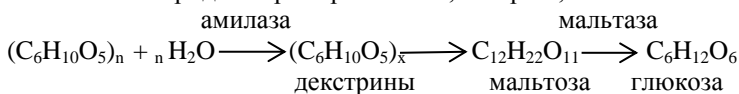


1.3. **Гидролазы** катализируют гидролиз эфирных, сложноэфирных. Пептидных и гликозидных связей, кислородных ангидридов, связей С-С, С-галоген, т. Е. расщепление внутримолекулярных связей с участием воды. Например, ацетилхолин + H<sub>2</sub>O ↔ холин + уксусная кислота. К этому классу относят:

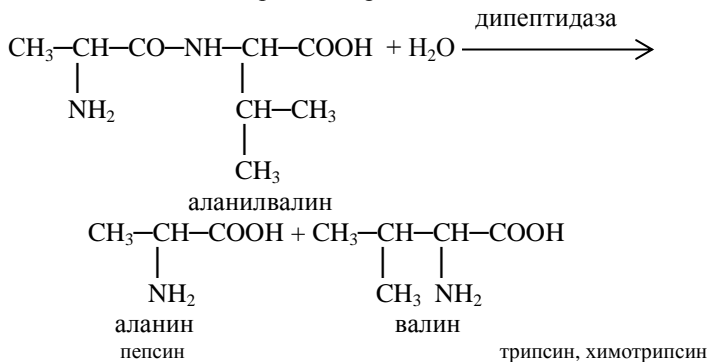
1.3.1. эстеразы, гликозидазы и т.д. Пример: липаза.

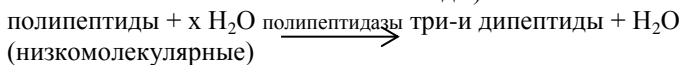
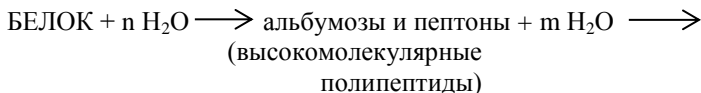


1.3.2. Гликозидазы - расщепляют гликозидные связи в молекулах поли- и олигосахаридов. Пример: амилаза, сахараза, мальтаза.



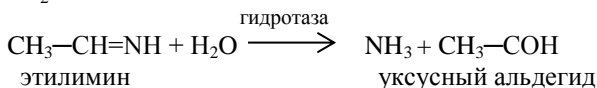
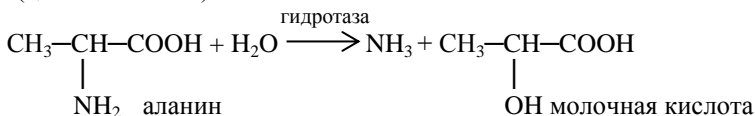
1.3.3. Пептидазы - катализируют гидролиз пептидных связей. Пример: карбоксипептидаза, химотрипсин, трипсин.





дипепсидаза аминокислоты

1.3.4. Амидазы - расщепляют амидные связи (CO-NH<sub>2</sub>). Пример: аргиназа (цикл мочевины).



муравьиный альдегид                      гидратная формула муравьиного альдегида

1.4. **Лиазы** - катализируют реакции расщепления молекул без присоединения воды. Эти ферменты имеют небелковую часть в виде тиаминпирофосфата (В1) и пиридоксальфосфата (В6).

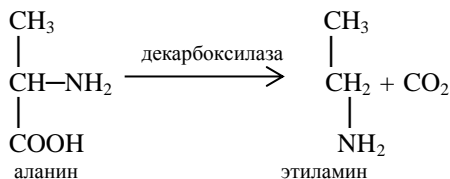
Лиазы отщепляют группы от субстратов по негидролитическому (без участия воды) механизму, с образованием двойных связей. Фермент действует на связи С-С, С-галоген и т.д. Например, L-малат ↔ фумарат + H<sub>2</sub>O.

1.4.1.К этому классу относят декарбоксилазы и др. Пример: пируватдекарбоксилаза.

1.4.2. Лиазы связи (гидратазы-дегидратазы) С-О. Пример: енолаза.

1.4.3. Лиазы связи С-N.

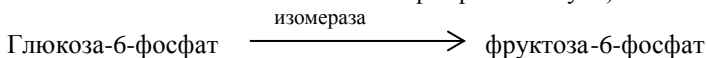
1.4.4. Лиазы связи С-S.



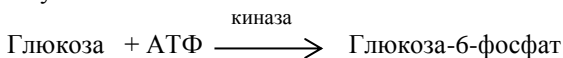


1.5. **Изомеразы** катализируют различные типы оптических, геометрических и позиционных изомеров (цис, транс). К классу относят мутазы, рацемазы, эпимиразы.

Пример: фосфопентозоизомераза, пентозофосфатизомераза (ферменты неокислительной ветви пентозофосфатного пути).



1.6. **Лигазы** катализируют соединения двух молекул, сопряженное с разрывом пирофосфатной связи АТФ или другого макроэргического соединения. Например, АТФ + L-глутамат + NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ↔ АДФ + ортофосфат + L-глутамин.



Предложено новое определение международной единицы фермента – катал (кат), соответствующее количеству фермента, способному вызывать превращение 1 моля субстрата в продукт за 1 с.

Единицы активности ферментов. Активность препаратов ферментов обычно выражают в международных единицах активности. Активностью, равной одной международной единице, обладает такое количество фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата в продукт за 1 мин в стандартных (обычно оптимальных) условиях. Удельная активность – это число единиц активности на 1 мг белка препарата фермента. Удельная активность отражает степень очистки фермента; она максимальна у чистого фермента. Международный биохимический союз предложил использовать в качестве единицы активности «катал» (кат); активность 1 кат обладает такое количество фермента, которое катализирует превращение 1 моль субстрата в продукт за 1 с. Следовательно, 1 кат = 60 · 10<sup>6</sup> = 6 · 10<sup>7</sup> международных единиц. Рекомендовано использовать также единицу значительно меньшего масштаба – нанокатал (нкат), равную 10<sup>-9</sup> кат.

## Молекулярные механизмы ферментативного катализа

Механизмы ферментативного катализа определяются ролью функциональных групп активного центра фермента в химической реакции превращения субстрата в продукт.

Выделяют 2 основных механизма ферментативного катализа: 1. кислотно-основной катализ. 2. ковалентный катализ.

### *Кислотно-основной катализ*

Концепция кислотно-основного катализа объясняет ферментативную активность участием в химической реакции кислотных групп (доноры протонов) и/или основных групп (акцепторы протонов). Кислотно-основной катализ – часто встречающееся явление. Аминокислотные остатки, входящие в состав активного центра, имеют функциональные группы, проявляющие свойства как кислот, так и оснований.

К аминокислотам, участвующим в кислотно-основном катализе, в первую очередь относят Цис, Тир, Сер, Лиз, Глу, Асп и Гис. Радикалы этих аминокислот в протонированной форме – кислоты (доноры протона), в депротонированной – основания (акцепторы протона). Благодаря этому свойству функциональных групп активного центра ферменты становятся уникальными биологическими катализаторами, в отличие от небиологических катализаторов, способных проявлять либо кислотные, либо основные свойства.

### *Ковалентный катализ*

Ковалентный катализ основан на атаке нуклеофильных (отрицательно заряженных) или электрофильных (положительно заряженных) групп активного центра фермента молекулами субстрата с формированием ковалентной связи между субстратом и коферментом или функциональной группой аминокислотного остатка (как правило, одной) активного центра фермента. Действие сериновых протеаз, таких как трипсин, химотрипсин и тромбин, – пример механизма ковалентного катализа, когда ковалентная связь образуется между субстратом и аминокислотным остатком серина активного центра фермента. Термин «сериновые протеазы» связан с тем, что аминокислотный остаток серина входит в состав активного центра всех этих ферментов и участвует непосредственно в катализе. Рассмотрим механизм ковалентного катализа на примере химотрипсина, осуществляющего гидролиз пептидных связей при переваривании белков в двенадцатиперстной кишке. Субстратами химотрипсина служат пептиды, содержащие аминокислоты с ароматическими и циклическими гидрофобными радикала-

ми (Фен, Тир, Три), что указывает на участие гидрофобных сил в формировании фермент-субстратного комплекса.

### **Специфичность действия ферментов**

Ферменты обладают более высокой специфичностью действия по сравнению с неорганическими катализаторами. Различают специфичность по отношению к типу химической реакции, катализируемой ферментом, и специфичность по отношению к субстрату. Эти два вида специфичности характерны для каждого фермента. Специфичность по отношению к субстрату – это предпочтительность фермента к субстрату определенной структуры в сравнении с другими субстратами.

Различают 4 вида субстратной специфичности ферментов:

1. Абсолютная специфичность – способность фермента катализировать превращение только одного субстрата. Например – глюкокиназа фосфорилирует только глюкозу, аргиназа расщепляет только аргинин, уреазы – мочевины.

2. Относительная специфичность – фермент катализует превращение нескольких субстратов, имеющих один тип связи. Например – липаза расщепляет сложноэфирную связь в триацилглицеролах.

3. Относительная групповая специфичность – фермент катализует превращение нескольких субстратов, имеющих один тип связи, но требуется наличие определенных функциональных групп, входящих в состав субстратов. Например, все протеолитические ферменты расщепляют пептидную связь, но пепсин – образованную аминокетонами ароматических аминокислот, химотрипсин – образованную карбоксильными группами этих же аминокислот, трипсин – пептидную связь, образованную карбоксильной группой лизина, аргинина.

4. Стереохимическая специфичность – фермент катализует превращение только одного стереоизомера. Например, бактериальная аспаргатамдекарбоксилаза катализует декарбоксилирование только L-аспартата и не действует на D-аспарагиновую кислоту.

Специфичность по отношению к реакции. Каждый фермент катализует одну реакцию или группу реакций одного типа. Часто одно и то же химическое соединение выступает как субстрат для разных ферментов, причем каждый из них катализует специфическую для него реакцию, приводящую к образованию разных продуктов. Специфичность по типу реакции лежит в основе единой классификации ферментов.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Березов, Т. Т. Биологическая химия: учебник / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. – Москва: Медицина, 1998. – 704 с.
2. Белясова, Н. А. Биохимия и молекулярная биология: учеб. пособие / Н. А. Белясова. – Минск: Книжный дом, 2004. – 416 с.
3. Биохимия животных: учебник / А. В. Четкин [и др.]; под ред. проф. А. В. Четкина. – Москва: Высш. шк., 1982. – 511 с.
4. Зайцев, С. Ю. Биохимия животных / С. Ю. Зайцев. – Санкт-Петербург: Изд-во «Лань», 2004. – 382 с.
5. Кольман, Я. Наглядная биохимия / Я. Кольман, К.-Г. Рем; пер. с нем. – М.: Мир, 2000. – 469 с.
6. Кононский, А. И. Биохимия животных: учебник / А. И. Кононский. – Киев: Выщ. шк., 1980. – 432 с.
7. Кудряшов, Л. С. Физико-химические и биохимические основы производства мяса и мясных продуктов / Л. С. Кудряшов. – М.: ДеЛи принт, 2008. – 160 с.
8. Метревели, Т. В. Биохимия животных / Т. В. Метревели. – Санкт-Петербург: Изд-во «Лань», 2004. – 295 с.
9. Микробиологический анализ мяса, птицы и яйцопродуктов / Дж. К. Мид; под ред. Дж. К. Мида; пер. с англ. И. С. Горожанкиной. – М.: Профессия, 2009. – 384 с.
10. Николаев, А. Я. Биологическая химия: учебник / А. Я. Николаев. – М.: Мед. информ. агентство, 2004. – 566 с.
11. Слесарев, В. И. Химия: основы химии живого: учебник для вузов / В. И. Слесарев. – Санкт-Петербург: Химиздат, 2001.
12. Хазипов, Н. З. Биохимия животных: учебник / Н. З. Хазипов, А. Н. Аскарлова. – Казань: КГАВМ, 2003. – 312 с.
13. Химия. Лабораторный практикум: учеб. пособие / А. Р. Цыганов [и др.]. – Минск: ИВЦ Минфина, 2015. – 320 с.
14. Цыганов, А. Р. Биохимия. Практикум: учеб. пособие / А. Р. Цыганов, И. В. Сучкова, И. В. Ковалёва. – Минск: ИВЦ Минфина, 2007. – 150 с.
15. Цыганов, А. Р. Сборник задач и упражнений по химии: учеб. пособие / А. Р. Цыганов, О. В. Поддубная. – Минск: ИВЦ Минфина, 2013. – 234 с.

Составители

**Поддубная** Ольга Владимировна  
**Ковалева** Ирина Владимировна  
**Мохова** Елена Владимировна