

А.Н. Огурцов

БИОХИМИЯ ДЛЯ СТУДЕНТОВ

Часть 3

ФЕРМЕНТЫ и КОФЕРМЕНТЫ

OUTLINE of BIOCHEMISTRY for STUDENTS



<https://sites.google.com/site/anogurtsov/lectures/biochem/>

2016

7. ФЕРМЕНТЫ

7.1. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ ЭНЗИМОЛОГИИ

Ферменты (от латинского *fermentum* – закваска), *энзимы* (от греческого *en* – «в» и *zyme* – «закваска») или *биокатализаторы*, – это вещества биологического происхождения, ускоряющие химические реакции.

Для того, чтобы не смешивать слова различных языков, принято называть науку, изучающую ферменты и катализируемые ими реакции, *энзимологией* (от греческих слов *en, zyme, logos* – $\epsilon\nu, \zeta\upsilon\mu\eta, \lambda\omicron\gamma\omicron\varsigma$).

Организованная последовательность процессов обмена веществ – *метаболизм* – возможна при условии, что каждая клетка обеспечена собственным генетически заданным набором ферментов. В живой клетке множество разнообразных соединений, но реакции между ними не беспорядочны, а образуют строго определённые, характерные для данной клетки *метаболические пути* – согласованные последовательности реакций.

Индивидуальность клетки в большой степени определяется уникальным набором ферментов, который она генетически запрограммирована производить. Нехватка какого-либо фермента или какой-нибудь его дефект могут иметь очень серьёзные отрицательные последствия для организма. Регуляция метаболических процессов ферментами обеспечивает соответствие обмена веществ изменённым условиям.

Почти все ферменты являются белками. Однако, известны также каталитически активные нуклеиновые кислоты – *рибозимы*.

Вещество, на которое действует фермент, называется *субстратом* (от лат. *substratum* – подстилка, основа).

Ферменты бывают простые белки (химотрипсин, пепсин, рибонуклеаза и др.) и сложные мультисубъединичные комплексы (дегидрогеназы, трансферазы и многие др.).

Существуют сложные двух- и многокомпонентные ферменты, содержащие как *белковые*, так и *небелковые* компоненты.

Апоферментом (*apoenzyme*) называется белковый компонент такого сложного фермента.

Кофактором (*cofactor*) называется небелковый компонент сложного фермента.

Ферментативной активностью обладает только комплекс апофермент–кофактор, который называется *холоферментом* (*holoenzyme*):

Апофермент + кофактор = холофермент.

Кофакторы можно разделить на *две группы*:

- 1) металлы (как правило, ионы металлов Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , K^+ , Na^+);
- 2) сложные органические соединения.

Органические небелковые кофакторы называются *коферментами* (*coenzymes*). Источником коферментов часто служат витамины.

Тип связи между ферментом и коферментом может быть различным. Иногда они существуют отдельно и связываются друг с другом во время протекания реакции. Многие коферменты легко отделяются от холофермента и служат переносчиками отдельных атомов или групп атомов, отщепляемых ферментом от субстрата.

В других случаях кофактор и фермент *связаны постоянно* и иногда прочными ковалентными связями как, например, гем в составе ферментов гемопротейдов или флавиновая группа в молекулах флавиновых дегидрогеназ. В таком случае небелковая часть фермента называется *протетической группой* (*prosthetic group*).

Ферменты отличаются от других катализаторов *тремя* уникальными свойствами:

- высокой эффективностью действия;
- специфичностью действия;
- способностью к регуляции.

Скорость ферментативных реакций обычно в 10^6 – 10^{12} раз выше, чем скорость соответствующих неферментативных реакций. Пример эффективности протекания реакции разложения перекиси водорода $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ с участием фермента *каталазы* приведён в таблице.

Активность фермента измеряется в *международных единицах* (МЕ), соответствующих активности, превращающей 1 микромоль субстрата в минуту, или, как это было введено в 1973 году, в *каталах* (кат), соответствующих активности, превращающей 1 моль субстрата в секунду.

Удельная активность выделенного фермента выражается в единицах активности на единицу массы активного белка.

Связь МЕ с каталом:

$$1 \text{ кат} = 1 \text{ моль субстрата/с} = 60 \text{ моль/мин} = 60 \cdot 10^6 \text{ мкмоль/мин} = 6 \cdot 10^7 \text{ МЕ},$$

$$1 \text{ МЕ} = 1 \text{ мкмоль/мин} = 1/60 \text{ мкмоль/с} = 1/60 \text{ мкат} = 16,67 \text{ нкат}.$$

Другие соотношения, используемые в энзимологии:

$$\text{Число оборотов} = \frac{\text{Число молей превращенного субстрата}}{\text{мин}};$$

$$\text{Удельная активность} = \frac{\text{Число каталов}}{\text{Масса активного белка, кг}};$$

$$\text{Молярная активность} = \frac{\text{Число каталов}}{\text{Число молей фермента}}.$$

Специфичностью действия фермента называется его способность выбирать определённый субстрат и катализировать строго специфическую реакцию.

Для ферментов характерны:

- высокая субстратная специфичность* – даже если какая-то реакция может идти с разными соединениями, данный фермент будет работать только с одним субстратом,
- специфичность пути превращения* (специфичность по типу реакции) – данный фермент катализирует только ту реакцию, для которой он предназначен. Например, фермент *декарбоксилаза*, отщепляющий карбоксильную группу аминокислоты, не будет отщеплять аминогруппу той же аминокислоты. Для этого есть фермент *трансаминаза*.

Другой пример высокоспецифичного ферментного катализатора – *ДНК-полимераза* (ЕС 2.7.7.7), которая синтезирует ДНК в строгом соответствии последовательностью нуклеотидов в другой ДНК, которая используется как «эталон» (или шаблон, *template*). ДНК-полимераза «ошибается» (вставляет «ошибочный» нуклеотид) реже, чем один раз на миллион синтезов.

Каталитическая активность многих ферментов может изменяться в зависимости от концентрации веществ-регуляторов больше, чем от концентрации их субстратов. Возможность *регулирования* активности ферментов делает их своеобразными организаторами обменных процессов в клетке.

Особенностью ферментативных реакций являются *мягкие условия протекания* – температура $\sim 37^\circ\text{C}$; нормальное атмосферное давление; близкое к нейтральному значению pH. В противоположность этому для эффективного химического катализа часто требуются высокие температура и давление, а также экстремальные значения pH.

Уникальным свойством ферментов как биокатализаторов является то, что некоторые из них могут *преобразовывать энергию* из одной формы в другую. Например,

фермент *миозин* преобразует энергию химических связей АТФ в механическую энергию мышечных сокращений.

Ферменты обладают характерной локализацией в клетках эукариот. Одни из них более или менее гомогенно распределены во внутриклеточных компартментах, а другие локализуются только в определённых структурах клетки. Среди ферментов, имеющих специфическое распределение внутри клетки, особое значение имеют следующие:

- *5'-нуклеотидаза* и *Na⁺/K⁺-АТФаза* – в наружной клеточной мембране (плазмалемме);
- *арилсульфатаза* – в эндоплазматическом ретикулуме;
- *сукцинатдегидрогеназа* – во внутренней митохондриальной мембране;
- *каталаза* – в пероксисомах;
- *лактатдегидрогеназа* и *аминотрансферазы* – в цитозоле.

Все эти ферменты являются своеобразными «маркерами» соответствующих внутриклеточных структур и используются для характеристики чистоты выделения различных субклеточных фракций.

7.2. ФЕРМЕНТ-СУБСТРАТНЫЙ КОМПЛЕКС

В процессе катализа принимает участие лишь небольшая часть молекулы фермента. Ферменты специфически связывают реагенты (свои субстраты) в *активном центре*.

Активным центром называется область молекулы фермента, в которой происходит связывание и превращение субстрата.

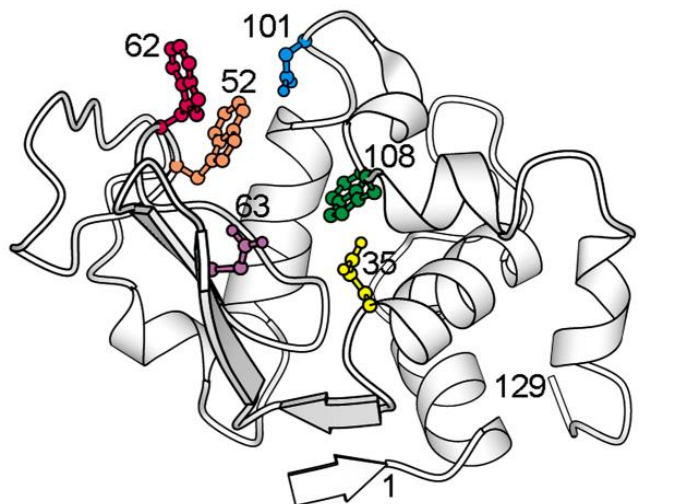
Активный центр фермента представляет собой трёхмерную структуру, которая образована сближенными в пространстве аминокислотными радикалами, как правило, далеко отстоящими друг от друга в полипептидной цепи. На рисунке, в верхней части, изображены аминокислоты активного центра фермента *лизоцим*, а внизу – номера их положений в первичной структуре полипептидной цепи.

Основное отличие ферментативных реакций от неферментативных заключается в том, что в ходе ферментативных реакций образуется *фермент-субстратный комплекс*, в котором происходит:

- 1) сближение и ориентация субстратов;
- 2) исключение из реакционной области молекул воды;
- 3) стабилизация переходного состояния;
- 4) перенос группы атомов.

Все эти события и действия происходят в *активном центре* фермента. В нём специфические аминокислоты располагаются в стратегически важных пространственных положениях, они идеально позиционированы для стабилизации переходного состояния молекулы субстрата.

Часто активный центр помещается в «*стандартном дефекте*» макромолекулы белка – в стандартно расположенной (т. е. определяемой мотивом укладки цепи, а не боковыми группами) *вмятине* в архитектуре белковой глобулы. Такая вмятина автоматически способствует окружению субстрата одновременно многими боковыми цепями белка. Столь же обычным местом активного центра является место стыка доменов.



Такое положение активного центра обуславливает формирование *особой среды*, отличающейся от той, что окружает молекулы в растворе (в цитозоле клетки). Среда активного центра отличается, как правило, сильно развитой *микрөгетерогенностью*. Гетерогенность означает разнородность, неоднородность. *Микрөгетерогенность* означает существенную неоднородность на микроскопических расстояниях.

Поскольку в формировании активного центра участвуют аминокислоты с самыми «контрастными» физико-химическими свойствами – как заряженные, так и незаряженные, как полярные, так и неполярные, как отрицательно заряженные, так и положительно заряженные, как доноры электронов или протонов, так и их акцепторы и т. д. – то в активном центре наблюдаются *резкие «перепады»* физико-химических параметров на расстояниях порядка среднего размера аминокислотного остатка. Именно воздействие этих *градиентов* на субстрат и ускоряет протекание биохимических реакций.

Кроме того, поверхностный слой белковой глобулы характеризуется повышенной *микровязкостью*. Эффекты повышенной микровязкости особенно сильно развиты в области активного центра. Здесь полипептидные цепи белка расположены *настолько жёстко*, что затрудняют не только поступательную диффузию в глобулу, но также и вращательное движение функциональных групп связанной молекулы.

7.3. КЛАССИФИКАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ

Исторически многие ферменты имеют названия, которые ничего не говорят о катализируемой реакции, например: *цитохром с*, *трипсин*, *пепсин*, *каталаза*.

Большинство ферментов, напротив, названы по катализируемым реакциям и субстратам. Например, фермент, разрушающий АТФ, называется *АТФаза*, а фермент, синтезирующий АТФ – *АТФ-синтетаза*.

В этих случаях название фермента складывается либо из названия субстрата с прибавлением суффикса *-аза*, либо суффикс добавляется к названию катализируемой реакции. Например, *амилаза*, *глюкозо-6-фосфатаза*, *аргиназа* и др.

Систематическое название ферментов принято образовывать из названия субстратов и типа катализируемой реакции. Например, фермент *глюкокиназа*, катализирующий реакцию фосфорилирования глюкозы



имеет систематическое название *АТФ:D-глюкозо-6-фосфотрансфераза*.

Но поскольку в настоящее время количество обнаруженных и зафиксированных в Базе данных белков (Protein Data Base, <http://pdb.org/>) насчитывает несколько десятков тысяч, то для унификации номенклатуры ферментов разработана *система классификации* с учётом реакционной и субстратной специфичности ферментов.

В основу существующей международной классификации положен тип реакции, катализируемой ферментом. По этому признаку все ферменты подразделяются на *шесть* основных классов (см. таблицу на с. 3-6).

1. *Оксидоредуктазы* – катализируют окислительно-восстановительные реакции.
2. *Трансферазы* – переносят ту или иную функциональную группу от одного субстрата на другой.

Для функционирования оксидоредуктаз и трансфераз необходимы *коферменты*.

3. *Гидролазы* – также участвуют в переносе групп, однако акцептором здесь всегда является молекула *воды*.
4. *Лиазы* (синтазы) – катализируют расщепление или образование химических соединений, при этом образуются или исчезают двойные связи.
5. *Изомеразы* – катализируют реакции внутримолекулярного переноса функциональных групп (изомеризации).
6. *Лигазы* (синтетазы) – катализируют *энергозависимые* реакции присоединения и поэтому их действие сопряжено с гидролизом нуклеозидтрифосфата (чаще всего АТФ).

Класс	Тип реакции	Важнейшие подклассы
1 Оксидоредуктазы	<p>○ = Восстановительный эквивалент</p> <p>Ared + B_{ox} ⇌ A_{ox} + B_{red}</p>	Дегидрогеназы Оксидазы Пероксидазы Редуктазы Моноксигеназы Диоксигеназы
2 Трансферазы	<p>A-B + C ⇌ A + B-C</p>	C ₁ -Трансферазы Гликозилтрансферазы Аминотрансферазы Фосфотрансферазы
3 Гидролазы	<p>A-B + H₂O ⇌ A-H + B-OH</p>	Эстеразы Гликозидазы Пептидазы Амидазы
4 Лиазы ("синтазы")	<p>A + B ⇌ A-B</p>	C-C Лиазы C-O Лиазы C-N Лиазы C-S Лиазы
5 Изомеразы	<p>A ⇌ изо-A</p>	Эпимеразы <i>цис-транс</i> -изомеразы Внутримолекулярные трансферазы
6 Лигазы ("синтетазы")	<p>A + B + XTP ⇌ A-B + XDP</p> <p>X = A, G, U, C</p>	C-C Лигазы C-O Лигазы C-N Лигазы C-S Лигазы

Все ферменты включены в Каталог ферментов (*Enzyme Catalog*, EC) Номенклатурного Комитета Международного Общества Биохимии и молекулярной Биологии <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/> (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) под своим *классификационным номером*, состоящим из четырёх цифр.

Первая цифра указывает на принадлежность к одному из *шести главных классов*. Следующие две определяют *подкласс* и *подподкласс*, а последняя цифра – *номер фермента* в данном подподклассе. Например, *лактатдегидрогеназа* имеет номер EC 1.1.1.27 (класс 1, оксидоредуктазы; подкласс 1.1, донор электрона – группа **CH-OH**; подподкласс 1.1.1, *акцептор* электрона – НАДФ⁺ (NADP⁺); (с. 3-31; с.3-33; с. 6-10)).

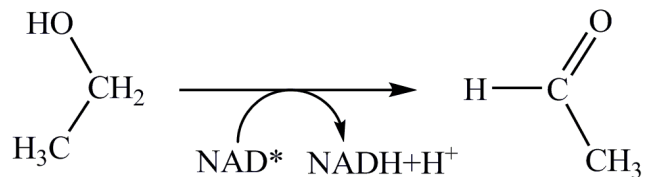
КЛАСС 1 – оксидоредуктазы переносят водород (протоны) или электроны и катализируют биологическое окисление. В состав оксидоредуктаз входят специфические коферменты.

Оксидоредуктазы подразделяются на *подклассы* в соответствии с *донором*, от которого переносится водород или электрон (подклассы обозначаются 1.n).

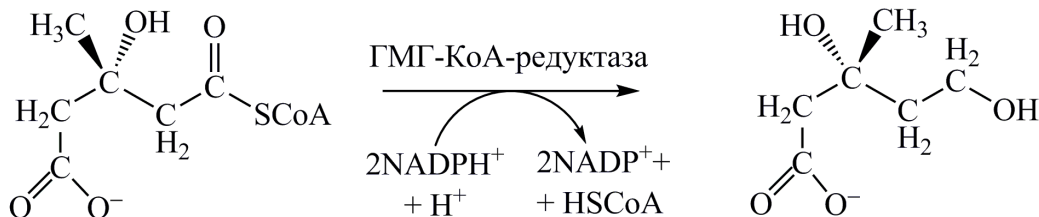
1.1. Оксидоредуктазы подкласса 1.1 действуют на **CH-OH** группы в молекулах *доноров*. *Подподклассы* определяются в соответствии с *акцептором*, к которому идёт перенос (подподклассы обозначаются 1.n.n).

1.1.1. Акцептором у оксидоредуктаз подподкласса 1.1.1 служит НАД⁺ (никотинамид-адениндинуклеотид) или НАДФ⁺ (никотинамидадениндинуклеотидфосфат). Общее название ферментов данного подподкласса – *дегидрогеназы* или *редуктазы*.

Например, фермент *алкогольдегидрогеназа* (EC 1.1.1.1) катализирует реакцию превращения этанола (спирта) в этаналь (ацетальдегид) (с. 6-10).



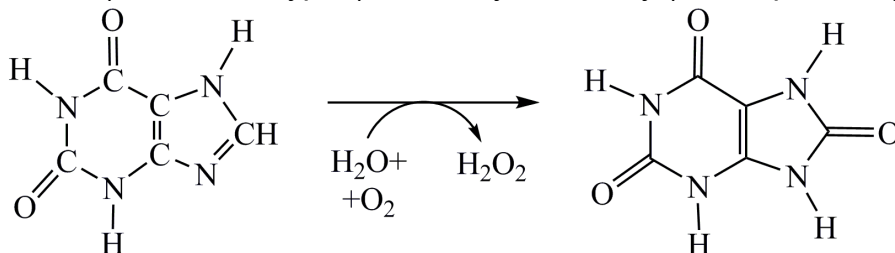
Фермент *гидроксиметилглутарил-СоА-редуктаза* (EC 1.1.1.34) в метаболизме холестерина (с. 6-44) катализирует реакцию превращения 3-гидрокси-3-метилглутарил-СоА в мевалонат.



1.1.2. Акцептором служит цитохром.

1.1.3. Акцептором служит молекулярный кислород. Общее название ферментов данного подподкласса – *оксидазы*. Оксидазы обычно присоединяют водород или электрон (из субстрата) к кислороду с образованием пероксида водорода H_2O_2 .

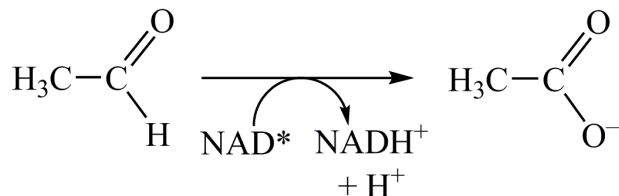
Например, фермент *ксантиноксидаза* (EC 1.1.3.22) в метаболизме нуклеотидов превращает ксантин (2,6-диоксипурин) в мочевую кислоту (2,6,8-триоксипурин) (с. 7-31).



1.2. Оксидоредуктазы подкласса 1.2 действуют на альдегидную или кетонную группы в молекулах *доноров*.

1.2.1. Акцептором служит НАД^+ или НАДФ^+ . Общее название ферментов данного подподкласса – *дегидрогеназы*.

Например, фермент *альдегиддегидрогеназа* (EC 1.2.1.3) в метаболизме этанола превращает этаналь в ацетат.



Ещё пример фермента этого подподкласса – *глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа* (EC 1.2.1.12).

1.2.3. Акцептором служит молекулярный кислород.

1.2.4. Акцептором служит дисульфидная группа.

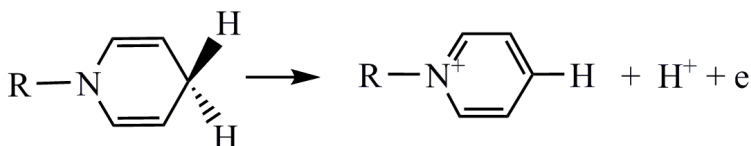
1.3. Оксидоредуктазы подкласса 1.3 действуют на $-\text{CH}-\text{CH}-$ группы в молекулах доноров.

1.4. Оксидоредуктазы подкласса 1.4 действуют на $-\text{CH}-\text{NH}_2$ группы в молекулах доноров.

1.5. Оксидоредуктазы подкласса 1.5 действуют на $-\text{CH}-\text{NH}$ группы в молекулах доноров.

1.6. Оксидоредуктазы подкласса 1.6 используют в качестве *донора* НАДФН .

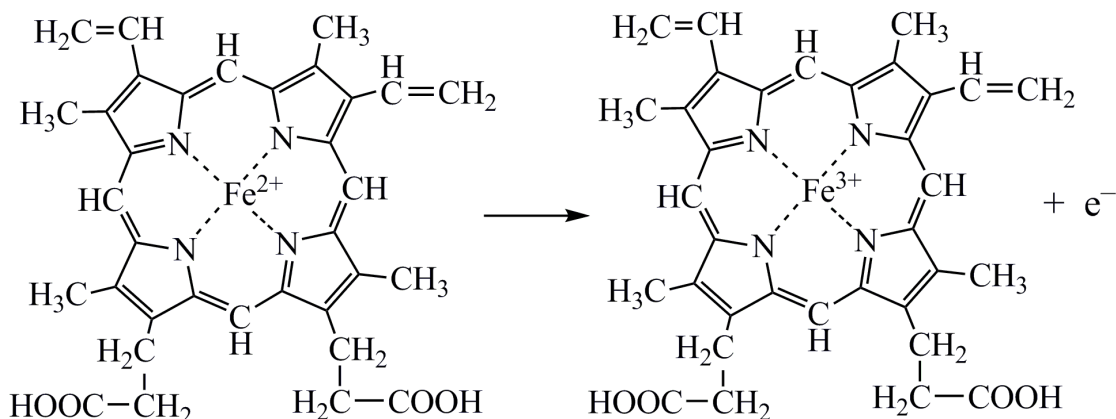
Например, компонентом комплекса I дыхательной цепи на внутренней митохондриальной мембране является фермент *НАДН-дегидрогеназа* (EC 1.6.5.3), который окисляет дигидропиридины в пиридины, образовавшиеся электроны переносятся на убихиноны (коферменты Q), а протоны накапливаются в межмембранном пространстве митохондрии, образуя трансмембранный протонный градиент (с. 5-17).



1.7. Оксидоредуктазы подкласса 1.7 используют в качестве *доноров* другие азотистые соединения группы.

1.8. Оксидоредуктазы подкласса 1.8 используют в качестве *доноров* серосодержащие группы.

1.9. Оксидоредуктазы подкласса 1.9 используют в качестве *донора* группу гема.



Например, фермент *цитохром-с-оксидаза* (EC 1.9.3.1), входящий в состав комплекса IV дыхательной цепи внутренней митохондриальной мембраны, на котором перенос электрона с гемсодержащего белка *цитохрома с* на молекулярный кислород сопряжён с переносом протонов через мембрану и созданием протонного градиента, окисляет ферропорфирин в феррипорфирин (с. 5-17; 5-21).

1.10. Оксидоредуктазы подкласса 1.10 используют в качестве *донора* дифенол.

1.11. Оксидоредуктазы подкласса 1.11 используют в качестве *акцептора* пероксид водорода H_2O_2 .

Общее название ферментов данного подкласса – *пероксидазы*. Обобщённо схему реакций, в которых окислителем является перекись водорода, можно записать в виде



Например, гем-содержащий фермент *каталаза* (EC 1.11.1.6) катализирует превращение перекиси водорода в воду и кислород (с. 5-22; 6-35)

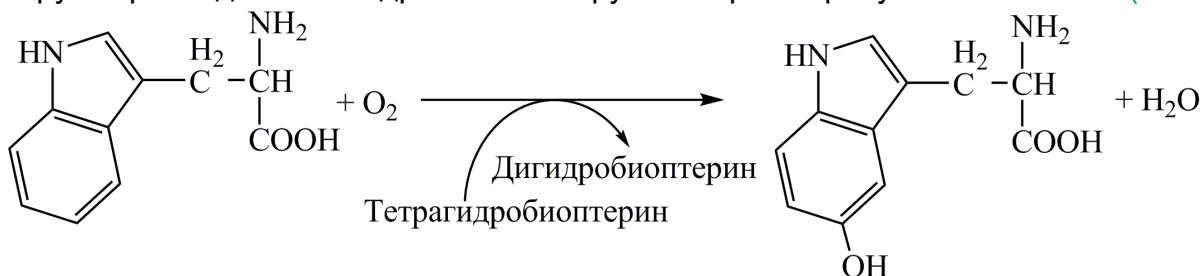


1.13. Оксидоредуктазы подкласса 1.13 включают в окисляемый субстрат (донор электронов) молекулярный кислород. Общее название ферментов данного подкласса – *оксигеназы*.

1.14. Оксидоредуктазы подкласса 1.14 включают в два окисляемых субстрата (доноры электронов) один атом кислорода.

Общее название ферментов данного подкласса – *монооксигеназы, гидроксилазы*.

Например, фермент *триптофан-5-монооксигеназа* (*триптофангидроксилаза*) катализирует присоединение гидроксильной группы к триптофану в положении 5 (с. 7-12).



1.15. Оксидоредуктазы подкласса 1.15 используют в качестве *акцептора* супероксид-радикал.

1.17. Оксидоредуктазы подкласса 1.17 используют в качестве *донора* $-CH_2$ -группу.

1.18. Оксидоредуктазы подкласса 1.18 используют в качестве *донора* восстановленный ферредоксин. Например, фермент *нитрогеназа* (EC 1.18.6.1) катализирует

разрыв молекулярных связей в молекуле азота в азотфиксирующих бактериях и синезелёных водорослях (с. 7-21).

КЛАСС 2 – трансферазы переносят группы атомов с помощью специфических переносчиков, которые действуют как коферменты. *Трансферазы* участвуют в биохимических превращениях и могут переносить метильные, карбоксильные, амино-, сульфо-, формильные (C_1) или фосфорильные группы.

2.1. Трансферазы подкласса 2.1 переносят одноуглеродные группы (C_1 -фрагменты).

2.1.1. *Метилтрансферазы.*

2.1.2. Трансферазы оксиметильных, формильных и родственных им групп.

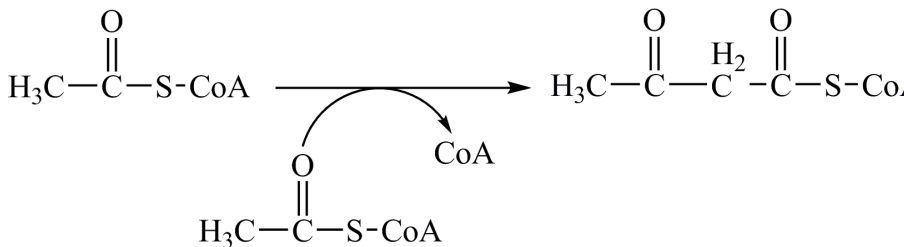
2.1.3. *Карбоксилтрансферазы и карбомилтрансферазы.*

2.2. Трансферазы подкласса 2.2 переносят альдегидные и кетонные группы.

2.3. *Ацилтрансферазы.*

2.3.1. Донором служит CoA.

Например, фермент *ацетил-CoA-ацилтрансфераза (тиолаза)* (EC 2.3.1.16) при высоких концентрациях молекул ацетил-CoA катализирует реакцию присоединения ещё одной ацильной группы к ацетилу-CoA с образованием молекулы ацетоацетил-CoA (с. 6-33; 6-44).



2.3.2. *Аминоацилтрансферазы.* Например, фермент *рибосомная пептидилтрансфераза* (EC 2.3.2.12) катализирует перенос растущей пептидной цепи от тРНК, находящейся в Р-центре на аминогруппу, присоединённую к тРНК, находящейся в А-центре рибосомы.

2.4. *Гликозилтрансферазы.*

2.4.1. Трансферазы подподкласса 2.4.1 переносят остаток гексозы – *гексозилтрансферазы.*

Например, фермент *фосфорилаза (или гликогенфосфорилаза)* (EC 2.4.1.1) катализирует расщепление связи в субстрате с одновременным присоединением фосфатной группы к продукту реакции (с. 6-18)



2.4.2. Трансферазы подподкласса 2.4.2 переносят остатки пентозы – *пентозилтрансферазы.*

2.5. Трансферазы подкласса 2.5 переносят алкильные или арильные группы.

2.6. Трансферазы подкласса 2.6 переносят азотсодержащие группы.

2.6.1. *Аминотрансферазы или трансаминазы.*

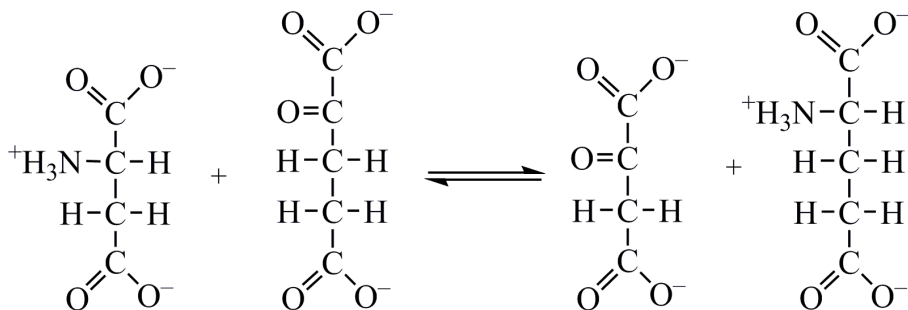
Например, фермент *аспартаттрансаминаза (аспартатаминотрансфераза)* (EC 2.6.1.1) переносит аминогруппу с аспартата на α -кетоглутарат с образованием глутамата (с. 3-32).

2.6.2. *Амидинотрансферазы.*

2.6.3. *Оксиминотрансферазы.*

2.7. Трансферазы подкласса 2.7 переносят фосфоросодержащие группы. Общее название ферментов данного подкласса – *киназы* или *фосфотрансферазы.*

2.7.1. Акцептором служит спиртовая группа $-\text{CH}-\text{OH}$. Ферментами данного подподкласса являются, например, *6-фосфофруктокиназа* (EC 2.7.1.11), *протеинкиназа* (EC 2.7.1.37), *киназа фосфорилазы* (EC 2.7.1.38) и *пируваткиназа* (EC 2.7.1.40).



Фермент *глюкокиназа* (или *гексокиназа* (ЕС 2.7.1.1)) переносит фосфатную группу от АТФ на глюкозу, образуя глюкозо-6-фосфат (с. 6-2).

2.7.2. Фосфотрансферазы, с карбоксильной группой ($-\text{COOH}$) в роли акцептора. Например, ферменты *фосфоглицераткиназа* (ЕС 2.7.2.3), *аспартаткиназа* (ЕС 2.7.2.4) и *ацетилглутаматкиназа* (ЕС 2.7.2.8).

2.7.3. Фосфотрансферазы, с азотсодержащими группами в роли акцептора, например, фермент *креатинкиназа* (*креатинфосфокиназа*) (ЕС 2.7.3.2) (с. 3-31).

2.7.4. Фосфотрансферазы, с фосфатной группой в роли акцептора. Например, ферменты *аденилаткиназа* (ЕС 2.7.4.3) и *нуклеозидфосфаткиназа* (ЕС 2.7.4.4).

2.7.5. Фосфотрансферазы, катализирующие реакции кажущегося внутримолекулярного переноса.

2.7.6. Фосфотрансферазы, катализирующие реакции переноса дифосфатных остатков.

Общее название ферментов данного подподкласса – *пирофосфаттрансферазы*.

2.7.7. Фосфотрансферазы, катализирующие реакции переноса нуклеотидов. Общее название ферментов данного подподкласса – *нуклеотидилтрансферазы*.

Например, ферменты *ДНК-зависимая РНК-полимераза* (*РНК-полимераза*) (ЕС 2.7.7.6), *ДНК-зависимая ДНК-полимераза* (*ДНК-полимераза*) (ЕС 2.7.7.7), *РНК-зависимая ДНК-полимераза* (*обратная транскриптаза* или *ревертаза*) (ЕС 2.7.7.49).

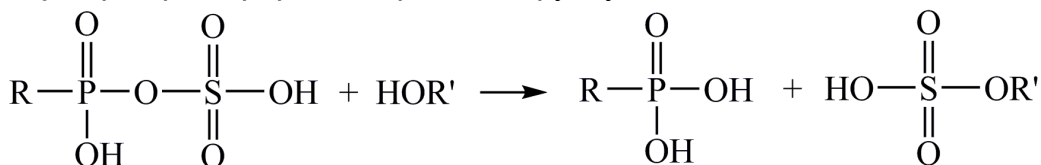
2.7.8. Фосфотрансферазы, катализирующие реакции переноса других замещённых фосфатных групп.

Например, *этаноламинфосфотрансфераза* (ЕС 2.7.8.1), *1-алкил-2-ацетилглицерин-холинфосфотрансфераза* (ЕС 2.7.8.16).

2.8. Трансферазы подкласса 2.8 переносят группы, содержащие серу.

2.8.1. *Сульфидтрансферазы*.

2.8.2. *Сульфотрансферазы* переносят группу $-\text{SO}_3\text{H}$.

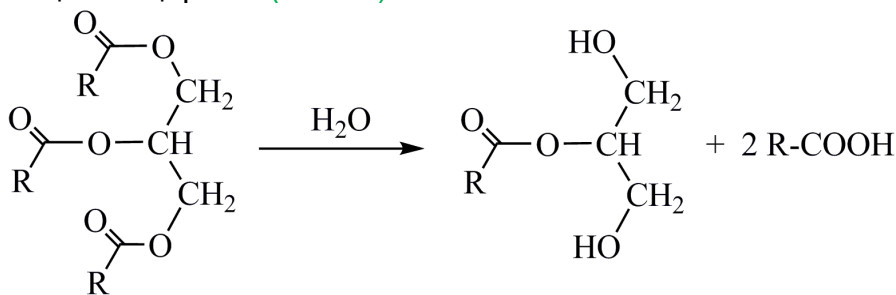


КЛАСС 3 – гидролазы катализируют гидролитическое расщепление и называются в соответствии с типом разрываемой связи.

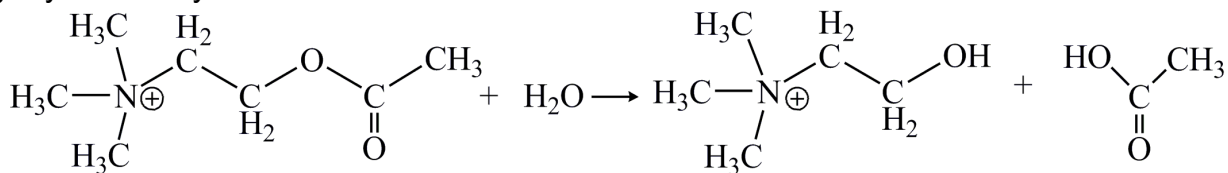
3.1. Гидролазы подкласса 3.1 гидролизуют сложноэфирные связи. Общее название ферментов данного подкласса – *эстеразы*.

3.1.1. Гидролазы эфиров карбоновых кислот.

Например, фермент *триацилглицероллипаза* или просто *липаза* (ЕС 3.1.1.3) гидролизует триацилглицеролы (с. 6-25).



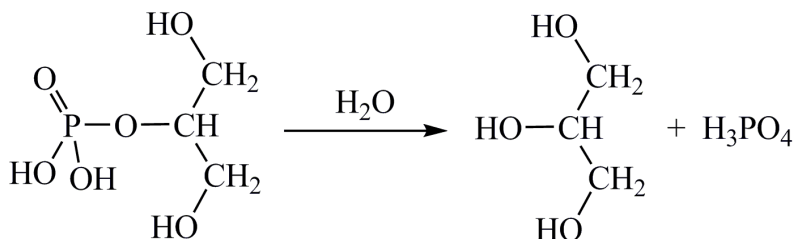
Фермент *ацетилхолинэстераза* (ЕС 3.1.1.7) гидролизует ацетилхолин на холин и уксусную кислоту.



3.1.2. Гидролазы тиоловых эфиров.

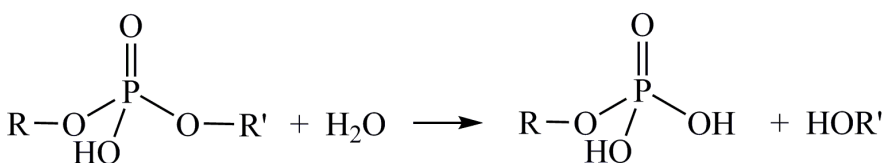
3.1.3. Гидролазы фосфомоноэфиров. Общее название ферментов данного подподкласса – *фосфатазы*.

Например, фермент *щелочная фосфатаза* (ЕС 3.1.3.1) катализирует реакцию гидролиза фосфатной группы.



3.1.4. Гидролазы фосфодиэфиров.

Общее название ферментов данного подподкласса – *фосфодиэстеразы*. Они гидролизуют фосфодиэфирную связь (с. 8-11).



3.1.5. Гидролазы трифосфомоноэфиров.

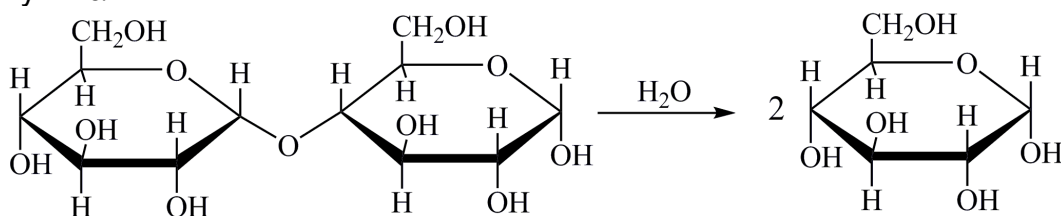
3.1.6. Гидролазы сульфэфиров.

3.1.21. Гидролазы ДНК. Например, ферменты *дезоксирибонуклеаза I* (ЕС 3.1.21.1), *специфическая дезоксирибонуклеаза (тип II)* (эндонуклеаза рестрикции или *рестриктаза*) (ЕС 3.1.21.4).

3.1.26–27. Гидролазы РНК.

3.2. Гидролазы подкласса 3.2 гидролизуют гликозидные связи. Общее название ферментов данного подкласса – *гликозидазы*.

Например, фермент *α-гликозидаза (мальтаза)* гидролизует молекулу мальтозы на две молекулы α-D-глюкозы



3.2.1. Гидролазы гликозидов. Например, *α-амилаза* (ЕС 3.2.1.1) и *лизоцим* (ЕС 3.2.1.17).

3.2.2. Гидролазы N-гликозильных соединений.

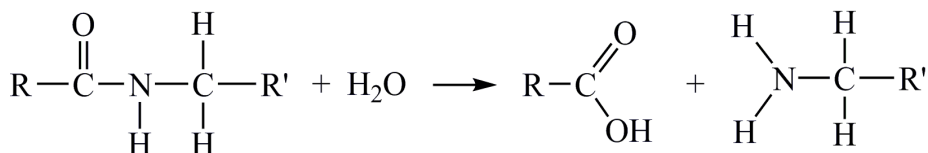
3.2.3. Гидролазы S-гликозильных соединений.

3.3. Гидролазы подкласса 3.3 гидролизуют простые эфирные связи.

3.4. Гидролазы подкласса 3.4 гидролизуют пептидные связи.

Общее название ферментов данного подкласса – *пептидазы* (с. 7-2).

Некоторые из 99 подподклассов пептидаз.



3.4.11. *Аминопептидазы (N-концевые экзопептидазы)* (с. 7-3).

3.4.13. *Дипептидазы* (действуют только на дипептиды).

3.4.15. *Пептидильдипептидазы* (C-концевые экзопептидазы, освобождающие дипептид).

3.4.17. *Карбоксипептидазы* (C-концевые экзопептидазы) (с. 7-3).

3.4.21. Сериновые протеазы (эндопептидазы).

Например, ферменты *химотрипсин* (ЕС 3.4.21.1), *трипсин* (ЕС 3.4.21.4), *тромбин* (ЕС 3.4.21.5), различные факторы свёртывания крови.

3.4.22. Цистеиновые протеиназы (эндопептидазы). Например, фермент *папаин* (ЕС 3.4.22.1).

3.4.23. Аспартатные протеиназы (эндопептидазы). Например, фермент *пепсин А* (ЕС 3.4.23.1), *ренин* (ЕС 3.4.23.15).

3.4.24. *Металлопротеиназы* (эндопептидазы). Например, фермент *коллагеназа* (ЕС 3.4.24.7).

3.4.99. Другие пептидазы. Например, фермент *сигнальная пептидаза* (ЕС 3.4.99.36).

3.5. Гидролазы подкласса 3.5 гидролизуют **C–N** связи, отличные от пептидных связей. Общее название ферментов данного подкласса – *амидазы*.

3.6. Гидролазы подкласса 3.6 гидролизуют ангидридные связи.

Например, ферменты

- *нуклеозид-дифосфатаза* (ЕС 3.6.1.6);
- *миозин-АТФаза* (ЕС 3.6.1.32);
- H^+ -*транспортирующая АТФ-синтаза* (*АТФ-синтаза*, комплекс V) (ЕС 3.6.1.34);
- Na^+/K^+ -*обменивающая АТФаза* (Na^+/K^+ -*АТФаза*) (ЕС 3.6.1.37);
- Ca^{2+} -*транспортирующая АТФаза* (Ca^{2+} -*АТФаза*) (ЕС 3.6.1.38).

3.7. Гидролазы подкласса 3.7 гидролизуют **C–C** связи. Например, *фумарилацетоацетаза* (3.7.1.2).

3.8. Гидролазы подкласса 3.8 гидролизуют связи с участием галогенов.

3.8.1. В соединениях со связью углерод-галоген.

3.8.2. В соединениях со связью фосфор-галоген.

3.9. Гидролазы подкласса 3.9 гидролизуют **P–N** связи.

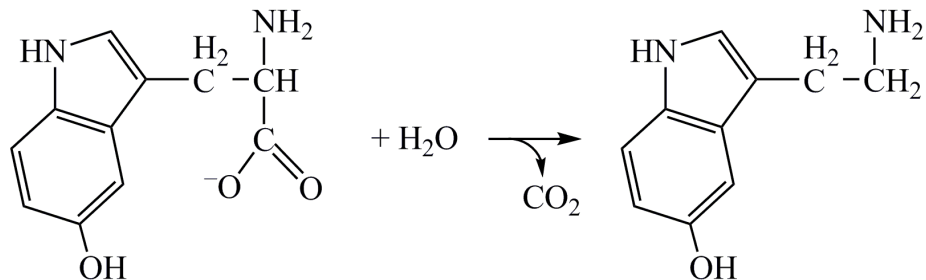
КЛАСС 4 – лиазы (синтазы) разрывают или образуют связи без участия окисления или гидролиза.

4.1. Лиазы подкласса 4.1 образуют или расщепляют **C–C** связи. Общее название ферментов данного подкласса – *углерод-углерод лиазы*.

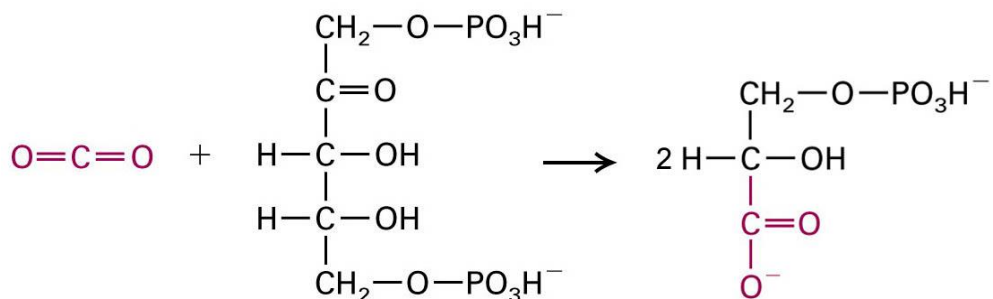
4.1.1. Карбоксилиазы (*карбоксилазы* и *декарбоксилазы*).

Ферменты *декарбоксилазы* катализируют удаление CO_2 .

Например, фермент *гидрокситриптофан декарбоксилаза* (*декарбоксилаза ароматических аминокислот*) (с. 7-12) катализирует образование серотонина из гидрокситриптофана.

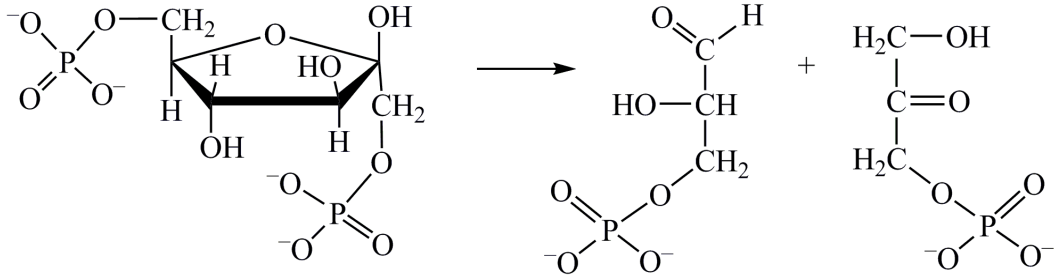


Фермент (ЕС 4.1.1.39) *рибулозобисфосфаткарбоксилаза*, «Рубиско» (*ribulose-1,5-bisphosphatecarboxylase*, RuBisCO) связывает молекулу углекислого газа CO_2 с рибулозо-1,5-бисфосфатом и образует две молекулы 3-фосфоглицерата (с. 5-34).



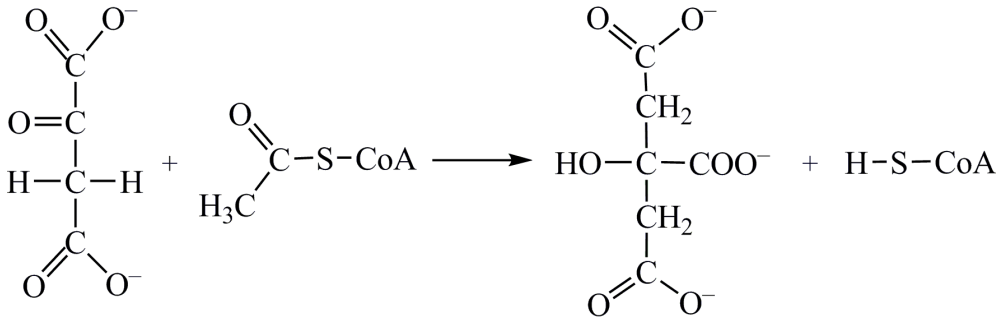
4.1.2. Альдегидлиазы – образуют альдегиды.

Например, фермент (EC 4.1.2.13) *фруктозо-1,6-бисфосфат-альдолаза* (или просто *альдолаза (aldolase)* (с. 6-2)) катализирует распад фруктозо-1,6-бисфосфата на глицеральдегид-3-фосфат и дигидроксиацетон-3-фосфат.



4.1.3. Лиазы кетокислот образуют кетоны.

Например, фермент *цитратсинтаза* (EC 4.1.3.7) катализирует реакцию синтеза цитрата из оксалоацетата и ацетил-СоА без участия АТФ (с. 5-12; 5-15; 6-36).



4.2. Лиазы подкласса 4.2 образуют или расщепляют C–O связи.

Общее название ферментов данного подкласса – *углерод-кислород лиазы*.

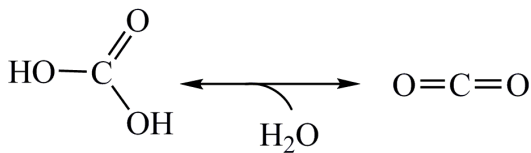
4.2.1. Гидролиазы (*гидратазы* и *дегидратазы*).

Гидратазы – ферменты, катализирующие присоединение воды по месту двойной связи.

Например, фермент *фумаратгидратаза* (*фумараза*) (EC 4.2.1.2) катализирует превращение фумарата в малат (с. 5-13).

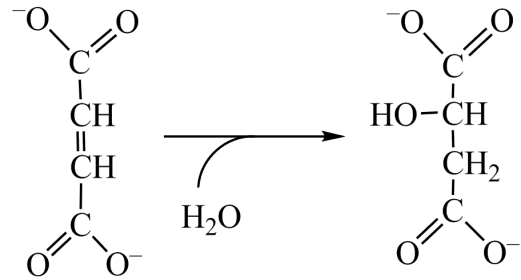
Дегидратазы – ферменты, катализирующие образование двойных связей с образованием воды.

Например, фермент *карбонат-дегидратаза* (EC 4.2.1.1) (*карбоангидраза*) катализирует реакцию



образования и разложения угольной кислоты.

Фермент *фосфопируватгидратаза* или *енолаза* (EC 4.2.1.11) катализирует реакцию дегидратации (отщепления молекулы воды), в которой преобразуется фосфоглицерат в фосфоенолпируват.



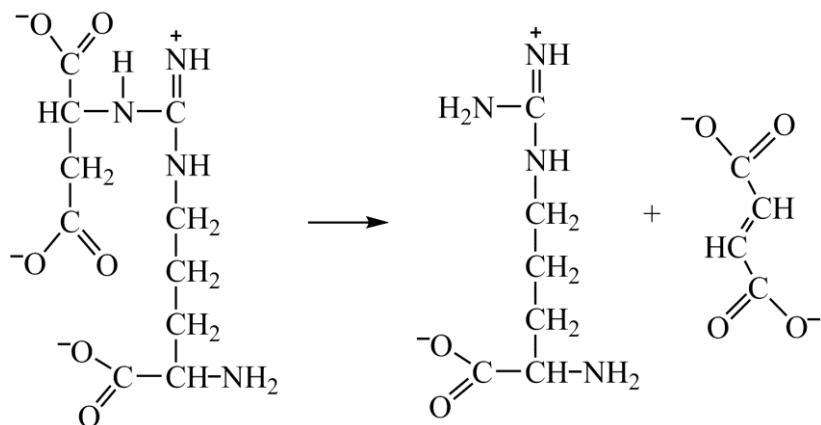
4.3. Лиазы подкласса 4.3 образуют или расщепляют C–N связи. Общее название

ферментов данного подкласса – *углерод-азот лиазы*.

4.3.1. Аммиак-лиазы.

4.3.2. Амидин-лиазы.

Например, фермент *аргининосукцинат-лиаза* (EC 4.3.2.1) катализирует превращение аргининосукцината в аргинин и фумарат (с.7-15).

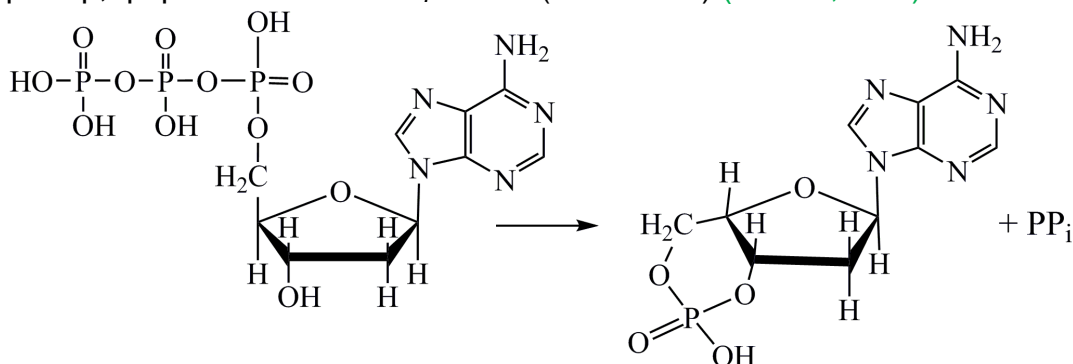


4.4. Лиазы подкласса 4.4 образуют или расщепляют C–S связи.

4.5. Лиазы подкласса 4.5 образуют или расщепляют связи между углеродом и галогеном.

4.6. Лиазы подкласса 4.6 образуют или расщепляют C–P связи.

Например, фермент *аденилатциклаза* (ЕС 4.6.1.1) (с. 6-20; 8-11)

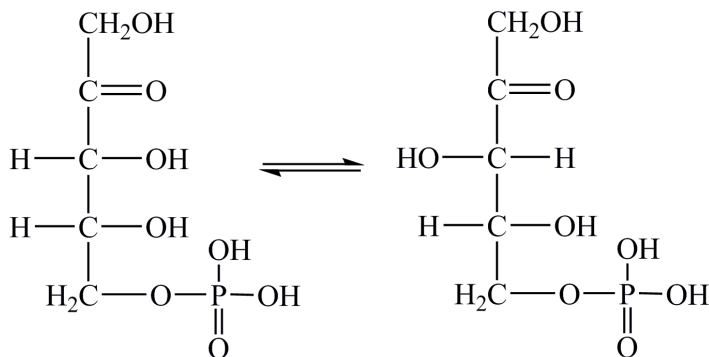


катализирует реакцию образования циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) из молекулы АТФ.

КЛАСС 5 – изомеразы катализируют превращения изомеров, включая рацемизацию, *цис-транс*-изомеризацию, перемещение двойных связей, обмен групп у асимметрического атома углерода, перемещение фосфатной группы к другому атому углерода и т. п.

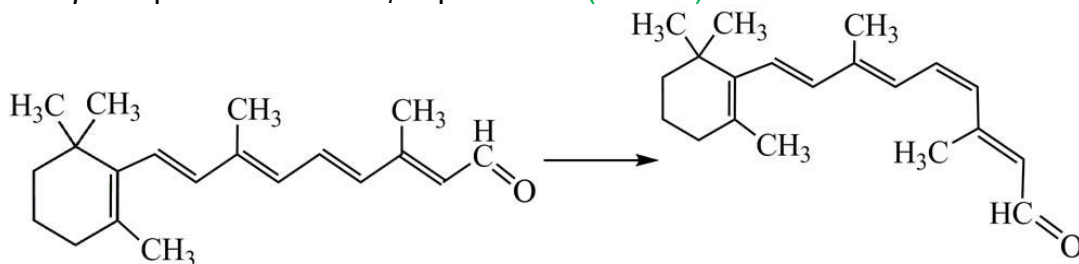
5.1. Изомеразы подкласса 5.1 катализируют рацемизацию (*рацемазы*) или взаимопревращение эпимеров (*эпимеразы*).

Например, фермент *рибозо-5-фосфат-эпимераза* (ЕС 5.1.3.1) катализирует взаимопревращение рибулозо-5-фосфата и ксилулозо-5-фосфата (с. 6-12).



5.2. Изомеразы подкласса 5.2 катализируют *цис-транс*-изомеризацию. Общее название ферментов данного подкласса – *цис-транс-изомеразы*.

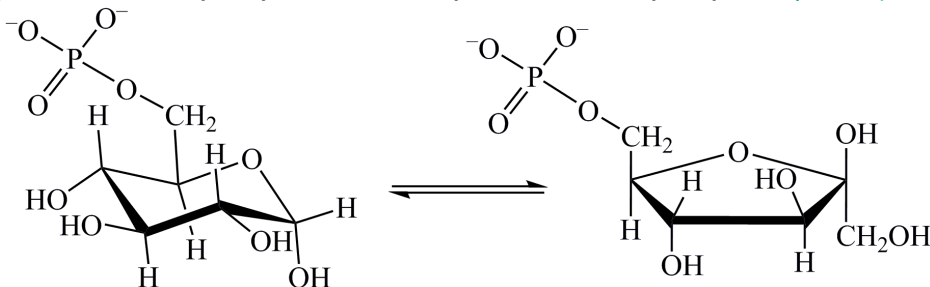
Например, фермент *ретиальизомераза* (ЕС 5.2.1.3) катализирует изомеризацию полностью *транс*-ретиная в 11-*цис*-ретиаль (с. 3-43).



5.3. Изомеразы подкласса 5.3 переносят электроны внутри молекулы – *внутримолекулярные оксидоредуктазы*.

Например, фермент *триозофосфатизомераза* (ЕС 5.3.1.1) катализирует реакцию взаимопревращения глицеральдегид-3-фосфата и дигидроксиацетонфосфата (с. 6-2), а

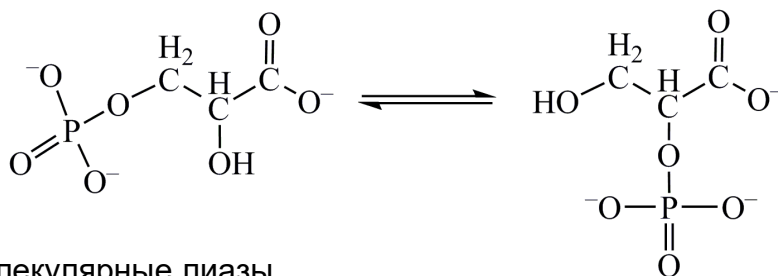
фермент *глюкозо-6-фосфатизомераза* (*фосфоглюкоизомераза*) (с. 6-2) (ЕС 5.3.1.9) катализирует взаимопревращение глюкозо-6-фосфата и фруктозо-6-фосфата.



5.4. Изомеразы подкласса 5.4 переносят группы внутри молекулы – *внутри-молекулярные трансферазы*.

Общее название ферментов данного подкласса – *мутазы*.

Например, фермент *фосфоглицератмутаза* (ЕС 5.4.2.1) преобразует 3-фосфоглицерат в 2-фосфоглицерат переноса фосфатную группу внутри молекулы глицерата (с. 6-3).



5.5. Внутримолекулярные лиазы.

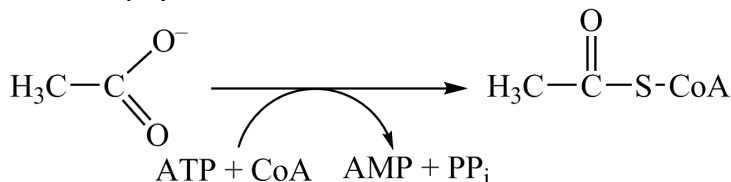
5.99. Прочие изомеразы. В частности, к этому подклассу относятся *ДНК-топоизомераза (ДНК-геликаза)* (ЕС 5.99.1.2) и *ДНК-топоизомераза АТФ-гидролизующая (ДНК-гираза)* (ЕС 5.99.1.3).

КЛАСС 6 – лигазы (синтетазы) являются ферментами, синтезирующими связи с помощью макроэргических фосфоангидридных соединений. В качестве таких компонентов может выступать АТФ или другое макроэргическое соединение, а также биотин в процессах ферментативного карбоксилирования.

6.1. Лигаза подкласса 6.1 образуют связи **C–O**. Например, ферменты (*аминокислота*)-*тРНК-лигазы (аминоацил-тРНК-синтетазы)* (ЕС 6.1.1.n) присоединяют аминокислоту к соответствующей тРНК.

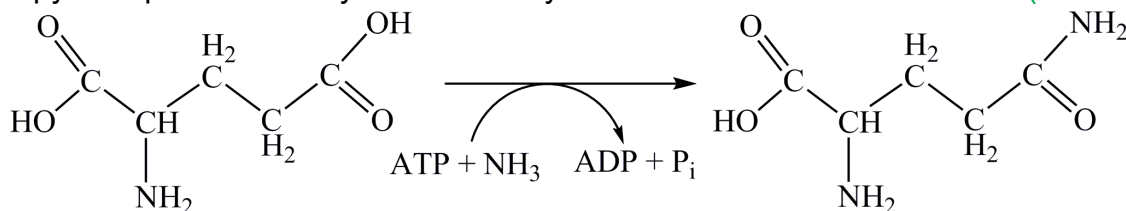
6.2. Лигаза подкласса 6.2 образуют связи **C–S**.

Например, фермент *ацетил-СоА-лигаза* (ЕС 6.2.1.1) катализирует образование ацетил-СоА из ацетата и кофермента А.



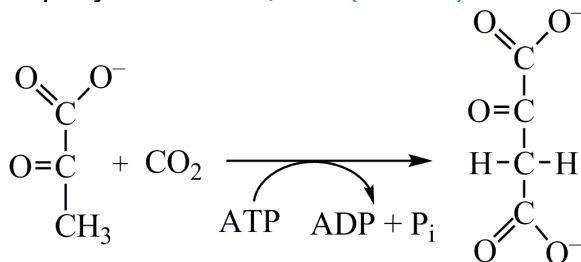
6.3. Лигаза подкласса 6.3 образуют связи **C–N**.

Например, фермент *глутамат-NH₃-лигаза (глутаматсинтетаза)* (ЕС 6.3.1.2) катализирует образование глутамина из глутаминовой кислоты и аммиака (с. 7-22).



6.4. Лигаза подкласса 6.4 образуют связи **C–C**.

Например, фермент *пируват карбоксилаза* (ЕС 6.4.1.1) катализирует присоединение CO₂ к пирувату, образуя оксалоацетат (с. 6-15).

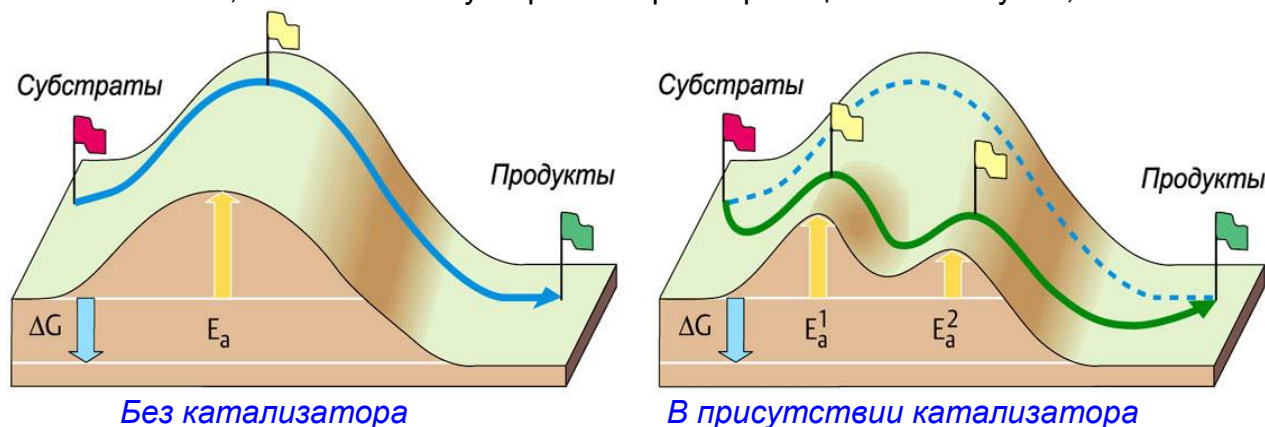


6.5. Лигаза подкласса 6.5 образуют связи **P–O**. Например, фермент *ДНК-лигаза* (ЕС 6.5.1.1) (с. 7-36; 7-46).

7.4. МЕХАНИЗМЫ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Биологические катализаторы, как и любые другие катализаторы, ускоряют протекание тех химических реакций, которые разрешены термодинамически.

Поскольку *катализатор не входит в состав* как исходных веществ, так и продуктов реакции, то он не может оказать влияние на изменение энергии Гиббса ΔG . Следовательно, он *не может* вызвать протекание реакций, для которых в данных условиях $\Delta G > 0$, а может лишь ускорить скорость реакции в том случае, если $\Delta G < 0$.



Химическая реакция превращения субстрата S в продукт P



способна протекать самопроизвольно, только в том случае, если величина свободной энергии её продукта становится меньше, чем у исходного субстрата.

В ходе химического превращения сначала определённые химические связи субстрата разрушаются, а затем формируются те химические связи, которые и формируют молекулу продукта.

То минимальное количество энергии, которое необходимо затратить на перестроение системы химических связей, называется *энергией активации* E_a .

То состояние системы, в котором системе сообщена энергия активации, вследствие чего сила связей в исходных веществах (субстратах) уже уменьшилась, но образующиеся новые связи ещё не сформировались окончательно, называется *переходным состоянием* системы. Переходное состояние соответствует вершине барьера на энергетическом профиле реакции (жёлтые флажки на рисунке). Молекула субстрата S^* в переходном состоянии далее спонтанно переходит в продукт реакции. При этом происходит выделение соответствующего количества свободной энергии.

Существует две основные возможности преодоления энергетического барьера реакции, то есть перевода молекулы субстрата в переходное состояние.

1. *Внешнее воздействие.* Можно сообщить молекуле субстрата дополнительное количество энергии за счёт внешнего воздействия, например, нагревания, облучения, воздействия давлением и т. д.
2. *Использование катализатора.* При внесении в реакцию катализатора под его влиянием изменяется путь реакции и происходит эффективное снижение энергетического барьера реакции.

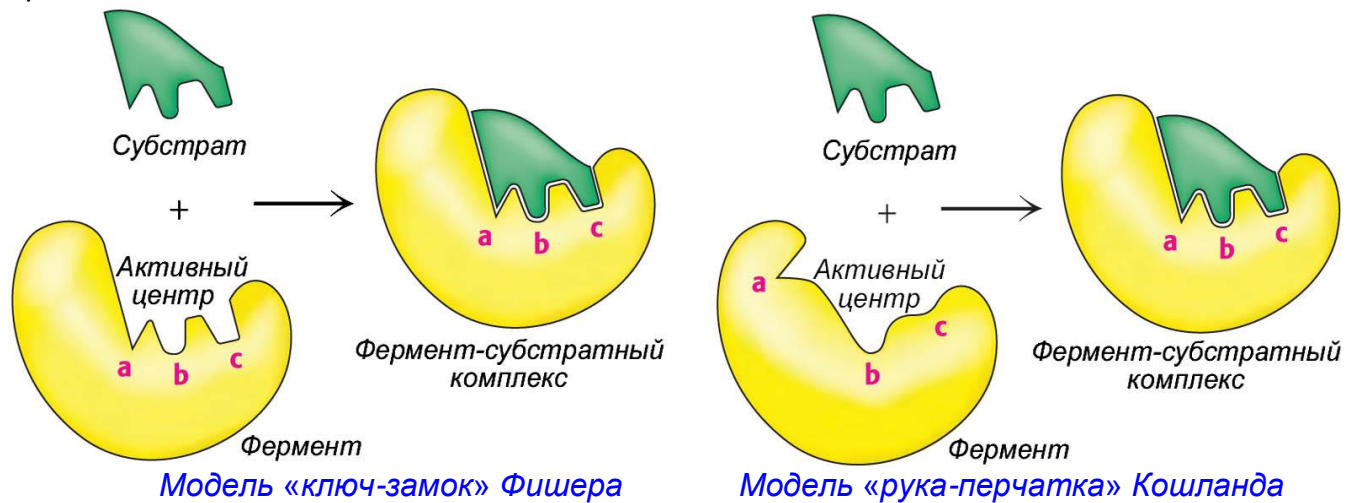
В первом случае внешнее воздействие на свободную молекулу субстрата и является активатором реакции $S \rightarrow S^* \rightarrow P$.

Во втором случае при использовании фермента (катализатора) E молекула субстрата S связывается с активным центром фермента и формирует *фермент-субстратный комплекс* ES .

Механизм действия ферментов обуславливается тем, что они образуют фермент-субстратные комплексы и тем самым *изменяют путь реакции*, причём на новом пути энергетические барьеры ниже, и энергии активации E_a^1, E_a^2 меньше по сравнению с E_a в исходной (некатализируемой) реакции.

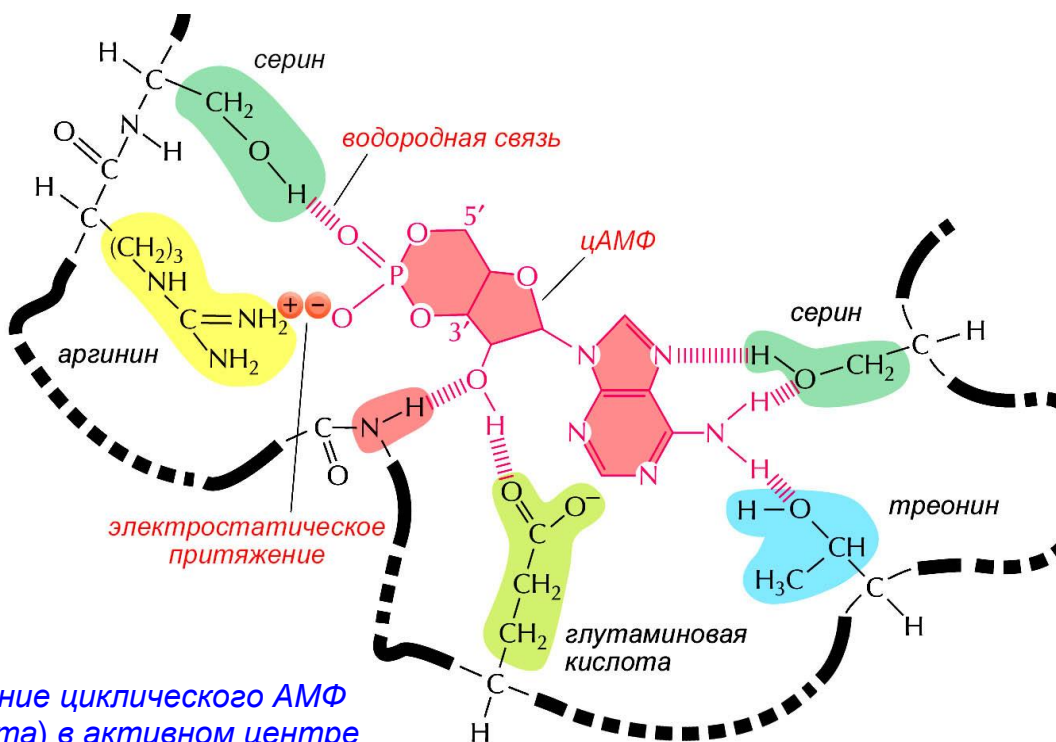
Молекула субстрата в составе фермент-субстратного комплекса оказывается в совершенно специфическом химическом окружении, которое формируют те аминокислотные остатки, из которых сформирован активный центр фермента. Активные функциональные группы (например, гидроксильная, $-\text{OH}$, или тиольная, $-\text{SH}$), полярные и заряженные аминокислотные остатки являются теми химическими инструментами и химическими «резаками», с помощью которых стимулируется переформатирование химических связей субстрата. Связывание субстрата в активном центре фермента оптимальным способом размещает те связи субстрата, которые должны быть переформатированы, относительно химически активных аминокислот фермента.

Исторически первыми моделями, учитывающими образование фермент-субстратного комплекса ES , были модель «ключ-замок» Эмиля Фишера (*Emil Fischer*), предложенная в 1890 г, и модель «рука-перчатка» Даниэля Кошланда (*Daniel E. Koshland*), предложенная в 1958 г.



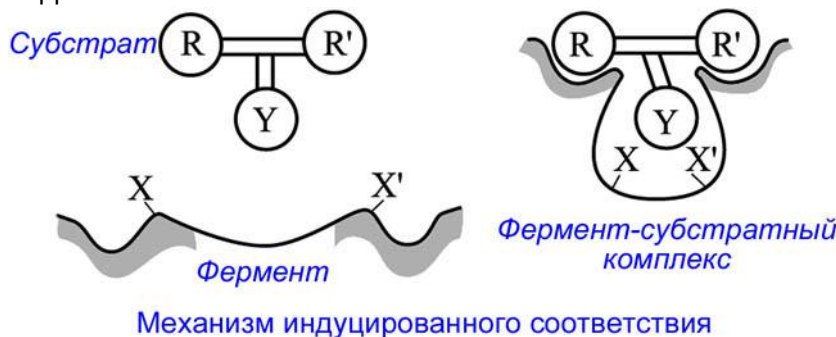
Модель стерического соответствия. В модели «ключ-замок» Фишера субстрат-ключ подходит только к определённому замку-ферменту. Такие стерические соответствия реализуются за счёт *геометрического* и *химического* соответствия (комплементарности) поверхности молекулы субстрата и поверхности активного центра.

Такая стерическая комплементарность включает в себя как *геометрическую комплементарность*, когда выступы на поверхности одной молекулы *точно совпадают* с впадинами на поверхности другой молекулы (сайты связывания **a**, **b** и **c** на рисунке), так и «*химическую комплементарность*», при которой в нужных позициях оказываются именно те атомы и функциональные группы, которые и формируют водородные связи или электростатическое притяжение.



Теория индуцированного соответствия. Даниэль Кошланд предложил модель «рука-перчатка», которая учитывала тот факт, что связывание субстрата S на ферменте E само по себе должно приводить к существенному изменению пространственной организации фермента. В результате обеспечивается возможность *пространственной настройки* отдельных участков активного центра фермента на соответствующие (связываемые ими) фрагменты сорбируемой молекулы субстрата. Сорбционный участок активного центра фермента способен принять конфигурацию, отличную от равновесной (то есть термодинамически устойчивой в отсутствие субстрата), чтобы обеспечить наибольший контакт фермента с субстратом. В результате такого *электронно-конформационного взаимодействия* фермента с субстратом и формируется активный центр, в котором фермент и субстрат «подстроились» друг к другу, как перчатка и рука «подстраиваются» друг к другу при надевании.

Такое *индуцированное соответствие* происходит вследствие того, что субстрат связывается с активным центром *двумя или большим* числом точек. Образованию таких «*многоточечных*» (хелатных) комплексов способствует то, что в свободном ферменте полипептидные цепи белка и особенно боковые группы аминокислотных остатков, находящиеся в поверхностном слое, не зафиксированы слишком жёстко и обладают определённой подвижностью (гибкостью). При этом каталитически активные группы X и X' расположены так, что они *не могут одновременно* взаимодействовать с субстратным фрагментом Y .



Поскольку молекула фермента довольно гибкая, а субстрат имеет жёсткую структуру, энергетически менее предпочтительная, но каталитически активная конформация активного центра образуется *лишь в фермент-субстратном комплексе*. На образование её тратится часть свободной энергии сорбции.

Впоследствии опыт полностью подтвердил эту гипотезу, но *только для тех белков*, которым нужно скрыть субстрат от конкурирующей с ним молекулы воды.

Для действия *трипсина*, например, этого не нужно, и в нём индуцированного соответствия субстрату не наблюдается: *трипсин* (а также – *химотрипсин*, *эластаза*, *субтилизин* и др.) не деформируется и опознает субстрат по простейшему принципу «ключ-замок».

Индуцированное соответствие достигается смещением либо крупных блоков, либо целых белковых доменов, а *не полной перестройкой* укладки белковой цепи. Эти смещения происходят, в основном, путём мелких локальных деформаций.

Активация субстрата в фермент-субстратном комплексе. Формирование фермент-субстратного комплекса стимулирует переход молекулы субстрата в переходное состояние. Конкретные механизмы активации молекулы субстрата в составе фермент-субстратного комплекса могут сильно различаться в различных ферментах. Однако можно выделить четыре основные группы причин, по которым данный переход становится возможным.

1. *Уменьшение ферментами энтропии химических реакций.* Ферменты ускоряют химические реакции, собирая все необходимые компоненты в нужном месте в нужное время. Энтропия препятствует протеканию химических реакций, снижая вероятность того, что реагирующие молекулы встретят друг друга и провзаимодействуют необходимым образом. В *мультисубстратных* реакциях энтропия снижает вероятность встречи обеих реагирующих молекул. В реакциях, требующих *однозначной ориентации* реагентов для преобразования химических связей, энтропия снижает вероятность выбора такой строгой ориентации из большого числа других взаимных

ориентаций реагентов. Ферменты как раз и являются теми молекулярными приспособлениями, которые минимизируют энтропийный фактор, оптимально позиционируя реагенты в пространстве и стимулируя перенос функциональных групп в нужном направлении. При образовании фермент-субстратного комплекса молекулы субстратов сразу ориентируются оптимальным для протекания реакции образом.

2. *Стабилизация ферментами переходного состояния химических реакций.* В молекуле субстрата, включённой в состав фермент-субстратного комплекса, возникают конформационные изменения, индуцированные активным центром фермента. Они проявляются в возникновении напряжений и деформаций. Вследствие их возникновения становится возможным перераспределение электронной плотности в молекуле субстрата и изменение его реакционной способности.

3. *Использование ферментами химических инструментов для проведения реакций.* В активном центре фермента молекула субстрата оказывается в окружении тех аминокислот фермента, которые используются для переноса атома водорода в пределах молекулы субстрата. В результате либо изменяется геометрия молекулы, либо смещается местоположение двойной связи в молекуле субстрата. В некоторых реакциях ферменты переносят новые атомы и функциональные группы между молекулами субстрата. Для переноса всего лишь нескольких электронов в некоторых реакциях в ферментах, как правило, используются ионы металлов, поскольку они могут легко переключаться между разными зарядовыми состояниями. Ионы меди и цинка прочно удерживаются внутри небольших аминокислотных кластеров. С другой стороны, ион железа обычно захватывается в центре гема (с. 3-8) – достаточно большой молекулярной структуры, которая, в свою очередь, расположена внутри глубокого кармана в теле фермента. Необычные атомы металла, такие как молибден и ванадий, используются тогда, когда необходимо приложить большую силу, как, например, в случае разрыва молекулярных связей в молекуле азота, который катализирует фермент нитрогеназа (с. 7-20).

4. *Формирование временной ковалентной связи фермента с субстратом.* В некоторых случаях при образовании фермент-субстратного комплекса молекула субстрата ковалентно связывается с активным центром фермента. При этом происходит ковалентная модификация молекулы субстрата, что сопровождается изменением её реакционной способности. Как правило, получившееся переходное состояние является нестабильным, и на следующем этапе реакции либо эта вновь сформированная связь, либо одна из других нестабильных связей разрушается и образуется необходимый продукт реакции.

Таким образом, при образовании фермент-субстратного комплекса различными путями создаются условия для повышения реакционной способности молекулы субстрата, что лежит в основе его перевода в переходное состояние (ES^*).

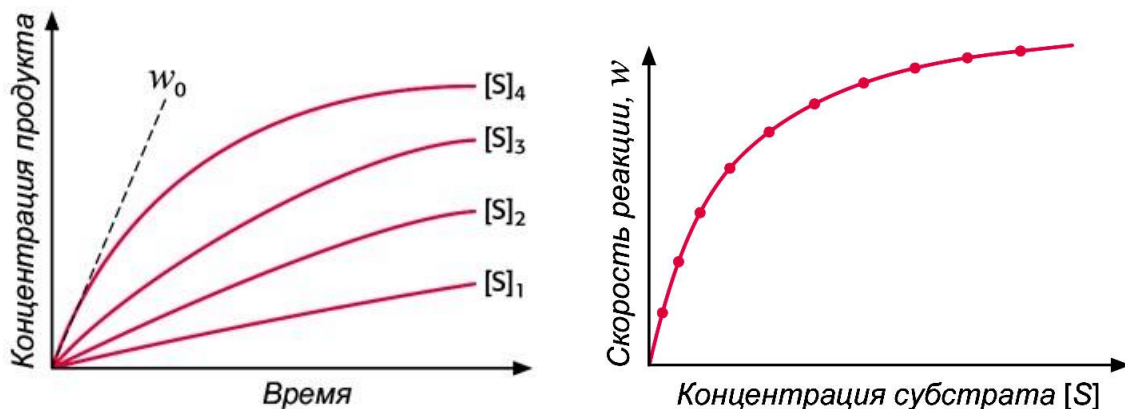
После того как молекула субстрата переходит в переходное состояние, субстрат спонтанно трансформируется в продукт реакции и его комплекс с ферментом разрушается. Таким образом, после реакции остаётся свободный фермент в исходном состоянии и появляется продукт реакции.

7.5. КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

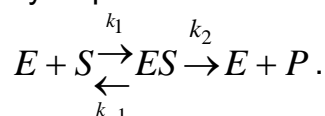
Скорость ферментативных реакций, т. е. количество продукта, синтезируемое в единицу времени, зависит от концентрации субстрата $[S]$.

Поскольку в ходе реакции субстрат в системе расходуется, то кривые зависимости концентрации образующегося продукта от времени рано или поздно выходят на насыщение (когда в системе весь субстрат будет превращён в продукт).

Поэтому за скорость реакции w принято считать начальную скорость образования w_0 продукта в начальный момент времени $t = 0$. График зависимости скорости реакции w (начальной скорости $w_0(t=0)$) от концентрации субстрата $[S]$ представлен на рисунке.



В 1913 году Леонор Михаэлис (*Leonor Michaelis*) и Мод Ментен (*Maud Leonora Menten*) предложили модель описания ферментативных реакций, которая в явном виде учитывала образование фермент-субстратного комплекса по схеме



На первом этапе молекулы субстрата S и фермента E с константой скорости k_1 образуют фермент-субстратный комплекс ES . Далее, этот комплекс либо распадается обратно на фермент и субстрат с константой скорости k_{-1} , либо на втором этапе процесса с константой скорости k_2 происходит преобразование субстрата в продукт P и диссоциация продукта с фермента.

Используя эмпирическое наблюдение о том, что большинство ферментативных процессов происходят в стационарных условиях, то есть на протяжении практически всего процесса концентрации промежуточных комплексов не изменяются во времени, мы можем записать

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[S][E] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0,$$

где слагаемое $k_1[S][E]$ – это скорость появления фермент-субстратного комплекса в прямой реакции из субстрата и фермента на первом этапе процесса, а слагаемое $-(k_{-1}[ES] + k_2[ES])$ – это скорость уменьшения концентрации фермент-субстратного комплекса либо при распаде обратно на фермент и субстрат в обратной реакции на первом этапе процесса, либо при распаде на фермент и продукт в прямой реакции на втором этапе процесса.

Стационарность протекания процесса означает, что скорость образования фермент-субстратного комплекса равна скорости его распада

$$k_1[S][E] = k_{-1}[ES] + k_2[ES].$$

Следовательно,

$$[ES](k_{-1} + k_2) = k_1[S][E],$$

или

$$\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]}.$$

Вид правой части уравнения соответствует выражению для константы равновесия для диссоциации комплекса ES на продукты E и S , которую в энзимологии называют *константой Михаэлиса* K_M

$$K_M = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}.$$

Поскольку фермент в системе может либо входить в состав фермент-субстратного комплекса, либо быть свободным, то для фермента справедливо уравнение материального баланса

$$[E]_0 = [E] + [ES],$$

где $[E]_0$ – начальная концентрация фермента в системе. С учётом уравнения материального баланса можем записать

$$K_M = \frac{([E]_0 - [ES])[S]}{[ES]},$$

$$K_M [ES] = [E]_0 [S] - [ES][S],$$

$$K_M [ES] + [ES][S] = [E]_0 [S],$$

$$[ES] = \frac{[E]_0 [S]}{K_M + [S]}.$$

Скорость ферментативной реакции в модели Михаэлиса–Ментен определяется как

$$w = \frac{d[P]}{dt} = k_2 [ES] = \frac{k_2 [E]_0 [S]}{K_M + [S]}.$$

При *низкой* концентрации субстрата ($[S] \rightarrow 0$) скорость w ферментативной реакции линейно растёт с ростом концентрации

$$w = \frac{k_2 [E]_0}{K_M} [S].$$

При *большой* концентрации субстрата ($[S] \rightarrow \infty$) рост скорости w ферментативной реакции прекращается, и кривая выходит на насыщение, достигая максимального значения w_{\max}

$$w_{\max} = k_2 [E]_0.$$

Уравнение

$$w = \frac{w_{\max} [S]}{K_M + [S]}.$$

называется *уравнением Михаэлиса–Ментен (Michaelis–Menten equation)* или просто *уравнением Михаэлиса*.

Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата в кинетической модели Михаэлиса–Ментен приведена на рисунке.

Из уравнения Михаэлиса следует, что при

$$w = \frac{w_{\max}}{2}$$

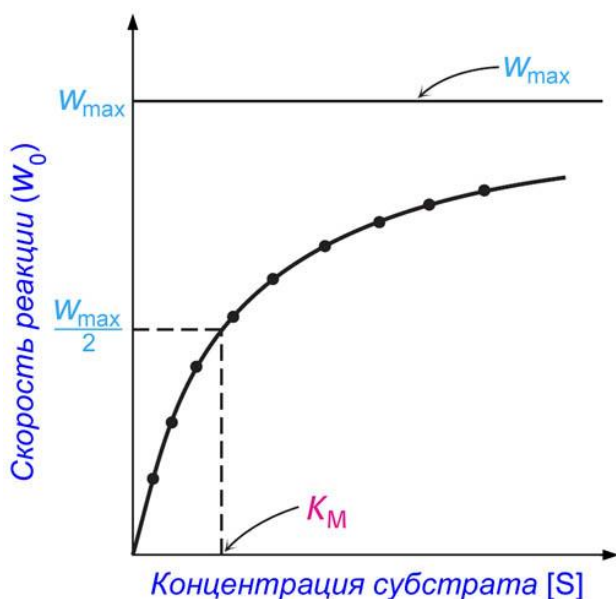
$$K_M = [S].$$

Таким образом, константа Михаэлиса *численно равна* концентрации субстрата, при которой скорость (стационарной) реакции достигает *половины* своего максимального значения.

Параметры кинетики Михаэлиса–Ментен являются важными характеристиками ферментативных реакций.

1. Максимальная скорость ферментативной реакции w_{\max} . Поскольку

$w_{\max} = k_2 [E]_0$, то w_{\max} можно использовать в качестве *характеристики количества*



фермента, присутствующего в неизвестном растворе (для «оценки» активности фермента). Обычно w_{\max} выражают в единицах ферментативной активности, например, в международных единицах МЕ (1 микромоль/с) при условии, что фермент насыщен субстратом.

На практике измерение активности в крови фермента *аспартатаминотрансферазы* позволяет в три раза увеличить достоверность диагностирования инфаркта миокарда, при котором резко повышается активность этого фермента в сыворотке крови.

2. Константа Михаэлиса
 K_M . Величина K_M отражает сродство фермента к субстрату. Чем больше эта величина, тем меньшее сродство к субстрату имеет фермент.

Так, величина K_M по отношению к глюкозе у фермента *глюкокиназы* составляет 10 мМ, а для *гексокиназы* – 0,01 мМ. Следовательно, гексокиназа проявляет большее сродство к глюкозе, чем глюкокиназа.

При одинаковой концентрации субстрата она с большей скоростью катализирует фосфорилирование глюкозы. K_M выражается в молях субстрата. Значения K_M для некоторых ферментов представлены в таблице.

Фермент	Субстрат	K_M , мкМ
Химотрипсин	Ацетил-L-триптофанамида	500
Лизоцим	Гекса-N-ацетилглюкозамин	6
Бэта-галактозидаза	Лактоза	4000
Треонин дезаминаза	Треонин	5000
Карбоангидраза	CO ₂	8000
Пенициллиназа	Бензилпенициллин	50
Пируваткарбоксилаза	Пируват	400
	HCO ₃ ⁻	1000
	АТФ	60
Аргинин-тРНК-синтетаза	Аргинин	3
	тРНК	0,4
	АТФ	300

3. Каталитическая константа k_2 . Константу скорости второго этапа реакции k_2 называют *каталитической константой* и часто обозначают как k_{cat} или k_c .

Если концентрация фермента известна (например, при работе с очищенными ферментными препаратами), то из w_{\max} можно определить

$$k_2 = \frac{w_{\max}}{[E]_0}.$$

Параметр k_2 характеризует *эффективность ферментативного катализа* и используется для получения информации о его механизмах.

Он может рассматриваться как количество молекул продукта, образуемых в единицу времени (в 1 с) на *одном* активном центре фермента, насыщенном субстратом и выражается числом оборотов фермента (*turnover number*).

Числа оборотов для некоторых ферментов	Число оборотов (в 1 с)
Карбоангидраза	600000
3-Кетостероид-изомераза	280000
Ацетилхолинэстераза	25000
Пенициллиназа	2000
Лактатдегидрогеназа	1000
Химотрипсин	100
ДНК-полимераза I	15
Триптофан-синтетаза	2

Приближение Лайнуивера–Берка. Нахождение значений w_{\max} и K_M из уравнения Михаэлиса требует набора данных во всем диапазоне концентраций. Эту задачу можно значительно упростить, если привести исследуемую зависимость к уравнению *прямой* путём преобразования координат. В энзимологии одним из наиболее популярных является подход, предложенный Хансом Лайнуивером (*Hans Lineweaver*) и Дэном Берком (*Dean Burk*).

Преобразуем уравнение Михаэлиса в вид

$$\frac{1}{w} = \frac{K_M + [S]}{w_{\max} [S]},$$

а затем в уравнение Лайнуивера-Берка

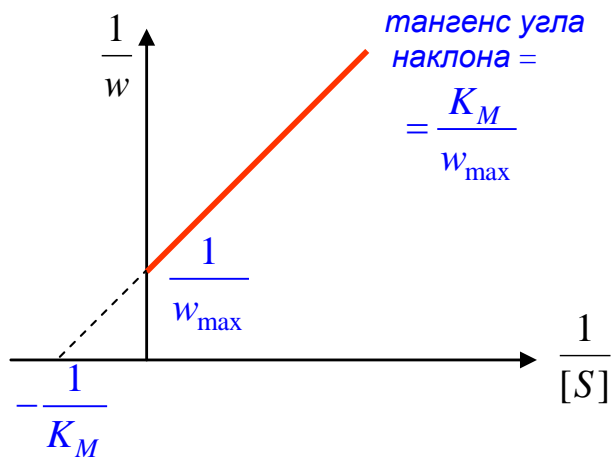
$$\frac{1}{w} = \frac{K_M}{w_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{w_{\max}}.$$

График уравнения Лайнуивера-Берка, представляющий собой прямую в координатах $\left(\frac{1}{w}, \frac{1}{[S]}\right)$, приведён на рисунке.

По графику уравнения Лайнуивера-Берка удобно определять w_{\max} , K_M и k_2 . Для этого продолжают прямую до пересечения её с осью абсцисс и ординат.

1. Значение максимальной скорости w_{\max} равно обратной величине отрезка, отсекаемого прямой Лайнуивера-Берка на оси ординат.

2. Значение константы Михаэлиса K_M равно обратной величине отрезка, отсекаемого прямой Лайнуивера-Берка на оси абсцисс.



7.6. ОБЩИЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ

Ферменты обладают всеми свойствами белков. Однако по сравнению с белками, выполняющими другие функции в клетке, и несмотря на существование определённых различий в строении, функциях и внутриклеточной локализации, ферменты имеют ряд специфических, присущих только им свойств.

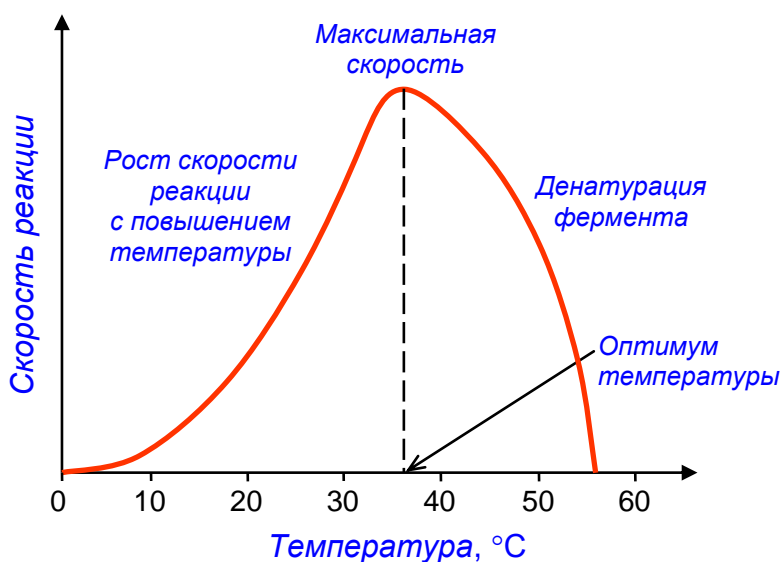
Термолабильность ферментов. Скорость ферментативных реакций, как и всяких других, зависит от температуры. При низких температурах (приблизительно до 40–50°C) повышение температуры на каждые 10°C в соответствии с *правилом Вант-Гоффа* сопровождается увеличением скорости химической реакции в 2–4 раза.

При высоких температурах более 55–60°C активность фермента резко снижается из-за его *тепловой денатурации*, и, как следствие этого, наблюдается резкое снижение скорости ферментативной реакции.

Максимальная активность ферментов наблюдается обычно в пределах 40–60°C. Температура, при которой активность фермента максимальна, называется *температурным оптимумом*.

Температурный оптимум ферментов термофильных микроорганизмов находится в области более высоких температур.

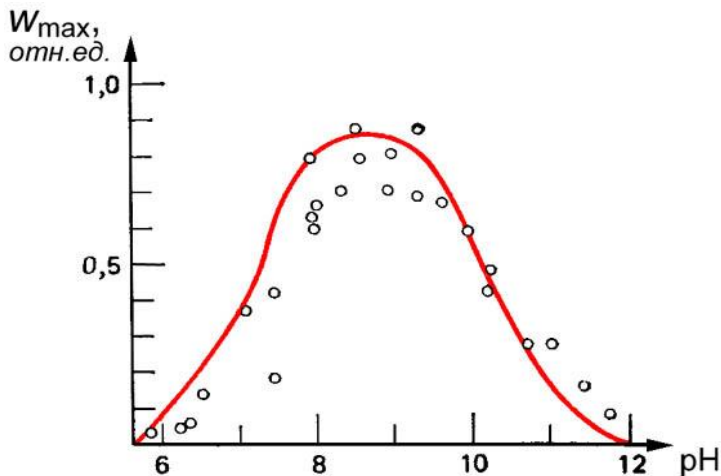
Как видно из представленного графика при температуре, близкой к 4°C ферментативные реакции практически не идут. Поэтому биологические объекты могут перед проведением биохимических исследований достаточно продолжительное время



храниться в холоде. Именно холод позволяет сохранять пищевые продукты от аутолиза (самопереваривания).

При температуре выше 55°C большинство ферментов полностью утрачивает каталитические свойства (инактивируется). Поэтому прогревание до 55–56°C широко используется для процедуры *пастеризации*, которая повышает срок хранения пищевых продуктов (молока и др.).

Зависимость активности ферментов от pH среды. Типичная зависимость ферментативной активности от pH описывается *колоколообразной* кривой, как показано, например, на рисунке для фермента *гистидаза*, действующего на субстрат гистидин.



Влияние pH на активность ферментов связано с ионизацией функциональных групп *аминокислотных остатков* данного белка, обеспечивающих оптимальную конформацию активного центра фермента. При удалении pH от оптимальных значений происходит изменение зарядового состояния функциональных групп молекулы белка.

Например, при *закислении* среды происходит *протонирование* свободных аминогрупп (NH_3^+), а при *защелачивании* происходит *депротонирование* карбоксильных групп (COO^-). Это приводит к изменению конформации молекулы фермента и конформации активного центра; следовательно, нарушается присоединение субстрата, кофакторов и коферментов к активному центру.

Кроме того, pH среды может влиять на степень ионизации или пространственную организацию *субстрата*, что также влияет на сродство субстрата к активному центру.

При значительном отклонении от оптимального значения pH может происходить *денатурация* белковой молекулы с полной потерей ферментативной активности.

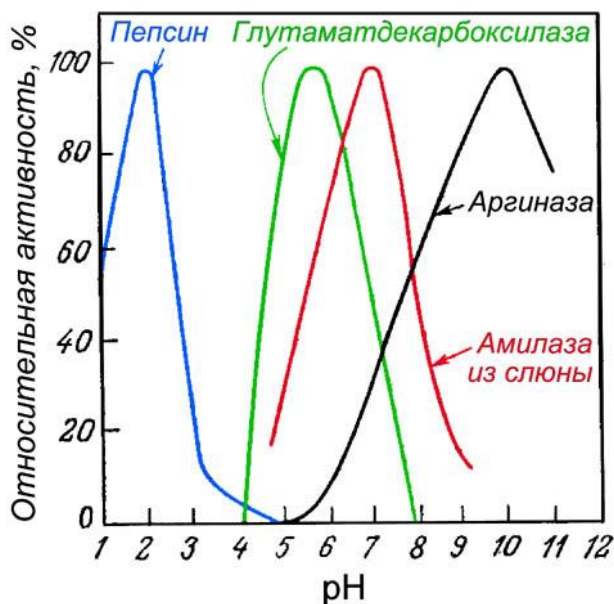
Колоколообразная форма кривой означает, что существует некоторое *оптимальное* состояние ионизации фермента, обеспечивающее наилучшее соединение с субстратом и катализ реакции.

Ферменты проявляют оптимальную активность при разных pH, что позволяет осуществлять тонкую регулировку путей метаболизма либо самим организмом, либо в результате внешних воздействий на организм.

Оптимум pH для большинства ферментов лежит в пределах от 6 до 8. Однако есть и исключения: например, пепсин наиболее активен при pH = 2. Количественное определение ферментов проводят при оптимальном для данного фермента pH.

Специфичность ферментов. Ферменты обладают высокой специфичностью действия. Выделяют несколько видов специфичности ферментов.

- Абсолютная специфичность** – способность фермента катализировать превращение только одного субстрата (*один фермент – один субстрат*). К ферментам, обладающим абсолютной специфичностью, относятся *аргиназа*, *уреаза*, *лактаза*, *сахараза*, *рестриктазы* и др.



2. *Относительная специфичность* – способность фермента катализировать превращение группы сходных по строению субстратов с одинаковым типом химической связи (*один фермент – одна связь*). Например, *протеолитические ферменты* гидролизуют пептидные связи в различных белках, *липаза* гидролизует сложную эфирную связь в сложных эфирах глицерина и высших жирных кислотах.
3. *Стереоспецифичность* – фермент катализирует превращение определённого стереоизомера из набора возможных стереоизомеров. Так в организме человека ферменты, участвующие в превращении моносахаридов, проявляют специфичность по отношению к их D-стереоизомерам, а ферменты, участвующие в превращении аминокислот, – к их L-стереоизомерам.

Активность ферментов. Мерой проявления силы каталитического действия ферментов является их *активность*. Способность ферментов менять свою активность в различных условиях имеет большой биологический смысл. Это свойство позволяет живой клетке адаптировать состояние обменных процессов к изменяющимся условиям.

Для характеристики фермента необходимо определить его активность. Существуют некоторые общие принципы количественного определения активности ферментов. Активность ферментов можно определять *двумя* способами:

- 1) по скорости накопления в реакционной смеси продукта реакции;
- 2) по скорости исчезновения из реакционной смеси субстрата.

Оба эти подхода равнозначны и могут быть использованы на практике. Однако при определении активности фермента необходимо соблюдать ряд обязательных условий. В реакционной смеси, в которой проводится определение активности фермента:

- температура должна соответствовать температурному оптимуму данного фермента;
- рН среды должна соответствовать рН-оптимуму данного фермента;
- концентрация субстрата должна быть на уровне насыщающей;
- должны присутствовать кофакторы, необходимые для работы фермента;
- должны присутствовать активаторы фермента.

Таким образом, активность фермента определяется в оптимальных для него условиях. В этих условиях активность фермента пропорциональна его концентрации в системе и поэтому может использоваться для оценки его концентрации ($w_{\max} = k_2[E]_0$).

7.7. РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Активность ферментов может изменяться под влиянием различных внешних факторов.

Внешние регуляторы ферментативных реакций можно разделить на *две группы*.

В первую группу входят внешние регуляторы, которые *неспецифичны в структурном отношении* – их активность коррелирует с некоторыми интегральными физико-химическими свойствами (такими как, например, поверхностное натяжение в их растворах, растворимость, степень ионизации) в большей степени, чем с присутствием в их структуре каких-либо специфических функциональных химических группировок.

Примеры таких веществ – лекарственные вещества-анестетики общего действия, такие, как *хлороформ* или *диэтиловый эфир*, физиологическая активность которых коррелирует с размером их молекул и с растворимостью в органических неполярных растворителях.

К другому подвиду первой группы веществ относятся некоторые наркотические и возбуждающие агенты, такие как *пикртоксин* или *димфлин*, действие которых основано на неспецифическом связывании с внешним слоем мембран и изменении ионной проницаемости синаптических мембран (нервных синапсов).

Вторую группу составляют *эффекторы* (или *модуляторы*), действие которых основано на изменении ими каталитического действия ферментов в результате *специфического* взаимодействия эфффектора с молекулой фермента.

Благодаря тому, что скорости обычных химических реакций намного ниже скоростей каталитических реакций, избирательность действия таких специфических эффекторов обеспечивает эффект «химического усиления», благодаря которому всего несколько молекул эффектора существенным образом влияют на выход продукта в масштабах клетки.

Эффекторы ферментативных реакций принято разделять на *ингибиторы* и *активаторы*.

Активаторы – это вещества, под влиянием которых происходит увеличение активности ферментов. В качестве активаторов могут выступать катионы металлов. Например, Na^+ является активатором амилазы слюнных желёз человека.

Ингибиторы – это вещества, под влиянием которых происходит уменьшение активности ферментов.

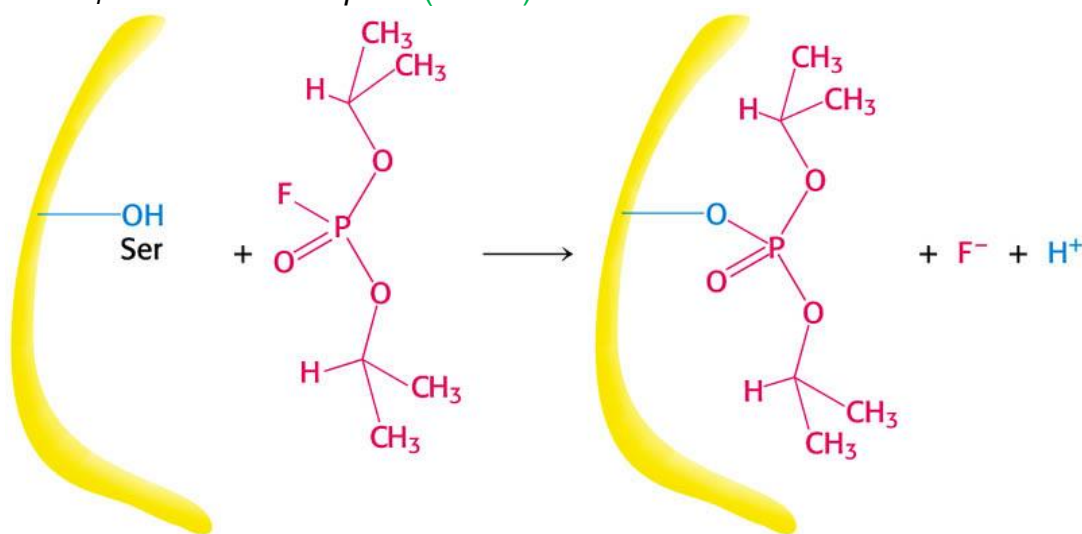
По продолжительности ингибирующего эффекта ингибиторы подразделяются на:

- **необратимые ингибиторы** (*irreversible inhibitors*), которые необратимо модифицируют целевой фермент;
- **обратимые ингибиторы** (*reversible inhibitors*), которые не вносят в молекулу фермента каких-либо изменений после своей диссоциации.

Необратимое ингибирование. Как правило, необратимые ингибиторы взаимодействуют с функциональными группами активного центра фермента. Они ковалентно соединяются с ними и, таким образом, блокируют их. В результате этого фермент утрачивает способность взаимодействовать с субстратом.

Классическим примером необратимых ингибиторов являются фосфорорганические вещества. Одним из их типичных представителей является *диизопропилфторфосфат* (ДФФ, *diisopropylphosphofluoridate*, DIPF). Фосфорорганические соединения соединяются с гидроксильной группой остатка серина в активном центре фермента, как показано на рисунке для фермента *ацетилхолинэстераза* (с.3-11).

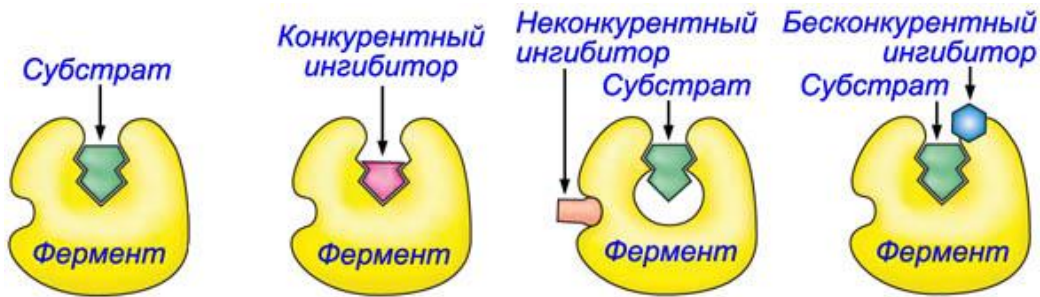
Явление необратимого ингибирования используется в народном хозяйстве, биотехнологии и медицине. На нём основано применение инсектицидов (средств борьбы с насекомыми), некоторых лекарственных препаратов (например, антихолинэстеразные средства) и боевых отравляющих веществ нервно-паралитического действия.



Обратимое ингибирование. В отличие от ингибиторов необратимого действия обратимые ингибиторы лишь на определённый промежуток времени понижают активность ферментов.

Обратимые ингибиторы по механизму ингибирующего эффекта подразделяются на *конкурентные* (*competitive*), *неконкурентные* (*noncompetitive*) и *бесконкурентные* (*uncompetitive*).

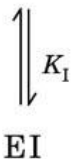
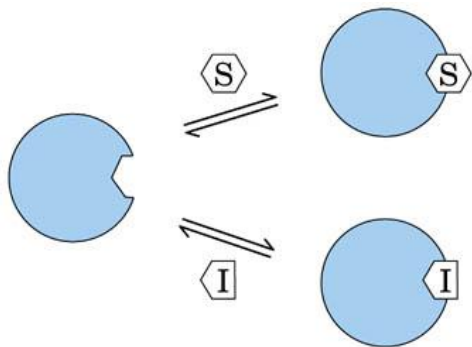
Конкурентным называется ингибирование (*competitive inhibition*), при котором молекула ингибитора подобна молекуле субстрата (аналог субстрата). Она блокирует активный центр фермента и полностью предотвращает связывание фермента с субстратом. Субстрат и ингибитор конкурируют за место связывания на ферменте.



Образование комплекса фермент-ингибитор EI является кинетическим «тупиком» – из него не образуются продукты. Ингибитор I выводит из реакции некоторое количество свободного фермента, который теперь не может связываться с субстратом.

Поэтому концентрация комплекса ES понижена, и скорость реакции $w = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES]$

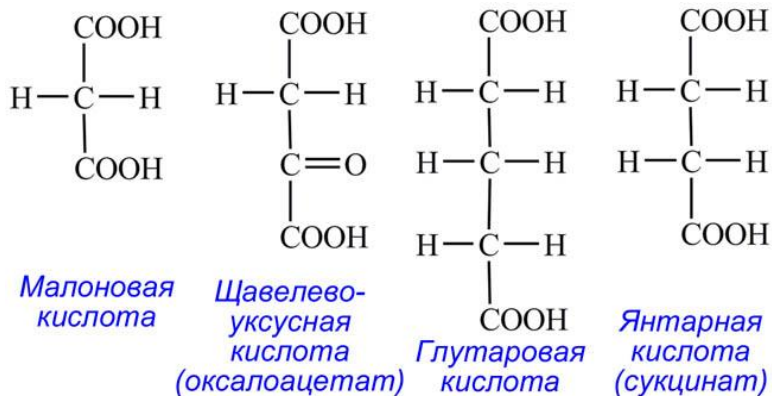
(пропорциональная $[ES]$) падает.



K_I – константа диссоциации комплекса фермент-ингибитор

Классическим примером конкурентного ингибитора является *малоновая кислота*, которая обратимо понижает активность фермента *сукцинатдегидрогеназы*, конкурируя с субстратом – *сукцинатом* (янтарной кислотой).

Структурное сходство позволяет малоновой кислоте связываться с активным центром фермента сукцинатдегидрогеназы. Однако это соединение не способно вступать в реакцию, катализируемую данным ферментом (реакцию дегидрирования). Поэтому ингибитор присоединяется к активному центру фермента, блокируя тем самым возможность его взаимодействия с истинным субстратом.



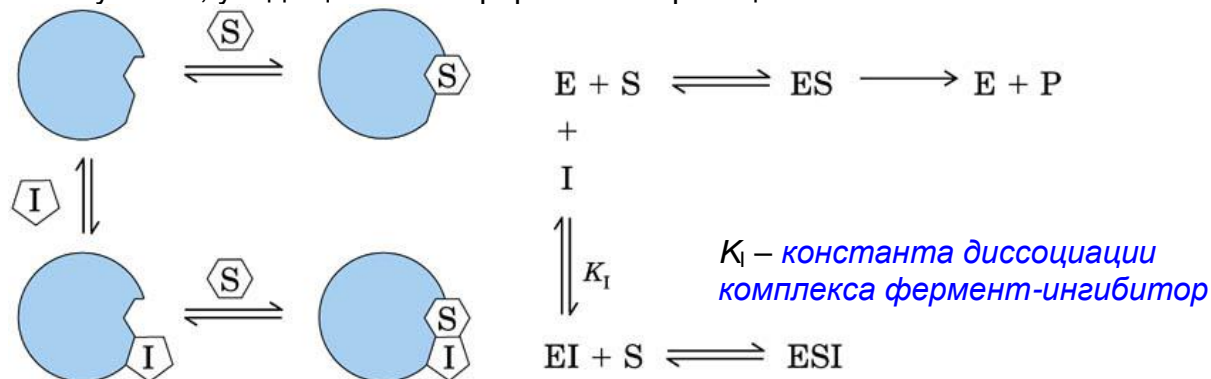
Кроме малоновой кислоты, конкурентным ингибитором сукцинатдегидрогеназы является также *щавелевоуксусная кислота (оксалоацетат)*. Конкурентное ингибирование сукцинатдегидрогеназы щавелево-уксусной кислотой играет важную роль в регуляции окислительно-восстановительных превращений в митохондриях.

Явление конкурентного ингибирования может быть снято путём резкого повышения концентрации субстрата в реакционной смеси.

Неконкурентным называется ингибирование, при котором связывание фермента с ингибитором не влияет на связывание фермента с субстратом, но ингибитор модифицирует функционально важную каталитическую группу фермента, «отключая» фермент. Структура активного центра изменяется, и каталитическое превращение не происходит.

При неконкурентном ингибировании ингибитор не влияет на связывание субстрата с ферментом, но препятствует превращению субстрата в продукты своим присутствием в составе фермент-субстратного комплекса. В комплексе фермент-ингибитор-субстрат

ESI не происходит преобразование субстрата, и такой комплекс тоже является кинетическим тупиком, уводящим часть фермента из реакции.



Неконкурентные ингибиторы, поскольку они модифицируют функциональные группы целевого фермента, действуют, как правило, необратимо.

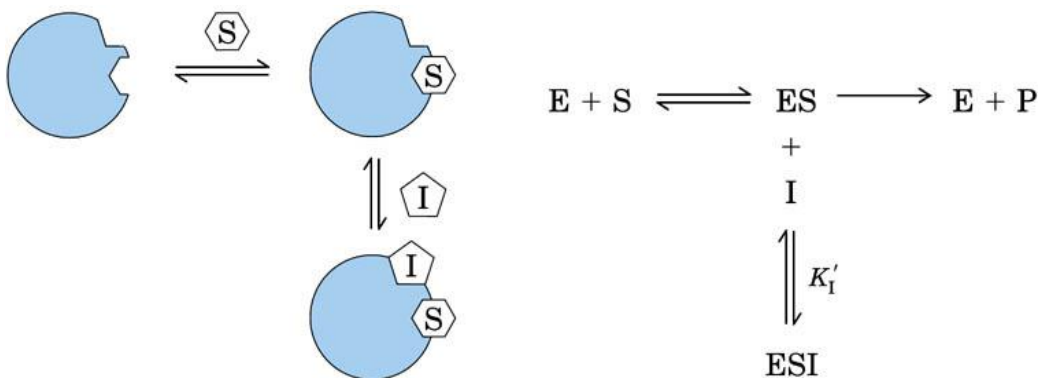
Примером неконкурентного ингибитора являются анионы CN^- , которые прочно связываются ионом Fe_3^+ , входящим в каталитический участок геминового фермента – *цитохромоксидазы*. Блокада этого фермента выключает дыхательную цепь, и клетка погибает.

Токсичность действия ионов тяжёлых металлов (ртути, свинца, кадмия, мышьяка) и их органических соединений также обусловлена неконкурентным ингибированием, механизм которого заключается в блокировании сульфгидрильных групп каталитического участка фермента.

Снять действие неконкурентного ингибитора избытком субстрата нельзя, а можно лишь веществами, прочно связывающими ингибитор – *реактиваторами*.

Бесконкурентным называется ингибирование, которое возникает, когда ингибитор может связываться с ферментом только в виде его комплекса с субстратом.

Бесконкурентный ингибитор не присоединяется к ферменту в отсутствие субстрата и даже способен облегчать присоединение субстрата, а затем, связываясь, сам инактивирует фермент.



7.8. АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ

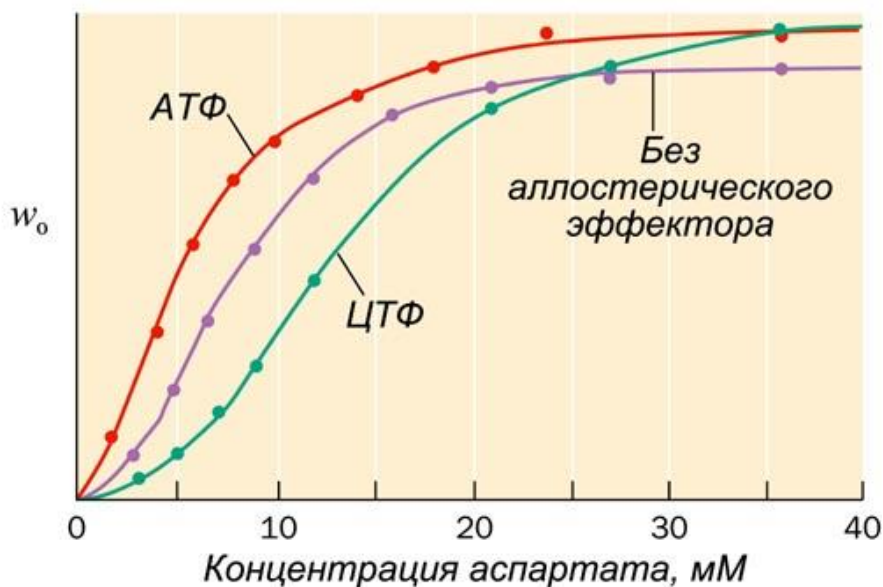
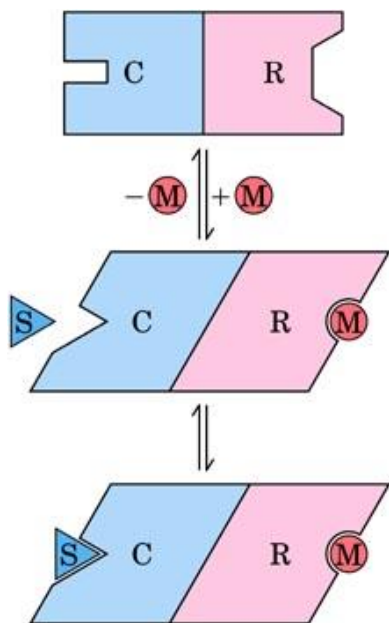
Существует ещё один вид регуляции активности ферментов – *аллостерическая регуляция*. Он характерен для особой группы ферментов – *аллостерических ферментов*. К ним относятся олигомерные белки, в структуре которых имеются *регуляторные центры*.

В составе молекул аллостерических ферментов выделяются два типа субъединиц: *каталитические (С)* и *регуляторные (R)*.

Каталитические субъединицы содержат *активные центры* фермента, а регуляторные, соответственно, – *регуляторные центры*. Регуляторный центр представляет собой участок молекулы, способный специфически взаимодействовать с *аллостерическим эффектором (модулятором (М))*, который может быть как активатором, так и ингибитором фермента.

Пусть изначально свободный фермент не активен, то есть он имеет низкое сродство с молекулой субстрата (S). В результате взаимодействия фермента с аллостерическим модулятором (на рисунке этот модулятор является активатором)

изменяется конформация регуляторной субъединицы (R), что, в свою очередь, стимулирует изменение конформации каталитической субъединицы (C), увеличение сродства активного центра к субстрату (S) и связывание субстрата с ферментом.

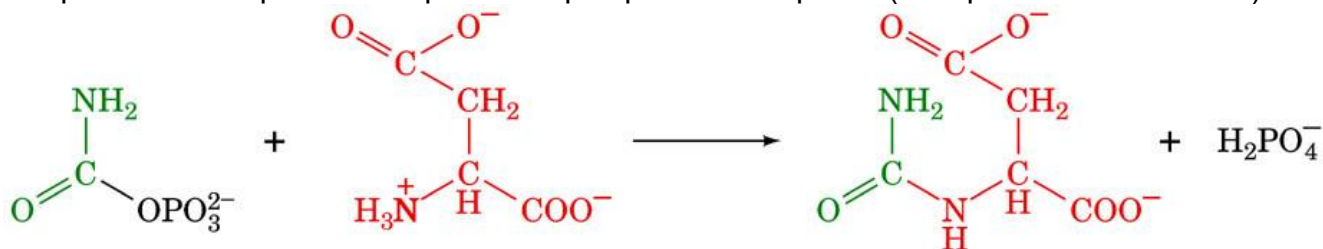


Аллостерическое ингибирование является обратимым. Диссоциация модулятора с R-субъединицы приводит к восстановлению исходных конформаций субъединиц, в результате чего и сродство активного центра к субстрату возвращается к исходному значению.

Таким образом, механизм действия аллостерических эфффекторов заключается в изменении конформации активного центра, затрудняющем или облегчающем превращение субстрата. Некоторые ферменты имеют несколько аллостерических центров, чувствительных к различным эфффекторам. Роль аллостерического эфффектора зачастую выполняют метаболиты, гормоны, ионы металлов, коферменты, а иногда и молекулы субстрата.

Аллостерические ферменты отличаются от прочих ферментов особой S-образной (сигмоидной) кривой зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата, как показано на рисунке. Такой характер зависимости свидетельствует о том, что активные центры субъединиц функционируют кооперативно, то есть сродство каждого следующего активного центра к субстрату определяется степенью насыщения предыдущих центров.

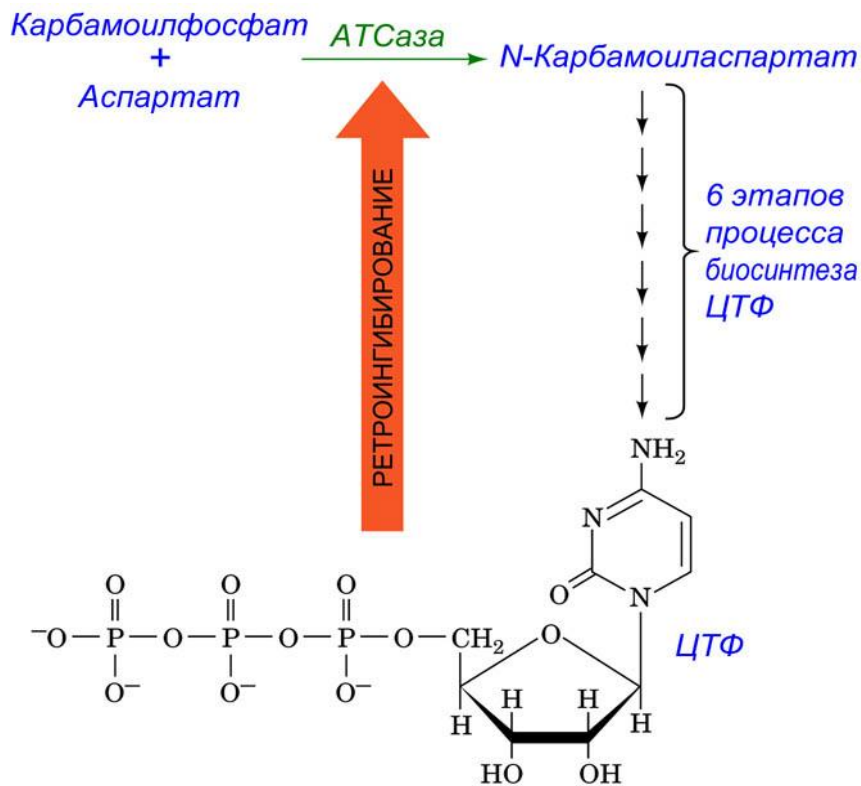
На рисунке представлены кривые для фермента *аспартат-транскарбамоилаза* (*aspartate transcarbamoylase*, АТСаза (с. 7-25)), известного также как *аспартат-карбамоилтрансфераза* (*aspartate carbamoyltransferase*). АТСаза катализирует образование N-карбамоиласпартата из карбамоилфосфата и аспартата (аспарагиновой кислоты).



Эта реакция является первой в биосинтезе пиримидинов. Оба субстрата кооперативно связываются с ферментом. АТСаза аллостерически ингибируется цитидин трифосфатом (ЦТФ, *cytidine triphosphate*, СТР) (зелёная кривая на рисунке) и в то же время аллостерически активируется аденозин трифосфатом (АТФ, *adenosine triphosphate*, АТР) (красная кривая на рисунке).

Очень часто в роли аллостерических ингибиторов выступает продукт реакции или метаболического пути, в котором участвует фермент. Процесс ингибирования фермента

продуктом реакции называется *ретроингибированием* (ингибированием по принципу отрицательной обратной связи, *feedback inhibition*) (с. 8-4).



В случае АТСаза таким ретроингибитором (*feedback inhibitor*) является конечный продукт метаболической цепи (ЦТФ), который ингибирует первый этап в метаболической цепи биосинтеза ЦТФ – фермент АТСаза (с. 7-25).

В качестве аллостерического активатора аллостерического фермента часто выступает молекула субстрата этого фермента. В этом заложен глубокий биологический смысл. В условиях, когда в клетке возрастает содержание субстрата, для поддержания постоянства внутренней среды появляется необходимость в его утилизации. Это достигается за счёт активации фермента, который катализирует его превращение.

Примером подобной активации может быть активация фермента *глюкокиназа* субстратом *глюкоза*.

Различают *гетеротропные* и *гомotropные* аллостерические эффекторы (ингибиторы и активаторы).

Гетеротропные эффекторы отличаются по своей химической структуре от субстрата, примером чему может служить ЦТФ как аллостерический ингибитор АТСаза.

Гомотропная аллостерическая регуляция осуществляется самим субстратом: присоединение субстрата к одной субъединице фермента изменяет конформацию всего белка, при этом может изменяться и активность других субъединиц.

Аллостерические механизмы регуляции характерны не только для ферментов, но и для *других* белков. В частности, транспорт кислорода *гемоглобином* регулируется по механизму гомотропной аллостерической активации: молекула кислорода, присоединившаяся к одной субъединице гемоглобина, увеличивает сродство к кислороду других субъединиц.

7.9. МУЛЬТИСУБСТРАТНЫЕ РЕАКЦИИ

Большинство ферментативных реакций в биологических системах являются мультисубстратными.

Именно в мультисубстратных реакциях происходит перенос функциональных групп, таких как фосфорильная или аминогруппа, от одного субстрата к другому. В окислительно-восстановительных реакциях между субстратами переносятся электроны.

Мультисубстратные реакции условно разделяют на два класса:

- 1) **реакции с образованием тройного комплекса**, которые ещё называют *реакции последовательного замещения* (*sequential displacement reactions*) или просто последовательные реакции (*sequential reactions*);
- 2) **«пинг-понг»-реакции** или *реакции двойного замещения* (*double displacement reactions*).

В реакциях с образованием тройного комплекса все субстраты должны быть сорбированы на ферменте, прежде чем какой-либо продукт реакции будет

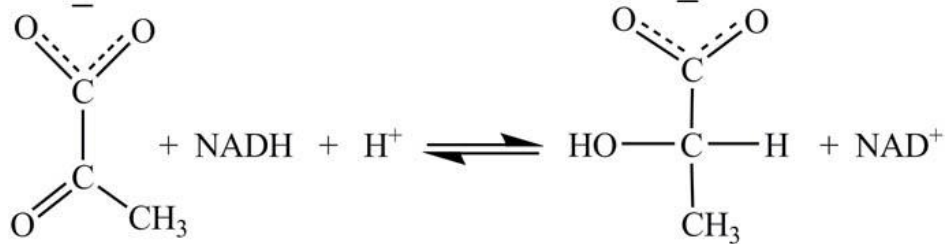
десорбирован. Так, в бисубстратной реакции образуется *тройной комплекс*: фермент и оба субстрата.

Реакции с образованием тройного комплекса бывают *двух типов*:

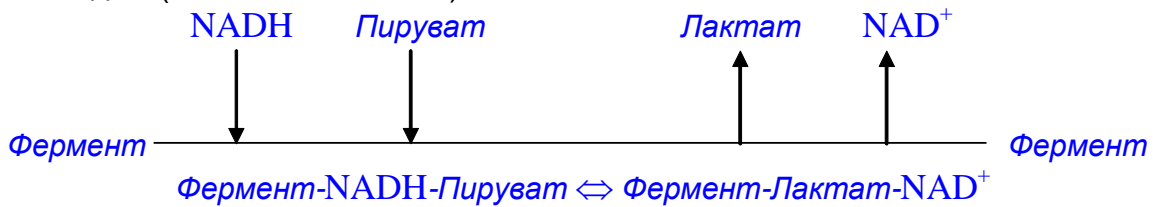
- 1) *упорядоченные*, в которых субстраты сорбируются на ферменте в строго определённом порядке,
- 2) *неупорядоченные* (статистические), в которых порядок присоединения субстратов к ферменту произволен.

Так, многие ферменты, использующие NAD^+ или NADH в качестве субстратов, демонстрируют **упорядоченный** механизм. Например, *лактатдегидрогеназа* (с. 6-10) восстанавливает пируват в лактат, окисляя при этом NADH в NAD^+ .

В этой *упорядоченной* реакции последовательного замещения кофермент NADH всегда присоединяется первым, а лактат всегда десорбируется первым.



Эта последовательность схематически изображена на рисунке в виде, предложенном Клеландом (*W. Wallace Cleland*).



Фермент-субстратный комплекс представляет собой тройной комплекс: сначала он состоит из фермента и субстратов, а затем из фермента и продуктов.

В **статистических** (неупорядоченных) реакциях порядок, в котором субстраты присоединяются к ферменту, произволен. Например, *креатинкиназа* (*креатинфосфокиназа*) (с. 3-10) образует *фосфокреатин* (*креатинфосфат*) и АДФ из *креатина* и АТФ

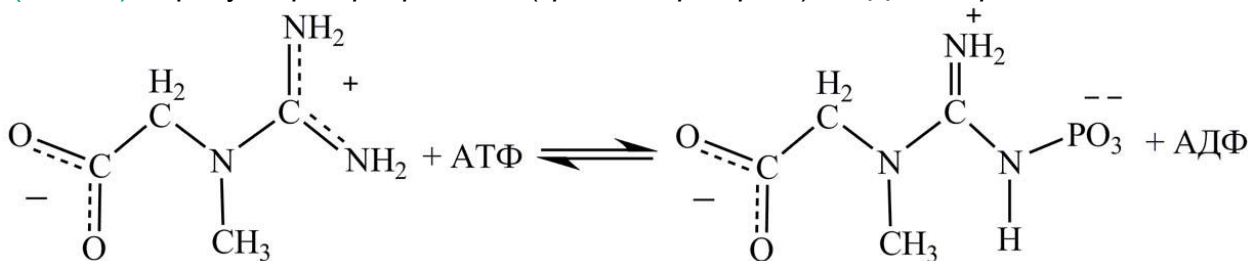
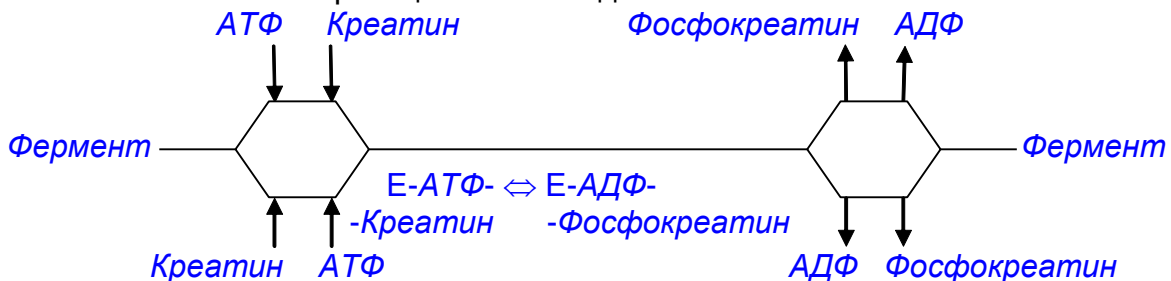


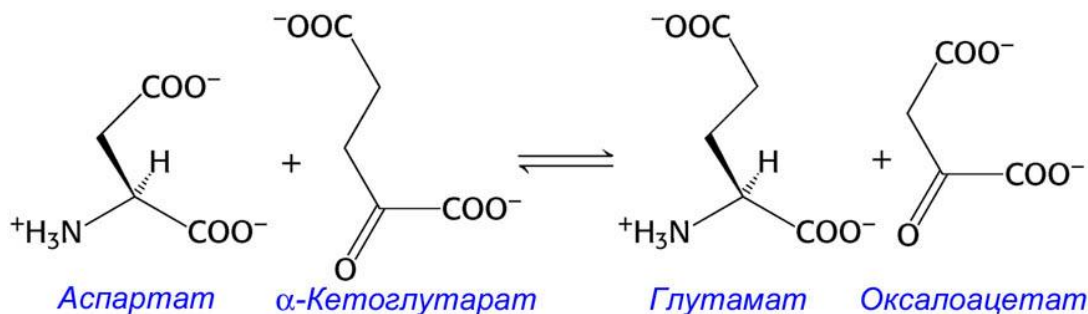
Схема Клеганда этой реакции имеет вид



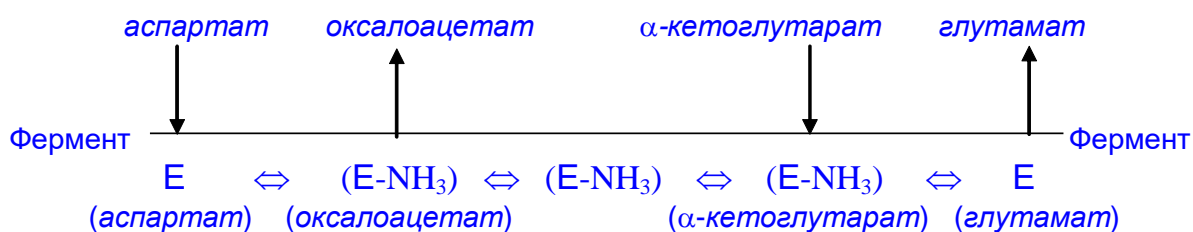
В «пинг-понг» реакциях один или более продуктов реакции десорбируется ещё до того момента, когда все субстраты присоединятся к ферменту. Определяющей особенностью этого механизма является существование промежуточного состояния фермента, в котором молекула фермента временно модифицирована.

Классическим примером такого механизма является реакция, в которой аминогруппа переносится между аминокислотой и α -кетокислотой.

Фермент *аспартатамиотрансфераза* катализирует перенос аминогруппы от аспарагиновой кислоты (аспартата) к α -кетоглутарату (с. 3-9).



После сорбции аспартата фермент присоединяет к себе аминогруппу, образуя временную модифицированную форму. После этого первый продукт, оксалоацетат, десорбируется. Схема Келланда этой реакции имеет вид



Второй субстрат, α -кетоглутарат, сорбируется на *модифицированном* ферменте, присоединяет аминогруппу и продукт, глутаминовая кислота (глутамат), десорбируется с фермента.

Фермент работает как своего рода «почтовый ящик», в котором первый субстрат (почтальон) оставил функциональную группу (почту), а второй субстрат (клиент) её забрал. Пустой почтовый ящик – это фермент, а ящик с почтой – временная модифицированная форма этого фермента.

Субстраты сорбируют и десорбируют на ферменте, как мячики настольного тенниса ударяются об игровой стол, поэтому такой механизм получил название «пинг-понг»-механизм.

7.10. ИЗОФЕРМЕНТЫ

Изоферменты или изоэнзимы (*isozymes* или *isoenzymes*) – это различные по аминокислотной последовательности изоформы или изоотипы одного и того же фермента, существующие в одном организме, но, как правило, в разных его клетках, тканях или органах.

Изоферменты, как правило, высоко гомологичны по аминокислотной последовательности и/или подобны по пространственной конфигурации. Особенно консервативны в сохранении строения активные центры молекул изоферментов. Все изоферменты одного и того же фермента выполняют одну и ту же каталитическую функцию, но могут значительно различаться по степени каталитической активности, по особенностям регуляции или другим свойствам.

Примером фермента, имеющего изоферменты, является *гексокиназа*, имеющая четыре изоотипа, обозначаемых римскими цифрами от I до IV. При этом один из изоотипов гексокиназы, а именно гексокиназа IV, экспрессируется почти исключительно в печени и обладает особыми физиологическими свойствами, в частности её активность не угнетается продуктом её реакции глюкозо-6-фосфатом.

Ещё одним примером фермента, имеющего изоферменты, является *амилаза* – панкреатическая амилаза отличается по аминокислотной последовательности и свойствам от амилазы слюнных желёз, кишечника и других органов. Это послужило основой для разработки и применения более надёжного метода диагностики острого панкреатита путём определения не общей амилазы плазмы крови, а именно панкреатической изоамилазы.

Третьим примером фермента, имеющего изоферменты, является *креатинфосфокиназа* (КФК, или креатинкиназа (с. 3-10; 3-31)) – изоотип этого фермента, экспрессируемый в сердце, отличается по аминокислотной последовательности от

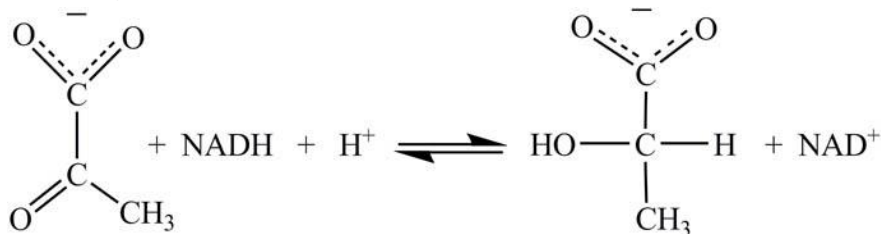
креатинфосфокиназы скелетных мышц. Это позволяет дифференцировать повреждения миокарда (например, при инфаркте миокарда) от других причин повышения активности КФК, определяя миокардиальный изотип КФК в крови.

Природа появления изоферментов разнообразна, но чаще всего обусловлена различиями в структуре генов, кодирующих эти изоферменты. Следовательно, изоферменты различаются по первичной структуре белковой молекулы и, соответственно, по физико-химическим свойствам. На различиях в физико-химических свойствах основаны методы определения изоферментов.

По своей структуре изоферменты в основном являются олигомерными белками. Причём та или иная ткань преимущественно синтезирует определённые виды протомеров. В результате определённой комбинации этих протомеров формируются ферменты с различной структурой – изомерные формы. Обнаружение определённых изоферментных форм ферментов позволяет использовать их для диагностики заболеваний.

Типичным ферментом, который представлен изоферментами, является *лактат-дегидрогеназа* (ЛДГ, *lactate dehydrogenase*, LDH). Этот фермент катализирует обратимую реакцию окисления лактата (молочной кислоты) до пирувата (пировиноградной кислоты) (с. 6-10).

Лактатдегидрогеназа – это олигомерный белок с молекулярной массой 134 кДа,



состоящий из 4 субъединиц 2 типов: М (●) (от *muscle* – мышца) и Н (■) (от англ., *heart* – сердце). Аминокислотная последовательность этих двух субъединиц на 75 % идентична. Комбинация этих субъединиц лежит в основе формирования пяти изоформ лактатдегидрогеназы: LDH-1 – LDH-5, причём соотношение изоформ даже в пределах одной ткани изменяется в ходе развития организма, как это показано на рисунке для тканей сердца крысы в зависимости от числа дней до и после рождения.

LDH-1 (H₄) и LDH-2 (H₃M) наиболее активны в сердечной мышце и почках, LDH-4 (HM₃) и LDH-5 (M₄) – в скелетных мышцах и печени. В остальных тканях имеются различные формы этого фермента.

Изоформы ЛДГ отличаются электрофоретической подвижностью, что позволяет устанавливать тканевое содержание изоформ ЛДГ.

	Сердце	Почки	Эритроциты	Мозг	Лейкоциты	Мышцы	Печень
H ₄	■	■	■	■	■	—	—
H ₃ M	■	■	■	■	■	—	—
H ₂ M ₂	—	■	—	■	■	■	—
HM ₃	—	—	—	—	■	—	—
M ₄	—	—	—	—	—	■	■

На рисунке показаны электрофореграммы разных тканей.

Синтез Н- и М-типов субъединиц осуществляется различными генами и в разных органах экспрессируется по-разному. Поскольку полипептиды субъединиц являются продуктами разных генов, они обладают:

- различным аминокислотным составом (первичной структурой);
- неодинаковыми физико-химическими и каталитическими свойствами (электрофоретической подвижностью);
- тканеспецифичностью (синтезируются в разных тканях) или специфической локализацией в клетках эукариот.

Из-за различий в структуре, изоферменты отличаются друг от друга по сродству к субстрату, особенностям регуляции активности, молекулярной массе и электрическому заряду. LDH-1 имеет минимальную электрофоретическую подвижность, а LDH-5 – максимальную.

Помимо различий в физико-химических свойствах, изоферменты сильно отличаются друг от друга по каталитическим свойствам (по кинетическим параметрам: для них характерна различная величина числа оборотов (w_{\max}) и сродства к субстрату (K_M). Так у LDH-1 величина K_M по отношению к молочной кислоте составляет 0,0044 М, тогда как у LDH-5 – 0,0256 М.

Изоферменты различаются и по чувствительности к действию регуляторов. Мочевина проявляет свойства ингибитора для LDH-5, но не оказывает влияния на LDH-1. При этом в качестве ингибитора LDH-1 выступает пировиноградная кислота, которая не оказывает аналогичного эффекта на LDH-5.

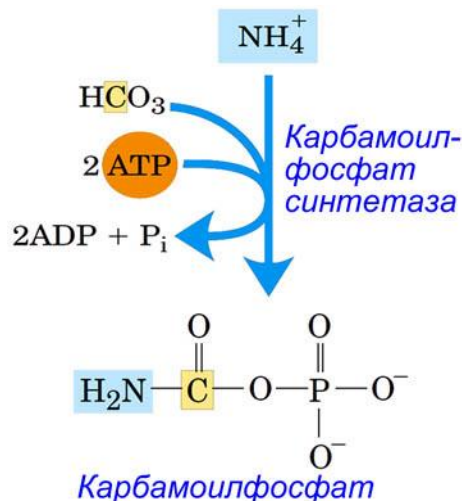
Таким образом, изоферменты различают по структуре и свойствам, а их существование оказывается *генетически детерминированным* и *биологически целесообразным*, поскольку в различных компартментах клетки эукариот, а также разных тканях многоклеточного организма, существуют различные условия. Для них характерна неодинаковая концентрация одних и тех же субстратов и кислорода, различная величина pH и ионный состав. Поэтому в клетках разных тканей, а также в разных компартментах одной клетки, одни и те же химические превращения фактически протекают в неодинаковых условиях. Существование изоферментов, обладающих различиями в каталитических и регуляторных свойствах, позволяет:

- в *разных* условиях осуществлять *одни и те же* химические превращения с высокой эффективностью;
- обеспечивать *тонкую регуляцию* каталитических превращений в соответствии с особенностями распределения регуляторов в соответствующих компартментах клетки и разных тканях.

Иллюстрацией этого служат различия в свойствах *цитозольного* (с. 7-24) и *митохондриального* (с. 7-15) изоферментов *карбамоилфосфатсинтетазы*. Этот фермент катализирует реакцию синтеза карбамоилфосфата.

Карбамоилфосфат, образующийся в митохондриях под действием митохондриального изофермента, далее вовлекается в процесс образования мочевины, а карбамоилфосфат, синтезирующийся под влиянием цитоплазматического изофермента, используется для синтеза пиримидиновых нуклеотидов. Естественно, что эти ферменты, связанные с совершенно различными обменными процессами, разделены пространственно и имеют различные каталитические и регуляторные свойства. Их присутствие в одной клетке позволяет происходить в ней одновременно двум разным метаболическим процессам.

Таким образом, существование изоферментов имеет важное биологическое значение, связанное с возможностью течения одних и тех же ферментативных процессов в разных условиях.



8. КОФЕРМЕНТЫ, ВИТАМИНЫ И КОФАКТОРЫ

8.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О ВИТАМИНАХ

Витами́ны (от лат. *vita* – «жизнь») – группа низкомолекулярных органических соединений относительно простого строения и разнообразной химической природы. Это сборная по химической природе группа органических веществ, объединённая по признаку абсолютной необходимости их для гетеротрофного организма (с. 5-26) в качестве составной части пищи. Автотрофные организмы (с. 5-26) также нуждаются в витаминах, получая их либо путём синтеза, либо из окружающей среды. Так, витамины входят в состав питательных сред для выращивания организмов фитопланктона. Витамины содержатся в пище (или в окружающей среде) в очень малых количествах, и поэтому относятся к микронутриентам. К витаминам не относят микроэлементы и незаменимые аминокислоты.

Большинство витаминов либо сами используются в ферментативных процессах в качестве коферментов, либо являются предшественниками коферментов.

В настоящее время известно более 20 витаминов. Основными их источниками являются:

- пища животного и растительного происхождения;
- сапрофитная микрофлора толстого кишечника;
- провитамины.

Провитамины представляют собой предшественники витаминов, из которых в организме различными путями происходит образование активных витаминов. К их числу относятся каротин (провитамин А), 7-дегидро-холестерин (провитамин D) и др.

Помимо витаминов, выделяется особая группа *витаминоподобных веществ*, которые обладают свойствами витаминов, но синтезируются в организме человека. К ним относятся карнитин, инозитол, липоевая кислота, холин, пангамовая кислота, витамин U и др.

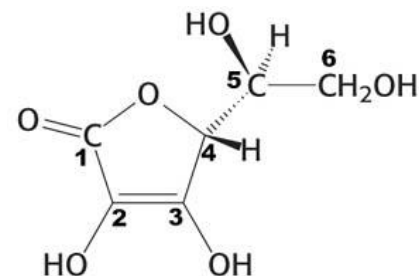
Витаминоподобные вещества являются витаминами только для тех видов организмов, у которых они не синтезируются.

Традиционно витамины принято разделять на водорастворимые и жирорастворимые.

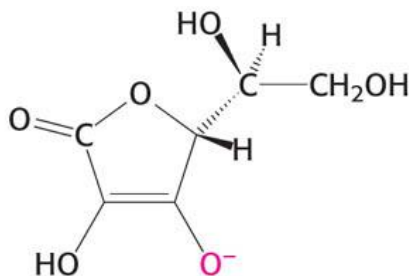
8.2. ВОДОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ

Витамин С (аскорбиновая кислота, *Acidum ascorbinicum*). Источником витамина С является пища растительного происхождения. Наиболее богаты этим витамином плоды цитрусовых, картофель, плоды шиповника, хвоя и т. д. Суточная потребность в витамине для взрослого человека составляет около 75 мг.

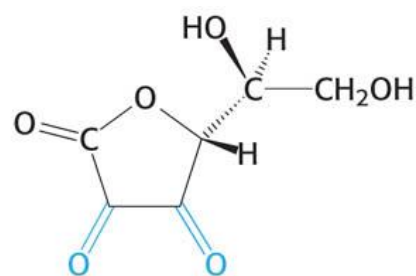
В молекуле аскорбиновой кислоты есть два лабильных атома водорода у 2 и 3 углеродных атомов.



Аскорбиновая кислота



Витамин С (аскорбат)

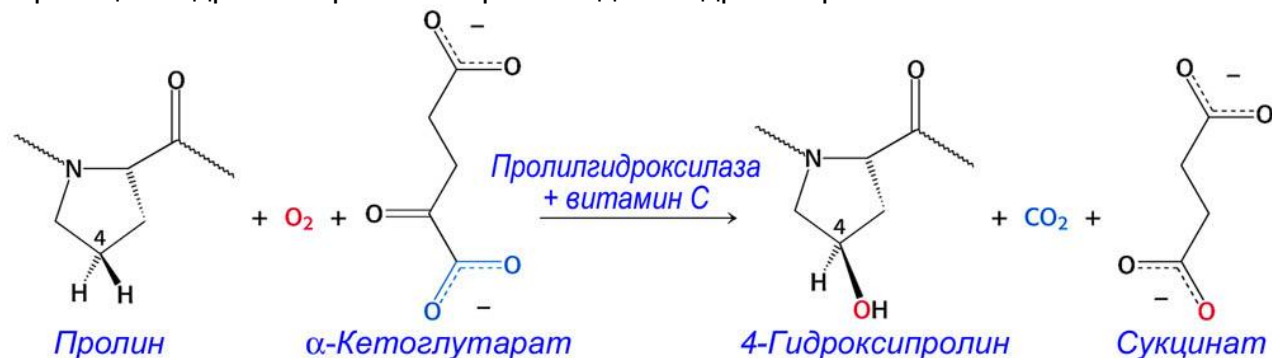


Дегидроаскорбиновая кислота (ДАК)

Биологическая активность аскорбиновой кислоты определяется её способностью участвовать в окислительно-восстановительных процессах. При окислении аскорбиновой кислоты происходит образование аниона аскорбиновой кислоты аскорбата (витамин С), а затем дегидроаскорбиновой кислоты.

При взаимодействии со свободными радикалами аскорбиновая кислота может передавать им электроны. В результате этого свободные радикалы трансформируются в стабильные молекулы. Подобное свойство лежит в основе антиоксидантного действия аскорбиновой кислоты.

Аскорбиновая кислота играет роль кофермента у фермента *пролилгидроксилаза* в реакции гидроксилирования пролина до 4-гидроксипролина.



Гидроксипролин представляет собой аминокислоту, которая в значительном количестве входит в состав белка соединительной ткани – коллагена.

После активации один из атомов молекулы кислорода используется для окисления пролина, а другой включается в α -кетоглутаровую кислоту, превращая её в янтарную кислоту (сукцинат). В реакцию вступает остаток пролина, находящийся в полипептидной цепи «созревающего» коллагена.

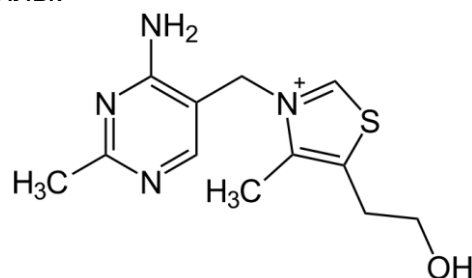
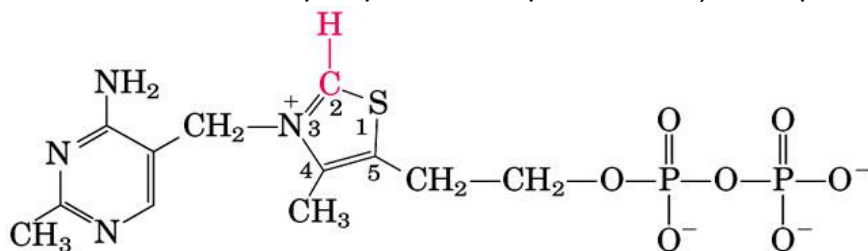
Кросс-линки водородных связей между гидроксипролинами связывают коллагеновые нити и стабилизируют тройную спираль коллагена, что и формирует «зрелый» коллаген, который в свою очередь используется для построения основного вещества соединительной ткани.

Ещё одной важной функцией аскорбиновой кислоты является её участие в обеспечении организма железом. Это связано с тем, что железо всасывается только после его восстановления аскорбиновой кислотой. Кроме того, именно в восстановленном состоянии оно способно соединяться с белком ферритином и транспортироваться в организме кровью.

Из-за своей способности восстанавливать металлы переменной валентности витамин С оказывает регуляторное влияние на каталитические свойства ферментов, в состав активного центра которых входят подобные металлы.

Витамин В₁ (тиамин, *thiamine*). *Тиамин* (аневрин) – это водорастворимый витамин – бесцветное кристаллическое вещество, хорошо растворимое в воде и нерастворимое в спирте.

Коферментной формой тиамина является *тиаминпирофосфат* (*thiamine pyrophosphate*, TPP) (другие названия тиаминдифосфат и кокарбоксилаза), который

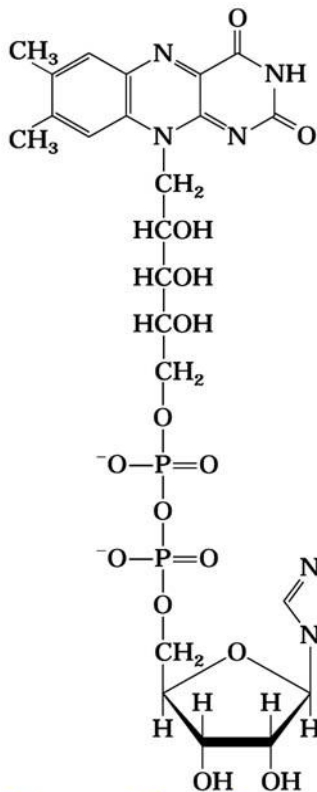
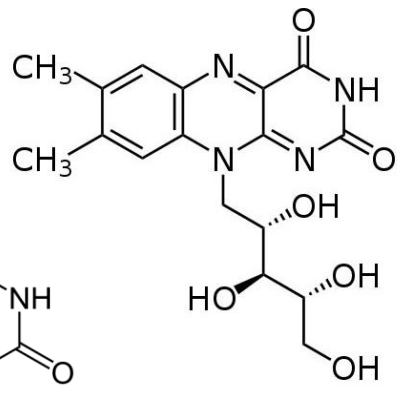


образуется путём переноса фосфатных групп с АТФ ферментом тиаминкиназа. Тиаминпирофосфат является коферментом фермента *транскетолаза* (с. 6-13), участвующего в апотомическом

пути окисления глюкозы (с. 6-11), а также, ряда ферментов окислительного (с. 5-12; 6-5) и неокислительного (с. 6-10) декарбоксилирования α -кетокислот (пировиноградной и α -кетоглутаровой кислот), которые, играют важную роль в энергетическом обеспечении клеток. По этой причине наиболее чувствительны к недостатку тиамин те ткани внутренних органов, функционирование которых сопряжено с высоким уровнем потребления энергии (нервная ткань, сердечная мышца и др.).

Витамин В₂ (рибофлавин). Рибофлавин представляет собой жёлто-оранжевого цвета игольчатые кристаллы, собранные в друзы, горького вкуса. Рибофлавин является производным гетероциклического соединения изоаллоксазина.

Изоаллоксазин (isoalloxazine) – это гетероциклическое соединение, производное птеридина. Молекула изоаллоксазина состоит из трёх ароматических колец – бензольного, пиримидинового, пиразинового.

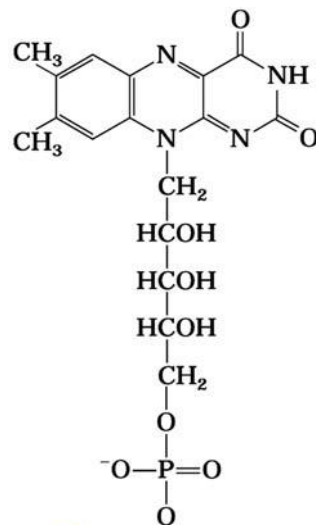


Флавинадениндинуклеотид

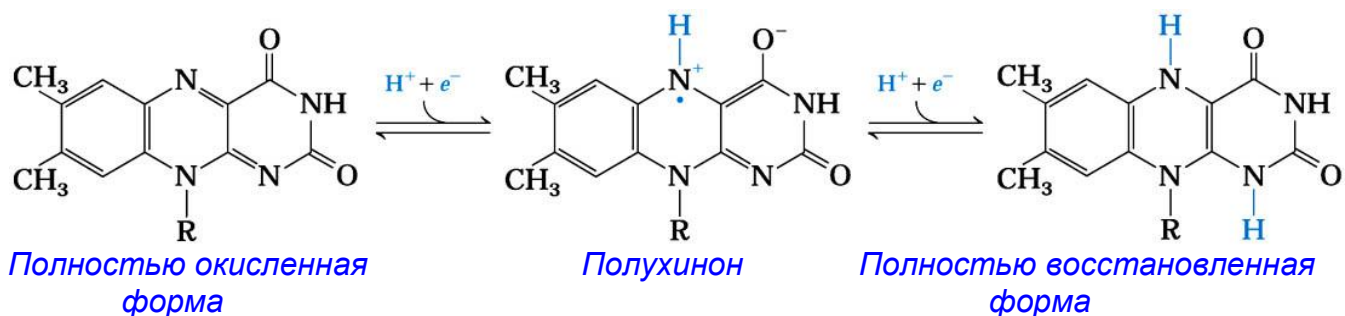
Коферментными формами рибофлавина, определяющими его биологическую роль, являются *флавиномононуклеотид (ФМН, flavin mononucleotide, FMN)* и *флавинадениндинуклеотид (ФАД, flavin adenine dinucleotide, FAD)*.

Оба этих производных витамина В₂ представляют собой нуклеотиды, у которых в качестве азотистого основания выступает изоаллоксазин.

Трициклическая гетероциклическая молекула изоаллоксазина в составе изоаллоксазиновых производных способна обратимо присоединять два электрона и два протона в форме одного или



Флавиномононуклеотид (ФМН)



ФМН и ФАД восстанавливаются, соответственно, до ФМНН₂ (FMNH₂) и ФАДН₂ (FADH₂).

ФМН и ФАД выступают в роли простетических групп флавиновых дегидрогеназ, которые участвуют в процессах биологического окисления и, в том числе, в тканевом дыхании. По этой причине рибофлавин играет важную роль в энергетическом обеспечении клеток.

Витамин В₃ (ниацин). (Устаревшее название – витамин РР). Витамин В₃ или никотиновая кислота (*niacin, nicotinic acid*) – это витамин, участвующий во многих

окислительных реакциях живых клеток, лекарственное средство. Белый кристаллический порошок без запаха, слабокислого вкуса. Трудно растворим в холодной воде (1:70), лучше в горячей (1:15), мало растворим в этаноле, очень мало – в эфире. Содержится в ржаном хлебе, свёкле, гречке, фасоли, мясе, грибах, печени, почках. В пищевой промышленности используется в качестве пищевой добавки E375. Суточная потребность взрослого человека 15–20 мг.

Биологическая роль этого витамина B₃ определяется тем, что он входит в структуру коферментов пиридинзависимых дегидрогеназ – *никотинамидадениндинуклеотида* (НАД, *nicotinamide adenine dinucleotide*, NAD⁺) и *никотинамидадениндинуклеотидфосфата* (НАДФ, *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*, NADP⁺).

НАДФ представляет собой фосфорилированную форму НАД.

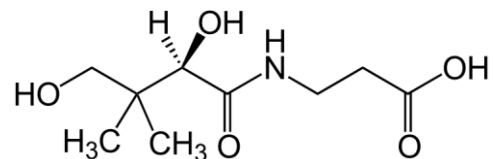
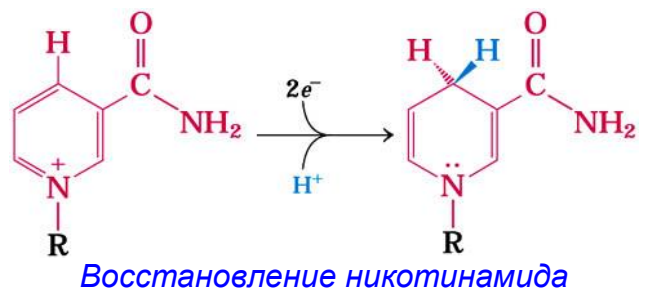
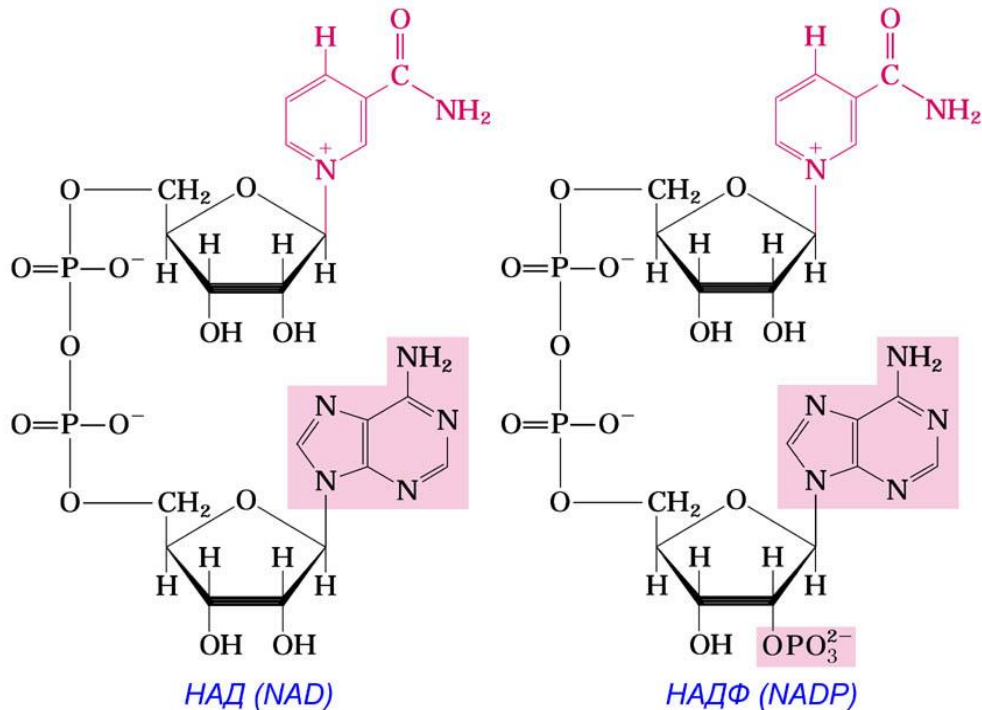
Коферменты НАД и НАДФ являются динуклеотидами, в структуру которых входят два мононуклеотида, один из которых содержит в качестве азотистого основания никотинамид.

В метаболизме НАД и НАДФ задействованы в окислительно-восстановительных реакциях, перенося электроны из одной реакции в другую. Таким образом, в клетках НАД и НАДФ находятся в двух функциональных состояниях: их окисленные формы, НАД и НАДФ, являются окислителями и забирают электроны от другой молекулы, восстанавливаясь в НАДН и НАДФН, соответственно, которые далее служат восстановителями и отдают электроны.

Восстановление никотинамидных коферментов – НАД в НАДН и НАДФ в НАДФН – происходит путём присоединения к никотинамидной группе гидрид-иона (H⁻) (одного протона и двух электронов).

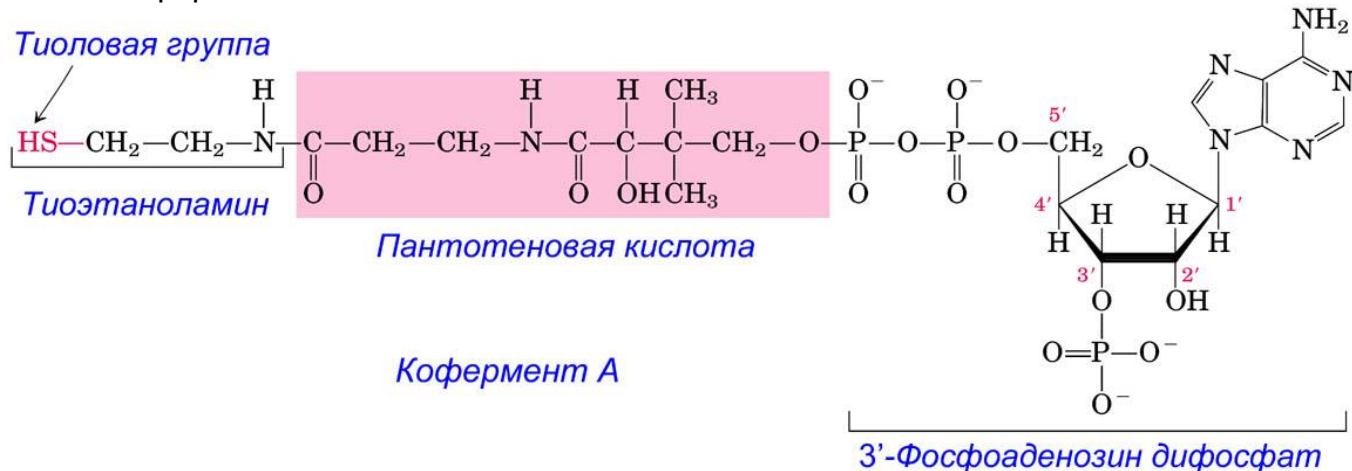
Ферменты, использующие эти коферменты, широко представлены в животных и растительных клетках, что связано с их участием в различных биоэнергетических процессах и, в том числе, в процессе тканевого дыхания.

Витамин B₅ (пантотеновая кислота). Витамин B₅ или пантотенат (*pantothenic acid*, *pantothenate*) по химической природе является дипептидом и состоит из остатков аминокислоты β-аланина и пантоевой кислоты. (В устаревших русскоязычных источниках часто обозначается как витамин «B₃» или «Вх»). Суточная потребность взрослого человека в витамине B₅ составляет 3–5 мг. Основными источниками этого витамина являются



печень крупного рогатого скота, дрожжи, зелёные части растений. Дополнительным источником служит микрофлора кишечника.

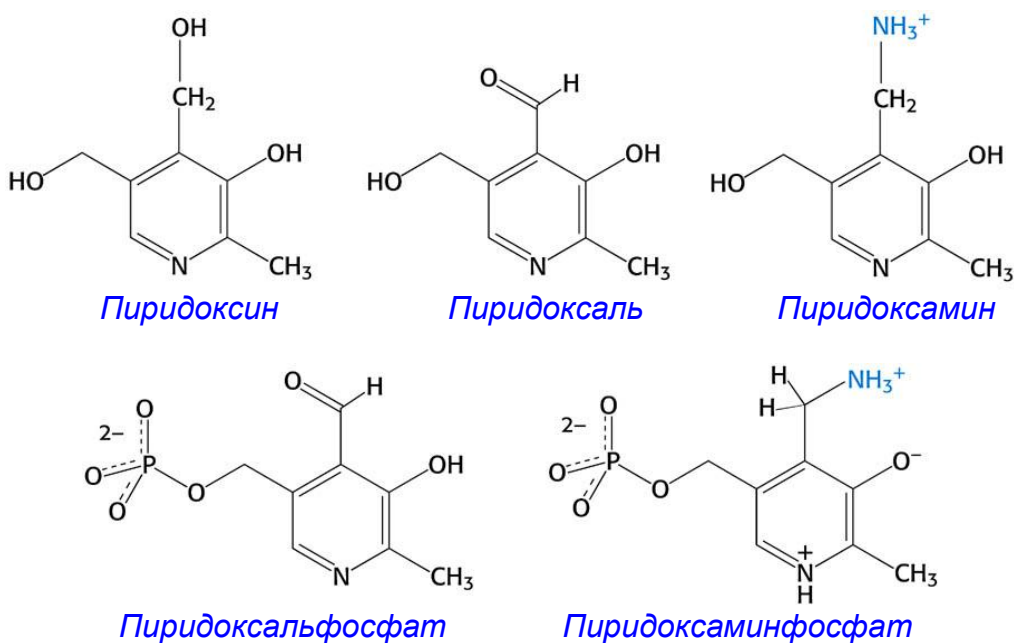
Биологическая роль пантотеновой кислоты определяется тем, что она входит в состав кофермента А.



В молекуле кофермента А к остатку пантотеновой кислоты присоединяется молекула тиоэтанолamina, терминальная SH-группа которого обладает способностью связывать различные соединения, содержащие в своей структуре карбоксильную группу. Соединяясь с коферментом А, эти соединения, к числу которых относятся кетокислоты и жирные кислоты, подвергаются своеобразной активации, следствием чего становится повышение их биологической активности. По этой причине, витамин В₅ играет важную роль в энергетическом обмене и обмене липидов.

Витамин В₆. Витамин В₆ – это собирательное название производных 3-гидрокси-2-метилпиридинов, обладающих биологической активностью пиридоксина – собственно *пиридоксин* (*pyridoxine*, PN), *пиридоксаль* (*pyridoxal*, PL), *пиридоксамин* (*pyridoxamine*, PM), а также их фосфаты *пиридоксальфосфат* (*pyridoxal 5'-phosphate*, PLP) и *пиридоксаминфосфат* (*pyridoxamine 5'-phosphate*, PMP).

Фосфорилированные производные витамина В₆ обладают коферментной функцией. Источником остатка фосфорной кислоты для их фосфорилирования служит АТФ. Биологическая роль витамина В₆ определяется тем, что пиридоксальные коферменты входят в состав ферментов, принимающих участие в обмене аминокислот (аминотрансферазы, декарбоксилазы гликогенфосфориллазы и др.).



Витамин В₆ содержится во многих продуктах. Особенно много его содержится в зерновых ростках, в грецких орехах, в шпинате, картофеле, моркови, капусте, помидорах, клубнике, черешне, апельсинах и лимонах. Также он содержится в мясных и молочных продуктах, рыбе, яйцах, крупах и бобовых. Витамин В₆ (пиридоксин, пиридоксаль, пиридоксамин) синтезируется в организме кишечной микрофлорой.

Витамин В₁₂. Витаминами В₁₂ называют группу кобальтсодержащих биологически активных веществ, называемых *кобаламинами*. К ним относят собственно *цианокобаламин*, *гидрокси-кобаламин* и две коферментные формы витамина В₁₂: *метилкобаламин* и *5'-дезоксаденозилкобаламин* (на рисунке: R – 5'-дезоксаденозил; Me; OH; CN).

В₁₂ имеет самую сложную по сравнению с другими витаминами структуру, основой которой является корриновое кольцо. Коррин во многом аналогичен порфируну (сложной структуре, входящей в состав гема, хлорофилла и цитохромов), но отличается от порфирина тем, что два пиррольных цикла в составе коррина соединены между собой непосредственно, а не метиленовым мостиком. В центре корриновой структуры располагается ион кобальта. Четыре координационных связи кобальт образует с атомами азота. Ещё одна координационная связь соединяет кобальт с диметилбензимидазольным нуклеотидом. Последняя, шестая координационная связь кобальта остаётся свободной: именно по этой связи и присоединяется цианогруппа, гидроксильная группа, метильный или 5'-дезоксаденозильный остаток с образованием четырёх вариантов витамина В₁₂, соответственно.

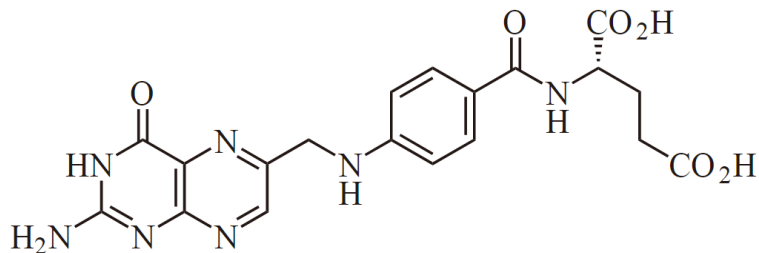
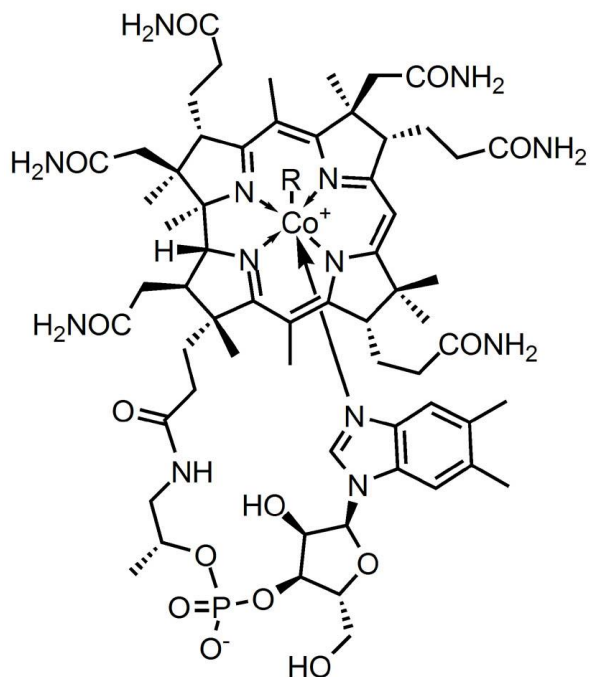
Ковалентная связь углерод-кобальт в структуре цианокобаламина – единственный в живой природе пример ковалентной связи металл-углерод.

Суточная потребность в витамине В₁₂ у взрослого человека составляет около 0,003 мг. Образуется он исключительно микроорганизмами. Поступает в организм человека с мясной пищей, молочными изделиями, печенью крупного рогатого скота и пр. Важным источником витамина В₁₂ является микрофлора кишечника (в условиях адекватного поступления с пищей кобальта). Витамин В₁₂ всасывается в желудке в комплексе с особым белком слизистой желудка – гастромукопротеином. При заболеваниях, сопровождающихся нарушением образования данного белка, возникают условия для гиповитаминоза даже в том случае, если человек употребляет богатую этим витамином пищу.

Биологическая роль витамина В₁₂ связана с его коферментной функцией, которую он выполняет в форме метильного (метилкобаламин) или дезоксиаденозильного (дезоксаденозилкобаламин) производного. Метилкабаламин является коферментом ферментов метилаз, катализирующих реакции метилирования, то есть переноса метильной группы. Дезоксиаденозилкобаламин является коферментом у ферментов, катализирующих реакции изомеризации и, в том числе, реакции внутримолекулярного переноса атомов водорода. Взаимодействуя с фолиевой кислотой (витамином В₉), дезоксиаденозилкобаламин участвует в реакциях трансметилирования.

Витамин В₉ (фолиевая кислота). Фолиевая кислота (витамин В₉; лат. *acidum folicum* от лат. *folium* – лист) – водорастворимый витамин, необходимый для роста и развития кровеносной и иммунной систем. Наряду с фолиевой кислотой к витаминам относятся и её производные ди-, три-, полиглутаматы и другие. Все такие производные вместе с фолиевой кислотой объединяются под названием *фолацин*.

Молекула фолиевой кислоты образована из остатков птеридина, *пара*-аминобензойной (*p*-аминобензойной) кислоты (витамин В₁₀) и глутамата.



Суточная потребность взрослого человека в витамине В₉ составляет 1–2 мг. Наиболее богатыми источниками витамина являются дрожжи и продукты, содержащие зелёные листья растений. Дополнительным источником фолиевой кислоты является микрофлора кишечника.

Коферментной функцией обладает восстановленное производное витамина В₉ – тетрагидрофолиевая кислота (ТГФК, *tetrahydrofolic acid*, или *tetrahydrofolate*).

Фолиевая кислота восстанавливается ферментом редуктаза за счёт кофермента НАДФН. Для полного восстановления одной молекулы фолиевой кислоты в тетрагидрофолиевую требуется две молекулы НАДФН.

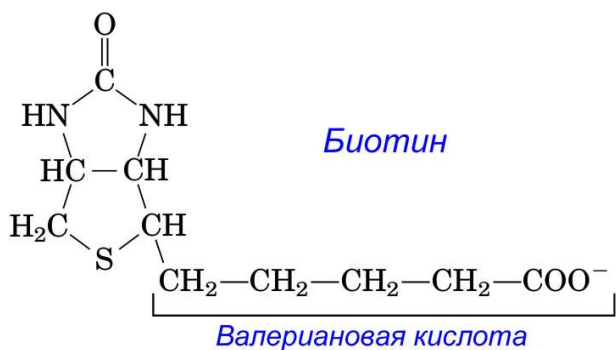
ТГФК выступает в роли кофермента в реакциях реакции переноса одноуглеродных функциональных групп.

- $-\text{CH}_3$;
- $-\text{CH}_2-$;
- $-\text{COH}$;
- $-\text{CH}=\text{}$;
- $-\text{CH}_2\text{OH}$;
- $-\text{CH}=\text{NH}$.

Эти реакции проходят в процессе химических превращений аминокислот и азотистых оснований мононуклеотидов.

В медицине находят широкое применение *антивитамины* фолиевой кислоты. К их числу относятся производные парааминобензойной кислоты – сульфаниламидные препараты, а также птеридина – 4-аминоптерин. Введение этих соединений в клетки микроорганизмов приводит к нарушению у них синтеза фолиевой кислоты. Поскольку фолиевая кислота выступает в качестве фактора роста микроорганизмов, антивитамины, играющие роль конкурентных ингибиторов, оказывают бактериостатический эффект (тормозят рост микроорганизмов).

Витамин Н (биотин). Биотин (*biotin*, витамин Н, витамин В₇, кофермент R) – водорастворимый витамин группы В. Молекула биотина состоит из тетрагидроимидазольного и тетрагидротиофенового кольца, в тетрагидротиофеновом кольце один из атомов водорода замещён на валериановую кислоту.



Биотин является кофактором в метаболизме жирных кислот, лейцина и в процессе глюконеогенеза.

Суточная потребность взрослого человека в биотине составляет около 0,25 мг. В больших количествах он содержится в продуктах растительного (картофеле, луке и др.) и животного происхождения (молоко, печень крупного рогатого скота, желток яиц и др.).

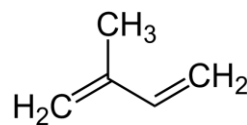
Молекула биотина способна связываться с одним из яичных белков – авидином. Образующийся биотин-авидиновый комплекс не позволяет витамину всасываться. По этой причине употребление в пищу большого количества сырых яиц нарушает усвоение биотина, что приводит к возникновению характерных проявлений его недостаточности (гиповитаминоза).

Биологическая роль биотина определяется тем, что его фосфорилированный продукт (фосфобиотин) используется в качестве простетической группы ферментов карбоксилаз и транскарбоксилаз. Эти ферменты принимают участие в процессах обмена углеводов и липидов, играя особую роль в их биосинтезе.

8.3. ЖИРОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ

Жирорастворимые витамины имеют следующие общие свойства.

1. В структуру многих жирорастворимых витаминов входят остатки *изопрена*. Они соединяются друг с другом в цепи разной длины, которые во многом и определяют нерастворимость жирорастворимых



витаминов в воде (гидрофобность) и, наоборот, их хорошую растворимость в органических растворителях.

2. Для обеспечения всасывания жирорастворимых витаминов необходимо наличие достаточного количества желчных кислот в кишечнике, а также содержание жиров в пище, как растворителей жирорастворимых витаминов.

3. Поскольку жирорастворимые витамины нерастворимы в воде, они переносятся в организме кровью с помощью особых белковых переносчиков. Как правило, каждый витамин переносится своим белком-переносчиком.

4. Жирорастворимые витамины способны накапливаться в тканях внутренних органов. В качестве их «депо» наиболее часто выступает ткань печени. Прекращение поступления жирорастворимых витаминов с пищей не сразу приводит к возникновению гиповитаминоза. Это связано с тем, что организм в течение некоторого времени способен обеспечиваться ими из собственных «депо».

5. Для большинства жирорастворимых витаминов не характерна коферментная функция.

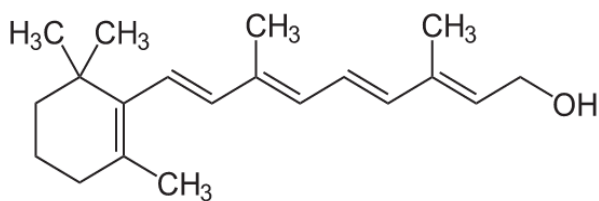
6. Биологическая роль жирорастворимых витаминов связана с тем, что они обладают способностью регулировать экспрессию генов.

Однако, несмотря на определённые сходства, жирорастворимые витамины обладают существенными особенностями в проявлении своего биологического эффекта.

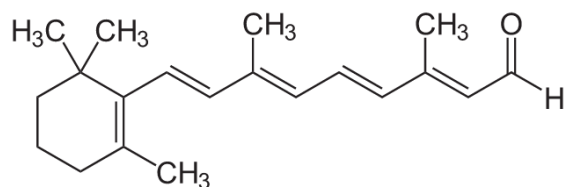
Витамин А. Витамин А – это группа близких по химическому строению веществ, которая включает *ретинол* (витамин А₁, аксерофтол) и другие ретиноиды, обладающие сходной биологической активностью: *дегидроретинол* (витамин А₂), *ретиаль* (ретилен, альдегид витамина А₁) и *ретиновую кислоту*.

Витамин А широко распространён в природе. Основными его источниками для человека служат продукты животного происхождения – печень морских рыб и крупного рогатого скота, сливочное масло, яичный желток и др.

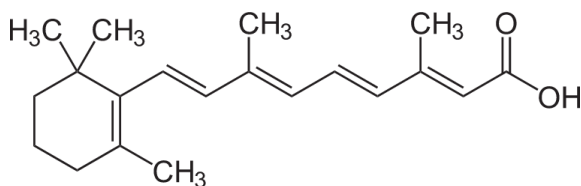
В растительной пище содержится провитамин А – *каротин*. Источниками каротина являются морковь, абрикосы и листья петрушки. Существует несколько разновидностей каротина (альфа-, бета- и гамма-каротины). Особое значение в обеспечении организма человека витамином А имеет β-каротин. Это связано с тем, что его молекула состоит из двух объединённых "хвост-к-хвосту" молекул ретиналя.



Ретинол



Ретиаль



Ретиновая кислота



Бета-каротин

Несмотря на то, что каротин является важным источником витамина А, он может обеспечить только шестую часть потребности организма человека. Суточная потребность в витамине А около 2,7 мг (в расчёте на ретиаль). Поступающий в организм с пищей каротин попадает в кишечник. Здесь он подвергается расщеплению под действи-

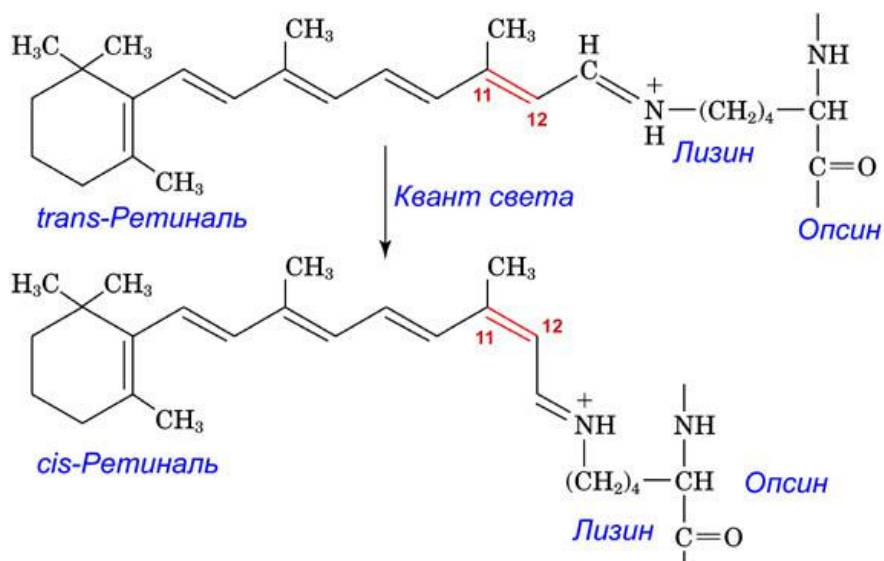
ем фермента *каротиндиоксигеназа*, в результате чего из него образуется две молекулы ретиналя.

Образовавшийся ретиналь, вместе с другими поступающими с пищей формами витамина А, образует в просвете кишечника комплекс с жирными и желчными кислотами и в таком виде всасывается. Витамин А транспортируется особыми липопротеидными частицами крови – хиломикронами (с.6-27). В их составе витамин А попадает в печень, где происходит его депонирование (накопление).

Важным биологическим эффектом витамина А является его участие в контроле дифференцировки клеток и клеточной репродукции. Особое значение витамин А имеет для регуляции роста эпителиальных тканей.

В отличие от других жирорастворимых витаминов, витамин А выполняет специфическую функцию, которая связана с его участием в процессах свето- и цвето-восприятия. Он входит в состав зрительного пигмента – родопсина, который содержится в светочувствительных клетках сетчатки глаза – палочках и колбочках.

Родопсин представляет собой сложный мембранный белок, который состоит из белкового компонента – *опсина* и небелкового компонента – *ретинаяля*. С родопсином может соединяться только 11-*cis*-изомер ретиналя, который ковалентно связывается с остатком лизина, входящим в состав опсина. *cis*-Изомер ретиналя под влиянием кванта видимого света превращается в *trans*-изомер.



Этот конформационный переход в молекуле ретиналя стимулирует изменение конформации белка опсина, что, в свою очередь, стимулирует активацию другого белка трансдуцина, который и инициирует формирование нервного импульса.

Затем родопсин распадается на опсин и *trans*-ретиналь. *trans*-Ретиналь далее восстанавливается ферментом *ретинальредуктаза* в ретинол, а последний изомеризуется в 11-*cis*-ретиналь.

После этого 11-*cis*-ретиналь вновь соединяется с опсином и образуется родопсин, который снова готов участвовать в процессе световосприятия.

Процесс цветовосприятия происходит в колбочках сетчатки глаза. В этих клетках существует несколько разновидностей родопсина. Их различия связаны с особенностями аминокислотного состава опсина. Ввиду того, что структура белкового компонента оказывает существенное влияние на свойства сложного белка в целом, разные формы родопсина воспринимают свет различной длины волны. Каждая разновидность родопсина сконцентрирована в разных типах колбочек. Существуют три основных их типа, способных воспринимать синий, зелёный или красный свет. Импульс, поступающий в зрительный центр мозга от разных типов колбочек, обрабатывается в мозгу и при этом формируется процесс цветового восприятия объекта.

При недостаточном поступлении витамина А в организм возникает гипо- или авитаминоз, первым проявлением которого является нарушение сумеречного зрения (куриная слепота). Помимо этого, при гиповаминозе А возникает поражение эпителиальных тканей (кожи и слизистых оболочек).

Витамин D. Витамин D – это группа биологически активных веществ стероидной природы эргокальциферол (витамин D₂, *ergocalciferol*) и холекальциферол (витамин D₃, *cholecalciferol*). Холекальциферол синтезируется под действием ультрафиолетовых

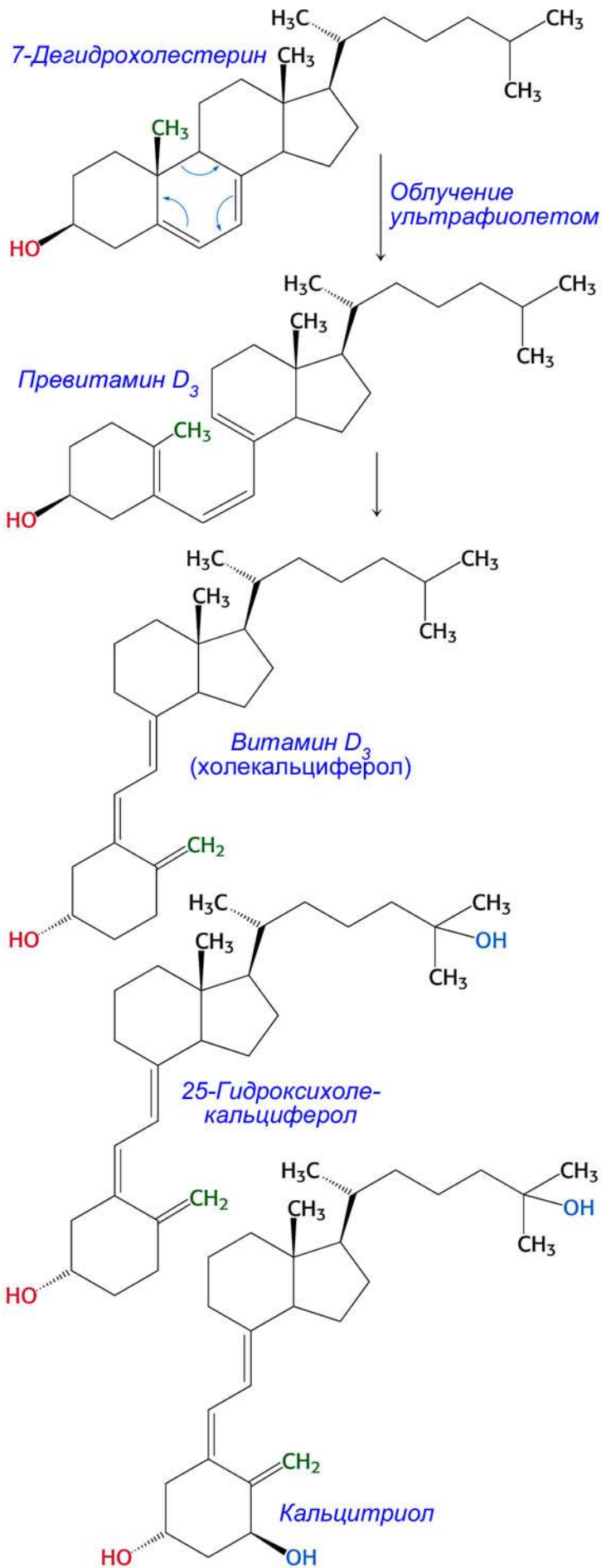
лучей в коже и поступает в организм человека с пищей. Эргокальциферол может поступать только с пищей.

Основными источниками холекальциферола являются продукты животного происхождения – сливочное масло, печень крупного рогатого скота и крупных морских рыб, а также яичный желток. Эргокальциферол имеет растительное происхождение. Основным источником его поступления являются растительные масла, дрожжи. Содержание этого витамина выражается в Международных Единицах (ИЕ). 1 ИЕ соответствует 0,025 мкг витамина D. Суточная потребность в витамине D у грудных детей соответствует 500–1000 ИЕ.

Дополнительным источником поступления витамина D в организм человека служит провитамин D₃ – 7-дегидрохолестерин (*7-dehydrocholesterol*). Этот предшественник в фотохимической реакции, которая происходит в коже, под влиянием квантов ультрафиолетового света превращается в провитамин D₃, который спонтанно изомеризуется в витамин D₃ (холекальциферол). Образование витамина D в коже имеет лишь вспомогательное значение. В результате этого даже летом организм человека получает не более 10 % от его суточной потребности.

Витамин D, поступающий в организм с пищей, в тонком кишечнике образует комплекс с желчными кислотами и в таком виде всасывается в кровь. Здесь он связывается со специфическим белком-переносчиком (глобулином) и транспортируется в печень. В печени витамин D подвергается гидроксильрованию с помощью фермента холекальциферол-25-гидроксилаза, который связан с эндоплазматическим ретикулом клеток печени (гепатоцитов). Продукт реакции гидроксильрования – 25-гидроксихолекальциферол депонируется (накапливается) в печени.

При возрастании потребности тканей внутренних органов в витамине D 25-гидроксихолекальциферол поступает в кровотоки и переносится в митохондрии почек. Здесь 25-гидроксихолекальциферол гидроксильруется по 1 углеродному атому и получается 1,25-дигидроксихолекальциферол (*кальцитриол, calcitriol*). Все эффекты витамина D в организме обеспечиваются



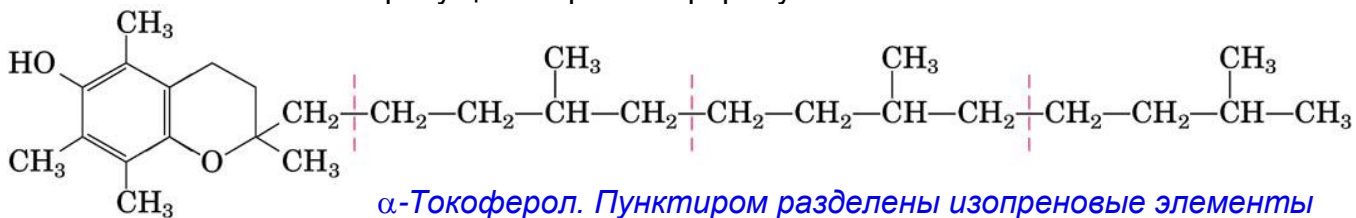
именно кальцитриолом. *Кальцитриол* участвует в регуляции фосфорно-кальциевого обмена в организме. Контроль уровня кальция и фосфора в крови определяется тем, что под влиянием кальцитриола происходит:

- повышение скорости всасывания кальция и фосфора в кишечнике;
- уменьшение скорости экскреции кальция и фосфора через почки с мочой.

В основе физиологических эффектов витамина D лежит свойство кальцитриола выступать в роли регулятора экспрессии генов кальцийсвязывающих белков.

Недостаточность витамина D часто встречается у детей раннего возраста в форме заболевания – рахит, которое характеризуется нарушением процесса окостенения трубчатых костей и роста зубов.

Витамин Е. Витамин Е – это группа природных соединений производных *токола*. Важнейшими соединениями являются *токоферолы* и *токотриенолы*. Наибольшая витаминная активность присуща альфа-токоферолу.



Витамин Е поступает в организм с пищей животного и растительного происхождения. Главным его источником служат растительные масла и мучные изделия. В большом количестве α -токоферол присутствует в хлебобулочных изделиях, за счёт которых организм человека обеспечивается этим витамином. Суточная потребность в витамине Е у взрослого человека составляет 5 мг, у детей – 20–30 мг.

Для усвоения витамина Е необходимо адекватное поступление с пищей жиров, которые являются его растворителем. Поступивший в тонкий кишечник витамин Е всасывается в комплексе с желчными кислотами и транспортируется в крови при помощи особых липопротеидных частиц – *хиломикронов* (с. 6-27). В составе хиломикронов витамин Е попадает в печень. Из печени он переносится при помощи других липопротеидных частиц – липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП, *Very Low Density Lipoprotein*, VLDL) – в жировую ткань и здесь депонируется (накапливаются).

Биологическая роль витамина Е определяется следующими факторами.

Витамин Е обладает свойствами антиоксиданта.

Антиоксиданты – это вещества, которые способны тормозить свободно-радикальные процессы, ингибировать окислительные процессы.

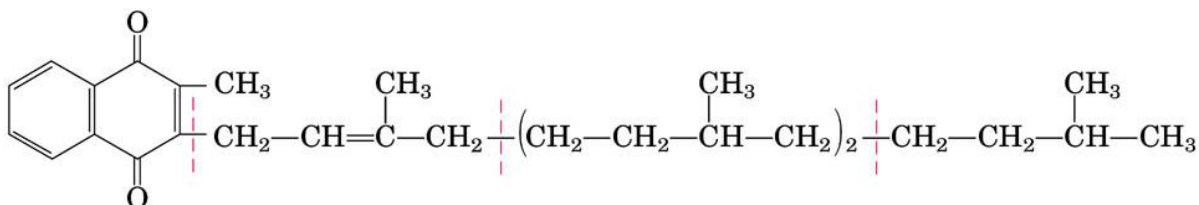
Антиоксиданты, подобные витамину Е, обладают свойством превращать свободные радикалы в стабильные молекулы. Свободные радикалы, ввиду их высокой реакционной способности, вызывают повреждение клеток. Поэтому антиоксиданты и, в том числе, витамин Е защищают организм от свободнорадикального повреждения.

Витамин Е особым образом влияет на упаковку молекул в липидном бислое биомембран. При его включении в состав мембраны она приобретает более структурированный (упорядоченный) характер.

Витамин Е участвует в регуляции экспрессии генов целой группы белков – гемопропротеидов (содержащих в своём составе гем). К их числу относятся цитохромы, каталаза и другие ферменты, участвующие в энергетическом обмене. По этой причине витамин Е оказывает влияние на состояние энергетического обеспечения клеток, а значит и на их функциональную активность.

Витамин К. К этой группе витаминов относятся нафтохиноны, в состав которых входят изопреновые боковые цепи разной длины. Наибольшая витаминная активность характерна для филлохинона (*phylloquinone*), представляющего собой витамин К₁.

Витамины этой группы существенно различаются по длине изопреновой цепи в молекуле. Так, в состав *витамина К₃* (менадион, *menadione*) вообще не входит изопреновая цепь, что определяет его способность растворяться в воде.



Витамин K₁. Пунктиром разделены изопреновые элементы

Водорастворимый синтетический аналог витамина К – *викасол*, который до настоящего времени широко используется в медицине, как кровоостанавливающее средство.

Главными источниками этого витамина являются пищевые продукты растительного происхождения. Наиболее богаты им листья растений (салат, шпинат и др.). Значительный вклад в обеспечение организма витамином К вносит сапрофитная микрофлора кишечника (кишечная палочка). Среднесуточная потребность в витамине К для взрослого человека составляет около 0,1 мг.

Всосавшийся в кровь витамин поступает в печень и депонируется в ней. Однако в отличие от других жирорастворимых витаминов, его запасы в печени сравнительно невелики. Поэтому прекращение поступления витамина К с пищей быстро приводит к возникновению гиповитаминоза.

Биологическая роль витамина К связана с его участием в процессе свёртывания крови. Этот витамин представляет собой кофермент фермента *витамин К-зависимой карбоксилазы*, который принимает участие в карбоксилировании остатков глутаминовой кислоты, входящих в состав II, VII, IX и X-факторов свёртывания крови. Полученные в результате остатки γ-карбоксиглутамата, принимают участие в *хелатировании* свободных ионов кальция, играющих важную роль в процессе свёртывания крови.

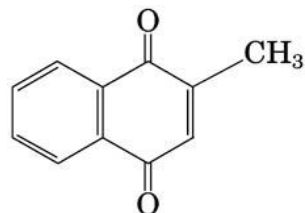
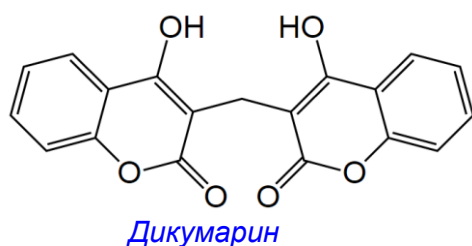
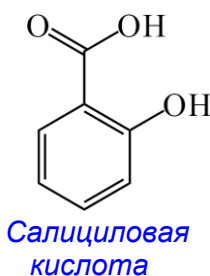
Реакция карбоксилирования идёт только в присутствии кислорода, хотя он в ней и не участвует. Витамин К используется в реакции карбоксилирования только в восстановленном состоянии.

Белковые факторы свёртывания крови после того, как в их составе появятся остатки γ-карбоксиглутамата, приобретают способность участвовать в процессе гемокоагуляции (свёртывании крови).

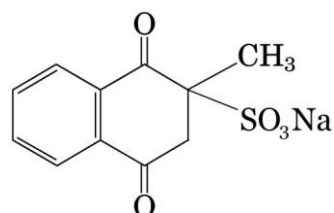
Таким образом, биологическая роль витамина К заключается в том, что он принимает участие в процессе свёртывания крови. Его недостаток нарушает процесс свёртывания крови и возникает повышенная кровоточивость.

В настоящее время известна целая группа веществ из группы *антивитамин К*, при попадании которых в организм тормозится процесс свёртывания крови.

Антивитаминные свойства этих веществ связаны с тем, что они обладают способностью тормозить восстановление окисленных форм витамина К, которые не участвуют в образовании гамма-карбоксиглутамата. К антивитаминам К относятся вещества растительного происхождения *дикумаролы*, а также *салициловая кислота* и её производные.



Витамин K₃



Викасол

8.4. МЕТАЛЛИЧЕСКИЕ КОФАКТОРЫ

Примерно треть всех известных ферментов содержит ион металла или активируется ионами металла. Прочность связи металлов с белковой частью фермента колеблется в широких пределах. Некоторые ферменты в процессе их выделения

утрачивают ион металла вследствие диссоциации, так что при измерении активности фермента приходится эти ионы добавлять – это ферменты, активируемые металлами.

Другие ферменты сохраняют ион металла при очистке – это металлоферменты (металлопротеины). Деление на эти группы условно, поскольку между крайними формами существует ряд промежуточных форм.

Ион металла может участвовать в присоединении субстрата, собственно в катализе, в стабилизации оптимальной конформации молекулы фермента, в стабилизации четвертичной структуры. Активность металлозависимых ферментов после удаления металла либо утрачивается полностью, либо заметно снижается.

В роли кофактора могут выступать ионы различных металлов.

Fe (железо) – входит в состав простетической группы гема (с. 3-8) гемсодержащих ферментов – *цитохромов*, *каталазы*, кислород-транспортного белка *гемоглобина* и др. Помимо этого, оно включается в структуру FeS-кластеров (с. 5-19) железо-серных белков, участвующих в процессе тканевого дыхания в митохондриях. У животных и человека в печени формируются запасы железа в форме комплекса с белком *ферритином*.

Cu (медь) – входит в состав некоторых оксидоредуктаз. Особое значение из них имеют: дыхательный фермент *цитохромоксидаза*, который участвует в процессе тканевого дыхания в митохондриях (с. 5-17), и *супероксиддисмутаза* – фермент, обеспечивающий обезвреживание супероксидного аниона-радикала, образующегося в процессе тканевого дыхания в митохондриях (с. 5-22).

Mg (магний) – входит в состав ферментов *ДНК-полимераза* (ДНК-зависимая ДНК-полимераза) (с. 7-35) и *РНК-полимераза* (ДНК-зависимая РНК-полимераза) (с. 7-39).

Mo (молибден) – входит в состав ферментов оксидаз, участвующих в превращениях карбонильных продуктов метаболизма (альдегидов), ксантина (*альдегиддегидрогеназы*, *ксантиноксидаза* (с. 7-31)), атмосферного азота (*нитрогеназы* (с. 7-19)) и др.

Zn (цинк) – входит в состав фермента *карбоангидраза* (с. 7-4), катализирующего обратимую реакцию синтеза угольной кислоты, и в состав *карбоксипептидаз* и *аминопептидаз*, катализирующих гидролитический распад белков (с. 7-3), и др.

Mn (марганец) – входит в состав фермента *аргиназа* (с. 7-15) и в состав *водорасщепляющего комплекса* реакционного центра фотосистемы ФС2 (с. 5-33).

Ni (никель) – входит в состав фермента *уреаза* (с. 7-33).

Se (селен) – входит в состав активного центра антиоксидантного фермента *глутатионпероксидаза*.

Co (кобальт) – входит в состав витамина B₁₂. Поэтому он является элементом, необходимым для функционирования витамин B₁₂-зависимых ферментов.

Атомы металлов могут принимать участие как в формировании комплекса фермента с субстратом с образованием истинного субстрата (наиболее часто в этой роли выступают Mg и Mn), так и в образовании комплекса с продуктом реакции (Zn принимает участие в образовании гранул, содержащих инсулин и С-пептид).

ENDNOTES

Учебное пособие подготовлено на основе курса лекций «Биохимия» на базе адаптированного материала учебников [1-10] (послужившего также источником иллюстраций) таким образом, чтобы максимально облегчить студентам ВТУЗов усвоение основ биохимии в ходе самостоятельной работы. Предназначено, главным образом, для студентов специальностей биотехнологического профиля всех форм обучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Alberts B. *et al.* Molecular Biology of the Cell (6th Ed.) – Garland Science, 2015. – 1464 p.
2. Berg J.M. *et al.* Biochemistry (7th Ed.) – Freeman, 2012. – 1120 p.

3. Karp G. Cell and Molecular Biology (6th Ed.) – Wiley, 2010. – 832 p.
4. Koolman J. *et al.* Color Atlas of Biochemistry (2nd Ed.) – Thieme, 2005. – 647 p.
5. Lodish H. *et al.* Molecular cell biology (5th Ed.) – Freeman, 2003. – 973 p.
6. Nelson D. *et al.* Lehninger Principles of Biochemistry (5th Ed.) – Freeman, 2008. – 1100 p.
7. Metzler D.E. Biochemistry: The Chemical Reactions of Living Cells (2nd Ed.) – Academic Press, 2003. – 1973 p.
8. Voet D., Voet J.G., Pratt C.W. Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level (4th Ed.) – Wiley, 2013. – 1200 p.
9. Огурцов А.Н. Основы молекулярной биологии (в 2-х ч.) – Ч. 1. Молекулярная биология клетки. – Харьков: НТУ "ХПИ", 2011. – 304 с.
10. Огурцов А.Н. Бионанотехнология. Принципы и применение. – Харьков: НТУ "ХПИ", 2012. – 480 с.

СОДЕРЖАНИЕ

7. Ферменты	2
7.1. Основные понятия энзимологии	2
7.2. Фермент-субстратный комплекс	4
7.3. Классификация ферментов	5
Оксидоредуктазы	6
Трансферазы	9
Гидролазы	10
Лиазы (синтазы)	12
Изомеразы	14
Лигазы (синтетазы)	15
7.4. Механизмы ферментативных реакций	16
7.5. Кинетика ферментативных реакций	19
7.6. Общие свойства ферментов	23
7.7. Регуляция активности ферментов	25
7.8. Аллостерические ферменты	28
7.9. Мультисубстратные реакции	30
7.10. Изоферменты	32
8. Коферменты, витамины и кофакторы	35
8.1. Общие сведения о витаминах	35
8.2. Водорастворимые витамины	35
Витамин С (аскорбиновая кислота)	35
Витамин В ₁ (тиамин)	36
Витамин В ₂ (рибофлавин)	37
Витамин В ₃ (ниацин)	37
Витамин В ₅ (пантотеновая кислота)	38
Витамин В ₆	39
Витамин В ₁₂	40
Витамин В _с (фолиевая кислота)	40
Витамин Н (биотин)	41
8.3. Жирорастворимые витамины	41
Витамин А	42
Витамин D	43
Витамин Е	45
Витамин К	45
8.4. Металлические кофакторы	46