

Державний вищий навчальний заклад
«Запорізький національний університет»
Міністерства освіти й науки України

Н.В.Колісник, Л.О. Омелянчик

БІОЕНЕРГЕТИКА ТА ЕНЗИМОЛОГІЯ

Навчальний посібник
Для студентів III курсу біологічного факультету
денної та заочної форм навчання

Затверджено
Вченою радою ЗНУ
Протокол № 5 від 25.01.08

Запоріжжя
2008

УДК 577.15:577.23(078)

Колісник Надія Василівна, Омелянчик Людмила Олександрівна
Біоенергетика та ензимологія: Навчальний посібник для студентів III
курсу біологічного факультету. – Запоріжжя: ЗНУ, 2008. – 118 с.

Навчальний посібник містить основні поняття, теоретичні
положення, актуальні питання курсу «Біоенергетика та ензимологія».

Призначений для студентів III курсу біологічного факультету
денного та заочного відділень (спеціальність «Біологія», «Хімія»).

Рецензент В.Д. Бовт

Відповідальний за випуск Н.В. Колісник

ЗМІСТ

Вступ (передмова).....	7
БІОЕНЕРГЕТИКА.....	
1 Вступ.....	8
1.2 Основні поняття біоенергетики.....	9
1.2.1 Вільна енергія.....	10
1.2.2 Сполучені реакції.....	10
1.2.3 Окисно-відновні потенціали.....	11
1.3 Загальні принципи біоенергетики.....	12
1.4 Біологічні енергетичні системи, що відновлюють вміст АТФ.....	12
1.4.1 Системи фосфагену.....	12
1.4.2 Гліколіз – анаеробний розпад глюкози.....	12
1.4.2.1 Контроль гліколізу.....	13
	14
1.4.3 Окислювальні системи.....	15
1.4.3.1 Мітохондрії, структура.....	15
1.4.3.2 Мітохондріальні транспортні системи.....	16
1.4.3.3 Цикл трикарбонових кислот.....	16
1.4.4 Дихальний ланцюг. Структура та функції.....	17
1.4.4.1 Характерні риси електрон транспортного ланцюга.....	18
1.4.4.2 Термодинаміка транспорту електронів.....	19
1.4.4.3 Послідовність транспорту електронів у дихальному ланцюгу.....	19
1.5 Окислювальне фосфорилування.....	20
1.5.1 Хеміосмотична модель синтезу АТФ.....	20
1.5.2 Утворення градієнта протонів.....	20
1.5.3 Гіпотези, що до механізмів транспорту протонів.....	21
1.5.4 Механізм роботи АТФ-синтази.....	21
1.6 Контроль продукції АТФ.....	22
1.6.1 Коефіцієнт фосфорилування. Баланс АТФ.....	22
1.6.2 Контроль окисного фосфорилування.....	23
1.6.3 Окислення, яке незв'язане з фосфорилуванням.....	25
1.7 Закони біоенергетики.....	26
2. ЕНЗИМОЛОГІЯ.....	27
.....	
2.1 Основні поняття і терміни, що використовуються.....	27

ензимології	
2.2. Загальна характеристика ферментів як біологічних каталізаторів	29
2.3 Сучасні проблеми ензимології	31
2.3.1 Інженерна ензимологія.....	31
2.3.2. Імобілізовані ферменти	32
2.3.3 Застосування іммобілізованих ферментів	33
2.4 Активний центр ферментів	34
2.4.1 Формування активного центру	34
2.4.2 Особливості структури активного центру простих і складних ферментів	35
2.4.3. Кофактори: класифікація, біохімічні функції	36
2.4.4 Фермент-субстратний комплекс	38
2.4.5 Причини прискорення реакцій ферментами	39
2.4.6 Чинники, що визначають каталітичну ефективність ферментів	40
2.5 Методика роботи з ферментами	41
2.5.1 Техніка роботи при вивченні ферментативної активності ..	41
2.5.2 Вимірювання швидкості ферментативних реакцій	41
2.5.3 Типи методів, які використовують для вчення ферментативних реакцій	42
2.5.4 Загальні принципи роботи з ферментами	44
2.5.5 Технічні зауваження при роботі з ферментами	46
2.5.6 Алгоритм дослідження ферменту	46
2.5.7 Методи кількісного вивчення ферментативних реакцій	48
2.5.7.1 Методи спектрофотометрії	48
2.5.7.2 Метод Тунберга	49
2.5.7.3 Електродні методи	50
2.5.7.4 Поляриметричні методи	51
2.5.7.5 Хроматографічні методи	52
2.6 Кінетика ферментативних реакцій	53
2.6.1 Рівняння Міхаеліса-Ментен	53
2.6.2 Обмеження кінетики Міхаеліса-Ментен	54
2.6.3 Основні кінетичні константи ферментів та методи їхнього визначення	55
2.6.4 Двохсубстратні ферментативні реакції	55
2.6.5 Інгібітори ферментів	57

2.6.5.1 Кінетична класифікація інгібіторів. Необоротне й оборотне інгібірування	57
2.6.5.2 Типи інгібірування: конкурентний, неконкурентний, змішаний.	58
2.6.5.3 Визначення типу інгібірування.....	60
2.6.5.4 Окремі випадки інгібірування субстратом і продуктом реакції.	60
2.6.6 Аlostеричні ферменти.	60
2.6.6.1 Структура аlostеричних ферментів.....	60
2.6.6.2.Сигмоїдальна кінетика	61
2.6.6.3 Наявність ефекторів. К-системи і V-системи ефекторів	61
2.6. 6.4 Двофазний ефект конкурентних інгібіторів.....	62
2.6.6.5 Особливість дії денатуруючих агентів.....	62
2.6.6.6 Кооперативність.....	63
2.6.6.7 Переваги аlostеричних ферментів з позитивною кооперативністю в регуляції метаболічних шляхів в клітині.....	63
2.6.7 Вплив рН на активність ферментів.....	64
2.7 Механізми прискорення реакцій ферментами	64
2.7.1 Енергія активації. Перехідний стан	64
2.7.2 Принципи каталізу	64
2.7.3 Типи ензиматичного каталізу	65
2.7.3.1 Кислотно-основний каталіз	65
2.7.3.2 Електростатичний каталіз	65
2.7.3.3 Каталіз іонами металів (електрофільний) каталіз	65
2.7.3.4 Ковалентний каталіз (нуклеофільний каталіз)	66
2.8 Принципи регуляції ферментативних процесів.....	66
2.8.1 Регуляція кількості молекул ферментів: контроль синтезу та катаболізму ферментів. Біосинтез ферментів і його регуляція на генетичному рівні. Репресія й індукція. Конститутивні та індукцибельні (адаптивні) ферменти.....	66
2.8.2 Регуляція активності ферментів без зміни кількості молекул.....	67
2.8.2.1 Аlostерична регуляція.....	68
2.8.2.2 Дисоціативна регуляція.....	69
2.8.2.3 Адсорбційна регуляція.....	69

2.8.2.4 Регуляція ковалентним зв'язуванням.....	7070
2.8.2.5 Регуляція обмеженим протеолізом.....	
Питання для самоконтролю.....	71
Самостійна робота	71
Рекомендована література.....	73
Додаток.....	74
Тестовий контроль.....	85
Відповіді до тестових питань	118

ВСТУП (ПЕРЕДМОВА)

Мета курсу: дати сучасне уявлення про закономірності трансформації енергії в еукаріот; фундаментальну роль ферментів (ензимів) в обміні речовин і енергії, основи ферментативної кінетики, принципи контролю та інтеграції метаболічних процесів у живих організмах.

Завдання курсу: теоретичне засвоєння сучасних знань про молекулярні перетворення енергії в живих системах. Ознайомити студентів із сучасними уявленнями про структурну організацію ферментів, механізми ферментативного каталізу та кінетики, методи визначення кінетичних констант, умови використання ферментів як діагностичних тестів у біології та медицині; принципах регуляції метаболізму на рівні окремих ферментів та метаболічних шляхів. Студенти повинні представляти значення отриманих знань у функціонуванні організму в нормі та патології, механізмах дії ліків та шкідливих факторів навколишнього середовища. Застосовувати отримані знання при рішенні контрольних завдань.

Місце курсу в системі природничо-наукової освіти - біоенергетика та ензимологія ведучі дисципліни в підготовці біолога. Це самостійні розділи біохімії, що визначають отримання фундаментальних знань у галузі механізмів трансформації енергії в біологічних системах.

Вимоги до рівня освоєння змісту курсу. Для освоєння спецкурсу необхідна належна загально біологічна й хімічна підготовка. Освоєння курсу включає прослуховування лекцій, виконання лабораторних робіт, рішення задач по біоенергетиці, ферментативної кінетиці, регуляції метаболізму, ознайомлення з основною й додатковою літературою, самостійне опрацювання деяких тим, проходження рубіжних контролів, здачу заліку. Дипломований фахівець повинен мати уявлення про механізми синтезу АТФ при окислюванні різних субстратів у різних умовах, ферменти, як ефективні й специфічні біокаталізатори, методи визначення їхніх кінетичних констант, принципи регуляції метаболічних шляхів у живих організмах. Форми проведення занять: лекції, лабораторні заняття, рішення задач, контрольні роботи, тест-опити на кожному лабораторному занятті.

1. БІОЕНЕРГЕТИКА

1.1 Вступ

Енергія - це здатність здійснювати роботу. Наука, що вивчає перетворення енергії в біологічних системах, називається біоенергетикою.

Біологічна система – сукупність живих організмів, окремий живий організм і будь-яка його частина, наприклад, орган, тканина, сукупність клітин, окрема клітина, частини клітини, метаболіти й ферменти, рецептори й ліганди, які взаємодіють, або взаємоперетворюються в складі живого організму.

Біологічні системи, що вивчаються в біоенергетиці, можуть бути ізолюваними, замкнутими або відкритими.

Відкрита система здійснює обмін енергією й матерією з навколишнім середовищем, замкнута система не обмінюється речовиною з навколишнім середовищем, але може обмінюватися енергією. Ізолювана система не може обмінюватися із середовищем, що оточує, ні енергією, ні речовиною.

Будь-яка біологічна система - система відкрита. У багатьох випадках окремі частини біологічної системи можуть розглядатися або як замкнуті, або як ізолювані.

Живі організми є термодинамічне нестійкими системами. Для їхнього функціонування необхідне постійне надходження енергії у формі, придатній для використання клітиною. Оскільки часовий масштаб біохімічних процесів такий, що за час їхнього протікання зміни зовнішнього тиску й температури незначні, то з достатнім ступенем точності біохімічні процеси в живих організмах можна розглядати як ізобарно-ізотермічні. Тому для виконання механічної роботи м'язового скорочення або хімічної роботи біосинтезу клітина не може використовувати ні теплову енергію (потрібна передача тепла від більш нагрітого тіла до менш нагрітому), ні електричну енергію (потрібна різниця електричних потенціалів). Єдиний вид енергії, який може бути використаний для виконання роботи при постійній температурі й тиску є вільна енергія Гібсу – ΔG (ізобарно-ізотермічний потенціал).

Клітина отримує вільну енергію в результаті окиснення

(«згорання») клітинного «палива» (як правило, вуглеводнів і жирних кислот). Якщо вільна енергія, що виділяється при цьому, не буде яким-небудь чином уловлюватися й зберігатися те вона перейде в тепло й буде втрачена. Очевидно, що в умовах існування клітини єдиним способом збереження вільної енергії є перетворення її на хімічну енергію (енергію хімічних зв'язків). У клітинах вільна енергія зберігається завдяки сполученому синтезу аденозинтрифосфату (АТФ).

Інтегрально будь-який процес при постійній температурі й тиску може йти тільки в бік зменшення вільної енергії. Тому всі процеси, що йдуть зі збільшенням G , повинні бути зв'язані із процесами, що протікають зі зменшенням G , так що сумарний підсумок $\Delta G < 0$.

Кількісною термодинамічною характеристикою хімічного процесу є різниця стандартних вільних енергій (ΔG°), тобто зміна вільній енергії в стандартних умовах. Зазвичай як такі для розчинника приймають активність рівну одиниці, для решти компонентів реакції — концентрації 1 М, при тиску 1 атм. і температурі 25°C (298К).

1.2 Основні поняття біоенергетики

1.2.1 Вільна енергія

Хімічні реакції синтезу йдуть зі споживанням енергії тому їх називають ендергонічними. Хімічні реакції розпаду йдуть, як правило, зі звільненням енергії, їх називають екзергонічними. Для представлення змін енергії в біохімічних реакціях використовують наступні поняття.

Вільна енергія, енергія Гібсу (ΔG)— це частина загальної зміни енергії системи, яка доступна для здійснення роботи системою, прагнучою до рівноваги при постійних значеннях температури, тиску і об'ємі. Під зміною вільній енергії розуміють таку енергію, яка вивільняється, або поглинається в реакції, і яка може бути передана іншій системі або використана іншою системою.

У реакціях ΔG може мати негативний знак ($\Delta G < 0$, - ΔG), це знак втрати вільної енергії системою, (екзергонічні, катаболічні реакції). Якщо - ΔG має велику величину, реакція практично йде до кінця, вона незворотна; позитивний знак ($\Delta G > 0$, + ΔG), знак

поглинання енергії системою (ендергонічні, анаболічні реакції). Якщо $+ \Delta G$ має велику величину, то система практично стійка.

При рівноважних станах реакцій $\Delta G = 0$, система знаходиться в стані рівноваги, в ній не відбуваються ніякі зміни.

З метою можливості порівняння значення ΔG різних реакцій визначають ΔG для кожної з реакцій в ідентичних умовах, які називають стандартними. Це коли концентрація всіх компонентів реакції рівна 1М

температура 25°C (273,15+25=298,15°) якщо в реакції бере участь газ, його парціальний тиск рівний 1 атм. Цю величину вільної енергії називають стандартною вільною енергією й означають ΔG^0 . У біохімії замість ΔG^0 використовують $\Delta G^{0'}$. Ця вільна енергія розраховується як стандартна, з тією лише різницею, що концентрацію іонів водню приймають за 10^{-7} М. Значення $\Delta G^{0'}$ показує напрям і ступінь, до якого протікатиме оборотна реакція. Якщо значення $\Delta G^{0'}$ негативне, то реакція протікатиме зліва направо, якщо позитивне, то справа наліво. Величина $\Delta G^{0'}$ показує наскільки система віддалена від стану рівноваги, а, отже, ступінь протікання реакції, але не дає інформації про швидкість реакції, як і про те, чи протікатиме реакція за конкретних умов.

1.2.2 Сполучені реакції

Величини ΔG , ΔG^0 і $\Delta G^{0'}$ адитивні в будь-якій послідовності реакцій. Загальне значення ΔG , ΔG^0 і $\Delta G^{0'}$ реакційної послідовності перетворення А в Х визначає тільки різницю між змістом вільної енергії А і Х за різних умов і не залежить від шляху перетворення і числа включених індивідуальних реакцій. Окремі реакції шляху перетворення можуть мати позитивні значення $\Delta G^{0'}$ за умови, що загальне значення $\Delta G^{0'}$ має негативний знак. Серед послідовних метаболічних реакцій у живих організмах зустрічаються реакції з позитивними значеннями $\Delta G^{0'}$, що протікають зліва направо за умови, що вони сполучені з реакціями з великими негативними значеннями $\Delta G^{0'}$. Концепція сполучених реакцій має дуже важливе значення в біохімії. Наприклад, у ЦТК реакція перетворення малату в ЩУК, має $\Delta G^{0'} = +27,9$ кДж/моль протікає завдяки тому, що

перетворення ЩУК і ацетил-КоА в цитрат супроводжується звільненням енергії: $\Delta G^{\circ} = -31,4$ кДж/моль. Загальне значення $\Delta G^{\circ} = -3,5$ кДж/моль. Ендергонічні реакції протікають тільки в тому випадку, якщо ними буде отримана вільна енергія. Реакції, які отримують енергію шляхом хімічного зв'язку з окислювальними реакціям, звать сполученими.

1.2.3 Окисно-відновні потенціали

Фундаментальним процесом звільнення енергії в живих організмах є перенесення електронів від субстрату на кисень. Зміна вільній енергії в цих реакціях може бути розрахована з окисно-відновного потенціалу двох компонентів: субстрату й кисню.

Окисно-відновний потенціал або редокс-потенціал з'єднання - це кількісна міра його здатності приєднувати або втрачати електрони, тобто спорідненість до електрона.

На практиці окисно-відновний потенціал одного напівелементу визначають щодо іншого - створюють гальванічний елемент. Інтенсивність потоку електронів від напівелементу з меншою спорідненістю до електрона до напівелементу з великою спорідненістю називають електрон рушійною силою (е. р. с.), яка може бути зміряна у вольтах. Для зручності порівняння окисно-відновних потенціалів різних напівелементів їх порівнюють зі стандартним водневим електродом. Окисно-відновний потенціал стандартного водневого електроду рівний умовно прийнятий за 0,000 В при всіх температурах. За даними вимірювання редокс-потенціалу напівелементів щодо стандартного електроду будують шкалу електродних потенціалів. Її називають водневою шкалою. Відповідні величини виражають у вольтах. За цією шкалою електроди із сильнішими відновними властивостями в порівнянні зі стандартним водневим електродом мають негативний редокс-потенціал (Е зі знаком мінус). Величина редокс-потенціалу напівелементу залежить від концентрації окислювача й відновника та температури. Зважаючи на цю обставину, вимірювання окислювальне - відновного потенціалу проводять при концентрації окислювача й відновника 1 М і температурі 25 С, тиск повинен бути рівним 1 атм. Зміряний у цих умовах редокс-потенціал називають стандартний окисно-відновний потенціал даного напівелементу.

Позначається він символом E° .

Реальний окислювальне - відновний потенціал розраховують по рівнянню

$$E = E^{\circ} +$$

де F – число Фарадея, 96487 кл/моль (кулон)

Позначають цю величину як E_h даного напівелементу.

1.3 Загальні принципи біоенергетики

Розвиток життя на Землі пішов по шляху використання як головного екзергонічного процесу, що забезпечує енергетичні потреби живих організмів, практично універсального для всієї живої природи хімічного перетворення — гідролізу одного з пірофосфатних зв'язків аденозин-5'-трифосфату або, рідше, гуанозин-5'-трифосфату. Звільнення значної енергії при гідролізі деяких фосфорорганічних речовин дало підставу ввести спеціальний термін – макроенергетичні сполуки. Молекула АТФ містить два високоенергетичних (макроенергетичних) зв'язків. У хімічній формулі вони традиційно позначаються знаком \sim (тильда). У молекулі АДФ тільки один високо енергетичний зв'язок; у результаті синтезу

АТФ шляхом окисного фосфорилування додається ще одна. У молекулі АТФ енергія окиснення субстрату трансформується в енергію хімічних зв'язків.

Енергія, що звільняється при реакціях гідролізу різних речовин, зазвичай невелика. Якщо вона перевищує 30 кДж/моль, то зв'язок, який гідролізується, називається високо енергетичним. Енергія гідролізу АТФ залежно від локалізації

у клітині, може мінятися від 40 до 60 кДж/моль.

Гідроліз АТФ і GTP використовується для забезпечення енергетичних потреб процесів життєдіяльності, хімічної, механічної роботи, осмотичної роботи та тепла.

Уміст АТФ в організмі обмежений, гомеостаз його забезпечується постійним ресинтезом.

1.4 Біологічні енергетичні системи, що відновлюють вміст

АТФ

1.4.1 Система фосфагену

Розташована в цитоплазмі, її складають такі реакції:

$\text{АТФ} \rightarrow \text{АДФ} + \text{Фн} + \text{енергія (АТФаза м'язину)}$

$\text{АДФ} + \text{КФ} \rightarrow \text{АТФ} + \text{креатин (креатинкіназа)}$

$\text{АДФ} + \text{АДФ} \rightarrow \text{АТФ} + \text{АМФ (міокіназа)}$

Таким чином, ресинтез АТФ у системі фосфагену здійснюється за рахунок макроергів, які присутні в клітині..

1.4.2 Гліколіз – анаеробний розпад глюкози

Це шлях окислення глюкози, ферменти якого локалізовані в цитоплазмі. Розрізняють швидкий гліколіз – піруват перетворюється на лактат, та повільний гліколіз – якщо присутній кисень, то піруват транспортується в мітохондрії. У реакціях гліколізу при анаеробному окисненні глюкози до пірувату синтезується 2 АТФ. Механізм синтезу – субстратне фосфорилювання. Енергія окиснення 3ФГА витрачається на фосфорилювання самого субстрату (3ФГА Фн + НАД (реакція каталізується дегідрогеназою 3ФГА) $\ll\text{---}\gg$ 1,3ДФГ + НАДН + Н⁺; 1,3ДФГ + АДФ (фосфогліцераткіназа) $\ll\text{---}\gg$ АТФ + 3ФГ. Друга молекула АТФ утворюється в реакції ФЄП + АДФ (піруваткіназа) $\ll\text{---}\gg$ АТФ + ПК.

Термодинамічні характеристики стадій гліколізу відображено в таблиці

Таблиця 1.1 – Термодинамічні характеристики стадій гліколізу

	Реакція	$\Delta G^{\circ \prime}$, ккал/моль
1	Глюкоза + АТФ $\ll\text{---}\gg$ глюкозо-6-фосфат + АДФ + Н ⁺	-4.0
2	Глюкозо-6-фосфат $\ll\text{---}\gg$ фруктозо-6-фосфат	+0.4
3	Фруктозо-6-фосфат + АТФ $\ll\text{---}\gg$ фруктозо-1,6-дифосфат + АДФ+ Н ⁺	-3.4
4	Фруктозо-1,6-дифосфат $\ll\text{---}\gg$ гліцеральдегід-3-фосфат +	+5.7

	дигідроксиацетонфосфат	
5	Д и г і д р о к с и а ц е т о н ф о с ф а т <<->> гліцеральдегід-3-фосфат	+1.8
6	гліцеральдегід-3-фосфат + НАД ⁺ + Ф _Н <<->>1,3-дифосфогліцерат + НАДН + Н ⁺	+1.5
7	1,3- Дифосфогліцерат + АДФ <<->> 3-фосфогліцерат + АТФ	-4.5
8	3-Фосфогліцерат <<->> 2-фосфогліцерат	+1.1
9	2-Фосфогліцерат<<->> фосфоенолпіруват	+0.4
10	Фосфоенолпіруват + АДФ + Н ⁺ <<->> піруват + АТФ	-7.5

1.4.2.1 Контроль гліколізу

Висока концентрація АДФ, АМФ, помірно понижений рН стимулюють гліколіз.

Високі концентрації АТФ і КФ, цитрату, вільних жирних кислот, значне зниження рН інгібують гліколіз.

Контроль гліколізу здійснюється також фосфорилюванням глюкози, швидкість розпаду глікогену (фосфорилаза), швидкістю лімітуючих ферментів (фосфофруктокіназа, ФФК). Лімітувати швидкість може весь ланцюг метаболічних реакцій, але зазвичай – фермент, який каталізує першу реакцію ланцюга (вхідний).

Таким чином, гліколіз - це сукупність реакцій перетворення глюкози в піруват. В аеробних організмів гліколіз служить як би прелюдією до циклу трикарбонних кислот і ланцюгу перенесення електронів, у ході яких запасається велика частина вільної енергії, що міститься в глюкозі. Десять реакцій гліколізу протікають у цитозолі. На першій стадії глюкоза перетворюється у фруктозо-1,6-дифосфат шляхом фосфорилювання, ізомеризації й другої реакції фосфорилювання. У цих реакціях, що грають роль підготовчого етапу для генерування АТФ, на кожен молекулу глюкози витрачаються дві молекули АТФ. На другій стадії фруктозо-1,6-дифосфат розщеплюється альдолазою на дигідроксиацетонфосфат і гліцеральдегід-3-фосфат, які легко піддаються взаємоперетворенню. гліцеральдегід-3-фосфат потім окислюється й фосфорилюється з утворенням 1,3-ДФГ-ацилфосфату, що володіє високим потенціалом перенесення фосфатної групи. Утворення 3-фосфоглицерата пов'язане з генеруванням однієї молекули АТФ. На останній стадії гліколізу шляхом переміщення фосфорильної групи й дегідратації утворюється фосфоенолпіруват – другий проміжний продукт із високим потенціалом перенесення фосфатної групи. Перетворення фосфоенолпірувату в піруват супроводжується генеруванням ще однієї молекули АТФ. Таким чином, при утворенні двох молекул пірувату з однієї молекули глюкози накопичуються дві молекули АТФ. Акцептором електронів при окисленні гліцеральдегід-3-фосфату служить НАД⁺. Отже, щоб гліколіз міг продовжуватися НАД⁺ у міру споживання повинен регенерувати. В аеробів організмів НАДН, що утворюється в ході

гліколізу, передає свої електрони на O_2 по ланцюгу перенесення електронів, що приводить у результаті до регенерації $НАД^+$. В анаеробних умовах регенерація $НАД^+$ відбувається при відновленні пірувату в лактат. Шлях гліколізу грає двояку роль: він приводить до генерування АТФ у результаті розпаду глюкози, і він же поставляє будівельні блоки для синтезу клітинних компонентів. Регуляція швидкості перетворення глюкози в піруват направлена на задоволення цих двох основних потреб клітини. Реакції гліколітичного шляху у фізіологічних умовах легко обертаємо, окрім реакцій що каталізує гексокіназа, фосфофруктокіназа й піруваткіназа. Фосфофруктокіназа найбільш важливий регуляторний елемент у процесі гліколізу, інгібується високими концентраціями АТФ і цитрату й активується АМФ. Тому фосфофруктокіназа активна при виникненні

потребі в енергії або в будівельних блоках. Гексокіназа інгібується глюкозо-6-фосфатом, який накопичується, коли фосфофруктокіназа неактивна. Піруваткіназа, інший регуляторний фермент інгібується АТФ як алостеричним ефектором, отже, перетворення фосфоенпірувату в піруват блокується при високому енергетичному заряді клітини.

1.4.3 Окислювальні системи

Окислювальні системи: аеробні, відбувається в мітохондріях, представлені реакціями ЦТК та дихальним ланцюгом, субстрати окиснення – жири й білки, у реакціях, які каталізують дегідрогенази ЦТК із коферментами $НАД$ і $ФАД$, останні відновлюються до $НАДН$ і $ФАДН_2$. $НАДН$ і $ФАДН_2$ представляють молекули, які багаті енергією, оскільки кожна з них містить пару електронів із високим потенціалом перенесення. При перенесенні цих електронів на молекулярний кисень вивільняється велика кількість енергії. Енергія, що вивільняється, може бути використана для генерування АТФ.

1.4.3.1 Мітохондрії, структура

Сукупність мітохондрій клітини називають мітохондріон. Мітохондрії – органели клітин із двома мембранами.

Зовнішня мембрана має неспецифічні пори – порини, які

проникні для молекул із м.м. < 10 кДа, фермент – нуклеозид дифосфаткіназа. Міжмембранний простір містить аденілаткіназу, нуклеозид дифосфаткіназу.

Внутрішня мембрана

Тут локалізовані білки електрон - транспортного ланцюга, транспортери/транслокатори АТФ, АДФ, Фн. Мембрана проникна для O₂, CO₂, H₂O.

Кристи

Інвагінації внутрішньої мембрани формують гребінці, кристи, їх тим більше, чим інтенсивніше дихання тканини.

Матрикс

Тут локалізовані: ферменти ЦТК, піруватдегідрогеназа, генетичний апарат

Окислювальне фосфорилювання – це процес зв'язаного із транспортом електронів по ланцюгу переносників від НАДН і ФАДН₂ до O₂. В організмів аеробів цей процес служить головним джерелом АТФ.

Процес генерування АТФ, у якому роль кінцевого акцептора електронів виконує кисень або інше неорганічне з'єднання, називають диханням. Донором електронів може служити як органічна, так і неорганічна сполука.

1.4.3.2 Мітохондріальні транспортні системи

АДФ -АТФ транслокатор - антипорт для обміну АДФ і АТФ, керований мембранним потенціалом.

pH-H⁺ транспортер – симпорт, керований ΔpH;

Ca²⁺ транспортер - керований мембранним потенціалом і Ca²⁺ - Na⁺ обміном.

Транспортуються НАД, але не НАДН

Гліцерофосфатний човник:

3-фосфогліцерол дегідрогеназа

Флавопротеїн дегідрогеназа NADH= 2 АТФ.

Малат-аспартатний човник:

Малат дегідрогеназа

Малат-α-кетоглутарат переносник

Трансамінази

Переносник глутамат-аспартату

НАДН = 3 АТФ

1.4.3.3 Цикл трикарбонних кислот

Цикл трикарбонних кислот представляє собою кінцевий загальний шлях для окиснення паливних молекул. Він служить також джерелом будівельних блоків для процесів біосинтезу. Більшість паливних молекул вступають у цикл у вигляді ацетил-СоА. Окислювальне декарбоксілювання пірувату, що приводить до утворення ацетил-СоА, є сполучною ланкою між гліколізом і циклом трикарбонних кислот. Ця реакція й усі реакції циклу протікають у мітохондріях на відміну від гліколізу, який відбувається в цитозолі. Цикл починається з конденсації оксалоацетату (С4) і ацетил-СоА., (С2) з утворенням цитрату (С6), який ізомеризується у ізоцитрат (С6). Окисне декарбоксілювання ізоцитрату дає α -оксоглутарат (С5). Друга молекула С0₂ виділяється у наступній реакції, в якій α -оксоглутарат піддається окисному декарбоксілюванню в сукциніл-СоА., (С4).

Тіоефірний зв'язок сукциніл-СоА., в присутності Фн; розщеплюється з утворенням сукцинату і одночасним генеруванням високо енергетичного фосфатного зв'язку в формі ГТФ або АТФ. Сукцинат окислюється у фумарат (С4), який потім перетворюється в малат (С4). Нарешті, малат окислюється, приводячи до регенерації оксалоацетат (С4). Таким чином, два атоми вуглецю поступають у цикл у вигляді ацетил-СоА й два атоми вуглецю покидають цикл у вигляді С0₂ при послідовних реакціях

декарбоксілювання, яки каталізує ізоцитрат дегідрогеназа та оксоглутарат дегідрогеназа. У чотирьох окисно-відновних реакціях циклу три пари електронів переносяться на НАД⁺ і одна пара - на ФАД. Ці відновлені переносники електронів окислюються потім у ланцюзі перенесення електронів, що супроводжується генеруванням одинадцяти молекул АТФ. Крім того, один високо енергетичний фосфатний зв'язок утворюється безпосередньо в циклі трикарбонних кислот. Отже, на кожен двох вуглецевий фрагмент, який повністю окислюється до Н₂0 і С0₂, відбувається генерування дванадцяти високоенергетичних фосфатних зв'язків.

1.4.4 Дихальний ланцюг. Структура та функції

Ланцюг перенесення високоенергетичних електронів від окислювальних субстратів ЦТК у складі НАДН+Н⁺, ФАДН₂ на кисень здійснюється дихальним ланцюгом. Він розташований на внутрішній мембрані мітохондрій. Його складають 4 комплексів (Додаток, рис .1.1)

Комплекс I (НАДН-коензим Q редуктаза)

Функція: переносить електрони від НАДН (2 е- донор/акцептор) на СоQ.

Склад: білок із м.м. 850-кДа; 1 флавін мононуклеотид (ФМН) - акцептор/донор 1 або 2 е⁻; 6 - 7 залізо-сірчаних кластерів - акцептор/донор 1 або 2 е⁻; коензим Q - акцептор/донор 1 або 2 е⁻, гідрофобний хвіст, 10 ізопроноїдних одиниць (Q10).

Комплекс II (сукцинат-коензим Q редуктаза)

Функція: переносить електрони із сукцинату на СоQ.

Склад: сукцинат дегідрогеназа; ковалентне зв'язаний ФАД; 1 [4Fe-4S] кластер; 2 [2Fe-2S] кластерів; 1 цитохром b₅₆₀

Δε⁰ комплексу недостатня для забезпечення ΔG синтезу АТФ.

Комплекс III (коензим Q-цитохром із редуктаза)

Функція: переносить електрони від СоQ на цитохром с.

Склад: 2 цитохромів b (цитохром b₅₆₂ або Н і цитохром b₅₆₆ або L); 1 цитохром с₁; 1 [2Fe-2S] кластер (залізо-сірчаний білок Rieske).

Цитохроми мають характерні смуги поглинання й хімічну структуру.

Цитохром с: переносить електрони від с₁ комплексу III на цитохром оксидазу (комплекс IV); периферичний мембранний білок; частина білка цитохрому безпосередньо переносить електрон; поверхневі заряди амінокислот полегшують білок-білкові взаємодії.

Комплекс IV (цитохром оксидаза)

Функція: накопичує й переносить 4e⁻ на O₂ з утворенням води – 4 цитохром с (Fe²⁺) + 4H⁺ + O₂ <<—>> 4 цитохром с (Fe³⁺) + 2H₂O

Склад: комплекс тварин має м.м. ~200-кДа, трансмембранний білок, димер, містить від 6 до 13 суб'єдиниць; суб'єдиниці I і II

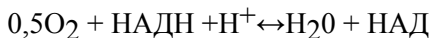
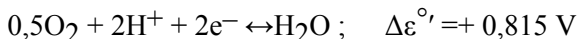
містять окислювально-відновні центри (редокс-активні центри); 2 гема а (гем а й гем а3); 2Cu центру (CuA або а й CuB або а3); заряджені залишки Asp/Glu взаємодіють із залишками Lys на поверхні цитохрому с. Реакція циклу протікає через бінуклеарний (Cu-Fe) комплекс і проміжне з'єднання феррил (Fe^{4+})

1.4.4.1 Характерні риси електрон транспортного ланцюга

Компоненти електрон транспортного ланцюга характеризуються: латеральною мобільністю; не еквімолекулярним відношенням; не очевидною структурою високого порядку.

4.4.4.2 Термодинаміка транспорту електронів

Повторне окиснення НАДН і ФАДН сполучене із синтезом АТФ.



$$\Delta\varepsilon^{\circ'} = 0,815 - (-0,315) = 1,130 \text{ V}$$

$$\Delta G^{\circ'} = -nF \Delta\varepsilon^{\circ'} = -2(96,494/\text{mol})(1,130 \text{ J C}^{-1}) = 218 \text{ кДж/моль}$$

При 100% ефективності це 5-7 АТФ.

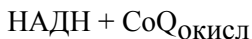
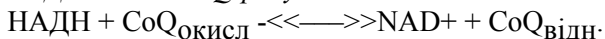
Різниця вільної енергії комплексів білків електрон-транспортного ланцюга сполучено із синтезом АТФ (окислювальне фосфорилування).

1.4.4.3 Послідовність транспорту електронів

Транспорт електронів здійснює ланцюг чотирьох білкових комплексів.

Комплекс I

НАДН- коензим Q-редуктаза



$$\Delta\varepsilon^{\circ'} = +0,36 \text{ V}; \Delta G^{\circ'} = -70 \text{ кДж.моль}^{-1}$$

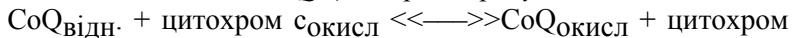
Інгібітори ротенон і амітал

Комплекс II – сукцинат - Q редуктаза



$$\Delta\varepsilon^{\circ'} = +0,015 \text{ V}; \Delta G^{\circ'} = -2,9 \text{ кДж.моль}^{-1}$$

Комплекс III - коензим Q-цитохром c редуктаза



$c_{\text{відн}}$

$$\Delta\varepsilon^{\circ'} = +0,58 \text{ V}; \Delta G^{\circ'} = -110 \text{ кДж.моль}^{-1}$$

Інгібітор антимицін А

Комплекс IV – цитохром c оксидаза



$$\Delta\varepsilon^{\circ'} = +0,58 \text{ V}; \Delta G^{\circ'} = -110 \text{ кДж.моль}^{-1}$$

Інгібітори: ціанід (CN⁻), СО, азид (N₃⁻)
Фосфорилювання і окислення міцно зв'язані.

1.5 Окислювальне фосфорилування

Енергія сполучення (енергія перетворення) - вільна енергія електрон-транспортного ланцюга, використовувана АТФ-синтазою, що переміщує протон (комплекс V, Додаток V, рис. 1.2).

Теорія сполучення енергії, що звільняється при окисно-відновних реакціях (хемі-) та транслокації за її рахунок протонів із матрикса в міжмембранний простір, а потім зворотний потік протонів у матрикс через структури V комплексу (осмос) із синтезом АТФ була сформульована П. Мітчеллом.

1.5.1 Хеміосмотична модель синтезу АТФ

Теорія П.Мітчелла, що встановлює тісну залежність синтезу АТФ від того, яким чином електрони і протони передаються по дихальному ланцюгу, вимагає дотримання ряду умов, які перераховані нижче.

1. Внутрішня мітохондріальна мембрана повинна бути інтактна і непроникна для протонів, що прямують зовні всередину.

2. У результаті активності дихального ланцюга іони водню поступають в неї зсередини, з матрикса, а звільняються на зовнішній стороні мембрани.

3. Рух іонів водню, направлений зсередини назовні, приводить до їхнього накопичення, унаслідок чого між двома сторонами мітохондріальної мембрани виникає градієнт рН.

4. Підтримка такого градієнту вимагає витрати енергії. Цю енергію поставляє перенос електронів по електрон-транспортному ланцюгу.

5. Синтез АТФ підтримується наявністю електрохімічного градієнту. ΔG електронного транспорту зберігається шляхом перекачування H^+ з матрикса мітохондрій в міжмембранний простір, створюючи електрохімічний градієнт H^+ уперек внутрішньої мембрани, який веде до синтезу АТФ.

1.5.2 Утворення градієнта протонів

Енергія електронного транспорту визначає можливість комплексів I, III і IV транспортувати H^+ із матрикса (область низьких $[H^+]$ або високого рН і негативного електричного потенціалу)

упоперек внутрішньої мембрани в міжмембранний простір (область високих $[H^+]$ або низького рН і позитивного електричного потенціалу) ΔG виникаючого електрохімічного градієнта - називають рушійною силою протона (pmf - proton motive force)

$$\Delta G = 2.3RT[pH(\text{in}) - pH(\text{out})] + ZF\Delta\Psi, \text{ де}$$

Z – заряд протона (+1), F - постійна Фарадея, $\Delta\Psi$ (дельта пси) - мембранний потенціал ($\Delta\Psi$ позитивна, коли іон транспортується від негативного до позитивного)

Для транспорту H^+ із матрикса в міжмембранний простір потрібна енергія 1 H^+ - $\Delta G \sim 21.5$ кДж.моль⁻¹

$\sim 3 H^+$ для синтезу 1 АТФ

1.5.3 Гіпотези, що до механізмів транспорту протонів

1). Механізм окисно-відновної петлі

Процес починається реакцією відновника ($S1H2$) з активним центром комплексу, розташованим в матрикса мітохондрій Два атоми водню ($2H^+ + 2e^-$), відщеплені від відновника, переміщуються по простетичних групах комплексу ($X1, X2, X3$) до зовнішньої сторони поверхні внутрішньої мембрани. Тут долі протонів і електронів розходяться: протони залишаються у водній фазі міжмембранного простору, а електрони повертаються назад по інших компонентах комплексу й потрапляють на молекулу окислювача ($S2$), яким служить яка-небудь група наступного комплексу. У результаті в матриксу з'являється черговий відновник ($S2H2$), а на мембрані виникає $\Delta\mu$. Реакція подальшого окиснення $S2H2$ може відбуватися за участю наступного комплексу дихального ланцюга

2) Механізм протонного насоса – транспорт електронів по ланцюгу супроводжується конформаційними змінами, які впливають на рKs залишків амінокислот, перенесення протонів здійснюється залишками амінокислот.

1.5.4 Механізм роботи АТФ-синтази

АТФ синтаза, що транслкує протон (протон АТФаза, що відкачує, і $F1F0$ -АТФаза); мультисуб'єдиничний трансмембранний протеїн; $F0$ - водонерозчинний трансмембранний білок, який складають 10 - 12 типів суб'єдиниць; це канал для переміщення

протонів із міжмембранного простору в матрикс, де протони утворюють воду с відновленим киснем. Олігоміцин інгібує синтез АТФ шляхом пов'язання з H^+ , перешкоджає їх транспорту. F1 - водорозчинний периферичний мембранний білок, який складається з $\alpha\beta\gamma\delta$ суб'єдиниць (синтез АТФ забезпечує β - суб'єдиниця); Стрижень складається принаймні з двох білків – олігоміцин-чутливого білка (ОЧБ) і сполучаючого чинника 6 (F6).

Механізм синтезу АТФ включає три фази.

- 1) Переміщення H^+ за допомогою F0.
 - 2) Каталітичне утворення фосфоангідридних зв'язків АТФ F1
 - 3) Сполучення зниження протонного градієнта із синтезом АТФ при взаємодій F0 і F1 реалізується в три стадії:
 - пов'язання АДФ + Фн із "вільним" (L) сайтом;
 - конформаційні зміни L в T (зв'язаний, напружений), обумовлені вільною енергією конформаційна зміна L в "напружену" (T) – центр синтезу АТФ;
 - АТФ синтезується на центрі T на одній суб'єдиниці, звільнення АТФ здійснюється іншою суб'єдиницею, вільна енергія H^+ потоку визначає вивільнення АТФ (тобто, T - O перехід).
- повному окисленні глюкози 29.5 – 31.

1.6 Контроль продукції АТФ

1.6.1 Коефіцієнт фосфорилювання

Шляхи, які проводять АТФ, строго управляються таким чином, що АТФ ніколи не проводиться більше ніж необхідно. Енергія, що утворюється при проходженні потоку електронів по дихальному ланцюгу, використовується для зв'язаного фосфорилювання АДФ. Ці два процеси взаємозалежні: окислення не може протікати у відсутності АДФ. Співвідношення окислення й фосфорилювання визначається коефіцієнтом P/O (кількість моль фосфорилюваної АДФ на 1/2 моль кисню). Коефіцієнт P/O називається коефіцієнтом окислювального фосфорилювання й залежить від точки входження відновних еквівалентів у ланцюг транспорту електронів. Наприклад, P/O=3, для субстратів, що окисляються НАД - залежною дегідрогеназою оскільки в дихальному ланцюзі є три ділянки, де перенесення електронів

зв'язане із синтезом АТР. Не всі субстрати передають електрони й протони на НАД, деякі окислюються ФАД - залежними дегідрогеназами, які переносять протони й електрони відразу на убіхінон, минувши перший комплекс. У цьому випадку Р/О = 2. Насправді коефіцієнт фосфорилування завжди менше теоретичної величини, тому що частина енергії, що вивільняється при транспорті електронів, витрачається не на синтез АТР, а для перенесення речовин через мітохондріальну мембрану.

У добу людина споживає в середньому 27 моль кисню. Основна його кількість (приблизно 25 моль) використовується в мітохондріях у дихальному ланцюгу. Отже, щодоби синтезується 125 моль АТР або 62 кг (при розрахунку використовували коефіцієнт Р/О=2,5, тобто середнє значення коефіцієнта фосфорилування). Маса всієї АТР, що міститься в організмі складає приблизно 20-30 г. Отже, можна зробити вивід, що кожна молекула АТР за добу 2500 разів проходить процес гідролізу й синтезу, що й характеризує інтенсивність обміну АТР.

1.6.2 Контроль окисного фосфорилування

Цитохромоксидаза – необоротна стадія, регулюється доступністю субстрату відновленого цитохрому с.

Контроль акцептором фосфатних груп - [АДФ].

Гліколіз і ЦТК забезпечують відношення

$[\text{НАДН}]/[\text{НАД}^+]$

Цитрат інгібує гліколіз на рівні фосфофруктокінази -1 (ФФК-1). Фізіологічне значення звернення метаболізмом аеробного обміну анаеробним.

Ефект Пастера - зниження споживання глюкози в умовах аеробів, ефективніший шлях синтезу АТФ

$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 2\text{АДФ} + 2\text{Фн} -$

$2 \text{ лактату} + 2\text{Н}^+ + 2\text{H}_2\text{O} + 2\text{АТФ}$

$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 38 \text{ АДФ} + 38 \text{ Фн} + 6\text{O}_2 -$

$6\text{CO}_2 + 4\text{H}_2\text{O} + 38 \text{ АТФ}$

Активність ФФК-1, що регулюється цитратом і аденіннуклеотидом багато разів знижується при перемиканні анаеробного метаболізму на аеробний .

ФФК-1 багато разів інгібують кислі продукти молочної кислоти.

Таким чином, при окисному фосфорилуванні протонний градієнт через внутрішню мітохондріальну мембрану забезпечує сполучення синтезу АТФ зі струмом електронів від НАДН або ФАДН₂ до O₂. Струм електронів через три асиметрично орієнтованих трансмембранних комплексів приводить до викиду протонів із мітохондріального матриксу й генеруванню мембранного потенціалу. Синтез АТФ відбувається при зворотному струмі протонів у матрикс через канал в АТР-синтезуючому комплексі, який відомий як мітохондріальна АТФ синтаза. Окислювальне фосфорилування утілює основну концепцію біоенергетики: передачу вільної енергії за допомогою протонних градієнтів.

Переносниками електронів у дихальному ансамблі внутрішньої мітохондріальної мембрани служать флавіни, залізо-сірчані комплекси (кластери), хінони й групи гема цитохромів. Електрони від НАДН переносяться на ФМН – простетичну групу НАДН-Q-редуктази, першого із трьох комплексів. Ця редуктаза містить також Fe-S- центр. Електрони з'являються в QH₂, відновленій формі убіхінону (Q). QH₂ дуже мобільний переносник, транспортує свої електрони до QH₂-цитохром-С-редуктази, комплексу, що містить цитохроми b і c₁ і Fe-S-центр. Цей другий комплекс відновлює цитохром c, водорозчинний периферичний мембранний білок. Цитохром c, подібно Q, є мобільним переносником електронів, які потім транспортуються до цитохром-с-оксидази, що є третьім комплекс, який містить цитохроми a й a₃. Іон міді в цій оксидазі переносить електрони до кінцевого акцептора O₂ з утворенням H₂O.

При струмі двох електронів через кожен з указаних трьох комплексів відбувається генерування протонного градієнта, достатнього для синтезу однієї молекули АТФ. Таким чином, на один окислений НАДН утворюються три АТФ, а на один окислений ФАДН₂ - тільки дві АТФ, тому що його електрони включаються в ланцюг на стадії QH₂, після першого етапу викиду протонів. Так само тільки два АТФ генеруються при окисненні НАДН, що утворився в цитозолі, оскільки одна АТФ втрачається в ході перенесення електронів у мітохондрії гліцерол-фосфатним

човниковим. Надходження АДФ у мітохондрії зв'язано з виходом АТФ у процесі так званої полегшеної обмінної дифузії. При повному окисненні молекули глюкози до CO_2 і H_2O утворюються 36 молекул АТФ. Перенесення електронів у нормі тісно зв'язаний із фосфорилуванням. Окислення НАДН і ФАДН₂ відбувається тільки за умови одночасного фосфорилування АДФ в АТФ. Це сполучення, зване дихальним контролем, може бути порушене роз'єднувачами, такими, як ДНФ, який порушує протонний градієнт, переносючи протони через внутрішню мітохондріальну мембрану. У таблиці 1.2 представлено енергетичний баланс окислення глюкози

Таблиця 1.2 – Енергетичний баланс окислення глюкози

	НАДН	ФАДН ₂	АТФ
Гліколіз (цитоплазма)			
Глюкоза + АТФ → Г-6-Ф + АДФ			- АТФ
Фруктоза -6-фосфат + АТФ → Ф-1,6-ДФ			- АТФ
гліцеральдегід-3-фосфату 1,3-ДФГ	+2 НАДН		
1,3-ДФГ → 3ФГ			+2АТФ
Фосфенолпіруват → піруват			+ 2АТФ
Мітохондріальні реакції			
Піруват → ацетил-СоА	+2НАДН		
ЦТК			
Окиснення ізолімонної кислоти, альфа-кетоглутарату й малату	+6 НАДН		
Окиснення сукцинату		+ 2 ФАДН ₂	
ГДФ → ГТФ			+1,5
Окисне фосфорилування			
2НАДН гліколізу			+4,5
2НАДН ПДГ (піруват в ацетил - КоА)			+5
6НАДН з ЦТК			+15
2ФАДН ₂			<u>+3</u>
			31 (29,5)

1.6.3 Окислення, яке незв'язане з фосфорилуванням

Сильний зв'язок транспорту електронів із синтезом АТФ залежить від непроникності внутрішньої мембрани мітохондрій. Агент, який взаємодіє із внутрішньою мітохондріальною мембраною й збільшує її прохідність до Н⁺, знижує градієнт Н⁺ й таким чином, роз'єднує окислювальне фосфорилування від електронного транспорту. Енергія транспорту електронів розсівається у вигляді тепла (підвищення температури): 2,4-дінитрофенол (ДНФ). У бурій жировій тканині: білок роз'єднування - термогенін формує канал для струму Н⁺ із міжмембранного простору, минувши АТФ синтазу.

Вільні жирні кислоти підвищують провідність внутрішньої

мембрани через норадреналін стимульований шлях.

1.7 Закони біоенергетики

Довгий час уважалось, що єдиним типом "енергетичної валюти" служать високо енергетичні хімічні сполуки, а серед них перш за все аденозинтрифосфат (АТФ). Проте останні роботи спростували цю догму. Виявилось, що клітина має не одним, а три типів "енергетичної валюти". Разом з АТФ таку роль виконують протонний (ПП) і натрієвий потенціали (НП) на біологічних мембранах. (ПП і НП - різниця електричних потенціалів плазми зовні й за мембраною, що створюється «накачуванням» крізь мембрану іонів водню (ПП) або іонів натрію (НП)). На цієї основі Скулачевим В.П. були сформульовані три закони біоенергетики.

1.7.1 Перший закон біоенергетики

Жива клітина уникає прямого використання енергії зовнішніх ресурсів для здійснення корисної роботи. Вона спочатку перетворює їх на одну із трьох конвертованих форм енергії ("енергетичних валют"), а саме: у АТФ або ПП та НП, які потім витрачаються для здійснення різних енергоємних процесів.

1.7.2 Другий закон біоенергетики

Будь-яка жива клітина завжди має у своєму розпорядженні як мінімум дві "енергетичні валюти": водорозчинною (АТФ) і пов'язаною з мембраною ($\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ або $\Delta\bar{\mu}_{Na^+}$).

1.7.3 Третій закон біоенергетики

Енергетичні валюти" клітини можуть перетворюватися одна в іншу. Тому отримання хоч би однієї з них за рахунок зовнішніх ресурсів достатньо для підтримки життєдіяльності.

2. ЕНЗИМОЛОГІЯ

2.1. Основні поняття й терміни, що використовуються в ензимології

Ферменти – це специфічні органічні каталізатори, що синтезуються живими клітинами. Як правило всі ферменти є білки з різними молекулярними масами: від 9 кДа до 1000 кДа. Кожен фермент каталізує певну хімічну реакцію.

Субстрати - це речовини, з якими відбувається хімічне перетворення під дією ферментів. Субстратами ферментів можуть бути як природні, так і хімічно синтезовані речовини.

Каталітична активність ферменту — це здатність ферменту перетворювати визначену кількість молекул субстрату, тоді як сам він до кінця реакції залишається незмінним. Ферменти розрізняються по своїй каталітичній здатності. Наприклад, 1 моль трипсину здійснює 102 циклів у секунду, глюкозооксидаза - 17×10^3 цикли в секунду й т.д. Це називається “Числом оборотів ферменту”. Число оборотів варіює від 1 до 10^6 залежно від природи ферменту.

Каталітичну активність ферментів виражають в одиницях активності.

Міжнародна одиниця активності (Е) — це кількість ферменту, яка каталізує перетворення 1 мкмоль субстрату за 1 хвилину в оптимальних умовах.

Одиниця активності в системі СІ (катал) — відповідає кількості ферменту, яка каталізує перетворення 1 моля субстрату в 1 секунду.

Співвідношення між одиницями активності:

$$1 \text{ Е} = 16,67 \text{ нанокатал} ;$$

$$1 \text{ катал} = 6 \times 10^7 \text{ Е}.$$

У медицині активність ферментів виражають найчастіше в одиницях активності на 1 л біологічної рідини.

Питома активність ферменту — це активність, виражена в одиницях активності на 1 міліграмі (або 1 г) білка або 1 міліграма (1 г) препарату ферменту. Використовується в біохімічній практиці.

Активатори ферментів — з'єднання, які приводять ферменти в каталітично активний стан. Іноді це можуть бути іони металів: Co^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} і ін.

Інгібітори ферментів — з'єднання, які пригнічують активність ферментів. Інгібування може бути оборотним або необоротним.

Специфічність ферменту — термін, що позначає, що дія кожного ферменту строго обмежена одним субстратом або дуже невеликим числом близько споріднених з'єднань. В останньому випадку фермент каталізує одну й ту ж реакцію, наприклад, фосфатаза каталізує реакцію відщеплювання фосфату в β -гліцерофосфату, *p*-нітрофенілфосфату, аденозинмонофосфату і інших субстратів.

Взаємодія ферменту й субстрату здійснюється шляхом утворення активного комплексу [ES] і подальшого його розпаду з утворенням продукту реакції й ферменту. Схема ферментативної реакції приведена на рис. 1. Субстрат у комплексі [ES] з'єднується не зі всією молекулою ферменту, а тільки з його "активним центром".

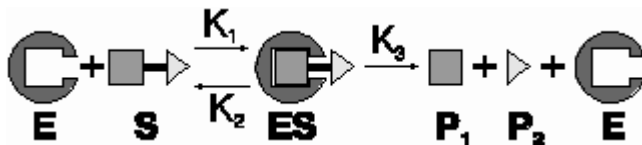


Рис. 2.1 – Схема ферментативної реакції

E – фермент;

S – субстрат;

ES – комплекс “фермент – субстрат”;

P1, P2 – продукти реакції;

K1, K2, K3 – константи рівноваги.

Для того, щоб кількісно визначити активність ферменту, вимірюють швидкість реакції, що каталізується ним.

Швидкість реакції — це швидкість, з якою змінюється в часі концентрація субстрату (під дією ферменту вона зменшується), або швидкість з якою збільшується концентрація продукту реакції. Для того щоб зміряти швидкість ферментативної реакції, необхідно перш за все "запустити" цю реакцію в певний час, швидко змішавши реагенти, а потім, за строго фіксованих умов температури й рН, вимірювати концентрацію продукту реакції або субстрату через певні проміжки часу. За даними вимірювання будують кінетичну криву.

Кінетична крива — будується за даними вимірювання

декількох крапок. Вона відображує зміну концентрації продукту (або субстрату) під час реакції.

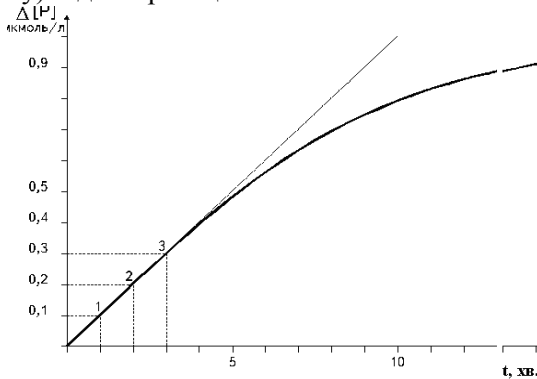


Рис. 2.2 – Загальний вид кінетичної кривої

t – час у хвилинах;

$\Delta[P]$ – зміна концентрації продукту, мкмоль/л або нмоль/л і

т.д.

Швидкість реакції в даний момент часу визначають як нахил дотичної до кінетичної кривої в даній крапці (рис. 2).

Початкова швидкість реакції – це швидкість реакції в нульовий момент часу, визначити її можна тільки спеціальними методами. Тому, для практичних цілей, при визначенні активності ферментів, початкову швидкість визначають на лінійній ділянці кінетичної кривої, тобто там, де реакція йде з постійною швидкістю (крапки 1, 2, 3 кінетичних кривої

2.2 Загальна характеристика ферментів як біологічних каталізаторів

Ферменти (від латинського fermentum – закваска) – це унікальні, специфічні каталізатори біохімічних процесів, присутні у всіх живих клітинах. Ферменти – глобулярні білки (крім РНКаз), які складаються із залишків амінокислот. Карбоксильна група однієї молекули амінокислоти, взаємодіючи з аміногрупою сусідньої молекули амінокислоти, утворює амід. Окремі пептидні ланки $-\text{CO}-\text{NH}-$ відрізняються один від одного тільки бічними групами R. Ці групи можуть містити вільні аміно- або карбоксильні групи, оскільки деякі білкові амінокислоти містять дві аміно- (лізин) або дві карбоксильні (аспарагінова кислота) групи. Вони можуть містити

також і амідні групи. Послідовність амінокислот визначає первинну структуру білків. Окрім пептидних зв'язків у білках є водневі зв'язки між NH_2 і COOH , що визначають вторинну структуру

(спіраль). У білках має місце також взаємодія NH_2 , $-\text{OH}$, COOH -груп, що не беруть участі в утворенні пептидного зв'язку (третинна структура). Для деяких ферментів характерна наявність чверткової структури [1,2].

Загальні властивості ферментів і хімічних каталізаторів небілкової природи:

1) Ферменти не входять до складу кінцевих продуктів реакції й не витрачаються в процесі каталізу, виходячи з реакції в незмінному вигляді.

2) Ферменти тільки прискорюють реакції, що протікають і без них, не можуть порушити реакцій, які суперечать законам термодинаміки.

3) Ферменти не зміщують положення рівноваги, а лише прискорюють його досягнення.

Чим же ферменти відрізняються від небіологічних каталізаторів?

У принципі клітина використовує ті ж самі хімічні реакції, що й хімік у своїй лабораторії. Але

- усі реакції в клітині протікають у водному розчині,
- при постійній температурі ($\sim 37^\circ\text{C}$)
- і постійному тиску (~ 1 атм.).

Саме тому дуже часто процеси, які в лабораторних умовах можна провести в одну стадію, у живій клітині протікають через безліч стадій. Характерним прикладом є спалювання глюкози — ключовий процес отримання клітиною енергії. Якщо хімік може просто підпалити порошкоподібну глюкозу, а теплоту, що виділяється, використовувати для отримання роботи, то необхідність проведення цього процесу у водному розчині при постійній температурі примусила клітину розбити його на безліч стадій (окислювальне фосфорилування, ланцюг гліколізу й цикл лимонної кислоти).

Особливість ферментативного каталізу полягає в тому, що

фермент специфічним чином зв'язує субстрат, і всі реакції протікають усередині фермент - субстратного комплексу. Область ферментативної молекули, у якій відбувається скріплення й перетворення субстрату, називається активним центром.

Основні особливості біологічних каталізаторів

1. Дивовижна ефективність ферментів. У присутності ферментів хімічні реакції протікають набагато швидше, ніж при небіологічному каталізі. У деяких випадках прискорення досягає 10^8 разів.

Дуже наочною мірою активності ферментів є так зване число оборотів. Числом оборотів ферменту називають число молекул субстрату, що зазнають перетворення на одиницю часу (зазвичай в 1 мін) з розрахунку на одну молекулу ферменту (або один каталітичний центр). Число оборотів може розрізнятися в різних ферментів на декілька порядків.

2. Ферменти володіють високою субстратною специфічністю. Як правило, вони відрізняють субстрат від його структурних ізомерів і навіть невелика хімічна модифікація природного субстрату різко знижує спорідненість ферменту до субстрату.

3. Ферменти володіють високою специфічністю до типу реакції, що каталізують. У переважній більшості випадків фермент каталізує лише одну реакцію (рідше — дві).

4. Ферменти володіють високою регіоспецифічністю. У разі субстратів, що мають декілька реакційно-здатних центрів, небіологічні каталізатори прискорюють реакцію по всіх центрах. У протилежність цьому, фермент «направляє» агент лише по одному із центрів.

5. Ферменти володіють високою стереоспецифічністю.

Причиною всіх цих унікальних властивостей ферментів є їхня просторова будова. Усі ферменти є глобулярні білки, що набагато перевершують за розмірами субстрат. Саме це обставина, разом з особливостями третинної структури білків, привела до того, що в процесі еволюції на поверхні ферменту сформувався активний центр, комплементарний субстрату.

2.3 Сучасні проблеми ензимології.

2.3.1 Інженерна ензимологія

Інженерна ензимологія - це новий науково-технічний напрям, поява якого пов'язана з необхідністю інтенсифікації біотехнологічних процесів.

Завдання інженерної ензимології - конструювання органічних каталізаторів (ензимів) із заданими властивостями на основі ферментів і поліферментних систем, що виділені із клітин, або знаходяться в них.

Термін "задані властивості" має на увазі, що ці властивості задаються практичними потребами в даному каталізаторі, умовами проведення ферментативного процесу, специфічністю, необхідною продуктивністю й т.д.

Інженерна ензимологія заснована на принципах органічного й ферментативного каталізу, хімічній технології, біотехнології й біохімії й із часу свого зародження цілком звернена до практики.

Хоча основна спрямованість сучасній інженерній ензимології - використання каталітичної активності іммобілізованих ферментів і клітин, її рамки набагато ширші. Мета цієї дисципліни - розробка наукових основ застосування ферментних каталізаторів для створення нових біотехнологічних виробництв, нових методів в діагностиці і терапії, органічному синтезі і ін., а також рішення фундаментальних проблем ензимології за допомогою іммобілізованих ферментів.

Практичні розробки в області інженерної ензимології пов'язані з рішенням наступних завдань:

- отриманням нового продукту;
- поліпшенням якості відомого продукту;
- підвищенням економічності біотехнологічного процесу.

2.3.2 Іммобілізовані ферменти

Ферменти як біологічні каталізатори застосовуються в різних галузях промисловості - харчовою, текстильною, фармацевтичною, шкіряною, у медицині, сільському господарстві, у тонкому органічному синтезі й т.д. Ширше використання ферментів у біотехнології до останнього часу стримувалося унаслідок ряду причин, а саме:

- трудомісткості відділення ферментів від початкових реагентів і продуктів реакції;
- нестабільності ферментів при зберіганні й при дії різних

чинників;

- високій вартості чистих ферментних препаратів.

Створення біокатализаторів нового покоління - іммобілізованих, тобто зв'язаних ферментів, відкрило перед прикладною ензимологією нові перспективи.

Іммобілізація ферменту - це методичний прийом, при якому молекулу біокатализатора включають у яку-небудь фазу, відокремлену від фази вільного розчину, але здатну обмінюватися з нею молекулами субстрату, ефектора або інгібітору. У 1959 р. був застосований принципово новий методичний прийом - ковалентне пришивання

З того часу й ведеться цілеспрямована розробка гетерогенних катализаторів на основі ферментів.

Іммобілізовані ферменти мають істотні переваги. Так, наприклад, вони легко відокремлюються від реакційного середовища. Це дає можливість зупинити реакцію в будь-який момент, отримати продукт, незабруднений катализатором, і використовувати ферментний препарат багато разів. Іммобілізовані ферменти технологічні, що визначається можливістю вести біотехнологічний процес безперервно й регулювати швидкість реакції, яку вони катализують, і вихід продукту шляхом зміни швидкості протоки. Підбором відповідних носіїв і методів іммобілізації можна цілеспрямовано модифікувати такі властивості ферментів, як специфічність, рН- і температурозалежність, а також стабільність ферменту при денатуруючих діях.

Успішне використання іммобілізованих ферментів значною мірою визначається вибором відповідного носія й методу іммобілізації, а також знанням кінетики реакцій за участю таких катализаторів.

2.3.3. Застосування іммобілізованих ферментів.

Іммобілізовані ферменти можна використовувати, головним чином, у трьох напрямках.

1. Аналіз різних речовин, як лікувальні засоби й біокатализатори для використання в біотехнологічних виробництвах.

2. Лікувальні засоби. Такі засоби застосовуються або в тому випадку, коли необхідний фермент відсутній у тканинах, унаслідок генетичних або інших порушень, або як агенти, що руйнують

небажані компоненти, наприклад, сечовину. Використання чужорідних (бактерійних) ферментів часто небажано, унаслідок того, що вони можуть стати причиною алергічних реакцій і, крім того, вони украй нестійкі. Імобілізація дозволяє обійти ці бар'єри, оскільки вона підвищує стабільність ферменту й перешкоджає його взаємодії з імунною системою макроорганізму. Наприклад, в апараті "штучна нирка", призначеному для звільнення крові від різних шлаків, у тому числі й сечовини, шляхом ультрафільтрації, використовується колонка з іммобілізованою уреазою. Ферменти застосовують у лікувальних цілях і тоді, коли вони необхідні, але унаслідок різних патологічних процесів відсутні, наприклад, для розчинення кров'яних тромбів.

3. Застосування в різних виробництвах. Імобілізовані ферменти широко використовуються в хімічній і фармацевтичній промисловості, а також для обробки стічних вод.

2.4 Активний центр ферментів

2.4.1 Формування активного центру

Особливість ферментативного каталізу полягає в тому, що фермент специфічним чином зв'язує субстрат, і всі реакції протікають усередині фермент - субстратного комплексу. Область ферментативної молекули, у якій відбувається скріплення й перетворення субстрату, називається активним центром.

Активний центр формується із фрагментів поліпептидного ланцюга, зокрема, з окремих амінокислот, що містять різноманітні функціональні групи. Деякі з них беруть участь у сорбції субстрату на ферменті, інші - каталізують його хімічне перетворення. До каталітично активних радикалів білка відносяться нуклеофільні групи (імідазолу, гістидину, оксигрупа серину або тирозину, тіольна група цистеїну, ϵ -аміногрупа лізину, іонізовані карбоксили аспарагінової і глютамінової кислот і ін.) і електрофіли (іон імідазолія, неіонізовані карбоксильні групи, іони металів і т. п.). У первинній структурі молекули ферменту групи активного центру зазвичай віддалені один від одного. Проте в третинній структурі амінокислотні залишки, що беруть участь у каталізі, фіксовані (орієнтовані) у стані, зручному для «одночасної» їхньої взаємодії із сорбованою молекулою субстрату.

У формуванні активного центру беруть участь також молекули води, що входять у гідратаційні шари, а в ряді випадків іони металів, що пов'язані з білком, і органічні кофактори. Певну жорсткість такої конструкції додають α -спіралі, β -структури і дисульфідні містки.

Структурні особливості поверхневого шару білкових глобул дозволяють зосередити в активному центрі велике число різних по хімічній природі функціональних груп, здатних не тільки сорбувати субстрат на ферменті, але взаємодіяти з ним і хімічно.

Положення активного центру в молекулі білка визначається мотивом укладання ланцюга, а не бічними групами. Часто це вм'ятина в архітектурі білкової глобули. Така вм'ятина, кишеня автоматично сприяє оточенню субстрату одночасно багатьма бічними ланцюгами білка. Таким же звичайним місцем активного центру є місце стику доменів. Середовище активного центру відрізняється, як правило, сильно розвинутою мікрогетерогенністю. Це пов'язано з тим, що в утворенні поверхневого шару білка беруть участь не тільки заряджені та полярні амінокислотні залишки, але також частково й аполярні (вуглеводневі) бічні групи.

Поверхневий шар білкової глобули характеризується підвищеною мікрів'язкістю. Ефекти підвищеної мікрів'язкості особливо сильно розвинені в області активного центру. Тут поліпептидні ланцюги білка розташовані настільки жорстко, що утрудняють не тільки поступальну дифузію в глобулу, але також і обертальний рух зв'язаної молекули. Важлива особливість будови активного центру - його поверхня комплементарна поверхні субстрату, тобто залишки амінокислот цієї зони ферменту здатні вступати в хімічну взаємодію з певними групами субстрату.

2.4.2 Особливості структури активного центру простих і складних ферментів

Умовно активний центр можна розділити на дві частини — зв'язуючий центр і каталітичний центр. Зв'язуючий центр (зв'язуючий майданчик) виконує функцію специфічного зв'язування субстрату і його оптимальної орієнтації по відношенню до груп, що каталізують. У каталітичному центрі сконцентровані каталітичні групи. Якщо для проведення реакції достатньо кислотно-основного каталізу (гідролітичні реакції такі як гідроліз амідного зв'язку в

білках або міжнуклеотидного фосфатного зв'язку), то каталітичний центр формується бічними радикалами амінокислотних залишків білка. У цьому випадку фермент складається тільки з полінуклеотидних ланцюгів. Проте багато речовин, необхідних для життєдіяльності клітини, можуть бути отримані тільки за допомогою окислювально-відновних реакцій або реакцій перенесення груп, що містять вуглець. Бічні радикали амінокислотних залишків не можуть каталізувати такі реакції. У цьому випадку клітина використовує складні ферменти, у яких білкова частина забезпечує зв'язування субстрату, а каталіз здійснюють небілкові (мономерні) з'єднання, звані коферментом (кофактором, простетичною групою). Білкова частина такого ферменту називається апоферментом, а активний фермент (комплекс апоферменту й коферменту) — холоферментом. У більшості випадків кофермент зв'язується з апоферментом нековалентними взаємодіями.

Стереохімічна специфічність ферментів найтіснішим чином пов'язана з однією з основних особливостей живих організмів — їхньою здібністю до синтезу оптично активних органічних сполук.

2.4.3 Кофактори: класифікація, біохімічні функції

Багато ферментів є кон'югованими білками, що містять простетичні групи, які не мають у своєму складі амінокислот. Кон'югований білок прийнято називати *холоферментом*, він може дисоціювати на білковий компонент — *апофермент* і небілкову простетичну групу — *кофактор*.

Наприклад, червонувато-коричнева каталаза дисоціює в кислому середовищі з утворенням безбарвного апоферменту й ферріпротопорфірину. Деякі ферменти містять метали, нерідко вельми міцно пов'язані з білком і такі, що відділяються тільки при денатурації ферменту. Супероксиддісмутаза містить два метали: по одному іону Cu^{2+} і Zn^{2+} в кожній з її двох суб'єдиниць; метали важко віддаляються без порушення конформації ферменту. Слід зазначити, що апофермент може знову взаємодіяти з обома металами, при цьому регенерується холофермент. Деякі метали, наприклад, Cu^{2+} в супероксиддісмутазі, безпосередньо беруть участь у каталітичному процесі. Метали можуть брати участь у підтримці нативної конформації ферменту, і в цьому випадку їх часто називають *активаторами*.

Деякі органічні кофактори ферментів діють як акцептори або донори атомів, або функціональних груп, які віддаються від субстрату, або приєднуються до нього. Такі кофактори часто легко дисоціюють із комплексу з ферментом, і в цьому випадку їх прийнято називати *коферментами*.

Відомі сотні ферментів, для функціонування яких необхідні метали або органічні кофактори, проте кількість металів, і кофакторів в організмі обмежена. Багато органічних кофакторів не можуть синтезуватися в організмі ссавців і є необхідними компонентами пищи, або *вітамiнами*. Прикладами кофакторів є никотинамідаденіндинуклеотид NAD, що містить вітамін нікотинамід, і флавінаденіндинуклеотид FAD, що містить вітамін рибофлавін. У таблиці 2.1 відображено участь вітамiнів у формування простетичних груп окремих класів ферментів

Таблиця 2.1 – Участь вітамiнів у формування простетичних груп окремих класів ферментів

Вітамін	Коферментна форма	Тип реакції, що каталізує
Водорозчинні вітамiни		
Тіамін (B1)	Тіамінпірофосфат	Декарбоксилування α -кетокислот
Рибофлавін (B2)	Флавінмононуклеотид, флавінаденіндинуклеотид	Окислювально-відновні реакції
Нікотинавакислота	Нікотинамідаденіндинуклеотид, нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат	Окислювально-відновні реакції
Пантотеновакислота	Кофермент (коензим) А	Перенесення ацильних груп
Піридоксин (B6)	Піридоксальфосфат	Перенесення аміногруп
Біотин	Біотицин	Перенесення CO ₂
Фолієвакислота	Тетрагідрофолат	Перенесення одновуглецевих груп
Вітамін B12	Дезоксиаденозилкобала	Перенесення

	мін амін	пов'язаного з вуглецем атома водню на сусідній атом вуглецю
Аскорбінова кислота (С)	Не відома	Р е а к ц і і гідроксилування
Жиророзчинні вітаміни		
Вітамін А	Ретіналь	Зоровий процес
Вітамін D	1,25-Дигідроксихолекаль ци-ферол	Регуляція обміну Са

З'єднання в холофермент здійснюється будь-якими типами зв'язків, окрім ковалентних.

Функції коферментів і простетичних груп

1. Участь в акті каталізу
2. Здійснення контакту між ензимом і субстратом
3. Стабілізація апоферменту

Апофермент, у свою чергу, підсилює каталітичну активність небілкової частини. Наприклад, NAD⁺ є коферментом великої кількості дегідрогеназ, які різняться апоферментною частиною.

2.4.4 Фермент-субстратний комплекс

Каталітичне перетворення субстрату протікає всередині фермент - субстратного комплексу. Тому, щоб зрозуміти як працює фермент, необхідно знати структуру не тільки нативного ферменту, але й комплексів ферменту із субстратами, а також проміжних з'єднань і продуктів. Тільки так ми зможемо зрозуміти, які каталітичні групи беруть участь у скріпленні субстрату, і які структурні зміни відбуваються в субстраті, і ферменті при утворенні фермент - субстратного комплексу. Основна трудність на цьому шляху пов'язана з тим, що реакції у фермент - субстратних комплексах протікають за долі секунди, тоді як для зняття рентгенограми потрібний, як правило, декілька годин. У зв'язку із цим зазвичай визначають структуру комплексів ферментів із продуктами реакції, інгібіторами або аналогами субстратів.

У фермент - субстратному комплексі діють ті ж сили, які зазвичай виникають при міжмолекулярних взаємодіях.

Серед механізмів, які грають головну роль при утворенні комплексу фермент-субстрат у воді, відзначимо наступні:

- 1) утворення ковалентних зв'язків;
- 2) гідрофобні взаємодії між аполярними (вуглеводневими) фрагментами субстратної молекули й дегідратованими (хоч би частково) областями поверхневого шару глобули;
- 3) електростатичні взаємодії між зарядженими групами субстрату й іонізованими амінокислотними залишками поліпептидних ланцюгів;
- 4) утворення водневих зв'язків.

Загальним для більшості ферментних систем є те, що субстрат зв'язується з активним центром двома або великим числом точок. Утворенню вельми міцних «багатоточкових» (хелатних) комплексів сприяє те, що поліпептидні ланцюги білка й особливо бічні групи амінокислотних залишків, що знаходяться в поверхневому шарі, не зафіксовані дуже жорстко й володіють певною рухливістю (гнучкістю). У результаті забезпечується можливість просторової настройки окремих сорбційних ділянок глобули на відповідні (зв'язуванні ними) фрагменти сорбуємої молекули. Іншими словами, сорбційна ділянка глобули здатна прийняти конфігурацію, яка забезпечує найбільший контакт ферменту з лігандом). Конформаційні зміни в молекулі ферменту при комплексоутворенні були зареєстровані як за допомогою хімічних, так і фізичних методів (ЯМР, ЕПР, дифракція рентгенівських променів і ін.).

Не менш важливу роль у комплексоутворенні грає також підвищена мікров'язкість у поверхневому шарі. Підвищена мікров'язкість обумовлена тим, що рухливість поліпептидних ланцюгів загальмована. Багатоточковий характер комплексоутворення в поєднанні з ефектом підвищеної мікров'язкості приводить практично до повної втрати дифузійної рухливості органічного ліганду.

2.4.5 Причини прискорення реакцій ферментами

Унікальні каталітичні властивості ферментів обумовлені вельми складним механізмом їхньої дії, багато сторін якої ще до кінця не розкрито. Згідно сучасним уявленням ферментативний каталіз обумовлений принаймні трьома основними причинами:

- 1) тим, що сорбція субстрату на ферменті протікає так, щоб полегшити подальшу хімічну реакцію;

2) поліфункціональним характером хімічних взаємодій між ферментом і сорбованим субстратом;

3) ефектами мікросередовища, характеристики якого (діелектрична проникність, полярність і ін.) в області активного центру можуть істотно відрізнятися від відповідних показників водного розчину.

Механізм прискорення полягає в тому, що утворення зв'язку E*R стабілізує перехідний стан -X...Y- хімічній реакції.

2.4.6 Чинники, що визначають каталітичну ефективність ферментів

Ферменти підвищують швидкість реакцій, що каталізують, в $10^8 - 10^{20}$ разів. Таке прискорення відповідає зниженню вільної енергії активації ферментативної реакції на 12-30 ккал/моль (при 30°C) у порівнянні з реакцією, що не каталізується. За рахунок яких взаємодій відбувається таке різке зниження вільної енергії активації (Додаток, рис.2.3)?

У даний час можна виділити чотири основні чинники:

1. Зближення й орієнтація. Фермент здатний зв'язувати молекулу субстрату таким чином, що зв'язок, який атакується ферментом, виявляється не тільки розташованим у безпосередній близькості від групи, що каталізує, але й орієнтованим по відношенню до нього найкращим чином. У результаті вірогідність того, що комплекс ES досягне перехідного стану, сильно збільшується.

2. Напруга й деформація; індукована відповідність. Приснавання субстрату може викликати конформаційні зміни в молекулі ферменту, які приводять до напруги структури активного центру, а також декілька деформують зв'язаний субстрат, полегшуючи, тим самим досягнення комплексом ES перехідного стану. При цьому виникає індукована відповідність ферменту субстрату. Навіть невеликі зміни третинної структури величезної в порівнянні із субстратом молекули ферменту (зазвичай молекула ферменту в декілька разів важче за молекулу субстрату) можуть грати роль механічного важеля для молекули субстрату.

3. Загальний кислотний-основний каталіз. В активному центрі ферменту знаходяться групи специфічних амінокислотних залишків, які є хорошими донорами й акцепторами протонів. Такі

кислотні й основні групи — могутні каталізатори загального типу.

4. Ковалентний каталіз. Деякі ферменти реагують зі своїми субстратами, утворюючи дуже нестабільні, ковалентне зв'язані фермент - субстратні комплекси, які перетворюються на продукти значно швидше, ніж сам субстрат.

Перераховані вище чотири чинники, мабуть, вносять різний внесок до прискорення реакцій ферментами різних типів, проте ні для одного ферменту поки не відомо точного механізму, що забезпечує прискорення тієї або іншої специфічної для нього реакції.

2.5 Методика роботи з ферментами

2.5.1 Техніка роботи при вивченні ферментативної активності

Характерною властивістю ферментів є їхня здатність каталізувати певні хімічні реакції. За винятком невеликого числа ферментів, які можуть бути виявлені безпосередньо спектральним шляхом або шляхом спостережень іншого роду, присутність ферментів виявляється по протіканню специфічних реакцій, що каталізують ними, кількість же присутнього ферменту визначається за швидкістю реакції. Тому вимірювання швидкості реакції складає найбільш істотну частину в методиці дослідження ферментів.

2.5.2 Вимірювання швидкості ферментативних реакцій

Криві ходу більшості ферментативних реакцій мають загальну форму, показану на рис. 2.2.

Рис. 2.2 – Типова крива ходу ферментативної реакції

На цьому графіку видно, що швидкість реакції зменшується із часом. Це зменшення швидкості може пояснюватися різними причинами. Наприклад, продукти реакції можуть пригноблювати фермент; ступінь насичення ферменту субстратом може зменшуватися в результаті падіння концентрації субстрату в міру здійснення реакції; при збільшенні концентрації продуктів реакції важливішою може ставати роль зворотної реакції; фермент (або кофермент) може піддаватися інактивації із-за нестабільності в умовах узятих для досвіду температури або рН; деякі з перерахованих причин можуть діяти одночасно. Унаслідок сказаного криві ходу ферментативних реакцій, як правило, не описуються звичайними рівняннями для гомогенних хімічних реакцій, і отримання рівняння, відповідного експериментальною кривою, може виявитися дуже важким завданням. Із цієї причини при вивченні ферментативних реакцій використовують інший підхід, а саме вимірювання початкової *швидкості* реакції. У цей початковий період згадані вище різні чинники ще не встигають проявити своєї дії, і умови протікання реакції піддаються точному визначенню. Тому при роботі з ферментами прийнято простежувати зміну початковій швидкості реакції під впливом зміни тільки одного із чинників, що визначають швидкість реакції, при збереженні решти всіх чинників постійними.

Для відшукування початкової швидкості досить визначити тільки першу ділянку кривої ходу реакції, і визначити тангенс кута нахилу в початковій точці. До тих пір, поки ступінь перетворення

субстрату не перевищить 20% від максимально можливою, графіки зазвичай є практично прямими лініями. Кількість субстрату, що прореагував за певний відрізок часу від початку реакції, тільки доти може розглядатися як показник швидкості реакції, поки не перейдена ця межа.

2.5.3 Типи методів, яки використовують для вчення ферментативних реакцій

Розрізняють два типи методів вивчення ферментативних реакцій: методи, пов'язані з відбором проб, і безперервні методи. У першому випадку не проводять спостережень над реакційною сумішшю, а через певні проміжки часу відбирають проби, і в результаті вимірювань отримують ряд окремих точок, по яких будують криві ходу реакцій. При роботі по безперервному методу спостереження проводять по ходу реакції над самою реакційною сумішшю; у цьому випадку шляхом проведення великого числа вимірювань або шляхом автоматичної реєстрації можуть бути отримані безперервні криві ходу реакції.

При роботі по методу відбору проб зазвичай проводять ряд хімічних визначень, вимірюючи концентрацію або субстрату, або продукту реакції. Якщо реакція проста, то обидві шляхи можуть бути використані для вимірювання ферментативної активності; проте при двох стадійній реакції в ході якої може накопичуватися проміжний продукт, результати, отримані в цих двох варіантах визначень, не обов'язково співпадатимуть. У разі двостадійної реакції тільки спад субстрату правильно характеризує швидкість першої стадії реакції.

В особливих випадках, наприклад, при гідролізі білків і полісахаридів, молекула яких містить багато зв'язків одного й того ж типу, що атакуються одним і тим же ферментом, глибину реакції прийнято оцінювати по числу гідролізованих зв'язків, і для визначення ступеня гідролізу користуватися такими методами, як формольне титрування або вимірювання відновної здатності.

При роботі по методу відбору проб зазвичай необхідно буває отримати принаймні три крапки в кожному випадку визначення швидкості: одну при нульовому відліку часу, другу після певного вибраного інтервалу часу й третю після приблизно подвійного такого інтервалу. Це дає можливість перевірити лінійність графіка протягом даного інтервалу часу. Кожну пробу необхідно негайно після узяття

змішувати з реагентом, що миттєво зупиняє ферментативну реакцію, з тим щоб проба точно відображала склад реакційної суміші в певний момент. Оскільки використовувані реагенти завжди високо токсичні по відношенню до ферментів, то необхідно дотримуватися великої обережності, щоб не перенести назад у реагуючу суміш сліди реагенту, наприклад, на кінчику піпетки.

Більшість методів, використовуваних для вивчення ферментативних реакцій, відносяться до безперервного типу, і саме цим методам зазвичай віддають перевагу. При роботі за допомогою цих методів необхідно, по суті, одне — отримати достатнє число відкликів для того, щоб можна було бути впевненим у тому, що відповідні крапки укладаються на пряму.

2.5.4 Загальні принципи роботи з ферментами

Ферменти — відносно нестійкі речовини; за несприятливих умов вони легко зазнають денатурацію й інактивування.

Успіх при роботі з ферментами залежить від дотримання умов, при яких ферменти залишаються стабільними. Ці умови для різних ферментів різні, але взагалі слід уникати високих температур, а також розчинів із вираженою кислотною або лужною реакцією. Рекомендується там, де це можливо, не піддавати ферменти дії температури, що перевищує температуру тіла. При очищенні багатьох ферментів підтримують температуру 0°. Використання для цієї мети бані з охолодженим спиртом переважно, чим робота в холодній кімнаті, не тільки тому, що при цьому створюються комфортабельніші умови для того, що працює, але також ще й тому, що судина з рідиною, занурена в подібну баню охолоджується дуже швидко, тоді як у холодній кімнаті, будучи оточений погано провідним тепло повітрям, він охолоджується відносно поволі. Для роботи при 0° замість судин із неіржавіючої сталі унаслідок їхньої високої теплопровідності замінюють скляними.

Більшість ферментів інактивується в розчинах із рН нижче 5 або вище 9. Тому важливо, щоб при доведенні рН розчину ферменту до певного значення шляхом додавання кислоти або луги навколо кожної краплі реагенту, що додається до розчину, не виникало зони деструкції. Реагент слід додавати поволі, даючи йому стікати по стінці судини й одночасно, енергійно перемішуючи розчин, бажано за допомогою механічної мішалки. Додавання реагенту слід проводити, якщо це можливо, при 0°.

Багато ферментів піддаються денатурації на поверхнях розділу. Тому важливо уникати утворення піни — переливати розчин ферменту з однієї судини в іншій слідую по стінці судини. З тієї ж причини не слід уживати мішалки, які утворюють піну на поверхні рідини. Лопаті мішалки повинні бути глибоко занурені, і потік рідини повинен бути відносно спокійним.

Органічні розчинники, наприклад, спирт, інактивують більшість ферментів при кімнатній температурі, якщо тільки вони не застосовуються в достатньо низьких концентраціях. Тому фракційне осадження ферментів спиртом або ацетоном необхідно проводити при можливо нижчій температурі, стежачи за тим, щоб

розчин не нагрівався в результаті виділення тепла при змішуванні розчинника з водою. Жодною з отриманих фракцій не можна давати нагріватися навіть на декілька градусів, поки розчинник не буде видалений, або поки в результаті розведення концентрація його не стане безпечною.

Відділення осадів шляхом центрифугування зазвичай вважають за краще фільтруванню, і центрифуга з охолодженням є дуже корисним предметом устаткування лабораторії. У деяких випадках, проте (наприклад, в умовах високих концентрацій сульфату амонію, коли відмінність у щільності між твердою й рідкою фазами дуже мала для того, щоб можна було ефективно розділити їх центрифугуванням), слід віддати перевагу фільтруванню за допомогою фільтруючих засобів, таких, як паперова пульпа та інші.

У багатьох випадках спостерігається повільне інактивування ферменту при стоянні навіть у найбільш сприятливих умовах. Тому доцільно проводити очищення ферменту по можливості швидко, закінчуючи виділення протягом 2—3 днів, якщо тільки фермент не є достатньо стійким.

Іноді виникають труднощі в зв'язку з необхідністю збереження ферментів у лабораторії без втрати активності. Якщо розчин ферменту можна піддати заморожуванню й відтаванню без втрати активності, то найзручніше зберігати його в стані глибокого охолодження; при цьому він зазвичай залишається стабільним протягом багатьох місяців. Деякі ферменти стабільні в концентрованих розчинах солей; їх можна тривалий час зберігати без втрати активності у формі обложених суспензій у насиченому сульфаті амонію з тим, щоб, коли це знадобиться, от центрифугувати й розчинити у воді.

Висушування розчинів ферментів при кімнатній температурі зазвичай викликає повну інактивацію, але висушування в умовах високого вакууму при низькій температурі із замороженого стану є цінним методом, у результаті застосування якого часто отримують активний розчинний препарат, який може зберігатися при кімнатній температурі.

Бактерійне забруднення розчинів ферментів у період проведення процедур фракціонування зазвичай не представляє небезпеки, але якщо розчин залишають стояти на тривалий час на

якій-небудь зі стадій очищення, то необхідно приймати відповідні запобіжні засоби.

2.5.5 Технічні зауваження при роботі з ферментами

Для отримання лінійної залежності між кількістю ферменту й швидкістю реакції умови в реакційній суміші винні, наскільки це можливо, підтримуватися постійними протягом усього періоду проведення спостережень.

1. Реакцію слід проводити у термостаті, і всі реагенти повинні бути доведені до необхідної температури, перш ніж у результаті їхнього змішення почнеться реакція.

Необхідно передбачити достатню буферну ємність розчинів для запобігання помітній зміні рН у тих випадках, коли в результаті реакції утворюється кислота.

2. Якщо це можливо, то бажано вибирати умови, при яких фермент достатньо стабільний: температура не повинна бути дуже високою, і величина рН повинна підтримуватися в межах зони стабільності ферменту.

3. Оскільки ферменти володіють високою каталітичною активністю, особливу увагу слід звертати на те, щоб у результаті недбалості не внести їх сліди до реакційної судини. Такі забруднення можуть потрапити в судину на кінчиках піпеток, або у вигляді пилу при роботі із сухими препаратами ферментів, або, нарешті, зі слідами слини в піпетках.

4. Швидкість реакції слід завжди заздалегідь відрегулювати шляхом зміни кількості взятого в досвід ферменту з таким розрахунком, щоб вимірювання могли бути проведені належним чином.

2.5.6 Алгоритм дослідження ферменту

Властивості білка: константи седиментації й дифузії; молекулярна вага; форма молекули (відношення осей); крива титрування; ізоелектрична точка; електрофоретична рухливість; ступінь гідратації; стабільність по відношенню до зміни рН, нагрівання, окислення й опроміювання; дисоціація на суб'єдиниці, спектр поглинання й т.д.

Структура: амінокислотний склад; число пептидних ланцюгів; послідовність чергування амінокислот; наявність

протетичної групи, спеціальної групи або атома металу; число простетичних груп у молекулі ферменту, їхня природа й характер приєднання; число SH-груп, їхній вплив на активність ферменту; дія хімічних реагентів.

Властивості ферменту: природа реакції, яку він каталізує; у випадку якщо в реакції бере участь кофермент — його природа й тип дії; специфічність по відношенню до субстрату; особливості хімічної структури субстрату, необхідні для пов'язання з ферментом, а також для здійснення реакції; стереохімічна специфічність; у разі оборотності реакції — специфічність до зворотної реакції; специфічність по відношенню до інгібіторів.

Характеристика активних центрів: число активних центрів у молекулі; їхня хімічна структура; вплив, що надається на субстрат при взаємодії з активним центром; механізм реакції; характер дії протетичної групи, якщо така є.

Термодинамічні властивості: оборотність і константа рівноваги ферментативної реакції; температурний коефіцієнт; теплові ефекти; вільні енергії й ентропії з'єднання ферменту із субстратом, активації фермент - субстратного комплексу, перетворення його на комплекс фермент-продукт і дисоціації цього комплексу на вільний фермент і продукт; зіставлення цих величин із відповідними величинами, що характеризують повну реакцію; спорідненість ферменту до субстрату; константа Міхаеліса; вплив рН на спорідненість ферменту до субстрату (для отримання відомостей про природу груп що зв'язують субстрат); спорідненість ферменту до інгібіторів, константи інгібіторів і вплив на них рН ; конкуренція інгібіторів з субстратом.

Кінетичні характеристики: питома активність; число оборотів; абсолютна активність із розрахунку на один активний центр; константи швидкостей з'єднання ферменту із субстратом, дисоціації субстрату й дисоціації продукту з фермент - субстратного комплексу й константи швидкості повної реакції; вплив активаторів; вплив різних іонів при різних рН.

Біологічні властивості: значення ферменту в реакціях обміну речовин; сполучення з дією інших ферментів у здійсненні біологічних реакцій; поширеність ферменту в різних видів живих істот і його розподіл у різних тканинах; внутріклітинна локалізація; утворення ферменту з попередників; адаптивна освіта; генетика

ферменту; вплив генних мутацій; вплив недоліку ферменту на організм; біологічний прояв специфічного отруєння ферменту; імунологічна поведінка; антиферменти.

2.5.7 Методи кількісного вивчення ферментативних реакцій

2.5.7.1 Методи спектрофотометрії

Багато субстратів і продукти ферментативних реакцій поглинають світло, або у видимій, або в ультрафіолетовій області спектру. Наявність у молекулі подвійного зв'язку або кільцевої структури зазвичай позначається на характері спектру поглинання. Оскільки маловірогідне, щоб субстрат і продукт даної ферментативної реакції володіли ідентичними спектрами поглинання, то часто виявляється можливим знайти таку довжину хвилі, при якій у результаті даного перетворення значно змінюється поглинання. Шляхом вимірювання величини цієї зміни можна кількісно вивчати перебіг даної ферментативної реакції. У тих випадках коли може бути застосований метод спектрофотометрії, його зазвичай віддають перевазі над будь-яким іншим унаслідок його простоти й чутливості. При цьому немає необхідності відбирати проби, не вимагається яких-небудь реагентів крім тих, які знаходяться в реакційній суміші, і увесь хід реакції може прослідкувати на одній невеликій пробі.

Часто, коли необхідні тільки порівняльні визначення, для вимірювання швидкості реакції використовуються самі величини змін оптичної щільності й одиниці ферменту виражаються у величинах зміни оптичної щільності за певний час. Коли ж необхідні дані, виражені в абсолютних одиницях, то заздалегідь вимірюють поглинання субстрату й продукту реакції при вибраній довжині хвилі, оскільки існування лінійної залежності між оптичною щільністю й концентрацією речовини дозволяє швидко виразити результати відкликів у формі кількості субстрату, що прореагував. При вивченні ферментативних реакцій за допомогою цього методу під час вимірювань необхідно, щоб кювета, що містить реакційну суміш, знаходилася в умовах постійної температури. Звичайні прилади не забезпечені відповідним пристосуванням, і потрібний спеціальний утримувач кювети з кожухом, по якому можна пропускати воду із приладу типу ультратермостата.

Є також велика група окислювальних ферментів, у яких другий реагент (акцептор водню) при відновленні субстратом змінює

свій спектр поглинання. Дійсно, коферменти НАД і НАДФ мають смуги поглинання при 340 мкм у відновленому, але не в окисненому стані, і це дає можливість використовувати метод спектрофотометрії при вивченні дії великого числа дегідрогеназ. Можна привести численні посилання на роботи подібного роду. Окислені форми флавопротеїдних ферментів поглинають при 450 мкм, тоді як їх відновлені форми поглинають при цій довжині хвилі в значно меншому ступені. Завдяки дуже чітким смугам поглинання відновлених форм цитохромів у видимій області метод спектрофотометрії є ідеальним для вивчення процесів їх окислення й відновлення. Нарешті, здійснюване за участю ферментів відновлення ферріціаниду або фарбників типу метиленового синього й індофенолового синього може точно прослідкувати методом спектрофотометрії. Таким чином, дія всіх окислювальних ферментів практично може бути легко вивчена за допомогою спектрофотометра. Навіть якщо перебіг ферментативної реакції, що вивчається, не супроводжується помітною зміною поглинання, то все ж таки метод спектрофотометрії може бути нерідко використаний після додавання до системи, що вивчається, іншого ферменту, дія якого на продукти реакції приводить до зміни поглинання. У багатьох випадках, наприклад, продукт ферментативної реакції сам служить субстратом для однієї з дегідрогеназ. У таких випадках додавання надлишку (очищеної) дегідрогенази разом із відповідним коферментом дозволяє простежити за ходом першої реакції по відновленню коферменту, що визначається по збільшенню поглинання при 340 мкм. Важливо відзначити, що необхідно додавати надлишок дегідрогенази (або ж зменшувати в достатній мірі кількість ферменту, що вивчається) з таким розрахунком, щоб швидкість усього процесу жодним чином не лімітувалася дегідрогеназною реакцією, і відновлення коферменту точно слідувало за первинною ферментативною реакцією.

Можна назвати й ще один варіант, а саме той, при якому продукт первинної реакції є одночасно продуктом окислення дегідрогеназної системи; у цьому випадку реакція часто може прослідкувати шляхом додавання дегідрогенази й відновленої форми коферменту, так що пониження поглинання характеризує окислення коферменту в «зворотній» дегідрогеназній реакції.

2.5.7.2 Метод Тунберга

У минулому значне число робіт із дегідрогеназами було проведене за допомогою методу Тунберга, у якому візуально визначають час, необхідний для відновлення (обезбарвлення) певної кількості метиленового синього або іншого подібного фарбника. Для запобігання подальшому окисленню фарбника атмосферним киснем досвід необхідно проводити в спеціальних пробірках, у яких можна створювати вакуум (трубки Тунберга). Оскільки кількість фарбника, що додається, надзвичайно мало, то концентрація субстрату в ході реакції залишається практично постійною. Зазвичай визначають тільки час відновлення фарбника, не простежуючи ходу реакції. У невеликому числі випадків, у яких зазначали криву ходу реакції в часі, було знайдено, що реакція протікала достатньо лінійно, таким чином, величина, зворотна часу відновлення фарбника, характеризує швидкість реакції. Застосовність методу, проте, не обмежується тією обставиною, що хід реакції сповільнюється, оскільки частіше цей метод використовується для визначення відносних, а не абсолютних швидкостей; величини ж часу, відновлення фарбника, будуть пропорційні швидкості навіть тоді, коли хід реакції не є лінійним.

Метод простий і не вимагає дорогої апаратури; при дотриманні необхідних обережностей його можна вважати досить точним. У разі дегідрогеназ, залежних від коферменту, необхідно, проте, додавати надлишок діафори для каталізу реакції між коферментом і фарбником, і це в деякій мірі обмежує можливості методу при роботі з такими ферментами.

Модифікацією методу є спостереження за обезбарвленням 2,6-дихлорфеноліндофенола за допомогою спектрофотометра. Відновлена форма цього фарбника реагує з O_2 значно повільніше, ніж відновлена форма метиленового синього, і тому досліди можна проводити в звичайній відкритій кюветі спектрофотометра; слідує, втім, відзначити, що для тієї ж мети виготовляються й спеціальні трубки Тунберга.

2.5.7.3 Електродні методи

Використання скляного електроду дає в руки дослідника інший метод вивчення таких реакцій, у результаті яких утворюється кислота. Найбільш простим прийомом є реєстрація змін рН у ході

реакції, проте проти цього способу є два заперечення. По-перше, зміна рН у ході реакції може, імовірно, викликати ускладнення, пов'язані зі зміною активності ферменту. По-друге, швидкість зміни рН повинна залежати не тільки від швидкості реакції, але також і від буферної місткості розчину. Останню обставину представляє вельми серйозне утруднення, оскільки білки володіють високою буферною місткістю. Неочищені ж препарати ферменту містять значну кількість неактивного білка, який віддаляється в ході очищення, внаслідок чого змінюється буферна місткість препаратів, що вивчаються. Значно кращим слід рахувати метод безперервного титрування. У цьому випадку шляхом частих додавань невеликих кількостей луж рН підтримується приблизно постійним; швидкість додавання лугу характеризує швидкість реакції й не залежить від кількості буфера. Кількість буфера впливає, проте, на точність методу; якщо взято дуже мало буфера, то важко підтримувати рН достатньо постійним, якщо ж його взято дуже багато, то метод стає нечутливим.

Дуже зручні автоматичні прилади, наявні в продажі, підтримують постійне значення рН шляхом безперервного додавання кислоти або лугу, і в той же час викреслюють криву, що показує кількість доданого реактиву в часі. За допомогою такого приладу можуть бути отримані без участі експериментатора криві ходу реакцій багатьох ферментів.

Електродні методи можуть бути також використані для вивчення окислювальних ферментів шляхом вимірювання окислювально-відновного потенціалу. Гладкий платиновий електрод у розчині, що містить суміш відновленої й окисленої форм фарбника або іншого водневого акцептора, набуває потенціалу, який залежить від відношення концентрацій цих форм. Тому відновлення фарбника можна прослідкувати по зміні потенціалу електроду. Зручніше зазвичай працювати не з фарбником, а з ферріціанідом, по-перше, тому що він безпосередньо реагує з коферментами, так що не вимагається додавання діафори, і, по-друге, тому що O_2 не заважає реакції й вона може бути.

2.5.7.4 Поляриметричні методи

Багато ферментів діють тільки на один з оптичних ізомерів своїх субстратів. Якщо, як це часто має місце, а продукт реакції

оптично неактивний, то хід реакції можна прослідкувати по зміні оптичного обертання. З аналогічним положенням ми стикаємося й у тому випадку, коли субстрат оптично неактивний, але в ході реакції утворюється оптично активний продукт або коли й субстрат і продукт оптично активні, але значно відрізняються по величині питомого обертання. Цей метод, хоча він і не є таким зручним, як деякі з попередніх, усе ж таки може бути використаний при вивченні ряду ферментів, по відношенню до яких інші методи непридатні, особливо при вивченні ферментів, що діють на вуглеводи. Класичним прикладом може служити сахароза. Важливо проводити досліди в поляриметричній трубці, що термостатована.

У деяких випадках субстрат характеризується величиною оптичного обертання, дуже малою для того, щоб її можна було безпосередньо зміряти, проте ця величина може бути значно збільшена в результаті утворення комплексного з'єднання. Саме так іде справа з оксикислотами, наприклад, з яблучною кислотою, яка утворює комплекси з молібдатом, що характеризуються високими значеннями питомого обертання. Уперше таким шляхом вивчали фумаразу, але оскільки реакція, що вона каталізує, не протікає в присутності молібденового реагенту, то необхідно було проводити відбір проб по ходу реакції, а тому в даний час цей метод поступився місцем швидшим спектrophотометричним методам.

2.5.7.5 Хроматографічні методи

У ряді випадків, коли застосування інших методів виявляється безуспішним, можна виявити утворення продукту реакції за методом хроматографії. Цей метод пов'язаний із відбором проб; проби відбирають із реакційної суміші через певні проміжки часу, поміщають на хроматографічний папір, висушують і хроматографують звичайним шляхом. Поступова поява на хроматограмі нової плями дає якісне уявлення про хід ферментативної реакції. Якщо бажано отримати кількісні дані, то необхідно вирізувати відповідні ділянки хроматограми, екстрагувати з них речовину й визначити її за допомогою хімічного методу, або спектrophотометрії.

Недоліком методу слід уважати те, що вся процедура в цілому віднімає дуже багато часу; особливо багато часу – декілька годин — потрібних для хроматографування. Виділення ферменту

при використанні такого методу для контролю за ходом очищення було б дуже повільною й трудомісткою процедурою. Із цієї причини хроматографічні методи не знайшли широкого застосування при роботі з ферментами, за винятком тих випадків, де інші методи непридатні.

2.6 Кінетика ферментативних реакцій

Кінетика – це розділ ензимології, що вивчає вплив різних факторів на швидкість ферментативних реакцій.

Швидкість усіх ферментативних реакцій залежить (за інших постійних умов) від концентрації ферменту і його субстрату. Тоді як при збільшенні концентрації ферменту швидкість реакції збільшується лінійно, у міру зростання субстрату (при постійній концентрації ферменту) вона збільшується гіперболічно, досягаючи граничної максимальної швидкості (Додаток, рис.2.4, 2.5). Це вказує на те, що фермент повинен мати кінцеве число активних центрів, що взаємодіють із субстратом. Після заповнення всіх активних центрів подальшого збільшення швидкості не відбувається, фермент виявляється насиченим субстратом. Міхаеліс і Ментен в 1913 році одними з перших проаналізували кінетику ферментативного процесу й вивели загальне рівняння швидкості реакції. Це рівняння відоме як рівняння Міхаеліса-Ментен.

2.6.1 Рівняння Міхаеліса-Ментен

Міхаеліс і Ментен припустили, що механізм ферментативних реакцій описується моделлю:



(2.1),

в якій швидкість реакції визначається розпадом фермент - субстратного комплексу

$$v_0 = k_2(ES) \quad (2.2)$$

Модель припускає, що рівновага між вільними ферментом, субстратом і фермент - субстратним комплексом устанавлюється швидко в порівнянні зі швидкістю реакції (рівновага, що швидко встановлюється, $k_2 \ll k_1, k_{-1}$). У цьому випадку друга стадія реакції практично не впливає на першу, і для виразу концентрації ферменту можна скористатися константою дисоціації.

$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]} \Rightarrow [E] = \frac{K_s[ES]}{[S]} \quad (2.3)$$

Загальна концентрація ферменту в реакційній суміші виражається рівнянням матеріального балансу

$$[E]_0 = [E] + [ES] = [ES] \left(\frac{K_s}{[S]} + 1 \right) \quad (2.4)$$

Тоді концентрація фермент - субстратного комплексу рівна:

$$[ES] = \frac{[E]_0[S]}{K_s + [S]} \quad (2.5)$$

Це рівняння відповідає ізотермі адсорбції Ленгмюра, показуючи, що фермент діє як гетерогенний каталізатор. Реакція досягає максимальної швидкості, коли вся кількість ферменту знаходиться в комплексі із субстратом:

$$V_{\max} = k_2[ES]_{\max} = k_2[E]_0 \quad (2.6)$$

Ця умова виконується, якщо реакція протікає при надмірній концентрації субстрату: $[S]_0 \gg [E]_0$. З рівнянь (2.2), (2.5) і (2.6) отримаємо

$$v_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_s + [S]} \quad (2.7)$$

Це є класичне рівняння Міхаеліса-Ментен, яким і сьогодні користуються для опису кінетики ферментативних процесів.

2.6.2 Обмеження кінетики Міхаеліса-Ментен

Міхаеліс і Ментен вивели рівняння з урахуванням двох припущень (рівновага, що швидко встановлюється, і надлишок субстрату). Пізніше було показано, що рівняння справедливе, тобто добре описує реакцію, при виконанні всіх наступних умов.

7 основних постулатів для виконання рівняння Міхаеліса-Ментен.

1. У ході реакції утворюється кінетично стійкий Фермент-субстратний комплекс.

2. Визначувана за допомогою рівняння константа K_s є константою дисоціації фермент - субстратного комплексу: це справедливо, тільки якщо $k_2 \ll k_1, k_{-1}$.

3. Концентрація субстрату не міняється в ході реакції тобто

$$[S] = [S]_0.$$

4. Продукт реакції швидко відщеплюється від ферменту, тобто реакція двохстадійна.

5. Друга стадія реакції необоротна. Оскільки це практично не здійснимо, ми беремо до уваги тільки початкові швидкості.

6. С кожним активним центром ферменту зв'язується тільки одна молекула субстрату.

7. Для всіх реагуючих речовин замість активностей можна використовувати їхні концентрації.

2.6.3 Основні кінетичні константи ферментів та методи їхнього визначення

K_m – це концентрація субстрату (у молях на літр), при якій швидкість реакції дорівнює $\frac{1}{2}$ максимальної V_{max} (Додаток, рис. 2.6).

За певних умов, K_m може бути мірою спорідненості між E і S: якщо K_m мала, то в субстрату висока афінність до ферменту, при високому значенні K_m у субстрату низька афінність до ферменту. K_m - постійна для даного ферменту.

Біологічний сенс K_m : при конкуренції за субстрат на перетині метаболічних шляхів переваги в того метаболічного шляху, вхідний фермент якого має меншу K_m . Також значення має K_m для ізоферментів (ферментів, які каталізують один тип реакції, але їхній синтез здійснюється різними генами).

V_{max} – швидкість реакції в умовах насиченості ферменту субстратом.

Якщо фермент працює за простою схемою

$E+S \rightleftharpoons ES \rightarrow E+P$, то неважко визначити його константу Міхаеліса K_m і максимальну швидкість V_{max} шляхом вимірювання швидкості реакції при різних концентраціях субстрату. Зручно перетворити рівняння Міхаеліса-Ментен у таку форму, щоб графічно воно виражалось прямою. Для цього рівняння Міхаеліса-Ментен представляють у вигляді зворотних величин:

(2.8) - рівняння Лайнуївера-Берка.

Відкладаючи $1/V$ проти $1/[S]$, отримуємо пряму, перетин якої

з віссю ординат дає $1/V_{\max}$, перетин із продовженням осі абсцис - $1/K_m$; кут нахилу $=K_m/V_{\max}$ (Додаток, рис.2.7)

2.6.4 Двохсубстратні ферментативні реакції

Більшість ферментів каталізують реакції, в яких бере участь не один, а більше число субстратів, наприклад $A + B = C + D$. У ході цих реакцій також відбувається утворення фермент - субстратних комплексів, подібно до того як це має місце в односубстратних реакціях, і при дослідженні кінетики двухсубстратних реакцій можуть бути визначені K_m для кожного із субстратів і V_{\max} для реакцій, які вони каталізують. Константи K_m для кожного із субстратів визначають графічно. Визначають початкову швидкість реакції в умовах насичуючої концентрації одного субстрату й зміни концентрації іншого.

Відомо два механізми двухсубстратних реакцій: механізм подвійного заміщення й послідовний механізм.

Якщо реакція $A + B = C + D$ здійснюється по механізму подвійного заміщення, то спочатку субстрат А приєднується до ферменту, утворюючи комплекс ЕА, потім звільняється перший продукт С; при цьому утворюється стабільний інтермедіат F що відрізняється від Е. Далі інтермедіат F взаємодіє із другим субстратом В, утворюючи Фермент-субстратний комплекс FB, з якого утворюється другий продукт D і звільняється фермент Е. Цей механізм називають також «пінг-понг»-механізмом. По такому механізму здійснюється, наприклад, переамінірування, що каталізує глутамат-аспартат амінотрансфераза (Додаток, рис.2.8)

Послідовні механізми представлені двома видами - упорядкованим і нерегульованим. У протилежність пінг-понг-механізму при послідовному механізмі обидва субстратів повинні з'єднатися з ферментом і утворити потрійний комплекс. Субстрат А зв'язується з ферментом Е, утворюючи комплекс ЕА, який у свою чергу зв'язує субстрат В. Потрійний комплекс ЕАВ перетворюється на потрійний комплекс ЕCD, з якого послідовно звільняються продукти (Додаток, рис. 2.9). По впорядкованому механізму функціонують, наприклад, фосфофруктокіназа й гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа. В інших випадках на ферменті Е є незалежні ділянки скріплення для А і В, і швидкість реакції не залежить від того, який субстрат А або В зв'язується з

ферментом першим. У таких випадках говорять, що механізм є нерегульованим. Нерегульованим є механізм, при якому при розпаді потрійного комплексу ECD жоден із продуктів не має перед іншим «переваги» звільнитися першим (Додаток, рис.2.10).

Відомі складніші кінетичні механізми для реакцій із трьома й навіть чотирма субстратами. Такі реакції можуть здійснюватися або по послідовному механізму, або по пінг-понг-механізму, або по змішаному механізму.

2.6.5 Інгібітори ферментів

2.6.5.1 Кінетична класифікація інгібіторів. Необоротне й оборотне інгібування

Речовини, що змінюють каталітичну активність ферменту, називаються модуляторами або ефекторами. Ефектори можуть бути звичайними компонентами клітини, але можуть і проникати в клітину із середовища, або діяти на ізольовані ферменти. Взаємодія ферменту з ефектором є хімічною реакцією й тому може бути повністю оборотною, частково оборотною або практично необоротною. До відомих необоротних інгібіторів належать отрути: ціанідний іон, який інактивує ксантинооксидазу, нервовопаралітичні отрути, що інактивують холінестеразу (фермент, що бере участь у передачі нервового імпульсу). Якщо процес інгібування необоротний, то кінетична реакція не підкоряється механізму Міхаеліса-Ментен, основою якого є наявність рівноваги між вільною й зв'язаною формами ферменту.

У разі оборотних інгібіторів для опису кінетики ферментативної реакції можна скористатися рівнянням Міхаеліса-Ментен. По впливу інгібіторів на параметри рівняння Міхаеліса-Ментен (V_{max} і K_m) їх класифікують: конкурентні - інгібітори, у присутності яких підвищується K_m , а V_{max} не міняється. Ефект, що викликається такими інгібіторами, можна частково або повністю подавити шляхом підвищення концентрації субстрату. Неконкурентні - інгібітори, інактивують фермент або Фермент-субстратний комплекс шляхом зменшення V_{max} , але що не впливають на K_m . У цьому випадку підвищення концентрації субстрату до скільки завгодно високого рівня вже не дозволить підвищити швидкість реакції до величини, характерної для не інгібованого ферменту. До неконкурентних інгібіторів відносяться іони важких металів, що оборотне реагують з -SH групами цистеїну. Відомо декілька поєднань і варіантів цих двох основних типів оборотного інгібування.

Багато з відомих конкурентних інгібіторів по своїй хімічній природі близькі звичайним субстратом. Такі інгібітори називаються аналогами субстратів. Уважають, що подібні інгібітори мають просторову структуру типу ключа, який може входити в "замкову

щілину" активного центру ферменту, проте "ключ" не цілком підходить до даного "замку" і реакція не йде.

Конкурентне інгібування лежить в основі дії лікарського препарату сульфаніламід (стрептоциду). Його структура дуже близька структурі п-амінобензойної кислоти - важливого вітаміну багатьох бактерій. Сульфаніламід інгібує фермент, що бере участь у перетворенні п-амінобензойної кислоти на фолієву кислоту – (кофермент біосинтезу нуклеотидів) тим самим блокуючи зростання бактерій. Неконкурентні інгібітори зв'язуються зі спеціальним регуляторним центром ферменту.

Окрім звичайних чинників (розчинник, температура, рН), на швидкість ферментативних процесів впливає присутність деяких специфічних для даного ферменту з'єднань, які прийнято називати або інгібіторами (якщо вони вповільнюють перебіг реакції), або активаторами (якщо вони прискорюють процес). Ефектори ферментативних реакцій підрозділяють на «оборотні» (зв'язуються з ферментом нековалентно) і «необоротні» (утворюють із ферментом ковалентні зв'язки). У свою чергу оборотні ефектори ділять на конкурентні й неконкурентні.

Необоротні (як правило, неприродного походження):
п-хлормеркурібензоат (зв'язує угруповання -SH),
диізопропілфторфосфат (інгібітор протеїназ і естераз).

Оборотні інгібітори - клітинні метаболіти й діють як

- а) конкурентні інгібітори;
- б) неконкурентні інгібітори
- в) безконкурентні інгібітори

2.6.5.2 Типи інгібування конкурентний, неконкурентний, змішаний

Конкурентне інгібування

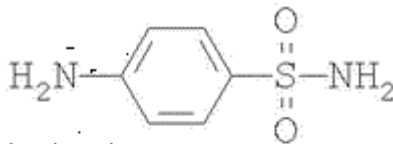
Основною особливістю конкурентного інгібування є те, що інгібітор, як і субстрат, зв'язується в активному центрі ферменту. Як правило конкурентні інгібітори є аналоги субстрату, що зберігають усе (або більшість) функціональних груп, необхідних для пов'язання з ферментом, але не здатні зазнавати ферментативне перетворення. Таким чином, фермент може утворювати або Фермент-субстратний комплекс, який потім перетворюється на продукт, або фермент -

інгібіторний комплекс. Пов'язання інгібітору з ферментом і субстратом одночасно неможливе (Додаток, рис.2.11).

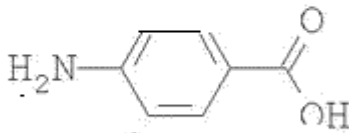
Характерною особливістю конкурентного інгібірування є те, що при постійній концентрації інгібітору збільшення концентрації субстрату підвищує активність ферменту, і при будь-якій концентрації інгібітору завжди знайдеться концентрація субстрату, повністю оновлюючого активність ферменту (інгібітор повністю витісняється з активних центрів ферменту).

У протилежність конкурентному інгібіруванню, неконкурентні інгібітори не впливають на константу Міхаеліса, але зменшують максимальну швидкість ферментативного процесу

$K_i = [E][I] / [Ei]$, чим менше K_i , тим сильніше інгібітор. Так, малінова, шавлевооцтова й глутарова кислоти інгібірують фермент сукцинат дегідрогеназу, субстратом якої є янтарна кислота, оскільки вони схожі по будові із субстратом.



сульфаніламід

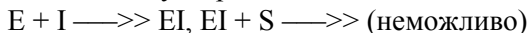


параамінобензойна кислота

Сульфаніламідні антибактеріальні препарати мають схожу будову з параамінобензойною кислотою і є конкурентними інгібіторами в синтезі бактеріями фолієвої кислоти (чинника зростання бактерій). У людини немає такого метаболічного шляху й у лікувальних дозах вони не впливають на життєдіяльність людини, надаючи загальний бактеріостатичний ефект (порушуючи в деякій мірі діяльність кишкової мікрофлори).

Неконкурентне інгібування

Виявляється при зв'язуванні інгібітору з ферментом поза активним центром, але при цьому міняється структура активного центру й зв'язок із субстратом стає неможливим (Додаток, рис.2.12).



Безконкурентне інгібування - результат приєднання інгібітору тільки після утворення ензим - субстратного комплексу: $E + S = ES; ES + I = ESI$ (Додаток, рис.2.12)

2.6.5.3 Визначення типу інгібування

Конкурентний інгібітор збільшує K_m і не змінює V_{max} .

2) Неконкурентний інгібітор не змінює K_m і знижує V_{max} .

3) Безконкурентний (змішаний) інгібітор однаковою мірою знижує K_m і V_{max} (Додаток.рис.2.12).

2.6.5.4 Окремі випадки інгібування субстратом і продуктом реакції

Деякі продукти ферментативних реакцій також виступають у ролі інгібіторів. Так, глюкоза інгібує фермент Г-6-фосфатазу: Глюкозо-6-фосфат + $H_2O \longrightarrow$ Глюкоза + H_3PO_4

Інгібування надлишком субстрату спостерігається в ряді випадків у результаті блокування активного центру за схемою

Ферменти протеїнкінази мають чверткову структуру, містять дві суб'єдиниці - каталітичну й регуляторну. Активатор впливає на регуляторну, а в результаті звільняється каталітична суб'єдиниця.

2.6.6 Алостеричні ферменти

Велике сімейство ферментів, кінетика яких не підкоряється рівнянню Міхаеліса-Ментен – алостеричні ферменти. У клітинах вони завжди локалізовані на перехрестях метаболічних шляхів.

2.6.6.1 Структура алостеричних ферментів

Алостеричні або регулюючі ферменти складаються з декількох суб'єдиниць (чверткова структура), які пов'язані одна з одною слабкими взаємодіями - водневі й гідрофобні зв'язки й мають декілька активних центрів. Алостеричні ферменти існують в активних і неактивних формах, що відрізняються по тривимірній

структурі. Алостеричні ферменти часто мають декілька інгібіторів або активаторів, які залучені в перемикання між їхніми активними й неактивними формами

2.6.6.2. Сигмоїдальна кінетика

Графік залежності швидкості ферментативної реакції від концентрації субстрату має вигляд, який називають сигмоїдальна або S – образна залежність (Додаток, рис.2.14)

Ключовий елемент цієї кривої - "носок" який добре видний при низьких концентраціях субстрату. У цій крапці незначне збільшення концентрації субстрату приводить до відповідно невеликому збільшенню швидкості – невеликий нахил кривої. Подальше незначне підвищення концентрації субстрату визначає непропорційно швидкий, драматично швидкий підйом швидкості й крутизна графіка різко збільшується. В умовах насичення ферменту субстратом графік наближається до гіперболи: крива виходить на плато, досягається максимальна швидкість реакції.

Цей тип графіка свідчить про позитивну кооперативність субстрату. При дуже низьких концентраціях субстрату тільки деякі активні центри ферменту пов'язані із субстратом, у інших активних центрів спорідненість до субстрату низька. Саме тому ми спостерігаємо незначне збільшення швидкості в області носка кривої. Але в міру пов'язання субстрату з ферментом усе більша кількість його залучається до реакції. І це залучення стрімко наростає – крива на графіці різко йде вгору. При насичуючих концентраціях субстрату крива приймає вид гіперболи, лінія вирівнюється. Швидкість реакції наближається до максимальної.

2.6.6.3 Наявність ефекторів

Активатори й інгібітори алостеричних ферментів називають алостеричні ефектори. Існування алостеричних ефекторів - найважливіша властивість алостеричних ферментів. По дії на кінетику алостеричних ферментів, які характеризуються позитивною кооперативністю із субстратом, розрізняють позитивні й негативні ефектори.

Присутність позитивного ефектору в різній концентрації збільшує швидкість реакції при даній концентрації субстрату, тоді як інгібітор у різній концентрації зменшує швидкість реакції при тій же

концентрації субстрату. Якщо порівняти криві з інгібітором і активатором із кривій без ефектору, то ми побачимо, що інгібітор підсилив сигмовідний характер кривої, подовжив «носок», а активатор укоротив його. При вищій концентрації позитивного ефектору «носок» зовсім зникає, і крива набуває вигляду гіперболи.

К-системи й V-системи ефекторів

Ті ефектори, які змінюють K_m алостеричних ферментів, називають К-системами, а ті які змінюють V_{max} називають V-системами.

2.6. 6.4 Двофазний ефект конкурентних інгібіторів

Разом із дією алостеричних інгібіторів, Алостеричні ферменти можуть піддаватися нормальному конкурентному гальмуванню. Класичні конкурентні інгібітори характеризуються структурною схожістю із субстратом ферменту. В алостеричного ферменту, для якого характерна позитивна кооперативність із субстратом, конкурентний інгібітор може займати активний центр, і надавати ефект позитивної кооперативності, властивий субстрату. За цих умов, низька концентрація конкурентного інгібітору збільшує здібність ферменту до скріплення молекул субстрату й реально збільшує швидкість ферментативної реакції. При вищій концентрації конкурентний інгібітор блокує доступ субстрату до активного центру й гальмує реакцію. Таким чином, ефект конкурентних інгібіторів на Алостеричні ферменти двофазний. У низькій концентрації вони активують фермент, діють як субстрати, у високій концентрації – інгібірують активність по механізму звичайних конкурентних інгібіторів.

2.6.6.5 Особливість дії денатуруючих агентів

Денатурація - це втрата ферментом тривимірної структури. Збереження тривимірної структури неодмінна умова прояву ферментативної активності. Денатурація може бути викликана дією безлічі чинників: температура, зміна параметрів рН, хімічні реагенти що денатурують. При м'якій дії денатуруючих агентів Алостеричні ферменти можуть втрачати Алостеричні властивості – кооперативність до субстрату, але залишати здібність до каталізу. Цей факт показує, що тривимірна структура

- а) надзвичайно важлива в механізмі алостерії ;
- б) тривимірна структура алостеричного ферменту – це щось більше ніж просто умова збереження структури активного центру, необхідного для каталізу.

2.6.6.6 Кооперативність

Чверткова структура важлива для реалізації механізму алостерії. Алостеричний фермент міститиме як мінімум стільки активних центрів, скільки в нього суб'єдинець . Прояв кооперативності по відношенню до субстрату – це, перш за все віддзеркалення взаємодії між активними центрами. Так, у типовому алостеричному ферменті, скріплення молекули субстрату в одному активному центрі змінює конформацію інших активних центром таким чином, що вони ефективніше зв'язують субстрат, ніж той, який зв'язав перші молекули субстрату. Це і є прояв позитивної кооперації субстратом.

Суб'єдиниці ферментів можуть легко, як з'єднуватися один з одним, так і дисоціювати та існувати самостійно. Таким чином, алостеричний фермент може існувати в рівновазі між повним ензимом, індивідуальними суб'єдинцями й декількома об'єднаними суб'єдинцями , число яких менше ніж у повному ферменті. Окрема суб'єдиниця каталітично неактивна. Мінімальну структуру, що володіє каталітичною активністю, називають промотор. Дуже часто наявність лігандів (субстрат, продукти або ефектори) змінює положення рівноваги в системі: повний фермент - суб'єдиниці - асоціації суб'єдинець.

2.6.6.7 Переваги алостеричних ферментів з позитивною кооперативністю в регуляції метаболічних шляхів в клітині.

Ефект кооперації неодмінно присутній у ферментів, які розташовані на перетині метаболічних шляхів. Це пояснюється тими перевагами, які забезпечує їх позитивна кооперативність із субстратом у регуляції метаболізму. Алостеричні ферменти чутливіші до змін концентрації субстрату, позитивна кооперативність забезпечує досягнення максимальної швидкості при низьких концентраціях субстрату В умовах функціонування клітини Алостеричні ферменти забезпечують підтримку нормального метаболізму в умовах різкої зміни рівня субстрату, наприклад,

ГЛЮКОЗИ.

2.6.7 Вплив рН на активність ферментів

Переважає більшість ферментативних реакцій є оборотними. Понад те, залежно від умов і субстрату вони протікають, або в одному напрямі, або в зворотному. Оскільки групи, що виконують функцію кислотного каталізу в одному напрямі протікання реакції повинні виконувати функцію основного каталізу при зміні напрямку реакції. Очевидно, що нормальне функціонування ферменту можливе лише в області рН, у якій у помітних концентраціях присутні обидві іонні форми груп, що каталізують, і кислотна, і основна. А це фізично зумовлює наявність оптимуму рН (тобто дзвінкообразну залежність активності ферменту від рН, додаток, рис.2.15).

2.7 Механізм прискорення реакцій ферментами

2.7.1 Енергію активації. Перехідний стан

Ферменти, як усі каталізатори, знижують енергію активації хімічної реакції.

Речовини вступають у реакцію тільки в тому випадку, коли їхньої молекули активовані, тобто коли в середовищі є певна частка молекул, що володіють необхідною енергією активації. Активовані молекули виявляються в перехідному стані. Енергію, необхідну для досягнення перехідного стану, називають *енергією активації*, а вершину енергетичного бар'єра – *перехідним станом*. Величина енергії активації - це енергетичний бар'єр реакції. Для будь-якої реакції, що здійснюється реально, сумарна енергія вихідних речовин повинна бути більше ніж для продуктів. У ході реакції витрачена енергія активації знову звільняється, так що сумарна зміна енергії в результаті реакції дорівнює різниці рівнів енергії субстрату й продукту.

2.7.2 Принципи каталізу

Реакції, які не каталізують ферменти, навіть коли термодинамічне сприятливі, часто є надзвичайно повільними. Вони повільні тому, що для досягнення перехідного стану необхідна висока енергія активації

(ΔG).

Енергія активації висока, тому що формування перехідного стану несприятливо через виникаючі непостійні позитивні й негативні заряди в реагуючих речовин. •Стабілізація цих зарядів знижує енергію активації й прискорює швидкість реакції в кишені активного центра.

2.7.3 Типи ензиматичного каталізу

Кисотно-основний

Електростатичний каталіз

Каталіз іонами металів (електрофільний каталіз)

Ковалентний каталіз

2.7.3.1 Кисотно-основний каталіз

Кислоти - донори протонів

Основи - акцептори протонів

Кисотно-основний каталіз - це коли протон або гідроксил іон є каталізаторам (органічні)

Радикали наступних амінокислот діють як кисотно-основні каталізатори: Asp, Glu, His, Lys, Cys, Tyr

Каталітична ефективність R-груп цих амінокислот залежить від рК відповідної функціональної групи й від рН, при якому протікає ферментативна реакція. Цей тип каталізу чутливий до зміни рН.

Вивчення впливу рН на швидкість ферментативної реакції дозволяє ідентифікувати цей тип каталізу.

2.7.3.2 Електростатичний каталіз

Коли заряджений перехідний стан не може бути стабілізовано кислотне - основним каталізатором (наприклад, відсутня іонізація), заряд може бути нейтралізований протилежно зарядженою групою каталізатора (активний центр ферменту). В електростатичному каталізі беруть участь радикали наступних амінокислот: Asp, Glu, His, Lys, Arg

В активному центрі ферменту кілька електростатичних взаємодій (також відомих як іонні пари або сольові містки), може залучити субстрат у кишеню активного центра, стабілізувати перехідний стан і, таким чином, знизити енергетичний бар'єр.

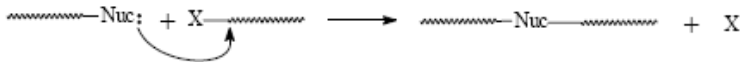
2.7.3.3 Каталіз іонами металів (електрофільний) каталіз

Специфічний тип електростатичного каталізу. Позитивно заряджений металевий іон або

- стабілізує негативні заряди й збільшує каталіз,
- взаємодіє з негативно зарядженими групами в радикалах амінокислот ферменту й стабілізує як конформацію ферменту, так і активного центру;
- кофактор (кінази), MgATP (дозволяє АТР зв'язувати як нейтральну молекулу).

2.7.3.4 Ковалентний каталіз (нуклеофільний каталіз)

Формування ковалентного зв'язку між ферментом і його субстратом у перехідному стані, яке ініціюється багатонаелектронною групою активного центра. Ферментативні реакції, що реалізують ковалентний каталіз мають два енергетичних бар'єри. Ковалентний каталіз часто називають нуклеофільним каталізом. Нуклеофіли мають нерозділені електронні пари й тому можуть реагувати в відповідних реакціях заміщення



Ефективність цих реакцій так само залежить від рН

Таблиця 2.2 – Нуклеофільні групи в ферментах

Нуклеофільна група	Амінокислота	Інтермедіат, що утворюється
ОН	серин	Ацил або фосфорил ензим
SH	цистеїн	Ацил або фосфорил ензим
COO-	Аспарагінова кислота	Ацил ензим
NH ₂	лізин	Шифова основа
імідазол	гистидин	Ацил ензим
ВН	тирозин	Фосфорил ензим

2.8 Принципи регуляції ферментативних процесів

Однією з дивовижних властивостей живих організмів є збереження постійного балансу між необхідними для підтримки життєдіяльності різними катаболічними процесами й величезною кількістю біосинтетичних процесів. Біодеградативні процеси забезпечують клітину високо енергетичними з'єднаннями (АТФ), необхідними для виконання такої роботи, як іонна регуляція, скоротність і процеси біосинтезу. Клітинний гомеостаз досягається завдяки функціонуванню ефективної й складної системи регуляції, що приводить кожен окремий метаболічний процес у строгу відповідність із потребами організму в цілому.

Оскільки практично всі клітинні реакції каталізують ферментами, координація метаболізму в істотній мірі зводиться до регуляції інтенсивності протікання ферментативних реакцій, утворюючих метаболічні шляхи. Ефективність біологічного каталізу в клітині може регулюватися двома шляхами: по-перше, шляхом зміни кількості каталізатора й, по-друге, шляхом регулювання активності ферменту.

2.8.1 Регуляція кількості молекул ферментів: контроль синтезу та катаболізму ферментів. Біосинтез ферментів і його регуляція на генетичному рівні. Репресія й індукція. Конститутивні та індукцибельні (адаптивні) ферменти

Кількість ферменту в клітині визначається співвідношенням швидкостей його синтезу й розпаду. Швидкість синтезу даного ферменту може сильно мінятися залежно від умов. Існують ферменти, які завжди присутні в клітині в більш менш постійних кількостях: їх називають конститутивні ферменти. На відміну від них так звані адаптивні (або індукцибельні) ферменти синтезуються тільки у відповідь на появу в середовищі відповідного субстрату. Гени, контролюючі синтез адаптивних ферментів, зазвичай знаходяться в стані репресії і вводяться в дію тільки у присутності індуктора.

Механізми регуляції ферментативної активності на рівні синтезу ферментів є достатньо повільними; для їхньої реалізації потрібні, щонайменше, години.

2.8.2 Регуляція активності ферментів без зміни кількості молекул

Існують відносно швидкі регуляторні механізми, які направлені безпосередньо на ферменти.

Ці регуляторні механізми можна класифікувати так:

- 1) Алостеричний
- 2) Дисоціативний
- 3) Адсорбційний
- 4) Регуляція ковалентним зв'язуванням
- 5) Регуляція обмеженим протеолізом

2.8.2.1 Алостерична регуляція

Для багатьох ферментів, що каталізують ключові стадії метаболічних шляхів, виявлена чутливість до метаболітів, що відрізняється по хімічній структурі від субстратів відповідних ферментативних реакцій. Яскравим прикладом може служити інгібування першого ферменту біосинтетичних шляхів кінцевим продуктом ланцюга. Такий механізм регуляції називається регуляцією по механізму зворотного зв'язку (термін запозичений із радіоінженерії). Пізніше було показано, що такого роду здібність до регуляції широко поширена в живих організмах, і величезне число ферментів регулюється великою кількістю низькомолекулярних метаболітів. Наприклад, вільні жирні кислоти, синтезовані в організмі, можуть регулювати по механізму зворотного зв'язку різні стадії глюконеогенезу, гліколізу, циклу Кребса, пентозофосфатного шунта, тобто всіх метаболічних шляхів, так або інакше включених у процес біосинтезу жирних кислот. Це означає, що не тільки кінцевий продукт метаболічного шляху може бути регулятором і не завжди регулюється саме перший фермент. Більш того, механізм регуляції може полягати не тільки в інгібуванні, але також і в активації.

Активність ферментів, що каталізують перші стадії в строго біодеградативних шляхах, може контролюватися з'єднаннями, індикаторами енергетичного стану клітини, такими як неорганічний фосфат, пірофосфат, аденінові або інші пуринові нуклеотидами.

Унікальним типом регуляції, властивим тільки амфіболічним шляхам, є активація попередником: перший метаболіт у послідовності реакцій активує фермент, що каталізує останню стадію. Цей тип регуляції виконується, наприклад, для

глікогенсинтетази ссавців, яка сильно активується глюкозо-6-фосфатом - попередником глікогену. Моно, Шанже й Жакоб, бажаючи підкреслити відмінності в хімічній структурі між субстратом ферментативної реакції й метаболітами, що надають регулюючу дію на фермент, запропонували називати подібні метаболіти-регулятори алостеричними ефекторами (термін "алостеричний" утворений від грецьких слів аλος - інший і стерео - просторовий). Алостеричні ефектори зв'язуються на особливих центрах білкової молекули ("алостеричних центрах"), просторово віддалених від активних центрів, а взаємодії між просторово роз'єднаними активними й алостеричними центрами опосередковуються конформаційними змінами білкової молекули. Розглянутий механізм регуляції активності ферменту називається алостеричним.

2.8.2.2 Дисоціативна регуляція

Багато ферментів клітинного метаболізму володіють олігомерною структурою, тобто побудовані з окремих суб'єдиниць. Зв'язки між суб'єдиницями мають найчастіше нековалентний характер, і це визначає можливість дисоціації ферментного олігомера на окремі суб'єдиниці, які, як правило, відрізняються за своїми каталітичними властивостями від ферментного олігомера. Положення рівноваги між олігомерними формами ферменту контролюється присутністю субстратів, коферментів і алостеричних ефекторів. Така дія метаболітів на міцність зв'язків між суб'єдиницями у ферментному олігомеру.

2.8.2.3 Адсорбційна регуляція

Клітинні метаболіти роблять вплив на здатність ферменту взаємодіяти із субклітинними структурами. Ферменти, адсорбовані структурними білками м'язів і мембранами клітинних органел мають інше мікрооточення, ніж ферменти в розчині, і характеризуються зміненими каталітичними характеристиками. Контрольована метаболітами адсорбція ферментів на субклітинних структурах (адсорбційний механізм регуляції) розширює регуляторні можливості клітини.

Алостеричний, Дисоціативний і адсорбційний механізми регуляції ферментативної активності є спорідненими в тому

відношенні, що в кожному з них вплив метаболіту-регулятора на каталітичні властивості ферменту здійснюється не шляхом прямої дії на активний центр ферменту, а непрямим шляхом (через зміну конформаційного, олігомерного або адсорбційного стану ферменту).

Алостеричні, дисоціативні й адсорбційні ферментні системи виявляють кінетичні аномалії (S-образні залежності швидкості ферментативної реакції від концентрації субстрату або алостеричного ефектора, лаг-періоди або сплески на кінетичних кривих накопичення продукту ферментативної реакції й т. д.), важливі з погляду виконання цими системами регуляторних функцій. Фізико-хімічне вивчення алостеричних, дисоціативних і адсорбційних ферментативних систем дозволяє кількісно охарактеризувати регуляторні можливості цих систем, і описати їх за допомогою параметрів, що є константами рівноваги між формами ферменту (форми, що розрізняються з конформаційного стану; олігомерні форми; вільні й адсорбовані форми), що взаємоперетворюються, константи швидкості переходу однієї форми ферменту в іншу й каталітичні параметри окремих форм ферменту.

2.8.2.4 Регуляція ковалентним зв'язуванням

Модифікація ферментативної активності може полягати в ковалентній модифікації ферменту. Найбільш поширену ковалентну модифікацію каталізують протеїнкінази: білок + АТФ $\ll\text{---}\gg$ білок-Ф + АДФ. Відомо багато ферментів, які активні тільки у фосфорильованому стані, або фосфорильована й дефосфорильована форми володіють різними активностями.

2.8.2.5 Регуляція обмеженим протеолізом

Накопичений кінцевий продукт зв'язується з інгібіторами протеолітичних ферментів, знижуючи їхню дію, Протеолітичні ферменти, звільнені, таким чином, від інгібування, розщеплюють ферменти, найбільш чутливі до протеолізу в даній метаболічній послідовності. У результаті концентрація кінцевого продукту знижується, потрійний комплекс кінцевий продукт-протеолітичний фермент-інгібітор дисоціює, звільнений інгібітор знову зв'язується із протеолітичним ферментом, і розщеплювання ферменту припиняється. Регуляція ферментними каскадами також належить до цієї групи (система згортання крові).

Без сумніву, одним із найважливіших відкриттів останніх сорока років в області метаболізму і його регуляції є пояснення регуляції з використанням механізму зворотного зв'язку, суть якого полягає в тому, що ферменти метаболізму можуть інгібуватися або активуватися низькомолекулярними речовинами, що мають відношення до даного метаболічного шляху.

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. Що розуміють під обміном речовин і енергії в живих організмах, зовнішнім і проміжним обміном, метаболізмом, головними й специфічними метаболічними шляхами, анаболізмом і катаболізмом
2. Яким чином процеси анаболізму й катаболізму розділені в живій клітині
3. Що є предметом вивчення в біоенергетиці
4. Які особливості термодинамічного опису біохімічних процесів Ви знаєте
5. Які реакції називають екзергонічні, а які ендергонічні
6. У чому полягає біологічний сенс сполучення цих процесів у живих організмах
7. У чому виявляється висока біохімічна активність «високоенергетичних» з'єднань і чим вона обумовлена
8. У чому суть поняття «Вільна енергія»
9. Які особливості біологічного окислення Ви знаєте й із чим вони пов'язані
10. Назвіть основні компоненти дихального ланцюга, назвіть комплекси дихального ланцюга і їхню функцію
11. Яку функцію виконують реакції ЦТК
12. Енергетичні стадії гліколізу
13. Назвіть відомі Вам шляхи перенесення протонів із НАДН цитоплазми в мітохондрії
14. Що таке сполучені мембрани
15. Що є АТФ синтаза, її локалізація, функція й механізм роботи.
16. Контроль окислювального фосфорилування.

Самостійна робота

Для перевірки початкового рівня знань виконайте наступні завдання.

Завдання 1. Відомо, що швидкість взаємодії речовин А і В збільшилася в три разів після додавання речовини К. Як кінцеві продукти виявляється речовина АВК. Чи є речовина К каталізатором?

Завдання 2. При інтенсивній м'язовій роботі в скелетній

мускулатурі накопичується молочна кислота, що утворюється в реакції відновлення піровиноградної кислоти.

До якого типу відноситься приведена реакція?

А. Окислювально-відновна реакція.

Б. Реакція гідролізу.

В. Реакція синтезу.

Г. Реакція електролізу.

Завдання 3. Речовини А і В взаємодіють по схемі $A + B \rightleftharpoons AB$. При заданій концентрації А і В через 30 хвилин установлюється рухома рівновага, тобто швидкість прямої і зворотної реакції зрівнюються. Яку із приведених характеристик реакції змінить внесення каталізатора?

А. Швидкість прямої реакції.

Б. Константу рівноваги

В. Швидкість зворотної реакції.

Г. Час настання рівноваги.

Д. Концентрацію продуктів реакції.

Питання для обговорення

1. Механізм ферментативного каталізу. Теорія проміжних фермент-субстратних комплексів, типи зв'язків.

2. Уявлення про активний центр ферменту, його організація. Теорії, що пояснюють роботу активного центру (Е. Фішер, Д. Кошланд).

3. Механізми прискорення реакцій ферментами

4. Особливості будови алостеричних ферментів, алостеричний центр.

5. Механізми регуляції швидкості ферментативних процесів: регуляція кількості ферментів (синтез, розпад), активності ферментів, зміна кількості субстрату, наявність ізоферментів, об'єднання ферментів у поліферментні комплекси, компартменталізація процесів.

6. Ключові ферменти, характеристика.

7. Регуляція активності ферментів: ковалентна модифікація, активатори й інгібітори (прикладі). Види інгібірування (необоротне й оборотне, характеристика, приклади).

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

Основна

1. Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. – М.: Академия, 2003. – 208 с.
2. Кнорре Д.Г., Мызина С.Д. Биологическая химия. – М.: Высшая школа, 2003. – 409 с.
3. Кольман Я., Рем К.Г. Наглядная биохимия. – М.: Мир, 2004. – 469 с.
4. Кучеренко М.Е., Бабенюк Ю.Д., Васильев О.М. Біохімія. Підручн.: К.: Либідь, 1995 – 120 с.
5. Плакунов В.К. Основы энзимологии. М: Логос, 2001 – 128 с.
6. Регуля Е.А., Николайчик М.Б. Регуляция метаболизма. Курс лекций. – Минск, 2002 – 89 с.

Додаткова

1. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты: В 3 т. / М.: Мир, 1982. – Т.1: Энзимология. – 392 с.; Т.2: Энзимология. – 515 с.; Т.3: Энзимология. – 1120 с.
2. Курганов Б.И. Аллостерические ферменты. – М. Наука, 1978. – 248с.
3. Кучеренко Н.Е., Войцицкий В.М. Биоэнергетика. – К.: Вища школа, 1986. – 450 с.
4. Имобилизованные клетки и ферменты. Методы / Под ред. Дж. Вурфорда. – М.: Мир, 1988 – 215 с.
5. Д. Мещлер. Биохимия: В 3 т. / М.: Мир, 1980. – Т.2: Биохимия. – с.5 – 305.
6. Основы биохимии / Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э., Хилл Р., Леман И. В 3 т. / М.: Мир, 1981. – Т.1. – С.238 – 523.
7. Страйер Л. Биохимия: В 3 т. / М.: Мир, 1984. – Т. 1. – С. 104 -167; Т.2. – С. 6 – 94.

Интернет сторінки

1. Concepts in Biochemistry (University of Akron) - Multimedia Course (Text, Images & Interactive Animations

2. Lehrmittel zu Enzymen: Biochemie und Molekularbiologie.–http://www.infochembio.ethz.ch/links/biochem_enzyme_lehr.html

Додаток

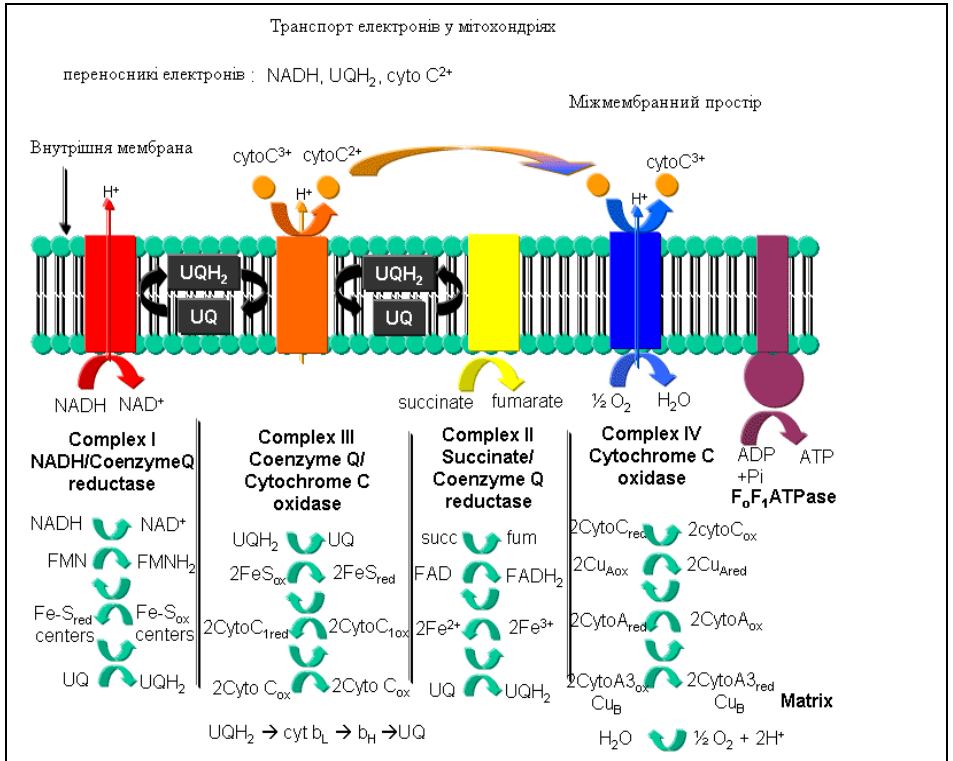


Рис.1.1 Структурна та функціональна організація комплексів дихального ланцюгу

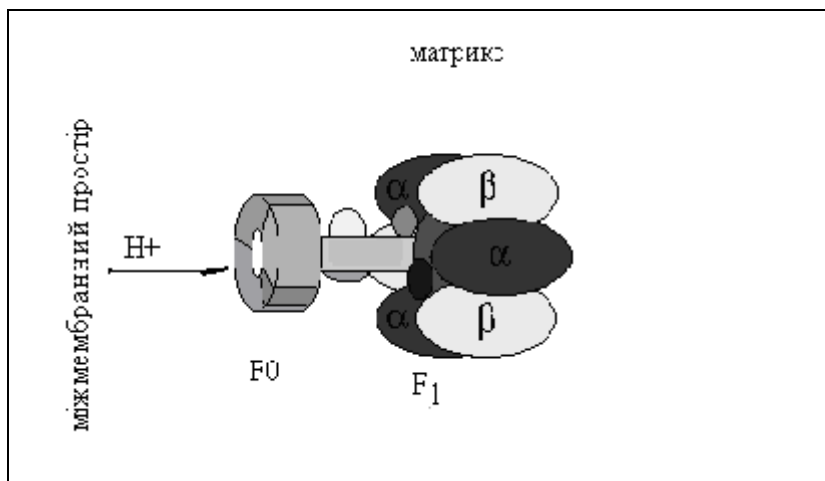


Рис. 1.2 – Структура H⁺-АТФ синтази

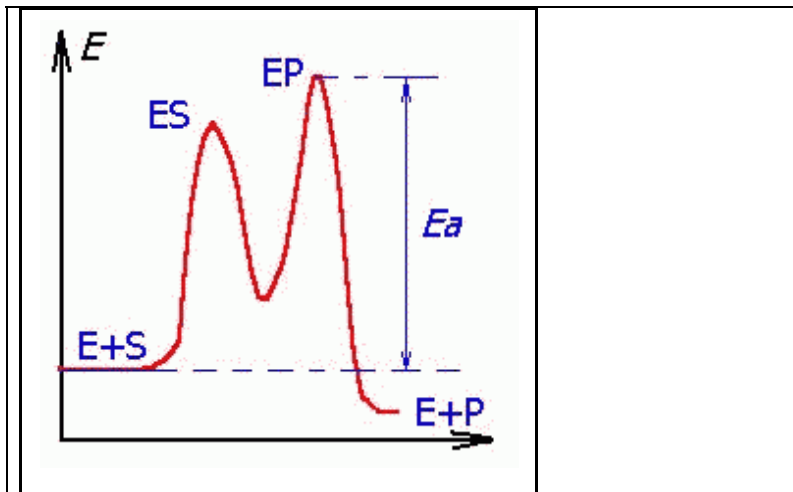


Рис. 2.3 – Ферменти знижують енергію активації реакції
Каталіз призводить до прискорення досягнення рівноваги за рахунок зниження енергії активації (E_a), часто східчато:

- 1) $E + S \rightarrow ES$ ($K = k_1/k_{-1}$) (швидка)
- 2) $ES \rightarrow EP$ (k_2) (повільна)
- 3) $EP \rightarrow E + P$

Таким чином, у момент рівноваги швидкості утворення й зникнення фермент - субстратного комплексу (ES) рівні:

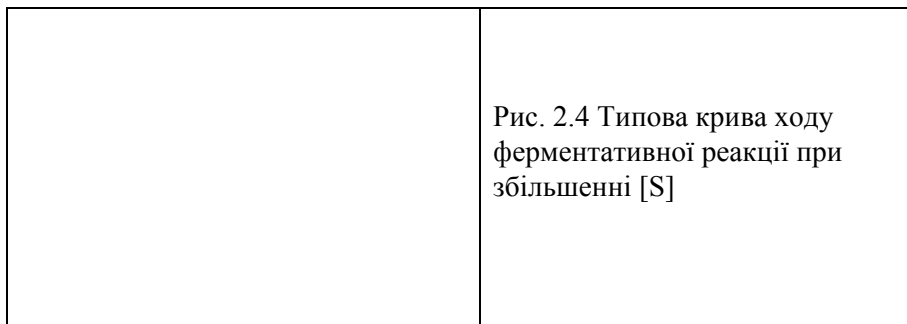
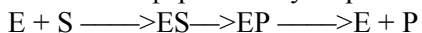


Рис. 2.4 Типова крива ходу ферментативної реакції при збільшенні $[S]$

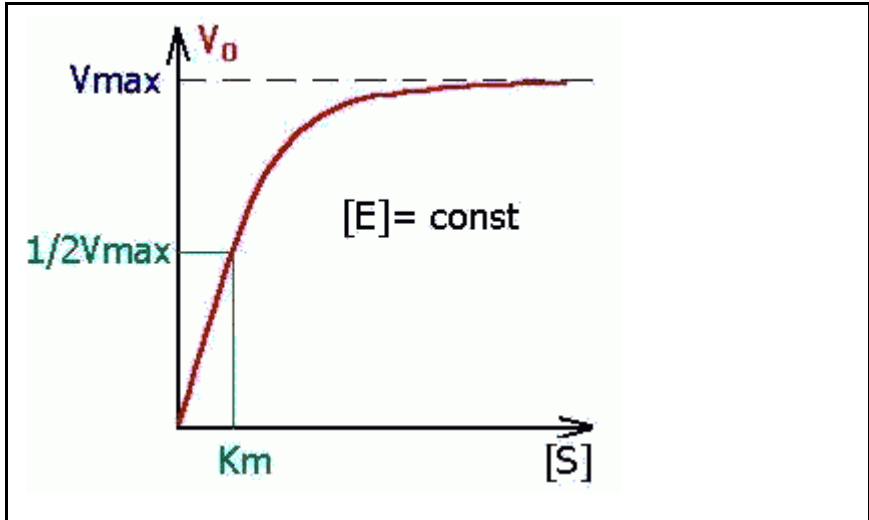


Рис. 2.5 – Вплив на початкову швидкість реакції концентрації субстрату $[S]$. Визначення $K_m/[S]$ - залежність гіперболічна; це означає, що при малих $[S]$ перший порядок реакції далі переходить у нульовий. K_m вимірюється в молях на літр і буває від 10^{-2} до 10^{-7} ; чим менше K_m , тим більш афінність ферменту до субстрату, тим активніше фермент.

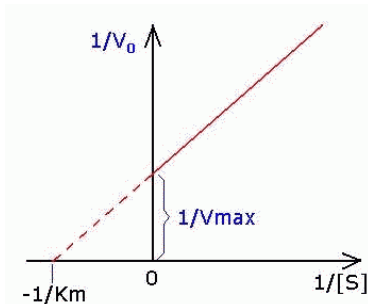


Рис. 2.6 – Графічний вираз швидкості реакції у координатах Лайнуївера-Берка
Це пряма лінія, яка відсікає на осі X значення $-1/K_m$, а на осі Y-значення $1/V$; рівняння Лайнуївера – Берка:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max} S} + \frac{1}{V_{\max}} = \text{const}$$

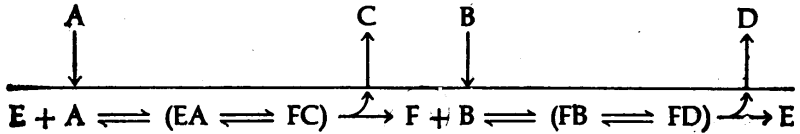


Рис. 2.7 – Пінг-понг механізм (подвійного заміщення) ферментативних реакцій

A, B, C, D - субстрати й продукти. E - фермент, F - стабільний інтермедіат. У дужках передбачувані інтермедіати. По горизонталі послідовно розташовані форми ферменту, що утворюється в ході реакції, а стрілки вказують на приєднання субстратів і дисоціацію продуктів.

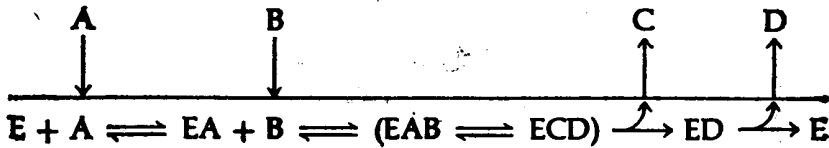


Рис. 2.8 – Схема механізму упорядкованих послідовних ферментативних реакцій

Субстрат А зв'язується з ферментом E, утворюючи комплекс EA, який, у свою чергу, зв'яже субстрат В. Т потрійний комплекс EAB перетворюється в потрійний комплекс ECD, з якого послідовно звільняються продукти С і D

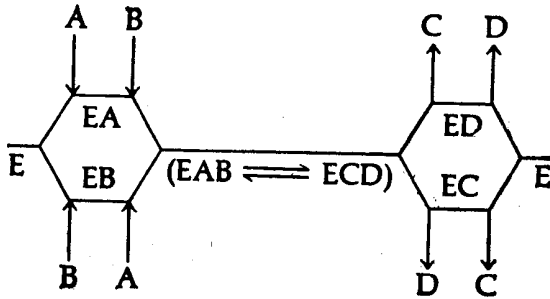


Рис. 2.10 - Схема механізму довільних послідовних мультисубстратних реакцій

На ферменті E є незалежні ділянки скріплення для A і B і швидкість реакції не залежить від того, який субстрат A або B зв'язується з ферментом першим. У такому разі говорять, що механізм є нерегульованим. При розпаді потрійного комплексу ECD жоден продукт не має перед іншим «преваги» звільнятися

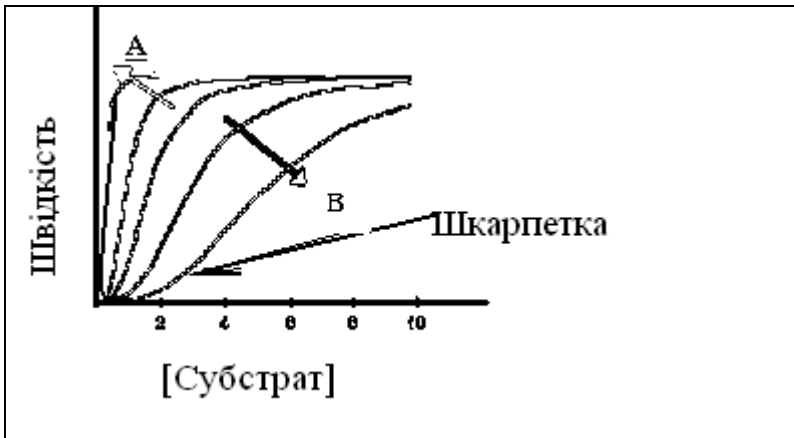


Рис. 2.11– Вплив активаторів (A) і інгібіторів (B) на швидкість реакцій, які каталізують алостеричні ферменти.

Активатор зменшує шкарпетку, інгібітор – збільшує її.

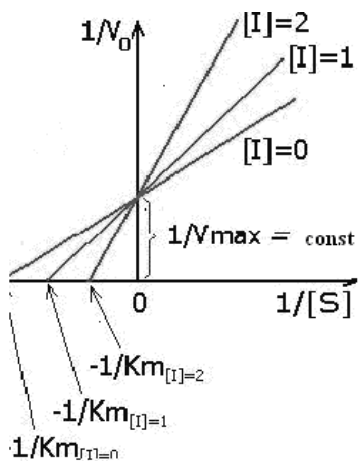


Рис. 2.12 – Конкурентне інгібування

За активний центр ферменту разом із субстратом конкурує інгібітор: $E + I = EI$; $K_i = [E][I] / [EI]$, чим менше K_i , тим сильніше інгібітор. Конкурентний інгібітор збільшує K_m і не змінює V_{max} .

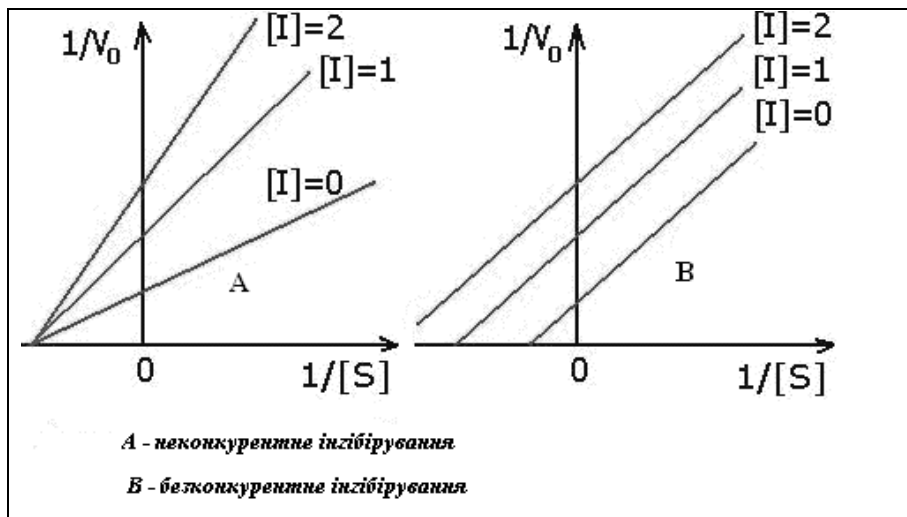


Рис. 2.13 – Неконкурентне (А) та безконкурентне (В) інгібування
 Неконкурентне інгібування виявляється при пов'язанні інгібітору з ферментом поза активним центром, але при цьому міняється структура активного центру й зв'язок із субстратом стає неможливим; $E + I \rightleftharpoons EI$, $EI + S \rightleftharpoons$ (неможливо).

А – неконкурентний інгібітор не змінює K_m і знижує V_{max} .
 Безконкурентне інгібування (В) - результат приєднання інгібітору тільки після утворення фермент - субстратного комплексу: $E + S = ES$; $ES + I = ESI$; В – безконкурентний інгібітор однаковою мірою знижує K_m і V_{max} .

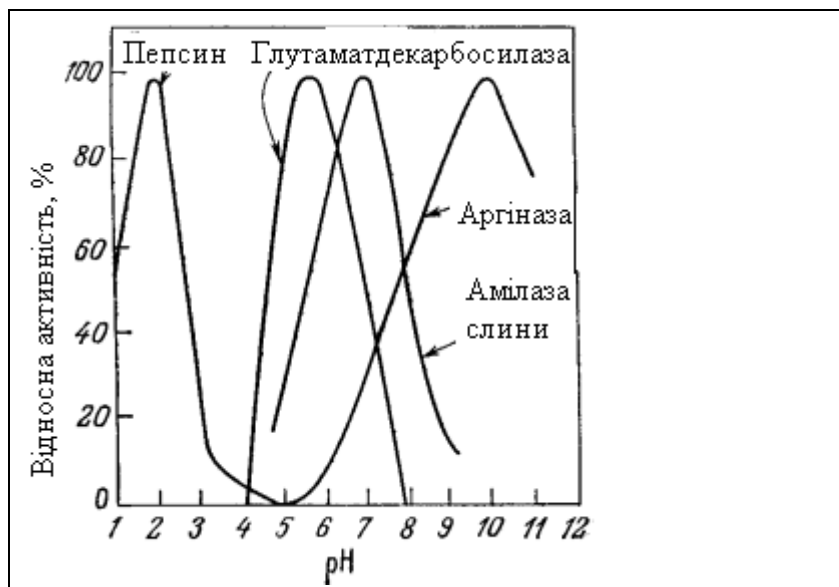


Рис. 2.14 Вплив рН на активність ферментів

Тестовий контроль

1 Найбільш корисна термодинамічна функція в біохімії:

- [1] ентропія
- [2] ентальпія
- [3] енергія системи
- [4] вільна енергія
- [5] робота, яку виконує система

2 Спеціальний носій вільної енергії в біологічних системах:

- [1] АДФ
- [2] АТФ
- [3] ГТФ
- [4] ЦТФ
- [5] ТТФ

3. Який спеціальний носій вільної енергії в біологічних системах має склад: аденін, рибоза, трифосфат?

- [1] аденілова кислота
- [2] АТФ
- [3] АДФ
- [4] АМФ
- [5] ЦТФ

4 При гідролізі АТФ до аденозинтрифосфату й ортофосфату звільняється енергія, яка складає:

- [1] – 7,3 ккал/моль
- [2] + 12 ккал/моль
- [3] – 12 ккал/моль
- [4] - 1,36 ккал/моль
- [5] + 1,8 ккал/моль

5 Що являє собою активна форма АТФ?

- [1] АТФ у стані синтезу
- [2] комплекс АТФ з Mg^{2+}
- [3] комплекс АТФ та β - суб'єдиниць
- [4] АТФ, зв'язана з актоміозином
- [5] АТФ, зв'язана з іонними каналами

6. При гідролізі АТФ до аденозинмонофосфату й пірофосфату вивільняється вільна енергія, яка дорівнюється:

- [1] – 7,3 ккал/моль
- [2] + 12 ккал/моль
- [3] – 12 ккал/моль
- [4] - 1,36 ккал/моль
- [5] + 1,8 ккал/моль

7 Вільна енергія, що звільняється при гідролітичному розщепленні ангідридного зв'язку АТФ, використовується для:

- [1] підтримки температурного гомеостазу
- [2] ініціації окислювально-відновних процесів
- [3] утворення хелатів
- [4] запуску реакцій, що вимагають вільної енергії
- [5] гальмування катаболічних процесів

8. Який цикл є основним механізмом обміну енергії в біологічних системах?

- [1] АТФ – АДФ
- [2] АТФ – КрФ
- [3] КрФ – АДФ
- [4] АТФ – Креатин
- [5] АМФ – АДФ

9. Безпосередньо використовуваним донором вільної енергії в біологічних системах є:

- [1] ЦТФ
- [2] ГТФ
- [3] Кр~Ф
- [4] АТФ
- [5] комплекс АТФ – Кр~Ф

10. Протягом якого часу молекула АТФ витрачається в клітині після її утворення?

- [1] доби
- [2] 1 години
- [3] 1 хв.

- [4] 1 с
- [5] 12 годин

11. Яку масу АТФ витрачає людина за 24 години?

- [1] 1 моль
- [2] ~40 кг
- [3] 0,5 кг
- [4] 1 кг
- [5] дорівнюється масі тіла

12. Чи вірно твердження: АТФ постійно утворюється й споживається, а тому не є формою накопичення вільної енергії

- [1] так
- [2] ні

13. Високий потенціал переносу фосфатної групи у біологічних системах мають перераховані з'єднання, за винятком:

- [1] АТФ
- [2] фосфат
- [3] фосфоенолпіруват
- [4] ацетил фосфат
- [5] креатин фосфат

14. Термодинамічна сутність ролі АТФ – це:

- [1] функціонування як енергосопрягаючого агента
- [2] накопичення енергії окислювання
- [3] звільнення енергії відновлення
- [4] забезпечення ресинтезу КрФ
- [5] акцептор вільної енергії

15. При окислюванні паливних молекул переносниками електронів на дихальний ланцюг є?

- [1] НАДФ
- [2] НАД і ФАД
- [3] НАД і НАДФ
- [4] цитохром з
- [] цитохром b

16. В якому переноснику електронів реакційно-здатна частина представлена ізоалоксазиновим кільцем?

- [1] НАД
- [2] НАДФ
- [3] цитохром с
- [4] цитохром b
- [5] ФАД

17. При окислюванні паливних молекул, який з акцепторів протонів та електронів приспонує два протони?

- [1] НАД
- [2] НАДФ
- [3] ФАД
- [4] ФАД і НАД
- [5] НАД і НАДФ

18 Головний донор протонів у відбудовних синтезах?

- [1] ФАДН₂
- [2] НАДН
- [3] НАДФН
- [4] Кофермент А

19. Скільки стадій генерування енергії при окислюванні живильних речовин описав Ганс Кребс?

- [1] 1
- [2] 4
- [3] 3
- [4] 10
- [5] 12

20. Як називається третя стадія генерування енергії при окислюванні живильних речовин?

- [1] Цикл Кноопа
- [2] Цикл Кребса
- [3] Цикл Кору
- [4] Цикл Гензеляйта

[5] Пентозофосфатний цикл

21 Що відображує формула: $[АТФ]+1/2[АДФ]/[АТФ]+ [АДФ]+[АМФ]$?

- [1] Запас АТФ у клітині
- [2] Інтенсивність утворення АТФ
- [3] Ступінь її використання
- [4] Молярні фракції АТФ і її метаболітів
- [5] Енергетичний заряд клітини

22. Енергетичний статус клітини характеризують два показники:

- [1] Енергетичний заряд і потенціал фосфорилування
- [2] Рівень НАДН і НАДФН
- [3] Енергетичний заряд і НАДФН
- [4] Енергетичний заряд і рівень НАДН
- [5] Рівень ФАДН₂ потенціал фосфорилування

23. Метаболічними шляхами енергетичного обміну є всі перераховані, крім:

- [1] гліколіз
- [2] бета-окислювання вищих жирних кислот
- [3] протеоліз
- [4] цикл трикарбонових кислот
- [5] окисне фосфорилування

24. Основний механізм синтезу АТФ:

- [1] бета-окислювання жирних кислот
- [2] окисне фосфорилування
- [3] пентозофосфатний шунт
- [4] цикл Кребса
- [5] глюконеогенез

25. Вуглекислий газ утворюється в реакціях:

- [1] гліколізу
- [2] пентозофосфатного шунта
- [3] циклу Кребса
- [4] окисного фосфорилування

[5] синтезу холестерину

26. В реакціях пентозофосфатного шунта утворюється:

- [1] піровиноградна кислота
- [2] лактат
- [3] НАДФН
- [4] ацетил~КоА
- [5] АТФ

27. Швидкий гліколіз – це реакції:

- [1] синтез глікогену
- [2] окислювання глікогену до лактату
- [3] окислювання глюкози до ацетил~КоА
- [4] окислювання глюкози до лактату
- [5] окислювання глюкози до вуглекислого газу й води

28. Субстратами енергетичного обміну можуть бути всі перераховані речовини, крім:

- [1] креатиніну
- [2] вуглеводів
- [3] ліпідів
- [4] кетонів тіл
- [5] амінокислот

29. У результаті β -окислення жирних кислот утворюється:

- [1] ацетил-СоА
- [2] лактат
- [3] кетонів тіл
- [4] тригліцериди
- [5] АТФ

30. Продукт аеробного окислювання глюкози:

- [1] триози
- [2] вуглекислий газ
- [3] лактат
- [4] вуглекислий газ і вода
- [5] вода

31. Макроергичним з'єднанням є:

- [1] глюкоза

- [2] НАД
- [3] глікоген
- [4] жирні кислоти
- [5] АТФ

32. До складу дихального ланцюга мітохондрій входять:

- [1] цитохроми
- [2] трикарбонові кислоти
- [3] глікофосфати
- [4] амінокислоти
- [5] вітаміни

33. Про стан гіпоксії тканин свідчить:

- [1] гіпоальбумінемія
- [2] збільшення в сироватці лактату
- [3] збільшення активності АЛТ, АСТ
- [4] гіперкоагуляція крові

34. Креатинфосфат у клітинах виконує функцію:

- [1] кофактора
- [2] ферменту
- [3] медіатора
- [4] переносника енергії

35. Окисне фосфорилювання здійснюється в:

- [] ядерцях
- [2] лізосомах
- [3] мітохондріях
- [4] апараті Гольджи
- [5] цитоскелеті

36. Який закон термодинаміки визначає умови спонтанного перебігу реакцій?

- [1] другий
- [2] перший
- [3] третій
- [4] ніякий

37. Ентропія (ΔS) – це міра

- [1] ступеня впорядкованості системи
- [2] ступеня разупорядкованості системи
- [3] вільної енергії
- [4] спряженості систем
- [5] константи рівноваги системи

38. Ентропія системи зростає ($\Delta S +$) коли

- [1] знижується ступінь разупорядкованості системи
- [2] система прагне до стану рівноваги
- [3] збільшується ступінь разупорядкованості системи
- [4] ентропія системи – величина константна

39. Який закон термодинаміки говорить: процес може протікати спонтанно тільки за умови збільшення суми ентропій системи й навколишнього середовища?

- [1] перший
- [2] третій
- [3] другий
- [4] усі відповіді вірні
- [5] усі відповіді невірні

40. Рівняння (ΔS системи $+\Delta S$ середовища) > 0 відображує:

- [1] перший закон термодинаміки
- [2] другий закон термодинаміки
- [3] необоротність процесу
- [4] активаційний потенціал
- [5] енергію сполучених реакцій

41. При якій умові під час спонтанного процесу ентропія системи може зменшуватися?

- [1] якщо ентропія навколишнього середовища зменшується так, що їхня сума виявляється негативною величиною
- [2] якщо ентропія навколишнього середовища збільшується так, що їхня сума виявляється позитивною величиною
- [3] ні при якому
- [4] у роки сонячної активності

42. Рівняння $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ – це рівняння

- [1] Гібсу
- [2] Полежаєва
- [3] першого закону біоенергетики
- [4] другого закону термодинаміки
- [5] закону збереження енергії

43. У чому переваги рівняння Гібсу перед рівнянням другого закону термодинаміки?

- [1] вони рівноцінні
- [2] питання некоректне
- [3] навпроти, другий закон більш узагальнюючий, чим рівняння Гібсу
- [4] у це рівняння не входять ніякі параметри навколишнього середовища й зміна вільної енергії (ΔG) служить критерієм можливості спонтанного протікання реакції

44. Зміна вільної енергії (ΔG) служить критерієм можливості спонтанного протікання реакції?

- [1] так
- [2] немає

45. Якщо система знаходиться в рівновазі й не перетерплює ніяких змін, то ΔG системи:

- [1] дорівнює 0
- [2] має негативне значення
- [3] має позитивне значення
- [4] прагне до нескінченності
- [5] не дорівнює нулю

46. Реакція може йти спонтанно, якщо ΔG системи:

- [1] дорівнює 0
- [2] має негативне значення
- [3] має позитивне значення

47. Яка із двох величин служить критерієм спонтанності біохімічних реакцій – ΔG чи ΔG^0 ’?

[1] ΔG^0 ,

[2] ΔG

48. Яке з’єднання служить спеціальним носієм вільної енергії в живих організмах?

[1] такого з’єднання немає

[2] АТФ

[3] креатинфосфат

49. Чи можна описати утворення молекули АТФ у термінах точного хімічного механізму елементарних стадій?

[1] Так

[2] Ні

50. Рушійним фактором процесу утворення АТФ служить:

[1] Енергія електричного поля, що існує на внутрішній мембрані мітохондрій

[2] Енергія сонячного світла

[3] Енергія електронів, що переміщаються по дихальному ланцюгу

[4] Окислювально-відновні реакції циклу трикарбонових і кислот

[5] Усі відповіді правильні

51. Що служить джерелом енергії електричного поля внутрішньої мембрани мітохондрій (у загальному виді)?

[1] Живильні речовини (білки, жири, вуглеводи)

[2] Різниця потенціалів зовнішньої й внутрішньої мембрани мітохондрій

[3] Різниця рН зовнішньої й внутрішньої мембрани мітохондрій

[4] Окислювання в мітохондріях киснем до вуглекислого газу й води обмеженого набору низькомолекулярних органічних кислот, що утворюються в ході метаболізму білків, жирів і вуглеводів

52. Споживання клітиною кисню як окислювача називають:

[1] горіння

- [2] внутрішньоклітинне дихання
- [] дихальний вибух

53. Енергія, що звільняється в клітинах у результаті хімічної реакції окислювання, не використовується:

- [1] як запас корисної енергії
- [2] терморегуляції
- [3] утворення корисних з'єднань
- [4] виведення з організму ксенобіотиків і кінцевих продуктів обміну
- [5] як механізм, що прискорює еволюцію
- [6] у пасивному транспорті

54. Енергія, що звільняється при окислюванні, не трансформується в електрохімічну:

- [1] на поверхні плазматичної мембрани
- [2] у ЕПР
- [3] у внутрішній мембрані мітохондрій
- [4] у матриксу мітохондрій
- [5] у цитоплазмі

55. Трансформація енергії окислювання в електрохімічну здійснюється:

- [1] спонтанно
- [2] оксидоредуктазами внутрішньої мембрани мітохондрій
- [3] ферментами циклу трикарбонових кислот
- [4] ферментами β – окислювання жирних кислот

56. Сукупність оксидоредуктаз, яки каталізують процес внутрішньоклітинного дихання, називають:

- [1] ферменти циклу трикарбонових кислот
- [2] гліколіз
- [3] окислювально-відновний потенціал
- [4] дихальний ланцюг

57. Для виникнення електричного поля (одна сторона мембрани заряджена негативно, друга – позитивно) необхідно, щоб ферменти дихального ланцюга здійснювали:

- [1] перенос протонів від донора до акцептора вздовж ланцюга

- [2] перенос електронів від донора до акцептора вздовж ланцюга
- [3] векторний , спрямований до сторін мембрани, перенос електронів від відновлювача до окислювача
- [4] усі відповіді вірні
- [5] усі відповіді невірні

58. Ферментативний процес окислювання субстратів у тканинах можна розглядати як:

- [1] відщиплення двох електронів
- [2] відщиплення двох протонів
- [3] окислювально-відновний процес
- [4] відщиплення одного протона й одного електрона
- [5] відщиплення двох атомів водню, кожний з яких складається із протона й електрона

59. У водному розчині вільно можуть існувати тільки:

- [1] протони
- [2] електрони
- [3] протони й електрони

60. У дегідрогеназах кофактор не виконує функцію:

- [1] пастки електронів
- [2] зв'язування протонів
- [3] пастки електронів і зв'язування протонів
- [4] зв'язування субстрату окислювання

61. Вільними кофакторами дегідрогеназ є:

- [1] ФАД
- [2] ФМН
- [3] убіхінон Q
- [4] НАД і НАДФ
- [5] убіхінон Q та НАД

62. Дихальний ланцюг здійснює:

- [1] синтез АТФ
- [2] гідроліз АТФ
- [3] окислювання киснем мітохондріального НАДН
- [4] відновлення мітохондріального НАД у реакціях циклу

трикарбоновых кислот

63. Задачею ферментів дихального ланцюга не є з:

- [1] східчастому звільненні енергії електронів і накопиченні її у формі придатної для синтезу АТФ
- [2] упорядкованому переносі електронів на кисень від компонентів із великим окислювально-відновним потенціалом до меншого, і запасаючи енергію
- [3] здійснення «вибуху» гримучого газу з величезним виділенням енергії у вигляді тепла

64. У дихальному ланцюгу сумарний процес переносу двох електронів від НАДН на кисень здійснюється:

- [1] п'ятьма ліпопротеїдними комплексами
- [2] чотирма комплексами металоферментів
- [3] трьома ліпопротеїдними комплексами (I, III,IV)
- [4] тільки цитохромами
- [5] тільки ферментом Варбурга

65. До загальних властивостей комплексів, яки каталізують векторний перенос електронів із НАДН на кисень, не відносяться:

- [1] ліпопротеїдна природа
- [2] висока молекулярна маса
- [3] будова з великої кількості суб'єдиниць
- [4] плавають у фосфоліпідній мембрані так, що дно й верхівки контактують із водяними фазами матриксу й мітохондрій
- [5] кожен комплекс каталізує окислювально-відновну реакцію
- [6] наявність іонів К

66. Який комплекс дихального ланцюга називається НАДН убіхінон Q оксидоредуктаз?

- [1] I
- [2] II
- [3] III
- [4] IV
- [5] V

67. Який комплекс дихального ланцюга містить у своєму складі

флавін, залізо-сірчані комплекси, більш як 40 поліпептидних ланцюгів, убіхінон Q?

- [1] I
- [2] II
- [3] III
- [4] IV
- [5] V

68. Який комплекс дихального ланцюга містить у своєму складі залізо в складі залізо-сірчаніх комплексів та цитохромів b(I) і b(II) ?

- [1] I
- [2] II
- [3] III
- [4] IV
- [5] V

69. Який комплекс дихального ланцюга називають дихальний фермент Варбурга?

- [1] I
- [2] II
- [3] III
- [4] IV
- [5] V

70. Ким запропонована ідея хеміосмотичного сполучення дихання тканин й окисного фосфорилування?

- [1] Скулачевим В.[]
- [2] Мітчеллом П.
- [3] Бором Н.
- [4] Андерсеном Х.

71. Кожний із чотирьох комплексів, що складають дихальний ланцюг, при переносі електронів не бере участь у:

- [1] переносі протонів через мембрану, що сполучає
- [2] формуванні електричного потенціалу
- [3] формуванні рН градієнта мітохондрій
- [4] формуванні структури АТФ-синтази

[5] у транслокації АТФ

72. Хеміосмотичний принцип сполучення , який не реалізований у конструкціях комплексів дихального ланцюга, це?

[1] окислювально-відновна петля

[2] протонний насос

[3] електронна помпа

74. Яка зі структур дихального ланцюга не входить до складу V комплексу?

[1] АТФ-синтаза

[2] F₁-F₀ –АТФ-синтаза

[3] H⁺- АТФ – синтаза

[4] αβγϵδ

[5] НАДН-убіхінон Q оксидоредуктаза

75. Комплекс II дихального ланцюга це:

[1] Сукцинат – убіхінон Q оксидоредуктаза

[2] FAD, цитохром b₅₆₀, убіхінон Q

[3] цитохром c

[4] залізо-сірчані комплекси

[5] Q-Сyt c оксидоредуктаза

76. Три конвертовані форми енергії в живих клітинах це:

[1] АТФ, АДФ, P

[2] АТФ, ГТФ, ЦТФ

[3] АТФ, натрієвий потенціал, протонний потенціал

[4] протонний потенціал, АТФ, ГТФ

[5] АТФ, АДФ, натрієвий потенціал

77. Який закон біоенергетики утверджує:

Жива клітина уникає прямого використання енергії зовнішніх ресурсів для здійснення корисної роботи. Вона спочатку перетворює її в одну із трьох конвертованих форм енергії: АТФ, протонний або натрієвий потенціал?

[1] перший

[2] другий

[3] третій

78. Який закон біоенергетики стверджує:

Будь-яка жива клітина завжди має як мінімум дві форми накопичення енергії: водорозчинною (АТФ) і зв'язаною з мембраною (протонний або натрієвий потенціал)?

[1] перший

[2] другий

[3] третій

79. Який закон біоенергетики стверджує: конвертована енергія клітин може перетворюватися одна в іншу, тому одержання хоча б однієї з них досить для підтримки життєдіяльності?

[1] перший

[2] другий

[3] третій

80. Взаємоперетворення АТФ, протонного й натрієвого потенціалів здійснюються спеціальними ферментами. Перехід АТФ \longleftrightarrow протонний потенціал каталізується:

[1] АТФ транслоказою

[2] Na^+ -АТФ-синтазою

[3] H^+/Na^+ антипортером

[4] H^+ -АТФ - синтазою

[5] протеїнкіназою

81. Взаємоперехід АТФ \longleftrightarrow натрієвий потенціал каталізується:

[1] Na^+ -АТФ-синтазою

[2] H^+/Na^+ антипортером

[3] H^+ -АТФ - синтазою

[4] АТФ транслоказою

[5] Протеїнкіназою А

82. Рівновага протонний потенціал \longleftrightarrow натрієвий потенціал забезпечується:

[1] Na^+ -АТФ-синтазою

[2] H^+/Na^+ антипортером

[3] H^+ -АТФ - синтазою

[4] АТФ транслоказою

[5] протеїнкіназою G

83. Клітини тварин мають у своєму розпорядженні наступні форми конвертованої енергії:

[1] АТФ, ГТФ, ЦТФ

[2] АТФ, натрієвий потенціал, ацетил~КоА

[3] натрієвий і протонний потенціал, фосфоенолпіруват

[4] АТФ, протонний потенціал, ЦТФ

[5] АТФ, натрієвий потенціал, протонний потенціал

84. Клітини рослин мають у своєму розпорядженні наступні форми накопичення конвертованої енергії:

[1] АТФ, натрієвий потенціал, протонний потенціал

[2] АТФ

[3] АТФ, натрієвий потенціал

[4] натрієвий і протонний потенціал

[5] АТФ і протонний потенціал

85. У клітинах тварин натрієва енергетика характерна для:

[1] плазмолемі

[2] внутрішньоклітинних мембран

[3] мікросом

[4] пероксисом

[5] ЕПР

86. У клітинах тварин протонна енергетика характерна для:

[1] плазмолемі

[2] внутрішньоклітинних мембран

[3] мікросом

[4] пероксисом

[5] ЕПР

87. Окисне фосфорилування – це:

[1] забезпечений протонним потенціалом синтез АТФ з АДФ + Φ_H у

дихальному ланцюзі

[2] фосфорилування білків цитоплазми протеїнкіназами – донор фосфатних груп АТФ

[3] це синтез АТФ у реакціях гліколізу

[4] фосфорилування білків цитоплазми за участю АТФ

[5] реакції циклу трикарбонових кислот

88. Каталітичні центри АТФ-синтази розташовані на:

[1] β - суб'єдиницях F_1 комплексу

[2] α – суб'єдиницях F_1 комплексу

[3] β - і α – суб'єдиницях F_1 комплексу

[4] F_0 – комплексу

[5] на дихальному ферменті Варбурга

89. АТФ-синтаза – фермент, активність якого визначається:

[1] рівнем іонів магнію

[2] рівнем АТФ і АДФ

[3] ротацією γ –суб'єдиниці F_1 - F_0 – комплексу

[4] ротацією F_0 – комплексу

[5] рівнем Φ_H

90. Який комплекс АТФ - синтази має склад: $\alpha\beta\gamma\epsilon\delta$?

[1] F_0

[2] F_1

[3] $F_0 - F_1$

91. Активний центр ферменту не формують:

[1] фрагменти поліпептидного ланцюга білка - ферменту

[2] нуклеофільні групи залишків амінокислот імідазол та гістидину, оксигрупи серину чи тирозину, тільна група цистеїну, ϵ -аміногрупа лізину

[3] іон імідазолія, не іонізовані карбоксильні групи, іони металів і т.п.)

[4] фермент - субстратний комплекс

[5] молекули води

[6] вільні пептиди

92. Серед механізмів, що відіграють головну роль при утворенні комплексу фермент - субстрат у водних розчинах, мінімальну роль мають:

- [1] утворення ковалентних зв'язків
- [2] гідрофобні взаємодії
- [3] електростатичні взаємодії
- [4] утворення водневих зв'язків
- [5] координаційні зв'язки

93. Що розуміють під доменами в структурі білків-ферментів?

- [1] області в третинній структурі білка з визначеною структурною й функціональною автономією
- [2] форму укладання в просторі поліпептидного ланцюга
- [3] структурно автономну область у молекулі білка
- [4] функціонально автономну область активного центра
- [5] субстрат-еднальна ділянку молекули ферменту

94. Каталітичне перетворення субстрату перебігає:

- [1] на поверхні фермент - субстратного комплексу
- [2] усередині фермент - субстратного комплексу
- [3] у водяній фазі активного центра ферменту
- [4] у гідрофобній ділянці активного центра
- [5] у складі субстрат еднальної ділянки ферменту

95. Відповідно до сучасних представлень, ферментативний каталіз не обумовлений:

- [1] сорбцією субстрату на ферменті так, що вона полегшує наступну хімічну реакцію
- [2] поліфункціональним характером хімічних взаємодій між ферментом і сорбованим субстратом
- [3] ефектами мікросередовища активного центра
- [4] структурною організацією активного центра
- [5] конформаційними перебудовами білків мембранних структур

96. Ферменти, кінетика яких не підкоряється рівнянню Міхаеліса - Ментен, називають:

- [1] непокірливі
- [2] атипові
- [3] алостеричні
- [4] ефекторні
- [5] лігандні

97. Для алостеричних ферментів не характерні:

- [1] кооперативність
- [2] наявність ефекторів
- [3] сигмоїдальна кінетика
- [4] двофазний ефект конкурентних інгібіторів
- [5] гіперболічна залежність швидкості ферментативної реакції від концентрації субстрату

98. 106 Ключовим елементом S-образної кривої, що відображує залежність швидкості ферментативної реакції від концентрації субстрату, є:

- [1] підбор
- [2] п'ята
- [3] шкарпетка
- [4] плато
- [5] крутість

99. Для реалізації механізму алостерії важлива структура:

- [1] первинна
- [2] вторинна
- [3] третинна
- [4] суб'єдинична

100. Кооперативність, як властивість алостеричних ферментів, виключає:

- [1] наявність двох і більш активних центрів
- [2] наявність двох або більш топологічне різних ділянок зв'язування лігандів
- [3] зв'язування одного ліганду збільшує здатність ферменту до зв'язування другого ліганду
- [4] зв'язування одного ліганду знижує здатність ферменту до зв'язування другого ліганду

[5] відсутність в структурі молекули суб'єдиниць

101. Скільки активних центрів у молекулах алостеричних ферментів?

[1] завжди один

[2] три

[3] як мінімум стільки, скільки суб'єдиниць в їхній молекули

[4] на 1 одиницю менше числа суб'єдиниць

[5] не більш чотирьох

102. Інгібітори алостеричних ферментів:

- [1] подовжують шкарпетку S-образної кривої залежності швидкості реакції від концентрації субстрату
- [2] укорочують шкарпетку S-образної кривої залежності швидкості реакції від концентрації субстрату
- [3] не впливають на величину носка S-образної кривої залежності швидкості реакції від концентрації субстрату
- [4] в алостеричних ферментів немає інгібіторів
- [5] прискорюють вихід на плато S-образної кривої

103. Місце локалізації алостеричних ферментів у метаболічних шляхах?

- [1] вхідні
- [2] вихідні
- [3] на перехрестях
- [4] на рівнобіжних шляхах
- [5] завжди ізольовані від метаболічних шляхів

104. В умовах дефіциту субстратів конкуруючих ферментів алостеричні ферменти:

- [1] мають найбільшу швидкість
- [2] мають найменшу швидкість
- [3] не виявляють активності
- [4] блоковані
- [5] активовані в найменшому ступені

105. $K_m - V_{max}$ система ефекторів у алостеричних ферментів – це ефектори, які:

- [1] не впливають на K_m V_{max}
- [2] змінюють або K_m , або V_{max}
- [3] система взаємодіючих один з одним ефекторів
- [4] не впливають на основні кінетичні константи

106. Якщо ефектор знижує ступінь спорідненості ферменту із субстратом:

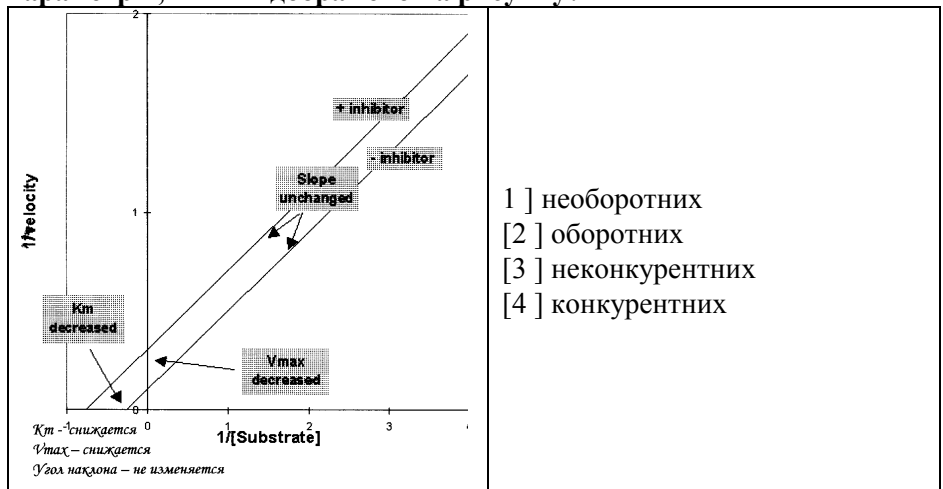
- [1] K_m – не змінюється

- [2] K_m – збільшується
- [3] K_m – зменшується
- [4] V_{max} – збільшується
- [5] K_m – знижується

107. Якщо ефектор алостеричного ферменту знижує число оборотів ферменту, то:

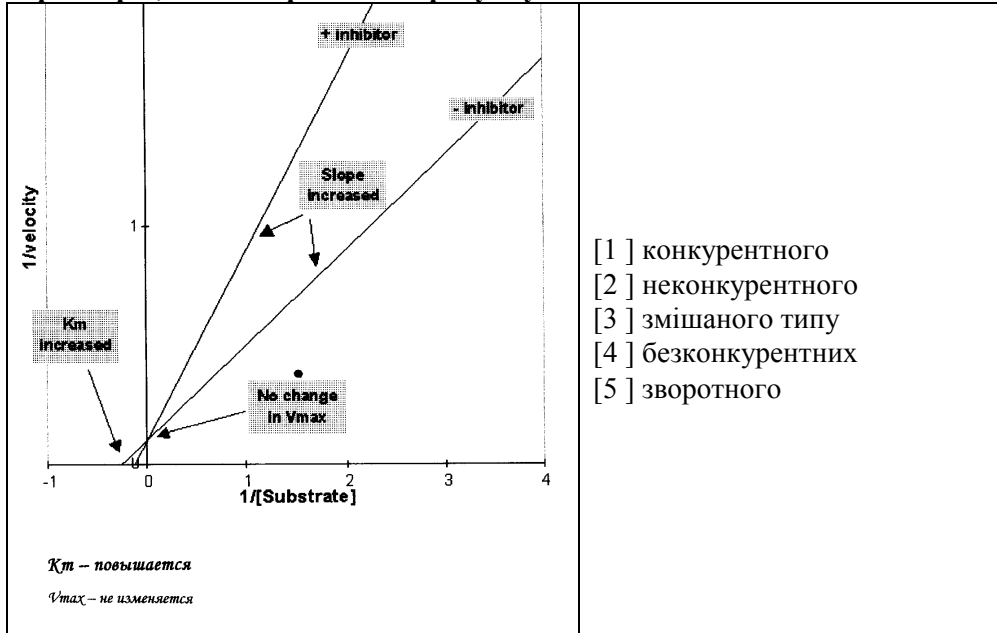
- [1] K_m – не змінюється
- [2] K_m – збільшується
- [3] K_m – зменшується
- [4] V_{max} – знижується
- [5] K_m – знижується

108. Для якого типу інгібіторів характерний стан кінетичних параметрів, який відображено на рисунку?



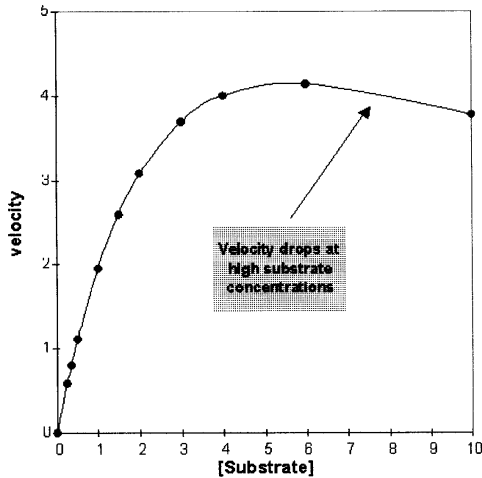
- 1] необоротних
- 2] оборотних
- 3] неконкурентних
- 4] конкурентних

109. Для якого типу інгібіторів характерний стан кінетичних параметрів, що відображено на рисунку?



- [1] конкурентного
- [2] неконкурентного
- [3] змішаного типу
- [4] безконкурентних
- [5] зворотного

110. Яку властивість субстрату відображує графік



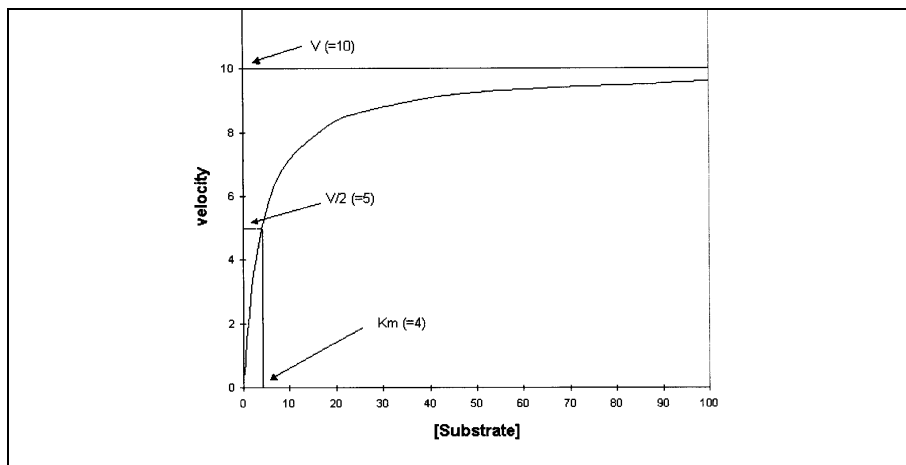
- [1] лінійну залежність швидкості реакції від концентрації субстрату
- [2] гіперболічну залежність швидкості реакції від концентрації субстрату
- [3] здатність інгібувати швидкість ферментативної реакції високими концентраціями субстрату
- [4] перевернену S-образну криву для алостеричних ферментів
- [5] Усі відповіді вірні

111. Дію яких типів інгібіторів відображує наведений графік?



- [1] безконкурентних
- [2] неконкурентного й конкурентного типу

112. Що відображує наведений графік?



- [1] гіперболічну залежність швидкості реакції від концентрації субстрату для всіх ферментів
- [2] кінетику алостеричних ферментів
- [3] графічний метод (метод Міхаеліса – Ментон) розрахунку кінетичних констант за графіком «концентрація субстрату – швидкість реакції»
- [4] крива адсорбції субстрату на ферменті
- [5] графічний метод доказу утворення фермент - субстратних комплексів

113. Константа рівноваги для реакції Г-6-Ф + Н₂О--->> глюкоза + фосфат дорівнює 260 Який висновок ви можете зробити про реакцію?

-
- [1] це замкнута система
-

[2] вона ніколи не досягає рівноваги

[3] у рівноважному стані глюкози набагато вище, ніж Г-6-Ф

[4] безпосередньо починається з Г-6-Ф

[5] константа рівноваги збільшується при збільшенні початкової концентрації Г-6-Ф

114. Які з'єднання мають наступні властивості: підвищують швидкість реакції в мільйони разів при температурах до 37-40°C; самі в реакції не змінюються; не змінюють положення рівноваги; зменшують енергію активації; відрізняються високою специфічністю до субстратів?

[1] Каталізатори

[2] Ферменти

115. Яку з перерахованих завдань може вирішити дослідження каталітичних властивостей ферментів?

[1] визначити кінетичні константи

[2] з'ясувати механізм ферментативної реакції

[3] ідентифікувати проміжні ланки й кінцеві продукти реакції

[4] оцінити внесок у каталіз концентрації субстрату

[5] оцінити внесок у каталіз концентрації ферменту

[6] всі перераховані

[7] ні однієї з перерахованих

116. Яка з перерахованих теорій ферментативного каталізу загально прийнята в цей час?

[1] індукованої відповідності

[2] каталізу за рахунок переважного зв'язування активним центром

перехідних станів

[3] напруг

[4] «ключ-замок»

117. Який тип хімічного механізму ферментативного каталізу можна припустити, якщо він складається з передачі протона від молекули каталізатора основам у молекулі субстрату в прямому напрямку реакції, й видаленні протона сполученою основою каталізатора у зворотному напрямку; стабілізації перехідного стану реакції досягається за рахунок більше сприятливого розподілу електронів між і зв'язками, що розривають та утворюються?

[1] ковалентний

[2] кислотно-основний

[3] каталіз іонами металів

[4] електростатичних взаємодій

118. Хто автори рівняння, наведеного нижче ?

$V = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$	[1] Лайнуївер і Берк [2] Міхаеліс і Ментен [3] Холдейн і Кребс
--------------------------------------	---

119. Знайдіть невірне твердження щодо константи Міхаеліса:

[1] концентрація субстрату, при якій швидкість реакції дорівнює $1/2 V_{\max}$

[2] величина константна для кожного ферменту

[3] не залежить від концентрації субстрату або ферменту

[4] відбиває спорідненість ферменту до субстрату

[5] висока K_m свідчить про те, що для досягнення V_{\max} необхідна висока концентрація субстрату

[6] висока K_m відбиває низьку афінність ферменту до субстрату

[7] всі твердження вірні

[8] всі твердження невірні

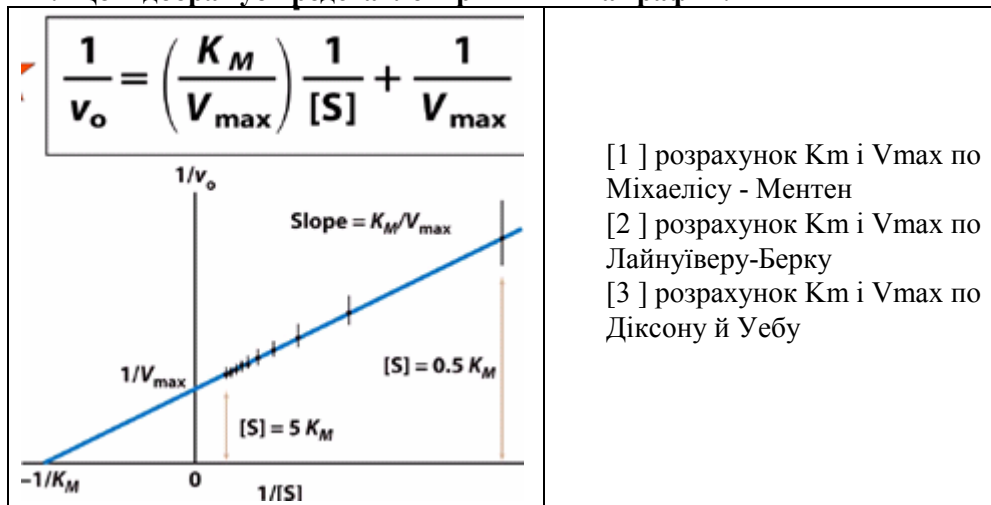
120. Які з перерахованих положень не відповідають теорії Міхаеліса - Ментен?

- [1] ферменти, що каталізують реакції, насичуються субстратом
- [2] у стані насичення всі активні центри молекул фермент пов'язані із субстратом
- [3] в умовах насичення досягається максимальна швидкість
- [4] в теорії ферментативного каталізу неприйнятно поняття «насичення»

121. Які дослідження дозволяють довести, що білок є ферментом?

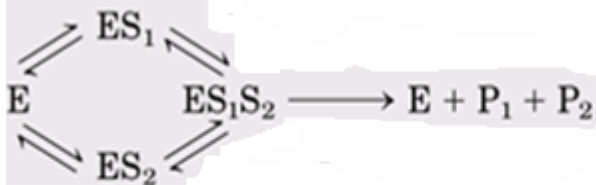
- [1] лінійна залежність швидкості реакції від концентрації ферменту
- [2] не лінійна залежність швидкості реакції від концентрації субстрату
- [3] залежність швидкості реакції від температури
- [4] залежність швидкості реакції від рН
- [5] все перераховане не дозволяє вирішити завдання виявлення ферменту
- [6] все перераховане дозволяє вирішити завдання виявлення ферменту

122. Що відображує представлені рівняння та графік ?

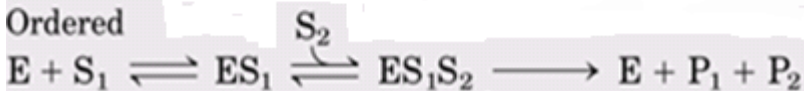


123. Що відображує наступна схема ферментативної реакції?

Random order



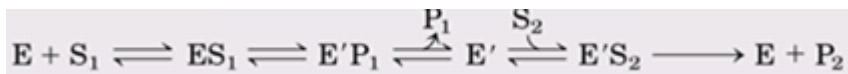
Ordered



[1] участь у реакції декількох ферментів, взаємодіючих з одним субстратом

[2] участь у реакції двох субстратів, що реагують із одним ферментом

124. Який механізм взаємодії ферменту з декількома субстратами відбиває схема



[1] неупорядковані взаємодії ферменту з декількома субстратами

[2] упорядковані реакції взаємодії ферменту з декількома субстратами

[3] пінг-понгу

125. Який тип інгібіторів зв'язуються тільки з ES, субстратний захист не реалізується; інгібітори знижують V_{max} і K_m

[1] конкурентний

[2] безконкурентний

[3] неконкурентний

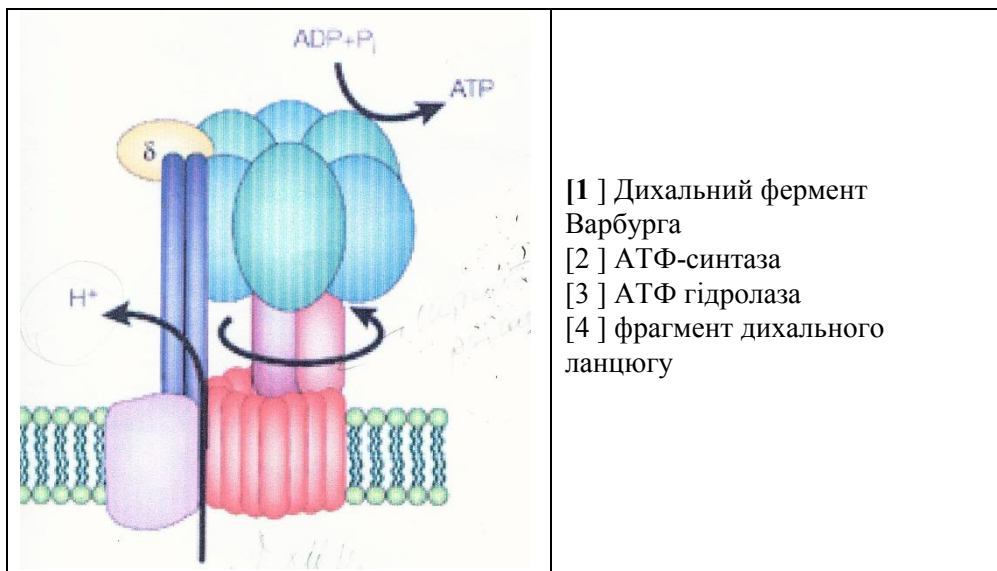
[4] оборотний

126. Яка структура зображена на рисунку?



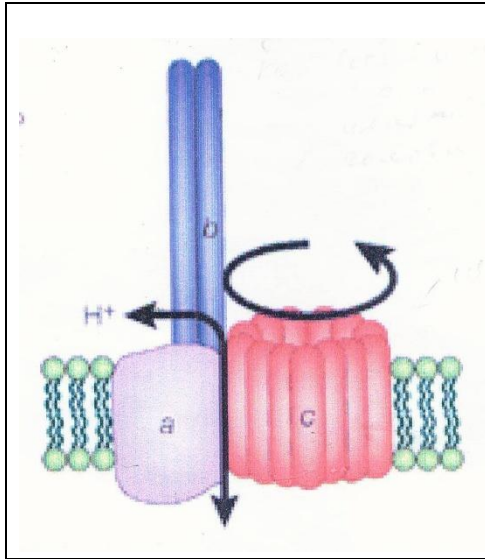
- [1] Протеасома
- [2] F₁- комплекс АТФ-синтази
- [3] F₀- комплекс АТФ-синтази
- [4] АТФ - гідролаза

127. Яка структура зображена на рисунку?



- [1] Дихальний фермент Варбурга
- [2] АТФ-синтаза
- [3] АТФ гідролаза
- [4] фрагмент дихального ланцюгу

128. Яка структура зображена на рисунку?



- [1] домен
- [2] Дихальний фермент Варбурга
- [3] АТФ гідролаза
- [4] F₀ комплекс АТФ - синтази

129 «Катал» - це одиниця, що відображує:

- [1] константу Міхаеліса-Ментен
- [2] концентрацію ферменту
- [3] концентрацію інгібітору
- [4] активність ферменту
- [5] коефіцієнт молярної екстинкції

130 Активність ферменту, виражена в міжнародних одиницях, має розмірність:

- [1] моль /година /л
- [2] моль /сек /л
- [3] мкмоль/хв. /мл
- [4] мкмоль /година/мл
- [5] мг/хв. /л

131 Швидкість ферментативної реакції не залежить від:

- [1] температури
- [2] рН
- [3] концентрації субстрату

- [4] присутності кофакторів
- [5] типу водяного термостата

132 Константа Міхаеліса-Ментен – це:

- [1] концентрація субстрату, при якій швидкість ферментативної реакції дорівнює половині максимальної
- [2] оптимальна концентрація субстрату для ферментативної реакції
- [3] коефіцієнт, що відображує залежність швидкості реакції від температури
- [4] усе перераховане

133 Величина константи Міхаеліса-Ментен відображує:

- [1] залежність швидкості реакції від концентрації ферменту
- [2] залежність швидкості реакції від температури
- [3] ефекти коферментів і кофакторів ферментів
- [4] усе перераховане вірно
- [5] спорідненість ферменту до субстрату

134 Яке твердження помилкове?

- [1] ферменти утворюють комплекс із субстратом
- [2] ферменти знижують енергетичний бар'єр реакції
- [3] ферменти змінюють константу рівноваги хімічної реакції
- [4] багато ферментів змінюють конформацію при скріпленні субстрату
- [5] реакція відбувається в активному центрі ферменту, в якому важлива точна тривимірна орієнтація амінокислот

135 Константа рівноваги конверсії дисахариду сахарози в моноцукри глюкозу й фруктозу дорівнює 140000 Який висновок Ви можете зробити про реакцію сахароза + H₂O?

- [1] це закрыта система
- [2] вона ніколи не досягає рівноваги
- [3] тече спонтанно при додаванні сахарози
- [4] константа рівноваги збільшиться при підвищенні концентрації сахарози
- [5] у стані рівноваги концентрація сахарози значно вища, ніж фруктози й глюкози

136 Щоб подолати енергетичний бар'єр між реагентами й продуктами реакції, необхідна енергія для запуску реакції. Цю енергію називають

- [1] енергія активації
 - [2] енергія інактивації
 - [3] енергія реакції
 - [4] кінетична енергія
 - [5] потенційна енергія
-

137 У присутності алкогольдегідрогенази швидкість відновлення ацетальдегіду в етанол збільшується пропорційно концентрації ацетальдегіду, досягає максимуму, при якому подальше збільшення ацетальдегіду не надає ніякого ефекту Чому?

[1] при високій концентрації ацетальдегіду енергія активації реакції знижується

[2] фермент втрачає специфічність до ацетальдегіду

[3] при високих концентраціях ацетальдегіду зміна вільної

[4] енергії реакції збільшується

[5] всі молекули алкогольдегідрогенази пов'язані з молекулами

ацетальдегіду

**138 Константа рівноваги іонізації оцтової кислоти рівна 0,00002
Який висновок Ви можете зробити про цю реакцію?**

[1] це замкнута система

[2] у стані рівноваги концентрація оцтової кислоти значно вища, ніж її іонів

[3] вона ніколи не досягає рівноваги

[4] реакція протікає спонтанно при додаванні оцтової кислоти

[5] константа рівноваги збільшиться, якщо збільшити концентрацію оцтової кислоти

139 Яке із тверджень про швидкість ферментативних реакцій помилкове?

[1] швидкістю реакції управляє енергетичний бар'єр між субстратами й продуктами

[2] ферменти можуть прискорювати швидкість реакції

[3] швидкість реакції не чутлива до температури

[4] ні один із них

140 Екзергонічні реакції це:

[1] реакції звільнення енергій

[2] спонтанні реакції

[3] константи рівноваги яких більш за 1

[4] можуть бути спряжені з ендергонічними реакціями

[5] Всі твердження істинні

ЕТАЛОНИ ВІДПОВІДЕЙ ДО ТЕСТОВИХ ПИТАНЬ

П	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
В	4	2	2	1	2	1	4	1	4	3	2	1	2
П	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
В	1	2	5	3	3	3	2	5	1	3	2	3	3
П	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
В	4	1	1	4	5	1	2	4	3	1	2	3	3
П	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
В	2	2	1	4	1	1	2	1	2	2	1	4	2
П	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
В	6	5	2	4	3	5	1	4	4	2	3	3	6
П	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78
В	1	1	3	4	2	4	3	3	5	1	3	1	2
П	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91
В	3	4	1	2	5	5	1	2	1	1	3	2	6
П	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104
В	5	1	2	5	3	5	3	4	5	3	1	3	1
П	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117
В	2	2	4	3	3	3	2	3	3	2	6	1	2
П	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130
В	2	7	4	6	2	2	3	2	2	2	4	4	3
П	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140			
В	5	1	5	3	3	1	5	2	3	5			

Навчальне видання
(українська мова)

Колісник Надія Василівна,
Омельянчик Людмила Олександрівна

БІОЕНЕРГЕТИКА ТА ЕНЗИМОЛОГІЯ

Навчальний посібник
Для студентів III курсу біологічного факультету