

## **Лекція 1. Загальна характеристика ферментів як біологічних каталізаторів**

Питання для розгляду

1. Основні поняття і терміни, що використовуються в ензимології.
2. Порівняння ферментів з неорганічними каталізаторами
3. Загальна характеристика ферментів як біологічних каталізаторів.
4. Регуляція активності ферментів
5. Основні принципи, покладені в основу сучасної класифікації та номенклатури ферментів.

### ***1. Основні поняття й терміни, що використовуються в ензимології***

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

*Субстрат* – це речовина, з якою відбувається хімічне перетворення під дією ферменту. 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  $10^2$  циклів у секунду, глюкозооксидаза –  $17 \times 10^3$  цикли в секунду й т.д. Цей показник 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 (E)* – це кількість ферменту, яка каталізує перетворення 1 мкмоль субстрату за 1 хвилину в оптимальних умовах.

*Одиниця активності в системі СИ - катал* – відповідає кількості ферменту, яка каталізує перетворення 1 моля субстрату в 1 секунду.

Співвідношення між одиницями активності:

1 E = 16,67 нанокатал;

1 катал =  $6 \times 10^7$  E.

У медицині активність ферментів виражають найчастіше в одиницях активності на 1 л біологічної рідини – ммоль/год/л.

*Питома активність ферменту* – це активність ферменту, виражена в одиницях активності на 1 мг (або 1 г) білка або 1 мг (1 г) препарату ферменту. Використовується в біохімічній практиці.

*Активатори ферментів* – сполуки, які приводять ферменти в каталітично активний стан. Іноді це можуть бути іони металів:  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  і ін.

*Інгібітори ферментів* – сполуки, які пригнічують активність ферментів. Інгібірування може бути оборотним або необоротним.

*Специфічність ферменту* – термін, що позначає, що дія кожного ферменту строго обмежена одним субстратом або дуже невеликим числом близько споріднених сполук. В останньому випадку фермент каталізує одну й ту ж реакцію, наприклад, фосфатаза каталізує реакцію відщеплювання фосфату в  $\beta$ -гліцерофосфату, *n*-нітрофенілфосфату, аденозинмонофосфату 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".

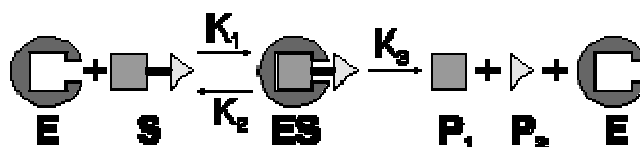


Рис. 1 – Схема ферментативної реакції

**E** – фермент;

**S** – субстрат;

**ES** – комплекс “фермент – субстрат”;

**P1, P2** – продукти реакції;

**K1, K2, K3** – константи рівноваги.

Про наявність того чи іншого ферменту у досліджуваному зразку судять по прояву реакції, що каталізує фермент. Для того, щоб кількісно визначити активність ферменту, вимірюють швидкість реакції, яка 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, розмірність швидкості реакції – ммоль/с, ммоль/хв. Для того щоб визначити 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 з використанням відповідних методів концентрацію продукту реакції або субстрату через певні проміжки часу. За даними вимірювання будують кінетичну криву.

Кінетична крива – будується за даними вимірювання декількох точок. Вона відображає зміну концентрації продукту (або субстрату) під час реакції.

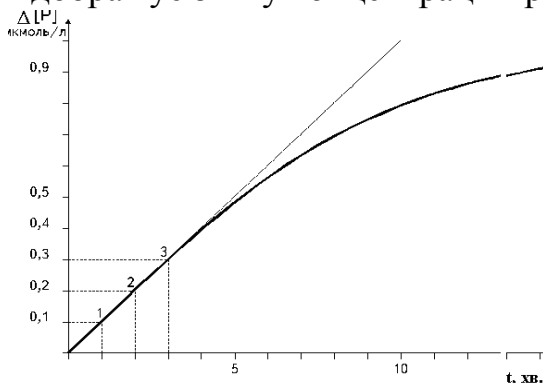


Рис. 2 – Загальний вид кінетичної кривої

$t$  – 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 точці (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 (точки 1, 2, 3 кінетичної кривої)*

**2. У ферментів є загальні властивості хімічних каталізаторів небілкової природи:**

- ✓ каталізують енергетично можливі реакції;
- ✓ енергія хімічної системи залишається постійною;
- ✓ у ході каталізу напрямок реакції не змінюється;
- ✓ не витрачаються в процесі реакції.

### **3. Загальна характеристика ферментів як біологічних каталізаторів**

Ферменти – це унікальні, специфічні каталізатори біохімічних процесів, присутні у всіх живих клітинах. Ферменти – глобулярні білки (крім РНКаз), тому їм притаманні всі властивості білків. Насамперед це наявність первинного, вторинного і третинного рівнів організації їх молекул.

✓ Нативні властивості і функції ферментів визначаються наявністю певної просторової структури (конформації) їх поліпептидного ланцюга. Зміна цієї структури в результаті теплової денатурації призводить до втрати каталітичних властивостей. Наявність у ферментів високої молекулярної маси обумовлює їх нездатність до діалізу, а присутність в молекулах заряджених функціональних груп – рухливість в електричному полі (електрофорез). Як і інші білки, ферменти утворюють колоїдні розчини, з яких можуть бути осаджені ацетоном, спиртом, сульфатом амонію – речовинами, що сприяють руйнуванню гідратної оболонки і нейтралізації електричного заряду. Доказами білкової природи ферментів також є:

- ✓ чутливість до рН,  $t$ , факторам денатурації та ін;
- ✓ при парентеральному введенні утворюють антитіла;
- ✓ гідроліз ферментів дає вільні амінокислоти, що входять до складу білків;
- ✓ штучний синтез ферментів.

Для реакцій ферментативного каталізу характерні:

- висока ефективність
- суворі вибірковість і спрямованість дії
- субстратна специфічність
- тонка і точна регуляція.

Ферменти збільшують швидкість хімічного перетворення субстрату в порівнянні з не ферментативною реакцією в  $10^9$ - $10^{12}$  разів. Настільки висока ефективність обумовлена особливостями будови активного центру. Прийнято вважати, що активний центр комплементарний перехідному стану

*субстрату* при перетворенні його в продукт. Завдяки цьому стабілізується перехідний стан і знижується активаційний бар'єр реакції.

- Більшість ферментів має високу *субстратну специфічність*, яка може бути абсолютною, відносною і стереохімічною. Субстратна специфічність означає здатність каталізувати перетворення тільки одного або декількох близьких за структурою речовин. Специфічність визначається топографією ділянки активного центру, що зв'язує субстрат. Тому фермент з усіх наявних у клітині речовин вибирає і приєднує лише свій субстрат. Для ферментів характерна специфічність не тільки по відношенню до субстрату, але й відносно шляху перетворення субстрату, *тобто сувора вибірковість і спрямованість дії*.

*Абсолютна специфічність* – вибіркова здатність ферменту каталізувати тільки єдине з можливих перетворень одного субстрату. Це можна пояснити конформаційною і електростатичною комплементарністю молекул субстрату і ферменту.

Наприклад, фермент аргіназа каталізує тільки гідроліз амінокислоти аргініну, фермент уреаза – тільки розщеплення сечовини і не діють на інші субстрати.

*Відносна специфічність* – вибіркова здатність ферменту каталізувати однотипні перетворення подібних за будовою субстратів.

Такі ферменти надають вплив на однакові функціональні групи або на один і той же тип зв'язків у молекулах субстратів. Так, наприклад, різні гідролітичні ферменти діють на певний тип зв'язків:

амілаза – на глікозидні зв'язку;

пепсин і трипсин – на пептидні зв'язки;

ліпаза і фосфоліпаза – на складноєфірні зв'язки.

Дія цих ферментів поширюється на велике число субстратів, що дозволяє організму обійтися малою кількістю травних ферментів – інакше їх було б потрібно набагато більше.

**Сtereохімічна (оптична) специфічність** – вибіркова здатність ферменту каталізувати перетворення тільки одного з можливих просторових ізомерів субстрату.

Так, більшість ферментів ссавців каталізує перетворення тільки L- ізомерів амінокислот, але не D-ізомерів. Ферменти, що беруть участь в обміні моносахаридів, навпаки, каталізують перетворення тільки D-, але не L-фосфосахарів. Глікозидази специфічні не лише до моносахаридного фрагменту, а й характеру глікозидного зв'язку. Наприклад,  $\alpha$ -амілаза розщеплює  $\alpha$ -1,4-глікозидні зв'язки в молекулі крохмалю, але не діє на  $\alpha$ -1,2-глікозидні зв'язку в молекулі сахарози.

Активність ферментів *регулюється* в процесі їх біосинтезу (у тому числі завдяки утворенню *ізоферментів*, які каталізують ідентичні реакції, але відрізняються будовою і каталітичними властивостями), а також умовами середовища (рН, температура, іонна сила розчину) і численними інгібіторами і активаторами, присутніми в організмі. Інгібіторами і активаторами можуть служити самі субстрати (в певних концентраціях), продукти реакції, а також кінцеві продукти в ланцюзі послідовних перетворень речовини.

#### **4. Регуляція дії ферментів здійснюється з використанням різних механізмів.**

В метаболічних шляхах реалізується механізм інгібування за принципом зворотнього зв'язку. Суть регуляції за принципом зворотнього зв'язку: кінцевий продукт метаболічного шляху при досягненні певної концентрації інгібує вхідний фермент шляху. В метаболічних шляхах контролюється активність лімітуючих ферментів, тих ферментів, активність яких в нормі найменша. Регуляція здійснюється або контролем активності метаболітами, лібо зміною кількості ферменту (частіше активація синтезу молекул фермента).

*Регуляція активності ферментів шляхом хімічної модифікації:*

- ✓ обмежений протеоліз (пепсиноген → пепсин)
- ✓ фосфорилювання;
- ✓ метилірування
- ✓ ацетилювання
- ✓ аденілірування та ін.

Регуляція активності ферментів інгібіторами: конкурентними, неконкурентними та безконкурентними.

- ✓ Активність ферментів регулюється умовами середовища
- ✓ -  $t^{\circ}$ , рН, іонна сила та ін.
- ✓ ізостерична регуляція здійснюється за допомогою S або P
- ✓ - субстратна активація і інгібування;
- ✓ ретроінгібування (інгібування продуктом);
- ✓ алостерична регуляція за допомогою ін речовин не є ні S або P даної реакції.

#### **5. Основні принципи, покладені в основу сучасної класифікації та номенклатури ферментів.**

В основу класифікації покладено найважливіша ознака, за якою один фермент відрізняється від іншого це реакція, яку він каталізує. Число типів хімічних реакцій порівняно невелико, що дозволило розділити всі відомі в даний час ферменти на 6 найважливіших класів, залежно від типу реакції, що каталізуються. Такими класами є:

- 1) Оксидоредуктази, каталізують окислювально-відновні реакції
- 2) Трансферази- перенесення функціональних груп:
- 3) гідролази – реакції розщеплення за участю води:
- 4) ліази – розрив зв'язків без участі води, з утворенням подвійних зв'язків:
- 5) ізомеразы – каталізують реакції ізомеризації:
- 6) лігази – синтез з витратою молекул АТФ:

Ферменти кожного класу ділять на підкласи, керуючись будовою субстратів. У підкласи об'єднують ферменти, що діють на схоже побудовані субстрати. Підкласи розбивають на підпідкласи, в яких ще суворіше уточнюють структуру хімічних груп, що відрізняють субстрати один від одного. У середині підпідкласів перераховують індивідуальні ферменти. Усі підрозділи класифікації мають свої номери. Таким чином, будь фермент отримує *свій унікальний кодовий номер*, що складається з чотирьох чисел, розділених крапками. Перше число позначає клас, друге – підклас, третє – підпідклас, четверте – номер ферменту в межах підпідкласа. Наприклад, фермент  $\alpha$ -амілаза, що розщеплює крохмаль, позначається як 3.2.1.1, де:

3 - тип реакції (гідроліз) ;

2 - тип зв'язку в субстраті (глікозидний) ;

1 - різновид зв'язку (O- глікозидний) ;

1 - номер ферменту в підпідкласі.

Вищеописаний десятковий спосіб нумерації має одну важливу перевагу: він дозволяє обійти головну незручність наскрізної нумерації ферментів, а саме: необхідність при включенні до списку знову відкритого ферменту змінювати номери всіх наступних. Новий фермент може бути поміщений в кінці відповідного підпідкласа без порушення всієї іншої нумерації. Точно так само при виділенні нових класів, підкласів та підпідкласів їх можна додавати без порушення порядку нумерації раніше встановлених підрозділів. Якщо після отримання нової інформації виникає необхідність змінити номери деяким ферментам, колишні номери не присвоюють новим ферментам, щоб уникнути непорозумінь.

### ***Поняття про систематичне і робочу назви ферменту, їх використання.***

Згідно з рекомендаціями міжнародного союзу по номенклатурі і класифікації, ферменти отримують два роду назв: систематична і робоча

*Систематична назва складається з двох частин.* Перша частина містить назву субстрату або субстратів, часто найменування коферменту, друга частина вказує на природу реакції, що каталізуються, і включає назву класу, до якого належить даний фермент. При необхідності наводиться додаткова інформація про реакцію в дужках після другої частини назви. Систематична назва надається тільки тим ферментам, каталітична дія яких повністю вивчена.

Наприклад, систематичне назва  $\alpha$ -амілази – 1,4- $\alpha$ -D-глюкан-глюканогідролаза. Звичайно, така назва дуже незручна для запам'ятовування і виголошення. Тому поряд з систематичними Комісія з ферментів IUBMB рекомендує використовувати робочі (спрощені) назви ферментів.

Робоча назва ферменту має бути достатньо короткою для вживання. Як робочі назви в ряді випадків може бути використано тривіальна назва, якщо вона не є помилковою або двозначною. В інших випадках вона будується на тих же загальних принципах, що і систематичне назва, але з мінімальною деталізацією. У наукових публікаціях при першій згадці про фермент прийнято вказувати його систематичну назву і кодовий номер, а надалі користуватися його робочою назвою.

***Приклад: основні правила побудови систематичних і робочих назв різних класів ферментів:***

Оксидоредуктази. Назва ферментів цього класу будується за схемою донор: акцептор-оксидоредуктаза. Согласно тривіальної номенклатури, оксидоредуктази, отщеплюють атоми водню або електрони і переносять їх на будь акцептор, крім кисню, називаються дегідрогенази. Оксидоредуктази, що використовують кисень як акцептора атомів водню або електронів, називаються оксидазами. Деякі ферменти, яким властива переважно відновлююча дія, носять назву редуктаз. Всі перераховані найменування можуть бути використані для побудови робочої назв оксидоредуктаз.

**Робочі назви ферментів.**

Утворюються додаванням суфікса -аза до назви субстрату.

Наприклад:

- тирозиназа - окислює тирозин;
- мальтаза - гідролізує мальтозу;

Загальні назва не описує хімічну реакцію.