

Министерство образования Республики Беларусь  
Белорусский государственный университет  
Биологический факультет  
Кафедра биохимии

СОГЛАСОВАНО

Заведующий кафедрой

\_\_\_\_\_Семак И. В.

«16» марта 2022 г.

СОГЛАСОВАНО

Декан факультета

\_\_\_\_\_Демидчик В. В.

«24» марта 2022 г.

СОГЛАСОВАНО

Председатель

учебно-методической комиссии факультета

\_\_\_\_\_Поликсенова В. Д.

«24» марта 2022 г.

Энзимология

Электронный учебно-методический комплекс  
для специальности: 1-31 01 02 «Биохимия»

Регистрационный № 2.4.2-20/247

Составитель:

Кукулянская Т. А., кандидат биологических наук, доцент

Рассмотрено и утверждено на заседании Научно-методического совета БГУ  
18.03.2022 г., протокол № 4.

Минск 2022

УДК 577.15(075.8)  
Э 661

Утверждено на заседании Научно-методического совета БГУ  
Протокол № 4 от 18.03.2022 г.

Решение о депонировании вынес:  
Совет биологического факультета  
Протокол № 8 от 24.03.2022 г.

С о с т а в и т е л ь :

Кукулянская Татьяна Александровна, кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры биохимии биологического факультета Белорусского государственного университета.

Рецензенты:

кафедра физиологии и биохимии Учреждения образования «Белорусский государственный университет физической культуры» (заведующий кафедрой Рубченья И. Н., кандидат биологических наук, доцент);

Руткевич С. А., доцент кафедры физиологии человека и животных Белорусского государственного университета, кандидат биологических наук, доцент.

Энзимология : электронный учебно-методический комплекс для специальности: 1-31 01 02 «Биохимия» / БГУ, Биологический фак., Каф. биохимии ; сост. Т. А. Кукулянская. – Минск : БГУ, 2022. – 71 с. : ил., табл. – Библиогр.: с. 70–71.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для студентов специальности 1-31 01 02 «Биохимия» биологического факультета Белорусского государственного университета. Содержание ЭУМК предполагает изучение следующих вопросов: особенности биокаталитических процессов, структурно-функциональная организация ферментов и механизм их действия, внутриклеточная локализация и организация ферментов, а также молекулярные механизмы регуляции активности ферментов *in vivo*.

## СОДЕРЖАНИЕ

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА.....	5
1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ.....	7
1.1. Энзимология как наука о ферментах. Общая характеристика ферментов как биокатализаторов .....	7
1.2. Организация ферментов в клетках и тканях .....	9
1.3. Выделение и очистка ферментов.....	10
1.4. Способы выражения активности фермента и методы её определения .....	11
1.5. Классификация и номенклатура ферментов .....	13
1.6. Структура ферментов .....	17
1.6.1. Структура и функции кофакторов .....	18
1.6.2. Структурная организация апофермента .....	23
1.7. Механизм действия ферментов .....	24
1.8. Регуляция активности ферментов .....	31
1.8.1. Регуляция биосинтеза ферментов .....	32
1.8.2. Регуляция каталитической активности ферментов .....	34
1.9. Влияние pH и температуры на активность ферментов .....	40
1.9.1. Влияние величины pH на скорость ферментативной реакции .....	40
1.9.2. Влияние температуры на скорость ферментативной реакции .....	41
2. ПРАКТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ.....	44
2.1. Получение препарата супероксиддисмутазы и определение активности фермента .....	44
2.2. Выделение, определение активности и изучение свойств алкогольдегидрогеназы из пекарских дрожжей .....	46
2.3. Выделение, определение активности и изучение свойств лактатдегидрогеназы .....	49
2.4. Определение активности каталазы и изучение зависимости активности фермента от температуры .....	52
2.5. Определение содержания глюкозы глюкозооксидазным методом .....	53

2.6. Справочные материалы .....	54
2.6.1. Определение неорганического фосфата с аскорбиновой кислотой .....	54
2.6.2. Определение содержания белка биуретовым методом.....	55
2.6.3. Определение содержания белка методом Лоури.....	55
2.6.4. Буферные смеси .....	57
3. РАЗДЕЛ КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ.....	59
3.1. Структура рейтинговой системы.....	59
3.2. Задания, тесты и задачи для самоконтроля .....	59
3.3. Темы рефератов.....	66
3.4. Вопросы для подготовки к экзамену .....	67
4. ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЙ РАЗДЕЛ.....	70
4.1. Учебно-программные материалы.....	70
4.2. Рекомендуемая литература .....	70
4.3. Электронные ресурсы.....	71

## ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) по учебной дисциплине «Энзимология» создан в соответствии с требованиями Положения об учебно-методическом комплексе на уровне высшего образования и предназначен для студентов специальности 1-31 01 02 Биохимия. Содержание разделов ЭУМК соответствует образовательным стандартам высшего образования данных специальностей. Главная цель ЭУМК – оказание методической помощи студентам в систематизации учебного материала в процессе подготовки к итоговой аттестации по курсу «Энзимология».

Предметом учебной дисциплины «Энзимология» являются структура, механизм действия и регуляция активности ферментов. Целью учебной дисциплины является формирование у студентов представления о фундаментальной роли ферментов в обмене веществ и энергии, механизмах реализации наследственной информации, регуляции и интеграции процессов метаболизма в живых организмах.

Учебная дисциплина предусматривает изучение особенностей биокаталитических процессов, структурно-функциональной организации ферментов и механизмов их действия, внутриклеточной локализации и организации ферментов, а также молекулярных механизмов регуляции активности ферментов *in vivo*.

Электронный учебно-методический комплекс предназначен для более полного у глубокого изучения дисциплины студентами, в результате чего обучающийся должен: **знать**: - принципы и особенности ферментативного катализа; - классификацию, номенклатуру и структуру ферментов;

- механизмы действия и пути регуляции ферментативной активности; - методы выделения, очистки и количественной оценки ферментов; - теоретическую и практическую значимость энзимологии; - новейшие достижения и перспективы развития энзимологии; **уметь**: - использовать знания энзимологии для объяснения особенностей протекания химических реакций в живых организмах как в норме, так и при возникновении патологии, связанной с изменением ферментативной активности; - использовать современные методы получения ферментов из биологического материала, провести количественную оценку ферментного препарата; - использовать энзиматические методы исследований в экспериментальной биохимии; **владеть**: - основными методическими приемами выделения и очистки ферментов; - методами количественной оценки содержания ферментов в биологических образцах; - основными методами определения ферментативной активности.

Структура ЭУМК включает:

1. Учебно-методическое обеспечение дисциплины

1.1. Теоретический раздел (учебное издание для теоретического изучения дисциплины в объеме, установленном типовым учебным планом по специальности).

1.2. Практический раздел (материалы для проведения практических занятий по дисциплине в соответствии с учебным планом).

2. Контроль самостоятельной работы студентов (материалы текущей и итоговой аттестации, позволяющие определить соответствие учебной деятельности обучающихся требованиям образовательных стандартов высшего образования и учебно-программной документации, в т.ч. вопросы для подготовки к экзамену, задания, тесты, вопросы для самоконтроля, тематика рефератов и др.).

3. Вспомогательный раздел.

3.1. Учебно-программные материалы (учебная программа для учреждения высшего образования по учебной дисциплине).

3.2. Информационно-аналитические материалы (список рекомендуемой литературы, перечень электронных образовательных ресурсов и их адреса и др.).

Работа с ЭУМК должна включать на первом этапе ознакомление с тематическим планом дисциплины, представленным в учебной программе, а также тематикой лекций и лабораторных занятий. Для подготовки к лабораторным занятиям и промежуточным зачетам необходимо использовать материалы, представленные в разделе учебно-методическое обеспечение дисциплины, а также материалы для текущего контроля самостоятельной работы. В ходе подготовки к итоговой аттестации рекомендуется ознакомиться с требованиями к компетенциям по дисциплине, изложенными в учебной программе, структурой рейтинговой системы, а также перечнем вопросов к экзамену. Для написания рефератов могут быть использованы информационно-аналитические материалы, указанные в соответствующем разделе ЭУМК.

# 1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ

Конспект лекций по дисциплине «Энзимология» для студентов специальности «Биохимия», обеспечивающих получение высшего образования. В пособии излагается материал всего лекционного курса: классификация и номенклатура ферментов, структурная организация ферментов, разнообразие и функции кофакторов, механизм действия и регуляция активности ферментов, разнообразие и применение ферментов.

Также кратко описаны методы и подходы, используемые энзимологии для изучения свойств, механизма действия и других характеристик ферментативного катализа. Особое внимание уделено вопросам, имеющим непосредственное отношение к практической и научной деятельности биохимиков. Предназначено пособие для студентов специальности «Биохимия», а также других биологических специальностей.

## 1.1. Энзимология как наука о ферментах. Общая характеристика ферментов как биокатализаторов

**Энзимология** (от греч. “en zyme” – “в дрожжах”) – наука о ферментах (от лат. “fermentatio” – “брожение”), их структуре, механизмах действия и путях регуляции их активности.

### **Основные вехи истории развития энзимологии как науки:**

нач. 17 в. – введение в научную лексику терминов “фермент” и “энзим” голландским естествоиспытателем Я.Б. Ван-Гельмонтом.

18 в. – один из основных вопросов химии – природа процессов, происходящих в живых системах. Основная модель и главный объект анализа: ферментативные процессы уксуснокислого и виннокислого брожения.

1799 г. – конкурсный вопрос Парижской академии наук: «Чем отличаются животные и растительные вещества, действующие как фермент, от тех веществ, которые подвергаются ферментации?»

1814 г. – открытие К.Кирхгофом ферментативного действия водных вытяжек из проросшего ячменя, расщепляющих крахмал.

1833 г. – получение А. Пайеном и Ж. Персо первого очищенного ферментного препарата амилазы.

1858 – М. Траубе доказал белковую природу ферментов.

1862 – А. Я. Данилевский провел разделение панкреатической амилазы и трипсина.

1894 – Э. Фишер доказал специфическое взаимодействие ферментов с субстратами, а также впервые применил ферменты для синтеза химических соединений.

1907 – Эдуарду Бухнеру (1860 - 1917) присуждена Нобелевская премия по химии «За проведение научно-исследовательской работы по биологической химии и открытие внеклеточной ферментации». Доказана возможность брожения *in vitro* под действием бесклеточных экстрактов (зимаза – комплекс ферментов

брожения).

1926 г. – получение Дж. Самнером кристаллического препарата уреазы.

1956 г. – установление С. Муром, У. Стайном, К. Анфинсеном аминокислотной последовательности рибонуклеазы из поджелудочной железы быка.

**Ферменты** представляют собой природные биокатализаторы белковой природы. В настоящее время в биологических системах обнаружено несколько тысяч индивидуальных ферментов, около 5000 – выделено, изучено и внесено в базу данных. Помимо белковых биокатализаторов существуют природные катализаторы – **рибозимы** – малые ядерные молекулы РНК.

В 1989 г. Чек и Альтман получили Нобелевскую премию по химии за «обнаружение каталитических свойств РНК». Рибозимы – низкомолекулярные молекулы РНК, способные осуществлять низкотемпературный катализ. Именно рибозимы катализируют реакции, сопровождающие созревание тРНК и рРНК; не исключается их участие в процессинге и сплайсинге мРНК. Предполагается, что рибозимы занимали центральное место в химическом катализе процессов, связанных со становлением жизни на Земле.

Предметом изучения энзимологии являются именно ферменты, или энзимы. Ферменты как биокатализаторы имеют черты сходства и различия с неорганическими химическими катализаторами.

К свойствам, объединяющим ферменты с другими катализаторами, относят:

1. способность катализировать только термодинамически возможные процессы.

2. ускорение наступления состояния равновесия обратимого процесса, при отсутствии возможности смещения равновесия в сторону прямой или обратной реакции.

3. способность образовывать с реагирующими веществами (субстратами реакции) высокореакционные промежуточные соединения.

4. высвобождение в неизменном виде после завершения катализируемого процесса.

К свойствам, характеризующим ферменты как особый тип катализаторов, относят:

1. высокую активность ферментов по сравнению с неорганическими катализаторами. Известно, например, что ионы железа ускоряют разложения пероксида водорода на воду и молекулярный кислород. Атомы того же железа, но в составе фермента каталазы действуют в 10 млрд. раз эффективнее, и всего 1 мг железа в ферменте способен заменить в данной реакции 10 тонн неорганического железа.

2. способность ферментов функционировать в очень мягких условиях: относительно низкая температура, физиологические значения рН и давления. Так, гидролитический распад белка до аминокислот в присутствии неорганических катализаторов (концентрированных кислот и щелочей) осуществляется при температуре 100 °С за несколько часов. Этот же процесс при каталитическом действии протеаз протекает за несколько минут при температуре 30-40 °С.

3. высокую специфичность действия ферментов.
4. высокую способность реагировать на различные регуляторные воздействия.
5. свойства, обусловленные белковой природой большинства ферментов (термолабильность, зависимость активности от величины рН среды и др.).

## 1.2. Организация ферментов в клетках и тканях

Органы и ткани многоклеточных организмов отличаются друг от друга не только по морфологическим и анатомическим признакам, химическому составу, но и по характеру протекающих в них метаболических процессов, который, в свою очередь, определяется “набором” ферментов и их активностью. Особенности распределения ферментов в различных органах и тканях можно использовать в клинической практике для диагностики заболеваний. Так, креатинкиназа – это фермент мышц, в норме в сыворотке крови она содержится в следовых количествах. Однако при повреждении скелетной мускулатуры (мышечная дистрофия) и миокарда (коронарная недостаточность), активность креатинкиназы в крови возрастает в 50 (!) раз.

Внутри клетки ферменты, как правило, содержатся и функционируют в строго определенных компартментах. Так, ферменты гликолиза находятся в цитозоле, ферменты цикла Кребса и  $\beta$ -окисления жирных кислот – в матриксе митохондрий, ферменты окислительного фосфорилирования – во внутренней мембране митохондрий и т.д. (рисунок).

Многие ферменты благодаря их строго определенному расположению в клетке используют как **маркеры** тех или иных внутриклеточных структур:

- маркеры плазматических мембран -  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФаза и аденилатциклаза;
- маркер цитозоля – лактатдегидрогеназа;
- маркер аппарата Гольджи – галактозилтрансфераза;
- маркер лизосом – кислая фосфатаза;
- маркер пероксисом – каталаза и оксидаза D-аминокислот;
- маркер эндоплазматического ретикулума – глюкозо-6-фосфатаза и НАДФН-цитохром с – редуктаза.

### *Ферментные системы и принципы их организации.*

**Ферментная система (мультимолекулярный ферментный комплекс)** представляет собой совокупность ферментов, катализирующих последовательные стадии превращения определенного субстрата.

Типичными примерами ферментных систем являются пируватдегидрогеназная и  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназная системы окислительного декарбоксилирования пирувата и  $\alpha$ -кетоглутарата животных, соответственно, синтетаза жирных кислот дрожжей, дыхательная цепь митохондрий и хлоропластов.

**Особенностями** ферментных систем являются: пространственная и функциональная ассоциация ферментов в комплексе; обеспечение ферментной системой определенной последовательности катализируемых реакций (в

пространстве и во времени); высокая молекулярная масса комплекса ( $2 \cdot 10^6 - 10 \cdot 10^6$  Да).

**По особенностям организации** мультиферментные системы можно разделить на 3 группы:

1. Растворимые мультиферментные системы (цитоплазматические). Небольшие молекулы субстратов, обладающие высокой скоростью диффузии, легко переходят от одного фермента к другому. Например, ферменты метаболических путей (гликолиза, пентозомонофосфатного пути окислению глюкозы, цикла трикарбоновых кислот и др.).

2. Ассоциированные ферменты, функционирующие совместно. Например, синтаза жирных кислот – димер, каждая субъединица которого включает 7 ферментов, молекулы которых объединены в тесно ассоциированный недиссоциирующий комплекс.

3. Ферментные системы, связанные с крупными надмолекулярными структурами. Например, дыхательная цепь митохондрий, расположенная во внутренней мембране митохондрий; монооксигеназная система окисления, ассоциированная с мембраной эндоплазматического ретикулаума .

### 1.3. Выделение и очистка ферментов

Работа по выделению и очистке фермента включает несколько этапов.

1 этап: выбор количественного теста для определения активности фермента. В данном случае скорость определения ферментативной активности более важна, нежели точность процедуры.

2 этап: выбор источника выделения фермента, если нет оснований получения его из определенного биологического объекта. При выборе источника фермента необходимо помнить о том, что количество данного фермента и его активность в различных тканях может сильно варьировать.

3 этап: перевод фермента в раствор. Часто для извлечения ферментов применяется экстракция буферным раствором. Однако для этого предварительно необходимо гомогенизировать клетки и, при необходимости, получить субклеточные фракции и разрушить мембранные структуры. С той целью используются различные методы гомогенизации, разрушения ультразвуком, многократного замораживания-оттаивания, экстракции детергентами (додецилсульфатом натрия, халатом натрия, тритоном X-100).

Для последующей экстракции фермента широко используются следующие буферные растворы: фосфатный (рН 4,5-9,2), ацетатный (рН 3,6-5,8), цитратный (рН 1,1-4,1), цитратно-фосфатный (рН 2,2-8,0), трис (7,2-9,8). Варьируя ионную силу и рН буферного раствора, можно добиться полной экстракции фермента.

4 этап: очистка полученного раствора фермента от примесей. С этой целью применяются различные методы разделения и фракционирования белков и белковых смесей.

К наиболее используемым **методам фракционирования** относятся:

1. фракционное осаждение при изменении рН;

2. фракционная денатурация нагреванием (данный метод используется только при работе с термостабильными ферментами);
3. фракционное осаждение органическими растворителями (ацетоном);
4. фракционирование нейтральными солями (высаливание).

Для получения высокоочищенных препаратов ферментов используют методы электрофореза и хроматографии.

К наиболее используемым **хроматографическим методам** относятся:

1. Адсорбционная хроматография.
2. Распределительная хроматография.
3. Ионообменная хроматография.
4. Аффинная хроматография (хроматография по сродству).
5. Гель-хроматография (метод молекулярных сит).

Для очистки ферментов широко используют также **электрофоретические методы**, основанные на движении заряженных молекул белков в электрическом поле со скоростью, зависящей от отношения массы молекулы к величине их заряда при данном рН и ионной силе раствора.

Применение перечисленных методов позволяет получать высокоочищенные препараты ферментов. Хранят полученные препараты в замороженном или лиофилизированном состоянии.

#### **Оценка гомогенности полученного ферментного препарата.**

Для оценки чистоты выделенного фермента используют следующие методы: ультрацентрифугирование в градиенте плотности сахарозы или хлорида цезия, электрофорез в полиакриламидном геле, изоэлектрическое фокусирование, иммунохимические методы и определение растворимости белка.

### **1.4. Способы выражения активности фермента и методы её определения**

**Единица активности фермента** – это количество фермента, которое в стандартных условиях катализирует превращение 1 мкмоль субстрата в 1 мин (1 МЕ = 1 мкмоль/мин).

**1 КАТАЛ** – количество фермента, способное в течение 1 с обеспечить превращение 1 моля субстрата в стандартных условиях.

$$1 \text{ КАТАЛ} = 6 \cdot 10^7 \text{ МЕ.}$$

**Удельная активность** – число единиц ферментативной активности, приходящееся на 1 мг белка (1 мкмоль/мг белка · мин).

**Молекулярная активность** – число молей субстрата, которые подвергаются превращению молекулой фермента за 1 мин.

**Активность каталитического центра** – число молекул субстрата, которые претерпевают превращение за 1 мин в расчете на 1 каталитический центр.

**Число оборотов фермента** – число молекул субстрата, претерпевающих превращение за 1 мин в расчете на 1 активный центр или 1 активную молекулу фермента. Для большинства ферментов число оборотов составляет 1-10 тысяч в мин.

Для определения активности ферментов используются следующие методы:

**1. Химические методы** предполагают отбор проб из реакционной смеси через определенные промежутки времени (например, через 1 мин) и определение количества продукта (субстрата) реакции определенными химическими методами.

Химическими методами определяется, например, активность фосфатаз, фосфорилаз, нуклеотидаз, в ферментативных реакциях которых участвуют различные фосфорные соединения, легко обнаруживаемые методом Фиске и Суббароу (голубая окраска развивается при взаимодействии неорганического фосфата с молибдатом аммония в присутствии восстановителя – хлорида олова).

**2. Поляриметрические методы** используют для определения активности ферментов, обладающих стереоспецифичностью, и если при этом либо продукт реакции, либо субстрат оптически неактивны, а также в случае, когда и субстрат, и продукт оптически активны, но значительно отличаются по величине удельного вращения. За ходом реакции можно проследить по изменению величины оптического вращения.

Например, измерение активности фермента сахаразы (субстрат сахароза –  $\alpha$ ,  $D^{20\text{ }^\circ\text{C}} = + 66,5^\circ$ ; продукты глюкоза –  $\alpha$ ,  $D^{20\text{ }^\circ\text{C}} = + 52,5^\circ$  и фруктоза –  $\alpha$ ,  $D^{20\text{ }^\circ\text{C}} = - 92,4^\circ$ ).

**3. Хроматографические методы** используют для определения активности ферментов, если субстраты и продукты катализируемых ими реакций имеют различные хроматографические характеристики. Такие вещества могут быть разделены хроматографически и количественно определены могут быть разделены с помощью химических или спектрофотометрических методов.

Такой способ применяется, например, при выделении и изучении аминотрансфераз, изоферментов цитохрома P<sub>450</sub> и др.

**4. Манометрические методы** для определения активности ферментов, катализирующие реакции, один из компонентов которых находится в газообразном состоянии.

Например, реакции, протекающей с выделением CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> или поглощением газообразных веществ (карбоксилазы/декарбоксилазы, оксидазы, каталаза, дезаминазы и др.).

**5. Спектрофотометрические методы** – наиболее часто используемые методы определения ферментативной активности, если продукты или субстраты процессов имеют характеристические максимумы поглощения в видимой или ультрафиолетовой области спектра. Непрерывно измеряя величину оптической плотности, можно наблюдать за ходом реакции и определить изменение концентраций веществ.

Спектрофотометрический метод широко используется для определения окислительно-восстановительных ферментов, кофакторами которых являются флавиновые или пиримидиновые кофакторы, имеющие различные характеристические максимумы поглощения в окисленной и восстановленной форме (более подробно спектральные методы определения активности будут рассмотрены в практическом разделе).

**6. Флуоресцентные методы** применяют для определения активности ферментов, кофакторы которых способны к флуоресценции в окисленной или

восстановленной форме (флавиновые соединения флуоресцируют в окисленной форме, пиридиновые кофакторы флуоресцируют в восстановленном состоянии). Это метод может быть использован для изучения дегидрогеназных реакций.

**7. Радиометрические методы** основаны на радиоиммунном анализе, основанном на конкуренции между продуктом реакции и его аналогом, меченым изотопом, за центры связывания на молекуле антитела.

## 1.5. Классификация и номенклатура ферментов

Энзимология довольно долго не располагала строгой научной номенклатурой ферментов. Наименования ферментов давали по случайным признакам (тривиальная номенклатура), по названию субстрата (рациональная), по химическому составу фермента и, наконец, по типу катализируемой реакции и характеру субстрата.

Примерами **тривиальной номенклатуры** могут служить названия таких ферментов, как пепсин (от греч. “пепсис” – “пищеварение”), трипсин (от греч. “трипсис” – “разжижаю”), папаин (от названия дынного дерева *Carica papaya*, из сока которого он выделен).

Наибольшее распространение получила **рациональная номенклатура**, согласно которой название фермента составляется из названия субстрата и характерного окончания “-аза”. Так, фермент, ускоряющий реакцию гидролиза крахмала, получил название амилаза (от греч. “амилон” – “крахмал”), гидролиза липидов – липаза (от греч. “липос” – “жир”), гидролиза белков – протеаза, гидролиза мочевины – уреаза (от греч. “уреа” – “мочевина”) и т.д.

Когда методами аналитической химии были достигнуты известные успехи в расшифровке химической природы простетических групп, возникла новая номенклатура ферментов. Их стали именовать по названию простетической группы, например, геминфермент, пиридоксальфермент и т.д.

Затем в названии фермента стали указывать как на характер субстрата, так и на тип катализируемой реакции. Например, фермент, отнимающий атомы водорода от молекулы янтарной кислоты, называют сукцинатдегидрогеназой, подчеркивая этим и химическую природу субстрата, и его окисление в процессе ферментативной реакции.

В 1961 г. Международная комиссия по номенклатуре ферментов приняла новый проект номенклатуры ферментов, построенный на строго научных принципах. Согласно этой номенклатуре название фермента состоит из химического названия субстрата и названия реакции, осуществляемой данным ферментом.

Если катализируемая ферментом реакция сопровождается переносом группы атомов от субстрата к акцептору, название фермента включает также химическое название акцептора. Например, фермент, катализирующий реакцию переаминирования между L-аланином и  $\alpha$ -кетоглутаратом, называется L-аланин: $\alpha$ -кетоглутарат-аминотрансферазой. В этом названии отмечены сразу 3 особенности реакции: 1) субстратом является L-аланин, 2) акцептором служит  $\alpha$ -

кетоглутарат, 3) от субстрата к акцептору передается аминогруппа.

Одновременно с принятием подобной номенклатуры ферментов, была принята классификация ферментов, в основе которой лежит тип катализируемой реакции. В настоящее время ферменты подразделяются на 7 классов.

### **Классы ферментов:**

1. **оксидоредуктазы** – ферменты, ускоряющие окислительно-восстановительные реакции.

2. **трансферазы** – ферменты, ускоряющие реакции переноса функциональных групп.

3. **гидролазы** – ферменты, ускоряющие реакции гидролитического распада.

4. **лиазы** (синтазы) – ферменты, ускоряющие негидролитическое отщепление от субстратов определенных групп атомов с образованием двойной связи или присоединение групп атомов по двойной связи.

5. **изомеразы** – ферменты, ускоряющие пространственные или структурные перестройки в пределах одной молекулы.

6. **лигазы** (синтетазы) – ферменты, ускоряющие реакции синтеза, сопряженные с распадом макроэргов.

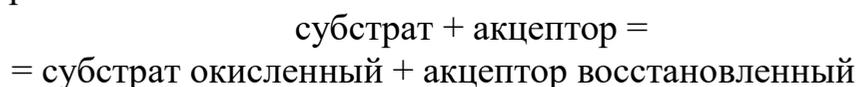
7. **транслоказы** – ферменты, ускоряющие различные модификации веществ, сопровождающиеся переносом веществ через мембраны.

В 1972 г. комиссией по номенклатуре биохимических соединений Международного союза теоретической и прикладной химии были предложены "Правила номенклатуры ферментов", имеющие кодовое четырёхзначное цифровое обозначение, где первая цифра обозначает класс фермента, вторая цифра (подкласс) уточняет природу преобразуемой группы или модифицируемой связи, третья (подподкласс) - уточняет природу дополнительных участников реакции (например, донора и акцептора) и четвёртая - порядковый номер фермента в данной подгруппе.

Например, шифр уреазы выражается цифрами 3.5.1.5. Это означает, что уреазы относятся к 3-ему классу ферментов, все представители которого катализируют реакции гидролиза. Вторая цифра говорит о том, что уреазы принадлежат к 5-ому подклассу этого класса, куда относятся ферменты, ускоряющие гидролиз связей типа C-N, не являющихся пептидными. Третья цифра (1) указывает на принадлежность уреазы к подподклассу, представители которого ускоряют гидролиз линейных амидов. Последняя цифра (5) - это порядковый номер уреазы в этом подподклассе.

### ***Общая характеристика ферментов класса оксидоредуктазы.***

К классу оксидоредуктаз относят ферменты, катализирующие реакции окисления-восстановления, общая схема которых может быть представлена следующим образом:



Систематическое наименование ферментов составляют по формуле "донор: акцептор-оксидоредуктаза".

Те оксидоредуктазы, которые переносят протоны и электроны непосредственно на атомы кислорода, называются **аэробными дегидрогеназами, или оксидазами**. Оксидоредуктазы, переносящие протоны и электроны на органические соединения, называют **анаэробными дегидрогеназами, или редуктазами**.

В качестве кофакторов оксидоредуктаз выступают НАД<sup>+</sup>, НАДФ<sup>+</sup>, ФАД (ФМН), железопорфирины, убихинон и др.

Более 500 оксидоредуктаз, подразделяют на 23 подкласса в зависимости от природы донора электронов.

1.1. ферменты, действующие на СН-ОН группу донора (алкогольдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа, малатдегидрогеназа).

1.2. ферменты, окисляющие альдегидную или кетонную группу (глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа).

1.3. ферменты, обеспечивающие перенос 2 протонов с образованием ненасыщенных связей (сукцинатдегидрогеназа).

1.4. ферменты, действующие на СН-NH<sub>2</sub> группу донора (ферменты окислительного дезаминирования аминокислот).

Подклассы подразделяются на подподклассы в зависимости от природы акцептора электронов.

### ***Общая характеристика ферментов класса трансферазы.***

В этот класс входят ферменты, ускоряющие перенос функциональных групп от одного соединения к другому

Название этих ферментов составляют по формуле "донор: транспортируемая группа-трансфераза".

В качестве кофакторов трансфераз выступают: тетрагидрофолиевая кислота, пиридоксальфосфат (пиридоксаминфосфат), коэнзим А и др.

В настоящее время известно порядка 500 трансфераз, которые подразделяют на 10 подклассов в зависимости от природы переносимых групп. Например,

2.1. ферменты, переносящие одноуглеродные остатки: метильные, оксиметильные, формильные, карбоксильные (метилтрансфераза).

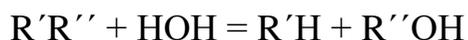
2.2. ферменты, переносящие альдегидные и кетонные группы (транскетолаза, трансальдолаза);

2.3. ферменты, ускоряющие перенос остатков карбоновых кислот на аминокислоты, амины, спирты и другие соединения (ацилтрансферазы);

2.4. ферменты, ускоряющие перенос гликозильных остатков (сахарозоизомераза, крахмалфосфорилаза, гликогенфосфорилаза) и др.

### ***Общая характеристика ферментов класса гидролазы.***

К классу гидролаз относят ферменты, ускоряющие реакции расщепления органических соединений при участии воды:



Наименование ферментов составляют по формуле "субстрат-гидролаза" или прямым присоединением к названию субстрата суффикса "аза", например протеаза, липаза, фосфолипаза, рибонуклеаза.

Класс подразделяется на 13 подклассов, среди которых наиболее важны следующие:

3.1. эстеразы, ускоряющие реакции гидролиза сложных эфиров (липазы).

3.2. гликозидазы, ускоряющие реакции гидролиза гликозидов, в том числе углеводов (мальтаза, сахараза, амилазы).

3.3. пептид-гидролазы, ускоряющие реакции гидролиза (а в некоторых случаях, синтеза) белков, пептидов и других соединений, содержащих пептидные связи.

Пептид-гидролазы, катализирующие гидролиз небольшого числа внутренних пептидных связей в белковой молекуле, в результате чего она распадается до пептидов, называются **эндопептидазами**. Пептид-гидролазы, обеспечивающие отщепление от пептидной цепи свободных аминокислот, называются **экзопептидазами**.

Пептид-гидролазы, катализирующие гидролиз пептидов до свободных аминокислот, могут отщеплять их от пептида, начиная либо с аминокислоты, обладающей свободной аминогруппой, либо с аминокислоты, имеющей свободную карбоксильную группу. В первом случае их называют **аминопептидазами**, во втором – **карбоксипептидазами**.

3.4. амидазы, действующие на связи типа C-N, не являющиеся пептидными (уреаза, аспарагиназа, глутаминаза).

#### ***Общая характеристика ферментов класса лиазы.***

К классу лиаз относятся ферменты, ускоряющие реакции негидролитического распада органических соединений по связям C-C, C-N, C-O и др. При этом образуются двойные связи, выделяются CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, NH<sub>3</sub>. Некоторые из этих реакций обратимы, и соответствующие ферменты способны катализировать не только реакции распада, но и синтеза. Для того чтобы отличить такие ферменты от ферментов класса лигаз (которые ускоряют только реакции синтеза и называются синтетазами), их называют также **синтазами**.

Наименование ферментов данного класса составляют по схеме "субстрат – отщепляемая или присоединяемая группа – лиаза". Класс подразделяется на 7 подклассов, среди которых наиболее важны следующие:

4.1. лиазы, расщепляющие связь C-C (декарбоксилазы, альдегид-лиазы).

4.2. лиазы, расщепляющие связь C-O (фумарат-гидратаза).

4.3. лиазы, расщепляющие связь C-N (аспартат-аммиак-лиаза) и т.д.

#### ***Общая характеристика ферментов класса изомеразы.***

К этому классу относятся ферменты, ускоряющие геометрические или структурные изменения в пределах одной молекулы. Эти изменения могут

закключаться во внутримолекулярном переносе атомов водорода, фосфатных или ацильных групп, в изменении пространственного расположения атомов, в перемещении двойных связей и т.д.

Систематическое название ферментов этого класса образуют по схеме: субстрат – тип реакции изомеризации – изомераза.

Изомеразы, участвующие во внутримолекулярном переносе функциональных групп, имеют тривиальные названия – **мутазы**, например, Изомеразы, участвующие в реакциях инверсии у хиральных центров, имеют тривиальные названия – **рацемазы и эпимеразы**.

#### ***Общая характеристика ферментов класса лигазы (синтетазы).***

К классу лигаз относятся ферменты, ускоряющие синтез органических соединений за счет энергии распада АТФ.

Класс подразделяется на 6 подклассов в зависимости от типа образующейся связи, например,

6.1. Ферменты, образующие С-О связь (амино-ацил-тРНК-синтетазы).

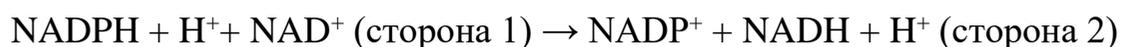
6.2. Ферменты, образующие С-S связь (ацетил-КоА-синтетаза).

6.3. Ферменты, образующие С-N связь (аспарагин-синтетаза, глутамин-синтетаза).

6.4. Ферменты, образующие С-С связь (пируваткарбоксилаза) и т.д.

#### ***Общая характеристика ферментов класса транслоказы.***

К классу транслоказ относятся ферменты, ускоряющие реакции модификации субстратов, сопровождающиеся переносом через мембраны. Например, протон-транслоцирующая (переносящая) NADP<sup>+</sup>-трансгидрогеназа:



Систематическое название: «переносимая группа – донор : акцептор - транслоказа». Деление на 6 подклассов в зависимости от переносимого соединения.

### **1.6. Структура ферментов**

Ферменты делятся на простые и сложные. **Простые ферменты** – однокомпонентные, состоят только из полипептидной (аминокислотной) части.

Например, трипсин – протеаза, молекулярная масса около 24 кДа, состоит из одной полипептидной цепи (около 220 аминокислотных остатков). Хитиназы – гликозидазы, содержат от 40 до 100 аминокислотных остатка. Известно 110 семейств хитиназ с различными аминокислотными последовательностями. Отличаются по числу и структуре хитинсвязывающих участков (доменов).

**Сложные ферменты** – двухкомпонентные, кроме полипептида (апофермента) содержат дополнительный компонент небелковой природы (кофактор). Комплекс апофермента и кофактора называется холоферментом.

Сложными ферментами являются все оксидоредуктазы (гемопротеины, флавопротеины и др.), трансферазы и др.

### 1.6.1. Структура и функции кофакторов

Кофакторы бывают двух типов:

**Коферменты** – растворимые кофакторы, связаны с апоферментом нековалентными взаимодействиями; имеют высокую константу диссоциации с полипептидом.

**Простетические группы** – нерастворимые кофакторы, связаны с апоферментом ковалентными связями; имеют низкую константу диссоциации с полипептидом.

Кофакторы каталитически неактивны (без апофермента) и не проявляют специфичность (ни в отношении апофермента, ни в отношении субстратов).

Функции кофакторов:

1. кофакторы - промежуточные переносчики атомов или функциональных групп;
2. кофакторы принимают участие в формировании активных центров сложных ферментов, участвуют в связывании субстрата и его превращении.

Большинство органических кофакторов являются производными водорастворимых витаминов (Таблица 1). Примеры наиболее распространенных кофакторов

В зависимости от выполняемых функций (типа катализируемой реакции) кофакторы подразделяются на:

1. кофакторы, участвующие в катализе окислительно-восстановительных реакций. Например, ФАД, ФМН, липоевая кислота, гем, глутатион, убихинон.

**Таблица 1 – Примеры кофакторов, производных витаминов.**

Кофактор	Витамин	Тип катализируемой реакции
Тиаминпирофосфат (ТПФ)	Тиамин (В <sub>1</sub> )	Декарбоксилирование α-кетокислот
Флавинмононуклеотид (ФМН) Флавинадениндинуклеотид (ФАД)	Рибофлавин (В <sub>2</sub> )	Окислительно-восстановительные реакции
Никотинамиддинуклеотид (НАД <sup>+</sup> ) Никотинамиддинуклеотид-фосфат (НАДФ <sup>+</sup> )	Никотинамид (В <sub>3</sub> , или РР)	Окислительно-восстановительные реакции
Пиридоксальфосфат	Пиридоксин (В <sub>6</sub> )	Перенос аминогрупп
Коэнзим А	Пантотеновая кислота (В <sub>5</sub> )	Перенос ацильных групп
Биоцитин	Биотин (В <sub>7</sub> , или Н)	Карбоксилирование/ декарбоксилирование

2. кофакторы, участвующие в катализе реакций переноса атомов и функциональных групп. Например, нуклеозидди- и нуклеозидтрифосфаты, кофермент А, тетрагидрофолиевая кислота, пиридоксальфосфат.

3. кофакторы, участвующие в катализе реакций синтеза и изомеризации. Например, тиаминпирофосфат, биотин, глутатион, пиридоксальфосфат.

### *Кофакторы оксидоредуктаз*

**Никотинамидные коферменты.** Никотинамидные коферменты принимают участие в обратимых окислительно-восстановительных реакциях, принимая при восстановлении 2 электрона и 1 протон (Рисунок 1).

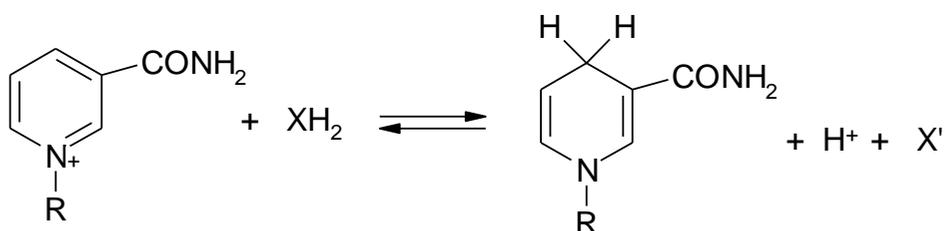


Рисунок 1 – Обратимое восстановление никотинамида.

Восстановленная форма НАДН (НАДФН) устойчива на воздухе, однако способна вновь окисляться под действием окисленных форм флавопротеинов. Окисленная форма коферментов обладает характеристическим максимумом светопоглощения при 340 нм, а восстановленная при  $\lambda = 260$  нм.

Никотинамид поступает вместе с пищей, всасывается в тонком кишечнике и переносится в печень и другие ткани и органы, где происходит синтез НАД или НАДФ. Образование коферментных (активных) форм витамина РР находится под жестким гормональным контролем гипофизадrenalной системы. После выполнения своих функций коферменты распадаются на никотинамид и АДФ-рибозу. Витамин РР выводится из организма с мочой в форме глюкуронидов.

Никотинамидные коферменты выполняют свои функции в основном в составе пиридинзависимых дегидрогеназ. Эти ферменты катализируют обратимые реакции окисления спиртов в альдегиды и кетоны (НАД-зависимая алкогольдегидрогеназа), альдегидов и кетонов в карбоновые кислоты, амины в имины. НАД и НАДФ, в основном, находятся в составе ферментов в виде коферментов (диссоциирующих) кофакторов. Никотинамидные коферменты принимают участие в основных метаболических превращениях углеводов и липидов, являются первичными акцепторами электронов, принимая их при окислении метаболитов цикла Кребса и передавая в дыхательную цепь. НАДФ является компонентом монооксигеназной системы печени, принимая участие в реакциях первой фазы детоксикации ксенобиотиков.

**Флавиновые коферменты.** Существуют две коферментных формы рибофлавина (витамина В<sub>2</sub>) – флавинмононуклеотид (ФМН) и флавинадениндинуклеотид (ФАД).

Эти коферменты катализируют реакции окисления-восстановления (Рисунок 2) в составе флавопротеинов («желтых ферментов»). В состав активного центра некоторых флавиндегидрогеназ входят также ионы железа или других металлов. Изоаллоксазиновое кольцо этих коферментов служит переносчиком атомов водорода, отщепляемых от субстрата.

Рибофлавин, поступаая с пищей, всасывается в тонком кишечнике, а далее поступает в кровь. При транспорте через клеточные мембраны под действием фермента флавокиназы и при участии АТФ рибофлавин фосфорилируется в ФМН. В печени под действием фермента ФАД-зависимая пиррофосфорилазы ФМН аденилируется и превращается в ФАД.

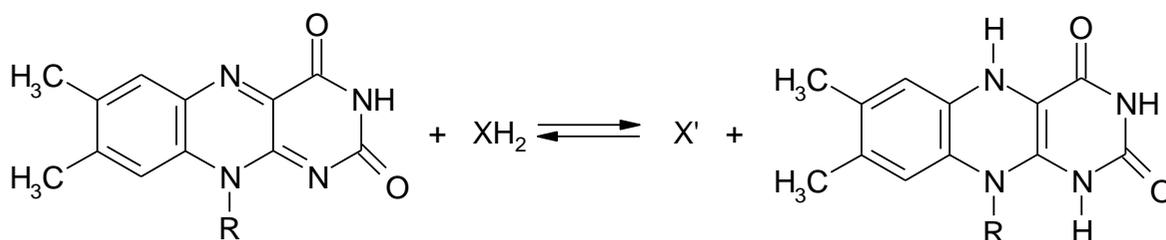


Рисунок 2 – Обратимое восстановление рибофлавина (изоаллоксазинового ядра).

Флавиновые коферменты входят в состав ФАД или ФМН зависимых дегидрогеназ, металлофлавопротеинов, монооксигеназ, гидроксилаз. Например, глюкозооксидаза – фермент, содержащий 2 молекулы ФАД, катализирует окисление глюкозы в глюконовую кислоты; ксантинооксидаза; Fe-S белки (НАДН-дегидрогеназа, сукцинат-дегидрогеназа). Флавопротеины принимают участие в реакциях энергетического обмена, являются структурными компонентами электронтранспортной цепи митохондрий (дыхательной цепи). ФАД и ФМН будучи первичными акцепторами восстановительных эквивалентов, передают их в дыхательную цепь. Флавиновые коферменты входят в состав монооксигеназной системы цитохрома Р450 и участвуют в процессах детоксикации ксенобиотиков.

После выполнения своей функции флавиновые коферменты деаденилируются и дефосфолируются до рибофлавина, окисляются и выводятся с мочой.

**Гем.** Структурной основой гема является кольцо протопорфирина IX, которое состоит из соединенный –СН– мостиками 4 пирольных колец, в центре которого находится атом Fe (рис. ). Гем входит в состав группы сложных окислительно-восстановительных ферментов: цитохромов, каталазы и пероксидазы.

Благодаря наличию в составе гема атома железа, гемопротеины способны транспортировать электроны. При этом железо обратимо окисляется, переходя из  $Fe^{2+}$  в  $Fe^{3+}$ .

### **Кофакторы трансфераз**

**Нуклеозидди- и нуклеозидтрифосфаты.** К ним относятся: АТФ, АДФ и другие три- и дифосфорилированные нуклеотиды. Они входят в состав ферментов, которые катализируют активацию веществ (например, аденилирование от АДФ, фосфорилирование от АТФ) с целью включения активированных форм в дальнейший метаболизм.

**Фосфорные эфиры углеводов (гексоз).** Они переносят остатки фосфорной кислота в ряде изомеразных реакций, являются кофакторами ферментов глюкозофосфатизомеразы; фосфоглицератмутаза и других.

**Тиаминпирофосфат (ТПФ).** Тиаминпирофосфат является производным витамина В<sub>1</sub> (тиамина). После всасывания в тонком кишечнике тиамин постыпает в печень, где происходит его фосфорилирование за счет АТФ под действием фермента тиаминфосфокиназы, в результате чего образуется три формы: тиаминмонофосфат, тиаминпирофосфат и тиаминтрифосфат.

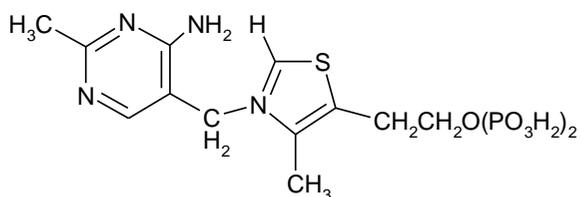
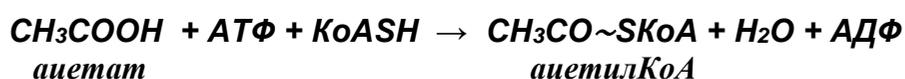


Рисунок 3 – Тиаминпирофосфат – коферментная форма тиамина.

Наиболее активным является тиаминпирофосфат (Рисунок 3), который выполняет коферментную функция в процессах карбоксилирования/декарбоксилирования, окислительного декарбоксилирования  $\alpha$ -кетокислот и перенос гликольальдегидной группы от кетосахаров на альдосахара в составе фермента транскетолазы.

**Кофермент ацетилирования (кофермент А, КоА , коэнзим А, СоА).** Кофермент А является производным витамина В<sub>3</sub> – пантотеновой кислоты (Рисунок 4). Образование КоА из витамина происходит в печени.

Функция КоА SH состоит в активации и переносе остатков карбоновых кислот



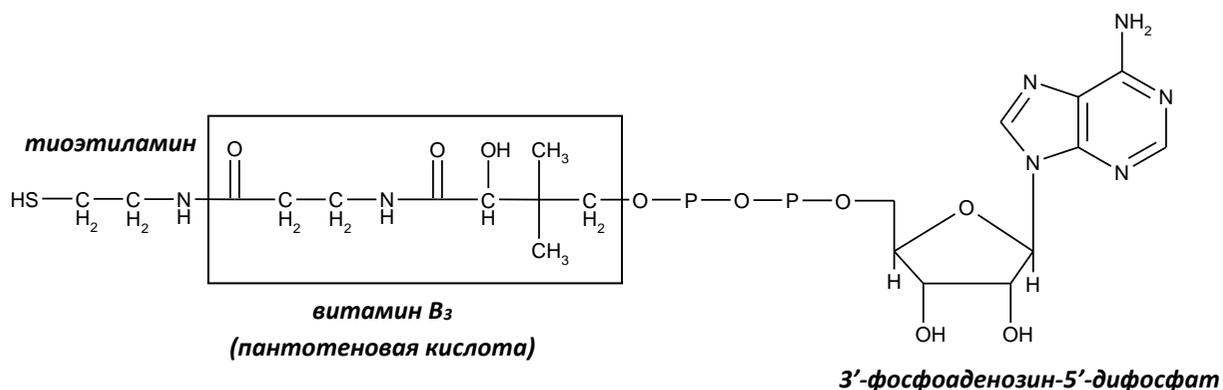


Рисунок 4 – Коферментная форма пантотеновой кислоты - коэнзим А.

КоА осуществляет перенос ковалентно связанных в форме тиоэфиров ацильных остатков в реакциях, катализируемых ферментами ацилтрансферазами в реакциях окисления и синтеза жирных кислот, холестерина, гема, ацетилхолина, обезвреживании чужеродных веществ и др.

**Пиридоксальные коферменты.** Существует три коферментные формы пиридоксина (витамина В<sub>6</sub>): пиридоксол-5-фосфат, пиридоксаль-5-фосфат и пиридоксамин-5-фосфат.

Пиридоксаль-зависимые ферменты катализируют многие реакции аминокислотного обмена: трансаминирования, декарбоксилирования аминокислот, рацемизации аминокислот и др.

**Биоцитин.** Биоцитин является коферментной формой витамина Н (биотина).

Активная форма биотина образуется при его взаимодействии с апоферментом через ε-аминогруппу лизина.

Он участвует в реакциях карбоксилирования (переносит карбоксильные группы), катализируемых ферментами карбоксилазами как с участием АТФ, так и без нее.

**Тетрагидрофолиевая кислота (ТГФК).** ТГФК - коферментная форма фолиевой кислоты (витамина В<sub>9</sub>). В организме протекает более 20 реакций с участием ТГФК – ферментативных процессов переноса одноуглеродных фрагментов (метильных, метиленовых, метенильных, формильных и формиминогрупп).

Реакции перенос одноуглеродных фрагментов с участием ферментов формилаз, трансметилаз и др. протекают в процессах синтеза азотистых оснований нуклеиновых кислот, посттрансляционной модификации белка, защитном метилировании нуклеиновых кислот. Большая часть витамина В<sub>9</sub> – предшественника ТГФК – синтезируется микрофлорой кишечника, а не поступает вместе с пищей.

Также кофакторами, участвующими в окислительно-восстановительных реакциях, являются: липоевая кислота (входит в состав мультиферментных пируватдегидрогеназного и  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназного комплексов); хиноновые коферменты (пирохинолинхинон, топахинон, триптофантриптофилхинон) (кофакторы моноаминоксидаз и полиаминоксидаз в комплексе с  $\text{Cu}^{2+}$ ); 5-дезоксаденозил-кобаламин (кофактор ферментов, катализирующих внутримолекулярный перенос атомов водорода); аскорбиновая кислота (кофактор ферментов, катализирующих реакции гидроксирования).

Коферментной активностью в трансферазных реакциях и реакциях изомеризации обладают: метилкобаламин (осуществляет перенос метильных групп); ретиноевая кислота (принимает участие в синтезе гликопротеинов в качестве кофактора гликозилтрансфераз); производные 2-метил-1,4-нафтохинона (является кофактором  $\gamma$ -глутамилкарбоксилазы, которая активирует протромбин); токоферол (является коферментом десатуразы жирных кислот).

Кофакторы сложных ферментов могут быть представлены металлами. Функции металлов могут быть следующими:

1. участие в катализе. Металл находится в зоне активного центра (в каталитическом участке). Например: тирозиназа ( $2 \text{Cu}^{2+}$ ), моноаминоксидаза ( $4 \text{Cu}^{2+}$ ), церулоплазмин ( $8 \text{Cu}^{2+}$ ).

2. стабилизация структуры апофермента. Металл находится вне зоны активного центра (вне каталитической зоны). Например: транскетолаза ( $\text{Ca}^{2+}$ ).

3. связывание субстрата. Металл располагается в зоне активного центра (в субстратсвязывающем участке). Например: гексокиназа ( $\text{Mg}^{2+}$ ).

4. связывание субстрата и катализ. Металл находится в зоне активного центра. Например: пируваткиназа ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^{+}$ ), аргиназа ( $\text{Mn}^{2+}$ ), щелочная фосфатаза ( $2 \text{Zn}^{2+}$ ).

Многие сложные ферменты могут содержать и органические, и неорганические (металлы) кофакторы. Например,  $\text{Zn}^{2+}$ -содержащая НАД<sup>+</sup>-зависимая алкогольдегидрогеназа.

### 1.6.2. Структурная организация апофермента

Апофермент (полипептидная часть) имеет как минимум третичный уровень организации, т.е. имеет пространственную структуру, или конформацию.

На гидрофильной поверхности молекулы белка, часто имеются гидрофобные участки («пятна»), которые играют важную роль при связывании лигандов (кофакторов, субстратов, активаторов и ингибиторов) и во взаимодействии с другими белковыми молекулами.

Четвертичная структура – пространственная организация нескольких полипептидных цепей – не обязательный уровень организации белковой молекулы. В ферментах, имеющих данный уровень организации, он играет важную функциональную роль:

1. объединение нескольких взаимосвязанных функций в одной структуре (каталитическая и регуляторная);

2. участие субъединиц в формировании функциональных зон (активного центра);

3. обеспечение взаимодействия с протяженными структурами (наличие нескольких зон связывания);

4. регуляторная функция (ассоциация/диссоциация субъединиц).

Область фермента, в которой происходит связывание и превращение субстрата, называется **активным центром**.

Активный центр формируется при сворачивании полипептида в глобулярную структуру. Происходит сближение функциональных групп аминокислотных остатков. Наиболее часто в активном центре встречаются имидазольная группа гистидина, ОН-группа серина или тирозина, SH-группа цистеина, ε-аминогруппа лизина, СООН-группы аспарагиновой и глутаминовой кислот и др.

В формировании активного центра могут также принимать участие: молекулы воды, ионы металлов, связанные с апоферментом, органические кофакторы.

Активный центр помещается в углублениях на поверхности белка. Среда активного центра микрогетерогенна. В образовании активного центра в гидрофобных участках на поверхности белковых глобул принимают участие полярные и заряженные функциональные группы.

Микросреда активного центра отличается:

1. более низкой диэлектрической проницаемостью (присущей органическим растворителям) по сравнению с водой;

2. пониженной полярностью по сравнению с водой;

3. повышенной микровязкостью.

Структурные особенности активного центра позволяют эффективно сорбировать субстрат (многоочечно связывать) и взаимодействовать с ним химически.

В активном центре различают две зоны: центр связывания субстрата и каталитический центр.

У многих ферментов имеются дополнительные регуляторные центры (аллостерические, «аллос» - другой). С аллостерическим центром фермента взаимодействуют вещества, влияющие на его каталитическую активность.

## 1.7. Механизм действия ферментов

Механизм действия ферментов – это последовательность стадий катализа:

1. Взаимодействие субстрата с ферментом в активном центре.

2. Химическое превращение субстрата в продукт реакции.

3. Освобождение продукта реакции из активного центра фермента.

Взаимодействие фермента  $E$  с субстратом  $S$  приводит к образованию промежуточного **фермент-субстратного комплекса  $ES$** . Связывание субстрата с ферментом происходит в субстратсвязывающем участке активного центра.

В ходе любой химической реакции можно выделить несколько стадий – полуреакций.



1 – образование переходного состояния, в котором к группе R одновременно присоединены и X, и Y;

2 – распад переходного состояния с образованием продуктов реакции.

Каждая из полуреакций характеризуется определенным изменением свободной энергии ( $\Delta G$ ) (Рисунок 5), которая может быть израсходована на совершение химического превращения.

**Энергия активации** ( $\Delta G_{\text{активации}}$ ) – это энергетический барьер, который должны преодолеть вещества, чтобы реакция (взаимодействие между реагентами) произошла.

$$\Delta G_{\text{реакции}} = \Delta G_{\text{продуктов реакции}} - \Delta G_{\text{реагентов}}$$

$$\Delta G_{\text{активации}} = \Delta G_{\text{реагентов}} - \Delta G_{\text{переходного состояния}}$$

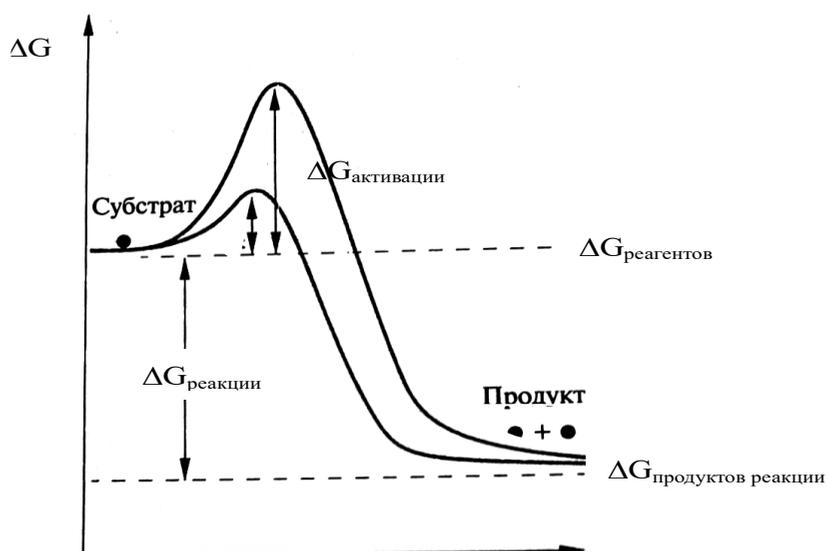


Рисунок 5 – Диаграмма изменения  $\Delta G$  в ходе реакции.

Действие катализаторов (ферментов) приводит к снижению **энергии активации** за счет уменьшения энергии переходного состояния. В случае ферментативных реакций реагенты достигают переходного состояния при образовании фермент-субстратного комплекса.

Уменьшение энергии активации в процессе ферментативного катализа происходит в результате реализации ряда эффектов, в частности:

1. многоточечного сорбционного связывания субстрата;
2. эффектов сближения и ориентации;
3. эффекта конформационного соответствия;
4. ковалентного катализа;
5. внутримолекулярного кислотно-основного катализа.

## Сорбционное связывание субстрата

Сорбционное связывание субстрата заключается (в основном) в образовании между функциональными группами субстрата и аминокислотными остатками апофермента и функциональными группами кофактора:

- гидрофобных взаимодействий;
- электростатических взаимодействий;
- водородных связей.

Многоточечное сорбционное связывание субстрата в активном центре способствует стабилизации и прочности фермент-субстратного комплекса.

## Реализация эффектов сближения и ориентации

При взаимодействии фермента с субстратом реагирующие вещества сближаются в нужной ориентации и удерживаются так, что реакционноспособные группы могут провзаимодействовать.

При образовании ES модифицируемые участки молекулы располагаются в непосредственной близости от катализирующей группы и оптимально ориентированы по отношению к ней (Рисунок 6).

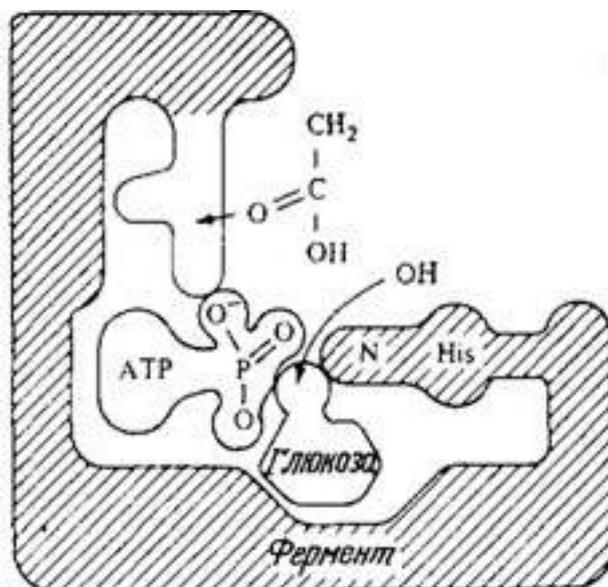


Рисунок 6 – Фермент гексокиназа ускоряет реакцию за счет пространственного сближения (эффект сближения) и их расположения под выгодным углом (эффект ориентации) (по Д. Кошланду).

В результате реализации эффектов сближения и ориентации происходит стабилизация («замораживание») реагирующих веществ в состоянии близком к переходному, а скорость ферментативной реакции за счет этого может увеличиться более чем в  $10^3$  раз.

## Эффект конформационного соответствия

Между активным центром фермента и молекулой субстрата существует **конформационное** – стерическое и топохимическое – **соответствие**.

Характер конформационного соответствия лежит в основе моделей взаимодействия фермента и субстрата и теорий ферментативного катализа.

**Модель жесткой матрицы** Э. Фишера (1894) (модель «ключ-замок») основана на теории существования конформационного соответствия между E и S: «активный центр организован так, что субстрат входит в него как ключ в замок» (Рисунок 7).

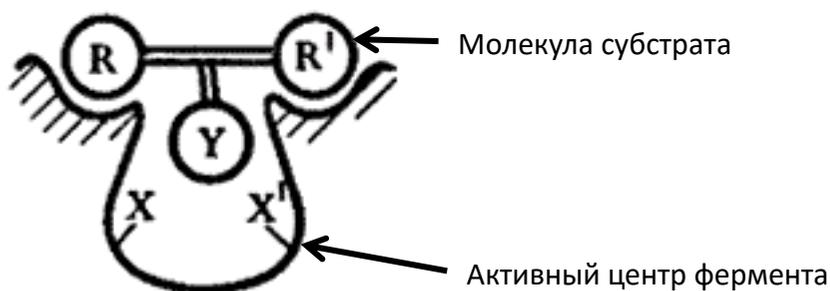


Рисунок 7 – Конформационное соответствие активного центра фермента и субстрата.

**Модель и теория индуцированного конформационного соответствия** между E и S Д. Кошланда (1958) (модель «рука-перчатка»). Взаимодействие субстрата с ферментом вызывает конформационные изменения в молекуле фермента: функциональные группы принимают ориентацию, необходимую для связывания субстрата и катализа (Рисунок 8).

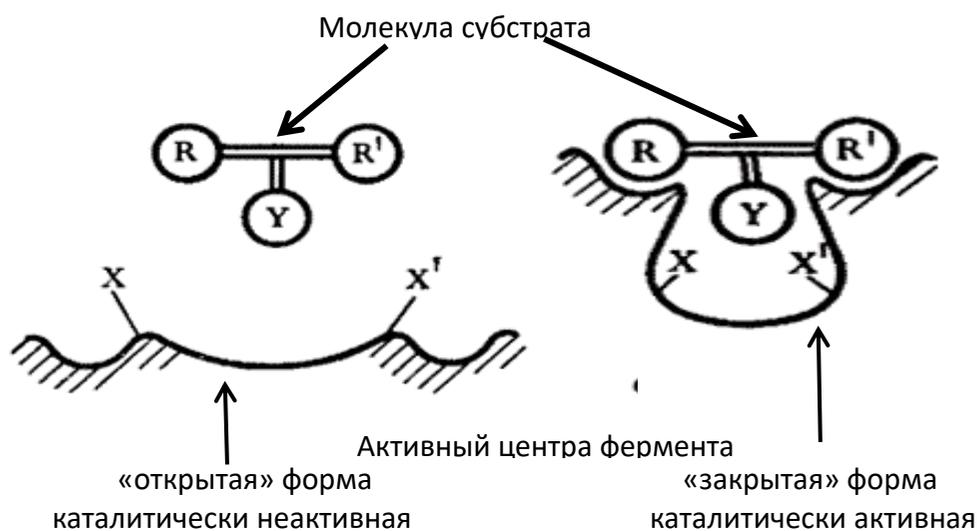


Рисунок 8 – Индуцированное конформационное соответствие активного центра фермента и субстрата (по Д.Кошланду).

**Модель и теория напряжений** между Е и S Г.Ламри и И.Эйринг (1954)(модель «дыбы»). При связывании молекула субстрата претерпевает деформацию (напряжение) и таким образом активируется (Рисунок 9).

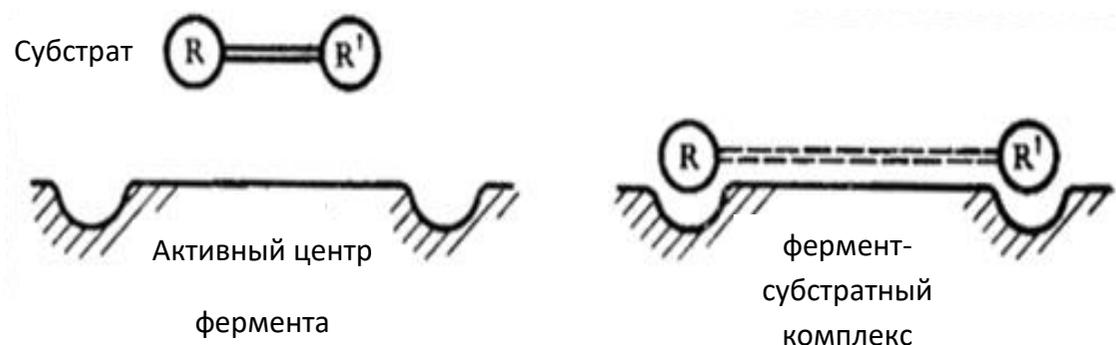


Рисунок 9 – Индуцированное конформационное соответствие активного центра фермента и субстрата (по Г.Ламри и И.Эйринг).

**Теория катализа за счет преимущественного связывания переходных состояний** Д.Холдейна и Л.Полингом (1930-1940). Связывая переходное состояние субстрата, ферменты катализируют его химическое превращение.

Возникновение конформационного соответствия между ферментом и субстратом способствует тому, что свободная энергия сорбции субстрата в активном центре фермента расходуется на понижение энергии активации последующей химической реакции.

### ***Кисотно-основный и ковалентный катализ***

В катализе принимают участие различные функциональные группы фермента и субстрата:

- доноры или акцепторы  $H^+$  (кислотами и основаниями);
- группы, которые могут участвовать в образовании ковалентных связей.

Принимая участие в образовании фермент-субстратного комплекса электрофильные и нуклеофильные функциональные группы, находящиеся в активном центре, осуществляют **кислотно-основный катализ**.

**Специфический кислотно-основный катализ** – это реакции, скорость которых увеличивается или уменьшается при изменении концентрации  $H^+$  или  $H_3O^+$ , но не зависит от концентрации кислот и оснований присутствующих в реакционной среде.

**Обобщенный кислотно-основный катализ** – реакции, скорость которых зависит от присутствия в растворе обобщенных кислот (доноров протонов) и обобщенных оснований (акцепторов протонов).

В ферментативных системах может осуществляться частный случай кислотно-основного катализа – **внутримолекулярный катализ**: функциональные реакционноспособные группы включены в состав одной

молекулы (субстрата) и находятся в необходимом для взаимодействия состоянии за счет реализации эффектов сближения и ориентации. Например, реакция мутаротации глюкозы, катализируемая ферментом глюкозомутаротазой (Рисунок 10).

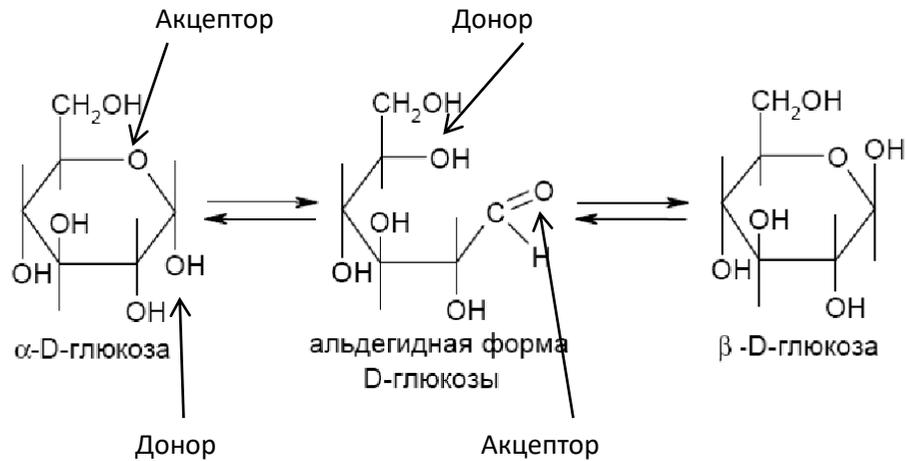
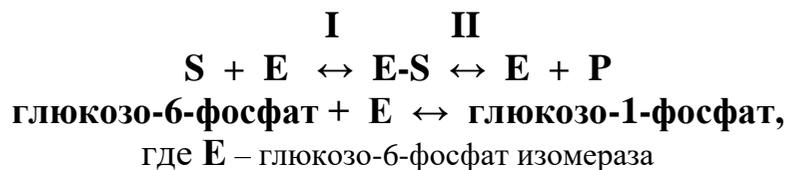
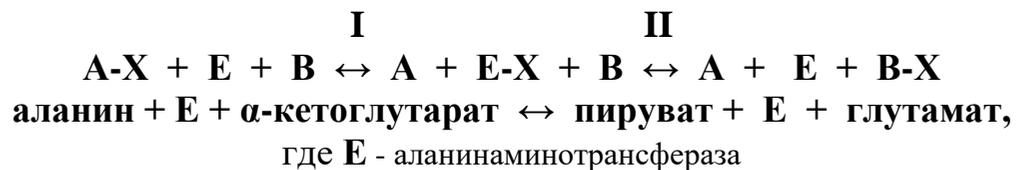


Рисунок 10 – Реакция мутаротации глюкозы (внутримолекулярный кислотно-основной катализ).

Боковые группы аминокислотных остатков молекулы E могут участвовать в образовании ковалентных связей с молекулами S. Характерен для ферментов, катализирующих реакции нуклеофильного замещения и требует присутствия кофакторов. Примерами ковалентного катализа являются реакции переноса функциональных групп и реакции изомеризации, в частности реакции переаминирования, катализируемые аминотрансферазами, содержащими кофактор пиридоксальфосфат.

Примером ковалентного катализа является ферментативный перенос ковалентно связанных групп с одного реагента на другой с участием трансфераз (например, аминотрансфераз) или реакции изомеризации:



I и II – полуреакции, сопровождающиеся разрывом и образованием ковалентных связей.

В случае ковалентного катализа фермент является полноправным реагентом, участвует в образовании и разрыве ковалентных связей.

Таким образом, причинами высокой каталитической активности ферментов являются:

- сорбционные взаимодействия функциональных групп, входящих в активный центр фермента, и субстрата – ускорение реакции в  $10^7$  раз и более;
- полифункциональный катализ – ускорение реакции в  $10^3$  раз и более;
- эффекты микросреды активного центра (микрогетерогенность, повышенная микровязкость, пониженная диэлектрическая сопротивляемость).

### *Механизм каталитического действия карбоксипептидазы А*

Карбоксипептидаза А – протеолитический пищеварительный фермент, катализирующий специфический гидролиз С-концевой аминокислотной последовательности.

Карбоксипептидаза А синтезируется поджелудочной железой в неактивной форме прокарбоксипептидазы. Активация фермента происходит в тонком кишечнике путем ограниченного протеолиза под действием трипсина. Специфичность действия этого фермента заключается в том, что она катализирует гидролитическое отщепление С-концевых остатков Тир, Трп и Фен (при  $\text{pH} > 7$  в 12-перстной кишке), но не активна в отношении Арг, Лиз и Про.

Кроме карбоксипептидазы А поджелудочной железой синтезируется карбоксипептидаза В, которая является сывороточным ферментом и специфически гидролизует С-концевые остатки Арг и Лиз.

Карбоксипептидаза А – это металлофермент, содержащий 1 атом цинка, входящего в состав активного центра. Удаление Zn из фермента приводит к его инактивации, а последующее введение этого металла – к восстановлению его активности. Это свидетельствует об участии Zn в катализе.

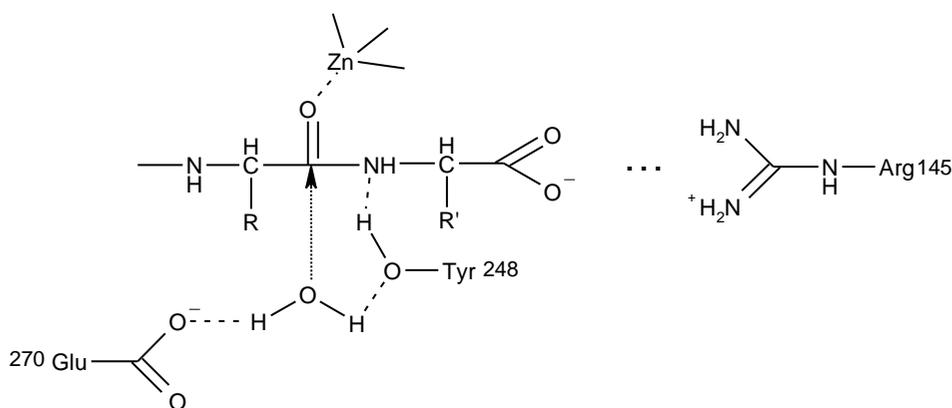


Рисунок 11 – Схема сорбции субстрата на активном центре карбоксипептидазы А.

Активный центр фермента локализован во впадине на поверхности апофермента вблизи с атомом цинка. Эта впадина ведет в гидрофобный «карман». Активный центра образован остатками Глу-270, Тир-248, Глу-72, Гис-69, Арг-145, Гис-196 и атомом Zn (Рисунок 11).

При связывании субстрата из активного центра вытесняется 5 молекул воды (эффект десольватации). В отсутствие субстрата Zn тремя координационными связями связан с боковыми цепями Гис-69, Глу-72 и Гис 196. Четвертая связь занята молекулой воды.

Сорбция субстрата в активном центре происходит следующим образом:

- свободная карбоксильная группа субстрата (С-конец) связывается с гуанидиновой группой аргинина 145;
- ароматическая группа С-концевой аминокислоты помещается в гидрофобный «карман»;

При связывании субстрата происходит ряд структурных изменений:

- Арг-145 сдвигается на 2 Å и взаимодействует с  $\alpha$ -СОО<sup>-</sup>-группой;
- СОО<sup>-</sup>-группа Глу-270 сдвигается на 2 Å к пептиду;
- связывание субстрата приводит к нарушению водородных связей в апоферменте и Тир-248 сдвигается на 12 Å, в результате чего гидроксильная группа тирозина оказывается возле NH-группы атакуемой пептидной связи. Тир-248, перемещаясь, закрывает зону активного центра

Глу-270, являясь нуклеофилом, образует ангидрид с карбонильной группой расщепляемой пептидной связи. Zn<sup>2+</sup> проявляет свойства электрофила и, в свою очередь, поляризует кислород этой же карбонильной группы. Тир-248 атакует NH-группу пептидной связи и становится донором водорода для аминогруппы. Донором протона для гидроксильной группы тирозина является молекула воды. В результате этих воздействий ангидрид расщепляется. Далее происходит восстановление структуры активного центра и освобождение из него продуктов реакции.

Необходимо отметить, что в процессе ферментативного гидролитического расщепления пептидной связи карбоксипептидазой А происходит:

- сближение и ориентация субстрата по отношению к функциональным группам активного центра фермента,
- специфическое многоточечное связывание субстрата в активном центре;
- индуцируются конформационные изменения в молекуле фермента;
- происходит десольватация зоны активного центра при образовании фермент-субстратного комплекса;
- общий кислотно-основной катализ.

## 1.8. Регуляция активности ферментов

Возможны два пути регуляции активности ферментов: экстенсивный и интенсивный путь.

**Экстенсивная регуляция** – регуляция путем изменения количества фермента в клетке, т.е. регуляция на генетическом уровне.

**Интенсивная регуляция** – регуляция путем модификации молекулы фермента, т.е. регуляция каталитической активности фермента.

### 1.8.1. Регуляция биосинтеза ферментов

Количество и разнообразие белков, в частности ферментов, определяется степенью их участия в метаболизме. Синтез белка регулируется внешними и внутренними факторами. Теорию регуляции синтеза белка разработали (Ф. Жакоб и Ж. Моно): происходит “выключение” или “включение” генов.

Эта теория, доказанная на бактериях, у которых показана возможность **индукции ферментов** (синтез ферментов *de novo*) при добавлении в питательную среду субстратов этих ферментов. Добавление конечных продуктов реакции, образование которых катализируется этими же ферментами, напротив, вызывает уменьшение количества синтезируемых ферментов. Это явление получило название **репрессии синтеза ферментов**.

Согласно теории Ф. Жакоба и Ж. Моно, в биосинтезе белка у бактерий участвуют структурные гены, ген-регулятор, ген-оператор. **Структурные гены** определяют первичную структуру синтезируемого белка.

Синтез мРНК контролируется **геном-оператором**. Группа структурных генов, транскрибируемая одновременно, образует **оперон** (Рисунок 12). Оперон начинается с **промотора** – участка ДНК, расположенного рядом с геном-оператором, с которым взаимодействует РНК-полимераза. Функционирование оперона находится под контролем **гена-регулятора**. Связь между структурными генами и геном-регулятором осуществляется при помощи **белка-репрессора**, который кодируется с геном-регулятором. Репрессор имеет сродство к гену-оператору и обратимо образует с ним в комплекс. Образование такого комплекса приводит к блокированию синтеза мРНК и, следовательно, синтеза белка, т.е. функция гена-регулятора состоит в том, чтобы через белок-репрессор прекращать деятельность структурных генов, синтезирующих мРНК.

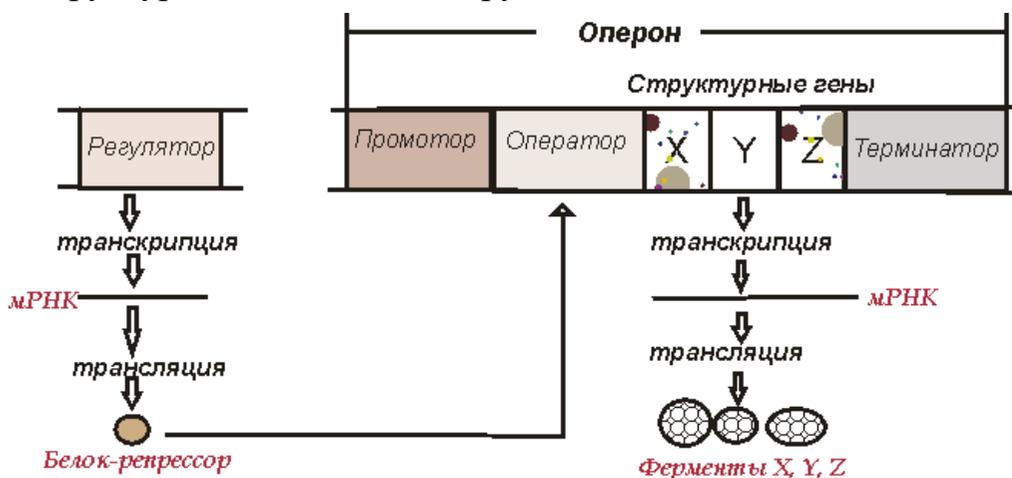


Рисунок 12 – Структура и функционирование оперона.

## ***Индукция синтеза ферментов***

Данный механизм был доказан в опытах на *E.coli* на примере синтеза  $\beta$ -галактозидазы (лактазы), расщепляющей молочный сахар на глюкозу и галактозу.

В отсутствие субстрата (лактозы) белок-репрессор – LacI-репрессор – взаимодействует с геном-оператором и препятствует транскрипции. При появлении в среде субстрата – лактозы – субстрат-индуктор связывается с белком-репрессором и препятствует его взаимодействию с геном-оператором – начинается транскрипция и синтез ферментов катаболизма лактозы.

Ферменты, синтез которых происходит *de novo* при появлении субстрата называются индуцибельными. **Индуцибельные ферменты** – ферменты, катализирующие расщепление веществ. У высших животных индукция синтеза ферментов наблюдается реже. Примерами таких ферментов являются цитохром P450, тирозиназа, аспарагиназа, аргиназа, уреазы. При увеличении количества белковой пищи индуцируются: тирозинтрансаминаза, серин- и треониндегидротазы и др.

## ***Катаболическая репрессия индуцибельных ферментов***

Ферменты катаболизма лактозы не синтезируются в отсутствие субстрата и в присутствии глюкозы. Глюкоза – более выгодный источник углерода и энергии, чем лактоза. Соответственно, глюкоза и лактоза – альтернативные источники углерода и энергии.

В отсутствие глюкозы в клетке повышается уровень 3',5'-цАМФ, который взаимодействует с белком CRP-белком (сAMP protein receptor). Комплекс цАМФ-CRP взаимодействует с промоторным участком ДНК, вызывает в нем конформационные изменения, что приводит к повышению сродства к РНК-полимеразе. Количество образующегося комплекса цАМФ-CRP определяется концентрацией 3',5'-цАМФ, концентрация которого уменьшается при увеличении содержания глюкозы.

3',5'-цАМФ образуется из АТФ под действием фермента аденилатциклазы. Активность аденилатциклазы повышается в присутствии фосфорилированных компонентов системы транспорта глюкозы в клетку. Фосфорилирование транспортных белков происходит при уменьшении концентрации глюкозы в среде, т.е. активность аденилатциклазы будет возрастать → концентрация 3',5'-цАМФ будет увеличиваться → количество комплекса цАМФ-CRP будет возрастать.

При высокой концентрации глюкозы компоненты системы транспорта дефосфорилированы, что приводит к падению активности аденилатциклазы. Происходит уменьшение концентрации цАМФ и количества комплексов цАМФ-CRP. Это приводит к снижению скорости транскрипции генов *lac*-оперона – явлению **катаболической репрессии индуцибельных ферментов**, т.е. продукты катаболизма глюкозы репрессируют синтез ферментов *lac*-оперона.

## Репрессия синтеза ферментов

Концентрация многих ферментов в клетках резко снижается при повышении содержания конечных продуктов, образующихся в цепи ферментативных реакций. Такой эффект, получивший название **репрессии ферментов**, часто наблюдается в реакциях биосинтеза.

Белки-репрессоры первоначально находятся в неактивной форме. Активация репрессоров происходит в присутствии продуктов реакции – ко-репрессоров. Активный белок-репрессор взаимодействует с зоной гена-оператора, репрессируя (блокируя) транскрипцию и синтез ферментов (Рисунок 13).

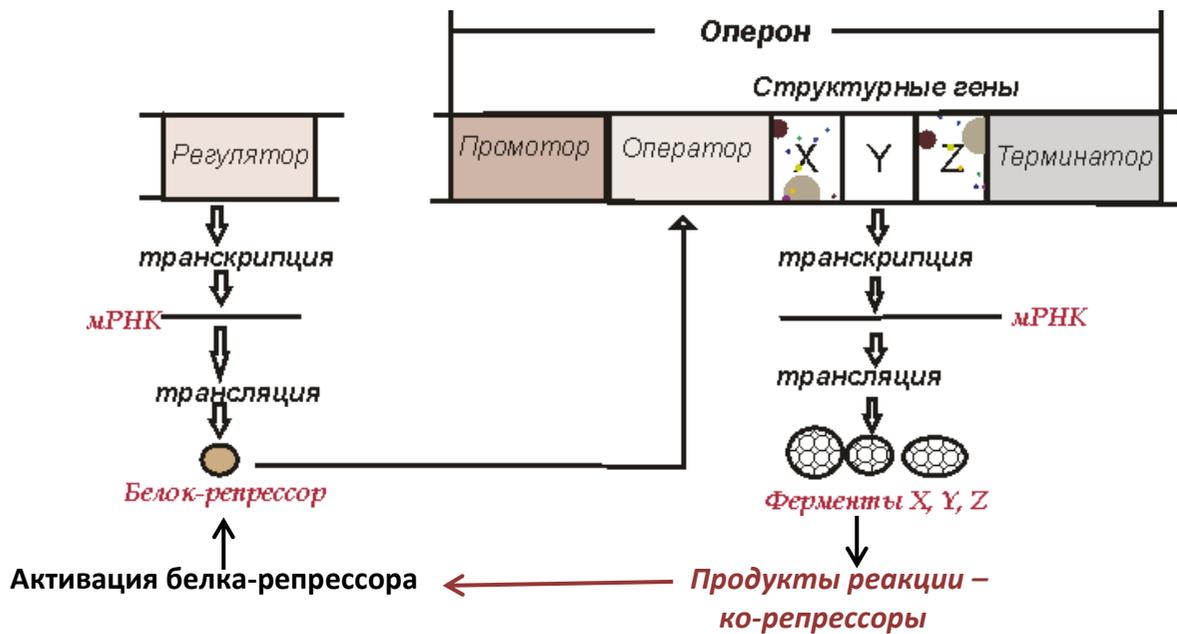


Рисунок 13 – Активация белка-репрессора.

**Репрессируемые ферменты** катализируют синтез веществ. Например, орнитинкарбамоилтрансфераза (синтез цитруллина, ко-репрессор – аргинин).

Ферменты, содержание которых в клетке не регулируется механизмами индукции и репрессии синтеза, называются конститутивными. **Конститутивные ферменты** – синтезируются с постоянной скоростью, поддерживаются в клетке в постоянной концентрации. Это ферменты, катализирующие реакции энергетического обмена и реакции основных метаболических процессов.

Влияние на скорость транскрипции и, соответственно, на синтез ферментов оказывают стероидные и тиреоидные гормоны, некоторые биологически активные вещества (витамин Д<sub>3</sub>, фитоэстрогены и др.)

### 1.8.2. Регуляция каталитической активности ферментов

Регуляция каталитической активности ферментов – регуляция активности уже синтезированных ферментов - осуществляется путем:

- аллостерической регуляция;
- ковалентной модификации молекулы фермента;
- ограниченного протеолиза;
- белок-белковых взаимодействий и др.

### *Аллостерическая регуляция*

С аллостерическим центром фермента могут нековалентно связываться низкомолекулярные вещества – *эфффекторы*. Ферменты, активность которых регулируется аллостерически, называются **аллостерическими ферментами**. Аллостерическая регуляция ферментов обратима.

В результате взаимодействия с эфффектором изменяется пространственная структура фермента (и самого активного центра). Это сопровождается изменением активности фермента.

Аллостерические эфффекторы бывают:

- отрицательные, или ингибиторы – снижают активность;
- положительные, или активаторы – повышают активность.

Аллостерические эфффекты бывают:

- гомотропные – аллостерический эфффектором является субстрат;
- гетеротропные – аллостерическим эфффектором является «не субстрат»

Большинство аллостерических ферментов – олигомерные.

Возможны 2 конформационных состояния аллостерических ферментов:

**R (relaxed)** – расслабленное – активное состояние – высокое сродство к субстрату;

**T (tensed)** – напряженное – неактивное состояние – низкое сродство к субстрату.

**R** и **T** формы – активная и неактивная формы аллостерических ферментов, которые находятся в равновесном состоянии.

Аллостерический активатор – стабилизирует R-состояние, а ингибитор – смещает равновесие в сторону T-состояния. Субстрат, выступая в роли эфффектора, смещает равновесие в сторону R-состояния, т.е. гомотропный аллостерический эфффект всегда положительный.

### *Аллостерическая регуляция метаболических путей*

Аллостерическая регуляция активности ключевых ферментов – одна из основных форм регуляции интенсивности метаболических путей. Эфффекторами выступают метаболиты процессов. Возможно два типа регуляции: ретро-ингибирование и активация предшественником.

**Ретро-ингибирование**, или ингибирование по принципу обратной связи, заключается в следующем. При увеличении концентрации продукта F происходит аллостерическое ингибирование первого фермента метаболического пути.



образовании большого количества фруктозо-1,6-бисфосфата наблюдается аллостерическая активация пируваткиназы.

Аллостерические ферменты играют важную роль в метаболизме, так как они чрезвычайно быстро реагируют на малейшие изменения внутреннего состояния клетки.

### *Регуляция каталитической активности ферментов путём ковалентной модификации*

Ковалентная модификация ферментов является одним из типов регуляции, определяющим интенсивность процессов обмена веществ многоклеточного организма.

При ковалентной модификации ферментов изменяется конформация молекулы. В результате этого активность фермента увеличивается или уменьшается.

Возможны следующие виды ковалентной модификации ферментов:

- фосфорилирование, ферменты: киназы, переносят Фн от АТФ;
- дефосфорилирование, ферменты: фосфатазы, гидролизуют Фн;
- метилирование и деметилирование, ферменты: метилазы/деметилазы, донор СН<sub>3</sub>-группы – Мет;
- гликозилирование и дегликозилирование, ферменты: гликозилтрансферазы, переносят остатки моно- и олигосахаридов;
- аденилирование и деаденилирование, ферменты: аденилаттрансферазы, переносят АМФ от АДФ.

А также: гидроксिलирование по остаткам Про и Лиз; карбоксилирование остатков Глу и Асп; ацетилирование; уридилирование и др.

Наиболее быстрый и широко распространённый способ ковалентной модификации ферментов – их обратимое фосфорилирование и дефосфорилирование по ОН-группам аминокислот. Присоединение остатка фосфорной кислоты протеинкиназой или его отщепление фосфатазой приводит к изменению конформации активного центра и его каталитической активности. При этом результат может быть двояким: одни ферменты при фосфорилировании активируются, другие, напротив, становятся менее активными (Рисунок 15).

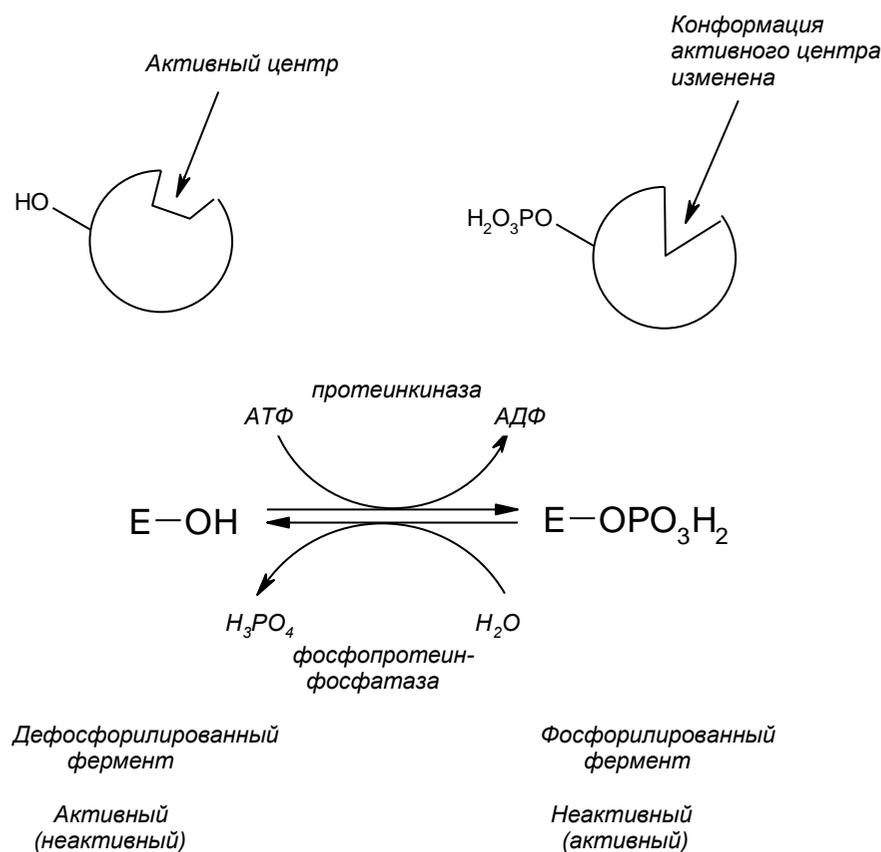


Рисунок 15 – Регуляция активности ферментов фосфорилированием и дефосфорилированием.

### ***Регуляция активности ферментов ограниченным протеолизом***

Некоторые ферменты, функционирующие в желудочно-кишечном тракте и в плазме крови (ферменты системы свертывания крови), синтезируются в виде неактивных предшественников (зимогенов, или проферментов) и активируются только в результате гидролиза одной или нескольких пептидных связей, что приводит к отщеплению части белковой молекулы предшественника.

Этот процесс называется ограниченным протеолизом и осуществляется ферментами – специфическими протеазами. В результате ограниченного протеолиза в оставшейся части белковой молекулы происходит конформационная перестройка и завершается формирование активного центра фермента. Например, таким образом формируется активная форма пищеварительной протеазы – химотрипсина. Поджелудочной железой синтезируется 2 формы химотрипсиногена – А и В, переход в активную форму которых происходит под действием минимального количества трипсина или химотрипсина (аутокаталитический процесс). При активации химотрипсиногена А образуются  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ -,  $\pi$ -химотрипсины. Химотрипсиноген В при активации переходит в химотрипсин В.

Активация профермента происходит в результате гидролиза четырех пептидных связей (Рисунок 16).

Таким образом, благодаря совместному действию химотрипсина и трипсина из исходного белкового предшественника образуются разные химотрипсины, различающиеся ферментативной активностью и физико-химическими свойствами. Тем не менее, следует отметить, что все химотрипсины характеризуются групповой специфичностью, обеспечивая гидролиз пептидов, эфиров, амидов и других ацилпроизводных, но наибольшую активность проявляют по отношению к пептидным связям, в образовании которых принимают участие карбоксильные группы ароматических аминокислот: фенилаланина, тирзина, триптофана.

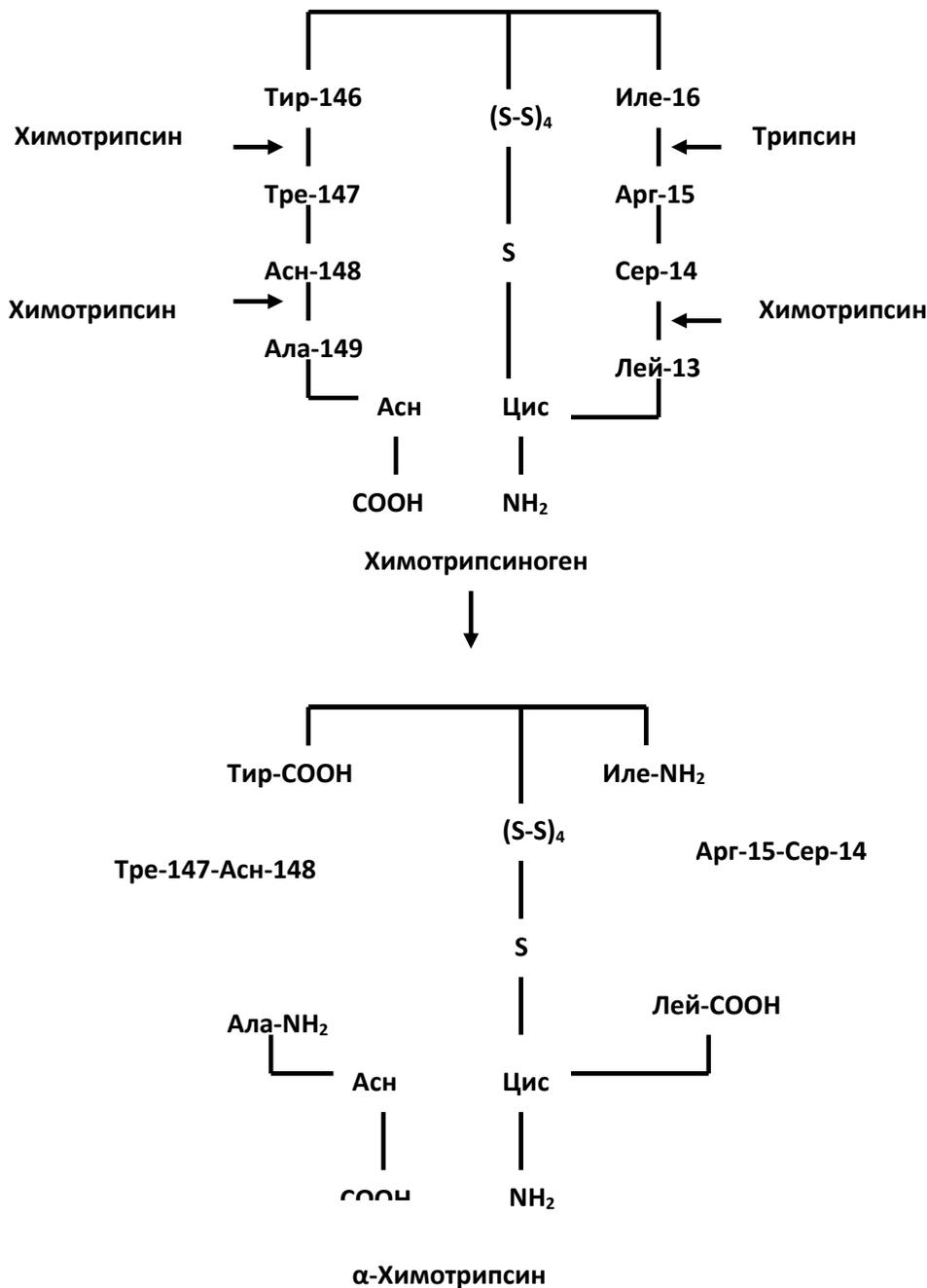


Рисунок 16 - Активация химотрипсиногена путем ограниченного протеолиза.

## Регуляция активности ферментов путем белок-белковых взаимодействий

Основным механизмом данного типа регуляции является кооперативность взаимодействия между субъединицами олигомерных белков (ферментов). Примером может являться функционирование фермента протеинкиназы (Рисунок 17).

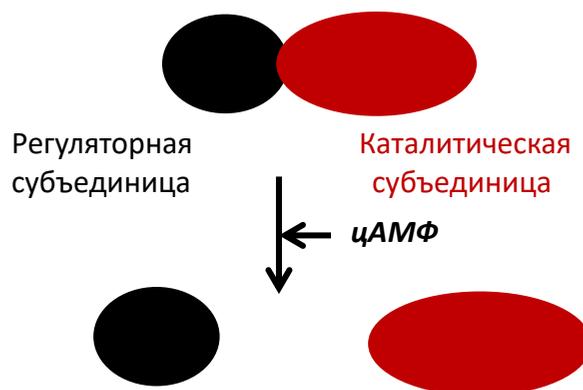


Рисунок 17 – Активация протеинкиназы в результате диссоциации субъединиц.

Протеинкиназа – тетрамер 2x2 (два димера), неактивная в олигомерном (ассоциированном) состоянии. После диссоциации, которая происходит в результате взаимодействия с цАМФ, каталитическая субъединица приобретает активность.

### 1.9. Влияние pH и температуры на активность ферментов

#### 1.9.1. Влияние величины pH на скорость ферментативной реакции

Графическая зависимость скорости большинства ферментативных реакций от величины pH имеет колоколообразную форму (Рисунок 18).

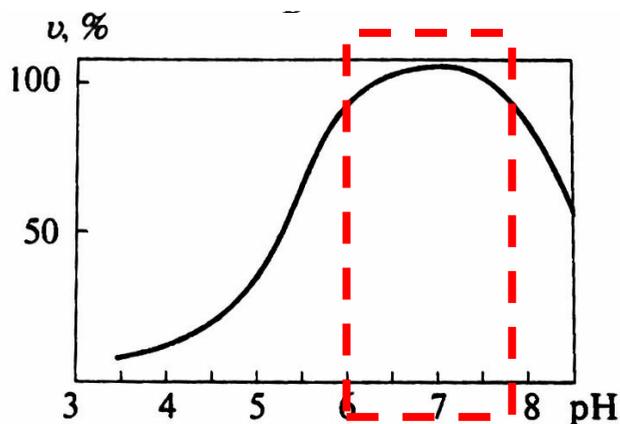


Рисунок 18 – Зависимость скорости реакции от величины pH.

Значение рН, при котором скорость реакции максимальна, называется **оптимумом рН** действия фермента.

Чувствительность ферментов к изменению рН обусловлена:

- наличием ионогенных групп в активном центре фермента;
- наличием ионогенных групп в молекуле субстрата;
- влиянием рН на конформацию ферментов, связь апо- и кофермента, ионное состояние аллостерических регуляторов и ионогенных групп аллостерического центра.

Значение рН, соответствующее оптимуму, не обязательно совпадает со значением рН, характерным для нормального внутриклеточного окружения этого фермента. Данный факт позволяет предположить, что влияние рН на активность фермента может быть одним из факторов, ответственных за регуляцию ферментативной активности внутри клетки. Поскольку в клетке содержатся сотни ферментов и каждый из них по-разному реагирует на изменение величины рН, значение данного параметра является одним из важнейших элементов в системе регуляции клеточного метаболизма.

### 1.9.2. Влияние температуры на скорость ферментативной реакции

Зависимость каталитической активности фермента от температуры выражается типичной кривой, представленной на Рисунке 19.

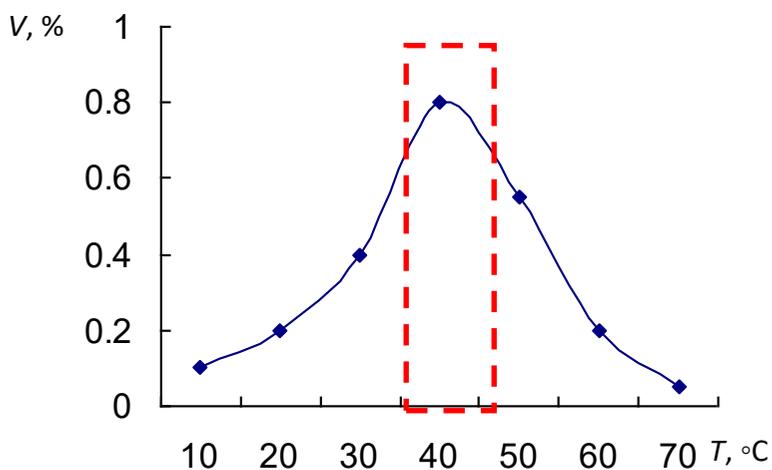


Рисунок 19 – Влияние температуры на активность фермента.

До некоторого значения температуры каталитическая активность фермента растет, причем на каждые 10 °C примерно в 2 раза повышается скорость преобразования субстрата. В то же время постепенно возрастает количество инактивированного фермента за счет денатурации его белковой части. Температура, при которой каталитическая активность фермента максимальна, называется его **температурным оптимумом**. При увеличении температуры среды выше температурного оптимума активность ферментов уменьшается. Причина – температурная денатурация белка. Температурный оптимум ферментов

животного происхождения – 40-50 °С; а растительного происхождения – 50-60 °С. Однако есть ферменты с более высоким температурным оптимумом, например, у папаина оптимум соответствует 80 °С. В то же время у каталазы оптимальная температура катализа находится между 0 и 10 °С, при более высоких температурах происходит активное окисление фермента и его инактивация.

### ***Влияние ингибиторов на активность ферментов***

**Ингибитор** – вещество, специфически уменьшающее скорость ферментативной реакции.

Взаимодействие ингибитора с ферментом может быть **обратимым или необратимым**. Критерием обратимости (необратимости) на практике служит восстановление (невосстановление) активности фермента при диализе или сильном разведении раствора, содержащего фермент и ингибитор.

**Обратимое ингибирование** активности фермента подразделяется на:

1. конкурентное
2. неконкурентное
3. бесконкурентное
4. смешанное.

К **конкурентному ингибированию** относят обратимое снижение скорости ферментативной реакции, вызванное ингибитором, связывающимся с активным центром фермента и препятствующим образованию фермент-субстратного комплекса.

**Неконкурентным** называют такое ингибирование ферментативной реакции, при котором ингибитор взаимодействует с ферментом в участке, отличном от активного центра. Неконкурентные ингибиторы не являются структурными аналогами субстрата. Присоединение неконкурентного ингибитора вызывает изменение конформации молекулы фермента таким образом, что нарушается взаимодействие субстрата с активным центром фермента, что приводит к снижению скорости ферментативной реакции.

**Бесконкурентное ингибирование** наблюдается в том случае, когда ингибитор обратимо взаимодействует с ферментом только после образования фермент-субстратного комплекса. Образующийся в этом случае тройной комплекс фермент-субстрат-ингибитор не подвергается дальнейшему превращению, в результате чего скорость реакции замедляется.

**Смешанное ингибирование** сочетает в себе конкурентное и неконкурентное торможение. Ингибитор, присоединяясь в активном центре фермента, изменяет сродство фермента к субстрату и, одновременно, каталитическую активность фермента.

### ***Влияние активаторов на активность ферментов.***

К числу **природных активаторов ферментов** относятся ионы  $\text{Cl}^-$  и ионы многих металлов. Показано, что 15 различных катионов металлов, а именно  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  и  $\text{NH}_4^+$

активируют один или несколько ферментов. Например, ионы  $Mg^{2+}$  - обычный активатор киназ, синтетаз и ферментов, катализирующих гидролиз ангидридов фосфорной кислоты.  $Mn^{2+}$  активирует креатинфосфокиназу, малатдегидрогеназу, глутаматсинтетазу, люциферазу.

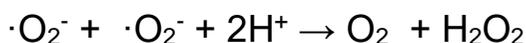
## 2. ПРАКТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ

Практические занятия по курсу «Энзимология» проводятся по темам, приведенным в практических рекомендациях. В данном разделе представлены рекомендации по выполнению лабораторных работ по выделению, очистке и изучению свойств ферментов. Также в рекомендациях приведены справочные материалы (методики, составы буферных смесей), которые необходимы для выполнения лабораторных работ. Данные практические рекомендации предназначены для студентов биологического факультета БГУ специальности 1-31 01 02 «Биохимия», а также других специальностей и специализаций:

### 2.1. Получение препарата супероксиддисмутазы и определение активности фермента

Одним из важнейших ферментативных компонентов антиоксидантной системы организма является супероксиддисмутаза. (КФ 1.15.1.1). Семейство супероксиддисмутазы (СОД) включает несколько ферментов: цитозольная Cu,Zn-зависимая СОД, митохондриальная Mn-зависимая СОД, внеклеточная СОД. Апофермент супероксиддисмутазы человека представляет собой тетрамер с Mr = 135 000 Да.

Супероксиддисмутаза уменьшает концентрацию супероксиданион радикала, катализируя реакцию дисмутации:



Для определения активности СОД используются как прямой, так и косвенный методы. Для определения СОД прямым методом необходимо создать высокую концентрацию  $\text{O}_2^-$ , что осуществить зачастую бывает очень трудно. Поэтому, наиболее часто используют непрямые методы, в них супероксиданион радикал генерируется в постоянном потоке, например при аутоокислении адреналина или кверцетина в щелочных условиях, или когда супероксиданион радикал взаимодействует с детекторной молекулой, такой как цитохром с Fe(III).

#### *Получение препарата супероксиддисмутазы*

##### **Среда выделения:**

0,25 М сахарозы, 0,5 мМ ЭДТА, 5 мМ трис-НСl буфере рН 7,2.

##### **Получение препарата СОД:**

Навеску печени промывают охлажденной средой выделения, измельчают ножницами и гомогенизируют с 6 объемами 0,25 М сахарозы. Гомогенат центрифугируют при 52 000 g в течение 60 мин.

Осадок отбрасывают, а супернатант подвергают тепловой обработке при 60 °С в течение 2 мин. Образовавшийся осадок удаляют центрифугированием при

9 000 g в течение 25 мин. В надосадочной жидкости определяют содержание белка биуретовым методом.

### ***Определение активности супероксиддисмутазы в процессе аутоокисления адреналина***

Метод определения активности супероксиддисмутазы основан на измерении интенсивности аутоокисления адреналина, которое инициируется супероксидными радикалами, образующимися при взаимодействии адреналина со следами металлов в щелочной среде. Супероксиддисмутаза ингибирует этот процесс, взаимодействуя с продуктами одноэлектронного восстановления кислорода. Количество окисленного адреналина оценивается по образованию окисленного продукта с максимумом поглощения (A) при  $\lambda = 347$  нм.

#### **Реактивы:**

1. Бикарбонатный буфер, 0,2 М, рН 10,65
2. Адреналин, 1 %
3. Супероксиддисмутаза, 35 мкМ

#### **Ход работы:**

В кювету для спектрофотометра вносят 1,8 мл бикарбонатного буфера, 100 мкл СОД (конечная концентрация 1,75 мкМ) и тщательно перемешивают. Производят измерение оптической плотности образца при  $\lambda = 347$  нм (устанавливают оптическую плотность равную 0,000 единиц).

В кювету вносят 100 мкл раствора адреналина (запускают реакцию), быстро перемешивают и начинают отсчет времени реакции.

Измерение оптической плотности раствора проводят в течение 3 мин с интервалом 20 сек.

Аналогичным образом проводят измерение оптической плотности контрольной пробы, оценивая степень интенсивность аутоокисления адреналина в отсутствие ингибитора. В контрольный образец вместо раствора супероксиддисмутазы вносят 100 мкл  $H_2O$  бидистиллированной.

Активность супероксиддисмутазы оценивают по степени ингибирования скорости реакции аутоокисления адреналина. Процент ингибирования скорости реакции рассчитывают следующим образом:

$$\% \text{ ингибирования} = (1 - \Delta D_{\text{оп}} / \Delta D_{\text{к}}) * 100\% ,$$

где  $\Delta D_{\text{оп}}$  – разница между величиной оптической плотности на 0 и 3 минуте определения;

$\Delta D_{\text{к}}$  – разница между величиной оптической плотности контрольного раствора на 0 и 3 минуте определения.



2. Ацетон, х.ч.
3. К-фосфатный буфер, 1 мМ, рН 7,5
4.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , кристаллический
5.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , насыщенный раствор
6.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , полунасыщенный раствор

#### **Ход работы:**

**Подготовка исходного материала.** Дрожжи измельчают и сушат на воздухе при комнатной температуре до постоянного веса.

**Экстракция.** 50 г сухих дрожжей заливают 150 мл двузамещенного фосфата натрия (66 ммоль/л) и в течение 2 ч термостатируют при 37°C (периодически перемешивая до получения однородной суспензии). После термостатирования суспензию охлаждают до комнатной температуры, а затем центрифугируют 30 мин при 18 000 g (для проведения более полной экстракции суспензию после термостатирования следует оставить на 3 часа при комнатной температуре, а затем центрифугировать).

**Тепловая обработка.** Центрифугат нагревают до 55°C на водяной бане (температура бани 70-75°C), термостатируют в течение 15 мин, а затем охлаждают на льду. После охлаждения центрифугируют 7 мин при 40 000 g. Осадок отбрасывают, а центрифугат можно хранить в холодильнике в течение суток (для длительного хранения разляют на аликвоты и хранят в морозильнике).

**Фракционирование ацетоном.** Центрифугат помещают в ацетоновую баню при -4°C и добавляют предварительно охлажденный ацетон (50 мл ацетона на каждые 100 мл дрожжевого экстракта).

Затем смесь центрифугируют при 18 000 g в течение 5 мин при -2°C. К центрифугату добавляют еще 55 мл ацетона на каждые 100 мл дрожжевого экстракта и центрифугируют повторно при 40 000 g в течение 5 мин при -2°C.

Осадок суспендируют в 40 мл бидистиллированной воды и диализуют против 1 л фосфатного буфера в течение 3 часов при непрерывном перемешивании (смену буфера производят четыре раза).

**Кристаллизация.** Осадок, выпавший в процессе диализа удаляют центрифугированием при 40 000g в течение 5 мин. К супернатанту добавляют сульфат аммония (3,6 г на каждые 10 мл), инкубируют 20 мин при комнатной температуре, а затем центрифугируют при 40 000 g в течение 15 мин. К центрифугату при постоянной перемешивании добавляют 1,2 г сульфата аммония на каждые 10 мл и оставляют на холоду для выпадения кристаллов.

Суспензию кристаллов центрифугируют при 40 000 g в течение 15 мин. Осадок суспендируют в небольшом объеме сульфата аммония (полунасыщенного) и хранят в холодильнике.

На каждой стадии выделения и очистки алкогольдегидрогеназы из пекарских дрожжей проводят определение содержания белка биуретовым методом и определяют удельную активность фермента.

## *Определение активности алкогольдегидрогеназы*

### **Реактивы:**

1. Na-фосфатный буфер, 60 mM, pH 8,5
2. Этанол – 3 M
3. NAD – 15 mM, pH 6,0
4. Алкогольдегидрогеназа, 1 E/мл
5. Изопропанол, 3 M
6. Na-фосфатный буфер, 60 mM с различными значениями pH (6,0; 6,4; 6,8; 7,4; 7,8; 8,2; 8,6; 9,0)

### **Ход работы:**

1. В кювету для спектрофотометра помещают реакцию смесь:
  - 2,25 мл бидистиллированной воды
  - 0,5 мл натрий-фосфатного буфера
  - 0,1 мл NAD
  - 0,05 мл фермента
  - 0,1 мл этилового спирта
2. Смесь перемешивают и измеряют оптическую плотность при 340 нм (контроль – реакция смесь без субстрата, вместо этилового спирта – 0,1 мл бидистиллированной воды).
3. Через 30 сек повторно измеряют оптическую плотность при 340 нм и рассчитывают активность фермента.

Коэффициент молярной экстинкции  $\epsilon$  при 340 нм для восстановленного NADH  $6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

## *Изучение свойств алкогольдегидрогеназы из пекарских дрожжей*

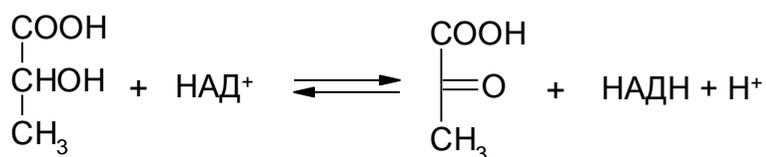
**1. Изучение субстратной специфичности алкогольдегидрогеназы.** Определяют активность ферментного препарата алкогольдегидрогеназы по отношению к этанолу и изопропанолу

**2. Изучение влияния ингибиторов на активность алкогольдегидрогеназы.** Проводят определение активности фермента в присутствии мочевины и тиомочевины в концентрациях в реакционной смеси от 0,001 до 0,1 M ( $10^{-3}$  M,  $5 \cdot 10^{-3}$ ,  $10^{-2}$ ,  $5 \cdot 10^{-2}$ ,  $10^{-1}$  M). На основании полученных данных делают вывод о влиянии мочевины и тиомочевины на активность алкогольдегидрогеназы.

**3. Изучение влияния pH реакционной смеси на активность алкогольдегидрогеназы.** Определяют активность алкогольдегидрогеназы при постоянной ионной силе и различных значениях pH реакционной смеси: 6,0; 6,4; 6,8; 7,4; 7,8; 8,2; 8,6; 9,0 (используя Na-фосфатный буфер с различными значениями pH). На основании полученных данных делают вывод о влиянии pH на активность алкогольдегидрогеназы и pH оптимуме действия фермента.

### 2.3. Выделение, определение активности и изучение свойств лактатдегидрогеназы

Лактатдегидрогеназа (L-лактат : NAD-оксидоредуктаза, 1.1.1.27, ЛДГ) катализирует окисление молочной кислоты до пирувата, а также обратную реакцию - восстановление пировиноградной кислоты до молочной в процессе анаэробного гликолиза



Равновесие реакции сдвинуто в сторону образования молочной кислоты. Лактатдегидрогеназа, как и все ферменты гликолитического расщепления глюкозы, локализована в цитоплазме.

Лактатдегидрогеназа – олигомерный белок, состоящий из 4 полипептидов двух типов Н и М. В зависимости от сочетаний субъединиц различают 5 изоформ лактатдегидрогеназы: Н<sub>4</sub>, Н<sub>3</sub>М<sub>1</sub>, Н<sub>2</sub>М<sub>2</sub>, Н<sub>1</sub>М<sub>3</sub> и М<sub>4</sub>. Изоформа М<sub>4</sub> преимущественно локализована в скелетных мышцах, а Н<sub>4</sub> – в сердечной. Наличие изоформ фермента, имеющих различную тканевую локализацию, обуславливает его важное диагностическое значение.

Лактатдегидрогеназа обладает высокой субстратной и коферментной специфичностью. Эффективность НАД как кофермента почти в 200 раз выше, чем НАДФ. Молекула ЛДГ содержит 4 молекулы кофермента, причем при низкой концентрации кофактора в реакционной среде, лактатдегидрогеназа диссоциирует на субъединицы. Каталитической активностью обладает олигомерная форма фермента.

В состав активного центра лактатдегидрогеназы входят аминокислотные остатки гистидина, аргинина и тирозина. Каталитическая активность фермента зависит от наличия свободных SH-групп, поэтому ингибиторами фермента являются все сульфгидрильные реагенты. Ингибирование ЛДГ происходит также в присутствии высоких концентрации молочной кислоты и НАД.

#### *Выделение лактатдегидрогеназы из скелетных мышц*

##### **Реактивы:**

1. КОН, 30 мМ
2. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, кристаллический
3. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, насыщенный раствор, рН 7,5-7,8 (рН доводят NH<sub>4</sub>ОН)

Выделение лактатдегидрогеназы проводится на льду или при охлаждении.

##### **Ход работы:**

**Экстракция.** Навеску мышечной ткани гомогенизируют с равным объемом 30 мМ КОН. Полученный гомогенат центрифугируют при 18 000g в течение 10 мин.

Супернатант отбирают и оставляют на льду. Осадок ресуспендируют в H<sub>2</sub>O бидистиллированной (½ от первоначального объема КОН), оставляют на 5 мин на льду, а затем центрифугируют при 18 000 g в течение 10 мин. Супернатант объединяют с полученным после первого центрифугирования.

**Фракционирование и тепловая обработка.** К экстракту, содержащему лактатдегидрогеназу, медленно при перемешивании добавляют насыщенный раствор сульфата аммония, рН 7,5-7,8 до насыщения 0,52 (104 мл (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> на 100 мл экстракта). Инкубируют на холоду в течение 20 мин, а затем центрифугируют. Осадок отбрасывают, а к супернатанту добавляют кристаллический (хорошо измельченный) сульфат аммония до насыщения 0,72 (13 г (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> на 100 мл). Раствор центрифугируют при 40 000 g в течение 15 мин.

Осадок растворяют в небольшом количестве H<sub>2</sub>O бидистиллированной (охлажденной), определяют содержание белка биуретовым методом. Полученный раствор с известной концентрацией разводят до содержания белка 25-30 мг в 1 мл и добавляют к нему при перемешивании насыщенный раствор сульфата аммония до насыщения 0,55 (122 мл (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> на 100 мл экстракта), инкубируют при комнатной температуре (постоянно перемешивая) в течение 15 мин, а затем центрифугируют при 40 000 g в течение 10 мин. Осадок ресуспендируют в небольшом количестве H<sub>2</sub>O бидистиллированной.

Полученный раствор белка ставят на водяную баню при 58°C и инкубируют 3 мин, а затем переносят на лед. Выпавший осадок удаляют центрифугированием при 10 000 g в течение 20 мин.

**Кристаллизация.** К центрифугату при постоянном перемешивании медленно добавляют насыщенный раствор сульфата аммония до помутнения раствора и оставляют в холодильнике на 10 ч (для кристаллизации). Суспензию кристаллов центрифугируют при 10 000 g в течение 20 мин. Осадок ресуспендируют в небольшом количестве сульфата аммония (с насыщением 0,55). Суспензию фермента хранят при +4°C.

### ***Определение активности лактатдегидрогеназы***

Под действием лактатдегидрогеназы происходит восстановление пировиноградной кислоты (ПВК) до молочной, которое сопровождается уменьшением количества НАД восстановленного. Восстановление ПВК и окисление НАДН происходит в эквимольном соотношении. Об убыли НАДН судят по уменьшению оптической плотности при  $\lambda = 340$  нм (максимум поглощения восстановленного НАД,  $\epsilon = 6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ )

### **Реактивы:**

1. Калий-фосфатный буфер, 40 мМ, рН 7,4
2. Калий фосфатный буфер, 10 мМ, оН 7,4
3. Пируват Na, 10 мМ
4. НАД восстановленный, 2 мМ, рН 8,0
5. Лактатдегидрогеназа, 0,4 Е/мл в 10 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7,4 (свежеприготовленный раствор)
6. Реактивы для определения содержания белка биуретовым методом

**Ход работы:**

1. В кювету для спектрофотометра помещают реакцию смесь:  
2,75 мл 40 мМ калий-фосфатного буфера  
0,1 мл НАДН  
0,1 мл пирувата натрия  
0,05 мл лактатдегидрогеназы
2. Быстро перемешивают и начинают отсчет времени реакции. Измерение оптической плотности при  $\lambda = 340$  нм производят в течение 3-5 мин против контроля (дистиллированной воды).
3. Рассчитывают удельную активность лактатдегидрогеназы, предварительно определив содержание белка в ферментном препарате биуретовым методом.

### *Изучение свойств лактатдегидрогеназы*

#### **1. Получение тканевого экстракта и определение активности лактатдегидрогеназы.**

**Среда выделения:**

Калий-фосфатный буфер, 0,1 М, рН 7,4

**Ход работы:**

1. Навеску ткани 3-4 г (предварительно очищенную от жира и соединительной ткани и промытую охлажденной средой выделения) измельчают ножницами и гомогенизируют с 4 объемами среды выделения.
2. Гомогенат центрифугируют при 600 g в течение 10 мин. Супернатант отфильтровывают через 4 слоя марли и повторно центрифугируют при 15 000 g в течение 10 мин.

Полученный центрифугат используют в качестве ферментного препарата, предварительно определив содержание белка биуретовым методом. Препарат хранят при 4°C.

Для определения активности лактатдегидрогеназы тканевой экстракт, содержащий 15-20 мг белка в 1 мл, разводят в 10-20 раз.

#### **2. Определение активности лактатдегидрогеназы в тканевых экстрактах мышечной ткани, сердца и печени.**

В тканевых экстрактах определяют удельную активность лактатдегидрогеназы при концентрации пирувата натрия от 0,05 до 2,0 мМ. На

основании полученных результатов делают вывод о зависимости активности лактатдегидрогеназы из различных тканей от концентрации субстрата.

### 3. Изучение влияния щавелевоуксусной кислоты (ЩУК) на активность лактатдегидрогеназы.

Удельную активность лактатдегидрогеназы из разных тканей исследуют при концентрации пирувата натрия 1,5 мМ (для определения активности в мышцах и печени) и 0,15 мМ (для определения активности в сердце) и в присутствии ЩУК в концентрации 0,01 – 0,1 мМ. Делают вывод о влиянии ЩУК на активность фермента в разных тканях.

#### 2.4. Определение активности каталазы и изучение зависимости активности фермента от температуры

Метод определения активности каталазы основан на способности пероксида водорода образовывать с молибдатом аммония стойкий окрашенный комплекс. Активность исследуемого фермента определяют спектрофотометрически при длине волны 410 нм.

##### Реактивы:

1. 0,05 М трис-НСl-буфер, рН 7,4
2. 0,08 % пероксид водорода
3. 4,5 % аммоний молибденовокислый (молибдат аммония)

##### Ход работы:

Приготовить реакционную смесь (субстратно-буферную), содержащую 10 мл трис-НСl-буфера (рН 7,4) и 30 мл 0,08% пероксида водорода.

К 2 мл субстратно-буферной смеси добавить по 2 мл 4,5%-й раствор аммония молибденовокислого (табл. 2).

**Таблица 2 – Порядок заполнения проб.**

Реактивы	Контрольная проба	Опытная проба	Ход работы
Субстратно-буферная смесь	2 мл	2 мл	Инкубировать 10 мин при 37°C
Гомогенат	-	0,1 мл	Инкубировать 3 мин при 37°C
Молибдат аммония	2 мл	2 мл	После добавления измерить оптическую плотность опытной пробы при 410 нм (Аоп)
Гомогенат	0,1 мл	-	После добавления измерить оптическую плотность контрольной пробы при 410 нм (Ак)

В качестве оптического контроль используют: 1 мл буфера, 3 мл дистиллированной воды и 0,1 мл гомогената (A = 0 / ZERO).

Расчет результатов производят по следующей формуле:

$$\begin{aligned} & \text{Активность каталазы ((Е/мл)/мин)} = \\ & = (A_k - A_{оп}) \times 12000 \times 4,1 \times 10^6 / 22,2 \times 10^6 \times 3 \end{aligned}$$

где 12000 – фактор разведения,  
 $22,2 \times 10^6$  – коэффициент молярной  $H_2O_2$  при 410 нм,  
 3 – время инкубации 3 мин,  
 4,1 – объем реакционной смеси,  
 $10^6$  – коэффициент пересчета в мкмоль.

### ***Изучение активности каталазы от температуры***

Провести определение активности каталазы, инкубируя реакционную смесь в течение 10 мин и 3 мин (см. таблицу подготовки проб) при 4 °С, 10 °С, 20 °С, 25 °С, 30 °С, 35 °С, 45 °С и 60 °С. Постройте график зависимости активности каталазы от температуры инкубации. Сделайте вывод о температурном оптимуме этого гемопротейна.

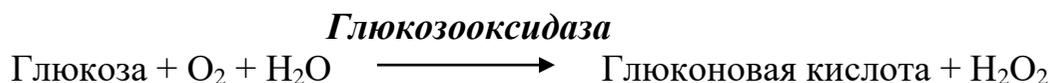
### **2.5. Определение содержания глюкозы глюкозооксидазным методом**

Благодаря высокой специфичности, позволяющей определять глюкозу в присутствии других сахаров, энзиматический метод имеет ряд преимуществ перед другими методами.

Глюкоза в водной среде в присутствии кислорода воздуха и при участии фермента глюкозооксидазы окисляется до глюколактона (глюконовой кислоты). Этот процесс сопровождается образованием пероксида водорода.

В присутствии пероксида водорода фермент пероксидаза катализирует окисление пероксидазного окисления *o*-толидина (3, 3'-диметилбензидаина), которое сопровождается образованием окрашенного окисленного продукта реакции.

Химизм реакций схематически можно представить следующим образом:



Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации глюкозы и измеряется спектрофотометрическим методом.

#### **Реактивы:**

1. 0,25 М ацетатный буфер Рн 4,8;
2. 3 % раствор ТХУ;

3. глюкозооксидаза;
4. пероксидаза из хрена;
5. стандартный раствор глюкозы (100 мг/100 мл);
6. 1 % раствор *o*-толидина в 96 % этаноле;
7. биологическая жидкость (плазма, сыворотка, моча).

**Ход работы:**

1. Приготовить рабочий реактив для определения глюкозы. В 80 мл ацетатного буфера растворить 1 мг глюкозооксидазы и 1 мг пероксидазы, прилить 1 мл 1 % раствора *o*-толидина и довести объем смеси до 100 мл ацетатным буфером. Реактив готовится за 1–2 ч до определения.

2. Провести депротеинизацию биологических жидкостей: в центрифужную пробирку внести 1,8 мл ТХУ и влить по стенке 0,2 мл исследуемой биологической жидкости (кровь, моча). Содержимое перемешать, центрифугировать 10 мин при скорости 3000 об/мин.

3. Подготовить опытную, стандартную и контрольную пробы, согласно таблице 3:

**Таблица 3 – Порядок заполнения проб.**

Проба	Опытная	Стандартная	Контрольная
Биологический материал (центрифугат)	1 мл	–	–
Стандартный раствор глюкозы	–	0,1 мл	–
Вода	–	0,9 мл	1 мл
Рабочий реактив	3 мл	3 мл	3 мл

Примечание. Знак «–» обозначает отсутствие биологического материала, глюкоза и воды.

Подготовленные пробы перемешивают и инкубируют при 37 °С в течение 15 мин. Затем измеряют оптическую плотность опытной ( $A_{оп}$ ) и стандартной ( $A_{ст}$ ) проб по отношению к контрольной при  $\lambda = 490–540$  нм, кювета = 1 см. Окраска стабильна в течение 15 мин. Если оптическая плотность пробы превышает 0,85, ее разводят дистиллированной водой в соотношении 1:1, а полученный результат умножают на 2.

Содержание глюкозы ( $C_{оп}$ ) в исследуемой жидкости рассчитывают по формуле:

$$C_{оп} = A_{оп}(C_{ст} / A_{ст})$$

Результаты записывают в протокол.

## 2.6. Справочные материалы

### 2.6.1. Определение неорганического фосфата с аскорбиновой кислотой

**Реактивы:**

1. 0,42% раствор  $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , приготовленный на 1н  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (реактив 1).
2. 10 % раствор аскорбиновой кислоты, свежеприготовленный (реактив 2).
3. Смесь 1 V часть (реактива 1) и 6 V частей (реактива 2). Готовится непосредственно перед определением.
4. Стандартный раствор фосфата ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), содержащий 0,23 мкмоль фосфата в 1 мл.

#### **Ход работы:**

К 0,9 мл исследуемого раствора (безбелкового фильтрата) добавляют 3 мл раствора (3). Перемешивают и инкубируют 20 минут при  $45^\circ\text{C}$  или 60 минут при  $37^\circ\text{C}$ . После охлаждения фотометрируют при 820 нм против контрольной пробы. Контрольная проба готовится как и опытная, вместо исследуемого раствора вносится дистиллированная вода.

Для построения калибровочного графика берут несколько проб с различными количествами стандартного раствора фосфата (по 0,15; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9 мл, объем доводят до 0,9 мл дистиллированной водой).

### **2.6.2. Определение содержания белка биуретовым методом**

#### **Реактивы:**

1. Стандартный раствор белка (бычий сывороточный альбумин), 10 мг в 1 мл

2. Биуретовый реактив:

0,15 г  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

0,6 г тартрат-К/Na (К/Na – виннокислый)

растворяют в 50 м  $\text{H}_2\text{O}$ , при перемешивании приливают 30 мл 10 % -ного раствора  $\text{NaOH}$ , добавляют 0,1 г  $\text{KI}$  и доводят раствор дистиллированной водой до 100 мл.

Биуретовый реактив хранят в полиэтиленовой посуде.

#### **Ход работы:**

1. К 1 мл раствора белка добавить 4 мл биуретового реактива, перемешать и инкубировать при комнатной температуре в течение 30 мин.

2. Колориметрировать на ФЭКе при 540 нм против контрольной пробы, содержащей вместо раствора белка 1 мл дистиллированной воды.

#### **Построение калибровочного графика:**

К 1 мл раствора БСА, содержащего от 2 до 10 мг белка в 1 мл добавить 4 мл биуретового реактива, инкубировать 30 минут при комнатной температуре, а затем колориметрировать при 540 нм на ФЭКе. Контрольная проба вместо раствора белка содержит 1 мл дистиллированной воды.

### **2.6.3. Определение содержания белка методом Лоури**

#### **Реактивы:**

1. Стандартный раствор белка, содержащий 0,25 мг в 1 мл.

2.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  – 2 % раствор в 0,1 н растворе  $\text{NaOH}$ .
3.  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 0,5 % раствор в 1 % растворе цитрате натрия.
4. Рабочий раствор: 1 мл реактива № 3 смешивают с 50 мл реактива 2.

Рабочий раствор в день определения.

5. Реактив Фолина – Чокальтеу: 10 г  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (перекристаллизованный) и 2,5 г  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  помещают в круглодонную колбу на 200—250 мл, приливают 70 мл воды и хорошо перемешивают. К полученному раствору добавляют 5 мл 85 % раствора фосфорной кислоты и 10 мл концентрированной  $\text{HCl}$  (х.ч.). Колбу присоединяют к обратному холодильнику (на шлифе), ставят на сетку и кипятят в течение 10 ч. Затем в раствор добавляют 15 г  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ , 5 мл  $\text{H}_2\text{O}$  и одну каплю брома. Раствор перемешивают и нагревают для удаления брома. После охлаждения доводят  $\text{H}_2\text{O}$  до 100 мл, фильтруют и разводят  $\text{H}_2\text{O}$  с таким расчетом, чтобы получился 1 н раствор кислоты (т. е. приблизительно вдвое). Кислотность определяют титрованием разведенного в 10 раз реактива 0,1 н раствором  $\text{NaOH}$  в присутствии фенолфталеина. Реактив может храниться в темной склянке длительное время.

6.  $\text{CCl}_3\text{COOH}$  (ТХУ) – 10 % раствор.

7.  $\text{NaOH}$  – 1 н раствор.

**Ход определения:**

К 0,4 мл исследуемого раствора, содержащего 10 – 100 мкг белка, приливают 2,0 мл рабочего раствора (№ 4), перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 10 мин. Затем добавляют 0,2 мл реактива Фолина – Чокальтеу, содержимое пробирки тщательно перемешивают и через 30 мин колориметрируют при 750 нм. Содержание белка рассчитывают по калибровочному графику, построенному по стандартному раствору.

В случае предварительного осаждения белка к исследуемому раствору добавляют  $\text{CCl}_3\text{COOH}$  (ТХУ) из такого расчета, чтобы конечная концентрация ее была равна 3 – 4%. Раствор тщательно перемешивают и оставляют на 10 – 20 мин. Выпавший осадок белка отделяют центрифугированием и промывают 2 % раствором  $\text{CCl}_3\text{COOH}$ . К осадку добавляют 1 – 2 мл 1 н раствора  $\text{NaOH}$  и осторожно подогревают до растворения осадка белка. Раствор белка количественно переносят в мерную колбу на 25 – 50 мл, доводят водой до метки, тщательно перемешивают и проводят определение белка.

## 2.6.4. Буферные смеси

Таблица 4 – Глицин – HCl буфер (0,05 моль/л); pH 2,2 – 3,6 (Глицин, М.в. = 75,07).

рН	Глицин 0,2 моль/л, мл	HCl 0,2 н, мл	рН	Глицин 0,2 моль/л, мл	HCl 0,2 н, мл
2,2	50	44,0	3,0	50	11,4
2,4	50	32,4	3,2	50	8,2
2,6	50	24,2	3,4	50	6,4
2,8	50	16,8	3,6	50	5,0

Объем довести дистиллированной водой до 200 мл.

Таблица 5 – Na-ацетат – лимонная кислота буфер (0,2 моль/л); pH 3,6 – 5,8, (Na-ацетат $\cdot$ 3H<sub>2</sub>O, М.в. = 136,09).

рН	Na-ацетат 0,2 моль/л, мл	лимонная кислота 0,2 н, мл	рН	Na-ацетат 0,2 моль/л, мл	лимонная кислота 0,2 н, мл
3,6	0,75	9,25	4,8	5,90	4,10
3,8	1,20	8,80	5,0	7,00	3,00
4,0	1,80	8,20	5,2	7,90	2,10
4,2	2,65	7,35	5,4	8,60	1,40
4,4	3,70	6,30	5,6	9,10	0,90
4,6	4,90	5,10	5,8	9,40	0,60

Таблица 6 – Ацетатный буфер (0,2 моль/л); pH 3,6 – 5,8 (Na-ацетат $\cdot$ 3H<sub>2</sub>O, М.в. = 136,09).

рН	Na-ацетат 0,2 моль/л, мл	CH <sub>3</sub> COOH 0,2 моль/л, мл	рН	Na-ацетат 0,2 моль/л, мл	CH <sub>3</sub> COOH 0,2 моль/л, мл
3,6	0,75	9,25	4,8	5,90	4,10
3,8	1,20	8,80	5,0	7,00	3,00
4,0	1,80	8,20	5,2	7,90	2,10
4,2	2,65	7,35	5,4	8,60	1,40
4,4	3,70	6,30	5,6	9,10	0,90
4,6	4,90	5,10	5,8	9,40	0,60

Таблица 7 – Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Na-фосфатный буфер) (0,1 моль/л); pH 5,8 – 8,0, (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, М.в. = 178,05; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O, М.м. = 358,22; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, М.в. = 138,0; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, М.м. = 156,03).

рН	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,2 моль/л, мл	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,2 моль/л, мл	рН	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,2 моль/л, мл	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,2 моль/л, мл
5,8	8,0	92,0	7,0	61,0	39,0
6,0	12,3	87,7	7,2	72,0	28,0
6,2	18,5	81,5	7,4	81,0	19,0
6,4	26,5	73,5	7,6	87,0	13,0
6,6	37,5	62,5	7,8	91,5	8,5
6,8	49,0	51,0	8,0	94,7	5,3

Объем довести дистиллированной водой до 200 мл.

**Таблица 8 – К-фосфатный буфер (0,05 моль/л); pH 5,8 – 8,0, (KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, М.в. = 136,09).**

pH	KН <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		pH	KOH	
	0,2 моль/л, мл	0,2 моль/л, мл		0,2 моль/л, мл	0,2 моль/л, мл
5,8	5	0,36	7,0	5	2,91
6,0	5	0,56	7,2	5	3,47
6,2	5	0,81	7,4	5	3,91
6,4	5	1,16	7,6	5	4,24
6,6	5	1,64	7,8	5	4,45
6,8	5	2,24	8,0	5	4,61

Объем довести дистиллированной водой до 20 мл.

**Таблица 9 – “Трис”-HCl буфер (0,05 моль/л); pH 7,2 – 9,1, (Трис-(оксиметил)-аминометан, М.в. = 121,14).**

pH		Трис 0,2 моль/л, мл	HCl 0,2 моль/л, мл
23°C	37°C		
9,10	8,95	25,0	5,0
8,92	8,78	25,0	7,5
8,74	8,60	25,0	10,0
8,62	8,48	25,0	12,5
8,50	8,37	25,0	15,0
8,40	8,27	25,0	17,5
8,32	8,18	25,0	20,0
8,23	8,10	25,0	22,5
8,14	8,00	25,0	25,0
8,05	7,90	25,0	27,5
7,96	7,82	25,0	30,0
7,87	7,73	25,0	32,5
7,77	7,63	25,0	35,0
7,66	7,52	25,0	37,5
7,54	7,40	25,0	40,0
7,36	7,22	25,0	42,5
7,20	7,05	25,0	45,0

Объем довести дистиллированной водой до 100 мл.

### 3. РАЗДЕЛ КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ

#### 3.1. Структура рейтинговой системы

Структура рейтинговой системы приведена в учебной программе УВО по учебной дисциплине «Энзимология» для специальности: 1-31 01 02 Биохимия (Регистрационный № УД-6759/уч., 2019 г.).

1. Учебная программа УВО по учебной дисциплине «Энзимология» для учреждений высшего образования по специальности 1-31 01 02 Биохимия [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/230753>. – Дата доступа: 12.03.2022.

#### 3.2. Задания, тесты и задачи для самоконтроля

1. Установить соответствие между ферментами и катализируемыми реакциями:

*Ферменты:*

1. карбоксипептидаза;
2. протеиназа;
3. аминопептидаза.

*Катализируемая реакция:*

- a. гидролитически отщепляет N-концевую аминокислоту в пептиде;
- b. гидролизует пептидные связи;
- c. гидролитически отщепляет C-концевую аминокислоту в пептиде.

2. Установить соответствие между ферментами и катализируемыми реакциями:

*Ферменты:*

1. каталаза;
2. цитохром С;
3. пероксидаза.

*Катализируемая реакция*

- a. переносит электроны в дыхательной цепи;
- b. расщепляет  $H_2O_2$ ;
- c. катализирует окисление веществ за счет  $H_2O_2$ .

3. Установить соответствие между ферментами и катализируемыми реакциями:

*Ферменты:*

1. амилаза;
2. сахараза;
3. гликогенфосфорилаза.

*Катализируемая реакция:*

- a. катализирует расщепление  $\alpha(1\rightarrow4)$ -связи между остатками глюкопиранозы с образованием глюкозо-1-фосфата;
- b. катализирует гидролитическое расщепление  $\alpha(1\rightarrow4)$ -связи между остатками глюкопиранозы
- c. катализирует расщепление  $(1\rightarrow2)$ -связи между остатками  $\alpha$ -D-глюкопиранозы и  $\beta$ -D-фруктофуранозы.

4. Простые ферменты состоят из:

- a. аминокислот и углеводов;
- b. аминокислот;
- c. аминокислот и небелковых компонентов.

5. Активный центр простых ферментов формируется из:

- a. одной аминокислоты;
- b. остатков нескольких аминокислот;
- c. остатков нескольких аминокислот и небелковых компонентов;
- d. небелковых компонентов.

6. Активный центр сложных ферментов формируется из:

- a. одной аминокислоты;
- b. остатков нескольких аминокислот;
- c. остатков нескольких аминокислот и небелковых компонентов;
- d. небелковых компонентов.

7. Сходными чертами между ферментами и неферментативными катализаторами являются:

- a. катализ только энергетически возможных реакций;
- b. взаимодействие с одним из компонентов реакционной среды;
- c. неизменность направления реакции;
- d. обратимость каталитической реакции.

8. Скорость ферментативной реакции зависит от:

- a. концентрации кофермента;
- b. концентрации фермента ;
- c. концентрации субстрата;
- d. молекулярной массы субстрата.

9. К коферментам относятся:

- a. пируват;
- b. НАД<sup>+</sup>;
- c. пиридоксальфосфат;
- d. витамин В<sub>1</sub>;
- e. тирозин.

10. Класс ферментов указывает на:
- конформацию фермента;
  - тип кофермента;
  - тип химической реакции, катализируемой данным ферментом;
  - строение активного центра фермента.
11. Конкурентными ингибиторами ферментов являются:
- металлы;
  - аминокислоты;
  - вещества, по структуре подобные субстрату;
  - вещества, по структуре подобные активному центру фермента;
  - полипептиды.
12. Конкурентные ингибиторы являются:
- обратимыми;
  - необратимыми;
  - обратимыми в определенных условиях.
13. В состав фермента, катализирующего окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты, входит:
- биотин;
  - глутатион;
  - пиридоксин;
  - НАД<sup>+</sup>;
  - фолиевая кислота.
14. Аллостерическими эффекторами ферментов являются:
- дипептиды;
  - коферменты;
  - продукты превращения субстрата;
  - углеводы;
  - липиды.
15. Ингибиторами аллостерического фермента происходит в результате действия:
- субстрата;
  - положительного эффектора;
  - отрицательного эффектора;
  - кофермента.
16. Аллостерические ферменты могут иметь:
- только один аллостерический центр;
  - несколько аллостерических центров;

с. в процессе ферментативной реакции число аллостерических центров может меняться.

17. Мультиферментные комплексы представляют собой:

- a. совокупность ферментов одного класса;
- b. ферменты, катализирующие сходные реакции;
- c. полиферментные системы, выполняющие определенную функцию;
- d. ферменты, ассоциированные с клеточной мембраной.

18. При взаимодействии фермента с субстратом конформационные изменения характерны для:

- a. фермента;
- b. субстрата;
- c. фермента и субстрата.

19. В результате взаимодействия фермента с субстратом энергия активации соответствующей ферментативной реакции:

- a. увеличивается;
- b. уменьшается;
- c. не изменяется.

20. В результате иммобилизации ферментов на нерастворимых носителях появляется возможность:

- a. увеличить активность ферментов;
- b. получить продукт реакции, не загрязненный ферментным белком;
- c. уменьшить время протекания ферментативной реакции.

21. К какому классу относятся ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции, лежащие в основе биологического окисления?

- a. гидролазы;
- b. оксидоредуктазы;
- c. лигазы;
- d. лиазы.

22. Оксидазы:

- a. ускоряют перенос протонов (электронов) на промежуточный субстрат, но не на кислород;
- b. катализируют перенос только электронов;
- c. катализируют перенос только протонов
- d. катализируют перенос протонов (электронов) непосредственно на кислород.

23. Гидролазы – это ферменты, катализирующие:

- a. окислительно-восстановительные реакции;

- b. реакции внутри и межмолекулярного переноса атомов, групп атомов или радикалов;
- c. расщепление внутримолекулярных связей;
- d. обратимые реакции отщепления различных групп от субстратов не гидролитическим путем.

24. К какому классу относятся ферменты, катализирующие синтез органических веществ из двух исходных молекул с использованием энергии распада АТФ?

- a. гидролазы;
- b. лиазы;
- c. лигазы;
- d. оксидоредуктазы.

25. Удельная активность фермента это:

- a. число молекул субстрата, подвергающихся превращению одной молекулой фермента в минуту;
- b. число единиц активности фермента, приходящихся на 1 мг белка;
- c. количество фермента, способное вызывать превращение 1 моля субстрата в продукт в 1 секунду.

26. Молекулярная активность фермента это:

- a. число молекул субстрата, подвергающихся превращению одной молекулой фермента в минуту;
- b. количество фермента, способное вызывать превращение 1 моля субстрата в продукт в 1 секунду;
- c. число каталов на 1 г активного белка;

27. Задача. Локализация ферментов.

Был получен гомогенат в 0,25 М сахарозе из 50 г печени крысы. С использованием метода дифференциального центрифугирования были получены субклеточные фракции, в которых определили содержание белка и активность глюкозо-6-фосфатазы. Глюкозо-6-фосфатазную активность определяли по накоплению фосфата неорганического при инкубировании реакционной среды, содержащей глюкозо-6-фосфат и исследуемую фракцию (ферментный препарат). Полученные данные приведены в Таблице 10.

Определите:

1) удельную активность глюкозо-6-фосфатазы (в мкг фосфата неорганического, образовавшегося за 1 мин, приходящиеся на 1 мг белка) в гомогенате и субклеточных фракциях;

2) количество глюкозо-6-фосфатазы и белка общее и в каждой фракции.

Какие выводы о локализации фермента в клетке можно сделать на основании полученных результатов?

**Таблица 10 – Фракционирование гомогената печени крыс**

Параметры	Фракция				
	гомогенат	Ядра	митохондри	микросомы	цитозоль
Общий объем, мл	50	10	10	5	75
Содержание белка, мг/мл	24	35	49	31	2,2
Объем, взятый для определения активности фосфатазы, мл	0,5	0,5	0,5	0,05	1,0
Изменение содержания неорганического фосфата за 5 мин, мкг	23	7,5	19	18	2

В какой степени происходит инактивация глюкозо-6-фосфатазы при фракционировании?

28. Задача. Зависимость активности амилазы слюны от pH.

Для изучения механизма активации амилазы слюны анионами была исследована активность фермента в присутствии 0,04 М NaCl и NaBr и без них при различных значениях pH. Данные об активности амилазы приведены в Таблице 11.

**Таблица 11 – Влияние анионов на активность амилазы слюны**

pH	Активность амилазы, усл.ед.		
	Без анионов	0,04 М NaCl	0,04 М NaBr
5,0	25	30	29
5,3	32	40	38
5,5	40	50	42
6,0	42	75	60
6,5	38	100	80
7,0	22	110	81
7,5	0,8	85	65
8,0	-	60	49
8,5	-	34	29
9,0	-	16	8

Постройте зависимость активности фермента от pH в присутствии активаторов и без них. Как активаторы влияют на pH оптимум действия амилазы?

Чем можно объяснить различную степень влияния анионов Cl<sup>-</sup> и Br<sup>-</sup> на активность амилазы?

Какие функциональные группы важны для функционирования амилазы (положительно или отрицательно заряженные)?

29. Задача. Выделение и очистка аминоксидазы.

Было проведено выделение аминоксидаз, способных окислять различные моно- и диамины (например, гистамин и кадаверин). Очистка и выделение ферментов включала следующие стадии:

1. Получение водно-солевого экстракта
2. Осаждение из водно-солевого экстракта
3. Переосаждение сульфатом аммония
4. Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе
5. Хроматография на фосфоцеллюлозе
6. Концентрирование препарата и гель-фильтрация
7. Повторная гель-фильтрация

На всех стадиях выделения и очистки проводили измерение содержания белка и активности аминоксидаз с двумя субстратами – кадаверином и гистамином. Данные об этих показателях приведены в Таблице 12.

**Таблица 12 – Активность аминоксидаз на различных стадиях очистки**

№ п/п	Фракция	Объем, мл	Содержание белка, мг/мл	Активность фермента, Е/мл	
				с кадаверином	с гистамином
1.	Водно-солевой экстракт	9620	12,0	4,90	4,84
2.	Раствор осадка после осаждения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3000	17,8	12,0	6,80
3.	Раствор после переосаждения	223	47,6	970	155,0
4.	Элюат после хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе	344	11,1	358	78,2
5.	Элюат после хроматографии на фосфоцеллюлозе	400	1,06	105	22,0
6.	Элюат после концентрации и гель-фильтрации	130	1,16	361	76,0
7.	Элюат после гель-фильтрации	345	0,24	52,0	12,0

Определите:

- 1) удельную активность и количество аминоксидаз на каждой стадии очистки;
- 2) соотношение удельных активностей моноаминоксидазы и диаминоксидазы.

На основании полученных данных сделайте вывод о субстратной специфичности очищенного препарата и исходного гомогената.

### 30. Задача. Механизм действия липазы.

Панкреатическая липаза катализирует гидролиз триацилглицеринов до диацилглицеринов и моноацилглицеринов в кишечном тракте. Диэтилпнитрофенилфосфат инактивирует фермент с выделением стехиометрического количества п-нитрофенола. Фосфат присоединяется к остатку серина в последовательности Leu-Ser-Gly-His. Изучение зависимости активности фермента от pH свидетельствует об участии в акте катализа функциональной группы с pH 5,8. Каким может быть механизм действия липазы?

### 3.3. Темы рефератов

1. Перспективы развития энзимологии.
2. Этапы развития энзимологии.
3. Рибозимы - катализаторы небелковой природы: разнообразие, структурные особенности и механизм действия
4. Использование ферментов в сельском хозяйстве и промышленности.
5. Ферменты в медицине: энзимопатологии, энзимодиагностика и энзимотерапия.
6. Ферменты как маркеры субклеточных фракций.
7. Методы выделения и очистки ферментов.
8. Методы определения ферментативной активности.
9. Методы определения аминокислот в активном центре ферментов и установления их роли в каталитическом действии.
10. Использование генноинженерных методов для определения аминокислот в активном центре фермента. Направленный мутагенез.
11. Структура, механизм действия и регуляция активности аспартатаминотрансферазы.
12. Структура, механизм действия и регуляция активности полифенолоксидазы.
13. Структура, механизм действия и регуляция активности гликогенфосфоорилазы.
14. Структура, механизм действия и регуляция активности креатинкиназы.
15. Структура, механизм действия и регуляция активности амилазы.
16. Структура, механизм действия и регуляция активности  $\beta$ -галактозидазы.
17. Структура, механизм действия и регуляция активности ДНКазы.
18. Структура, механизм действия и регуляция активности гиалуронидазы.
19. Активация и механизм действия пищеварительных протеолитических ферментов.
20. Каскад активации факторов свертывания крови.
21. Источники ферментов. Нахождение ферментов в природных объектах, локализация ферментов в клетке.

22. Биосинтез ферментов. Посттрансляционная модификация. Сборка ферментов.
23. Стабильность ферментов. Денатурация и инактивация ферментов. Принципы стабилизации ферментов.
24. Химическая модификация ферментов. Виды ферментных препаратов.
25. Прикладная энзимология, основные направления развития и области практического использования ферментов.
26. Имобилизованные ферменты. Методы иммобилизации. Свойства иммобилизованных ферментов.
27. Применение ферментов в химическом синтезе.
28. Иммуноферментный анализ.
29. Биосенсоры.
30. Инженерия биокатализаторов и биокаталитических систем.

### **3.4. Вопросы для подготовки к экзамену**

1. Энзимология – наука о ферментах. Особенности ферментативного катализа
2. Ферменты как биологические катализаторы. Рибозимы.
3. Принципы классификации ферментов. Общая характеристика классов ферментов. Номенклатура ферментов
4. Оксидоредуктазы. Общая характеристика класса. Примеры.
5. Гидролазы. Общая характеристика класса. Примеры.
6. Трансферазы. Общая характеристика класса. Примеры.
7. Синтазы (лиазы). Общая характеристика класса. Примеры.
8. Изомеразы. Общая характеристика класса. Примеры.
9. Синтетазы (лигазы). Общая характеристика класса. Примеры.
10. Синтазы и синтетазы. Сравнительная характеристика классов.
11. Структурная организация ферментов. Одно- и двухкомпонентные ферменты.
12. Кофакторы: коферменты и простетические группы, их важнейшие типы и представители.
13. Кофакторы оксидоредуктаз. Характеристика основных представителей.
14. Кофакторы трансфераз. Характеристика основных представителей.
15. Кофакторы синтеза и изомеризации. Характеристика основных представителей.
16. Роль металлов в каталитическом действии ферментов. Примеры металлоферментов и ферментов, активируемых металлами.
17. Принципы пространственной организации апофермента.
18. Структурная организация активного центра ферментов.
19. Взаимодействие фермента с субстратом. Основное и переходное состояния.

20. Образование фермент-субстратного комплекса и его роль в катализе. Многоточечное связывание субстрата
21. Типы ферментативного катализа и причины высокой каталитической активности ферментов.
22. Эффекты сближения и ориентации. Эффект конформационного соответствия.
23. Теория конформационного соответствия фермента и субстрата и теория индуцированного конформационного соответствия.
24. Кислотно-основной катализ (специфический и обобщенный). Внутримолекулярный кислотно-основной катализ.
25. Структура и каталитический механизм карбоксипептидазы А.
26. Ковалентный катализ. Нуклеофильный катализ.
27. Механизм каталитического действия сериновых протеаз. Химотрипсин: механизм активации и характеристика стадий катализа.
28. Принципы и особенности функционирования, организации и регуляции мультиферментных комплексов.
29. Уровни регуляции ферментативной активности.
30. Экстенсивный и интенсивный пути регуляция активности ферментов
31. Регуляция активности ферментов на уровне транскрипции. Индукция и репрессия ферментов.
32. Активация проферментов. Ограниченный протеолиз. Примеры.
33. Аллостерическая регуляция активности ферментов. Механизмы аллостерических взаимодействий.
34. Аллостерическая регуляция активности ферментов и реализация принципа обратной связи.
35. Ковалентная модификация ферментов.
36. Регуляция активности ферментов путем белок-белковых взаимодействий.
37. Взаимопревращение активных и неактивных форм ферментов.
38. Гормональный контроль ферментативной активности.
39. Роль вторичных посредников в активации протеинкиназ.
40. Регуляция активности гликогенфосфоорилазы.
41. Влияние на активность ферментов внешних факторов. Активаторы и ингибиторы ферментов.
42. Организация ферментов в клетках и тканях.
43. Внутриклеточная организация ферментов. Ферменты – маркеры субклеточных фракций.
44. Мультиферментные системы и принципы их организации.
45. Выделение и очистка ферментов. Методы выделения, очистки и разделения ферментов.
46. Методы выделения, очистки и разделения ферментов. Критерии чистоты ферментных препаратов.
47. Методы определения ферментативной активности.
48. Количественная характеристика ферментов.

49. Медицинская энзимология: энзимопатология, энзимодиагностика и энзимотерапия.

50. Применение ферментов в промышленности и сельском хозяйстве. Имобилизованные ферменты.

## 4. ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЙ РАЗДЕЛ

### 4.1. Учебно-программные материалы

Учебная программа УВО по учебной дисциплине «Энзимология» для учреждений высшего образования по специальности 1-31 01 02 Биохимия [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/230753>. – Дата доступа: 12.03.2022.

### 4.2. Рекомендуемая литература

#### Основная литература

1. Андрусенко, С. Ф. Общая и медицинская энзимология. Учебник / С. Ф. Андрусенко – М. : КноРус. – 2021. – 242 с.
2. Нельсон, Д. Основы биохимии Ленинджера : в 3 т. / Д. Нельсон, М. Кокс; пер. с англ. – М. : Лаборатория занятий, 2020. – Т.1. Основы биохимии. Строение и катализ. – 749 с.
3. Шлейкин, А. Г. Прикладная энзимология / А. Г. Шлейкин, Н. Н. Скворцова, Н. Н. Бландов – СПб : Университет ИТМО, 2019. – 160 с.

#### Дополнительная литература

4. Безбородов, А. М. Ферментативные процессы в биотехнологии / А. М. Безбородов, Н. А. Загустина., В.О. Попов. - М.: Наука, 2008.
5. Биссвангер, Х. Практическая энзимология / Х. Биссвангер ; пер. с англ. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015,— 328 с
6. Варфоломеев, С. Д. Химическая энзимология / С .Д. Варфоломеев. – М. : Академия/Academia, 2005.
7. Галимова, М. Х. Ферментативная кинетика: справочник по механизмам реакций / М. Х. Галимова. - М.: КомКнига, 2007.
8. Комов, В. П. Биохимия: учебник для академического бакалавриата / В. П. Комов, В. Н. Шведова. - 4-е изд. - М.: Издательство Юрайт, 2014.
9. Нельсон, Д. Основы биохимии Ленинджера (в 3-х томах) / Д. Нельсон, М.Кокс. / Пер. с англ. О. В. Ефременковой. - М.: Лаборатория знаний, 2017.
10. Плакунов, В. Н. Основы энзимологии / В. Н. Плакунов. - М.: Логос, 2001.
11. Польшанина, Г. В. Определение активности ферментов / Г. В. Польшанина, В. С. Чередниченко, Л. В. Римарева. - М.: ДеЛи принт, 2003.
12. Ферш, Э. Структура и механизм действия ферментов / Э. Ферш. -М.: Мир, 1980.
13. Энзимология [Электронный ресурс] : пособие / сост.: О. И. Губич, Т. А. Кукулянская. - Минск : БГУ, 2013. – Режим доступа <http://elib.bsu.by/handle/123456789/105350>. – Дата доступа 12.03.2022.
14. Palmer, Tr. Enzymes: Biochemistry, Biotechnology, Clinical Chemistry / Tr. Palmer, Ph. L. Bonner – Woodhead Publishing, 2007. – 432 p.

15. Yon-Kahn, J. *Molecular and Cellular Enzymology* / J. Yon-Kahn, G. Hervé. – Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010. – 822 p.

### **4.3. Электронные ресурсы**

1. Биохимическая классификация и номенклатура ферментов [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/>. – Дата доступа: 12.03.2022.

2. Международная база данных по первичным и 3D структурам ферментов [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [www.swissprot.com](http://www.swissprot.com). – Дата доступа: 12.03.2022.

3. Сайт Международного союза биохимии и молекулярной биологии молекулярной биологии [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/>. – Дата доступа: 12.03.2022.

4. Образовательный портал PDB 101. Молекулярные исследования через биологию и медицину [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://pdb101.rcsb.org/browse/enzymes>. – Дата доступа: 12.03.2022.