

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ
УЗБЕКИСТАН
САМАРКАНДСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИНСТИТУТ**

РЕФЕРАТ

ТЕМА: Ферменты

Выполнила: Шайзакова Р.

САМАРКАНД-2016

Ферменты

Оглавление реферата

1. Общие положения
2. Свойства ферментов
3. Строение ферментов
4. Номенклатура ферментов
5. Классификация ферментов и характеристика некоторых групп
6. Локализация ферментов в клетке
7. Методы выделения и очистки ферментов

Литература

1. Общие положения

Ферменты (от лат. *fermentum* - брожение, закваска), специфические белки, присутствующие во всех живых клетках и играющие роль биологических катализаторов. Через их посредство реализуется генетическая информация и осуществляются все процессы обмена веществ и энергии в живых организмах. Ферменты бывают простыми или сложными белками, в состав которых наряду с белковым компонентом (апоферментом) входит небелковая часть - кофермент. Эффективность действия ферментов определяется значительным снижением энергии активации катализируемой реакции в результате образования промежуточных фермент-субстратных комплексов. Присоединение субстратов происходит в активных центрах, которые обладают сходством только с определенными субстратами, чем достигается высокая специфичность (избирательность) действия ферментов. Одна из особенностей ферментов - способность к направленному и регулируемому действию. За счёт этого контролируется согласованность всех звеньев обмена веществ. Эта способность определяется пространственностью структурной молекулы ферментов. Она реализуется через изменение скорости действия ферментов и зависит от концентрации соответствующих субстратов и кофакторов, pH среды, температуры, а также от присутствия специфических активаторов и ингибиторов (например, адениловых нуклеотидов, карбонильных, сульфгидрильных соединений и др.). Некоторые ферменты помимо активных центров имеют дополнительные, т.н. аллостерические регуляторные центры. Биосинтез ферментов находится под контролем генов. Различают **конститутивные ферменты**, постоянно присутствующие в клетках, и **индуцируемые ферменты**, биосинтез которых активируется под влиянием соответствующих субстратов. Некоторые функционально взаимосвязанные ферменты образуют в клетке структурно организованные полиферментные комплексы. Многие ферменты и ферментные комплексы прочно связаны с мембранами клетки или её органоидов (митохондрий, лизосом, микросом и т.д.) и участвуют в активном транспорте веществ через мембраны.

Известно более 20000 различных ферментов, из которых многие выделены из живых клеток и получены в индивидуальном состоянии. Первый кристаллический фермент (уреаза) выделен американским биохимиком Д.Самнером в 1926 г. Для ряда ферментов изучена

последовательность аминокислот и выяснено расположение полипептидных цепей в трёхмерном пространстве. В лабораторных условиях осуществлен искусственный химический синтез фермента рибонуклеазы. Ферменты используют для количественного определения и получения различных веществ, для модификации молекул нуклеиновых кислот методами генной инженерии, диагностики и лечения ряда заболеваний, а также в ряде технологических процессов, применяемых в лёгкой, пищевой и фармацевтической промышленности.

2. Свойства ферментов

Будучи белками, ферменты обладают всеми их свойствами. Вместе с тем биокатализаторы характеризуются рядом специфических качеств, тоже вытекающих из их белковой природы. Эти качества отличают ферменты от катализаторов обычного типа. Сюда относятся термолабильность ферментов, зависимость их действия от значения pH среды, специфичность и, наконец, подверженность влиянию активаторов и ингибиторов.

Термолабильность ферментов объясняется тем, что температура, с одной стороны, воздействует на белковую часть фермента, приводя при слишком высоких значениях к денатурации белка и снижению каталитической функции, а с другой стороны, оказывает влияние на скорость реакции образования фермент-субстратного комплекса и на все последующие этапы преобразования субстрата, что ведет к усилению катализа.

Зависимость каталитической активности фермента от температуры выражается типичной кривой. До некоторого значения температуры (в среднем до 50°C) каталитическая активность растёт, 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. При температуре выше 50°C денатурация ферментного белка резко усиливается и, хотя скорость реакций преобразования субстрата продолжает расти, активность фермента, выражающаяся количеством превращенного субстрата, падает.

Детальные исследования роста активности ферментов с повышением температуры, проведенные в последнее время, показали более сложный характер этой зависимости, чем указано выше: во многих случаях она не отвечает правилу удвоения активности на каждые 10°C в основном из-за постепенно нарастающих конформационных изменений в молекуле фермента.

Температура, при которой каталитическая активность фермента максимальна, называется его температурным оптимумом.

Температурный оптимум для различных ферментов неодинаков. В общем для ферментов животного происхождения он лежит между 40 и 50°C, а растительного - между 50 и 60°C. Однако есть ферменты с более высоким температурным оптимумом, например, у папаина (фермент растительного происхождения, ускоряющий гидролиз белка) оптимум находится при 80°C. В то же время у каталазы (фермент, ускоряющий распад H_2O_2 до H_2O и O_2) оптимальная температура действия находится между 0 и -10°C, а при более высоких температурах происходит энергичное окисление фермента и его инактивация.

Зависимость активности фермента от значения pH среды была установлена свыше 50 лет назад. Для каждого фермента существует оптимальное значение pH среды, при котором он проявляет максимальную активность. Большинство ферментов имеет максимальную

активность в зоне рН поблизости от нейтральной точки. В резко кислой или резко щелочной среде хорошо работают лишь некоторые ферменты.

Переход к большей или меньшей (по сравнению с оптимальной) концентрации водородных ионов сопровождается более или менее равномерным падением активности фермента.

Влияние концентрации водородных ионов на каталитическую активность ферментов состоит в воздействии ее на активный центр. При разных значениях рН в реакционной среде активный центр может быть слабее или сильнее ионизирован, больше или меньше экранирован соседними с ним фрагментами полипептидной цепи белковой части фермента и т.п. Кроме того, рН среды влияет на степень ионизации субстрата, фермент-субстратного комплекса и продуктов реакции, оказывает большое влияние на состояние фермента, определяя соотношение в нем катионных и анионных центров, что сказывается на третичной структуре белковой молекулы. Последнее обстоятельство заслуживает особого внимания, так как определенная третичная структура белка-фермента необходима для образования фермент-субстратного комплекса.

Специфичность - одно из наиболее выдающихся качеств ферментов. Это свойство их было открыто еще в прошлом столетии, когда было сделано наблюдение, что очень близкие по структуре вещества - пространственные изомеры (α - и β -метилглюкозиды) расщепляются по эфирной связи двумя совершенно разными ферментами.

Таким образом, ферменты могут различать химические соединения, отличающиеся друг от друга очень незначительными деталями строения, такими, например, как пространственное расположение метоксильного радикала и атома водорода при 1-м углеродном атоме молекулы метилглюкозида.

По образному выражению, нередко употребляемому в биохимической литературе, **фермент подходит к субстрату, как ключ к замку** . Это знаменитое правило было сформулировано Э. Фишером в 1894 г . исходя из того, что специфичность действия фермента предопределяется строгим соответствием геометрической структуры субстрата и активного центра фермента.

В 50-е годы нашего столетия это статическое представление было заменено гипотезой Д. Кошланда об **индуцированном соответствии субстрата и фермента** . Сущность ее сводится к тому, что пространственное соответствие структуры субстрата и активного центра фермента создается в момент их взаимодействия друг с другом, что может быть выражено формулой *«перчатка - рука»* . При этом в субстрате уже деформируются некоторые валентные связи и он, таким образом, подготавливается к дальнейшему каталитическому видоизменению, а в молекуле фермента происходят конформационные перестройки. Гипотеза Кошланда, основанная на допущении гибкости активного центра фермента, удовлетворительно объясняла активирование и ингибирование действия ферментов и регуляцию их активности при воздействии различных факторов. В частности, конформационные перестройки в ферменте в процессе изменения его активности Кошланд сравнивал с колебаниями паутины, когда в нее попала добыча (субстрат), подчеркивая этим крайнюю лабильность структуры фермента в процессе каталитического акта.

В настоящее время гипотеза Кошланда постепенно вытесняется гипотезой **топохимического соответствия** . Сохраняя основные положения гипотезы взаимоиндуцированной настройки субстрата и фермента, она фиксирует внимание на том, что специфичность действия

ферментов объясняется в первую очередь узнаванием той части субстрата, которая не изменяется при катализе. Между этой частью субстрата и субстратным центром фермента возникают многочисленные точечные гидрофобные взаимодействия и водородные связи.

3. Строение ферментов

По строению ферменты могут быть однокомпонентными, простыми белками, и двухкомпонентными, сложными белками. Во втором случае в составе фермента обнаруживается добавочная группа небелковой природы.

В разное время возникли различные наименования белковой части и добавочной группы в двухкомпонентных ферментах. Все они до сих пор употребляются в литературе, например:

Фермент в целом Белковая часть Добавочная группа

Симплекс Ферон (носитель) Агон (активная группа)

Холофермент Апофермент Кофермент

Добавочную группу, прочно связанную, не отделяемую от белковой части, называют **протетической группой**; в отличие от этого добавочную группу, легко отделяющуюся от апофермента и способную к самостоятельному существованию, обычно именуют **коферментом**.

Химическая природа важнейших коферментов была выяснена в 30-е годы нашего столетия благодаря трудам О. Варбурга, Р. Куна, П. Каррера и др. Оказалось, что роль коферментов в двухкомпонентных ферментах играют большинство витаминов (Е, К, Q, В₁, В₂, В₆, В₁₂, С, Н и др.) или соединений, построенных с участием витаминов (коэнзим А, НАД + и т. п.). Кроме того, функцию коферментов выполняют такие соединения, как HS-глутатион, многочисленная группа нуклеотидов и их производных, фосфорные эфиры некоторых моносахаридов и ряд других веществ.

Характерной особенностью двухкомпонентных ферментов является то, что ни белковая часть, ни добавочная группа в отдельности не обладают заметной каталитической активностью. Только их комплекс проявляет ферментативные свойства. При этом белок резко повышает каталитическую активность добавочной группы, присущую ей в свободном состоянии в очень малой степени; добавочная же группа стабилизирует белковую часть и делает ее менее уязвимой к денатурирующим агентам. Таким образом, хотя непосредственным исполнителем каталитической функции является протетическая группа, образующая каталитический центр, ее действие немислимо без участия полипептидных фрагментов белковой части фермента. Более того, в апоферменте есть участок, характеризующийся специфической структурой, избирательно связывающий кофермент. Это так называемый **кофермент связывающий домен**; его структура у различных апоферментов, соединяющихся с одним и тем же коферментом, очень сходна. Таковы, например, пространственные структуры нуклеотидсвязывающих доменов ряда дегидрогеназ.

Иначе обстоит дело у однокомпонентных ферментов, не имеющих добавочной группы, которая могла бы входить в непосредственный контакт с преобразуемым соединением. Эту функцию выполняет часть белковой молекулы, называемая **каталитическим центром**. Предполагают, что каталитический центр однокомпонентного фермента представляет собой уникальное сочетание нескольких аминокислотных остатков, располагающихся в

определенной части белковой молекулы.

Чаще всего в каталитических центрах однокомпонентных ферментов встречаются остатки *сер, гис, три, арг, цис, асп, глу* и *тир*. Радикалы перечисленных аминокислот выполняют здесь ту же функцию, что и кофермент в составе двухкомпонентного фермента.

Аминокислотные остатки, образующие каталитический центр однокомпонентного фермента, расположены в различных точках единой полипептидной цепи. Поэтому каталитический центр возникает в тот момент, когда белковая молекула приобретает присущую ей третичную структуру. Следовательно, изменение третичной структуры фермента под влиянием тех или иных факторов может привести к деформации каталитического центра и изменению ферментативной активности.

Кроме каталитического центра, образованного сочетанием аминокислотных радикалов или присоединением кофермента, у ферментов различают еще два центра: субстратный и аллостерический.

Под субстратным центром понимают участок молекулы фермента, ответственный за присоединение вещества (субстрата), подвергающегося ферментативному превращению. Часто этот участок называют «якорной площадкой» фермента, где, как судно на якорь, становится субстрат. Во многих случаях прикрепление субстрата к ферменту идет за счет взаимодействия с ϵ -аминогруппой радикала *лиз*, расположенного в субстратном центре. Эту же роль может выполнять COOH-группа *глу*, а также HS-группа *цис*. Однако работы последних лет показали, что гораздо большее значение здесь имеют силы гидрофобных взаимодействий и водородные связи, возникающие между радикалами аминокислотных остатков субстратного центра фермента и соответствующими группировками в молекуле субстрата.

Понятие о каталитическом и субстратном центре не следует абсолютизировать. В реальных ферментах субстратный центр может совпадать (или перекрываться) с каталитическим центром. Более того, каталитический центр может окончательно формироваться в момент присоединения субстрата. Поэтому часто говорят об **активном центре** фермента, представляющем сочетание первого и второго. Активный центр у ферментов располагается на две щели при двухъядерной структуре, например у лизоцима и рибонуклеазы, или на дне глубокой впадины, как у химотрипсина.

Аллостерический центр представляет собой участок молекулы фермента, в результате присоединения к которому определенного низкомолекулярного (а иногда - и высокомолекулярного) вещества изменяется третичная структура белковой молекулы. Вследствие этого изменяется конфигурация активного центра, сопровождающаяся либо увеличением, либо снижением каталитической активности фермента. Это явление лежит в основе так называемой **аллостерической регуляции** каталитической активности ферментов.

Значения молекулярных масс ферментов колеблются в широких пределах: от нескольких тысяч до нескольких миллионов. В природе насчитывается несколько десятков ферментов, обладающих сравнительно небольшими молекулами (до 50 тыс.). Однако большинство ферментов представлено белками более высокой молекулярной массы, построенными из субъединиц. Так, каталаза ($M=25200$) содержит в молекуле шесть протомеров с $M=42000$ каждый. Молекула фермента, ускоряющего реакцию синтеза рибонуклеиновых кислот (РНК-

полимераза, $M = 400000$), состоит из 6 неравных субъединиц. Полная молекула глутаматдегидрогеназы, ускоряющей процесс окисления глутаминовой кислоты ($M=336000$), построена из 6 субъединиц с $M=56000$.

Способы компоновки протомеров в мультимеры разнообразны. Крайне важно, что достроенный из субъединиц фермент проявляет максимальную каталитическую активность именно в виде мультимера: диссоциация на протомеры резко снижает активность фермента. Не все ферменты-мультимеры построены исключительно из каталитически активных протомеров. Наряду с каталитическими в их составе отмечены регуляторные субъединицы, как, например, у аспартат-карбамилтрансферазы.

Среди ферментов-мультимеров безусловно преобладают димеры и тетрамеры (их несколько сотен), в меньшей мере распространены гексамеры и октамеры (несколько десятков) и необыкновенно редко встречаются тримеры и пентамеры.

Молекулы ферментов-мультимеров в ряде случаев составлены из субъединиц двух типов, обозначаемых условно как субъединицы типа *A* и *B*. Они сходны друг с другом, но отличаются по некоторым деталям первичной и третичной структур. В зависимости от соотношения протомеров типа *A* и *B* в мультимере последний может существовать в виде нескольких изомеров, которые называют изозимами. Так, при четырех субъединицах возможны 5 изозимов:

I II III IV V

AAAA AAAB AABV ABVV BBBB

В настоящее время интерес к изозимам резко повысился. Оказалось, что кроме генетически детерминированных изозимов существует большая группа ферментов, обладающая множественными формами, возникающими в результате их посттрансляционной модификации. Множественные формы ферментов и изозимы в частности используются сейчас для диагностики болезней в медицине, прогнозирования продуктивности животных подбора родительских пар при скрещивании для обеспечения максимального гетерозиса в потомстве и т. п.

Значение пространственной организации ферментов особенно ярко выявляется при изучении строения так называемых **мультиэнзимов**, т.е. ферментов, обладающих способностью ускорять одновременно несколько химических реакций и осуществлять сложные превращения субстрата. Примером может служить мультиэнзим, ускоряющий реакцию окислительного декарбоксилирования пировиноградной кислоты. Этот многоферментный комплекс с $M=450000$ состоит из трех видов ферментов. Первый из них (*E 1*) ускоряет реакцию декарбоксилирования пировиноградной кислоты. В состав комплекса входит 12 димерных молекул этого фермента ($K=19200$). Вторым и третьим ферментами, катализирующие окислительно-восстановительные процессы при окислении пировиноградной кислоты, сосредоточены внутри мультиэнзимного комплекса. Один из них (*E 3*) представлен шестью димерными молекулами ($M=112\ 000$), другой (*E 2*) - 24 протомерами ($M=70000$).

В тех случаях, когда мультиэнзимный комплекс обслуживает единый, многоступенчатый процесс биохимических превращений, его называют **метабоном** (от слова метаболизм - обмен веществ). Таковы метаболон гликолиза, биосинтеза ряда аминокислот, цикла дикарбоновых и трикарбоновых кислот и др.

В результате слаженного во времени и пространстве действия всех трех видов входящих в его состав ферментов мультиэнзим с огромной скоростью осуществляет превращение пировиноградной кислоты. Именно в кооперативном характере каталитического процесса и кроется главное отличие биокатализаторов от катализаторов неорганической природы, именно поэтому интенсивность биокатализа в десятки, сотни и тысячи раз превосходит мощность действия неорганических катализаторов.

Сравнительно недавно выявлена еще одна своеобразная черта в строении ферментов: некоторые из них являются **полифункциональными**, т.е. обладают несколькими энзиматическими активностями, но всего лишь одной полипептидной цепью. Дело в том, что эта единая цепь при формировании третичной структуры образует несколько функционально и стерически обособленных глобулярных участков - **доменов**, каждый из которых характеризуется своей каталитической активностью.

При изучении мультиэнзимных комплексов и полифункциональных ферментов удалось понять наиболее важную особенность ферментативного катализа, а именно - эстафетную передачу промежуточных продуктов реакции от одного компонента каталитической системы к другому без их высвобождения.

4. Номенклатура ферментов

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

Примерами **тривиальной номенклатуры** могут служить названия таких ферментов, как пепсин (от греч. *пелсис* - пищеварение), трипсин (от греч. *трипсис* - разжижаю) и папаин (от названия дынного дерева *Carica papaya*, из сока которого он выделен). По действию все эти ферменты являются протеолитическими, т. е. ускоряют гидролиз протеинов (белков). Характерное название была дано группе окрашенных внутриклеточных ферментов, ускоряющих окислительно-восстановительные реакции в клетке, - цитохромы (от лат. *цитос* - клетка и *хрома* - цвет).

Наибольшее распространение получила **рациональная номенклатура**, согласно которой название фермента составляется из названия субстрата характерного окончания *-аза*. Она была предложена более столетия тому назад, в 1883 г. Э. Дюкло - учеником Л. Пастера. Так, фермент, ускоряющий реакцию гидролиза крахмала, получил название амилаза (от греч. *амилон* - крахмал), гидролиза жиров - липаза (от греч. *липос* - жир), белков (протеинов) - протеаза, мочевины - уреаза (от греч. *уреа* - мочевина) и т. п.

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 (простетическая группа - гем), пиридоксаль-фермент (простетическая группа - пиридоксаль) и т.п.

Затем в названии фермента стали указывать как на **характер субстрата**, так и на **тип катализируемой реакции**. К примеру, фермент, отнимающий водород от молекулы янтарной кислоты, называют сукцинатдегидрогеназой, подчеркивая этим одновременно и

химическую природу субстрата, и отнятие атомов водорода в процессе ферментативного действия:

- 2H

$\text{HOOC} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COOH} \text{ ?????} \text{ @ } \text{HOOC} \cdot \text{CH} = \text{CH} \cdot \text{COOH}$

Янтарная кислота Дегидрирование

В 1961 г. Международная комиссия по номенклатуре ферментов представила V Международному биологическому конгрессу проект номенклатуры, построенный на строго научных принципах. Проект был утвержден конгрессом, и новая номенклатура прочно вошла в ферментологию. Согласно этой (Московской) номенклатуре название ферментов составляют **из химического названия субстрата и названия той реакции, которая осуществляется ферментом**. Если химическая реакция, ускоряемая ферментом, сопровождается переносом группировки атомов от субстрата к акцептору, название фермента включает также **химическое наименование акцептора**.

Например, пиридоксальфермент, катализирующий реакцию переаминирования между L-аланином и α -кетоглутаровой кислотой, называется L-аланин: 2-оксоглутарат аминотрансфераза. В этом названии отмечены сразу три особенности: 1) субстратом является L-аланин; 2) акцептором служит 2-оксоглутаровая кислота; 3) от субстрата к акцептору передается аминогруппа.

Названия ферментов по научной номенклатуре неизмеримо выигрывают в точности, но становятся в ряде случаев гораздо сложнее старых, тривиальных. Так, уреазы (тривиальное название), ускоряющая реакцию гидролиза - мочевины на оксид углерода (IV) и аммиак, по научной номенклатуре именуется карбамид - амидогидролазой:

$\text{H}_2\text{N} \cdot \text{CO} \cdot \text{NH}_2 + \text{H}_2\text{O} \text{ ?????} \text{ @ } 2\text{NH}_3 + \text{CO}_2$

В этом названии дано точное химическое наименование субстрата и указано, что фермент катализирует реакцию гидролиза амидогруппы. Трегалаза, ускоряющая реакцию гидролиза трегалозы, называется трегалоза-1-глюко-гидролазой.

В связи со значительным усложнением научных названий в новой номенклатуре допускается сохранение наряду с новыми старых тривиальных, рабочих названий ферментов. Международной комиссией был составлен детальный список всех известных в то время ферментов, существенно дополненный в 1972 г. при пересмотре как классификации, так и номенклатуры некоторых ферментов, где рядом с новым научным названием каждого фермента приведено старое, а также указан химизм катализируемой ферментом реакции и в некоторых случаях природа фермента. Таким образом, исключается возможность путаницы в наименовании ферментов. В 1964 г. список включал 874 фермента; в последующее время он был существенно дополнен и возрос до 1770 ферментов в 1972 г. и до 2003 ферментов в 1979 г.

Каждому ферменту в указанном списке присвоен **индивидуальный номер (шифр)**. Например, шифр уреазы выражается цифрами 3.5.1.5. Это означает, что уреазы относятся к 3-му классу (первая цифра) ферментов, все представители которого катализируют реакции гидролиза. Вторая цифра (5) говорит о том, что уреазы принадлежат к 5-му подклассу этого

класса, куда зачислены все ферменты, ускоряющие гидролиз С - N-связей, не являющихся пептидными. Третья цифра шифра (1) указывает на принадлежность уреазы к подподклассу 5-го подкласса, члены которого ускоряют гидролиз линейных амидов, а последняя цифра (5) - порядковый номер уреазы в этом подподклассе.

Упомянутая ранее лактатдегидрогеназа имеет шифр 1.1.1.27, т. е. относится к 1-му классу ферментов (оксидоредуктазы), к 1-му подклассу (оксидоредуктазы, действующие на СН - ОН-группировки в качестве доноров атомов водорода), к 1-му подподклассу (акцептором атомов водорода служит никотинамидадениндинуклеотид) и занимает 27-е место в перечне ферментов упомянутого подподкласса. Таким образом, шифр абсолютно точно указывает место фермента в общем списке. В настоящее время принято в научных публикациях при первом упоминании фермента указывать в скобках его шифр.

5. Классификация ферментов и характеристика некоторых групп

По первой в истории изучения ферментов классификации их делили на две группы: **гидролазы**, ускоряющие гидролитические реакции, и **есмолазы**, ускоряющие реакции негидролитического распада. Затем была сделана попытка разбить ферменты на классы по числу субстратов, участвующих в реакции. В соответствии с этим ферменты классифицировали на три группы.

1. Катализирующие превращения двух субстратов одновременно в обоих направлениях: $A+B \rightarrow C+D$.
2. Ускоряющие превращения двух субстратов в прямой реакции и одного в обратной: $A+B \rightarrow C$.
3. Обеспечивающие каталитическое видоизменение одного субстрата как в прямой, так и в обратной реакции: $A \rightarrow B$.

Одновременно развивалось направление, где в основу классификации ферментов был положен тип реакции, подвергающейся каталитическому воздействию. Наряду с ферментами, ускоряющими реакции гидролиза (гидролазы), были изучены ферменты, участвующие в реакциях переноса атомов и атомных групп (феразы), в изомеризации (изомеразы), расщеплении (лиазы), различных синтезах (синтетазы) и т. д. Это направление в классификации ферментов оказалось наиболее плодотворным, так как объединяло ферменты в группы не по надуманным, формальным признакам, а по типу важнейших биохимических процессов, лежащих в основе жизнедеятельности любого организма. По этому принципу все ферменты делят на 6 классов.

1. **Оксидоредуктазы** - ускоряют реакции окисления - восстановления.
2. **Трансферазы** - ускоряют реакции переноса функциональных групп и молекулярных остатков.
3. **Гидролазы** - ускоряют реакции гидролитического распада.
4. **Лиазы** - ускоряют негидролитическое отщепление от субстратов определенных групп атомов с образованием двойной связи (или присоединяют группы атомов по двойной связи).
5. **Изомеразы** - ускоряют пространственные или структурные перестройки в пределах одной

молекулы.

6. Лигазы - ускоряют реакции синтеза, сопряженные с распадом богатых энергией связей. Эти классы и положены в основу новой научной классификации ферментов.

К классу оксидоредуктаз относят ферменты, катализирующие реакции окисления - восстановления. Окисление протекает как процесс отнятия атомов H (электронов) от субстрата, а восстановление - как присоединение атомов H (электронов) к акцептору.

В класс трансфераз входят ферменты, ускоряющие реакции переноса функциональных групп и молекулярных остатков от одного соединения к другому. Это один из наиболее обширных классов: он насчитывает около 500 индивидуальных ферментов. В зависимости от характера переносимых группировок различают фосфотрансферазы, аминотрансферазы, гликозилтрансферазы, ацилтрансферазы, трансферазы, переносящие одноуглеродные остатки (метилтрансферазы, формилтрансферазы), и др. Например, амидазы ускоряют гидролиз амидов кислот. Из них важную роль в биохимических процессах в организме играют уреаза, аспарагиназа и глутаминаза.

Уреаза была одним из первых белков-ферментов, полученным в кристаллическом состоянии. Это однокомпонентный фермент ($M=480000$), молекула его глобулярна и состоит из 8 равных субъединиц. Уреаза ускоряет гидролиз мочевины до NH_3 и CO_2 .

Характерные черты действия ферментов класса лигаз (синтетаз) выявлены совсем недавно в связи со значительными успехами в изучении механизма синтеза жиров, белков и углеводов: Оказалось, что старые представления об образовании этих соединений, согласно которым они возникают при обращении реакций гидролиза, не соответствуют действительности. Пути их синтеза принципиально иные.

Главная их особенность - сопряженность синтеза с распадом веществ, способных поставлять энергию для осуществления биосинтетического процесса. Одним из таких природных соединений является АТФ. При отрыве от ее молекулы в присутствии лигаз одного или двух концевых остатков фосфорной кислоты выделяется большое количество энергии, используемой для активирования реагирующих веществ. Лигазы же каталитически ускоряют синтез органических соединений из активированных за счет распада АТФ исходных продуктов. Таким образом, к лигазам относятся ферменты, катализирующие соединение друг с другом двух молекул, сопряженное с гидролизом пиррофосфатной связи в молекуле АТФ или иного нуклеозидтрифосфата.

Механизм действия лигаз изучен еще недостаточно, но, несомненно, он весьма сложен. В ряде случаев доказано, что одно из участвующих в основной реакции веществ сначала дает промежуточное соединение с фрагментом распадающейся молекулы АТФ, а вслед за этим указанный промежуточный продукт взаимодействует со вторым партнером основной химической реакции с образованием конечного продукта.

6. Локализация ферментов в клетке

Одним из принципиальных отличий ферментов от катализаторов небиологического происхождения является **кооперативный характер их действия**. На уровне одиночной молекулы фермента кооперативный принцип реализуется в тонком взаимодействии субстратного, активного и аллостерического центров. Однако гораздо большее значение имеет кооперативное осуществление реакций на уровне ансамблей ферментов. Именно

благодаря наличию систем ферментов - в виде **мультиэнзимных комплексов** или еще более сложных образований - **метаболонов**, обеспечивающих каталитические превращения всех участников единого метаболического цикла - в клетках с большой скоростью осуществляются многостадийные процессы как распада, так и синтеза органических молекул. Ферментативный катализ в многостадийных реакциях идет без выделения промежуточных продуктов: только возникнув, они тут же подвергаются дальнейшим преобразованиям.

Это возможно лишь потому, что в клеточном содержимом ферменты распределены не хаотически, а строго упорядоченно. С современной точки зрения клетка представляется высокоорганизованной системой, в отдельных частях которой осуществляются строго определенные биохимические процессы. В соответствии с приуроченностью их к определенным субклеточным частицам или отсекам (компартаментам) клетки в них локализованы те или иные индивидуальные ферменты, мультиэнзимные комплексы, полифункциональные ферменты или сложнейшие метаболоны.

Разнообразные гидролазы и лиазы сосредоточены преимущественно в лизосомах. Внутри этих сравнительно небольших (несколько нанометров в диаметре) пузырьков, ограниченных мембраной от гиалоплазмы клетки, протекают процессы деструкции различных органических соединений до тех простейших структурных единиц, из которых они построены. Сложные ансамбли окислительно-восстановительных ферментов, такие, например, как цитохромная система, находятся в митохондриях. В этих же субклеточных частицах локализован набор ферментов цикла дикарбоновых и трикарбоновых кислот. Ферменты активирования аминокислот распределены в гиалоплазме, но они же есть и в ядре. В гиалоплазме присутствуют многочисленные метаболоны гликолиза, структурно объединенные с таковыми пентозофосфатного цикла, что обеспечивает взаимопереключение дихотомического и апотомического путей распада углеводов. В то же время ферменты, ускоряющие перенос аминокислотных остатков на растущий конец полипептидной цепи и катализирующие некоторые другие реакции в процессе биосинтеза белка, сосредоточены в рибосомальном аппарате клетки.

Нуклеотидилтрансферазы, ускоряющие реакцию переноса нуклеотидных остатков при новообразовании нуклеиновых кислот, локализованы в основном в ядерном аппарате клетки. Таким образом, системы ферментов, сосредоточенные в тех или иных структурах, участвуют в осуществлении отдельных циклов реакций. Будучи тонко координированы друг с другом, эти отдельные циклы реакций обеспечивают жизнедеятельность клеток, органов, тканей и организма в целом.

7. Методы выделения и очистки ферментов

Долгое время вполне обоснованно считали, что все ферменты - тела белковой природы. Однако в начале 80-х годов была неожиданно открыта способность низкомолекулярных рибонуклеиновых кислот ускорять реакцию превращения предшественников РНК в функционально значимый продукт, т. е. возникло представление о **полирибонуклеотидной природе** некоторых ферментов, названных **рибозимами**.

Хотя уже осуществлен лабораторный синтез ряда ферментов - рибонуклеазы, лизоцима, ферредоксина и цитохрома с, трудно ожидать, что синтетическое получение ферментов получит широкое распространение в ближайшие десятилетия ввиду его сложности и дороговизны, поэтому единственный реальный в настоящее время способ получения ферментов - это выделение их из биологических объектов.

Выделяют ферменты так же, как и другие белки, хотя есть приемы, применяемые преимущественно для ферментов. Из них можно **отметить экстракцию глицерином**, в котором сохраняются нативные свойства ферментов, а также **метод ацетоновых порошков**, состоящий в осаждении и быстром обезвоживании при температуре не выше -10°C тканей или вытяжек из них, содержащих ферменты. К их числу относится также получение ферментов путем **адсорбции с последующей элюцией** (снятием) с **адсорбента**. Этот метод был введен в химию ферментов А. Я. Данилевским и дал мощный толчок развитию ферментологии. Сейчас адсорбционный метод выделения и очистки ферментов разработан детально. Наряду с ним широко применяют метод *ионообменной хроматографии*, метод *молекулярных сит*, *электрофорез* и особенно *изоэлектрофокусирование*. Одна из модификаций адсорбционного метода - *аффинная хроматография*, где адсорбентом служит вещество, с которым фермент взаимодействует избирательно. В результате лишь один этот фермент задерживается на колонке, а все сопутствующие ему выходят с током проявителя. Изменяя характер проявителя, исследуемый фермент элюирует с колонки. Этим методом достигают очистки фермента в несколько тысяч раз, применяя всего лишь одноэтажную (аффинная сорбция - элюция) схему выделения.

Для успешного выделения ферментов из клеточного содержимого необходимо очень тонкое измельчение исходного материала, вплоть до разрушения субклеточных структур: лизосом, митохондрий, ядер и др., которые несут в своем составе многие индивидуальные ферменты. Особое внимание при выделении ферментов уделяют проведению всех операций в условиях, исключающих денатурацию белка, так как она всегда связана с потерей ферментативной активности. Этому способствует проведение операций в присутствии защитных добавок, в частности HS-содержащих соединений (цистеина, глутатиона, меркаптоэтанола, цистеамина, дитиотреитола и др.):

HS ? CH₂ ? CH₂ ? NH HS ? CH₂ ? CH(OH) ? CH(OH) ? CH₂ ? SH

Цистеамин Дитиотреитол

Очень важно поддерживать на всех этапах выделения ферментов низкую температуру, так как некоторые из них даже при -80°C теряют активность.

Для оценки гомогенности ферментного препарата прибегают к обычным методам белковой химии. Переломным моментом в усовершенствовании методов получения высокоочищенных, гомогенных препаратов ферментов было открытие способности их кристаллизоваться, осуществленное впервые в 1906 г. А. Д. Розенфельдом (им была получена в виде кристаллов оксидаза из корней редьки) и приобретшее с 1926 г. широкую известность после работы Д. Самнера по получению кристаллической уреазы из бобов канавалии. Нередко о степени чистоты ферментного препарата судят по его биологической активности; если активность при дальнейшей очистке не возрастает, препарат можно считать гомогенным. Из 2003 включенных в список ферментов более 1500 выделено и в той или иной мере очищено, третья часть их закристаллизована, у нескольких сотен выяснена первичная, а у нескольких десятков - третичная структура.

Литература

1. Власова З.А. Биология. Справочник школьника. М., Всероссийское слово, 1995 г.
2. Хомченко Г.Л. Химия для поступающих в ВУЗы. Учебное пособие. М., Высшая школа, 1993 г.

3. Биологический энциклопедический словарь. Под ред. Гилярова М.С. М., Советская энциклопедия, 1987 г .