

Документ подписан простой электронной подписью

Информация о владельце:

ФИО: Локтионова Оксана Геннадьевна

Должность: проректор по учебной работе

Дата подписания: 14.09.2022 16:32:35

Уникальный программный ключ:

0b817ca911e6668abb13a5d426d39e5f1c11eabbf73e943df4a4851fda56d088

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Юго-Западный государственный университет»
(ЮЗГУ)

Кафедра фундаментальной химии и химической технологии



ФЕРМЕНТЫ

Методические указания к практическим занятиям и самостоятельной работы по курсу «Биоорганическая химия» для студентов направления подготовки 04.04.01 «Химия» и специальности 04.05.01 «Фундаментальная и прикладная химия»

Курск 2016

УДК621.383: 681.7.013.6: 681.586.5

Составитель Л.М.Миронович

Рецензент:

Доктор химических наук, профессор *А.М.Иванов*

Ферменты: методические указания к практическим занятиям и самостоятельной работе по курсу «Биоорганическая химия» для студентов направления подготовки 04.04.01 Химия и специальности 04.05.01 Фундаментальная и прикладная химия /Юго-Зап. гос. ун-т; сост.: Л.М.Миронович. Курск, 2016, 18 с: ил. 2. Библиогр.: 1 с.

Методические указания предназначены для углубленного изучения биологически важной темы по курсу «Биоорганическая химия» и научно-исследовательской работы (НИРС) для студентов очной формы обучения, а также для преподавателей, научных сотрудников, аспирантов и инженеров кафедры фундаментальной химии и химической технологии.

Методические указания соответствуют требованиям программы, утвержденной учебно-методическим объединением по курсу химия для студентов специальности 04.04.01 «Химия» и специальности 04.05.01 Фундаментальная и прикладная химия.

Текст печатается в авторской редакции

Подписано в печать
Усл.печ.л. Уч.-изд.л. Тираж ... экз. Заказ. Бесплатно.
Юго-Западный государственный университет.
305040, г. Курск, ул. 50 лет Октября, 94

СОДЕРЖАНИЕ

с

1 Введение	4
2 Краткие теоретические сведения.	5
3 Примеры ответов на тестовые задания.	10
4 Тестовые вопросы для контроля усвоения материала.	12
5 Ответы на тестовые задания.	18
6 Литература.	18

Вступление

Самостоятельная работа студентов является важной составляющей процесса подготовки специалистов различного профиля на современном этапе, особенно с переходом на бально-рейтинговую систему обучения. Самостоятельная работа позволяет студентам более углубленно изучить отдельные разделы, разобраться в прохождении химических процессов, действия различных факторов на организм человека. При изучении курса «Биоорганическая химия» важным является раздел «Ферменты». Под действием ферментов в организме осуществляется большое многообразие биохимических реакций.

В современном обществе большое значение имеет конструирование лекарственных препаратов, которые зачастую оказывают ингибирующее действие на ферменты. Ингибирование ферментно-катализируемых биохимических реакций приводит к прерыванию некоторых биохимических и физиологических процессов, блокируя при этом образование нежелательных или ключевых метаболитов. Поэтому, углубленное изучение данной темы, позволит студенту-химику правильно ориентироваться в многообразии лекарственных препаратов и процессов, проходящих в организме.

Для самостоятельного изучения темы, студент обязан прослушать лекционный материал. После изучения лекционного материала по теме, студент обязан познакомиться с литературой учебной и научной, которая рекомендована преподавателем. После углубленного изучения материала рекомендуется студентам ответить на вопросы по теме, которые могут быть в тестовой форме или в виде небольших вопросов, отображающих суть вопроса. В данных методических указаниях приведены дополнительные сведения о ферментах, дана их краткая характеристика, что служит дополнением к лекционному материалу. Для закрепления знаний при изучении темы приведены тестовые задания, позволяющие проверить усвоение изложенного материала.

КРАТКИЕ ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СВЕДЕНИЯ

Ферменты – белковые катализаторы биохимических реакций, необходимые для жизнедеятельности организма. Известно около 2400 ферментов, с помощью которых осуществляется до 2000 разнообразных биологических реакций.

Ферменты делят на простые и сложные. *Простые ферменты* имеют только белковую природу. *Сложные ферменты* состоят из белка и кофермента (витамины, нуклеотиды, ионы металлов), связанного с белком ковалентной или нековалентной связями. Кофермент в процессе биохимической реакции изменяется ($\text{НАД}^+ \rightleftharpoons \text{НАД} \cdot \text{H}$, $\text{ФАД} \rightleftharpoons \text{ФАД} \cdot \text{H}_2$).

Биохимические реакции и ферменты классифицируют на 6 классов, каждый из которых разбит на подклассы. Название ферментов складывается из названия субстрата с добавлением типа катализирующей реакции и оканчивается на – *аза*.

- а) *Оксидоредуктазы* катализируют окислительно-восстановительные реакции с участием двух субстратов. Например, окисление молочной кислоты в пировиноградную проходит с участием оксидоредуктазы (НАД^+);
- б) *трансферазы* - ферменты, катализирующие перенос алкильных, ацильных, альдегидных, кетонных групп, а также групп, содержащих серу, фосфор. Так, ацилирование холина протекает с участием трансферазы с получением ацетилхолина;
- в) *гидролазы* – ферменты, катализирующие гидролиз сложноэфирных, эфирных, пептидных, гликозидных связей (гидролиз *in vivo* жиров, белков, углеводов);
- г) *лиазы*, принимают участие в образовании двойных связей и реакций присоединения к ним, а также в биохимических реакциях, в которых происходит отщепление атомов или групп атомов по негидролитическому механизму. Например, превращение глицерин-1-фосфата в гидроксиацетон и глицериновый альдегид;
- д) *изомеразы* – ферменты, катализирующие взаимопревращения оптических, геометрических и конфигурационных изомеров (превращение *транс*-ретиная в *цис*-ретинаяль);
- е) *лигазы* катализируют соединение 2-х молекул, сопряженное с разрывом пирофосфатной связи АТФ или подобного соединения

(глутаминовая кислота с участием НАД⁺ превращается в глутамин).

Специфичность является важной особенностью фермента. *Специфичность* – свойство фермента селективно выбирать из многих субстратов один или несколько близких по химической природе. Если фермент катализирует только один субстрат, одну специфическую реакцию, то говорят об *абсолютной специфичности*. Если фермент действует на ряд близких субстратов, имеющих схожее строение, то говорят об *абсолютной групповой специфичности* (амилаза легко расщепляет крахмал, но не расщепляет сахар). *Относительная групповая специфичность* проявляется в том случае, когда фермент специфичен к типу химической связи и допускает замену субстрата (пепсин, трипсин гидролизуют пептидные связи; эстераза гидролизует сложноэфирные связи в жирах).

Фермент, действующий только на один из пространственных изомеров, обладает *стереохимической специфичностью* (*цис*-, *транс*-изомеры).

Ферменты обладают каталитической активностью в пределах 10-50 °С (рис.1а). С повышением температуры при ферментативных реакциях каталитическая активность фермента увеличивается и достигает максимума при оптимальной температуре (36,6° – нормальное физиологическое состояние человека), а в дальнейшем уменьшается, что обусловлено денатурацией белков. Установлено, что скорость ферментативной реакции намного ниже по сравнению со скоростью денатурации белка, и при $T > 50$ °С они денатурируют необратимо.

Оптимум ферментативной активности в организме человека расположен в пределах (5,0 – 9,0) рН. Некоторые ферменты активны и при других значениях рН. Так, пепсин, гидролизующий пептидные связи в желудке, активен при рН 1,5-2,0, а оргиназа, гидролизующая пептидные связи в двенадцатиперстной кишке, активна при рН 9,5-9,9. Изменение рН среды может приводить к денатурации фермента и изменению величины заряда молекулы фермента, что характеризуется изменением структуры фермента или изменением заряда

функциональных групп, принимающих участие в катализе субстрата (рис.1б).

Ферментативный катализ играет большое значение в жизнедеятельности человека. Ферменты ускоряют биохимические реакции в 10^4 - 10^5 раз, и как уже говорилось, обладают специфичностью к субстрату.

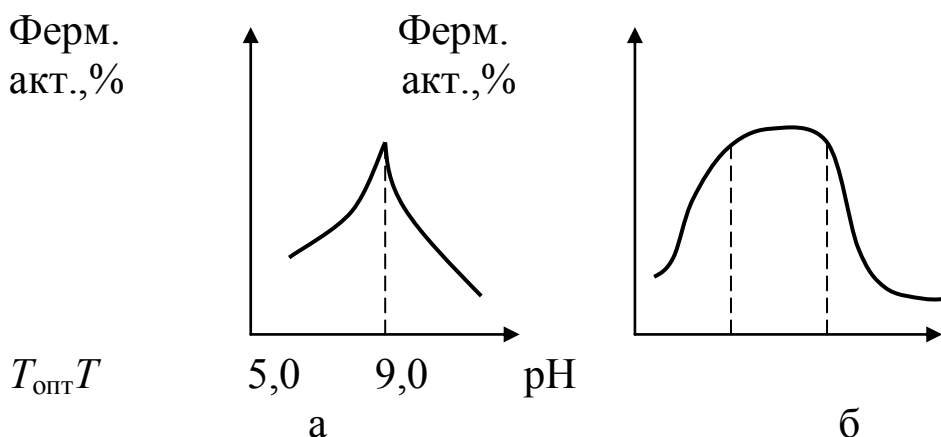


Рисунок 1 – Влияние различных факторов на скорость ферментативной реакции:

а) влияние температуры; б) влияние рН среды

Первая модель каталитической реакции (Фишер, 1890 г.) описала взаимодействие субстрата и фермента по аналогии к системе “ключ – замок”, при этом “замком” является твердая структура активного центра. Каждый фермент в трехмерной структуре имеет пустоты, в которые входит субстрат. Пустоты называют активным центром фермента, при этом в нем размещены боковые цепи аминокислот, проводящие реакции. В сложных белках данную функцию выполняют коферменты. Количество активных центров в ферменте ограничено.

Позднее была предложена модель индуцированного соответствия (Кошланд), в основе которой лежит гибкость активного центра фермента (модель “рука – перчатка”).

Независимо от предложенного механизма в каталитическом действии фермента должно соблюдаться:

– возможность одновременной атаки на молекулу субстрата группировок активного центра;

- образование временных ковалентных связей между субстратом и активным центром фермента с дальнейшим перераспределением электронной плотности;
- соответствие пространственной структуры активного центра фермента структуре субстрата.

Михаэлис и Ментен (1913 г.) представили ферментативную реакцию в виде схемы:

где E_{nz} – фермент; S – субстрат; $[E_{nz} S]$ – ферментно-субстратный комплекс (комплекс Михаэлиса-Ментен);
 \bar{k}_1 , \bar{k}_1 , \bar{k}_2 – константы скоростей прямой и обратной реакций.

Лимитирующей стадией является процесс распада комплекса Михаэлиса-Ментен до продуктов реакции.

Кинетическое уравнение для расчета начальной скорости ферментативной реакции (ω_0) в зависимости от концентрации субстрата ($[S]$ – концентрация субстрата в момент времени; $[S]_0$ – начальная концентрация субстрата) и фермента ($[E_{nz}]_0$ – начальная концентрация фермента):

$$\omega_0 = \frac{k_2[E_{nz}]_0[S]_0}{K_M + [S]}$$

где k_2 – число оборотов фермента, показывающее количество молекул субстрата в продукте при условии, что весь фермент представлен в виде ферментно-субстратного комплекса; K_M – константа Михаэлиса-Ментен.

Установлено, что начальная скорость ферментативной реакции прямо пропорциональна концентрации фермента (рис.2а) описывается зависимостью

$$\omega_0 = k[E_{nz}].$$

Увеличение концентрации субстрата приводит к увеличению скорости ферментативной реакции до того времени

пока не произойдет насыщение активных центров фермента субстратом, и скорость будет максимальной (рис.2б). Концентрация субстрата, при которой скорость ферментативной реакции составляет половину максимальной ($\omega_{\max}/2$) называется *константой Михаэлиса-Ментен*. До точки А рис. 2б скорость ферментативной реакции пропорциональна концентрации субстрата $\omega_0 = k[S]$.

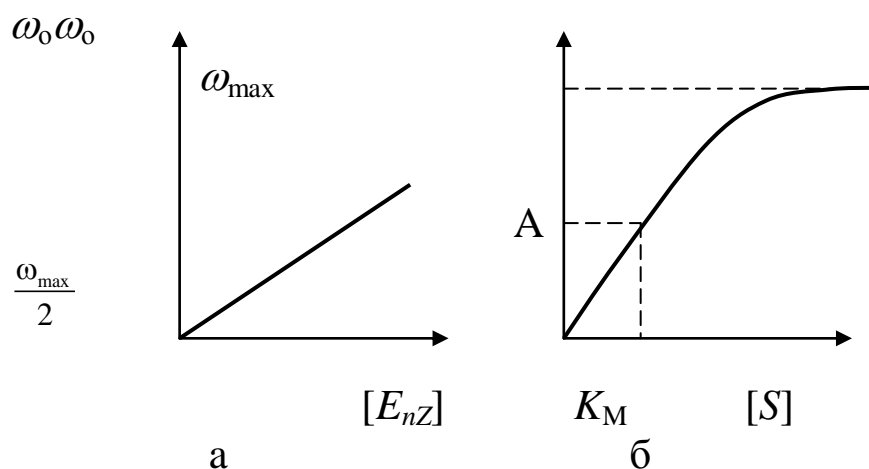


Рисунок 2 – Зависимость начальной скорости реакции от концентрации фермента (а) и субстрата (б)

Активация и ингибирование ферментов. Ферменты могут повышать (понижать) ферментативную активность под действием некоторых веществ.

Активаторы – вещества, увеличивающие ферментативную активность или переводящие ферменты из неактивного состояния в активное. К ним относят ионы металлов (K^+ , Na^+ , Ca^+ , Mg^{+2} и др.); кислота HCl для активации пепсина; органические соединения различного химического строения.

Понижение скорости ферментативной реакции проходит при добавлении *ингибиторов*. Ингибиторы, которые уменьшают активность ферментов, в результате взаимодействия с теми же активными центрами, что и субстрат, называют *конкурентными*. Действие сульфаниламидных препаратов основано на конкурентной реакции $p\text{-H}_2\text{N-C}_6\text{H}_4\text{-SO}_2\text{NHR}$ и α -аминокислотой,

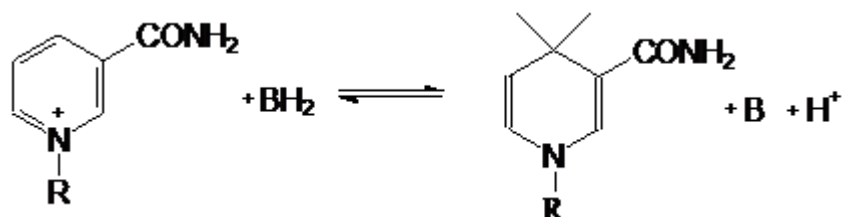
что препятствует образованию фолиевой кислоты (витамин В_С), в результате чего угнетается рост бактерий.

Ингибиторы, уменьшающие активность ферментов, в результате связывания ингибитора с ферментом, но не по тем функциональным группам, с которыми реагирует субстрат, называются *неконкурентными*. Необратимое ингибирование наблюдается при отравлениях: пестицидами, ионами тяжелых металлов, боевых отравляющих веществ (зарин, зоман). В последнее время увеличивается экологическая нагрузка. Это обусловлено демографическим взрывом в последнее столетие, который требует развития промышленности и повышения урожайности сельскохозяйственных культур. Для сохранения урожая широко применяют пестициды. Особенно вредны инсектициды, являющиеся ядами, действующими на комаров и людей. Фосфорорганические инсектициды ингибируют фермент ацетилхолинэстеразу, при этом нарушается передача нервных импульсов и наступает смерть.

При действии отравляющих веществ, поступающих в организм из окружающей среды, наблюдается уменьшение скорости ферментативной реакции. Уменьшение скорости ферментативной реакции может проходить и при значительном повышении концентрации субстрата, за счет того, что один активный центр может связывать две и более молекулы субстрата с образованием неактивного соединения. В результате изменения активности ферментов, в том числе за счет действия окружающей среды, возникают разнообразные болезни, которые довольно тяжело лечатся.

ПРИМЕРЫ ОТВЕТОВ НА ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Пример 1. В качестве фермента, принимающего участие в переносе водорода от биологического донора водорода (ВН_2) к НАД^+ , которое проходит по следующей схеме, является следующий класс ферментов



а) гидролаз; б) оксидоредуктаз; в) изомераз.

Ответ: Для выбора правильного ответа необходимо вспомнить классификацию ферментов по типу прохождения реакций. Классифицируют на 6 основных классов ферментов, а именно:

а) *Оксидоредуктазы* катализируют окислительно-восстановительные реакции с участием двух субстратов;

б) *трансферазы* - ферменты, катализирующие перенос алкильных, ацильных, альдегидных, кетонных групп, а также групп, содержащих серу, фосфор;

в) *гидролазы* – ферменты, катализирующие гидролиз сложноэфирных, эфирных, пептидных, гликозидных связей;

г) *лиазы*, принимают участие в образовании двойных связей и реакций присоединения к ним, а также в биохимических реакциях, в которых происходит отщепление атомов или групп атомов по негидролитическому механизму;

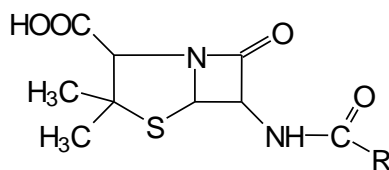
д) *изомеразы* – ферменты, катализирующие взаимопревращения оптических, геометрических и конфигурационных изомеров;

е) *лигазы* катализируют соединение 2-х молекул, сопряженное с разрывом пирофосфатной связи АТФ или подобного соединения.

Далее, проводят анализ биохимической реакции. Во время прохождения реакции меняется степень окисления, таким образом реакция относится к окислительно-восстановительным реакциям и по классификации такие реакции катализируются оксидоредуктазами.

Ответ: б.

Пример 2. Пенициллин – природное соединение, продуцируемое плесневым грибом *Penicillium notatum*, препятствует образованию сшивок на заключительном этапе синтеза клеточной стенки бактерий



и оказывает

а) обратимое ингибирующее действие на ферменты; б) активирующее действие на ферменты; в) необратимое ингибирующее действие на ферменты.

Ответ. Ферменты могут повышать (понижать) ферментативную активность под действием некоторых веществ.

Активаторы – вещества, увеличивающие ферментативную активность или переводящие ферменты из неактивного состояния в активное.

Понижение скорости ферментативной реакции проходит при добавлении *ингибиторов*.

По условию тестового задания пенициллин препятствует образованию сшивок на заключительном этапе синтеза клеточной бактерии и поэтому оказывает ингибирующее действие. Поэтому ответ б) активирующее действие на ферменты, можно исключить.

Ингибиторы могут оказывать обратимое и необратимое действие на ферменты. Обратимые ингибиторы связываются посредством слабых ковалентных связей и могут быть легко разрушены, при этом активность фермента восстанавливается, что не наблюдается при действии пенициллина, который связывается необратимо прочными ковалентными связями, за счет ацилирования фермента при раскрытии β -лактамного кольца, и оказывает необратимое ингибирующее действие на ферменты.

Ответ: в.

ТЕСТОВЫЕ ВОПРОСЫ ДЛЯ КОНТРОЛЯ УСВОЕНИЯ МАТЕРИАЛА

1. Ферменты, катализирующие перенос алкильных, ацильных, альдегидных, кетонных групп, а также групп, содержащих серу, фосфор называют

а) оксидоредуктазами; б) трансферазами; в) гидролазами.

2. Ферменты, катализирующие гидролиз сложноэфирных, эфирных, пептидных, гликозидных связей являются

а) изомеразами; б) лиазами; в) гидролазами.

3. Ферменты, катализирующие взаимопревращения оптических, геометрических и конфигурационных изомеров называют

а) изомеразами; б) трансферазами; в) лигазами.

4. Ферменты, катализирующие соединение 2-х молекул, сопряженное с разрывом пирофосфатной связи АТФ или подобного соединения являются

а) лигазами; б) трансферазами; в) изомеразами.

5. Окисление молочной кислоты в пировиноградную проходит с участием фермента

а) гидролазы; б) оксидоредуктазы; в) изомеразы.

6. В качестве фермента, принимающего участие в декарбоксилировании пировиноградной кислоты с образованием уксусного альдегида и диоксида углерода, протекающего по схеме

является

а) лигаза; б) изомераза; в) лиаза.

7. В качестве фермента, принимающего участие в превращении пирувата в оксалоацетат с участием аденозинтрифосфата (АТФ) является

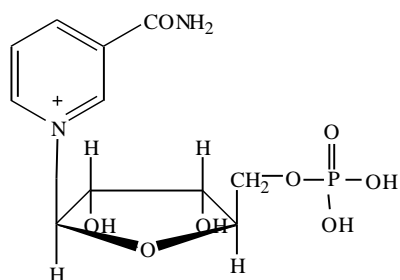
а) лиаза; б) лигаза; в) трансфераза.

8. Коферментами окислительно-восстановительных реакций в организме являются

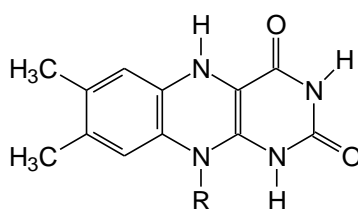
а) НАД⁺, АТФ; б) НАД⁺, ФАД; в) ФАД, АТФ.

9. При восстановлении ФАД образуется соединение формулы

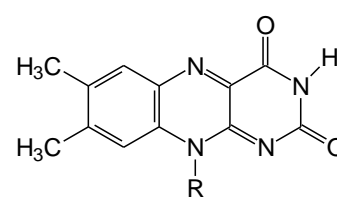
а)



б)



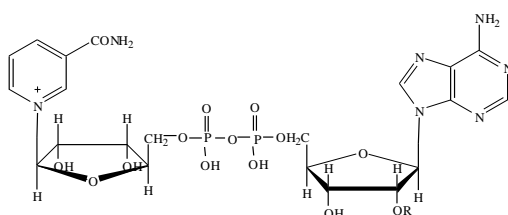
в)



10. Коферментами окислительно-восстановительных реакций в организме являются

а) НАД⁺, ФАД; б) ФАД, АТФ; в) НАД⁺, ФАД · Н₂, АТФ.

11. Приведенная формула является



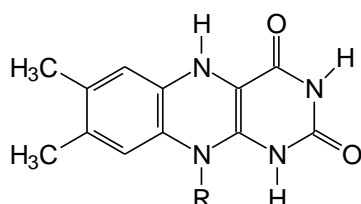
а) ФАД · Н₂; б) НАД · Н; в) НАД⁺. б)

12. Небелковый компонент фермента называют

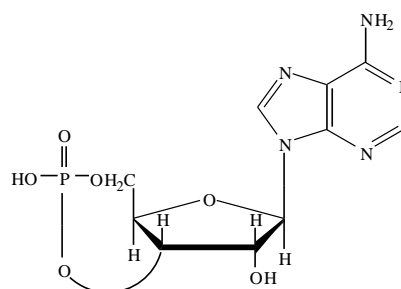
а) простетической группой; б) апоферментом; в) коферментом.

13. Выберите кофермент ароматического ряда из приведенных формул и реакций

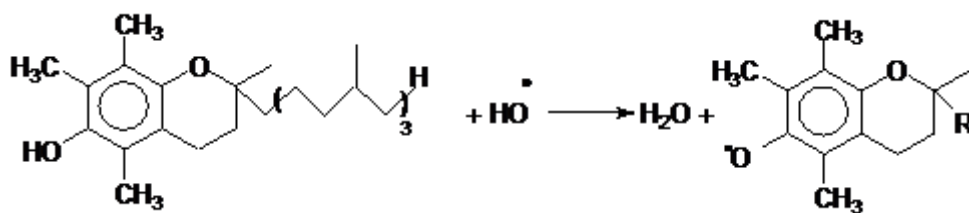
а)



б)

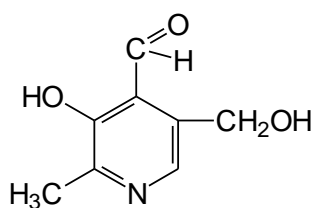


В)

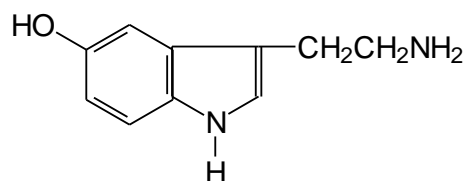


14. Выберите кофермент алифатического ряда из приведенных формул

а)



б)

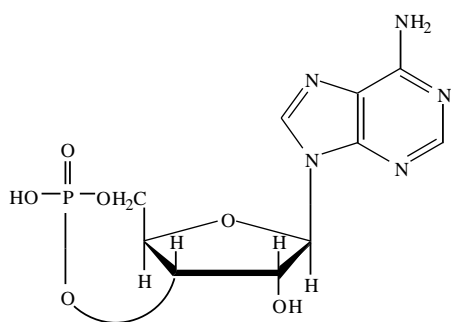


В)

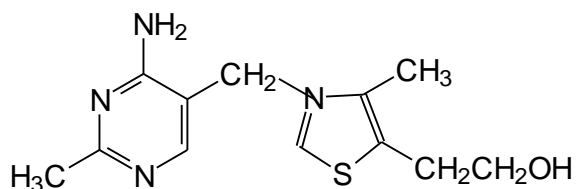


15. Выберите кофермент гетероциклического ряда из приведенных формул

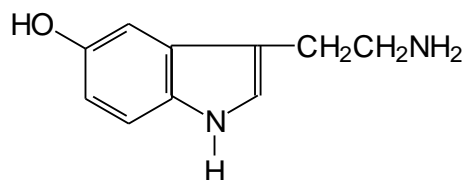
а)



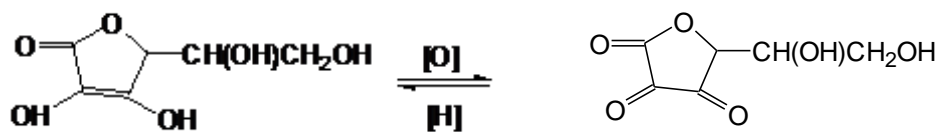
б)



В)

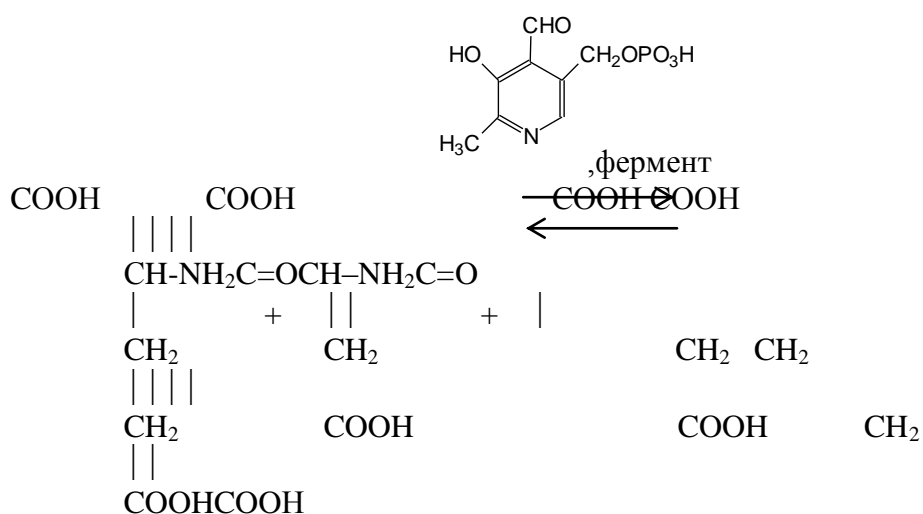


16. Приведенная реакция катализируется ферментом класса



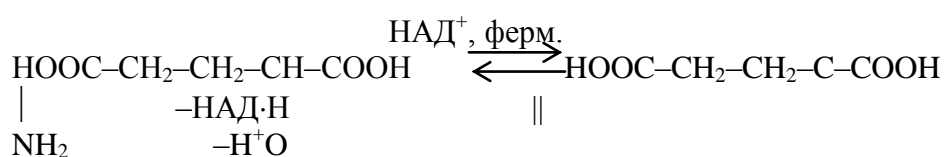
а) оксидоредуктаз; б) лиаз; в) изомераз.

17. Приведенная реакция катализируется ферментом классом



а) изомераз; б) трансфераз; в) лигаз.

18. Приведенная реакция катализируется ферментом класса



а) гидролаз; б) оксидоредуктаз; в) изомераз.

19. Могут или нет выступать в качестве коферментов ионы металлов, например Ca^{+2}

а) могут; б) не могут; в) не знаю.

20. Свойство фермента селективно выбирать из многих субстратов один или несколько близких по химической природе называют

а) относительной групповой селективностью; б) стереохимической специфичностью; в) специфичностью.

21. Если фермент действует на ряд близких субстратов, имеющих схожее строение, то говорят об

а) абсолютной групповой специфичности; б) абсолютной специфичности; в) относительной групповой специфичности.

22. Фермент, действующий только на один из пространственных изомеров, обладает

а) стереохимической специфичностью; б) абсолютной специфичностью; в) относительной групповой специфичностью.

23. Относительная групповая специфичность проявляется в том случае

а) если фермент действует на ряд близких субстратов, имеющих схожее строение; б) если фермент катализирует только один субстрат, одну специфическую реакцию; в) если фермент специфичен к типу химической связи и допускает замену субстрата.

24. Приведенное уравнение описывает

а) схему Михаэлиса; б) кинетическое уравнение Михаэлиса-Ментен; в) кинетическое уравнение Михаэлиса.

25. Приведенное уравнение служит для определения

$$w_o = \frac{k_2[E_{nz}]_o[S]_o}{K_M + [S]}$$

а) скорости реакции; б) начальной скорости реакции; в) конечной скорости реакции.

26. Понижение скорости ферментативной реакции проходит при добавлении

а) кофакторов; б) коферментов; в) ингибиторов.

27. Необратимое ингибирование наблюдается

а) при отравлениях ионами тяжелых металлов; б) при применении сульфаниламидных препаратов; в) не знаю.

Ответы

1б; 2в; 3а; 4а; 5б; 6в; 7б; 8б; 9б; 10а; 11в; 12б; 13в; 14в; 15б; 16а; 17б; 18б; 19а; 20в; 21а; 22а; 23в; 24б; 25б; 26в; 27а.

Литература

1. Орлов В.Д., Липсон В.В., Иванов В.В. Медицинская химия. Учебник для студентов химических специальностей высших учебных заведений. Харьков: Фолис. 2005. 460с.