

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Кафедра биологической химии, биотехнологии и биоинженерии

Н. А. Кленова, О. Н. Макурина

ХИМИЯ БЕЛКА И ФЕРМЕНТОВ

Часть 2

Ферменты

*Утверждено редакционно-издательским советом
университета в качестве учебного пособия*

Самара
Издательство «Самарский университет»
2015

УДК 621.43
ББК 24.239
К48

Рецензенты: д-р биол. наук, проф. Ю. М. Попов,
д-р биол. наук, проф. А. Н. Инюшкин

Кленова, Н. А., Макурина, О. Н.

К48 Химия белка и ферментов: в 2 ч. Ч. 2. Ферменты : учеб. пособие /
Н. А. Кленова, О. Н. Макурина. – Самара : Изд-во «Самарский универси-
тет», 2015. – 32 с.

Учебное пособие содержит современные представления об особенностях строения, механизме действия, свойствах, значении и классификации ферментов. Подробно даны характеристики кофакторов и коферментов: их строение и роль в ферментативном катализе. Рассматривается проблема регуляции активности ферментов.

Предназначено для студентов высших учебных заведений, обучающихся на биологических, медицинских и фармацевтических факультетах (бакалавры, магистранты, специалисты), а также может быть рекомендовано аспирантам, научным сотрудникам.

УДК 621.43
ББК 24.239

© Кленова Н. А., Макурина О. Н., 2015
© ФГБОУ ВПО «Самарский
государственный университет», 2015

Содержание

Введение	4
1. Значение ферментов	5
2. Общие и отличительные черты ферментов и небиологических катализаторов	6
3. Общая характеристика ферментов	8
4. Особенности структурно-функциональной организации ферментов	13
4.1. Активный центр ферментов	13
4.2. Простые и сложные ферменты	15
4.3. Кофакторы, коферменты, простетические группы	16
4.3.1. Строение и роль кофакторов	17
4.3.2. Строение и роль коферментов	17
4.3.3. Структура и функции некоторых коферментов	19
5. Классификация ферментов	25
6. Регуляция активности ферментов	26
Задачи	28
Библиографический список	30

Введение

Существование живых организмов, начиная от бактерий и других прокариотов до многоклеточных эукариотических организмов – растений, грибов, животных – невозможно без реакционно-специфических катализаторов, ускоряющих практически все биохимические реакции, протекающие в организме. Совокупность химических реакций, обеспечивающих метаболизм клеток и целостных организмов, может осуществляться только при наличии специфических биологических катализаторов, которыми являются **ферменты**. Ферменты – биологические катализаторы белковой природы.

Термин «фермент» (от лат. *fermentum* – закваска) был предложен в начале XVII в. голландским ученым Ван Гельмонтом для веществ, влияющих на спиртовое брожение. Спиртовое брожение – это химический процесс, а в дрожжах (или их экстрактах), употреблявшихся в качестве закваски для ускорения брожения, присутствуют природные катализаторы. То, что эти катализаторы белковой природы, стало известно значительно позже. Вследствие этого, за биологическими катализаторами, ускоряющими не только брожение, но и другие химические реакции в организме, сохранился термин «фермент». Как правило, в зарубежной литературе чаще встречается синоним данного термина – «энзим» (от греч. *en zyme* – в дрожжах).

Наука, изучающая ферменты, называется **энзимологией**. Энзимология решает две главные, и, как правило, неразрывно связанные между собой задачи: 1) определение структурной макромолекулярной организации ферментов; 2) изучение природы химических взаимодействий, лежащих в основе ферментативного катализа. Теоретические и практические достижения энзимологии в настоящее время используются в решении многих проблем биохимии и молекулярной биологии, включая их сравнительное и эволюционное рассмотрение, а также в медицине и биотехнологии, генной и клеточной инженерии.

Изучение ферментов имеет огромное значение для любой фундаментальной и прикладной области биологии, а также для многих практических отраслей химической, пищевой и фармацевтической индустрии, занятых изготовлением катализаторов, антибиотиков, витаминов и многих других биологически активных веществ, используемых в народном хозяйстве и медицине.

1. Значение ферментов

Роль ферментов в жизнедеятельности животных, растений, грибов, микроорганизмов колоссальна. Благодаря каталитической функции ферменты обеспечивают быстрое протекание в организме огромного числа химических реакций. Складываясь в единый ансамбль саморегулируемых биохимических процессов, эти химические реакции составляют материальную и энергетическую основу непрерывного самообновления не только веществ в клетках, но и их органелл, а также тканей, органов и целостного организма.

Ферменты обеспечивают осуществление таких важнейших процессов жизнедеятельности клеток, как экспрессия наследственной информации, биоэнергетика, обмен веществ. Изучение ферментов способствует пониманию сути механизмов, лежащих в основе жизни. Именно этим объясняется столь пристальное внимание исследователей к проблемам структуры, функций и молекулярных механизмов действия ферментов.

Проблемы клеточного роста и развития, дифференцировки клеток высших организмов, физиологических функций (движение, перемещение в пространстве, транспорт веществ и ионов, процессы возбуждения и торможения и др.) определяются в большой степени работой биокатализаторов, включая их биосинтез и инактивацию.

Изучение любой проблемы в области познания механизмов жизнедеятельности или возникающих в процессе жизнедеятельности патологий обязательно связано с исследованием соответствующих ферментных систем и механизмов их регуляции.

Многие болезни (врожденные нарушения метаболизма) определяются генетически обусловленными нарушениями в синтезе ферментов. При повреждении клеток (вызванном, например, недостатком кровоснабжения или воспалением) некоторые ферменты попадают в плазму крови. Измерение активности таких ферментов обычно используется для диагностики многих распространенных заболеваний (например, инфаркта миокарда). Диагностическая энзимология является областью медицины, использующей определение активности ферментов для диагностики и контроля за результатами лечения. Ферменты применяются и в терапии.

2. Общие и отличительные черты ферментов и небиологических катализаторов

Биокатализаторы (ферменты), также как и небиологические катализаторы, ускоряют химические реакции, идущие и без них, но достаточно долго и в «жестких» условиях (высокая температура, давление, большие концентрации реагирующих веществ и пр.).

Биологические катализаторы не вызывают каких либо побочных реакций и не участвуют в реакциях, невозможных по термодинамическим условиям. Катализаторы как небиологические, так и биологические, только ускоряют химические реакции, обычно протекающие очень медленно.

Ферменты и небиологические катализаторы (например, железо, платина и др.), подчиняясь общим законам катализа, имеют ряд сходных признаков: 1) они катализируют только энергетически возможные реакции (реакции, не противоречащие законам термодинамики); 2) они никогда не изменяют направления реакции; 3) они не изменяют равновесия обратимой реакции, а лишь ускоряют его наступление; 4) они не расходуются в процессе реакции (фермент в клетке работает до тех пор, пока по каким-либо причинам не разрушится или не будет инактивирован необратимо).

Но ферменты обладают качествами, принципиально отличающими их от небиологических катализаторов. Эти отличия определяются особенностями строения ферментов. Перечислим эти основные отличия:

1. Поскольку ферменты – белковые молекулы, то для них характерна и амфотерность (изменение заряда и, как следствие, кислотности и основности, в зависимости от pH среды). Для каждого фермента характерны специфическая последовательность расположения аминокислотных остатков и пространственная конформация. Ферменты значительно различаются по размеру молекул (молекулярная масса от $1,5 \cdot 10^4$ до 10^6 Да и даже более).

2. Скорость ферментативного катализа намного выше, чем небиологического. Это происходит за счет более значительного снижения энергии активации по сравнению с небиологическими катализаторами.

3. Ферменты отличаются высокой специфичностью действия в отношении как химической природы субстрата (химическое соединение, на которое действует фермент), так и типа реакции, т.е. каждый фермент катализирует в основном только определенную химическую реакцию. Известны ферменты, действующие только на один из стереоизомеров вещества, тогда как платина, например, используется в качестве катализатора в разнообразных реакциях и ее активность не зависит от изомера вещества. Вы-

сокая специфичность ферментов (об этом пойдет речь немного позже) обеспечивает осуществление обмена веществ в строго определенном направлении.

4. Ферменты чрезвычайно эффективны и проявляют более высокую каталитическую активность в условиях умеренной температуры (температура тела, т.е. около 37°C), нормального давления и в области близких к нейтральным значениям рН среды, т.е. в достаточно «мягких» условиях. Это отличает их от небиологических катализаторов, действие которых возможно только при высоком давлении, крайних значениях рН, высокой температуре и пр. Поскольку ферменты являются белками, то они очень чувствительны к колебаниям температуры, сдвигам рН и изменениям давления. Эффективность большинства ферментов чрезвычайно высока. Так, например, одна молекула фермента может катализировать превращение 10^2 - 10^6 молекул субстрата в 1 минуту.

5. Ферменты необыкновенно высокоэффективные катализаторы, увеличивающие скорости реакции в миллионы и миллиарды раз. Так, например, уреазы (при рН 8,0, 20°C) ускоряет гидролиз мочевины примерно в 10^{14} раз.

6. Ферменты – катализаторы с регулируемой активностью (чего нельзя сказать о небиологических катализаторах). Это совершенно уникальное свойство ферментов позволяет изменять скорость метаболизма в клетке и организме в зависимости от условий среды. Таким образом, клетка и организм приспосабливаются (адаптируются) к действию различных факторов (как химической, так и физической природы). Активность ферментов в клетках строго контролируется как на генетическом уровне, так и посредством определенных низкомолекулярных соединений, в частности субстратов и продуктов реакций, катализируемых этими же ферментами, ингибиторов и др.

7. Скорость ферментативной реакции прямо пропорциональна количеству фермента, а для небиологического катализа не существует строгой зависимости скорости реакции от количества катализатора. Недостаток фермента в живой клетке и целостном организме приводит к низкой скорости превращения веществ. Одним из путей приспособления клеток организма к изменяющимся факторам внешней среды является образование дополнительных количеств фермента.

3. Общая характеристика ферментов

Все ферменты – белки. Именно эта особенность определяет все следующие отличительные черты биологических катализаторов от небиологических.

Под влиянием различных физических и химических факторов происходит денатурация ферментов, так же как и прочих белков.

Как было отмечено ранее, подобно другим белкам, ферменты имеют большую молекулярную массу – от десятков тысяч до нескольких миллионов (табл. 1).

Таблица 1

Молекулярная масса некоторых ферментов

Тривиальное название фермента		Молекулярная масса, Да
1	Рибонуклеаза (из поджелудочной железы быка)	13683
2	Лизоцим (из яичного белка)	13930
3	Галактозооксидаза (из грибов)	60000
4	Уратоксидаза (из печени)	120000
5	Каталаза	248000
6	Уреаза	480000
7	Моноаминоксидаза	1200000
8	Пируватдегидрогеназа (комплекс)	4500000

Ферменты могут быть построены из одной полипептидной цепи, нескольких полипептидных цепей или представлять собой сложные (иногда полиферментные) комплексы.

Ферменты, как и все белки, обладают рядом свойств, характерных для высокомолекулярных соединений: 1) электрофоретической подвижностью благодаря наличию в них положительных и отрицательных зарядов, а в изоэлектрической точке не обнаруживают подвижности в электрическом поле; 2) амфотерностью (могут существовать в растворе в виде анионов, катионов и амфионов); 3) ферменты неспособны к диализу через полупроницаемые мембраны (при помощи диализа их растворы можно освободить от низкомолекулярных примесей); 4) как и белки, они легко осаждаются из водных растворов при низких температурах методами высаливания или осторожным добавлением ацетона, этанола и других веществ и при этом не теряют своих каталитических свойств.

Термолабильность ферментов. При получении ферментов в чистом виде и при их хранении следует учитывать одно важное свойство белков, а именно – стабильность, которая определяется рядом факторов. Одним из общих правил при работе с ферментами является оптимальная температура, обычно соответствующая температуре тела, а для препаративных целей – использование температуры около 0°C.

Одно из неперенных условий сохранения стабильности ферментов – хранение их в высушенном (в условиях холода) или замороженном состоянии. Поскольку скорость химических реакций зависит от температуры, поэтому катализируемые ферментами реакции также чувствительны к изменениям температуры (рис. 1).

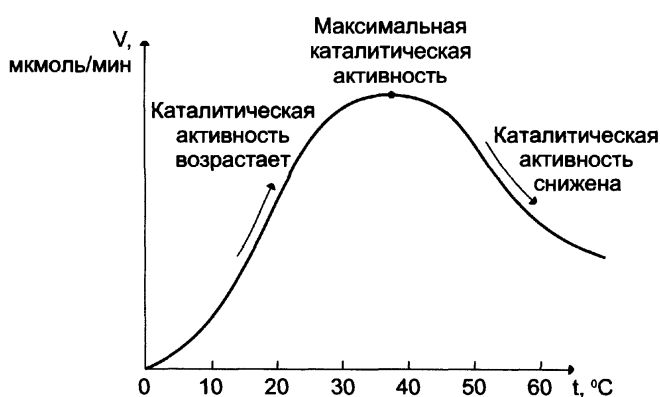


Рис. 1. Зависимость скорости ферментативной реакции (V) от температуры

Анализируя кривую, представленную на данном рисунке видно, что при некой оптимальной температуре скорость реакции максимальна. Повышение скорости реакции по мере приближения к оптимальной температуре слева объясняется увеличением кинетической энергии реагирующих молекул.

При дальнейшем повышении температуры кинетическая энергия молекулы фермента становится достаточной для разрыва связей, поддерживающих вторичную структуру фермента в нативном, каталитически активном состоянии (происходит тепловая денатурация фермента). Вторичная и третичная структура фермента разрушается, что сопровождается потерей каталитической активности.

Зависимость активности ферментов от pH среды. Кардинальным биологическим принципом является **гомеостаз** – поддержание внутренней среды организма в состоянии, максимально близком к норме. Активность многих ферментов и белков изменяется даже при сравнительно небольших изменениях pH.

Ферменты обычно наиболее активны в пределах узкой зоны концентрации водородных ионов, соответствующей для животных тканей в ос-

новном выработанным в процессе эволюции физиологическим значениям рН среды 6,0-8,0, хотя имеются исключения. При графическом изображении на кривой колоколообразной формы имеется определенная точка, в которой фермент проявляет максимальную активность; эту точку называют оптимумом рН среды для действия данного фермента (рис. 2).

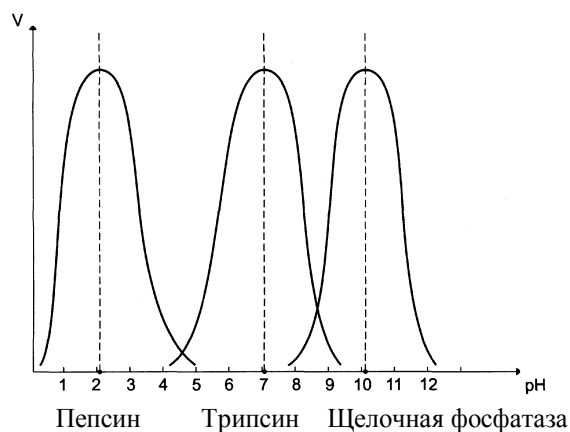


Рис. 2. Зависимость скорости ферментативной реакции (V) от рН среды

В табл. 2 приводятся оптимальные значения рН среды для ряда ферментов.

Таблица 2

Оптимальные значения рН для некоторых ферментов

Фермент	рН	Фермент	рН
Пепсин	1,5-2,5	Каталаза	6,8-7,0
Катепсин В	4,5-5,0	Уреаза	7,0-7,2
Пируваткарбоксилаза	4,8	Липаза панкреатическая	7,0-8,5
Амилаза из солода	4,9-5,2	Карбоксипептидаза	7,5
Сахараза кишечная	5,8-6,2	Трипсин	7,5-8,5
Фумараза	6,5	Аргиназа	9,5-10,0
Амилаза слюны	6,8-7,0		

Из данных табл. 2 видно, что рН оптимум действия ферментов лежит в пределах физиологических значений. Исключение составляют пепсин, рН оптимум которого 2,0. Согласно современным представлениям, влияние изменений рН среды на молекулу фермента (а зачастую и субстрата) заключается в воздействии на состояние и степень ионизации кислотных и основных групп (в частности, COOH -группы дикарбоновых аминокислот, SH -группы цистеина, имидазольного азота гистидина, NH_2 -группы лизина и др.). При резких сдвигах от оптимума рН среды ферменты могут подвергаться конформационным изменениям, приводящим к потере активности

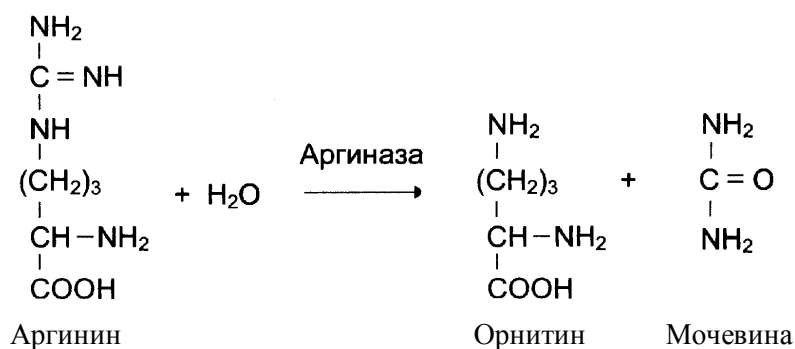
вследствие денатурации или изменения заряда молекулы фермента. Можно сделать вывод, что зависимость активности ферментов от pH определяется следующими факторами: 1) денатурацией фермента при очень высоких или очень низких pH; 2) изменением величины заряда молекул субстрата или фермента.

Специфичность ферментов. Как уже отмечалось ранее, тот или иной фермент может взаимодействовать только с определенным веществом (веществами), катализируя их превращения. В этом проявляется специфичность ферментов – наиболее важное свойство всех энзимов. Именно это свойство определяет биологическую значимость ферментов.

Все ферменты по виду специфичности можно разделить на четыре группы: 1) ферменты, обладающие абсолютной специфичностью; 2) ферменты, обладающие относительной (групповой) специфичностью; 3) ферменты, обладающие оптической специфичностью (стереоспецифичностью); 4) специфичность в отношении типа катализируемой реакции. Первые три группы специфичности относят к разновидностям субстратной специфичности (в отличие от каталитической специфичности ферментов).

Специфичность – это свойство, которое существенно отличает ферменты от неорганических катализаторов.

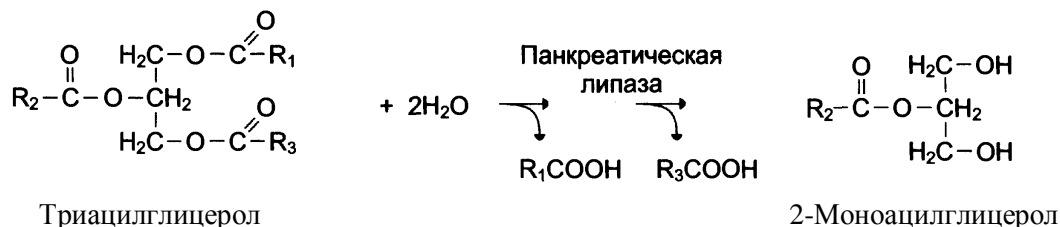
1. Абсолютная специфичность ферментов. Абсолютной специфичностью действия называют способность фермента катализировать превращение только единственного субстрата. Примерами таких ферментов могут служить аргиназа, расщепляющая в естественных условиях (в организме) аргинин, уреаза, катализирующая распад мочевины:



2. Относительная (групповая) специфичность ферментов. Большинство ферментов катализирует однотипные реакции с небольшим количеством (группой) структурно похожих субстратов. Отдельные литические ферменты отличаются более высокой группоспецифичностью. Так, химотрипсин гидролизует преимущественно пептидные связи, в которых кар-

боксильная группа принадлежит ароматическим аминокислотам – фенилаланину, тирозину или триптофану.

Панкреатическая липаза катализирует гидролиз жиров в двенадцатиперстной кишке человека, катализируя превращение любой молекулы жира (триацилглицерола) до молекулы моноацилглицерола и двух молекул жирных кислот:

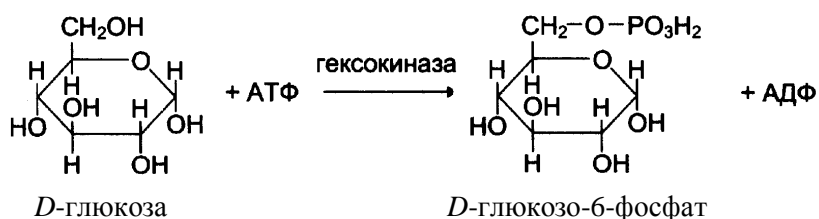


Панкреатическая липаза гидролизует эфирную связь у α -атомов углерода глицерола, независимо от того, какие жирные кислоты входят в состав молекулы жира.

3. Оптическая специфичность (стереоспецифичность) ферментов.

За исключением эпимераз (рацемаз), которые катализируют взаимопревращение оптических изомеров, ферменты в общем случае проявляют абсолютную оптическую специфичность, по крайней мере, по отношению к одному из участков молекулы субстрата.

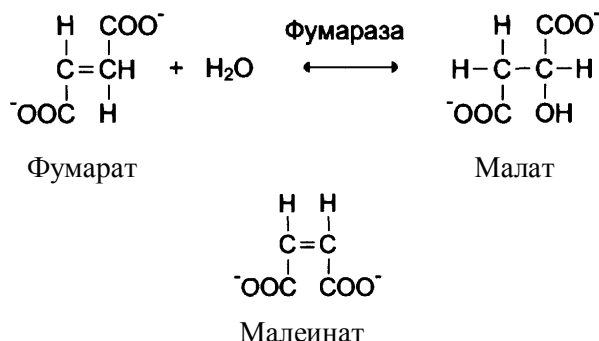
Большинство моносахаридов и продуктов их обмена в организме человека и других млекопитающих относят к *D*-стереоизомерам. Ферменты, осуществляющие их метаболизм, имеют специфичность к *D*-, а не к *L*-сахарам:



Амилаза действует только на α -гликозидные связи, что позволяет гидролизовать крахмал и гликоген (полимеры глюкозы), остатки глюкозы в которых соединены α -гликозидными связями. Целлюлоза – тоже полимер глюкозы, однако, остатки глюкозы в этой макромолекуле связаны β -гликозидными связями. В организме человека нет ферментов, специфичных к β -гликозидной связи и глюкоза не гидролизуется в кишечнике человека (поэтому целлюлоза не может служить источником глюкозы для человека).

Если какое либо соединение существует в форме *цис*- и *транс*-изомеров с различным расположением групп атомов вокруг двойной связи,

то, как правило, только один из этих геометрических изомеров может служить в качестве субстрата для действия фермента. Например, фумараза катализирует превращение только фумаровой кислоты (*транс*-изомер), но не действует на малеиновую кислоту (*цис*-изомер):



Таким образом, благодаря высокой специфичности действия ферменты обеспечивают протекание с большой скоростью лишь определенных химических реакций из огромного разнообразия возможных превращений в микропространстве клеток и целостном организме, регулируя тем самым интенсивность обмена веществ.

4. Специфичность в отношении типа катализируемой реакции. Фермент фумараза катализирует гидратацию или дегидратацию своих субстратов. Протеолитические ферменты – гидролитическую реакцию. При этом рассматриваемые ферменты не катализируют другие возможные превращения своих субстратов, например окислительно-восстановительные реакции или реакции декарбоксилирования. Однако о более широкой специфичности данного вида свидетельствует факт, что известны протеолитические ферменты, выступающие в роли катализаторов гидролиза не только пептидов, но и эфиров и тиоэфиров.

4. Особенности структурно-функциональной организации ферментов

4.1. Активный центр ферментов

Исследования показали, что молекула фермента, как правило, во много раз больше молекулы субстрата, подвергающегося химическому превращению эти ферментом. В контакт с субстратом вступает лишь небольшая часть молекулы фермента (2-8 аминокислотных остатков, формирующих активный центр. Это, как правило, Гис, Тир, Цис, Сер, Лиз, Три, Арг, Асп, Глу). Роль остальных аминокислотных остатков – обеспечение правильной конформации молекулы фермента для оптимального протекания химиче-

ской реакции. Отсюда возникло представление об активном центре фермента.

Под **активным центром** подразумевают уникальную комбинацию аминокислотных остатков в молекуле фермента, обеспечивающую непосредственное связывание ее с молекулой субстрата и прямое участие в акте катализа. Аминокислоты, формирующие активный центр, линейно могут быть значительно удалены друг от друга, но пространственно они сближены и, как правило, находятся в углублении («кармане») молекулы фермента. Установлено, что у сложных ферментов в состав активного центра входят также кофакторы, коферменты или простетические группы. Активный центр представляет собой либо глубокую впадину в молекуле фермента (химотрипсин), либо щель (лизоцим, рибонуклеаза).

Лиганд, взаимодействующий с активным центром фермента, называют **субстратом**. Субстрат комплементарно связывается с активным центром фермента. Под **комплементарностью** понимают пространственное и химическое соответствие взаимодействующих молекул субстрата и молекул, формирующих активный центр фермента. Схематично процесс катализа можно представить следующим уравнением:



где **E** – фермент; **S** – субстрат; **ES** – фермент-субстратный комплекс; **EP** – комплекс фермент-продукт; **P** – продукт.

В активном центре фермента субстраты располагаются таким образом, чтобы участвующие в реакции функциональные группы субстратов находились в непосредственной близости друг к другу. Это свойство активного центра называют **эффектом сближения и ориентации реагентов**. Активный центр способствует также дестабилизации межатомных связей в молекуле субстрата, что облегчает протекание химической реакции и образование продуктов. Это свойство активного центра называют **эффектом деформации субстрата**.

В активном центре фермента есть аминокислотные остатки, функциональные группы которых обеспечивают связывание субстрата, и аминокислотные остатки, функциональные группы которых осуществляют химическое превращение субстрата.

В свою очередь молекула субстрата также содержит функционально различные участки: например, субстраты эстераз или протеиназ – одну специфическую связь (или группу атомов), подвергающуюся атаке со сто-

роны фермента, и один или несколько участков, избирательно связываемых ферментом.

В участке связывания субстрат при помощи нековалентных связей взаимодействует с ферментом, формируя фермент-субстратный комплекс. В каталитическом участке субстрат претерпевает химическое превращение в продукт, который затем высвобождается из активного центра.

Предполагают, что формирование активного центра фермента начинается уже на ранних этапах синтеза белка фермента на рибосоме, когда линейная одномерная структура пептидной цепи превращается в трехмерное тело строго определенной конфигурации.

Образовавшийся белок приобретает информацию совершенно нового типа, а именно функциональную (в частности, каталитическую).

Помимо активного центра, в молекуле фермента может присутствовать также **аллостерический центр** (или центры) (от греч. *allos* – другой, иной и *steros* – пространственный, структурный), представляющий собой участок молекулы фермента, с которым связываются определенные, обычно низкомолекулярные, вещества (эффекторы, или модификаторы), молекулы которых отличаются по структуре от субстратов. Присоединение эффектора к аллостерическому центру изменяет третичную и часто также четвертичную структуру молекулы фермента и соответственно конформацию активного центра, вызывая снижение или повышение энзиматической активности. Ферменты, активность каталитического центра которых подвергается изменению под влиянием аллостерических эффекторов, связывающихся с аллостерическим центром, получили название **аллостерических ферментов**. Это явление лежит в основе так называемой аллостерической регуляции каталитической активности. На уровне клеток такая регуляция метаболизма является основной.

4.2. Простые и сложные ферменты

Ферментам присущи все особенности структурной организации белков. В природе существуют как **простые**, так и **сложные ферменты**. Первые целиком представлены полипептидными цепями и при гидролизе распадаются исключительно на аминокислоты. Такими ферментами (простые белки, ферменты-протеины) являются гидролитические ферменты, в частности, пепсин, трипсин, папаин, уреазы, лизоцим, рибонуклеаза, фосфатаза и др.

Большинство природных ферментов относится к классу сложных белков (ферменты-протеиды), содержащих помимо полипептидных цепей, какой-либо небелковый компонент (простетическая группа, кофактор, ко-

фермент), присутствие которого является абсолютно необходимым для каталитической активности данного фермента. Белковая часть такого сложного фермента называется **апоферментом**, небелковая, легко диссоциирующая с белковой частью, – **коферментом**, прочно связанная с белком, – **протетической группой**, а молекула фермента в целом – **холоферментом (холоэнзимом)**.

Апофермент + Кофермент \rightleftharpoons Холофермент

В некоторых случаях в условиях живой клетки равновесие сильно сминуто влево, и кофермент присоединяется к апоферменту вместе с субстратом в момент реакции. Другой крайний случай – стабильные холоферменты, содержащие прочно связанный кофермент. Такие ферменты относят к сложным белкам.

4.3. Кофакторы, коферменты, протетические группы

В состав двухкомпонентных ферментов, как было отмечено ранее, входят небелковые структуры (металлы, витамины и др.). Если такой небелковой частью являются металлы, то их, как правило, называют **кофакторами**, если – различные органические молекулы, то в этом случае такая часть конъюгированного фермента называется **коферментом**. Коферменты можно рассматривать как косубстраты, поскольку они вместе с субстратами стехиометрически участвуют в каталитической реакции.

Единодушное мнение в литературе сохраняется относительно характеристики **протетической группы** сложных ферментов – когда кофактор (или кофермент) связан с апоферментом прочно и постоянно.

Химические связи между кофакторами и пептидными цепями могут быть относительно слабыми (например, водородные связи, электростатические взаимодействия и др.). В таких случаях при выделении ферментов наблюдается полная диссоциация обеих частей, и изолированный белковый компонент оказывается лишенным ферментативной активности, пока не будет добавлен извне недостающий кофактор. Именно к подобным изолированным низкомолекулярным органическим веществам применим термин «кофермент», типичными представителями которых являются витамины В₁, В₂, В₆, РР, содержащие коферменты.

Многие двухвалентные металлы (Mg²⁺, Mn²⁺, Ca²⁺) также выполняют роль кофакторов, хотя они не относятся ни к коферментам, ни к протетическим группам. Известны примеры, когда ионы металлов прочно связаны с белковой молекулой, выполняя функции протетической группы.

4.3.1. Строение и роль кофакторов

Более 25 % всех ферментов для проявления полной каталитической активности нуждается в ионах металлов. В табл. 4 приведены примеры кофакторов различных двухкомпонентных ферментов.

Металлы, являясь обязательной составной частью фермента (кофактор), выполняют различные функции:

1. Стабилизируют молекулы субстратов.
2. Стабилизируют активный центр фермента.
3. Стабилизируют третичную и четвертичную структуры ферментов.
4. Участвуют в ферментативном катализе.
5. Регулируют активность ферментов (табл. 3).

4.3.2. Строение и роль коферментов

Для проявления каталитической активности большинству ферментов необходимо наличие кофермента.

Коферменты находятся в каталитическом участке активного центра и поэтому принимают непосредственное участие в химических реакциях, выступая в качестве акцептора и донора химических группировок, атомов, электронов. Кофермент может быть связан с белковой частью молекулы фермента ковалентными и нековалентными связями.

Если кофермент присоединен к апоферменту ковалентными связями, то его называют **протетической группой** (ФАД, ФМН, биотин, липоевая кислота).

Таблица 3

Химическая природа и функции важнейших кофакторов

№ п/п	Фермент	Кофактор	Функции кофакторов
1	α -Амилаза	Ca^{2+} (и анион Cl^-)	Стабилизация третичной структуры апофермента
2	Аргиназа	4Mn^{2+}	Связывание субстрата и катализ
3	Аспартаттранскарбамоилаза	6Zn^{2+}	Стабилизация четвертичной структуры апофермента
4	Гексокиназа	Mg^{2+}	Связывание субстрата
5	Карбоксипептидаза А	Zn^{2+}	Катализ
6	Моноаминооксидаза	4Cu^{2+}	Катализ
7	Пируваткарбоксилаза	4Mn^{2+}	Катализ

8	Пируваткиназа	Mg^{2+}, K^+	Связывание субстрата и катализ
9	Фосфатаза (щелочная)	$2Zn^{2+}$	Связывание субстрата и катализ

Если кофермент соединен с апоферментом нековалентными связями, то в этом случае кофермент взаимодействует с ферментом только на время химической реакции и может рассматриваться в качестве второго субстрата ($НАД^+$, $НАДФ^+$).

Один и тот же кофермент, взаимодействуя с различными апоферментами, может участвовать в разных химических превращениях, поскольку именно апофермент обеспечивает специфичность действия всего фермента и отвечает за выбор типа химического превращения субстрата. Примером может служить пиридоксальфосфат, который в зависимости от того, с каким апоферментом взаимодействует, участвует в реакциях трансаминирования или декарбоксилирования аминокислот.

В табл. 4 приведены данные о важнейших коферментах и простетических группах ферментов, а также о витаминах, входящих в состав этих коферментов и характер производимой ими реакции.

Учитывая особенности строения и функционирования, коферменты можно условно разделить на три группы:

1. Соединения с высоким потенциалом переноса химических групп, такие как АТФ и ГТФ, которые участвуют в трансформации энергии в клетках.

2. Соединения, часто являющиеся производными витаминов, которые, находясь в активном центре фермента, взаимодействуют с субстратом и так изменяют его структуру, что его реакционная способность повышается. Большинство коферментов, в том числе кофермент А (КоА), пиридоксальфосфат, тиаминдифосфат и коферментные формы витамина B_{12} , относятся к этой группе.

3. Окислительные коферменты, в состав которых входят особые структуры со строго определенным окислительно-восстановительным потенциалом. Коферменты этой группы выступают в роли переносчиков атомов водорода или электронов, как, например, $НАД^+$, $НАДФ^+$, ФАД и липоевая кислота.

Ферменты, в составе которых имеются кофакторы, не работают при его отсутствии. Причем, каждый из составляющих двухкомпонентного фермента оказываются вовлеченными в процесс катализа и не функционируют друг без друга. Реакции, катализируемые сложными ферментами, за-

висят не только от природы субстрата и кофактора, но и от аминокислотного состава апофермента. Так, например, трансаминазы (ферменты, переносящие аминогруппу с аминокислоты на кетокислоту) и декарбоксилазы аминокислот (катализирующие декарбоксилирование аминокислот) работают с участием одного и того же кофермента – пиридоксальфосфата. Субстратом в обоих случаях может служить одна и та же аминокислота. Следовательно, различный характер реакций связан с разницей в природе соответствующих апоферментов.

4.3.3. Структура и функции некоторых коферментов *Никотинамидадениндинуклеотид (НАД) и никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ)*

Наиболее значимыми окислительно-восстановительными переносчиками для метаболизма клеток и организмов являются такие коферменты, как НАД (никотинамидадениндинуклеотид) и НАДФ (никотинамидадениндинуклеотидфосфат). На рис. 3 представлены структурные формулы НАД и НАДФ.

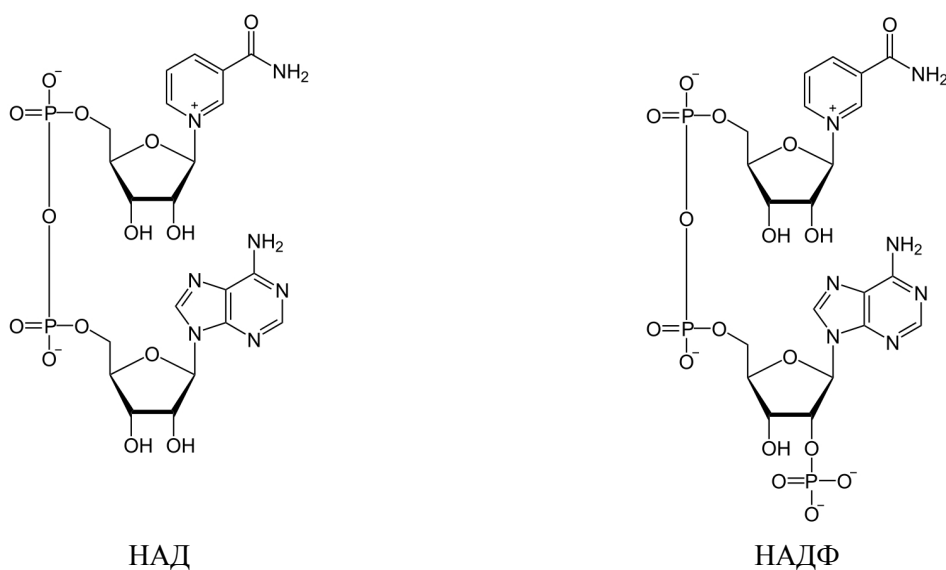


Рис. 3. Структура НАД и НАДФ.

Таблица 4

Химическая природа и функции важнейших коферментов

№ п/п	Кофермент	Участвующий витамин	Группы, подлежащие переносу	Название фермента
1	2	3	4	5
1	Никотинамидадениндинуклеотид (НАД)	Никотинамид, витамин РР	Атомы водорода (электроны)	Лактатдегидрогеназа, малатдегидрогеназа, алкогольдегидрогеназа печени и др.
2	Никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ)	Никотинамид, витамин РР	Атомы водорода (электроны)	Глутаматдегидрогеназа, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, эпимераза УДФ-глюкозы и др.
3	Флавиномононуклеотид, рибофлавинфосфат (ФМН)	Рибофлавин, витамин В ₂	Атомы водорода (электроны)	НАД-Н-дегидрогеназа и др.
4	Флавинадениндинуклеотид (ФАД)	Рибофлавин, витамин В ₂	Атомы водорода (электроны)	Оксидаза D-аминокислот, дигидролипиддегидрогеназа, гликолатоксидаза, сукцинатдегидрогеназа и др.
5	Коэнзим А (КоА)	Пантотеновая кислота	Ацильные, ацетильные и другие группы	Ацил-Ко-синтетаза, трансацетилаза, трансацилаза и др.
6	Тетрагидрофолиевая кислота (ТГФ)	Фолиевая кислота	Метильные, метиленовые, формильные группы или форминогруппы (одноуглеродные остатки).	Карбоксилаза, трансформилаза, трансметилаза, дигидрофолатредуктаза и др.

1	2	3	4	5
7	Биоцитин	Биотин, витамин Н	Двуокись углерода (активная форма CO ₂)	Карбоксилтрансфераза, биотинкарбоксилаза, карбонилфосфатаза, декарбоксилаза аминокислот и др.
8	Тиаминдифосфат (ТДФ)	Тиамин, витамин В ₁	Альдегиды и кетоны	Пируваткарбоксилаза, ацетолактатсинтетаза, глиоксيلاتкарболигаза, транскетолаза, декарбоксилаза α-кетокислот и др.
9	Пиридоксальфосфат (ПФ)	Пиридоксин, витамин В ₆	Карбоксильные группы	Аминотрансферазы, тирозиндекарбоксилаза, триптофаназа, цистеинсинтетаза и др.
10	Дезоксиаденозил- и (метил)-кобаламин (В ₁₂ -коферменты)	Цианкобал-амин, витамин В ₁₂	Реакции изомеризации и перемещения метильных групп	Изомераза, В ₁₂ -аденозилтрансфераза, рибонуклеотидредуктаза, диолдегидратаза и др.
11	Убихинон (коэнзим Q)	Витамин Q (убихинон)	Атомы водорода, протоны и электроны	Менадионредуктаза
12	Липоевая кислота		Окислительное декарбосилирование α-кето-кислот	Дигидролипоилтрансацилилаза, пируватдегидрогеназа и др.
13	Глутатион		Атомы водорода	Малеилпируватизомераза, формальдегиддегидрогеназа и др.
14	Цитохромы: a, b, c, d		Атомы водорода (электроны)	Цитохром-с-оксидаза, цитохром-b ₅ -редуктаза, гидроксилазы и др.

Рабочей частью никотинамидных коферментов служит никотинамид. Оба кофермента функционируют как посредники переноса двух электронов и одного протона от донора к акцептору, другого протона – в среду.

При переходе кофермента из окисленной формы в восстановленную происходит присоединение одного атома водорода и потеря одного положительного заряда. В связи с этим окисленную форму сокращенно обозначают НАД⁺ (или НАДФ⁺), а восстановленную – НАДН (или НАДФН). НАД⁺ восстанавливается многими субстратами в присутствии соответствующих дегидрогеназ. НАДФ⁺ восстанавливается меньшим числом ферментов.

Оба кофермента широко распространены в живой природе. В большинстве клеток (за исключением клеток листьев растений) НАД присутствует в значительно больших количествах, чем НАДФ.

Флавины и флавопротеиды

В настоящее время насчитывается около 80 флавопротеидных ферментов. Некоторые из них содержат в качестве простетической группы рибофлавин-5'-фосфат (флавинмононуклеотид, ФМН), но у большинства ферментов эту функцию выполняет флавинадениндинуклеотид (ФАД) (рис. 4).

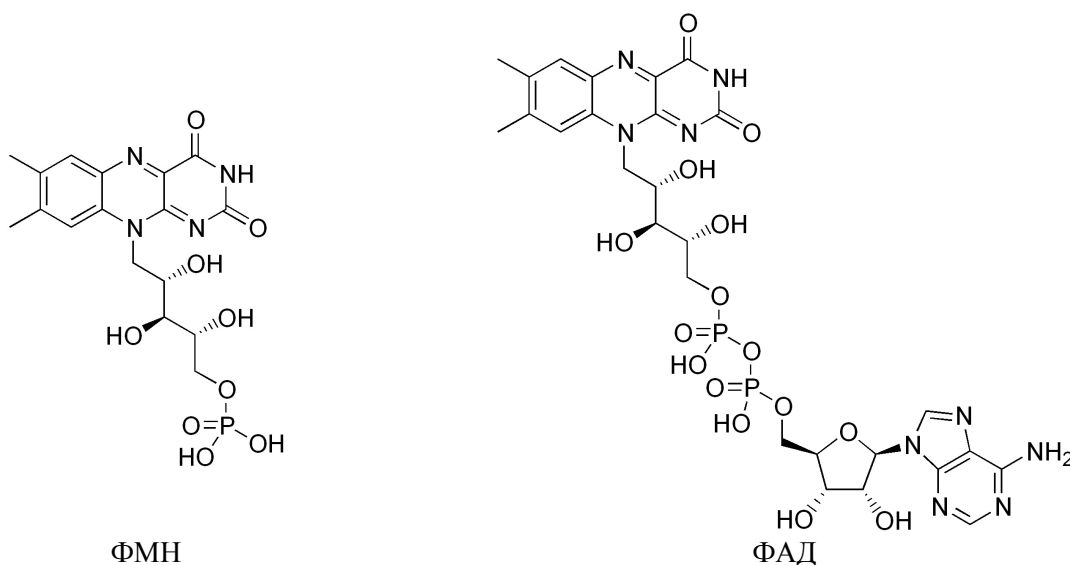


Рис. 4. Структура ФМН и ФАД

Рабочей частью ФАД и ФМН служит изоаллоксазиновая сопряженная циклическая система.

Флавины связываются с рядом разных специфических апоферментов с образованием флавопротеидных ферментов. При этом обычно с каждой субъединицей фермента связывается одна молекула флавина. Катализ

окислительно-восстановительных реакций флавопротеидами обусловлен последовательным окислением и восстановлением их флавиновых групп. Однако ФАД отличается от НАД тем, что завершает свой окислительно-восстановительный цикл, будучи связан с одним и тем же ферментным белком, в то время как НАД восстанавливается на одном ферменте, а окисляется на другом. ФАД является внутриферментным окислительно-восстановительным переносчиком, а НАД – межферментным.

Цитохромы

В настоящее время к цитохромам относят все внутриклеточные гемопротеиды, за исключением гемоглобина, миоглобина, каталазы и пероксидазы. В эту группу входят вещества, несущие различные биологические функции. Они функционируют путем последовательного окисления и восстановления. Известно около 30 различных цитохромов. Выделяют 4 группы цитохромов: *a*, *b*, *c* и *d*. Внутри каждой группы отдельные виды с уникальными спектральными свойствами обозначают цифровыми индексами (*b*, *b*₁, *b*₂ и т.д.).

На рис. 5 представлена структура гема различных цитохромов.

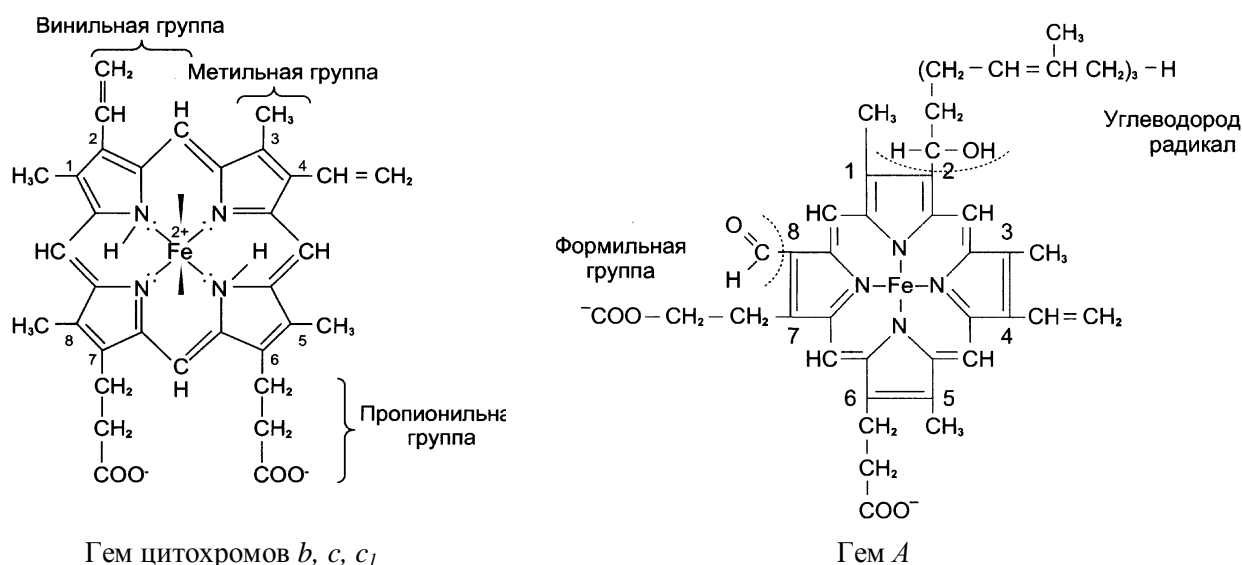


Рис. 5. Структура гема цитохромов *b*, *c*, *c*₁ и *A*.

Структурные особенности разных видов цитохромов определяют различие в их окислительно-восстановительных потенциалах.

В цепи переноса электронов в митохондриях (от НАДН к O₂) участвуют 5 типов цитохромов (*a*, *a*₃, *b*, *c*, *c*₁). В микросомах имеются два других гемопротеида – цитохромы *b*₅ и P-450. Цитохром P-450 отвечает за потребление определенной части кислорода микросомами животных тканей. Этот

вид цитохрома осуществляет катализ процесса гидроксилирования стероидов, лекарственных веществ, ароматических соединений и жирных кислот.

Переносчики фосфатов

Аденозиндифосфорная кислота (АДФ)

Наиболее универсальным переносчиком фосфата, конечно, является АДФ (рис. 6), которая, принимая фосфатную группу, переходит в АТФ, а затем АТФ передает эту группу на соответствующий акцептор.

К настоящему времени известно 132 фермента, участвующих в переносе незамещенной фосфатной группы, из которых 114 специфичны к АДФ. Их называют киназами.

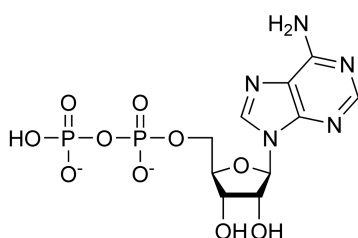


Рис. 6. Структура АДФ.

При превращении АДФ в АТФ образуется пиродифосфатная связь, которая характеризуется более высокой энергией гидролиза, чем, например, обычная связь сахар-фосфат и поэтому ее принято называть «богатой энергией связью» (макроэргическая связь).

Переносчики аминокислот

Пиридоксальфосфат

Пиридоксальфосфат (рис. 7) служит простетической группой большого числа ферментов, катализирующих несколько типов реакций с участием аминокислот (за исключением реакций образования или гидролиза пептидных связей).

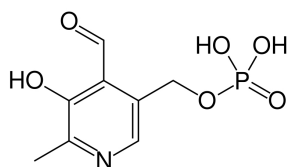


Рис. 7. Структура пиридоксальфосфата.

В большом количестве реакций переаминирования пиридоксальфосфат выступает как переносчик аминокислот.

Переносчики ацильных групп

В настоящее время изучение промежуточного обмена жиров привлекло внимание к важности процесса переноса ацильных групп, особенно с участием переносчиков, содержащих тиоловой группы, с которыми ацильные группы образуют тиоловые эфиры. Эти богатые энергией соединения наряду с богатыми энергией фосфатными соединениями выполняют важную функцию переноса энергии в биологических системах.

Кофермент А

Этот важный кофермент был впервые открыт как кофермент ацетилирования в печени и у микроорганизмов Липманом в 1947 г. Ферментативный путь биосинтеза кофермента А выяснен полностью. Кофермент А представляет собой 3'-фосфо-АДФ-пантоил-β-аланилцистеамин (рис. 8).

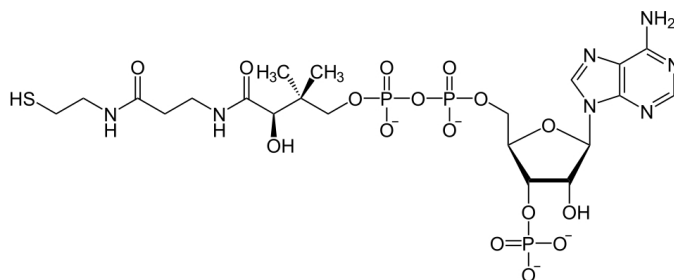


Рис. 8. Структура кофермента А

Ацильные группы могут присоединяться к тиоловой группе кофермента А либо в результате переноса от другой молекулы, либо в результате синтетазной реакции. Кофермент А участвует в реакциях, в которых переносимая на него ацильная группа удаляется из субстрата в результате реакции лиазного типа (в продукте образуется двойная связь).

5. Классификация ферментов

В 1961 г. Международным биохимическим союзом была принята классификация ферментов. Ферменты отличаются типом катализируемой ими химической реакции. Именно эта особенность лежит в основе деления ферментов на 6 классов. Название ферментов складывается из названия субстрата и слова, определяющего тип реакции, имеющего окончание *-аза* (аминотрансфераза и пр.). Также применяются и тривиальные названия (пепсин, трипсин и пр.). Каждый фермент имеет шифр, включающий 4 числа, обозначающих класс, подкласс, подподкласс и порядковый номер. Например: КФ 2.7.1.1 означает, что фермент относится к классу 2 (транс-

фераза), подклассу 7 (перенос фосфата) и подподклассу 1 (акцептором фосфата является спирт). Последняя цифра обозначает фермент гексокиназу, или АТФ: D-гексозо-б-фосфотрансферазу, т.е. фермент, катализирующий перенос фосфата с АТФ на гидроксильную группу атома углерода в шестом положении глюкозы.

Классы ферментов:

1 класс. Оксидоредуктазы (катализируют окислительно-восстановительные реакции с участием двух субстратов. Например: алкогольдегидрогеназа, глутаматдегидрогеназа и пр.).

2 класс. Трансферазы (катализируют перенос функциональных групп от одного соединения к другому. Например: аминотрансферазы, гексокиназа и пр.).

3 класс. Гидролазы (катализируют гидролитическое расщепление ковалентных связей. Например: β -галактозидаза, химотрипсин и пр.).

4 класс. Лиазы (катализируют отщепление группировок от субстрата по негидролитическому механизму с образованием двойных связей или присоединение воды по месту разрыва двойной связи. Например: фумараза, альдолаза и пр.).

5 класс. Изомеразы (катализируют взаимопревращения оптических, геометрических и позиционных изомеров. Например: ретинальизомераза, триозофосфатизомераза).

6 класс. Лигазы (катализируют соединение двух молекул, сопряженное с разрывом пирофосфатной связи АТФ или подобного соединения. Например: глутаминсинтетаза, АТФ-синтаза и пр.).

6. Регуляция активности ферментов

Ферментативную активность можно регулировать, изменяя следующие параметры: 1) абсолютное количество присутствующего фермента; 2) пул реагентов (помимо фермента); 3) каталитическую эффективность фермента. Большинство форм жизни использует все три типа регуляции.

Ферменты можно разделить на 3 группы в зависимости от их количества в клетке: 1) конститутивные (количество таких ферментов практически постоянно, поскольку они обеспечивают протекание наиболее важных для клетки процессов; 2) ферменты, содержащиеся в клетке в очень небольших концентрациях, но при необходимости их количество возрастает в сотни раз под действием каких-либо лигандов (индукторов); 3) индуцибельные (появляются в клетке только в присутствии индуктора).

Каталитическая активность некоторых регуляторных ферментов может модулироваться низкомолекулярными аллостерическими эффекторами, обычно имеющими либо незначительное структурное сходство с субстратами или с коферментами регулируемого ими фермента, либо не имеющими его вообще. Ингибирование фермента, катализирующего одну из реакций в цепи, конечным продуктом этой цепи называют **ингибированием по принципу обратной связи**.

Ингибирование по принципу обратной связи может быть конкурентным, неконкурентным, частично конкурентным и смешанным. Ингибирование по принципу обратной связи характерно для биосинтетических путей.

Обратимое изменение каталитической активности ферментов может осуществляться путем ковалентного присоединения фосфатной группы (преобладает у млекопитающих) или нуклеотида (преобладает у бактерий). Ферменты, подверженные ковалентной модификации, которая сопровождается изменением их активности, называют **обратимо модифицируемыми ферментами**.

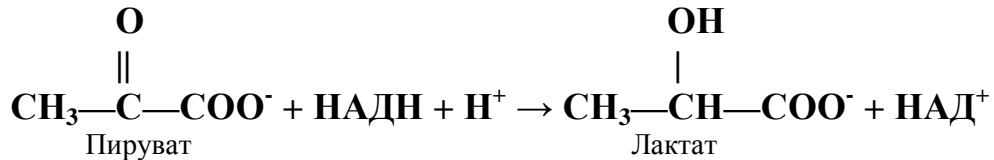
Обратимо модифицируемые ферменты могут находиться в двух состояниях, одно из которых характеризуется высокой, а другое — низкой каталитической эффективностью. В зависимости от конкретного случая более активным катализатором может быть либо фосфо-, либо дефосфофермент.

Кроме фосфорилирования, активность ферментов может регулироваться также такими посттрансляционными ковалентными модификациями, как аденилированием, уридилированием, ацетилированием, метилированием и ограниченным протеолизом.

Задачи

1. Фермент уреазы повышает скорость гидролиза мочевины при pH 8,0 и 20°C в 10^{14} раз. Если данное количество уреазы может полностью гидролизовать данное количество мочевины за 5 мин при pH 8,0 и 20°C, сколько времени потребовалось бы для полного гидролиза мочевины в тех же условиях без уреазы? Предполагается, что обе реакции проходят в стерильных условиях без жоступа бактерий.

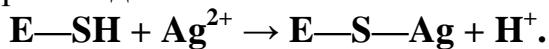
2. Мышечный фермент лактатдегидрогеназа катализирует реакцию:



В отличие от НАД⁺ раствор НАДН поглощает свет при 340 нм (ближняя ультрафиолетовая область спектра). Это свойство используется для определения концентрации НАДН в растворе путем измерения поглощения раствора при 340 нм с помощью спектрофотометра. Объясните, как эти свойства НАДН можно использовать для количественного определения лактатдегидрогеназы.

3. При нагревании раствора фермента со временем он постепенно утрачивает каталитическую активность. Это обусловлено разворачиванием молекулы нативного фермента, которая по мере возрастания ее тепловой энергии принимает конформацию беспорядочного клубка. При инкубации раствора гексокиназы в течение 12 мин при 45°C фермент теряет 50 % активности, но если гексокиназа инкубируется при 45°C в присутствии очень большой концентрации одного из ее субстратов – глюкозы, то она утрачивает только 3 % активности. Объясните, почему тепловая денатурация гексокиназы замедляется в присутствии одного из ее субстратов.

4. Многие ферменты необратимо ингибируются ионами тяжелых металлов, такими как Mg²⁺, Cu²⁺, Ag²⁺, которые могут взаимодействовать с важными для активности фермента сульфгидрильными группами с образованием меркаптидов:



Сродство ионов Ag²⁺ к сульфгидрильным группам столь велико, что эти ионы можно использовать для количественного титрования —SH-групп. К 10 мл раствора, содержащего 1 мг/мл чистого фермента, добавили такое количество AgNO₃, которое достаточно для полной инактивации фермента. Для этого потребовалось 0,342 мкмоль AgNO₃. Рассчитайте минимальную молекулярную массу фермента. Почему значение молекулярной массы, полученное таким путем, будет минимальным?

5. Протеолитические ферменты различаются по уровню субстратной специфичности. Например, **трипсин** расщепляет связь, образованную карбоксильной группой лизина или аргинина и аминокислоты; **тромбин** – связь, образованную карбоксильной группой аргинина и

аминогруппой глицина; субтилизин – любую пептидную связь. Расположите ферменты в порядке возрастания субстратной специфичности.

6. Какие технологические процессы необходимо провести, чтобы собранные в молочной спелости початки кукурузы сохранили сладкий вкус? Обоснуйте свой ответ.

7. Назовите ферменты согласно типу реакции, которую они катализируют, если они осуществляют гидролиз: а). дипептида; б). лактозы; в). сахарозы; г) амилозы.

8. Неактивная форма пепсина имеет М.М. 42 000 Да. После добавления к раствору белка соляной кислоты масса белка уменьшилась до 25 000 Да фермент активировался. Каков механизм активации?

9. Проведено определение скорости окисления рибофлавина НАД-зависимым ферментом по уменьшению оптической плотности (ОП) при $\lambda 340$ нм в течение 30 мин. Изменения ОП составили:

Время, минуты	Оптическая плотность, ед.
1	0,347
5	0,327
9	0,302
23	0,254
27	0,239
30	0,229

Определите V_{max} ; K_m , если молярный коэффициент экстинкции равен $6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Используйте график двойных обратных координат.

10. Рассчитайте удельную скорость фермента, если 5 мг фермента осуществляют превращение 100 мкМ субстрата за 5 сек. Выразите в млМ / мин \times мг белка.

11. В мембранах гепатоцитов есть транспортный белок, переносящий глюкозу, имеющий $K_m = 12$ млМ/л. Он непосредственно связан с глюкокиназой, обладающей сходным сродством к глюкозе. При каких условиях транспорт глюкозы в гепатоциты будет эффективным?

12. Рассчитайте удельную активность фермента гистидазы, если за 5 минут 10 мкг фермента осуществляют превращение 20 мкМ гистидина в гистидиновую кислоту. Выразите активность в млМ/мин на г фермента.

Библиографический список

1. Биохимические основы жизнедеятельности человека: учеб. пособие для студентов/ Ю.Б. Филиппович, А.С. Коницев, Г.А. Севастьянова, Н.М. Кутузова. М.: Гуманит. изд. центр ВЛАДОС, 2005. 407с.
2. Биохимия: учебник / под ред. Е.С. Северина. М.:ГЭОТАР-МЕД, 2004. 784 с.
3. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М.:Мир, 1982 г. 1120 с.
4. Кленова Н.А. Биохимия патологических состояний. Самара: изд-во «Самарский университет, 2006. 216 с.
5. Клиническая биохимия: учебное пособие / под ред. В.А.Ткачука-3-е изд., исп. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 264 с.
6. Ковалева Т.А., Макарова Е.Л., Гладнева А.В. Влияние синтетических и природных ингибиторов на физико-химические свойства глюкоамилазы. Сорбционные и хроматографические процессы. 2009. Т. 9. № 4. С. 537-544.
7. Комов В.П., Шведова В.Н. Биохимия. М.:Дрофа, 2008. 638 с.
8. Костецкий П.В. Местоположение и объем активного центра хитотрипсина. Биохимия. 2007. Т. 72. № 4. С. 486-492.
9. Ленинджер А. Основы биохимии: В 3-х т. М.:Мир, 1985. 1121 с.
10. Маркосян К.А. Фолдинг, неправильный фолдинг и агрегация белков. Образование телец включения и агрегасом // Биохимия, 2004, Т.69. Вып. 9. С.1196-1212.
11. Мясоедова К.Н. Новое в изучении цитохромов P450. Биохимия. 2008. Т. 73. № 9. С. 1199-1205.
12. Рязанцева Л.Т. Ферменты-антиоксиданты: структурно-функциональные свойства и роль в регулировании метаболических процессов. Вестник Воронежского государственного технического университета. 2011. Т.7. №2. С.126-129.
13. Фролов Ю.П., Серых М.М., Макурина О.Н., Кленова Н.А., Подковкин В.Г. Биохимия и молекулярная биология. Самара: изд-во «Самарский университет», 2004. 501 с.
14. Хелдт Г.-В. Биохимия растений. М.:БИНОМ, 2011. – 471 с.
15. Чухрай Е.С., Атякшева Л.Ф. Физико-химический взгляд на активность, стабильность и адсорбционные свойства ферментов. Журнал физической химии. 2010. Т.84. №5. С.805-818.
16. Bajzer Željko, Strehler Emanuel E. About and beyond the Henri-Michaelis–Menten rate equation for single-substrate Enzyme kinetics. Bio-

chemical and Biophysical Research Communications, Volume 417, Issue 3, 20 January 2012, Pages 982-985.

17. Fange David, Lovmar Martin, Pavlov Michael Y., Ehrenberg Måns. Identification of Enzyme inhibitory mechanisms from steady-state kinetics. *Biochimie*, Volume 93, Issue 9, September 2011, Pages 1623-1629.

18. Ferrer J.-L., Austin M.B., Stewart Jr. C., Noel J.P.. Structure and function of Enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiology and Biochemistry*, Volume 46, Issue 3, March 2008, Pages 356-370.

19. Fyfe Paul K., Alphey Magnus S., Hunter William N.. Structure of *Trypanosoma brucei* glutathione synthetase: Domain and loop alterations in the catalytic cycle of a highly conserved Enzyme. *Molecular and Biochemical Parasitology*, Volume 170, Issue 2, April 2010, Pages 93-99.

20. Gajiwala Ketan S., Margosiak Stephen, Lu Jia, Cortez Joseph, Su Ying, Zhe Nie, Appelt Krzysztof. Crystal Structures of bacterial FabH suggest a molecular basis for the substrate specificity of the Enzyme. *FEBS Letters*, Volume 583, Issue 17, 3 September 2009, Pages 2939-2946.

21. Griffin Michael D.W., Dobson Renwick C.J., Pearce F. Grant, Antonio Laurence, Whitten Andrew E., Liew Chu K., Mackay Joel P., Trehwella Jill, Jameson Geoffrey B., Perugini Matthew A., Gerrard Juliet A.. Evolution of Quaternary Structure in a Homotetrameric Enzyme. *Journal of Molecular Biology*, Volume 380, Issue 4, 18 July 2008, Pages 691-703.

22. Huang Qiang, Zheng Maofa, Yang Shuangshuang, Kuang Chunxiang, Yu Cunjing, Yang Qing. Structure–activity relationship and Enzyme kinetic studies on 4-aryl-1H-1,2,3-triazoles as indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, Volume 46, Issue 11, November 2011, Pages 5680-5687.

23. Qian Haifeng, Chen Wei, Sheng G. Daniel, Xu Xiaoyan, Liu Weiping, Fu Zhengwei. Effects of glufosinate on antioxidant Enzyme, subcellular Structure, and gene expression in the unicellular green alga *Chlorella vulgaris*. *Aquatic Toxicology*, Volume 88, Issue 4, 30 July 2008, Pages 301-307.

24. Singh Sheo B., Ondeyka John G., Herath Kithsiri B., Zhang Chaowei, Jayasuriya Hiranthi, Zink Deborah L., Parthasarathy Gopalakrishnan, Becker Joseph W., Wang Jun, Soisson Stephen M.. Isolation, Enzyme-bound Structure and antibacterial activity of platencin A₁ from *Streptomyces platensis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Volume 19, Issue 16, 15 August 2009, Pages 4756-4759.

25. Zhao Yulan, Xu Chuanlian. Structure and Function of Angiotensin Converting Enzyme and Its Inhibitors. *Chinese Journal of Biotechnology*, Volume 24, Issue 2, February 2008, Pages 171-176.

Учебное издание

**Кленова Наталья Анатольевна,
Макурина Ольга Николаевна**

ХИМИЯ БЕЛКА И ФЕРМЕНТОВ

Часть II

Ферменты

Учебное пособие

Публикуется в авторской редакции
Титульное редактирование *Т.И. Кузнецовой*
Компьютерная верстка, макет *Н. П. Бариновой*

Подписано в печать 09.11.15. Формат 60x84/16. Бумага офсетная. Печать оперативная.
Усл.-печ. л. 1,86; уч.-изд. л. 2,0. Гарнитура Times. Тираж 100 экз. Заказ № 2696.
Издательство «Самарский университет», 443011, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.
Тел. 8 (846) 334-54-23.
Отпечатано на УОП СамГУ.