

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ КАТАЛИЗ

Учебное пособие для вузов

Составители:
Т.Н. Попова,
Т.И. Рахманова,
А.А. Агарков

Издательский дом ВГУ
2014

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
1. МЕТОДИКА РАБОТЫ С ФЕРМЕНТАМИ	6
1.1. Измерение скорости ферментативных реакций	7
1.2. Типы методов, используемых при изучении ферментативных реакций.....	8
1.3. Общие правила работы с ферментами.....	9
1.4. Методы количественного изучения ферментативных реакций.....	11
1.4.1. Спектрофотометрические методы	11
1.4.2. Флуоресцентные методы	12
1.4.3. Манометрические методы	12
1.4.4. Электродные методы.....	12
1.4.5. Поляриметрические методы	13
1.4.6. Методы с отбором проб	13
1.5. Выделение ферментов	14
1.5.1. Методы фракционирования.....	15
1.5.1.1. Фракционное осаждение при изменении pH	16
1.5.1.2. Фракционная денатурация нагреванием	16
1.5.1.3. Фракционное осаждение органическими растворителями	16
1.5.1.4. Фракционирование солями.....	17
1.5.1.5. Фракционная адсорбция	17
1.5.2. Колоночная хроматография.....	18
1.5.3. Электрофорез	20
1.5.4. Кристаллизация.....	23
1.5.5. Концентрирование	23
1.6. Критерии чистоты ферментных препаратов.....	24
2. ФЕРМЕНТЫ КАК БИОЛОГИЧЕСКИЕ КАТАЛИЗАТОРЫ	26
2.1. Общая характеристика ферментов.....	26
2.2. Специфичность ферментов	30
2.3. Каталитическая эффективность	35
2.4. Лабильность ферментов	36
2.5. Способность ферментов к регуляции	36
2.6. Порядок ферментативных реакций.....	36
3. КОФАКТОРЫ ФЕРМЕНТОВ	38
3.1. Ионы металлов как кофакторы.....	38
3.1.1. Роль металлов в присоединении субстрата в активном центре фермента.....	38
3.1.2. Роль металлов в стабилизации третичной и четвертичной структуры фермента.....	40

ВВЕДЕНИЕ

Катализ – явление изменения скорости химической реакции в присутствии веществ, состояние и количество которых после реакции остаются неизменными. Различают положительный и отрицательный катализ (соответственно увеличение и уменьшение скорости реакции), хотя часто под термином «катализ» подразумевают только положительный катализ; отрицательный катализ называют ингибированием.

Вещество, входящее в структуру активированного комплекса, но стехиометрически не являющееся реагентом, называется катализатором.

Ферментативный катализ – каталитические реакции, протекающие с участием ферментов (биологических катализаторов).

Ферменты (энзимы) – это, как правило, высокоспецифичные белки, выполняющие функции биологических катализаторов. В научной литературе на русском языке утвердились оба термина – «ферменты» и «энзимы», но предпочтение отдают термину «фермент», хотя наука о ферментах называется энзимологией. Слово «фермент» происходит от лат. *fermentum* – закваска, а «энзим» – от греч. *en* – в, внутри и *zyme* – дрожжи. Данная терминология возникла исторически при изучении ферментативных процессов спиртового брожения.

В роли биокатализаторов могут выступать и небелковые соединения. Например, некоторые типы РНК вызывают гидролиз фосфодиэфирных связей нуклеиновых кислот. Такие молекулы РНК с каталитической активностью называют рибозимами, однако их значение в химическом превращении соединений намного меньше, чем ферментов.

В данном учебном пособии приводятся основные методики работы с ферментами, дается характеристика ферментов как биологических катализаторов, а также их кофакторов. Основное внимание уделяется механизмам действия ферментов, кинетике протекания ферментативных реакций, влиянию ингибиторов и активаторов на скорость ферментативных реакций. Кроме этого, представлен материал относительно биосинтеза ферментов и их деградации, дается характеристика мультиферментным комплексам, рибозимам и каталитическим антителам (абзимам).

1. МЕТОДИКА РАБОТЫ С ФЕРМЕНТАМИ

Характерным свойством ферментов является их способность катализировать определенные химические реакции. За исключением небольшого числа ферментов, которые могут быть обнаружены непосредственно при помощи спектрального анализа или наблюдений другого рода, присутствие ферментов обнаруживается по протеканию катализируемых ими специфических реакций, количество же присутствующего фермента определяется по скорости реакции. Поэтому измерение скорости реакции составляет наиболее существенную часть в методике исследования ферментов.

1.1. Измерение скорости ферментативных реакций

Кривые хода большинства ферментативных реакций имеют общую форму, показанную на рис. 1.1. На приведенном графике видно, что скорость реакции уменьшается со временем. Это уменьшение скорости может объясняться различными причинами. Например, продукты реакции могут угнетать фермент; степень насыщения фермента субстратом может уменьшаться в результате падения концентрации субстрата по мере осуществления реакции; при увеличении концентрации продуктов реакции более существенной может становиться обратная реакция и др. Вследствие этого при изучении ферментативных реакций используют измерение начальной скорости реакции.

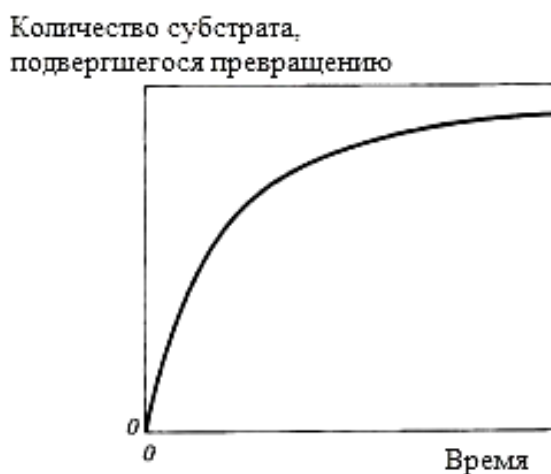


Рис. 1.1. Типичная кривая хода ферментативной реакции

В начальный период упомянутые выше различные факторы еще не успевают проявить своего действия и условия протекания реакции поддаются точному определению. Поэтому при работе с ферментами принято проследживать изменение начальной скорости реакции под влиянием изменений только одного из факторов, определяющих скорость реакции, при сохранении всех остальных факторов постоянными.

Для отыскания начальной скорости достаточно построить только начальный участок кривой хода реакции и определить тангенс угла наклона в начальной точке. До тех пор, пока степень превращения не превысит 20 % максимально возможной, графики обычно представляют собой практически прямые линии.

Количество субстрата, прореагировавшего за определенный отрезок времени от начала реакции, может рассматриваться как показатель скорости реакции только до тех пор, пока не перейден этот предел.

Не в каждом случае получают кривую, подобную приведенной на рис. 1.1. Иногда ряд факторов вызывает не уменьшение, а увеличение ско-

рости в течение первой фазы реакции. В этом случае кривая имеет S-образную, или аутокаталитическую, форму с максимумом скорости в одной из промежуточных точек.

В таких ситуациях, по-видимому, общего правила, как охарактеризовать активность фермента, нет – в каждом случае следует поступать с учетом особенностей системы.

Лучшим путем является установление причины ускорения (это часто удается сделать, проведя несколько предварительных экспериментов); затем модифицируют процедуру определения так, чтобы устранить действие обнаруженной причины, и обычным путем определяют начальную скорость. Например, оксидаза *D*-аминокислот (КФ 1.4.3.3) функционирует при участии флавинового кофермента, который относительно медленно связывается с ферментом; в результате количество «активного фермента» в течение некоторого периода времени после смешивания реагентов возрастает и наблюдается ускорение реакции. Это осложнение можно устранить, если вначале проинкубировать фермент с коферментом и запускать реакцию добавлением субстрата. В другом случае в концентрированном исходном растворе фермент находится в частично активной агрегированной форме; при разведении инкубационной смесью происходит его диссоциация (не мгновенная) в полностью активную форму. В этом варианте к инкубационной смеси сначала следует добавить фермент, а затем субстрат. Далее в исходном растворе фермент может обратимо комплексоваться с примесным металлом-ингибитором; при разведении же комплекс диссоциирует. В данном случае следует поступать так же, как в предыдущем.

1.2. Типы методов, используемых при изучении ферментативных реакций

Различают два типа методов изучения ферментативных реакций: методы, связанные с отбором проб, и непрерывные методы. В первом случае за самой реакционной смесью не следят, а через определенные промежутки времени отбирают пробы и в результате измерений получают ряд отдельных точек, по которым строят кривые хода реакции. Во втором наблюдения проводят (по ходу реакции) над самой реакционной смесью: при этом с помощью большого числа измерений или автоматической регистрации удается получать непрерывные кривые хода реакции.

При работе по методу отбора проб измеряют обычно концентрацию либо субстрата, либо продукта реакции. Если реакция проста, то для измерения ферментативной активности можно использовать оба этих пути; однако при двухстадийной реакции, в ходе которой может накапливаться промежуточный продукт, результаты, полученные этими двумя различными