

ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

Ֆարմացիայի ինստիտուտ

Ֆարմաքինիայի և ֆարմակոգնոզիայի ամբիոն

ՊԵՊՏԻԴՆԵՐ, ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐ

Լաբորատոր աշխատանքների ձեռնարկ

«Բնական միացությունների քիմիա» առարկայից

ԵՐԵՎԱՆ

ԵՊՀ ՀՐԱՏԱՐԱԿԶՈՒԹՅՈՒՆ

2018

*Հրապարակության է երաշխավորել
ԵՊՀ Ֆարմացիայի ինստիտուտի
գիրական խորհուրդը*

Կազմեցին՝

ասիստ. Ա. Ֆ. Մկրտչյան,

ասիստ. Հ. Մ. Սիմոնյան

Պեպտիդներ, ֆերմենտներ: Լաբորատոր աշխատանքների ձեռնարկ
«Բնական միացությունների քիմիա» առարկայից/Կազմողներ՝
ասիստ. Ա. Ֆ. Մկրտչյան, ասիստ. Հ. Մ. Սիմոնյան: -Եր., ԵՊՀ
հրատ., 2018, 36 էջ:

Ձեռնարկում մանրամասն քննարկվում է պեպտիդների ստացման եղանակա-
ների փորձնական մասը, ինչպես նաև ֆերմենտների հատկությունների հիմնահար-
ցերը: Այս ձեռնարկը նախատեսված է ԵՊՀ Ֆարմացիայի ինստիտուտի, ինչպես
նաև հանրապետության այլ բուհերի քիմիայի, կենսաքիմիայի և դեղագործական
քիմիայի բաժինների ուսանողների համար: Ձեռնարկը նախատեսված է բակալավ-
րիատի կուրսերի դասընթացների իրականացման համար:

© ԵՊՀ հրատ., 2018

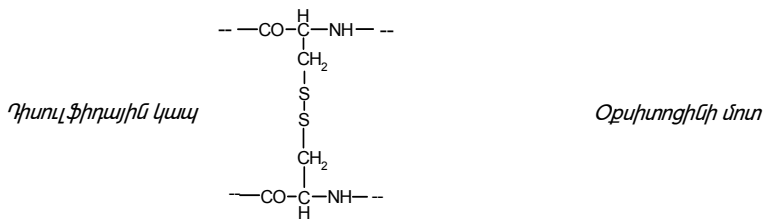
© Կազմողի համար, 2018

ԳԼՈՒԽ 1.

Պեսպալիդներ

Պեպտիդներն ամինաաթվային մնացորդներից կազմված միա-
ցություններ են, որտեղ ամինաթթուները իրար հետ կապված են կո-
վալենտային α -պեպտիդային (-NH-CO-) կապերով: Բարդ պեպտիդ-
ների կառուցվածքի ձևավորման գործընթացում կարևոր դեր են խա-
ղում մասնակցող սպիտակուսային (-S-S-) կապերը: Դրանց հետ միասին որոշ
ցածրմոլեկուլային պեպտիդներում հայտնաբերված են մասնակցող
պեպտիդային, N- ω -պեպտիդային, էսթերային, քիտեթերային և այլ կա-
պեր: Բնության մեջ հայտնի սպիտակուցների կառուցվածքում պեպ-
տիդային կապի առավել տարածված տեսակը α -պեպտիդային
կապն է:

α -պեպտիդային կապ $\text{H}_2\text{N}-\text{CHR}-\text{CO}-[\text{NHCHRCO}]_n-\text{NH}-\text{CHR}-\text{COOH}$ *քոլոր սպիտակուցների*
 $n=1,2,3$ և այլն *մոտ*


$$\begin{array}{c} \gamma\text{-պեպտիդային կապ} \\ \text{---NH---}\underset{\text{H}}{\overset{\text{CH}_2\text{---CH}_2\text{---CO---NH---CHR---CO---}}{\text{C}}\text{---CO---}} \end{array} \quad \text{գլուտամինի մոտ}$$

Էթերային կապ

$$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{--NH--CHR--C--O--CH--CH}_3 \\ | \\ \text{--NH--C--CO--} \\ | \\ \text{H} \end{array}$$

Ակտինոնիցինի մոտ

$$\text{N}^{60}\text{-պեպտիդային կապ} \quad \text{--NH--CHR--CO--NH--(CH}_2\text{)}_4\text{--CH} \begin{array}{l} \text{CO--} \\ \text{NH--} \end{array} \quad \text{Բացիտրացինի մոտ}$$

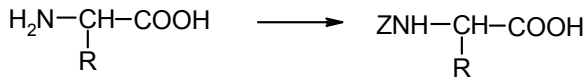
Պեպատիվները ստացվում են ինչպես քիմիական և էնզիմատիկ սինթեզի եղանակներով, այնպես էլ անջատվում են սպիտակուցների

մասնակի հիդրոլիզի արգասիքներից: Սակայն նույնիսկ սպիտակուցային հիդրոլիզատից պեպտիդի անջատման դեպքում վերջինիս կառուցվածքի վերջնական հաստատման համար պահանջվում է նրա սինթետիկ մոդելի առկայությունը՝ համեմատության համար:

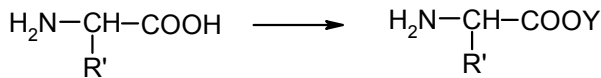
1.1. Պեպտիդային սինթեզ

Պեպտիդների սինթեզի մեթոդները (պեպտիդային շղթայում ամինաթթուների միացման մեթոդները) բազմազան են, և կախված խնդրի դրվածքից՝ կարելի է օգտագործել մի շարք մեթոդների համակցում՝ նպատակ ունենալով սինթեզել ամինաթթվային խիստ որոշակի հաջորդականությամբ պեպտիդային շղթա: Ընդհանուր առմամբ պեպտիդային սինթեզի սխեման կազմված է հետևյալ էտապներից.

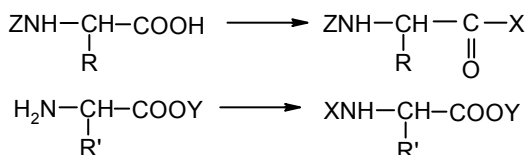
1. Կարբօքսիլային բաղադրիչի ստացում տվյալ ամինաթթվի կամ պեպտիդի ամինո խմբի պաշտպանմամբ (պաշտպանող խումբը նշանակվում է Z տառով):



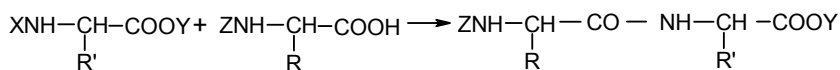
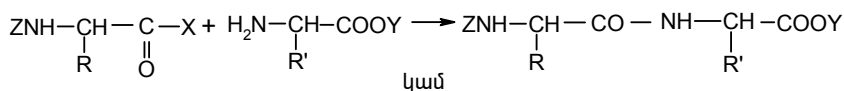
2. Ամինաբաղադրիչի ստացում հաջորդ ամինաթթվի կամ պեպտիդի կարբօքսիլ խմբի պաշտպանմամբ (պաշտպանող խումբը նշանակվում է Y տառով):



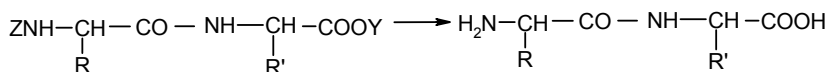
3. Ամինաբաղադրիչի ամինո խմբի կամ կարբօքսիլային բաղադրիչի կարբօքսիլ խմբի ակտիվացում (ակտիվացնող խմբերը նշանակվում են X տառով):



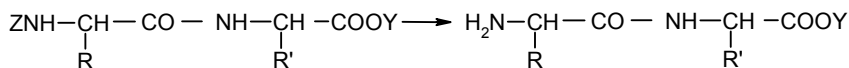
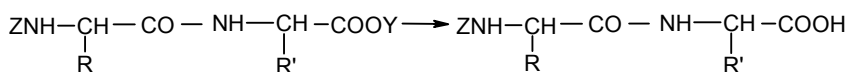
4. Կոնդենսում կամ պեպտիդային կապի առաջացում:



5. Պաշտպանող խմբերի հեռացում, որը կատարվում է սինթեզի ավարտելուց հետո:



Եթե նախատեսվում է պեպտիդային շղթայի հետագա երկարացում, ապա հեռացվում է միայն մեկ պաշտպանող խումբ:



Այդ դեպքում առաջանում է նոր ամինո- կամ կարբօքսիլային բաղադրիչ, և բոլոր հետագա գործընթացները շարունակվում են:

Փորձ 1. N-t-BOC-գլիցինի սինթեզը

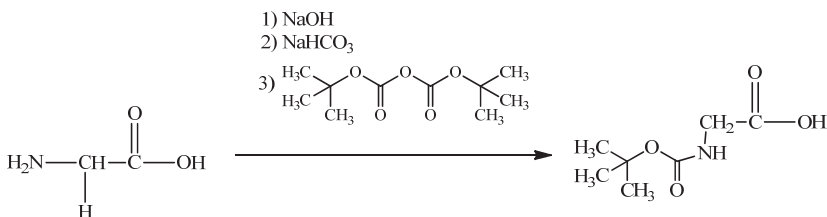
Ռեակտիվներ և սարքավորումներ՝ գլիցին, մատրիումի հիդրօքսիդ, մատրիումի հիդրոկարբոնատ, դի-, տրեա-, բուքիլպիրոկարբոնատ, իզոպրոպանոլ, հեքսան, կիտրոնաթթու, էթիլացետատ, մատրիումի սուլֆատ, մագնիսական տաքացնող խառնիչ, բաժանիչ ձագար, վակումային թորման սարք:

Փորձի ընթացքը

0,5 գ (6,6 մմոլ) գլիցինը լուծել 10 մլ նատրիումի հիդրօքսիդի 0,5M ջրային լուծույթում, որին ավելացնել 0,3465 գ (4,1 մմոլ) նատրիումի հիդրոկարբոնատ լուծված

5 մլ ջրում, այնուհետև ավելացնել 1,87գ(8,6 մմոլ) դի-տրետ-բութիլպիրոկարբոնատ լուծված 6,6 մլ իզոպրոպանալում: Խառնուրդը 2 ժամ խառնել սենյակային ջերմաստիճանում, նոսրացնել մինչև 50 մլ և ռեագենտի ավելցուկը էքստրակտել հեքսանում (2 անգամ 20 մլ-ով): Ջրային լուծույթին ավելացնել 6 մլ 10%-անոց կիտրոնաթթվի լուծույթ և նորից էքստրակտել էթիլացետատով (2 անգամ 20 մլ-ով), էքստրակտները միացնել, ջրազրկել անջուր նատրիումի սուլֆատով: Դեկանտելուց հետո օրգանական լուծիչները գոլորշիացնել վակուումի պայմաններում մինչև 50°C ջերմաստիճանում: Նպատակային արգասիքը վերաբյուրեղացնել էթիլացետատ/հեքսան 1/3 հարաբերությամբ խառնուրդից, ֆիլտրել և չորացնել վակուումի պայմաններում (50-60°C): Հաշվել քիմաիական ելքը: Հաստատել ստացված արգասիքի իսկությունը՝ համաձայն գրական տվյալներին:

Ռեակցիայի ընթացքը



Փորձ 2. *N-t-BOC-գլիցիլ-N-օքսիսուկցինիդիային էսթերի սինթեզը (Կարբօքսիլ խմբի ակտիվացումը)*

Ռեակտիվներ և սարքավորումներ՝ N-t-BOC-գլիցին, N-հիդրոքսիսուկցինիմիդ, 1,4-դիօքսան, մեթիլենքլորիդ, դիցիլլոհեքսիլկարբո-դիիմիդ, ՆՇԶ քիթել, խցիկ, քլորոֆորմ, մեթանոլ, էթիլացետատ, իզոպրոպանոլ, մագնիսական տաքացնող խառնիչ, բաժանիչ ձագար, վակուումային թորման սարք:

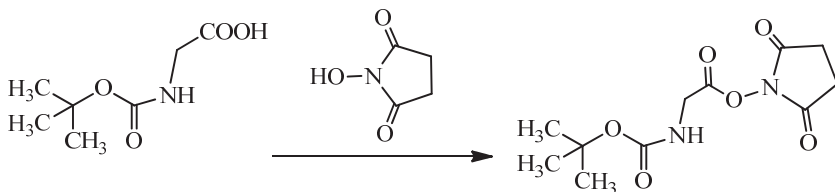
Փորձի ընթացքը

0,91գ (5,21 մմոլ) N-t-BOC-գլիցինը և 0,66 գ (5,73 մմոլ) N-հիդրոքսիսուկցինիմիդը լուծել 4 մլ 1,4-դիօքսան և 2 մլ մեթիլենքլորիդի խառնուրդում, ջերմաստիճանը իջեցնել

0 °C, այնուհետև 15 րոպեի ընթացքում փոքր չափաբաժիններով ավելացնել 1,2 գ (6,08 մմոլ) դիցիկլոհեքսիլկարբոդիիմիդ լուծված 2 մլ 1,4-դիօքսանում: Ռեակցիոն խառնուրդը 2 ժամ խառնել 0 °C, այնուհետև պահել սառնարանում մինչև հաջորդ օրը: Ռեակցիայի ընթացքին հետևել ՆՇԲ մեթոդով (քլորոֆորմ/մեթանոլ/էթիլացետատ): Առաջացած նստվածքը ֆիլտրել՝ դիցիկլոհեքսիլմիզանյութից ազատվելու համար, ֆիլտրատը թորել մինչև նստվածքի առաջացումը: Առաջացած յուղանման զանգվածը մի քանի անգամ լվանալ իզոպրոպանոլով՝ ավելցուկային դիցիկլոհեքսիլկարբոդիիմիդից ազատվելու համար:

Հաշվել քիմիական ելքը:

Ռեակցիայի ընթացքը



Փորձ 3. N-t-BOC-գլիցիլ-(S)-ալիլգլիցինի սինթեզը

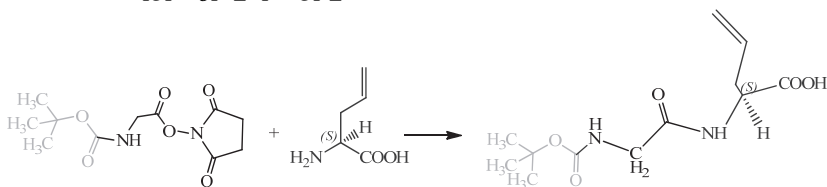
Ռեակտիվներ և սարքավորումներ՝ (S)-ալիլգլիցին, նատրիումի հիդրօքսիդ, N-հիդրոքսիսուկցինիմիդ, նատրիումի հիդրոկարբոնատ, N-t-BOC-գլիցիլ-N-օքսիսուկցինիմիդիային էսթեր, 1,4-դիօքսան, ՆՇԲ թիթել, խցիկ, քլորոֆորմ, մեթանոլ, էթիլացետատ, մագնիսական տաքացնող խառնիչ, բաժանիչ ձագար, վակուումային թորման սարք:

Փորձի ընթացքը

0,5 գ (4,3 մմոլ) (S)- ալիլգլիցին լուծված 9,36 մլ 0.5 M նատրիումի հիդրօքսիդում ավելացնել 0,132 (1,56 մմոլ) նատրիումի հիդրոկար-

բոնատ, այնուհետև ավելացնել 1,3 գ (4,7 մմոլ) N-t-BOC-գլիցիլ-N-օքսիսուկցիմիդիային էսթեր՝ լուծված 9,62 մլ 1,4-դիօքսանում: Որից հետո ռեակցիոն խառնուրդը խառնել 6 ժամ սենյակային ջերմաստիճանում, ռեակցիոն խառնուրդին ավելացնել 5 մլ էթիլացետատ, չեզոքացնել 10%-անոց կիտրոնաթթվի լուծույթով և տեղափոխել բաժանիչ ձագար՝ էքստրակտելու: Այնուհետև օրգանական ֆրակցիաները միացնել և ջրազրկել անջուր նատրիումի սուլֆատի օգնությամբ: Դեկանտելուց հետո օրգանական լուծիչները գոլորշիացնել վակուումի առկայությամբ մինչև 50 °C ջերմաստիճանային պայմաններում: Նպատակային դիպեպտիդը վերաբյուրեղացնել էթիլացետատ/հեքսան 1/3 հարաբերությամբ խառնուրդից, ֆիլտրել, չորացնել և հաշվել քիմիական ելքը:

Ռեակցիայի ընթացքը



ԳԼՈՒԽ 2.

Ֆերմենտներ

Ֆերմենտներ (կամ էնզիմներ) են կոչվում յուրահատուկ սպիտակուցները, որոնք օժտված են կատալիտիկ ակտիվությամբ, գտնվում են օրգանիզմի բջիջներում ու արտաբջջային հեղուկներում և կատարում են կենսաբանական կատալիզատորների դեր: Ելանյութերը, որոնք ֆերմենտների ազդեցությամբ ենթարկվում են բազմատեսակ փոխարկումների կոչվում են սուբստրատներ, իսկ վերջանյութերը՝ պրոդուկտներ:

Ֆերմենտները կենդանի օրգանիզմների բջիջների և հյուսվածքների բաղադրիչներ են: Նրանք կարողանում են կատալիզել ռեակցիաները ինչպես օրգանիզմի ներսում (in vivo), այնպես էլ դրանից դուրս (in vitro) օպտիմալ պայմաններում (օրինակ, կաթի կտրումը պեպսինի ազդեցությամբ, սախարոզի հիդրոլիզումը և այլն): Էնզիմները անընդհատ սինթեզվում են կենդանի օրգանիզմների բջիջներում: Անօրգանական կատալիզատորների նման, ֆերմենտները արագացնում են քիմիական ռեակցիաների արագությունը ակտիվացման էներգիայի իջեցման հաշվին: Սակայն դրանք իրականացնում են ավելի բարձր արդյունավետությամբ (մինչև հազար և ավելի անգամ) 0-110 °C ջերմաստիճանի և pH-ի լայն միջակայքի պայմաններում:

Ֆերմենտների բնութագրական առանձնահատկությունը, որով նրանք տարբերվում են այլ կատալիզատորներից, համարվում է նրանց արտակարգ բարձր ակտիվությունը: Օրինակ, կատալազ ֆերմենտի (կատալիզում է ջրածնի պերօքսիդի ճեղքումը մինչև ջրի և ատոմական թթվածնի) մեկ մոլեկուլը ընդունակ է մեկ րոպեի ընթացքում ճեղքել ջրածնի պերօքսիդի մինչև 5 մլն մոլեկուլ: Եթե համեմատենք կատալազի և Fe^{2+} իոնի կատալիտիկ ակտիվությունները այդ ռեակցիայում, ապա 1 մգ կատալազ ֆերմենտին համարժեք է 2 կգ երկաթի իոնը (կատալազ ֆերմենտի ակտիվ կենտրոնը պարունակում է Fe^{2+}):

Ֆերմենտները օժտված են բարձր սուբստրատային յուրահատկությամբ, այսինքն յուրաքանչյուր ֆերմենտի ազդեցությունը խիստ սահմանափակվում է մեկ սուբստրատով կամ կառուցվածքով իրար մոտ մի քանի սուբստրատներով:

Ներկայումս հայտնի են 1000-ից ավելի ֆերմենտներ, որոնց գերակշռող մասը անջատված է անհատական, քիմիապես հոմոգեն մաքուր պատրաստուկների տեսքով: Ավելի քան 200 ֆերմենտներ անջատված են բյուրեղական տեսքով և նրանց կառուցվածքը պարզաբանված է ռենտգենկառուցվածքային անալիզի եղանակով 36, 37:

Ֆերմենտային պատրաստուկները կիրառություն են գտել ժողովրդական տնտեսության տարբեր բնագավառներում՝ բժշկություն, դեղագործություն, սննդարդյունաբերություն, գյուղատնտեսություն և այլն:

2.1. Ֆերմենտների դասակարգումը

Ֆերմենտների բազմազանությունը որոշակի դժվարություններ է առաջացրել նրանց ճիշտ դասակարգման համար: Որոշ հետազոտողներ նոր հայտնաբերված ֆերմենտներին տվել են անվանումներ, որոնք չէին արտացոլում ո՛չ սուբստրատի, որոնց վրա նրանք ազդում են, և ո՛չ էլ կատալիզող ռեակցիաների բնույթը: Նույն ֆերմենտը տարբեր աշխատանքներում անվանվում էր տարբեր կերպ: Այդ պատճառով անհրաժեշտություն էր առաջացել մշակել որոշակի համակարգված կանոններ, որոնցով պետք է առաջնորդվեին ֆերմենտների անվանակարգման ժամանակ:

Ֆերմենտների ժամանակակից անվանակարգումը հիմնված է նրանց կողմից կատալիզվող քիմիական փոխարկումների բնույթի վրա: Համաձայն 1961 թվ-ին Միջազգային կենսաքիմիական միության ֆերմենտների գծով համձնաժողովի որոշման՝ ֆերմենտները բաժանվում են 6 դասի:

1. **Օքսիդառեդուկտազներ**, որոնք կատալիզում են օքսիդավերականգնման ռեակցիաները:

2. **Տրանսֆերազներ**, որոնք կատալիզում են տարբեր քիմիական խմբերի և մնացորդների միջնոլեկուլյար տեղափոխությունները:

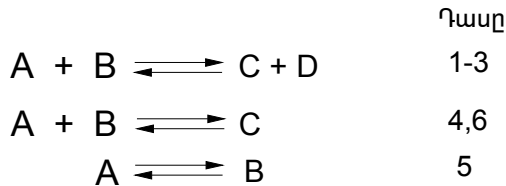
3. **Հիդրոլազներ**, որոնք կատալիզում են ներմոլեկուլային կապերի հիդրոլիտիկ ճեղքման պրոցեսները:

4. **Լիազներ**, որոնք կատալիզում են սուբստրատից ոչ հիդրոլիտիկ ճանապարհով որոշակի ատոմների խմբերի պոկումը կրկնակի կապի առաջացմամբ (կամ ատոմների խմբերի միացումը կրկնակի կապին):

5. **Իզոմերազներ**, որոնք կատալիզում են տարբեր խմբերի, կապերի ներմոլեկուլային տեղափոխման ռեակցիաները (իզոմերման ռեակցիաները):

6. **Լիգազներ** (կամ սինթետազներ), որոնք կատալիզում են երկու մոլեկուլների միացման ռեակցիաները (սինթեզի ռեակցիաները):

Ֆերմենտներով կատալիզվող ռեակցիաներն ընդհանուր առմամբ կարելի է ներկայացնել հետևյալ ֆորմուլներով.



Յուրաքանչյուր դասի ներսում ֆերմենտները ստորաբաժանվում են ենթադասերի՝ կախված այն սուբստրատի տեսակից, որոնց հետ նրանք փոխազդում են:

Այդ ենթադասերը իրենց հերթին ստորաբաժանվում են ենթանենթադասերի:

Միջազգային հանձնաժողովի որոշմամբ ընդունված է ֆերմենտների անվանակարգման երկու համակարգ՝ համակարգված և տրիփլալ (գործնական):

Համակարգված անվանակարգումը ներառում է տվյալ ֆերմենտի հիմնական սուբստրատի (կամ սուբստրատների) ռացիոնալ քիմիական անվանումը և հստակ բնորոշում է իր կողմից կատալիզող ռեակցիայի էությունը: Համաձայն ընդունված կանոնակարգի՝ ֆերմենտի անվանումը՝ ըստ սիստեմատիկ անվանակարգման, կազմվում

է երկու մասից. առաջին մասը արտահայտում է սուբստրատի անվանումը (բիմոլեկուլյար ռեակցիաների դեպքում՝ երկու սուբստրատների անվանումները, բաժանված իրարից գծիկով), իսկ երկրորդ մասը «ազ» վերջավորությամբ՝ կատալիզող ռեակցիայի բնույթը: Օրինակ, կարբամիդ-ամիդոհիդրոլազ, բարբիտուրատ-ամիդոհիդրոլազ, L-լակտատ-ՆԱԴ-օքսիդոռեդուկտազ և այլն:

Տրիվիալ անվանակարգումն ավելի պակաս ստույգ է, սակայն ավելի կարճ է, քան համակարգվածը, ինչի պատճառով այն ավելի հաճախ է գործածվում պրակտիկայում և այլ կերպ կոչվում է աշխատանքային:

Նախկինում, երբ դեռ ֆերմենտային ռեակցիաների մեխանիզմները լուրջ հետազոտված չէին, ֆերմենտների անվանումն ընտրվում էր կամայական ձևով, օրինակ՝ պեպսին, տրիպսին, պապաին, քիմոտրիպսին և այլն:

Հետագայում, հայտնի ֆերմենտների քանակի մեծացման և ֆերմենտային ռեակցիաների բնույթի բացահայտման հետևանքով սկսել են ֆերմենտներն անվանել օգտագործելով սուբստրատի անվանումը՝ ավելացնելով «ազ» վերջավորությունը: Օրինակ՝ միզանյութին (urea) ճեղքող ֆերմենտը անվանվել է ուրեազ, արգինինին՝ արգինազ և այլն: Սակայն, հաշվի առնելով, որ միևնույն նյութի վրա կարող են ազդել մի քանի ֆերմենտներ, կատալիզելով տարբեր փոխարկումներ, հետագայում ֆերմենտի անվանման մեջ սկսել են մտցնել ֆերմենտային ռեակցիայի անվանումը, օրինակ, պոլիֆեմոլօքսիդազ, լակտատդեհիդրոգենազ, ադենինդեզամինազ և այլն:

Այն դեպքում, երբ սուբստրատը ռեակցիային մասնակցում է անիոնի տեսքով, ֆերմենտի անվանման ժամանակ նշվում է այն ոչ թե համապատասխան ազատ թթվի անվանումը, անիոնի անունը՝ ավելացնելով «ատ» վերջավորությունը: Օրինակ՝ ոչ թե կաթնաթթվի դեհիդրոգենազ, այլ՝ լակտատդեհիդրոգենազ:

Ֆերմենտների նախորդների անվանակարգման ժամանակ Միջազգային հանձնաժողովը երաշխավորում է ֆերմենտի անվանման ավելացնել «պրե» նախածանցը, կամ «ոգեն» վերջածանցը, ինչպես դա արվում էր նախկինում, այլ «պրո» նախածանցը: Սա-

կայն ֆերմենտների նախորդների անվանակարգման պրակտիկայում հաճախ գործածում են «պրո» նախածանցը և «ոգեն» վերջածանցը, օրինակ, «պրոտոմբին» կամ «տրիպսինոգեն»:

2.2. Ֆերմենտների կառուցվածքը

Ֆերմենտները կա՛մ պարզ (միաբաղադրիչ ֆերմենտներ), կա՛մ էլ բարդ սպիտակուցներ են՝ պրոտեիններ (երկ- և բազմաբաղադրիչ ֆերմենտներ): Ի տարբերություն ոչ ակտիվ սպիտակուցների, ֆերմենտներն իրենց կառուցվածքում պարունակում են հատուկ հատված, որը կոչվում է ակտիվ կենտրոն:

Միաբաղադրիչ ֆերմենտները կազմված են բացառապես ամինաթթվային մնացորդներից, օրինակ՝ պեպտիդոհիդրոլազները (տրիպսինը, քիմոտրիպսինը, պեպսինը, պապաինը), ռիբոնուկլեազը, ուրեազը և այլն: Երկ- և բազմաբաղադրիչ ֆերմենտների դասին են պատկանում այն ֆերմենտները, որոնք, բացի սպիտակուցային բաղադրիչից, իրենց կառուցվածքում պարունակում են նաև ոչ սպիտակուցային հատված, որը կարող է լինել օրգանական մոլեկուլ, մետաղի իոն կամ օրգանական մոլեկուլ, որը կոմբինացված է մետաղի իոնի հետ: Ֆերմենտի ոչ սպիտակուցային հատվածը կոչվում է կոֆերմենտ կամ պրոստետիկ խումբ: Իսկ բարդ ֆերմենտների սպիտակուցային բաղադրիչը կոչվում է ապոֆերմենտ: Բազմաբաղադրիչ ֆերմենտների կոֆերմենտը (կամ պրոստետիկ խումբը) սովորաբար մտնում է ակտիվ կենտրոնի բաղադրության մեջ:

Ֆերմենտների մոլեկուլային զանգվածը տատանվում է բավականին լայն մարզում՝ 14.000-1.000.000: Յուրաքանչյուր ֆերմենտի համար բնութագրական է որոշակի ամինաթթվային բաղադրությունը, ամինաթթվային հաջորդականությունը և տարածական կառուցվածքը, ինչով այն տարբերվում է այլ ֆերմենտներից: Բյուրեղական ֆերմենտների գերակշռող մասի համար որոշված է ամինաթթվային բաղադրությունը և հայտնի են ծայրային ամինաթթվային մնացորդները, իսկ ավելի լավ հետազոտված ֆերմենտների համար գրեթե ամբողջությամբ հաստատված է նաև պեպտիդային շղթայի ամինա-

թթվային հաջորդականությունը (տրիպսին, քիմոտրիպսին, պեպսին, պապաին, ռիբոնուկլեազ, լիզոցիմ, ցիտոքրոմ C և այլն):

Որոշ դեպքերում ֆերմենտի մոլեկուլը կազմված է մի քանի բաղադրիչներից: Օրինակ՝ գլիցերալդեհիդֆոսֆատդեհիդրոգենազի դեպքում առանձին բաղադրիչներն օժտված չեն ֆերմենտային ակտիվությամբ, և միայն բարդ մոլեկուլը, կազմված մի քանի բաղադրիչներից, ընդունակ է գործել որպես ֆերմենտ: Այլ դեպքերում բաղադրիչը կարող է լինել ակտիվ: Օրինակ, տրիպտոֆանսինթետազի մոլեկուլը կազմված է երկու բաղադրիչներից, որոնցից յուրաքանչյուրն օժտված է սեփական ֆերմենտային ակտիվությամբ, որոնք տարբերվում են տրիպտոֆանսինթետազի ակտիվությունից: Այդ երկու բաղադրիչների միացումից առաջացող մակրոմոլեկուլը ցուցաբերում է տրիպտոֆանսինթետազային ակտիվություն:

2.3. Ֆերմենտի անջատումը, մաքրումը և բնութագրումը

Ֆերմենտների աղբյուր կարող են հանդիսանալ տարբեր կենսաբանական օբյեկտներ՝ թարմ և սառեցված կենդանիների, բույսերի և սնկերի հյուսվածքներ, մանրէներ և դրանց կենսաբանական արգասիքները: Այս օբյեկտներից ֆերմենտները անջատվում են մեխանիկական հոմոգենիզացման կամ ֆիզիկական, քիմիական և կենսաբանական դեզինդեգրացման մեթոդների կիրառմամբ, հատուկ պահպանիչ բուֆերներում, տվյալ ֆերմենտի բնորոշ օպտիմալ pH-ի և ջերմաստիճանի պայմաններում:

Քանի որ մաքուր ֆերմենտների անջատումը չափազանց բարդ է, հաճախ վործերում օգտագործում են մասնակիորեն մաքրված ֆերմենտային պատրաստուկներ:

Թուրք և կենդանիների ու մարդու այլ մարսողական հյուսքերը ֆերմենտների խիտ լուծույթներ են: Թուրք պարունակում է α -ամիլազ ֆերմենտը, որը հիդրոլիզում է օսլան: Թքի ամիլազը օսլայում հիդրոլիզում է α -1,4-գլիկոզիդային կապերը: Ըստ ազդեցության մեխանիզմի՝ այն է նրոզլիկոզիդազ է: Օսլայի հիդրոլիզը α -ամիլազի օգնությամբ գնում է միջանկյալ նյութերի՝ դեքստրինների առաջացումով,

ընդհապ մինչև մալտոզ ու գլյուկոզ: Օսլան յողի հետ տալիս է կապույտ գունավորում, դեքստրինները՝ կախված մոլեկուլի չափից, տալիս են տարբեր գունավորում, ամիլոդեքստրինները՝ մանուշակագույն, էրիթրոդեքստրինները՝ գորշ-կարմիր, ախրոդեքստրինները և մալտոզը՝ դեղին (յողի գույնը ջրում, այսինքն յողի հետ չի տալիս գունավորում):

Փորձ 4. *Bacillus amyloliquefaciens* α -ամիլազ ֆերմենտի ակտիվությունը որոշումը

Ռեակտիվներ և սարքավորումներ՝ NaCl, թորած ջուր, փորձափոք, Շոմոդիի և Նելսոնի ռեագենտներ, թերմոստատ:

Փորձի ընթացքը

Փորձի համար օգտագործում են *Bacillus amyloliquefaciens*-ի α -ամիլազ ֆերմենտը:

Bacillus amyloliquefaciens-ի α -ամիլազ ֆերմենտի ակտիվությունը որոշելու համար, առանձնացնում են 1 մլ լուծույթ և տեղափոխում են մաքուր փորձանոթի մեջ, ավելացնում են 2 ծավալ 1%-անոց օսլայի լուծույթ ու խառնում: Ֆերմենտի և սուբստրատի խառնուրդը ինկուբացնում են թերմոստատի մեջ 10 րոպե 37-38 °C ջերմաստիճանում: 10 րոպեից հետո α -Ամիլազի ակտիվությունը չափվում է ըստ օսլայի ճեղքման արդյունքում առաջացած ռեդուկցվող խմբերի քանակի, օգտագործելով Շոմոդիի և Նելսոնի ռեագենտները. Ռեակցիոն միջավայրը պարունակել է 50 մմոլ/լ HEPES (pH 7,2), 0,5 մմոլ/լ CaCl₂, 0,5 % ժելատինիզացված օսլա և անհրաժեշտ քանակությամբ ֆերմենտային պրեպարատ: Ռեակցիան իրականացվել է 65°C ջերմաստիճանում:

Ֆերմենտի ակտիվությունը որոշվել է հետևյալ բանաձևով՝

$$A = \frac{(D_2 - D_1) \cdot V}{\varepsilon \cdot t \cdot V_p \cdot C_p}$$

որտեղ՝

A – ֆերմենտի տեսակարար ակտիվությունն է, միավոր/մգ,
 D_1 – մնուշի օպտիկական կլանումն է ինկուբացումից առաջ,
 D_2 – մնուշի օպտիկական կլանումն է ինկուբացումից հետո,

V – նմուշի ծավալն է, մլ,

ε_{560} – էքստենքցիայի գործակիցն է, մոլ⁻¹սմ⁻¹,

t – ռեակցիայի տևողությունն է, ր,

V_p – ֆերմենտային պրեպարատի ծավալն է, մլ,

C_p – ֆերմենտային պրեպարատում սպիտակուցի կոնցենտրացիան է, մգ/մլ,

Որպես ֆերմենտային ակտիվության միավոր ընդունվել է նշված պայմաններում 1 միկրոմոլ վերականգնող խմբերի առաջացումը 1 րոպեի ընթացքում:

Սպիտակուցի կոնցենտրացիայի որոշումը.

Սպիտակուցի կոնցենտրացիան որոշվել է Գրովսի և Դեյվիսի եղանակով: Նմուշի կլանումը չափվել է 224 և 236 նմ երկարության ալիքի տիրություն:

Սպիտակուցի քանակը հաշվարկվել է հետևյալ բանաձևով՝

$$C_p = (D_{224} - D_{236}) \cdot 0,168 \cdot N$$

որտեղ՝

C_p – սպիտակուցի կոնցենտրացիան է, մգ/մլ,

D_{224} և D_{236} – սպիտակուցի նմուշի կլանման արժեքները 224 և 236 նմ երկարության ալիքի տակ,

N – նոսրացումը:

Փորձի վերլուծություն

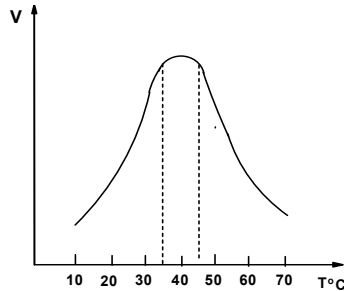
Ըստ ստացված տվյալների կարելի է եզրակացնել, ռեակցիայի արգասիքների և α -ամիլազ ֆերմենտի մասին:

Ըստ ստացված արդյունքների՝ կարելի է բնութագրել հիդրոլիզի խորությունը և դատել ֆերմենտի ակտիվության մասին:

2.4. Ջերմաստիճանի ազդեցությունը ֆերմենտների ակտիվության վրա

Ջերմաստիճանի բարձրացումից ռեակցիայի արագությունը, այդ թվում նաև ֆերմենտներով կատալիզվող ռեակցիաների, որպես կանոն մեծանում է: Սակայն մի որոշակի ջերմաստիճանից սկսած

Ֆերմենտները ենթարկվում են անդարձելի դեմատուրացման և կորցնում են ակտիվությունը: Այդ պատճառով ջերմաստիճանի բարձրացմամբ ֆերմենտային ռեակցիայի արագությունը սկզբից մեծանում է, որից հետո անցնելով այսպես կոչված «ջերմաստիճանային օպտիմումով», կտրուկ նվազում է (նկ. 1):



Նկ. 1. *Ֆերմենտային ռեակցիայի արագության կախվածությունը ջերմաստիճանից:*

Կենդանական և բուսական ծագման յուրաքանչյուր ֆերմենտ ունի բնութագրական ջերմաստիճանային օպտիմում:

Ֆերմենտները հիմնականում ինակտիվանում են 40-70°C ջերմաստիճանային տիրույթում, սակայն կան բացառություններ: Օրինակ՝ ծովաբուլկից անջատված պերօքսիդազն իր ակտիվությունը չի կորցնում նույնիսկ լուծույթի եռման ժամանակ, իսկ կան ֆերմենտներ, որոնք ցուցաբերում են օպտիմալ ակտիվություն ցածր ջերմաստիճանի պայմաններում, օրինակ՝ կատալազը, որի օպտիմում ջերմաստիճանը գտնվում է 0-10°C մարզում:

Փորձ 5. *Ջերմաստիճանի ազդեցությունը α -ամիլազ ֆերմենտի ակտիվության վրա*

Ռեակտիվներ և սարքավորումներ՝ α -ամիլազ, թորած ջուր, փորձանոթ, օսլա, սառույց, թերմոստատ, սալիկ, յոդ:

Փորձի ընթացքը

Վերցնել 3 փորձանոթ: Երեքի մեջ էլ լցնել 2-ական մլ 1%-անոց օսլայի լուծույթ և 1-ական մլ ամիլազ:

1-ին փորփձանոթը տեղադրել սառույցի մեջ (0°C)

2-ը՝ տեղադրել 37°C -ում

3-ը՝ եռացնել

Առաջին և երրորդ փորձանոթները 5 թույն անց վերցնել նմուշ յոդի հետ գունավոր ռեակցիայի համար, իսկ փորձանոթները 5 թույնով տեղադրել 37°C -ի մեջ:

1-ին, 2-րդ և 3-րդ փորձանոթներում ավելացնել մեկական կաթիլ յոդ:

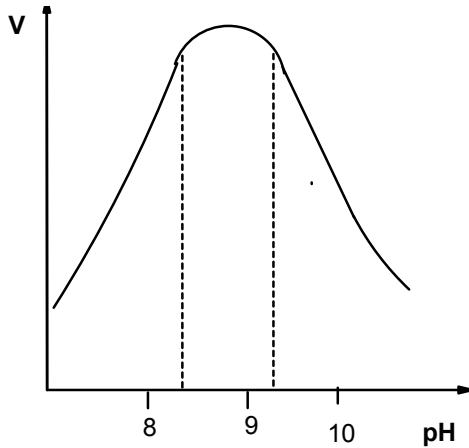
2-րդ փորձանոթում դելին գունավորում, 1-ին և 3-րդ կապույտ գունավորում: 5 թույն հետո 1-ին և 3-րդ փորձանոթները սառեցնել և ավելացնել 1-ական կաթիլ յոդ 1-ջին փորձանոթում՝ դելին գունավորում, 3-րդ փորձանոթում՝ կապույտ:

Փորձի վերլուծություն

α -ամիլազի ազդեցության օպտիմալ ջերմաստիճանն է 37°C , իսկ եռացման ժամանակ ֆերմենտը դենատուրացվում է և չի ազդում, որի հետևանքով հաջորդ ինկուբացիան $t = 37^{\circ}\text{C}$ –ում չի ուղեկցվում օսլայի հիդրոլիզով: $t = 0^{\circ}\text{C}$ -ում ֆերմենտի ակտիվությունը խիստ ցածր է, բայց ամիլազը չի ինակտիվանում, որի հետևանքով հետագա ինկուբացիան 37°C ջերմաստիճանում բերում է օսլայի հիդրոլիզին:

2.5. Միջավայրի ազդեցությունը ամիլազի վրա

Ֆերմենտատիվ ակտիվության վրա զգալի ազդեցություն է թողնում միջավայրի pH-ը, որի սահմանային արժեքների դեպքում (ուժեղ թթվային կամ հիմնային միջավայրում) տեղի է ունենում ֆերմենտի ոչ դարձելի դենատուրացում (նկ. 2):



Նկ. 2. *Ֆերմենտատիվ ռեակցիայի արագության կախվածությունը միջավայրի pH-ից:*

Միջավայրի pH-ի արժեքն ազդեցություն է թողնում նաև սուբստրատի նկատմամբ ֆերմենտի խնամակցության վրա: Յուրաքանչյուր ֆերմենտի համար pH-ի որոշակի արժեքի տիրույթում նրանով կատալիզվող ռեակցիան ընթանում է մաքսիմալ արագությամբ: pH-ի այդ տիրույթը կոչվում է «pH-օպտիմում»: Ընդ որում՝ միևնույն ֆերմենտը տարբեր սուբստրատների ներկայությամբ կարող է ունենալ տարբեր օպտիմալ pH-ի արժեքներ:

Միջավայրի pH-ի ազդեցությունը ֆերմենտի ակտիվության վրա պայմանավորված է նրանով, որ ֆերմենտն իր կառուցվածքում պարունակում է մեծ թվով ֆունկցիոնալ խմբեր, որոնք ընդունակ են իոնիզացվելու (α -կարբօքսիլային և α -ամինո, ռադիկալի կարբօքսիլային և ամինո, ցիստեինի սուլֆիդիլային, թիրոզինի հիդրօքսիլային, հիստիդինի իմիդազոլային, արգինինի գուանիդինային և այլն): Միջավայրի pH-ի փոփոխությունն ազդում է այդ խմբերի իոնիզացվածության աստիճանի վրա, հետևաբար նաև, ֆերմենտի մոլեկուլի լիցքի վրա: Կախված միջավայրի pH-ի փոփոխությունից, փոփոխվում է ֆերմենտի մոլեկուլի պոլիպեպտիդային շղթայի տարածական կոնֆորմացիան, ինչն ուղեկցվում է որոշ խմբերի տարա-

ծապես իրար մոտեցմամբ կամ հեռացմամբ, ինչը որոշիչ կարող է լինել ֆերմենտի ակտիվության համար: Բնականաբար, առավել մեծ ազդեցություն կարող են ցուցաբերել ֆերմենտի ակտիվ կենտրոնում կամ նրա անմիջական հարևանությամբ գտնվող ֆունկցիոնալ խմբերի իոնիզացվածության վիճակի փոփոխությունը:

Ֆերմենտները կարող են գտնվել բազմաթիվ իոնական ձևերով, որոնցից մեկը, որը բնութագրվում է դրական և բացասական լիցքերի հավասարությամբ, հանդիսանում է իզոէլեկտրիկ ձևը: Եվ քանի որ, ֆերմենտի կատալիտիկ ակտիվությունը դրսևորվում է pH-ի բավականին նեղ մարզում, հավանաբար ֆերմենտի միայն մեկ իոնական ձևն է համապատասխանում կատալիտիկ ակտիվ վիճակին:

Փորձ 6. *pH-ի ազդեցությունը α -ամիլազ ֆերմենտի ակտիվության վրա:*

Ռեակտիվներ և սարքավորումներ α -ամիլազ, բուֆերային լուծույթներ, բորած ջուր, փորձանոթ, օսլա, սառույց, թերմոստատ, յոդ:

Փորձի ընթացքը

Վերցնել 5 փորձանոթ, յուրաքանչյուրի մեջ լցնել 1-ական մլ բուֆերային լուծույթ տարբեր pH-ով՝ 1-փորձանոթում – pH 4,5 2-ում՝ pH 6, 3-ում՝ pH 7,2, 4-ում՝ pH 7,8, 5-ում՝ pH 8,5:

Հետո բոլոր փորձանոթների մեջ լցնել 2-ական մլ 1%-անոց օսլայի լուծույթ և 1-ական մլ ամիլազ, ինկուբացնել 5-10 րոպե՝ 37 °C-ում: Ինկուբացիայի ավարտից հետո փորձանոթները սառեցնել և բոլորի մեջ ավելացնել 1-ական կաթիլ յոդի լուծույթ:

Փորձի վերլուծություն

pH 7,2-ով փարձանոթում գունավորումը դեղին է (օպտիմում pH), իսկ մյուսներում՝ կապույտ կամ մանուշակագույն: Դա նշանակում է, որ α -ամիլազ ֆերմենտը ակտիվ գործում է pH 7,2 պայմաններում, ավելի ցածր կամ բարձր pH-ի տակ նրա գործունեության ակտիվությունը ցածր է, քանի որ այն ենթարկվում է մասնավոր կամ ամբողջական դենատուրացիայի:

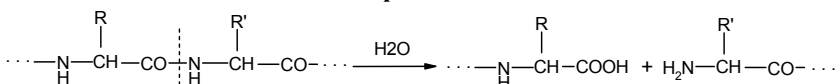
2.6. Ֆերմենտի ազդեցության սպեցիֆիկությունը

Ֆերմենտները կատալիզում են ռեակցիաներ, որոնք ընթանում են կենդանի օրգանիզմում: Ի տարբերություն սովորական քիմիական կատալիզատորների, ֆերմենտներն օժտված են բարձր սուբստրատային սպեցիֆիկությամբ:

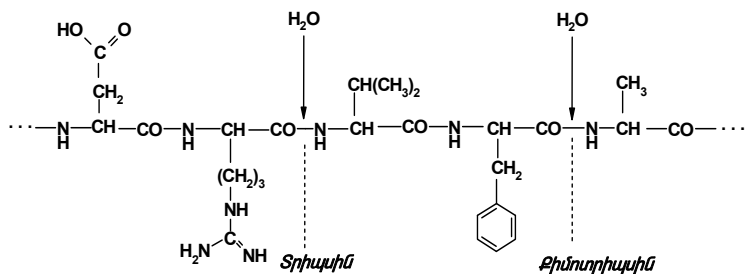
Ներկայումս հայտնի են 1000-ից ավելի ֆերմենտներ, որոնց գերակշռող մասը (մինչև 75-80%) կատալիզում են հիմնականում 6 կարգի ռեակցիաներ: Դա նշանակում է, որ մեծ թվով ֆերմենտներ կատալիզում են միևնույն տեսակի ռեակցիաներ: Մասնավորապես, մոտ 70 ֆերմենտներ տարբեր սուբստրատներում կատալիզում են CO-NH կապի հիդրոլիզը, 80-ից ավելի ֆերմենտներ՝ CHOH խմբի օքսիդացումը մինչև CO խմբի և այլն:

Բննարկենք պրոտեոլիտիկ ֆերմենտները, որոնք կատալիզում են պեպտիդային կապի հիդրոլիզը, որի ընթացքում տեղի է ունենում կապի ճեղքում և սպիտակուցի ֆրագմենտացում (սխեմա 1):

Սխեմա 1



Պեպտիդային կապի վրա պրոտեոլիտիկ ֆերմենտների ազդեցությունը կախված է նրան շրջապատող խմբերից, այսինքն ոչ մի պեպտիդազ չի կարող հիդրոլիզել սպիտակուցային մոլեկուլի բոլոր պեպտիդային կապերը: Յուրաքանչյուր պեպտիդազ ընտրողաբար ճեղքում է որոշակի ամինաթթվային մնացորդների հարևանությամբ գտնվող պեպտիդային կապը: Օրինակ՝ տրիպսինը ընտրողաբար ճեղքում է այն պեպտիդային կապերը, որոնք առաջացած են հիմնային ամինաթթուներ L-արգինինի կամ L-լիզինի, իսկ քիմոտրիպսինը՝ արոմատիկ ամինաթթուներ ֆիրոզինի և ֆենիլալանինի կարբօքսիլային խմբերի մասնակցությամբ առաջացած պեպտիդային կապերը (նկ. 3):



Նկ. 3. Պրոտեոլիտիկ ֆերմենտների ընտրողական ազդեցությունը:

Ֆերմենտի և սուբստրատի փոխազդեցության անհրաժեշտ պայմանը համարվում է նրանց կառուցվածքների ստերիկ կոմպլեմենտարությունը, այսինքն սուբստրատի մոլեկուլի կառուցվածքի և կոնֆորմացիայի համապատասխանությունը ֆերմենտի որոշակի հատվածի կառուցվածքին ու կոնֆորմացիային: Այդ պայմանն ապահովվում է այնպիսի ուժերի բնույթով, որոնք կապում են ֆերմենտի և սուբստրատի մոլեկուլների արտաքին մակերևույթները (Վան-դեր-Վալսյան, էլեկտրոստատիկ և ջրածնական):

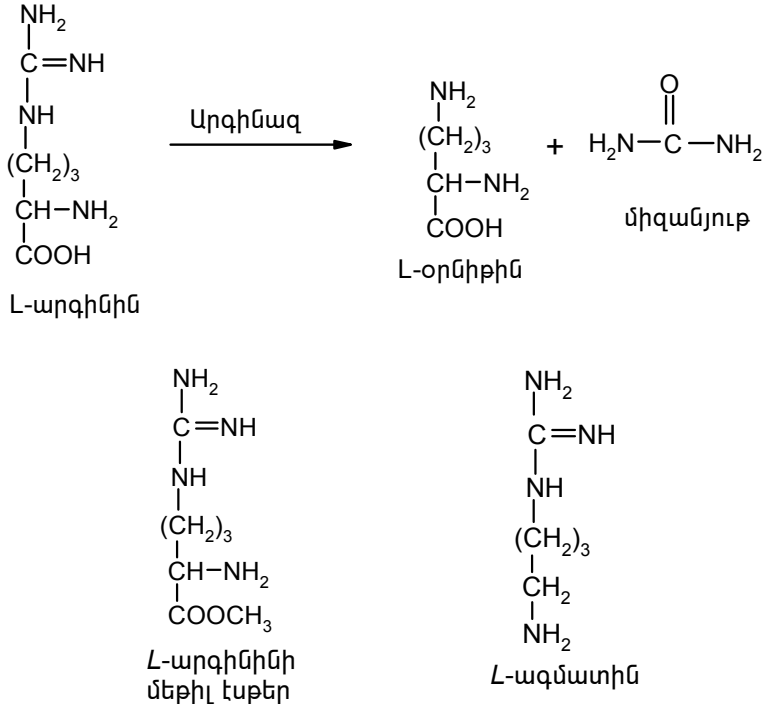
Սուբստրատի կառուցվածքի չնչին փոփոխությունն անգամ բերում է նրա և ֆերմենտի ակտիվ կենտրոնի միջև ստերիկ կոմպլեմենտարության խախտման:

Գոյություն ունի մի քանի տեսակի սուբստրատային սպեցիֆիկություն՝ բացարձակ, խմբակային, օպտիկական (ստերեոքիմիական) և որոշակի տեսակի ռեակցիաների նկատմամբ սպեցիֆիկություն:

Բացարձակ սպեցիֆիկություն: Բացարձակ սպեցիֆիկությամբ օժտված են այն ֆերմենտները, որոնք կատալիզում են միայն մեկ ռեակցիա և ազդում են մեկ որոշակի սուբստրատի վրա: Բացարձակ սպեցիֆիկության դասական օրինակ է կարբամիդ-ամիդոհիդրոլազ (ուրեազ) ֆերմենտի ազդեցությունը, որը կատալիզում է միզանյութի հիդրոլիզը և չի ազդում միզանյութի ոչ մի ածանցյալի վրա: Մեկ այլ օրինակ, արգինազ ֆերմենտի դեպքում (սխեմա 2): Ֆերմենտը կատալիզում է արգինինի հիդրոլիզը՝ առաջացնելով օրնիթին, ու միզա-

նյութ և գործնականորեն չի ազդում արգինինի մեթիլ էսթերի, ազմատինի (դեկարբօքսիլացված արգինին) և այլ ածանցյալների վրա:

Սխեմա 2

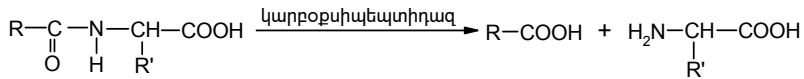


Հավանաբար, բարձր սպեցիֆիկությամբ օժտված ֆերմենտների մոտ արտաքին մակերևույթի հատվածը, որտեղ մտնում է ակտիվ կենտրոնը, շատ ստույգ համապատասխանում է սուրստրատի մոլեկուլին, և այդ հատվածին չեն համապատասխանում նույնիսկ սուրստրատին շատ մոտ, բարեկամ մոլեկուլները, որոնք ընդունակ են մասնակցելու նույն ռեակցիաներին, ինչ որ սուրստրատը:

Խմբակային սպեցիֆիկություն: Խմբակային սպեցիֆիկություն նշանակում է, որ ֆերմենտը սպեցիֆիկ է մի խումբ միացությունների հանդեպ, որոնք ունեն ընդհանուր կառուցվածք, այսինքն որոշակի տեսակի կապեր և այդ կապերն առաջացրած բաղադրիչներից մեկի

խիստ որոշակի քիմիական կառուցվածք: Խմբակային սպեցիֆիկությամբ են օժտված, օրինակ, α -ամինոացիլպեպտիդոհիդրոլազները (կարբօքսիպեպտիդազները), որոնք սպիտակուցներում և պեպտիդներում ճեղքում են ազատ կարբօքսիլային խմբի անմիջական հարևանությամբ գտնվող պեպտիդային կապը, հետևաբար, նրանք ազդում են պեպտիդային շղթայի C-ծայրային մնացորդների վրա (սխեմա 4):

Սխեմա 4



Յուրաքանչյուր կոնկրետ ֆերմենտի սպեցիֆիկությունը որոշվում է այն ամինաթթվով, որին պատկանում է ազատ կարբօքսիլային խումբը: Ծեղքվող պեպտիդային կապն առաջացրած երկրորդ ամինաթթվային մնացորդը չի ազդում տվյալ ֆերմենտի սպեցիֆիկության վրա: Օրինակ՝ կարբօքսիպեպտիդազ A ֆերմենտը հեշտությամբ ճեղքում է բազմաթիվ պեպտիդների C-ծայրային ամինաթթվային մնացորդի պեպտիդային կապը, բացի այն կապերից, որոնց մոտ C-ծայրային ամինաթթվային մնացորդը հանդիսանում է դիամինաթթու կամ պրոլին: Իսկ կարբօքսիպեպտիդազ B ֆերմենտը հիդրոլիզում է լիզին և արգինին ամինաթթուների առաջացրած C-ծայրային պեպտիդային կապերը:

Որոշակի տեսակի ռեակցիաների հանդեպ սպեցիֆիկություն:

Սպեցիֆիկության այս տեսակն արտահայտվում է սուբստրատի մոլեկուլի միայն որոշակի քիմիական կապերի (օրինակ՝ պեպտիդային, բարդ եթերային, գլիկոզիդային և այլն) հանդեպ, որոնց վրա ազդում է ֆերմենտը, և նրա ազդեցությունը կախված չէ այդ կապի հարևանությամբ գտնվող խմբերի քիմիական բնույթից:

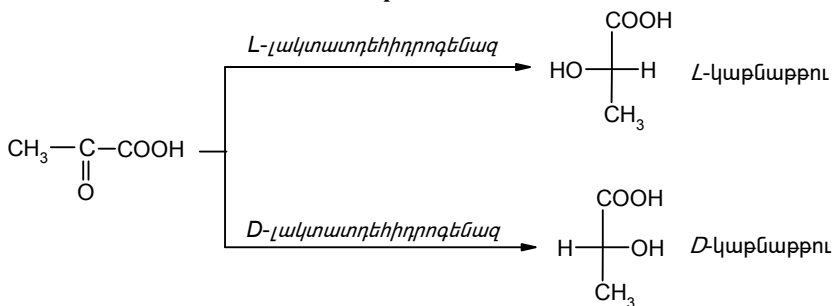
Որոշակի տեսակի ռեակցիաների հանդեպ յուրահատկությամբ օժտված ֆերմենտի օրինակ են կարբոնաթթուների էսթերների հիդրոլազները (կարբօքսիլէսթերազները) և ամինոպեպտիդազները: Հավանաբար, այդ ֆերմենտները փոխազդում են սուբստրատի մոլեկուլի

այն հատվածների հետ, որոնք անմիջապես հատվում են ռեակցիային մասնակցող կապերի հետ:

Ստերեոքիմիական սպեցիֆիկություն: Օպտիկապես ակտիվ միացության վրա ազդելու դեպքում ֆերմենտը ցուցաբերում է ստերեոքիմիական սպեցիֆիկություն: Ֆերմենտն ազդում է միայն մեկ ստերեոիզոմեր ձևի վրա, առանց փոփոխելու օպտիկական անտիպոդին: Ֆերմենտների այս հատկության վրա է հիմնված ռացեմատ խառնուրդների բաժանման կենսաքիմիական եղանակը:

Ֆերմենտների օգնությամբ կարելի է իրականացնել ասիմետրիկ սինթեզ: Օրինակ՝ օպտիկապես ոչ ակտիվ պիրովսադոլաթթվի վերականգնումը L-լակտատդեհիդրոգենազ ֆերմենտով բերում է L-կաթնաթթվի առաջացման, իսկ D-լակտատդեհիդրոգենազով՝ D-կաթնաթթվի առաջացմանը (սխեմա 5):

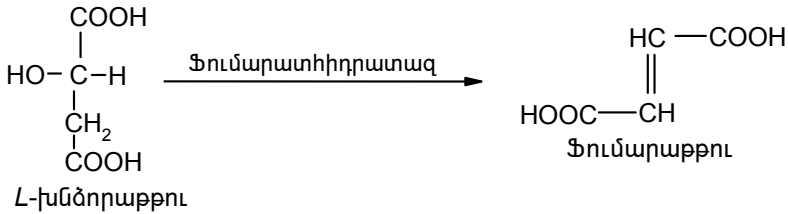
Սխեմա 5



Խնձորաթթվի դեհիդրատացումը ֆումարաթթվի առաջացմամբ ֆումարատհիդրատազ ֆերմենտի ազդեցությամբ ընթանում է միայն L-խնձորաթթվի դեպքում, քանի որ D-խնձորաթթվի վրա այդ ֆերմենտը չի ազդում (սխեմա 6):

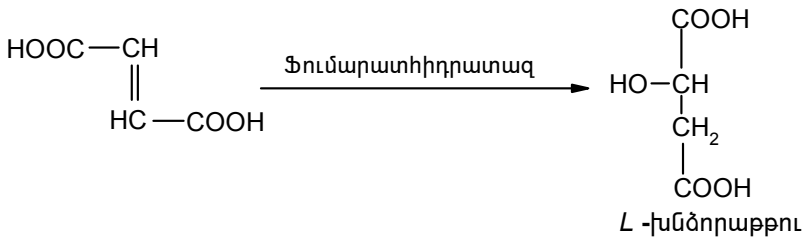
Ամիրաժեշտ է նշել, որ պեպտիդազների գերակշիռ մասն ընդունակ չէ հիդրոլիզել D-ամինաթթուների առաջացրած պեպտիդային կապերը, այսինքն ֆերմենտը կարողանում է գերազանց ձևով տարբերել ստերեոիզոմերների և սուբստրատի օպտիկական անտիպոդը տվյալ ֆերմենտի համար այլևս սուբստրատ չէ:

Սխեմա 6



Ֆերմենտները ցուցաբերում են ստերեոքիմիական սպեցիֆիկություն ոչ միայն L- և D-ստերեոիզոմերների, այլ նաև ցիս և տրանս իզոմերների նկատմամբ: Օրինակ՝ ֆումարատ-հիդրատազ ֆերմենտն ազդում է միայն տրանս իզոմերի՝ ֆումարաթթվի վրա և գործնականորեն չի ազդում ցիս իզոմերի՝ մալեինաթթվի վրա (սխեմա 7):

Սխեմա 7

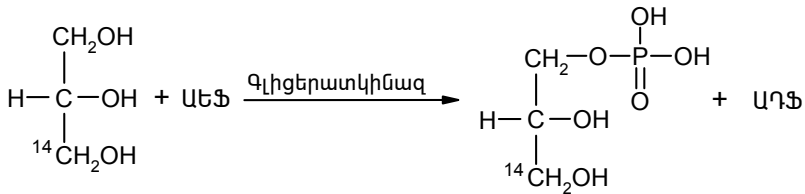


Քանի որ ֆերմենտի և սուբստրատի կառուցվածքները կոմպլեմենտար են իրար, ապա ֆումարատհիդրատազ ֆերմենտի ակտիվ կենտրոնը կոմպլեմենտար է կրկնակի C=C կապի նկատմամբ տեղակալիչների տրանս-բաշխմանը: Ակնհայտ է, որ այն չի կարող փոխազդել ցիս-իզոմերի հետ, որին բնորոշ է կրկնակի կապի շուրջը տեղակալիչների լրիվ հակառակ տարածական բաշխումը:

Ստերեոսպեցիֆիկ ձևով է ընթանում, օրինակ, գլիցերինի ֆոսֆորիլացման ռեակցիան ԱԵՖ:D-գլիցերատ-3-ֆոսֆոտրանսֆերազ (գլիցերատկինազ) ֆերմենտի ազդեցությամբ: Գլիցերատկինազ ֆերմենտի ազդեցությամբ ԱԵՖ-ի ֆոսֆատային մնացորդը միանում է գլիցերինի քիմիապես հավասարազոր երկու առաջնային սպիրտային խմբերից միայն մեկին: Այդ մասին է վկայում D-գլիցերո-3-

ֆոսֆատի միայն մեկ օպտիկական իզոմերի առաջացումը: Գլիցերինի սինտարիկ մոլեկուլի ասիմետրիկ ֆոսֆորիլացումը գլիցերատկինազ ֆերմենտի ազդեցությամբ ապացուցվել է իզոտոպային մեթոդով: 1-14C-գլիցերինի ֆոսֆորիլացման արդյունքում առաջանում է համապատասխան իզոտոպով նիշակրված D-գլիցերո-3-ֆոսֆատ (սխեմա 8):

Սխեմա 8



Ֆերմենտի սպեցիֆիկության ուսումնասիրումը կարևոր նշանակություն ունի ֆերմենտի ակտիվ կենտրոնի կառուցվածքի, ֆերմենտի և սուբստրատի փոխազդեցության և ֆերմենտատիվ ռեակցիայի մեխանիզմի պարզաբանման համար:

Փորձ 7. α -ամիլազ ֆերմենտի ազդեցության սպեցիֆիկության որոշումը

Ռեակտիվներ և սարքավորումներ՝ α -ամիլազ, սախարոզ, աղաթթու, թորած ջուր, փորձանոթ, օսլա, սառույց, թերմոստատ, յոդ, ֆեխինգի ռեակտիվ:

Փորձի ընթացքը

Վերցնել 4 փորձանոթ, առաջինի և երկրորդի մեջ ավելացնել 2-սկան մլ 1%-անոց օսլայի լուծույթ, 3-րդ և 4-րդի մեջ 2-սկան մլ սախարոզի 1%-անոց լուծույթ, 1-ին և 3-րդի մեջ ավելացնել 2-սկան մլ աղաթթու, 2-րդ և 4-րդ մեջ՝ 2-սկան մլ ամիլազ: 1-ին և 3-րդ փորձանոթները եռացնել: 2-րդ և 4-րդ ինկուբացնել 10 րոպե 37 °C-ում: Առաջին և երկրորդ փորձանոթների մեջ սառեցնելուց հետո ավելացնել մեկական կաթիլ յոդի սպիրտային լուծույթ: Փորձանոթների պարունակությունը ներկվում է դեղին գույնով՝ օսլան քայքայվել է: 3-րդ փորձանոթի մեջ ավելացնել 4 մլ 10%-անոց NaOH-ի լուծույթ թթվի

չեզոքացման և հիմնային միջավայրի ստեղծման համար: 3-րդ և 4-րդ փորձանոթներին ավելացնել 2-ական մլ ֆեյլինգի ռեակտիվ և եռացնել: 3-րդ փորձանոթում առաջանում է աղյուսակարմիր գունավորում, քանի որ աղաթթուն հիդրոլիզում է սախարոզը գլյուկոզի և ֆրուկտոզի: Գլյուկոզը օքսիդավերականգման ռեակցիայի մեջ է մտնում ֆեյլինգի ռեակտիվի հետ՝ առաջացնելով Cu_2O -ի աղյուսակարմիր նստվածք: 4-րդ փորձանոթում առաջացնում է երկնագույն գունավորում՝ ֆեյլինգի բացասական ռեակցիա:

Փորձի վերլուծություն

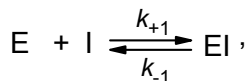
Ֆերմենտը սպեցիֆիկ է, ամիլազը քայքայում է α -1.4-գլիկոզիդային կապը օսլայում և չի ազդում β -1.2-գլիկոզիդային կապը սախարոզում: Աղաթթուն սպեցիֆիկ չէ, հիդրոլիզում է և α - և β -գլիկոզիդային կապը, դրա համար էլ քայքայում է և՛ օսլան և՛ սախարոզը:

2.7. Ինհիբիտորներ և ակտիվատորներ

Ֆերմենտների ազդեցության վրա ազդող կարևորագույն գործոններից են ռեակցիոն միջավայրում ինհիբիտորների կամ ակտիվատորների առկայությունը:

Ինհիբիտորների դասին են պատկանում այն միացությունները, որոնց ներկայությամբ տեղի է ունենում ֆերմենտային ռեակցիայի արգելակում: Օրինակ՝ կալիումի ցիանիդի ազդեցությամբ նկատվում է ցիտոքրոմօքսիդազի ֆերմենտային ակտիվության ճնշում, ինչը բերում է շնչառական շղթայի խախտման և սկսվում է օրգանների մեռակացում:

Ինհիբիտորի հետ ֆերմենտի փոխազդեցության արդյունքում առաջանում է ֆերմենտ-ինհիբիտորային կոմպլեքս, որն ընդունակ է դիսոցման.



որտեղ I -ն ինհիբիտորն է; E - Գ՝ ֆերմենտը; EI -Գ՝ ֆերմենտ-ինհիբիտորային կոմպլեքսը

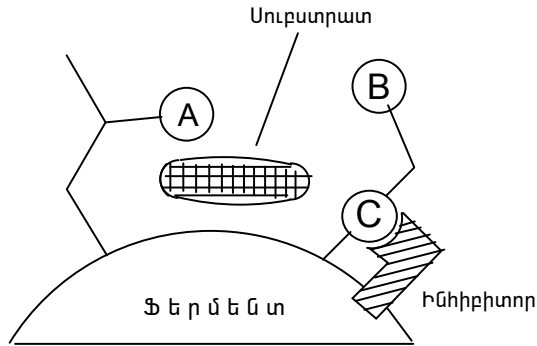
Կախված ֆերմենտ-ինհիբիտոր կապի ամրությունից, ֆերմենտի ազդեցության արգելակումը կարող է լինել դարձելի կամ ոչ դարձելի: Ֆերմենտի ոչ դարձելի ինհիբիցման վառ օրինակ է տրիպսինի վրա դիլզոպրոպիլֆոսֆատի ազդեցությունը, առաջացած ֆերմենտի դիլզոպրոպիլֆոսֆատային ածանցյալը բավականին կայուն միացություն է (k-1-ը մոտ է զրոյի) և ֆերմենտի ազդեցությունը դադարում է:

Դարձելի ինհիբիցման դեպքում, երբ ֆերմենտին միանում է սուբստրատին կառուցվածքով շատ մոտ նյութ, սուբստրատի և նրան կառուցվածքային մոտ մնանակի միջև սկսվում է մրցակցություն ֆերմենտի ակտիվ կենտրոնը զբաղեցնելու համար: Ինհիբիտորը և սուբստրատը ձգտում են մեկը մյուսին դուրս մղել ֆերմենտի հետ առաջացրած կոմպլեքսից: Ֆերմենտատիվ ռեակցիայի մնան տիպի արգելակումը կոչվում է մրցակցային ինհիբացում:

Մրցակցային ինհիբիցման օրինակ կարող է ծառայել սաթաթթվի դեհիդրման ռեակցիայի ճնշումը մալոնաթթվով: Կառուցվածքային մնանության պատճառով մալոնաթթուն զբաղեցնում է սուլցինատդեհիդրոգենազ ֆերմենտի ակտիվ կենտրոնի այն հատվածը, որը նախատեսված էր սաթաթթվի համար, սակայն նա ընդունակ չէ օքսիդացման: Քանի որ այս դեպքում EI կոմպլեքսի դիսոցման հաստատունը ավելի փոքր է, քան ES կոմպլեքսի դիսոցման հաստատունը, մալոնաթթուն մույնիսկ չնչին կոնցենտրացիաների դեպքում կարող է ճնշել սուլցինատդեհիդրոգենազ ֆերմենտի ակտիվությունը: Ընդ որում, սաթաթթվի կոնցենտրացիայի հետագա մեծացման դեպքում ֆերմենտի ինհիբիցումը լրիվ անհետանում է:

Որոշ դեպքերում ինհիբացումը տեղի է ունենում ոչ մրցակցային մեխանիզմով, քանի որ ինհիբիտորը չի միանում ֆերմենտի ակտիվ կենտրոնի ֆունկցիոնալ խմբերի հետ, որոնք կապված են սուբստրատի հետ: Այս դեպքում ինհիբիցման աստիճանը կախված չէ սուբստրատի կոնցենտրացիայից: Համաձայն մակաձված համապատասխանելիության սկզբունքի, ոչ մրցակցային ինհիբիցման դեպքում ինհիբիտորը ճնշում է ֆերմենտի ակտիվությունը, խախտելով սուբստրատի հանդեպ ֆերմենտատիվ ռեակցիայի համար ակ-

տիվ A, B և C խմբերի անհրաժեշտ դասավորվածությունը՝ սպիտակուցային մոլեկուլի ընդհանուր դեֆորմացման հետևանքով (նկ. 4):



Նկ. 4. Ոչ մրցակցային ինհիբիցում (համաչայն ճկուն ակտիվ կենտրոնի մեխանիզմի):

Ֆերմենտային ռեակցիաների ոչ մրցակցային ինհիբացումն այլ կերպ կոչվում է ալոստերիկ (կառուցվածքային չկապված ինհիբիցում), իսկ սպիտակուց-ֆերմենտները, որոնք ընդունակ են ոչ մրցակցային ինհիբիցման, կոչվում են ալոստերիկ ֆերմենտներ կամ ալոստերիկ սպիտակուցներ: Ալոստերիկ ինհիբիցումը համարվում է օրգանիզմում ընթացող կենսաքիմիական պրոցեսների կարգավորման ամենակարևոր մեխանիզմներից մեկը:

Փորձ 8. Ակտիվատորների և ինհիբիտորների ազդեցությունը ամիլազի ակտիվության վրա

Ռեակտիվներ և սարքավորումներ՝ α -ամիլազ, NaCl, CuSO₄, թորած ջուր, փորձանոթ, օսլա, սառույց, թերմոստատ, յոդ, ֆեղինգի ռեակտիվ:

Փորձի ընթացքը

Թքի ամիլազի ակտիվությունը արտահայտվում է օսլայի 0,1%-անոց լուծույթի քանակով (մլ), որը հիդրոլիզվում է 1 մլ չնոսրացված թրով 30 րոպեի ընթացքում, 37⁰C ջերմաստիճանում: NaCl-ը համարվում է թքի ամիլազի ակտիվատոր, իսկ CuSO₄-ը որպես ծանր մետաղի աղ, դեմատուրացիայի է ենթարկում ամիլազ ֆերմենտը, ուստի ինհիբացում է նրա ակտիվությունը:

Փորձը դրվում է 30 փորձանոթներում, որոնք բաժանում ենք 3 շարքի, յուրաքանչյուրում 10-ական փորձանոթ: 1-ին շարքի փորձանոթները ստանդարտ են՝ համեմատելու համար, 2-րդ փորձանոթների՝ ակտիվատորների հետ, 3-րդների՝ ինհիբիտորների: Բոլոր (30) փորձանոթներին ավելացնել 1-ական մլ թորած ջուր:

Կոլբայի մեջ լցնել 9 մլ թորած ջուր և ավելացնել 1 մլ թուք, ստանալով թթի նոսրացում 1:10-ի: Երեք շարքերի առաջին փորձանոթներին ավելացնել 1-ական մլ 1:10 նոսրացված թուք, խառնել, ստանալով 1:20 նոսրացում: 1-ին փորձանոթից 1մլ ավելացնել 2-րդի մեջ, ստացվում է 1:40: Այս պրոցեսը կրկնել բոլոր փորձանոթներում, 10-ից 1մլ-ը թափել: Այսպիսով, բոլոր փորձանոթներում պարունակվում է 1 ական մլ տարբեր նոսրացման ամիլազ ֆերմենտը:

N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	N10
1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Բոլոր (30) փորձանոթներին ավելացնել 0.1% օսլայի լուծույթ 2-ական մլ: Երկրորդ շարքի փորձանոթներին (ակտիվատոր) ավելացնել 1 մլ 1%-անոց NaCl-ի լուծույթ, երրորդ շարքին (ինհիբիտոր)՝ 1-ական մլ 1%-անոց CuSO₄-ի լուծույթ, առաջին շարքի փորձանոթներին՝ 1-ական մլ թորած ջուր: Դնել ինկուբացիայի ջրային բաղնիքում 37⁰C-ում 30 րոպե: Հետո փորձանոթները սառեցնել և բոլոր 30-ի մեջ ավելացնել 1-2 կաթիլ յոդի լուծույթ: Յուրանքաչյուր շարքում որոշել ամիլազի ակտիվությունը, դրա համար գտնել այն փորձանոթները, որտեղ ֆերմենտները դեռ քայքայում են օսլան (կարմիր գունավորում յոդի հետ) և այն փորձանոթը, որտեղ գունավորումը կապույտ է ֆերմենտը չի քայքայել օսլան:

Փորձի վերլուծություն

Ընդունենք, որ առաջին շարքի 4-րդ փորձանոթում ունենք կարմիր գունավորում, 5-ում՝ կապույտ: 4-ում պարունակում է 1-160 մլ նոսրացված թուք, որը հիդրոլիզել է 2 մլ 0,1%-անոց օսլան, իսկ 1 մլ չնոսրացված թուքը քայքայում է X մլ 0,1%-անոց օսլան:

1/160մլ - 2մլ 0,1% օսլայի լուծույթ

1մլ - Xմլ

$$X = 160 \times 2 = 320 \text{մլ (0.1\% \text{օսլա})}$$

Ամիլազի ակտիվությունը 320 մլ միավոր է:

Երկրորդ շարքի (ակտիվատոր) 9-րդ փորձանոթում կարմիր գունավորում է, 10-ում՝ կապույտ:

1/5120մլ - 2մլ 0,1%-անոց օսլայի
լուծույթ

1մլ - Xմլ

$$X = 10240 \text{մլ (0.1\% \text{օսլա})}$$

Ամիլազի ակտիվությունը մեծացել է ակտիվատորի առկայությամբ 30 անգամ՝ $10240/320 = 30$:

Երրորդ շարքի բոլոր 10 փորձանոթներում կապույտ գունավորում է, օսլան չի քայքայվել, քանի որ ամիլազան պասիվ վիճակում է:

Փորձ 9. *Ֆերմենտի կատալիտիկ ակտիվության անօրգանական կատալիզատորների համեմատումը*

Ռեակտիվներ և սարքավորումներ՝ α -ամիլազ, աղաթթու, թորած ջուր, փորձանոթ, օսլա, թերմոստատ, յոդ, ֆեիլինգի ռեակտիվ:

Փորձ ընթացքը

Երեք փորձանոթների մեջ լցնել 2մլ (յուրաքանչյուրի մեջ) 1%-անոց օսլայի լուծույթ: Առաջին փորձանոթի մեջ ավելացնել ամիլազ ֆերմենտի լուծույթը, 2-րդ և 3-րդում՝ 2N աղաթթվի լուծույթ: 1-ին և 3-րդը դնել ինկուբացիայի 37°C ջերմաստիճանի տակ հինգ թույլով, իսկ երկրորդ փորձանոթը եռացնել: Հետո բոլոր փորձանոթները սառեցնել և ավելացնել մեկական կաթիլ յոդի լուծույթ: 1-ին և 3-րդ փորձանոթներում առաջանում է դեղին գունավորում, իսկ 2-րդում՝ կապույտ:

Փորձի վերլուծությունը

Ֆերմենտը օժտված է ավելի բարձր կատալիտիկ ակտիվությամբ, որովհետև նա ազդում է համեմատաբար մեղմ պայմաններում 37°C ջերմաստիճանում, որոնց դեպքում աղաթթուն չի ազդում: Օսլան աղաթթվով հիդրոլիզելու համար անհրաժեշտ է ավելի բարձր ջերմաստիճան՝ եռացում:

Օգտագործված գրականություն

1. Սաղյան Ա. Ս., Ամինաթթուների, պեպտիդների և սպիտակուցների քիմիա // Դասագիրք, 452 էջ, Երևան, ԵՊՀ հրատարակչություն, 2015:
2. Մ. Ա. Մացոյան, Է. Մ. Միքայելյան, Մ. Ի. Աղաջանով, Ֆերմենտներ, Երևանի Մխիթար Հերացու անվ. Պետական բժշկական համալսարան, 2003:
3. А.А. Гершкович, В.К. Кибирев, Синтез пептидов. Реагенты и методы // Киев. Наукова думка, 1987.
4. Методы экспериментальной микологии. Справочник. Под ред. В.И. Билай, Н.Думка, 550 с., 1982.
5. Peterson G. Determination of total protein // Meth. Enzymol. – 1983, 91(1), 95–119.

ԲՈՎԱՆԴԱԿՈՒԹՅՈՒՆ

ԳԼՈՒԽ 1. Պեպտիդներ	3
1.1. Պեպտիդային սինթեզ	4
Փորձ 1. <i>N-t-BOC-գլիցինի սինթեզ</i>	5
Փորձ 2. <i>N-t-BOC-գլիցին-N-օքսիսուկցինիդիային էսթերի սինթեզը (Կարբօքսիլ խմբի ակտիվացումը)</i>	6
Փորձ 3. <i>N-t-BOC-գլիցին-(S)-ալիլգլիցինի սինթեզը</i>	7
ԳԼՈՒԽ 2. Ֆերմենտներ	9
2.1. Ֆերմենտների դասակարգումը	10
2.2. Ֆերմենտների կառուցվածքը	13
2.3. Ֆերմենտի անջատումը, մաքրումը և բնութագրումը	14
Փորձ 4. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> α -ամիլազ ֆերմենտի ակտիվությունը որոշումը	15
2.4. Ջերմաստիճանի ազդեցությունը ֆերմենտների ակտիվության վրա	16
Փորձ 5. Ջերմաստիճանի ազդեցությունը α -ամիլազ ֆերմենտի ակտիվության վրա	17
2.5. Սիջավայրի ազդեցությունը Ամիլազի վրա	18
Փորձ 6. <i>pH-ի ազդեցությունը α-ամիլազ ֆերմենտի ակտիվության վրա:</i>	20
2.6. Ֆերմենտի ազդեցության սպեցիֆիկությունը	21
Փորձ 7. α -ամիլազ ֆերմենտի ազդեցության սպեցիֆիկության որոշումը	27
2.7. Ինհիբիտորներ և ակտիվատորներ	28
Փորձ 8. Ակտիվատորների և ինհիբիտորների ազդեցությունը ամիլազի ակտիվության վրա	30
Փորձ 9. Ֆերմենտի կարալիտիկ ակտիվության անօրգանական կարալիզատորների համեմատումը	32
Օգտագործված գրականություն	33

ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

Ֆարմացիայի ինստիտուտ

Ֆարմաքինիայի և ֆարմակոգնոզիայի ամբիոն

ՊԵՊՏԻԴՆԵՐ, ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐ

*Լաբորատոր աշխատանքների ձեռնարկ
«Բնական միացությունների քիմիա» առարկայից*

Համակարգչային ձևավորումը՝ Կ. Չալաբյանի
Կազմի ձևավորումը՝ Ա. Պատվականյանի
Հրատ. սրբագրումը՝ Լ. Հովհաննիսյանի

Ստորագրված է տպագրության՝ 00.00.2018:

Չափսը՝ 60x84 ¹/₁₆: Տպ. մամուլը՝ :

Տպաքանակը՝ :

ԵՊՀ հրատարակչություն

ք. Երևան, 0025, Ալեք Մանուկյան 1

www.publishing.am