

# ENZYMOLOGIE

Pracovní sešit k přednáškám z biochemie  
pro studenty biologických kombinací

II

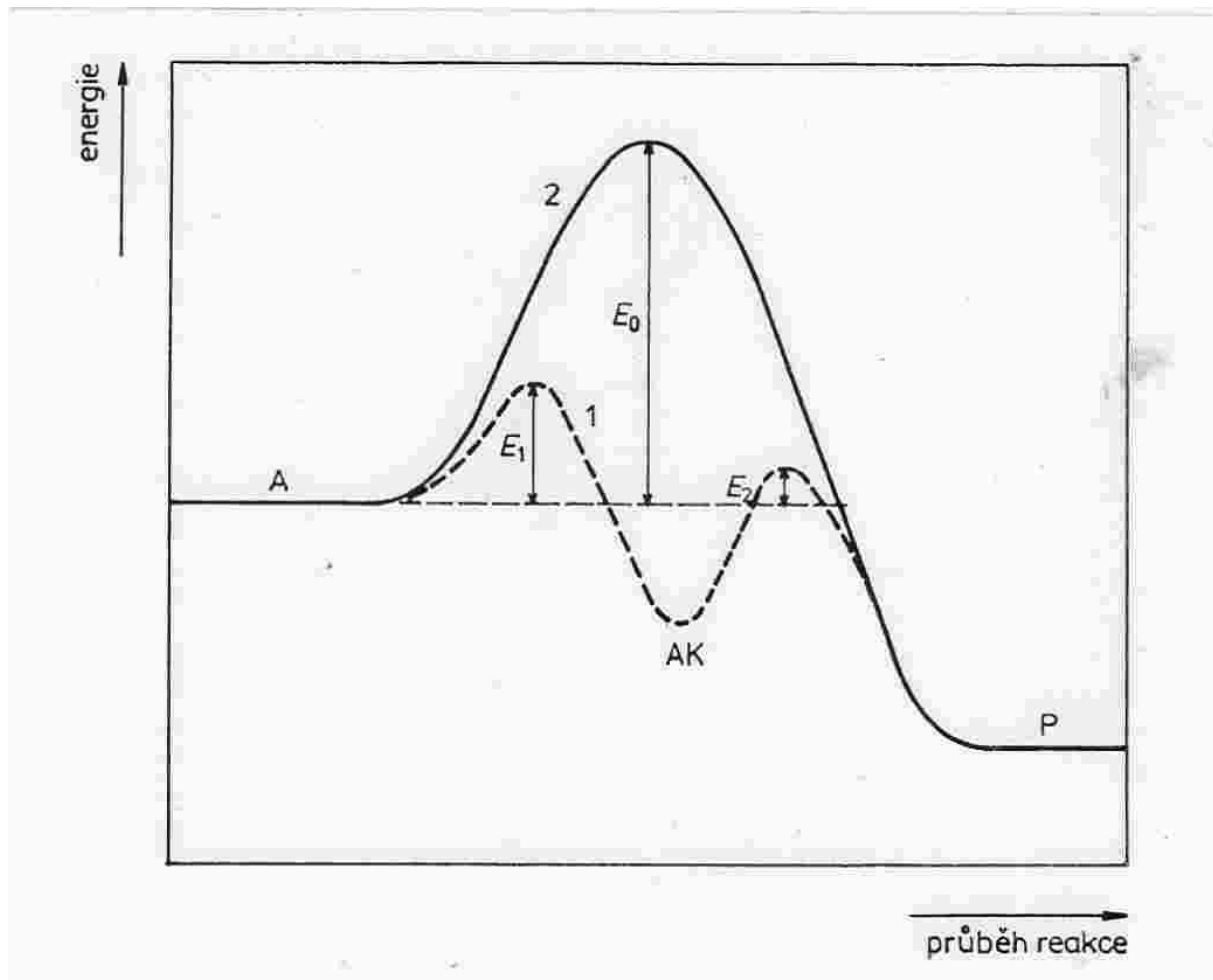
*ZDENĚK GLATZ*

2004

# ENZYMOLOGIE

## Katalýza - Berzelius 1838

- katalyzátor**
- látky urychlující chemické reakce
  - nemění rovnováhu chemických reakcí
  - snižují aktivační energii



**Požadavky na biokatalyzátory :****A. Reakce musí probíhat cíleně.****B. Musí probíhat specificky****C. Jejich aktivita musí být přesně regulovaná****Biokatalyzátory :**

- globulární bílkoviny
- RNA - CZECH a ALTMAN (1986)

**Historie poznání enzymů**

- 1878 - KUHNEN - ENZYM - *En Zyme* - v kvasnicích
- 1860 - PASTEUR - *vis vitalis* - životní síla v kvasinkách
- LIEBIG - *fermenty* - chemické látky
- 1897 - BUCHNER - extrakt kvasinek katalyzuje kvašení
- 1926 - SUMNER - bílkovinná povaha enzymů - ureasa

**Enzymologie :**

- studium struktury enzymů
- studium kinetiky enzymových reakcí
- studium reakčních mechanismů
- studium forem a lokalizace enzymů
- studium vztahu enzymů k patologii organismů
- praktické využití enzymů
- příprava a studium umělých enzymů

**Názvosloví**

1. triviální - *trypsin, pepsin, ptyalin*

2. název substrátu + asa - *lipasa, amylasa*

reakce + asa - *oxidasa, hydrolasa*

3. substrát + reakce - *alkoholdehydrogenasa*

substrát<sub>1</sub> + substrát<sub>2</sub> + reakce - *alkohol: NAD-oxidoreduktasa*

### Enzymová nomenklatura

IUB 1961 - nejnovější 1984

- |                   |   |
|-------------------|---|
| 1. OXIDOREDUKTASY | - oxidačně redukční reakce<br>- <i>alkoholdehydrogenasa</i>                   |
| 2. TRANSFERASY    | - přenos skupin<br>- <i>aspartátaminotransferasa</i>                          |
| 3. HYDROLASA      | - hydrolytické štěpení (+ H <sub>2</sub> O)<br>- <i>proteasy</i>              |
| 4. LYASY          | - nehydrolytické štěpení (bez H <sub>2</sub> O)<br>- <i>karbonátanhydrasa</i> |
| 5. IZOMERASY      | - přesuny atomů a skupin<br>- <i>glukosafosfátizomerasa</i>                   |

- 6. LIGASY**
- vznik vazby za současného rozkladu ATP
  - *asparaginsynthetasa*

<b>EC 1.1.1.27</b>		<b>1.</b>	<b>1.</b>	<b>1.</b>	<b>27</b>
<b><u>Enzyme Commission</u></b>					
<b><u>Třída</u></b>	- <i>oxidoreduktasa</i>				
<b><u>Podtřída</u></b>	- <i>skupina CHOH</i>				
<b><u>Podpodtřída</u></b>	- <i>koenzym NAD</i>				
<b><u>Číslo enzymu</u></b>					

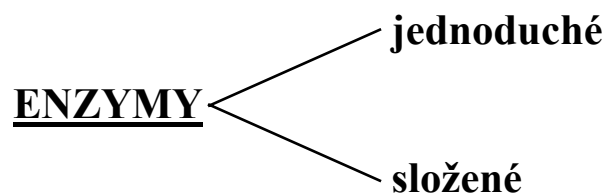
**Vyjadřování aktivity enzymů :**

- smluvené jednotky
- IU - International Unit - mezinárodní jednotka (IUB 1961)
  - počet mikromolů přeměněného substrátu za minutu
- kat - katal (IUB 1971)
  - počet molů přeměněného substrátu za sekundu

**Specifická aktivita** - aktivita vztažená na mg bílkoviny

**Číslo přeměny** - počet molů substrátu přeměněných molem enzymu za jednu sekundu

## STRUKTURA ENZYMŮ

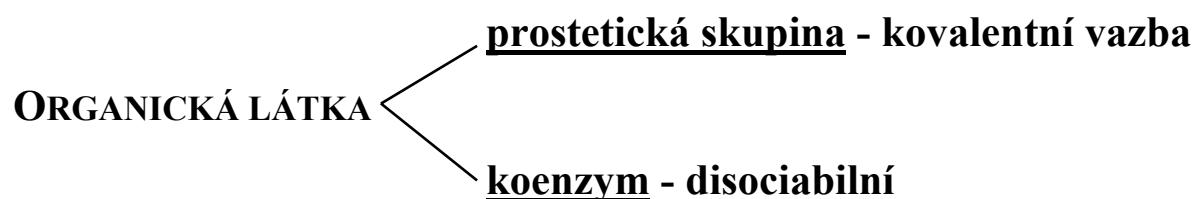


**KOFAKTOR + APOENZYM → HOLOENZYM**

**Kofaktor - kovový ion nebo organická látka**

### METALOENZYMY

<b>kovový ion</b>	<b>enzym</b>
<b>Zn<sup>2+</sup></b>	<b>alkoholdehydrogenasa alkalická fosfatasa karbonátanhydrasa</b>
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	<b>fosfohydrolasy fosfotransferasy</b>
<b>Mn<sup>2+</sup></b>	<b>arginasa</b>
<b>Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup></b>	<b>cytochromy peroxidasa katalasa</b>
<b>Cu<sup>2+</sup>, Cu<sup>+</sup></b>	<b>tyrosinasa diaminoxidasa</b>



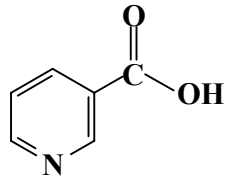
## KOFAKTORY A VITAMINY

VITAMIN - FUNK - “amin potřebný pro život”

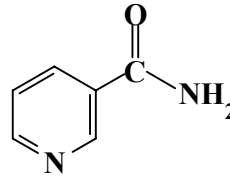
Vitamin	Kofaktor	Funkce
<u>rozpuštěné ve vodě</u>		<u>přenos (reakce)</u>
thiamin - B <sub>1</sub>	thiamindifosfát TPP	aldehydicke s.
riboflavin - B <sub>2</sub>	FMN, FAD	H
k.nikotinová(nikotinamid)	NAD <sup>+</sup> , NADP	H
k.pantothenová	CoA	acylové s.
k.listová	k.listová	C <sub>1</sub> skupin
pyridoxin - B <sub>6</sub>	pyridoxalfosfát	aminoskupiny
kobalamin - B <sub>12</sub>	kobalamin	izomerace
k.askorbová - C	k.askorbová	hydroxylace
biotin - H	biotin	COOH
k. lipoová	k. lipoová	H
<u>rozpuštěné v tucích</u>		
karotenoidy - A		proces vidění
kalciferoly - D		metabolismus Ca
tokoferoly - E		antioxidans
maftochinony - A		srážení krve

## NIKOTINAMIDOVÉ KOENZYMY

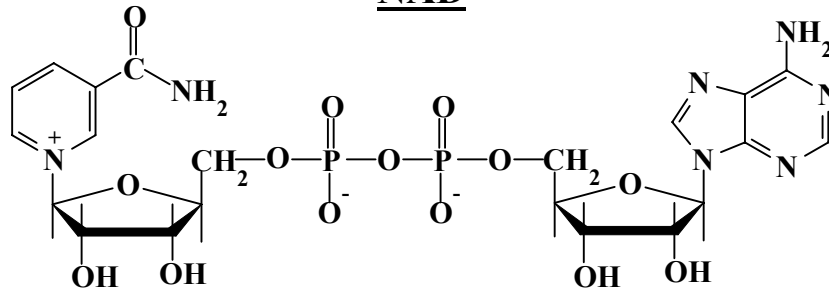
k. nikotinová



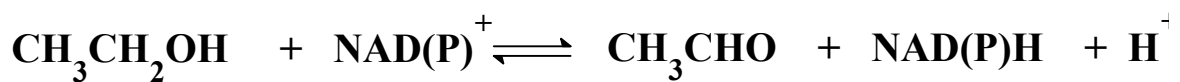
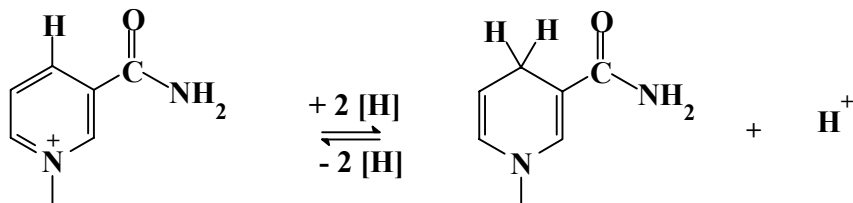
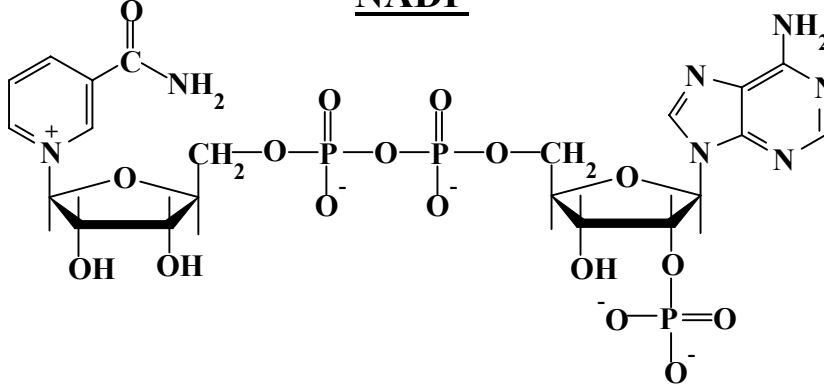
nikotinamid



NAD<sup>+</sup>



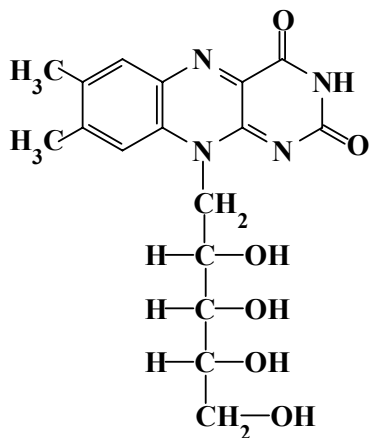
NADP<sup>+</sup>



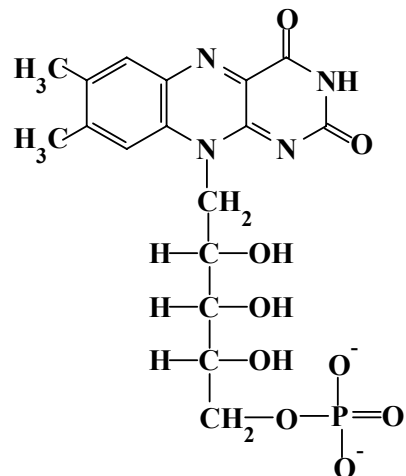


## FLAVINOVÉ KOENZYMY

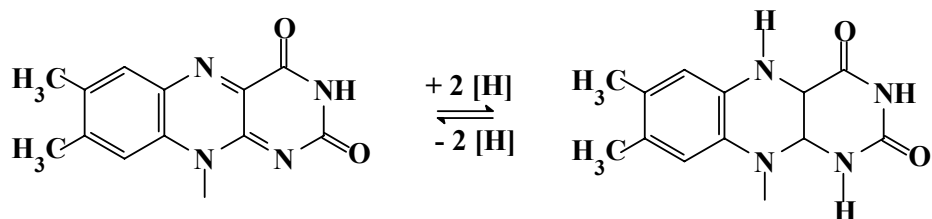
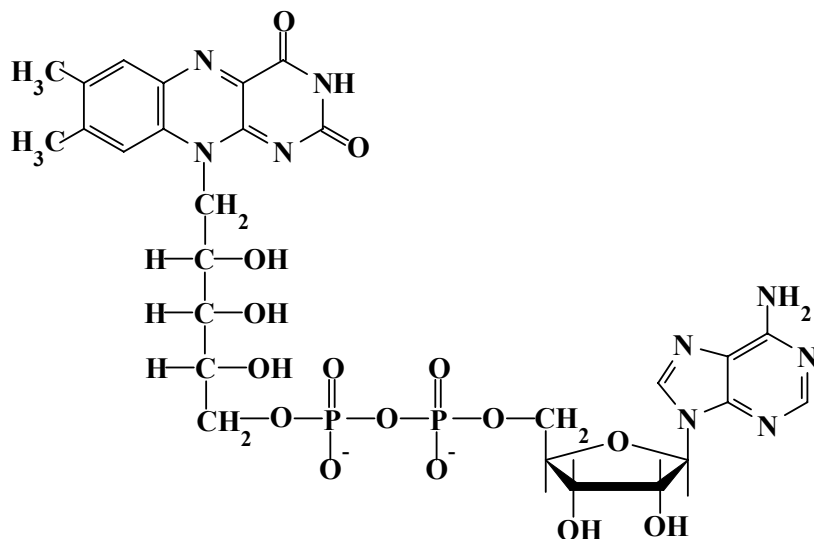
### riboflavin

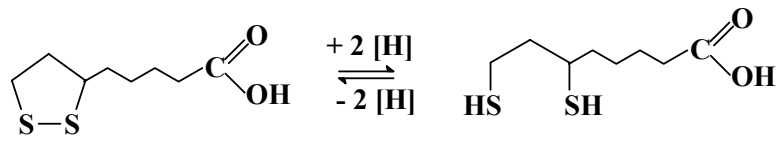
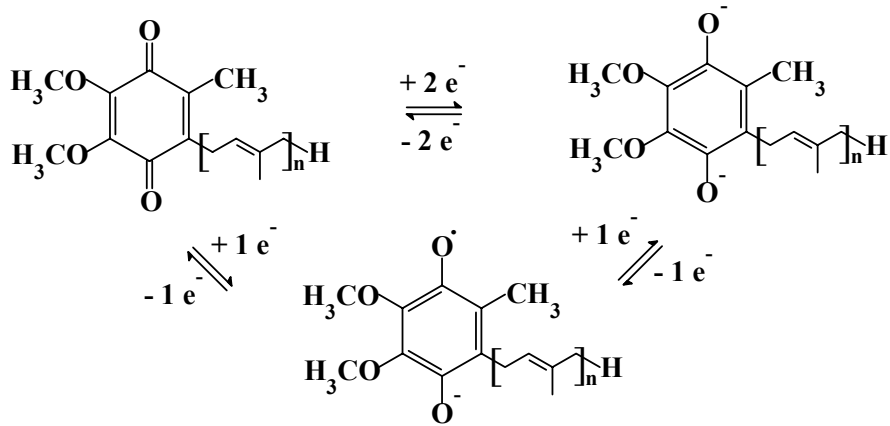
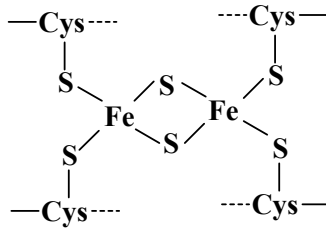
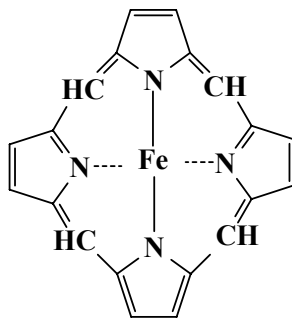
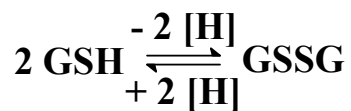


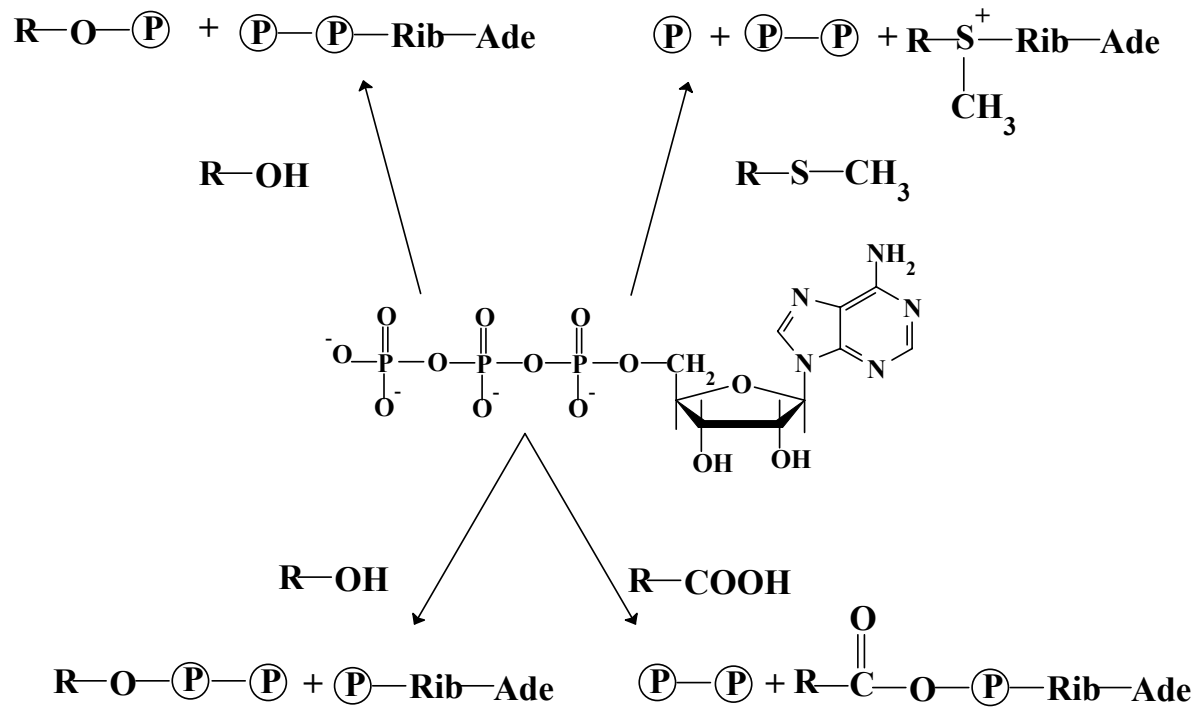
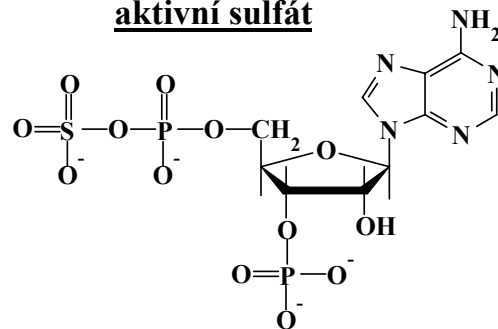
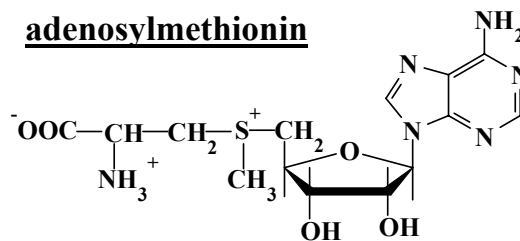
### FMN

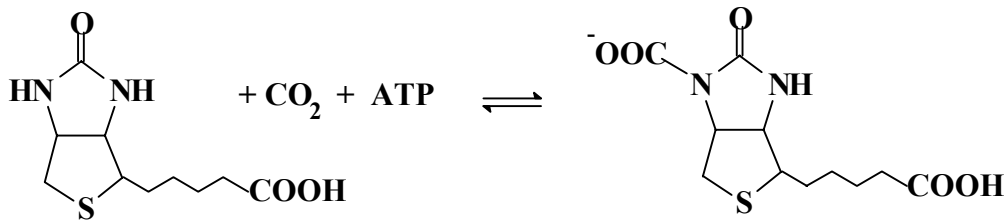
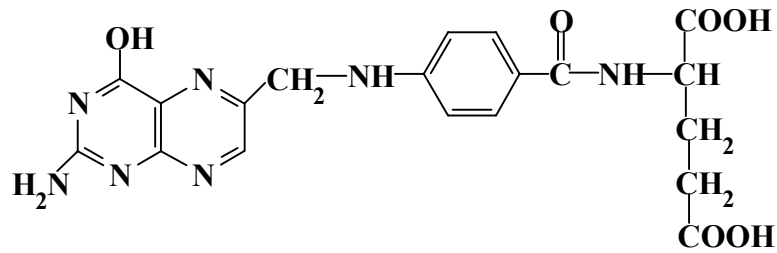
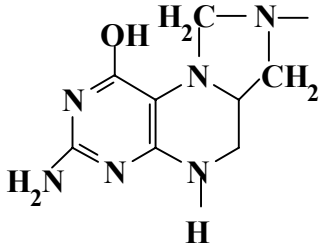
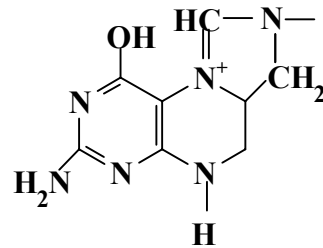
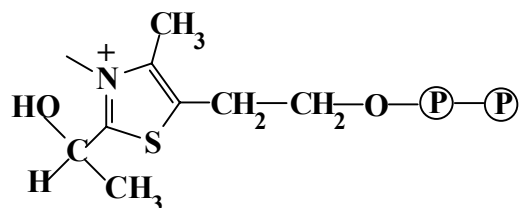
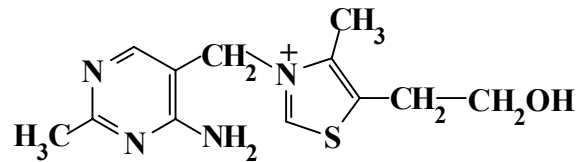


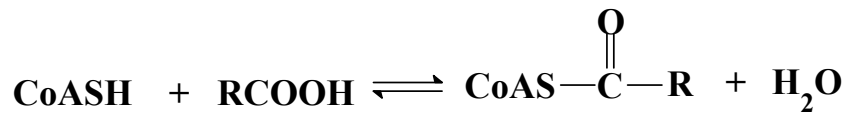
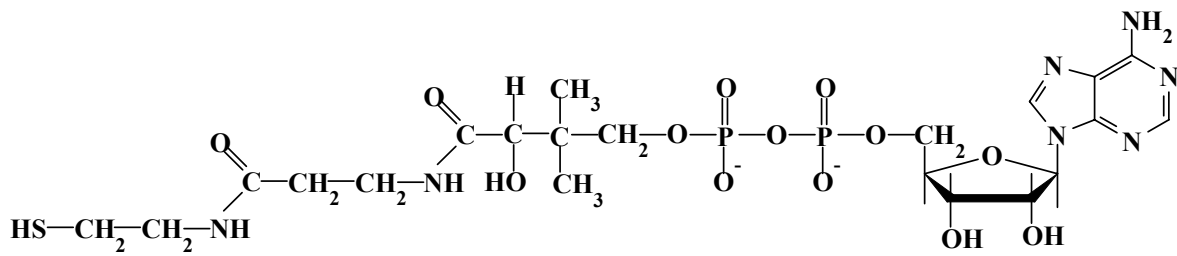
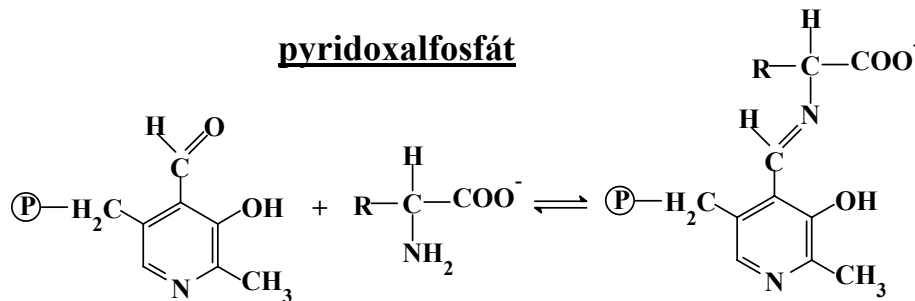
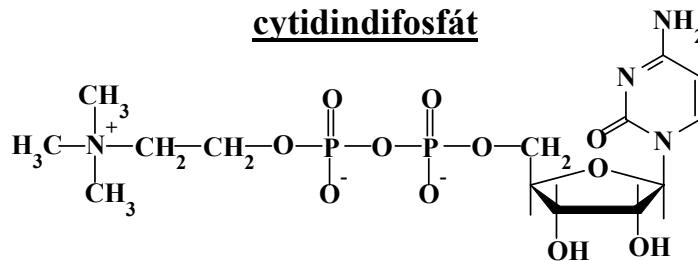
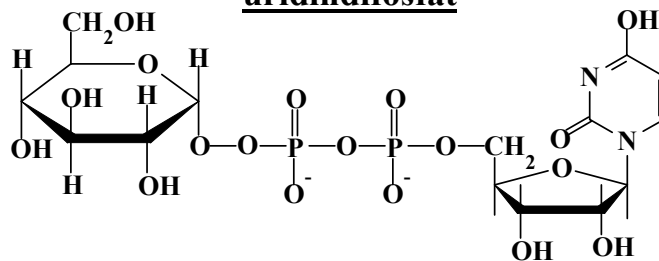
### FAD



**k.lipoová****ubichinon****ferredoxiny****hem****glutathion**

ATPaktivní sulfátadenosylmethionin

**biotin****tetrahydrolistová k.****methylenetetrahydrolistová k.****methenyltetrahydrolistová k.****thiamin**

koenzym A - CoA - CoASHpyridoxalfosfátcytidindifosfáturidindifosfát

**Lyasy a ligasy - bez kofaktoru nebo již popsáním kofaktorem**

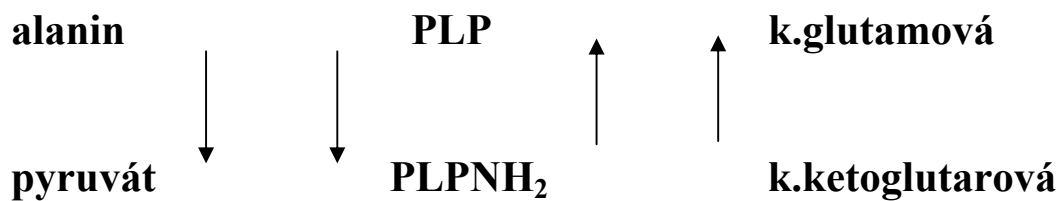
**TPP**

**Hydrolasy - bez kofaktoru**

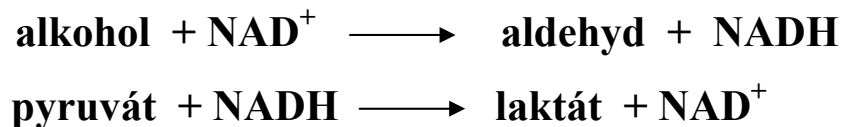
**Izomerasy - většinou bez kofaktoru nebo kobalamin,**

### **Regenerace kofaktorů**

**1. Prostetická skupina se regeneruje na téže enzymové bílkovině :**



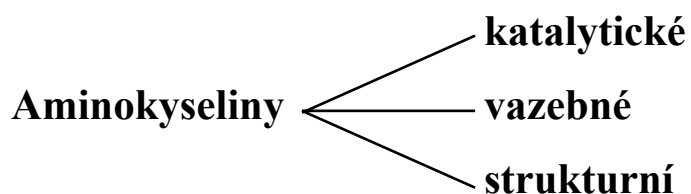
**2. Koenzym se odštěpí napojí se na jiný apoenzym a regeneruje se v jiné enzymové reakci :**

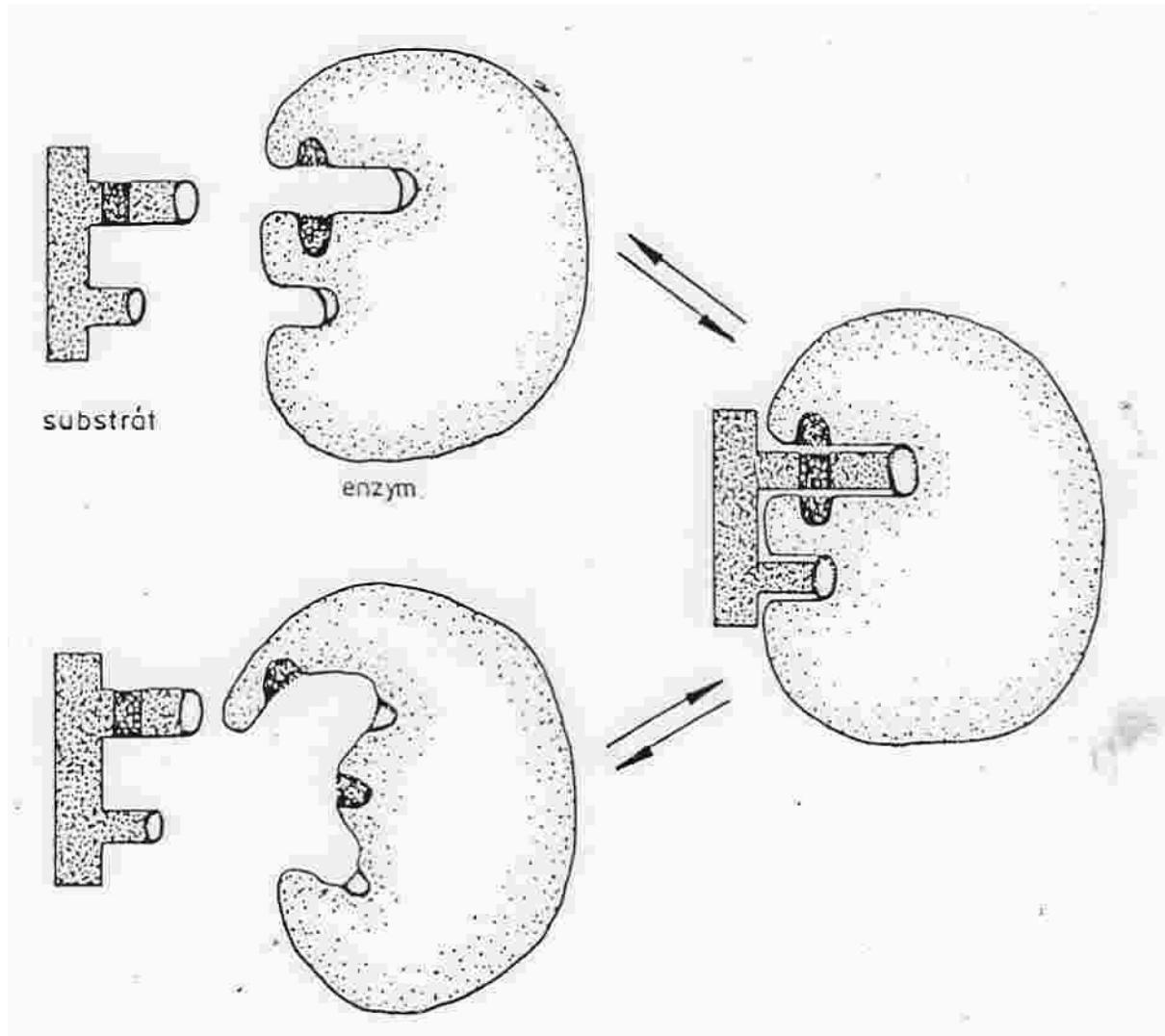


### **Enzymové bílkoviny**

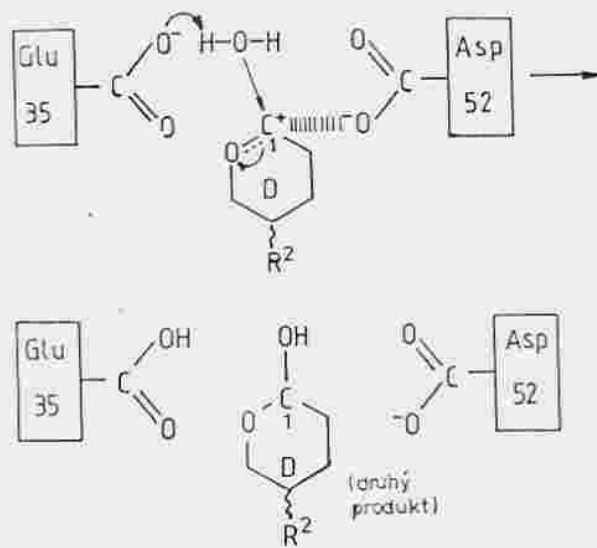
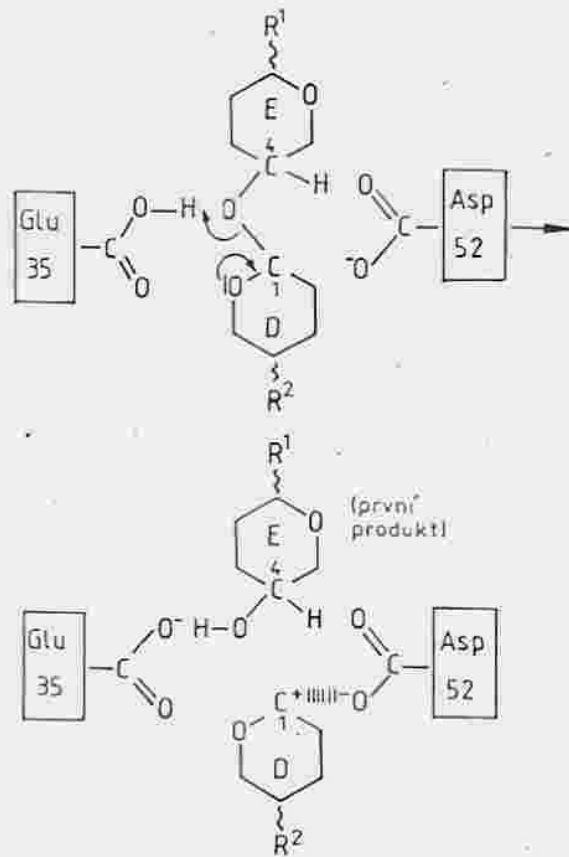
- monomerní
- oligomerní
- multienzymové komplexy

### **Aktivní místo enzymů**



**Fischer - 1894 - *teorie o zámku a klíči*****Koshland - 1959 - *teorie indukovaného přizpůsobení***

## Mechanismus působení lysozymu





## Specifita enzymové reakce

specifita reakční - účinku - jaká reakce proběhne

specifita substrátová - absolutní

- skupinová

- stereospecifita

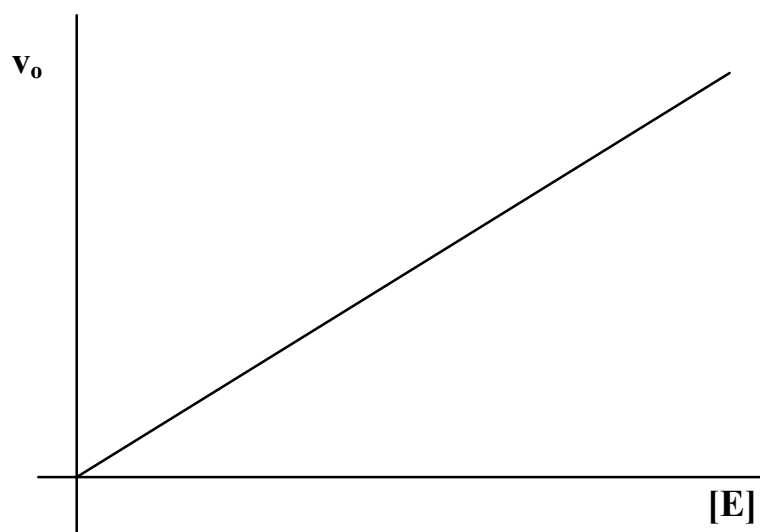
## ENZYMOVÁ KINETIKA

### Reakce s jedním substrátem

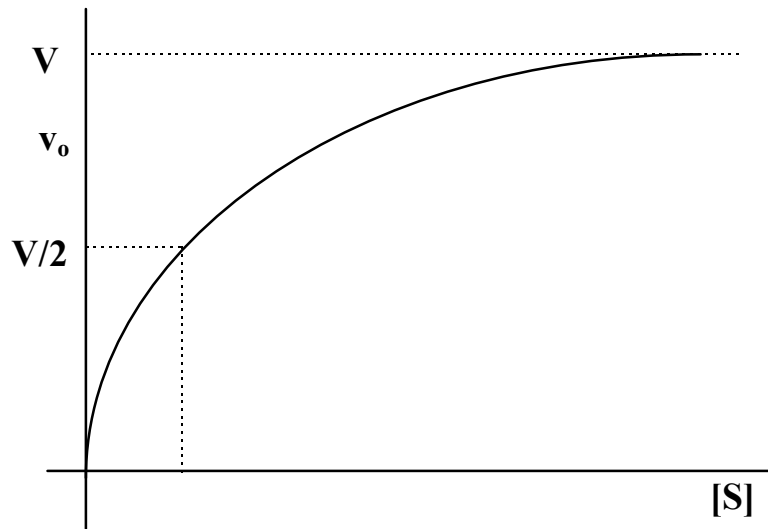
BROWN 1902

MICHAELIS MENTENOVÁ 1913

a) závislost počáteční rychlosti na koncentraci enzymu



## b) závislost počáteční rychlosti na koncentraci enzymu



## Rovnice Michaelis Mentenové

$$v = \frac{V \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

$v$  - počáteční reakční rychlost

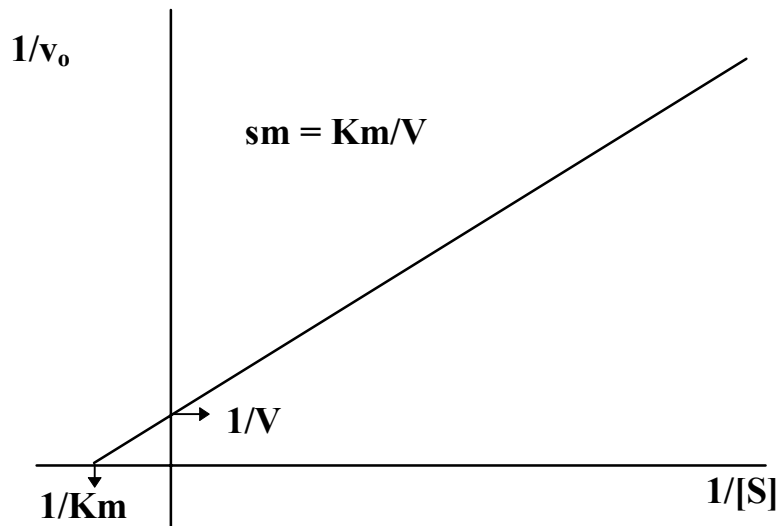
$V$  - maximální (limitní) reakční rychlost

$K_m$  - Michaelisova konstanta

$$v = \frac{V \cdot [S]}{K_m + [S]} \begin{cases} [S] \gg K_m & v = \frac{V \cdot [S]}{[S]} = V \\ [S] \ll K_m & v = \frac{V \cdot [S]}{K_m} = \text{konst.} \cdot [S] \end{cases}$$

Stanovení  $K_m$  :

### LINWEAVER BURKE



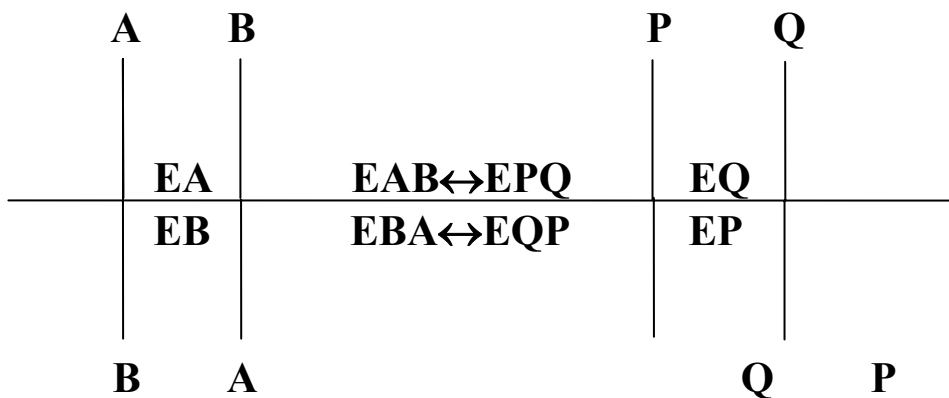
$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{[S]}$$

### Reakce se dvěma substráty

Mechanismy - CLELAND

Sekvenční :

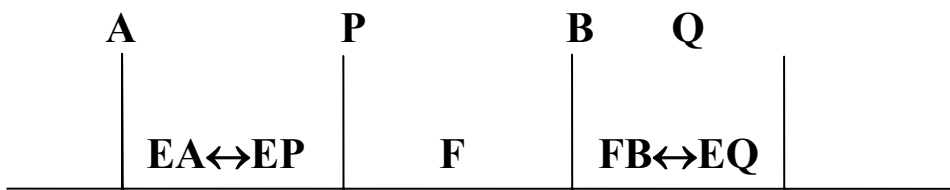
a) náhodný



b) *uspořádaný*



Pingpongový



### Látky ovlivňující činnost enzymů

Látky ovlivňující činnost enzymů {

- aktivátory
- inhibitory

*Aktivátory* - zvyšují rychlost enzymové reakce

*Inhibitory* - snižují rychlost enzymové reakce

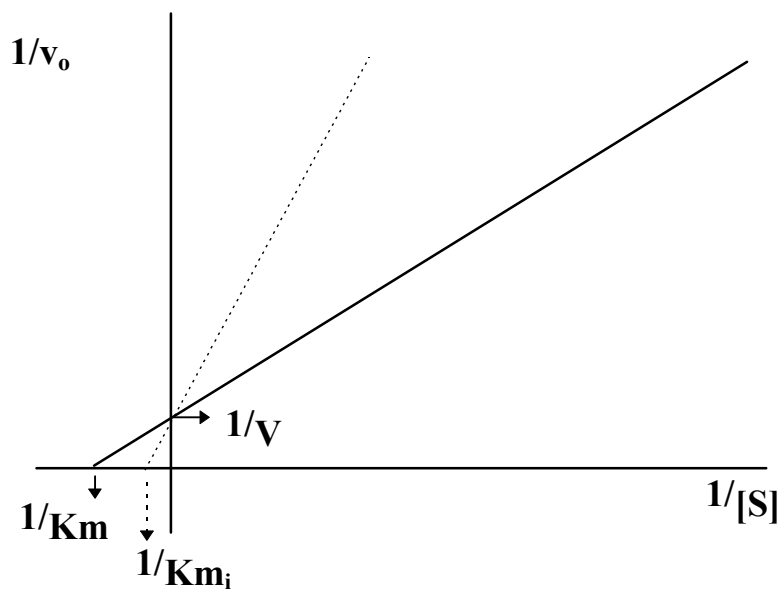
### Inhibice

- Ireverzibilní inhibice



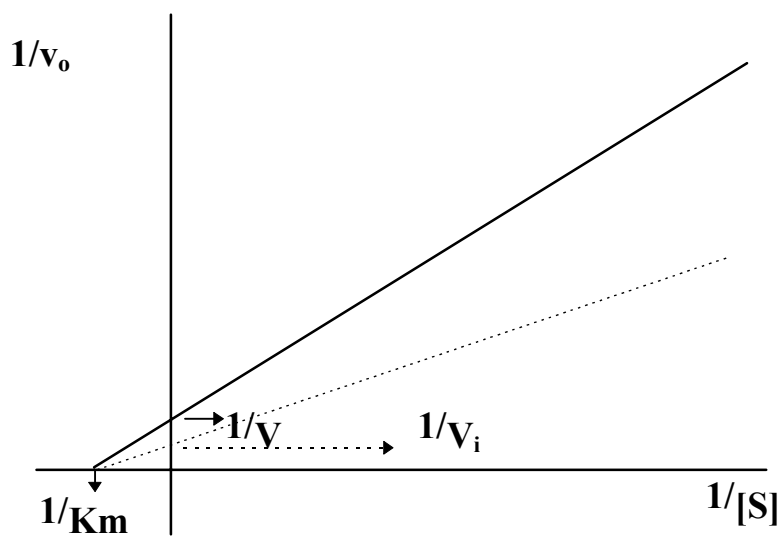
- Reverzibilní inhibice

*Kompetitivní inhibice*



$$K_{m_i} > K_m \quad V_i = V$$

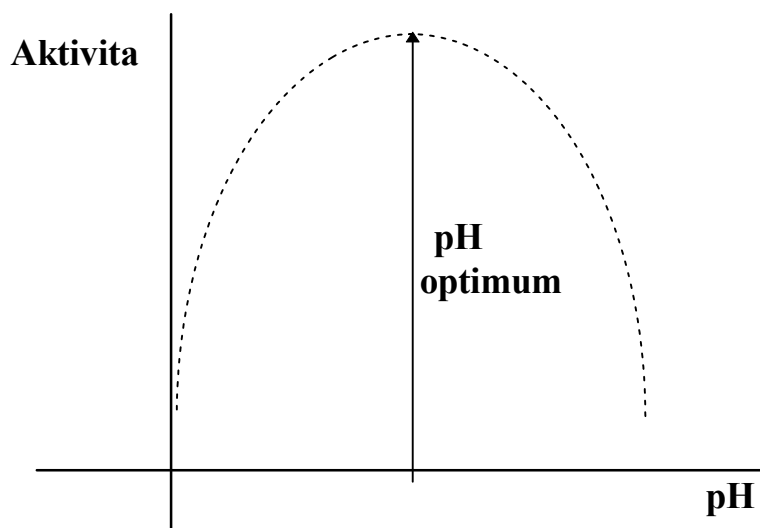
*Nekompetitivní inhibice*



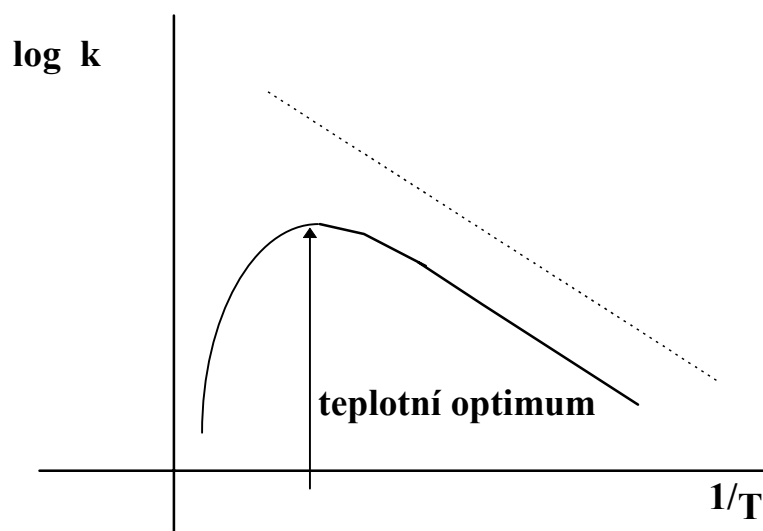
$$K_{m_i} = K_m \quad V_i < V$$

**Fyzikálně chemické faktory**  
**ovlivňující rychlost enzymové reakce**

*Vliv pH*



*Vliv teploty*



## Regulace činnosti enzymu

- Regulace koncentrace enzymu
- Allosterická regulace MONOD 1963
- Regulace zpětnou vazbou
- Regulace kovalentní modifikací
- Kompartmentace

## Využití enzymů

- bioanalytická chemie
  - stanovení substrátů
  - stanovení inhibitorů
  - nepřímé stanovení
- lékařství
- průmyslové využití
- průmyslové využití
  - prací prostředky
  - krmivářství
  - potravinářství
  - farmacie
- enzymová katalýza v organické chemie

## Umělé enzymy

- Synzymy
- Abzymy