

## Enzymy v praxi

- částečně zmíněno již u použití imobilizovaných enzymů
- praktické využití mají samozřejmě i volné enzymy

## Enzymy pro molekulární biologii

- přerušují řetězce DNA či RNA
- spojují řetězce DNA či RNA
- syntetizují nové řetězce DNA či RNA
- přidávají nebo odstraňují skupinu fosfátu na koncích nukleových kyselin
- ochraňují / povlékají / splétají / rozplétají řetězec DNA

## Enzymy přerušující DNA / RNA

### ▪ endonukleasy

- restrikční endonukleasy, restriktasy (3 typy)
- deoxyribonukleasy (DNasy)
  - DNasa I, fazolová nukleasa (*Phaseolus aureus*, mung bean)
- ribonukleasy (RNasy)
  - RNasa T1, U2, A, CL3, PhyM, B, H

### ▪ exonukleasy

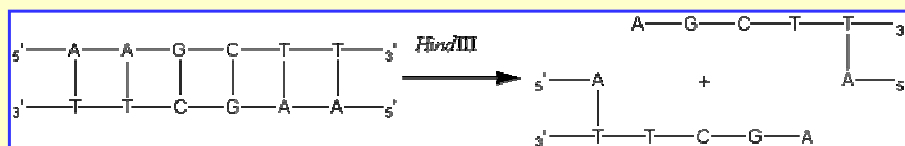
- exonukleasy III a VII
- lambda exonukleasa
- T7 gen 6 exonukleasa
- fosfodiesterasa z jedových žláz (venom)
- fosfodiesterasa ze sleziny

### ▪ endo- a exonukleasy

- nukleasa Bal31
- nukleasa z *Neurospora crassa*
- nukleasy P1 a S1

## Restrikční enzymy

- degradační enzymy, které reorganizují a stříhají DNA ve specifických "střihových" místech = restrikční místa
- tři typy:
  - I: náhodné štípání na nemetylovaných dsDNA délky 4 až 7 kbp
  - II: štípají v dvojité symetrické sekvenci dsDNA
  - III: rozpoznávají specifické penta- nebo hexamerní cílové sekvence v dsDNA, ALE štípají o 25 až 27 nukleotidů dále směrem k 3'-konci



## DNasy a RNasy

- **DNasa I**
  - degraduje DNA hydrolýzou vnitřních fosfodiesterových vazeb
- **fazolová nukleasa**
  - vysoce specifická pro DNA nebo RNA postrádající uspořádanou strukturu
  - hydrolyzuje ve směru 5' -> 3'
- **RNasa H**
  - specificky degraduje RNA řetězce v DNA:RNA heteroduplexech

## Exonukleasy

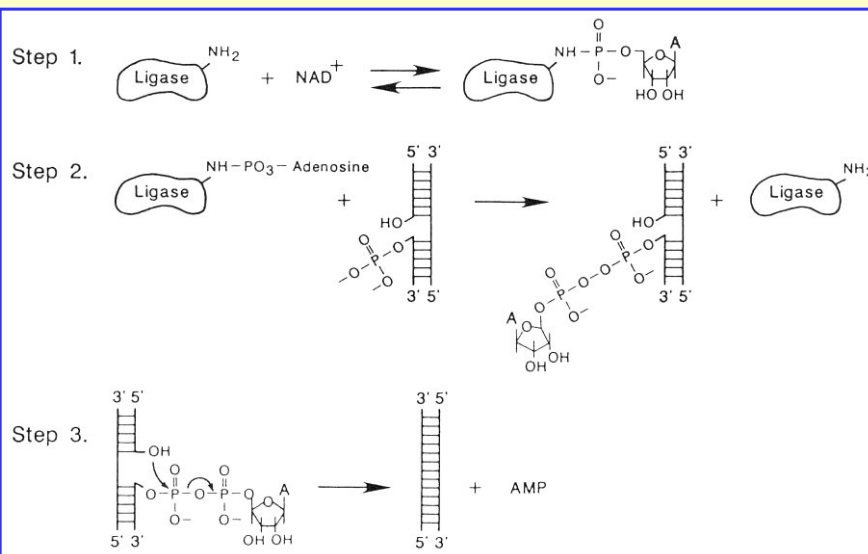
- **exonukleasa III**
  - 3' -> 5' exonukleasová aktivita plus další tři aktivity, pouze na dsDNA, neúčinkuje na ssDNA
- **exonukleasa VII**
  - účinkuje jak v 3' -> 5' tak v 5' -> 3' směru
  - specifická pro jednořetězcové nukleové kyseliny
  - neuvolňuje mononukleotidy
- **lambda exonukleasa**
  - účinkuje v 5' -> 3' směru, na dvouřetězcové nukleové kyseliny

## Endo- i exonukleasy

- nukleasa Bal31
  - vysoce specifická endodeoxynukleasová aktivita pro jednořetězcové DNA
  - exonukleasová aktivita dokáže současně degradovat jak 3' tak 5' konce DNA duplexu
- nukleasa z *Neurospora crassa*
  - na ssDNA nebo RNA účinkuje jako endonukleasa
  - na dsDNA a ssDNA účinkuje jako exonukleasa

## Ligasy - spojování DNA / RNA

- T4 DNA ligasa T4 RNA ligasa DNA ligasa z *E. coli*



## Enzymy syntetizující nové vazby kostry DNA a RNA

- DNA polymerasa I
- velký fragment DNA polymerasy I (Klenowův fr.)
- T4 DNA polymerasa
- modifikovaná T7 polymerasa
- Taq polymerasa
- RNA polymerasa
  - bakteriální
  - z bakteriofága (T3, T7, SP6)
- reversní transkriptasa
- poly(A)-polymerasa
- terminální deoxynukleotidyltransferasa
- polynukleotidfosforylasa

## Enzymy přidávající / odstraňující fosfokupinu na koncích NA

- T4 polynukleotidkinasa
- alkalická fosfatasa
- kyselá pyrofosfatasa z tabáku

## Enzymy (a další proteiny) co chrání, rozvíjí nebo zavinují DNA

- DNA methylasy
- proteiny vážící ssDNA nebo ssRNA
  - RecA protein, SSB protein, Gen 32 protein
- topoisomerasy

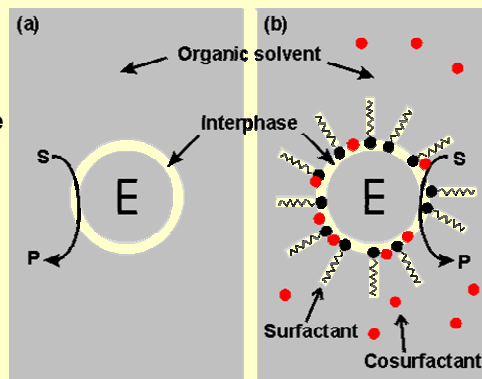
## Enzymy v organických rozpouštědlech

- voda je nevhodné médium pro většinu reakcí organické chemie
- mnohé reaktanty (kyslík, steroidy, lipidy) jsou mnohem rozpustnější v organickém rozpouštědle
- mnohé produkty jsou ve vodném prostředí labilní
- nadbytek vody (55,5 M koncentrace) často upřednostní hydrolytické reakce proti jiným užitečnějším procesům
  - transesterifikační reakce esteras a lipas
  - posun termodynamických rovnováh žádoucím směrem - enzym sám jako katalyzátor nemění velikost rovnovážné konstanty katalyzované reakce!
- stabilizace - nehrozí mikrobiální kontaminace
- velmi často zde enzym funguje v dvoufázovém systému
  - usnadnění separačních kroků
- polaritu prostředí charakterizuje partiční koeficient log P
  - rozdělovací poměr daného rozpouštědla mezi oktanolem a vodou

$$\text{Log } P = \text{Log}_{10} \left( \frac{[Materiál]_{\text{oktanol}}}{[Materiál]_{\text{voda}}} \right)$$

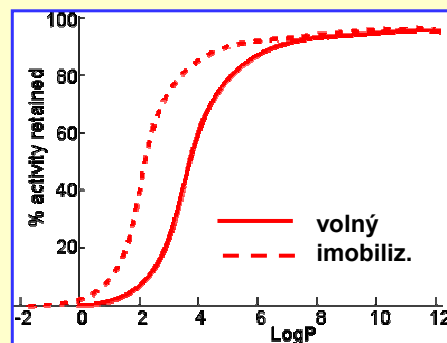
## Enzymy v organických rozpouštědlech

- v zásadě existují dvě možnosti:
- téměř bezvodý enzym je suspendován v organickém rozpouštědle
  - na jeho povrchu je velmi tenká vodná vrstvička
- enzym je rozpuštěn v reverzních micelách tvořených molekulami surfaktantu a kosurfaktantu
  - surfaktant: cetyltrimethylamonium bromide (CTAB), bis(2-ethylhexyl) sulfosukcinát Na (AOT), fosfatidylcholin, tetraethylenglycoldodecylether - nachází se na rozhraní vodné interfáze a org. rozpouštědla
  - kosurfaktant (butanol, hexanol, oktanol) - pokud je přítomen, tak modifikuje polaritu interfáze



## Polarita prostředí

- aktivita enzymu je úměrná polaritě prostředí vyjádřené pomocí log P
- ve speciálních případech může být užitečné použít těžkou vodu D<sub>2</sub>O
- příklady log P pro nejčastěji používaná rozpouštědla



Solvent	LogP	Solvent	LogP
Butanone	0.3	1,1,1-trichloroethane	2.8
Ethyl acetate	0.7	Carbon tetrachloride	2.8
Butanol	0.8	Dibutyl ether	2.9
Diethyl ether	0.8	Cyclohexane	3.1
Methylene chloride	1.4	Hexane	3.5
Butyl acetate	1.7	Petroleum ether (60-80)	3.5
Di-isopropyl ether	2.0	Petroleum ether (80-100)	3.8
Benzene	2.0	Dipentyl ether	3.9
Chloroform	2.2	Heptane	4.0
Tetrachloroethylene	2.3	Petroleum ether (100-120)	4.3
Toluene	2.7	Hexadecane	8.7

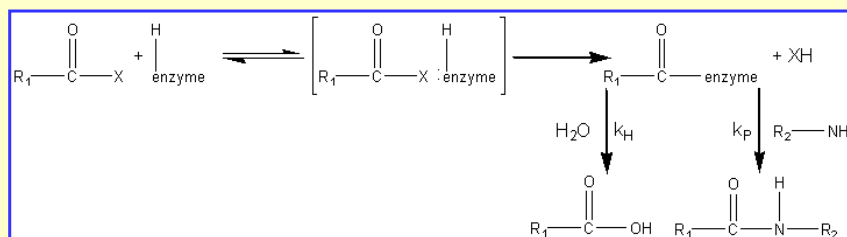
## Průmyslové proteasy

Enzyme	Preferred cleavage sites <sup>a</sup> (N-terminal → C-terminal)
Bromelain	-Lys→Z; -Arg→Z; -Phe→Z; -Tyr→Z
Chymotrypsin	-Trp→Z; -Tyr→Z; -Phe→Z; -Leu→Z
Papain	-Phe-AA→Z; -Val-AA→Z; -Leu-AA→Z; -Ile-AA→Z
Pepsin	-Phe(or Tyr,Leu)→Trp(or Phe,Tyr)-
Thermolysin	-AA→Leu-; -AA→Phe-; -AA→Ile-; -AA→Val-
Trypsin	-Arg→Z; -Lys→Z

<sup>a</sup> AA represents any amino acid residue and Z represents amino acid residues, esters or amides. The cleavage sites (→) are those preferred by the pure enzyme; crude preparations may have much broader specificities.

## Proteasy

- jsou schopny katalyzovat vznik polymerů z konc. roztoků bílkovin, peptidů nebo aminokyselin (plasteiny)
- využívá se pro odbarvování a odstranění špatné chuti (sojové proteiny, biomasy)
- syntetické využití při tvorbě peptidů - využití stereospecifity, omezení nutnosti chránění postranních skupin
  - důležitá volba pH, vhodné další skupiny usnadňující precipitaci produktů
  - kinetická kontrola - přenos skupiny ne na vodu, ale na alternativní AK nebo peptid, co je silnějším nukleofilem než voda:



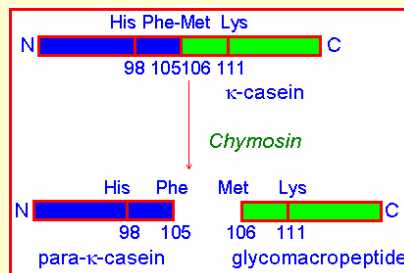


## Enzymy v potravinářství

- **pekařství** - obilniny a tedy i mouka obsahují širokou škálu enzymů důležitých pro proces pečení - isoenzymy  $\alpha$ -amylas, pullulanasy, isoamylasy, proteasy, lipoxygenasy, lipasy, esterasy a fosfatasy
  - konverze škrobu na jednodušší cukry, jejich využití kvasnicemi pak produkuje  $\text{CO}_2$  - textura pečiva
  - $\alpha$ -amylasy se přidávají k mouce - zlepšení kvality těsta a následně i chleba, prodloužení trvanlivosti
- **kvašení** - výroba zejm. piva
  - přídavky  $\alpha$ - a  $\beta$ -amylasy - degradace dextrinů, vyšší podíl alkoholu
  - přídavek pullulanasy - štěpení  $\alpha$ -1,6- větvení škrobu
  - $\beta$ -glukanasa - snižování nežádoucí viskozity beta glukánů
  - papain - bránění vzniku polyfenolových komplexů bílkovin, ale nadměrná hydrolýza bílkovin nežádoucí

## Další enzymové procesy

- **sacharifikace škrobu**
  - glukoamylasy,  $\alpha$ -amylasa
- **mléčné produkty**
  - chymosin (syřidlo) srážení bílkoviny kaseinu po jeho rozštěpení
  - lipasy - zrání sýrů, specifická vůně a aroma
  - $\beta$ -galaktosidasy
  - štěpení laktosy - intolerance vedoucí k gastrointestinálním obtížím, galaktosa a glukosa se metabolizují snadno

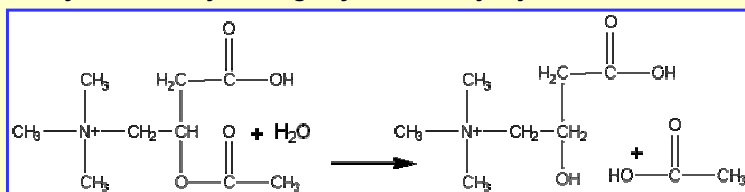


# Trendy

- **enzymy stále zůstávají v popředí zájmu biotechnologie**
- **relativně málo enzymů se produkuje ve velkém (> kg) a ve stavu vhodném pro průmyslové nasazení**
- **nové enzymy se hledají z přírodních zdrojů a selekcí existujících mikrobiálních kmenů**
- **průmyslově rozšířené enzymy nachází další nové aplikace**
- **nové enzymy jsou navrhovány metodami molekulového modelování, bioinformatickými technikami a genetickým a proteinovým inženýrstvím**
- **jsou navrhovány a syntetizovány nové organické katalyzátory s využitím "enzymologického" know-how**
- **začínají se prosazovat i složitější enzymové komplexy**

## "Nepřirozené" substráty

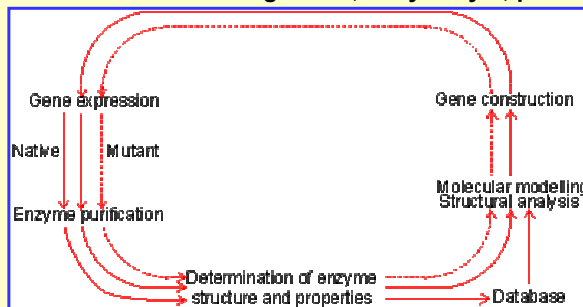
- mnohé enzymy nejsou zcela specifické pro své přirozené substráty
- některé mohou katalyzovat i reakce neodpovídající jejich zařazení
  - např. v nepřirozeném prostředí dvou fází (org. rozpouštědla)
  - lipasa (hydrolasa) v nevodném prostředí funguje jako transesterasa
  - řada oxidas můž jako akceptor místo kyslíku využívat širokou škálu jiných oxidantů (benzochinon, ferricinium, ferrikyanid, ...)
- **acetylcholinesterasa - příprava L-karnitinu**
  - syntetická racemická směs acetyl-DL-karnitinu, z ní se D-anomer enzymaticky zhydrolyzuje
  - směs acetyl-L-karnitinu a D-karnitinu se separuje na ionexu
  - acetyl-L-karnitin je biologicky aktivní stejně jako L-karnitin



- **ač je rychlostní konstanta pro acetyl-D-karnitin 10<sup>4</sup>x nižší než pro acetylcholin, výtěžnost je stejná (acetylcholin při nadbytku inhibuje...)**

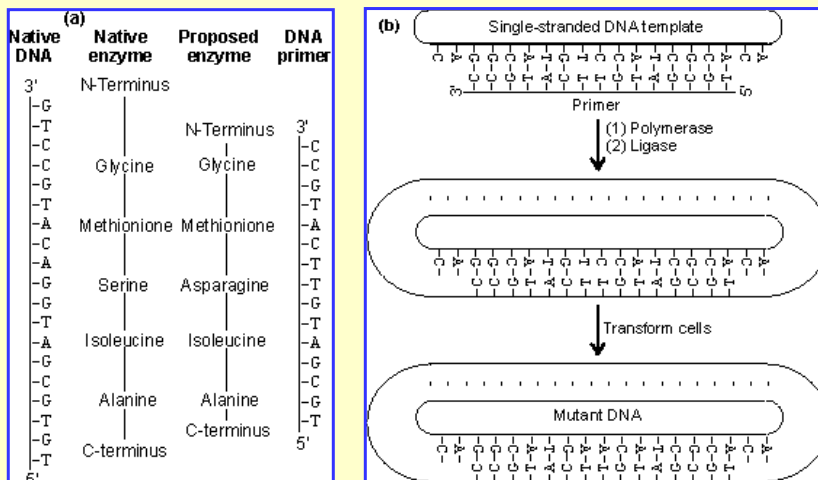
## Enzyme engineering

- lze vylepšit nebo změnit řadu vlastností
- výtěžek enzymu z produkčního organismu
  - z pomalu rostoucího mikrobiálního organismu, z rostlinného materiálu nebo živočišné tkáně se naklonuje do rychle a snadno rostoucího bezpečného produkčního mikrobiálního kmenu
  - zvýší se počet kopií genu, co enzym kóduje
- proteinové inženýrství
  - izoluje se požadovaný enzym, určí se charakteristiky, složení akt. místa
  - porovná se s informacemi v databázích, navrhne se lepší struktura
  - site-directed mutagenesis, nový enzym, pokud není lepší, pokračuje se



## Site-directed mutagenesis

- nahrazování 1 nebo 2 aminokyselin ve struktuře enzymu, probíhá v následných krocích
- cílené plánování změn - modelování struktury enzymu a potenciálních substrátů, informace o podobných enzimech z DB



## Synzymy - umělé enzymy

- syntetické poly / oligomery vykazující enzymovou aktivitu - **synzymy**
- mají místo vázící substrát a katalyticky aktivní skupiny
  - první se vytváří rel. snadno, druhé je mnohem náročnější
  - často je vzorem přechodový stav očekávaný v plánované reakci
- katalýza odpovídá saturační MM kinetice:



- některé synzymy jsou pouze derivatizované proteiny
  - přidáním  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5]^{3+}$  k myoglobinu (přenašeč kyslíku) - naváže se na 3 povrchové histidinové zbytky - se získá umělá askorbát oxidasa
- zcela umělé synzymy
  - polyglutamová kyselina - esterasová aktivita - hydrolyzuje 4-nitrofenylacetát, pH optimum 5,3,  $K_M = 2 \text{ mM}$
  - cyklodextriny (toroidní molekuly ze 6 až 10 1,4-D-glukosových jednotek, vytváří hydrofobní komůrku 0,5 až 1 nm širokou a 0,7 nm hlubokou, místo jednoho C-6 hydroxylu se přidal pyridoxal - vznikla transaminasa

## Abzymy - katalyticky aktivní protilátky

- protilátky vytvořené proti analogům předpokládaného přechodového stavu očekávané reakce
- např. fosfonátové estery **R-PO<sub>2</sub>-OR'** jsou stabilní analogy přechodového stavu při hydrolýze karboxyesterů
  - protilátky připravené proti této sloučenině fungují jako esterasy
  - $K_m$  v mikromolární oblasti, zrychlení reakce až o tři řády oproti nekatalyzované reakci

## Molekulární otisky

- MIPs, molecularly imprinted polymers - analog přechodového stavu je obklopen strukturou polymeru při jeho vzniku
  - polymer poskytne vhodné skupiny vytvářející vazebné a katalyticky aktivní zbytky
  - poté se vymyjí templátové molekuly
- velmi stabilní, odolné při vysokých teplotách

## **ZÁVĚR**

- **enzymová technologie prochází fází zralosti a evoluce**
  - zralost - existuje teorie popisující fungování enzymů a vztahy mezi funkcí a primární strukturou a 3D-konfigurací
  - evoluce - existují široké možnosti vývoje užitečných procesů a materiálů využívajících získané vědomosti
- **budoucnost enzymů je jasně pozitivní**
  - mnohem širší nasazení
  - objevy nových enzymů
  - vylepšování existujících enzymů
  - katalýza nových reakcí
- **enzymologie startuje nové období enzymových technologií**