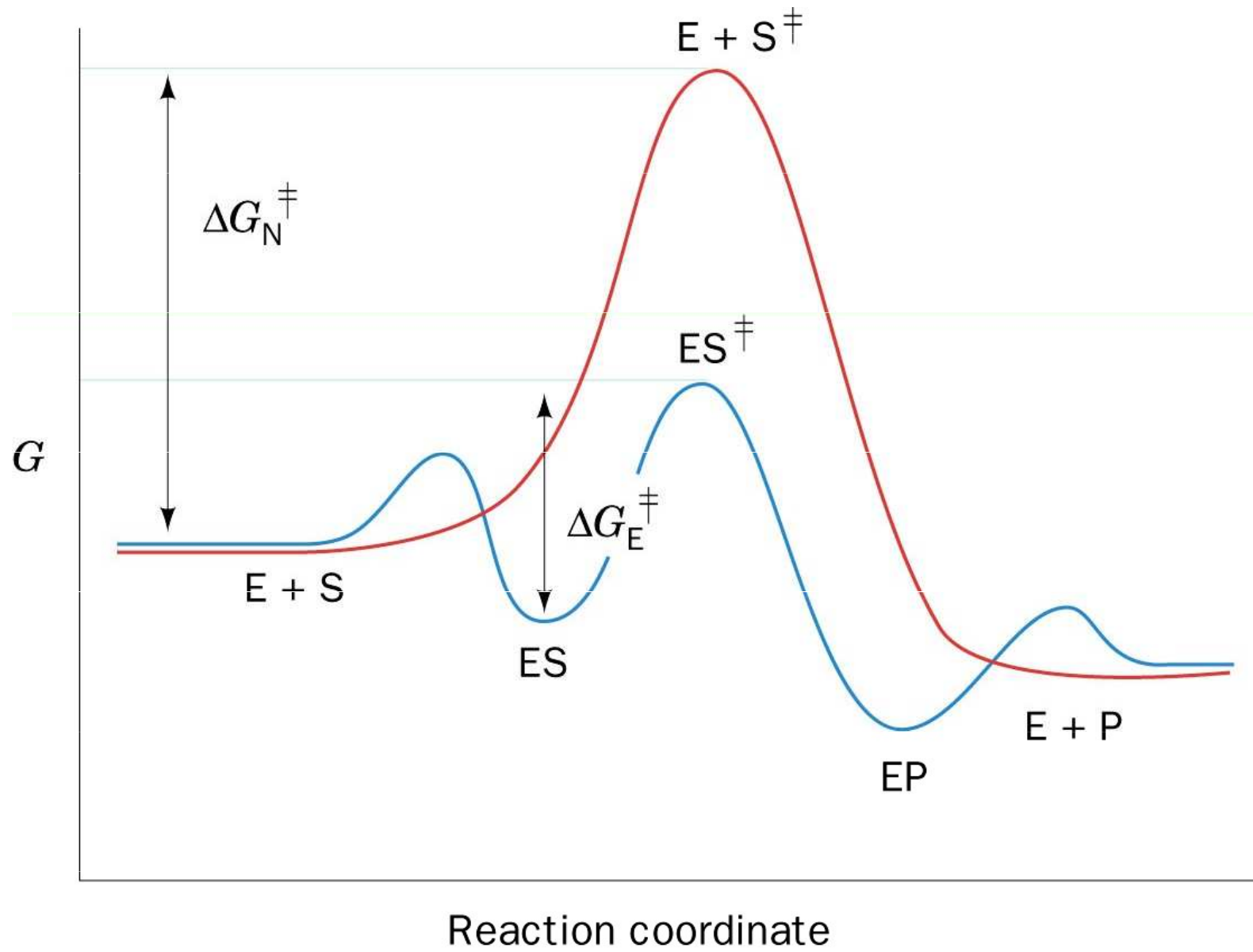


ENZYMOLOGIE

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

Enzymy – molekulární stroje



Rychlostní konstanta :

- Bez katalýzy - $0,23 \text{ s}^{-1}$
- Pt - $1,3 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$
- Enzym - katalasa - $3,7 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$

Enzymy – molekulární stroje

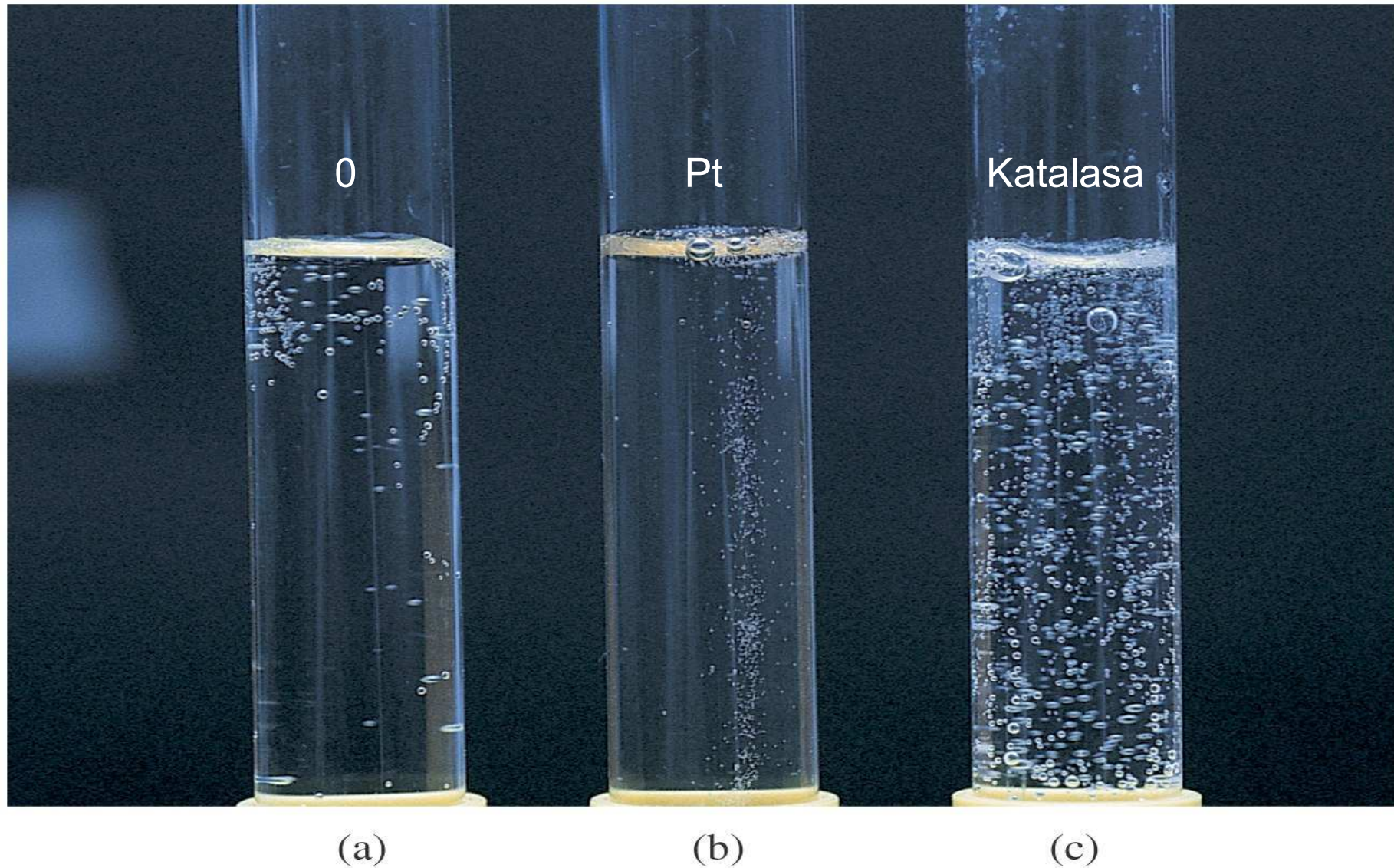
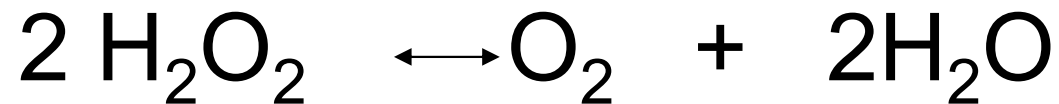


Figure 5-1 Concepts in Biochemistry, 3/e

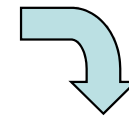
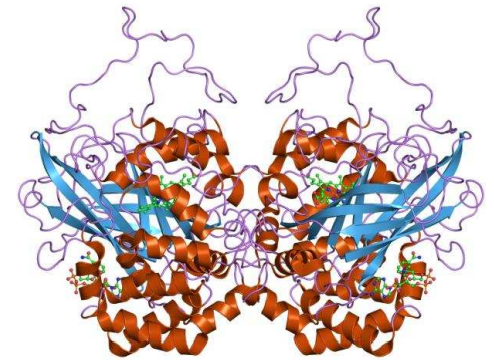
Enzymy – molekulární stroje

Katalasa



Číslo přeměny 40 000 000

1 molekula enzymu přemění
40 000 000 molekul substrátu za 1 s



Biokatalyzátory

- Globulární bílkoviny – enzymy
- RNA – ribozymy Cech Altmann NC1986

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*

substrát₁ + substrát₂ + reakce - *alkohol: NAD-oxidoreduktasa*

Enzymová nomenklatura

IUB 1961 - nejnovější 1984

1. OXIDOREDUKTASY - oxidačně redukční reakce
 - *alkoholdehydrogenasa*

2. TRANSFERASY - přenos skupin
 - *aspartátaminotransferasa*

3. HYDROLASA - hydrolytické štěpení (+ H₂O)
 - *proteasy*

4. LYASY

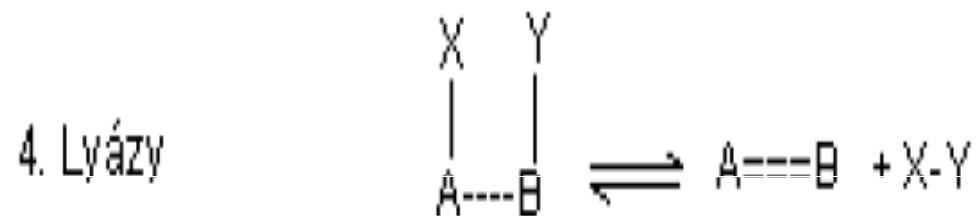
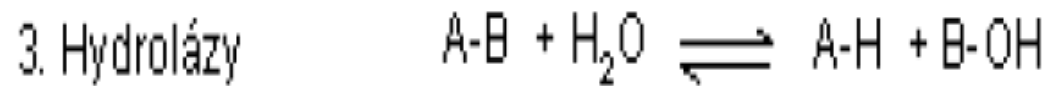
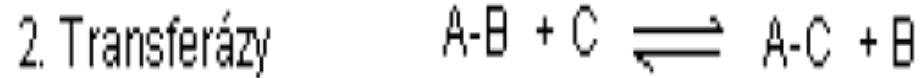
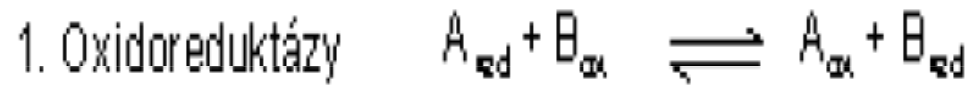
- **nehydrolytické štěpení (bez H₂O)**
- *karbonátanhydrasa*

5. IZOMERASY

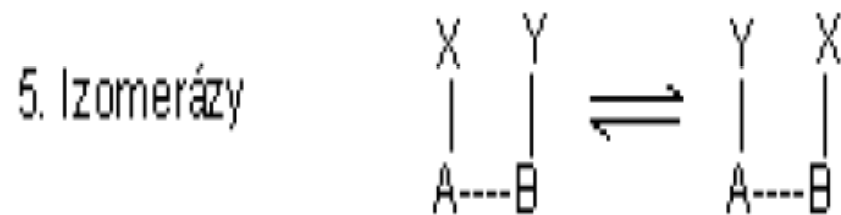
- **přesuny atomů a skupin**
- *glukosafosfátizomerasa*

6. LIGASY

- **vznik vazby za současného rozkladu ATP**
- *asparaginsynthetasa*



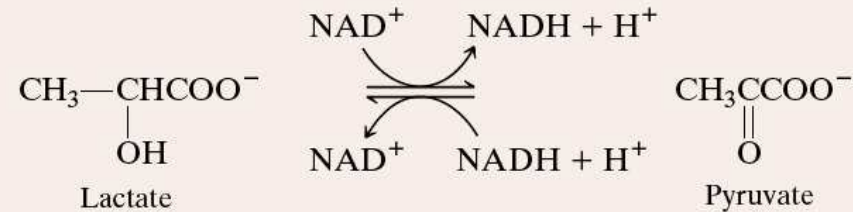
Synthasy



Syntethasy

Table 5.2**An example of each class of enzyme**

1. Oxidoreductases



Common name: Lactate dehydrogenase

Official name: L-Lactate:NAD⁺ oxidoreductase

Official number: 1.1.2.3

2. Transferases

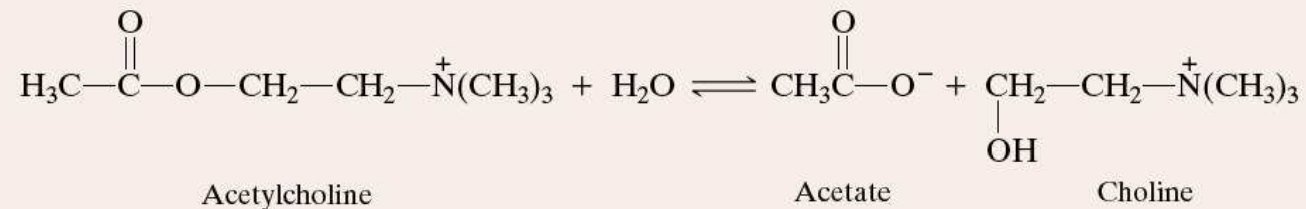
 $(dNMP)_n$ = DNA with n nucleotides $dNTP$ = deoxynucleoside triphosphate $(dNMP)_{n+1}$ = DNA with $n + 1$ nucleotides PP_i = Pyrophosphate

Common name: DNA polymerase

Official name: Deoxynucleoside triphosphate:DNA deoxynucleotidyltransferase (DNA-directed)

Official number: 2.7.7.7

3. Hydrolases



Common name: Acetylcholinesterase

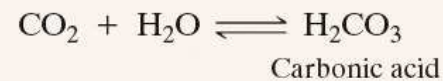
Official name: Acetylcholine acetylhydrolase

Official number: 3.1.1.7

Table 5.2

An example of each class of enzyme

4. Lyases

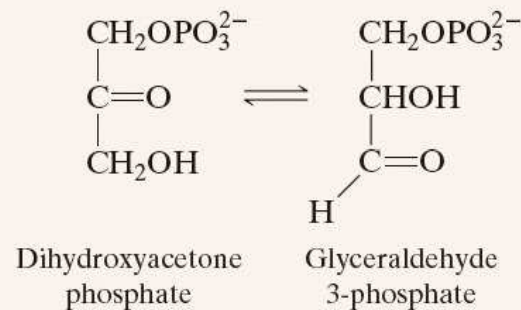


Common name: Carbonic anhydrase

Official name: Carbonate hydrolyase

Official number: 4.2.1.1

5. Isomerases

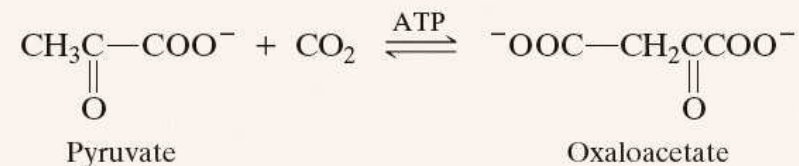


Common name: Triose phosphate isomerase

Official name: D-Glyceraldehyde-3-phosphate ketoisomerase

Official number: 5.3.1.1

6. Ligases



Common name: Pyruvate carboxylase

Official name: Pyruvate CO₂ ligase (ADP-forming)

Official number: 6.4.1.1

http://www.brenda-enzymes.info/

The screenshot shows the BRENDA website interface within a browser window. The browser's address bar displays the URL <http://www.brenda-enzymes.info/>. The page header includes the BRENDA logo and the tagline "The Comprehensive Enzyme Information System". A navigation menu on the left lists various search and exploration tools. The main content area features a search bar with tabs for "EC-Number", "Enzyme Name", "Organism", "Protein", "Full text", and "Advanced Search". Below the search bar, a red banner announces a "NEW feature online!". A table provides a detailed overview of the data categories available in the database, organized into six columns: Nomenclature, Reaction & Specificity, Functional Parameters, Isolation & Preparation, Stability, and Enzyme Structure. The table lists specific data points for each category, such as "Enzyme Names", "Pathway", "Km Value", "Purification", "pH Stability", and "Sequence/SwissProt link". At the bottom of the page, contact information for the webmaster, Sandra Placzek, is provided, along with a note regarding browser requirements for full site functionality.

Enzyme Database - BRENDA

Soubor Úpravy Zobrazit Oblíbené položky Nástroje Nápověda

X Převést Vybrat

Formuláře pro návrhy proj... Získat více doplňků Benefit

BRENDA home
login
history
All enzymes

Quick Search
Fulltext Search
Advanced Search
Substructure Search
TaxTree Explorer
EC Explorer
Sequence Search
Genome Explorer
Ontology Explorer
Functional Enzyme Parameters
SBML Output
Soap
Download

Tutorial/Training
BRENDA input
Propose new enzyme

Introduction/References
Contact and Impressum
News
Jobs
Copyright
Related Links
Help
Acknowledgements
BRENDA on Facebook
To se mi líbí

BRENDA Professional
Commercial Version

Release 2012.2 (July 2012)

Technische Universität Braunschweig

BRENDA
The Comprehensive Enzyme Information System

EC-Number Enzyme Name Organism Protein Full text Advanced Search

Search Display 10 entries

NEW feature online!

Nomenclature	Reaction & Specificity	Functional Parameters
Enzyme Names EC Number Common/ Recommended Name Systematic Name Synonyms CAS Registry Number	Pathway Catalysed Reaction Reaction Type Natural Substrates and Products Substrates and Products Substrates Natural Substrate Products Natural Product Inhibitors Cofactors Metals/Ions Activating Compounds Ligands Biochemicals Reactions Aligned	Km Value kcat/Km Value Ki Value IC50 Value pI Value Turnover Number Specific Activity pH Optimum pH Range Temperature Optimum Temperature Range Kinetic ENzyme DATA NEW
Isolation & Preparation		Organism-related information
Purification Cloned Expression Renatured Crystallization		Organism Source Tissue Localization Protein-Specific Search
Stability	Enzyme Structure	Disease & References
pH Stability Temperature Stability General Stability Organic Solvent Stability Oxidation Stability Storage Stability	Sequence/ SwissProt link 3D-Structure/ PDB link Molecular Weight Subunits Posttranslational Modification	Disease/ Diagnostics References
		Application & Engineering
		Engineering Application

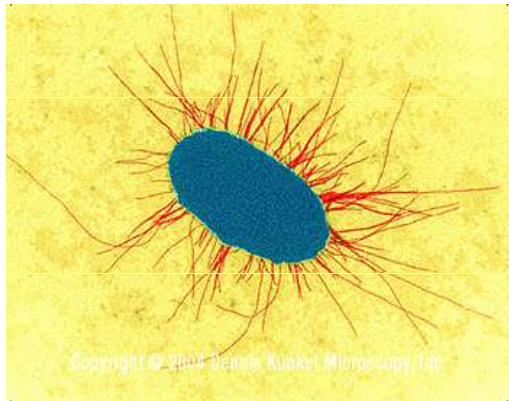
Webmaster: **Sandra Placzek**
s.placzek@tu-bs.de

For access to all features of the website Javascript must be activated, frames enabled and Java (at least version 1.4) has to be installed

100%

Enzymy – stanovení koncentrace

Escherichia coli



3 000 bílkovin

Homo sapiens



25 000 bílkovin

Koncentrace ↔ Katalytická aktivita



Substrát ↔ Produkt

Stanovení aktivity enzymů

- *Biochemie*
- *Molekulární biologie*

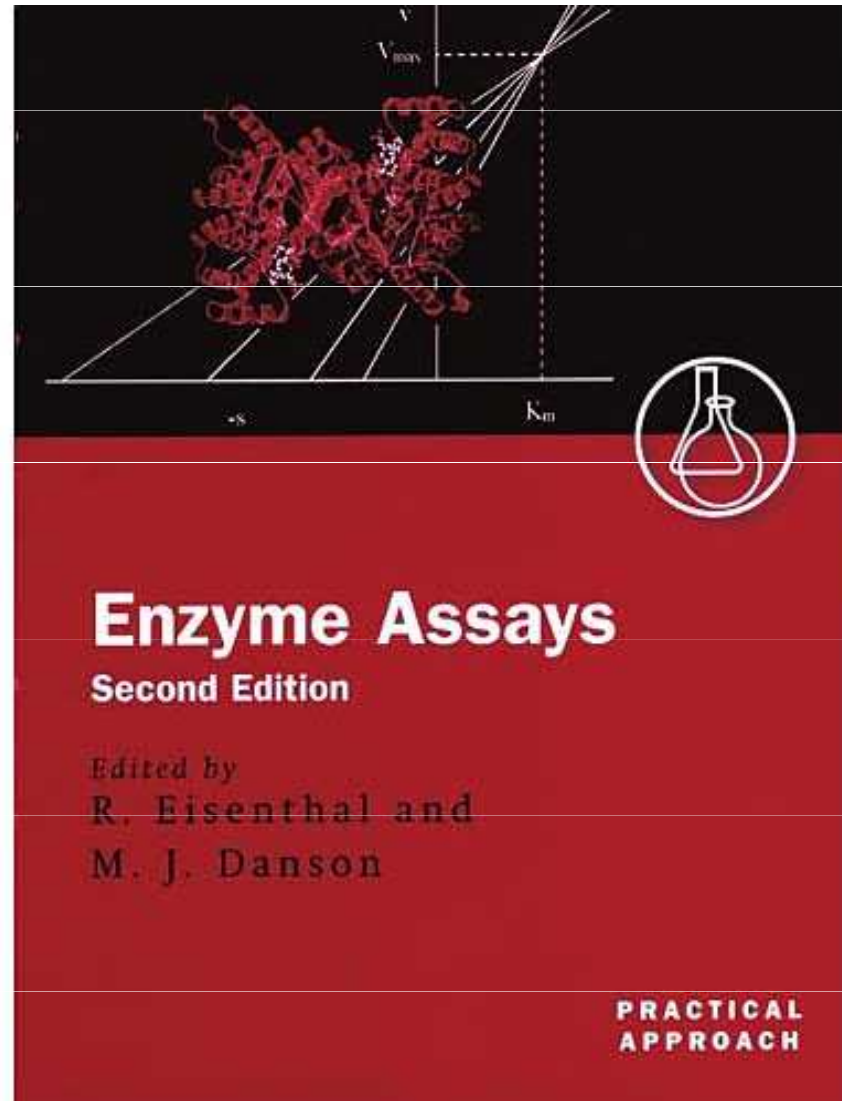
- *Klinická diagnostika*
- *Farmakologie – vývoj léčiv*
- *Biotechnologické procesy*
- *Bioanalytická chemie*

Metody používané pro stanovení aktivity enzymů

- Spektrofotometrické
- Spektrofluorimetrické
- Elektrochemické
- Radiochemické
- Separální – HPLC, GC, **CE**

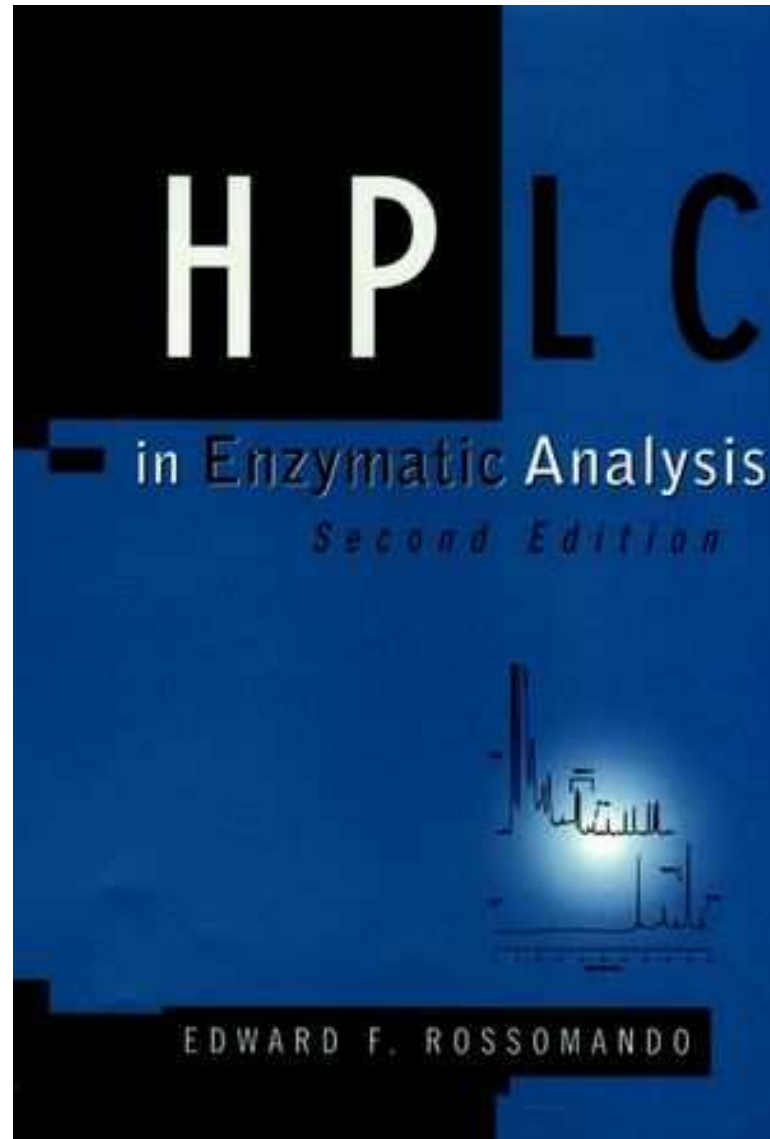
Enzyme Assays

R. Eisenthal and M.J. Danson



HPLC in Enzymatic Analysis

E.F. Rossomando



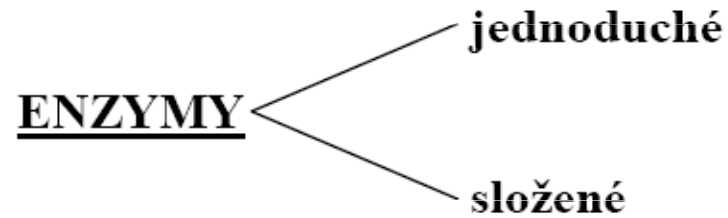
Vyjadřování aktivity enzymů :

- 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

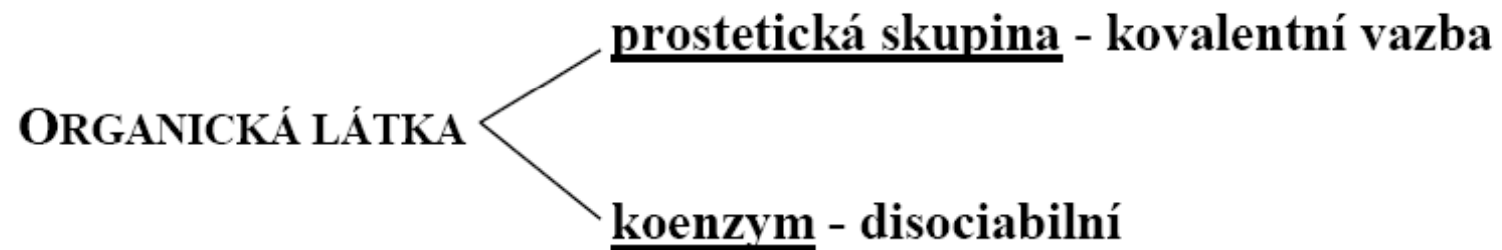
Specifická aktivita - aktivita vztažená na mg bílkoviny

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

STRUKTURA ENZYMŮ



KOFAKTOR + APOENZYM → HOLOENZYM



Kofaktor - kovový ion nebo organická látka

METALOENZYMY

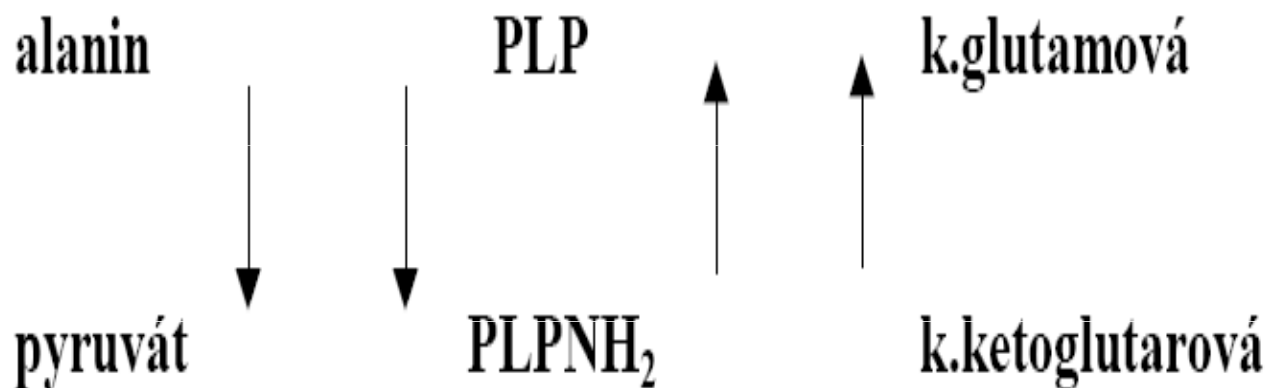
kovový ion	enzym
Zn^{2+}	alkoholdehydrogenasa alkalická fosfatasa karbonátanhydrasa
Mg^{2+}	fosfohydrolasy fosfotransferasy
Mn^{2+}	arginasa
Fe^{2+}, Fe^{3+}	cytochromy peroxidasa katalasa
Cu^{2+}, Cu^{+}	tyrosinasa diaminoxidasa

Table 6.2**Enzymes requiring metal ions as cofactors**

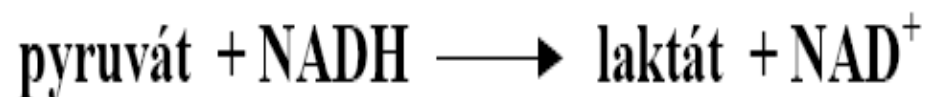
Enzyme	Metal Ion
Catalase, peroxidase, aconitase, and cytochrome oxidase	Fe ²⁺ and Fe ³⁺
Alcohol dehydrogenase, carboxypeptidase A, carboxypeptidase B, and DNA polymerase	Zn ²⁺
Cytochrome oxidase, lysyl oxidase, ascorbate oxidase, and superoxide dismutase	Cu ²⁺
Hexokinase and glucose-6-phosphatase	Mg ²⁺
Arginase	Mn ²⁺
Pyruvate kinase	K ⁺
Urease	Ni ²⁺
Nitrate reductase	Mo ⁴⁺ and Mo ⁶⁺
Carbonic anhydrase	Zn ²⁺ , Cd ²⁺

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 :*

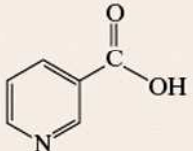
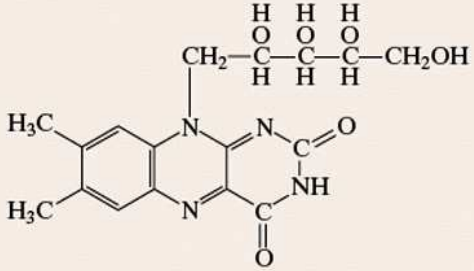
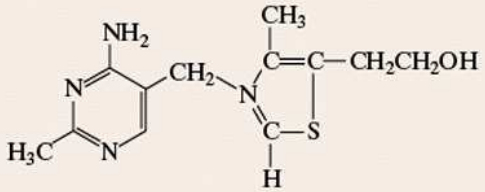
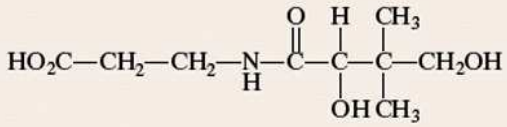


KOFAKTORY A VITAMINY

VITAMIN - FUNK - “amin potřebný pro život”

Vitamin	Kofaktor	Funkce
<u>rozpuštěné ve vodě</u>		<u>přenos (reakce)</u>
thiamin - B ₁	thiamindifosfát TPP	aldehydicke s.
riboflavin - B ₂	FMN, FAD	H
k.nikotinová(nikotinamid)	NAD ⁺ , NADP	H
k.pantothenová	CoA	acylové s.
k.listová	k.listová	C ₁ skupin
pyridoxin - B ₆	pyridoxalfosfát	aminoskupiny
kobalamin - B ₁₂	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

Table 6.1
Characteristics of vitamins and coenzymes

Name/Structure of Vitamin	Related Coenzyme	Reaction type (page numbers ^a)	Deficiency Disease
Water-Soluble Vitamins			
Niacin 	NAD ⁺ , NADP ⁺	Oxidation–reduction (pp. 485-494, 505-508, 515-524)	Pellagra
Riboflavin (vitamin B ₂) 	FAD, FMN	Oxidation–reduction (pp. 485-494, 515-524)	Growth retardation
Thiamine (vitamin B ₁) 	Thiamine pyrophosphate	Decarboxylation (pp. 461, 463, 487-494)	Beriberi
Pantothenic acid (vitamin B ₃) 	Coenzyme A	Acyl group activation and transfer (pp. 440-441, 485-494, 563-571)	Dermatitis (chickens)

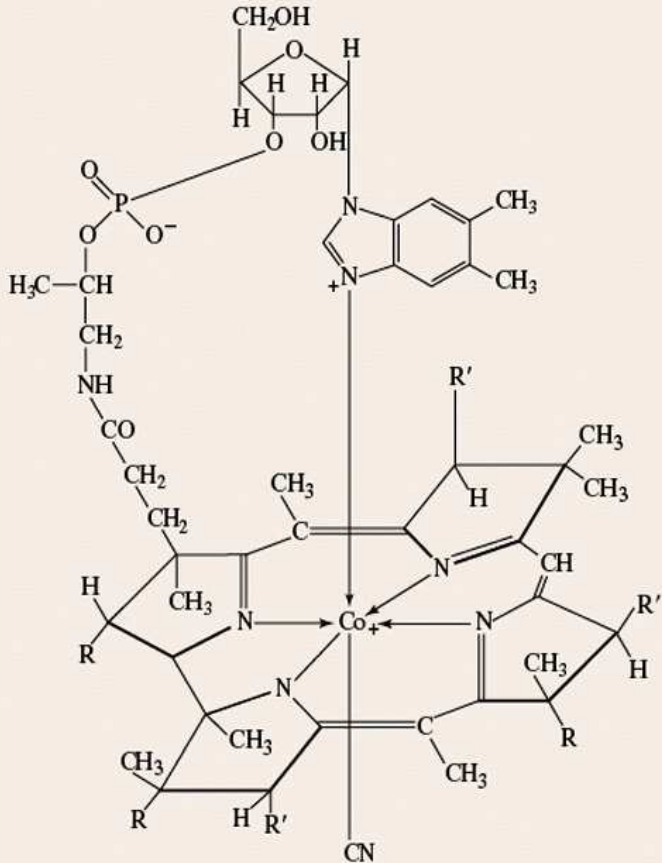
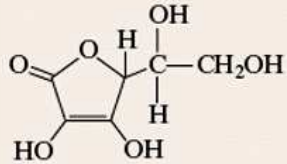
<p>Biotin</p>	Biotinylated enzymes	CO ₂ activation and transfer (pp. 465-466)	Dermatitis (humans)
<p>Pyridoxine (vitamin B₆)</p>	Pyridoxal phosphate	Amino group transfer (pp. 605-606)	Dermatitis (rats): neurological symptoms
<p>Folic acid</p>	Tetrahydrofolate	Transfer of one carbon unit (pp. 600-601)	Anemias
<p>Lipoic acid (may not be a vitamin)</p>	Attached to ε-NH ₂ group of Lys in protein	Acyl group activation and transfer (pp. 485-493)	Growth deficiencies
<p>Choline</p>	?	(pp. 163, 171, 242-243)	Impaired brain development

(continued)

Table 6-1 part 2 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

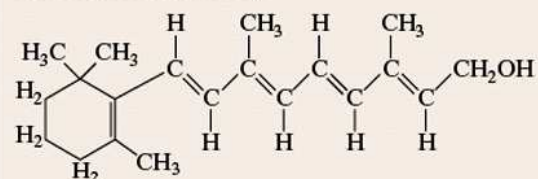
Table 6.1 (continued)

Characteristics of vitamins and coenzymes

Name/Structure of Vitamin	Related Coenzyme	Reaction type (page numbers ^a)	Deficiency Disease
Water-Soluble Vitamins (continued)			
Cobalamin (vitamin B ₁₂)	5'-Deoxyadenosylcobalamin	Methyl group transfer (pp. 570-571)	Pernicious anemia
			
L-Absorbic acid (vitamin C)	L-Absorbic acid	Hydroxylation (pp. 105-107, 493)	Scurvy
			

Fat-Soluble Vitamins

trans-Retinol (vitamin A)

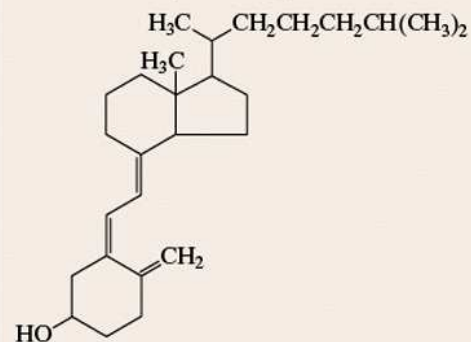


Associated with visual pigment

(pp. 123-125, 252)

Night blindness, other effects

Cholecalciferol (vitamin D₃)

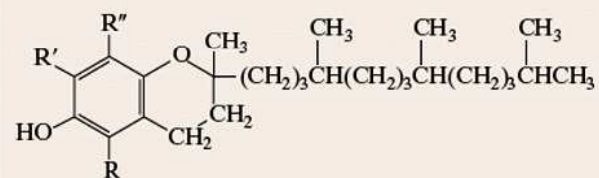


None

(pp. 252, 582-584)

Rickets

Tocopherol (vitamin E)



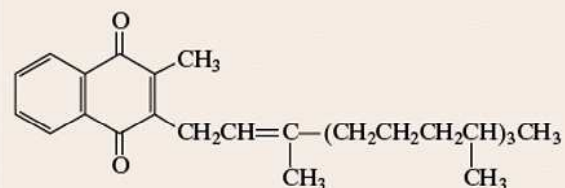
None

(p. 252)

Reproductive and other problems in rats; uncertain in humans

(several variants, with R, R', R''=H or CH₃)

Phylloquinone (vitamin K₁)



None

(pp. 252, 539-544)

Problems in blood clotting

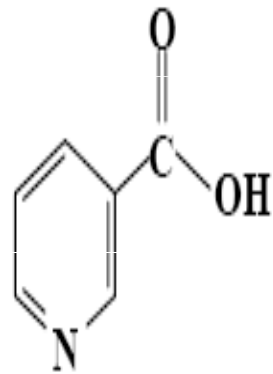
^aPage numbers listed here refer to page numbers in this book.

Table 6-1 part 4 Concepts in Biochemistry, 3/e

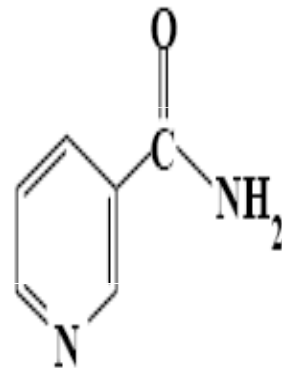
© 2006 John Wiley & Sons

NIKOTINAMIDOVÉ KOENZYMY

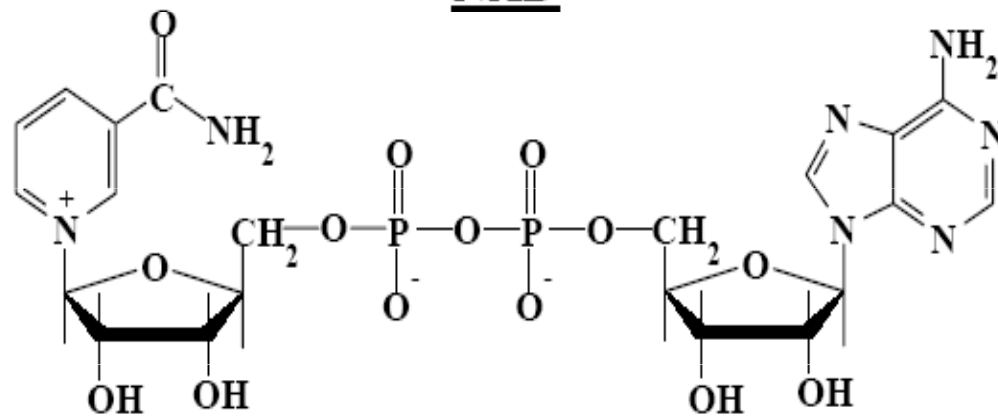
k. nikotinová



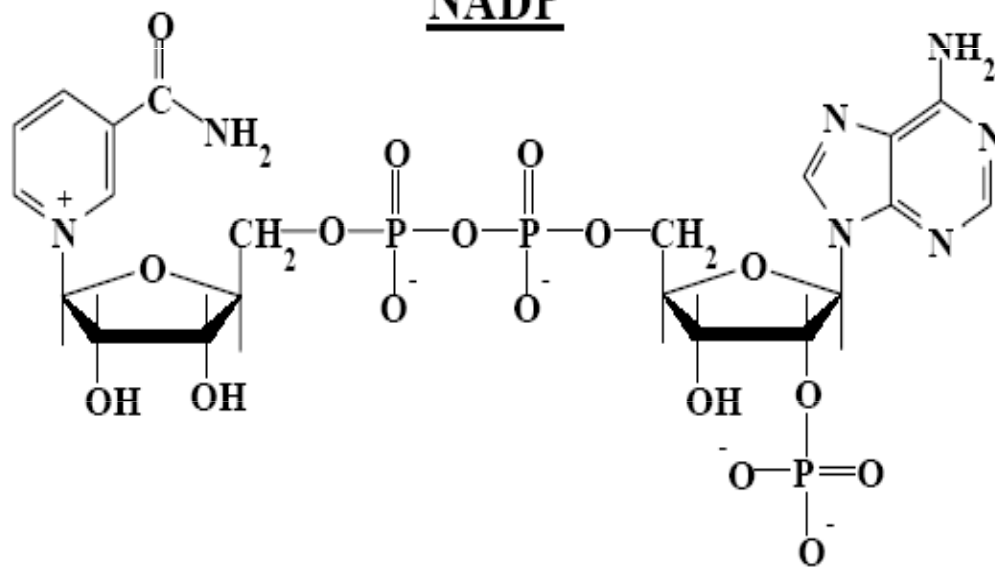
nikotinamid

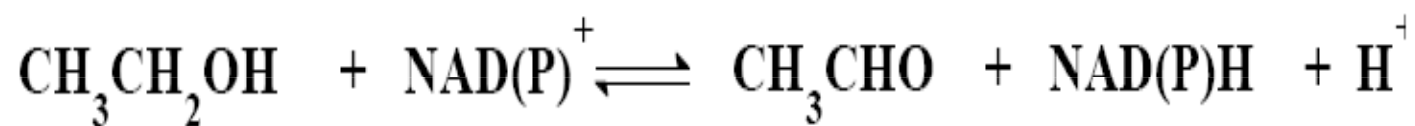
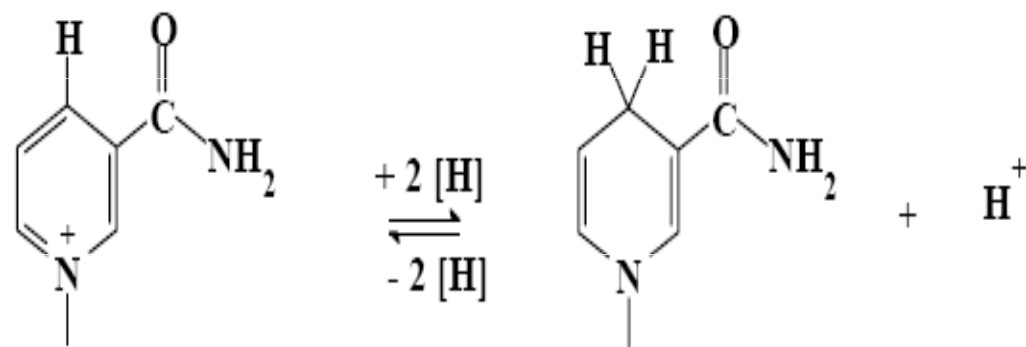


NAD⁺

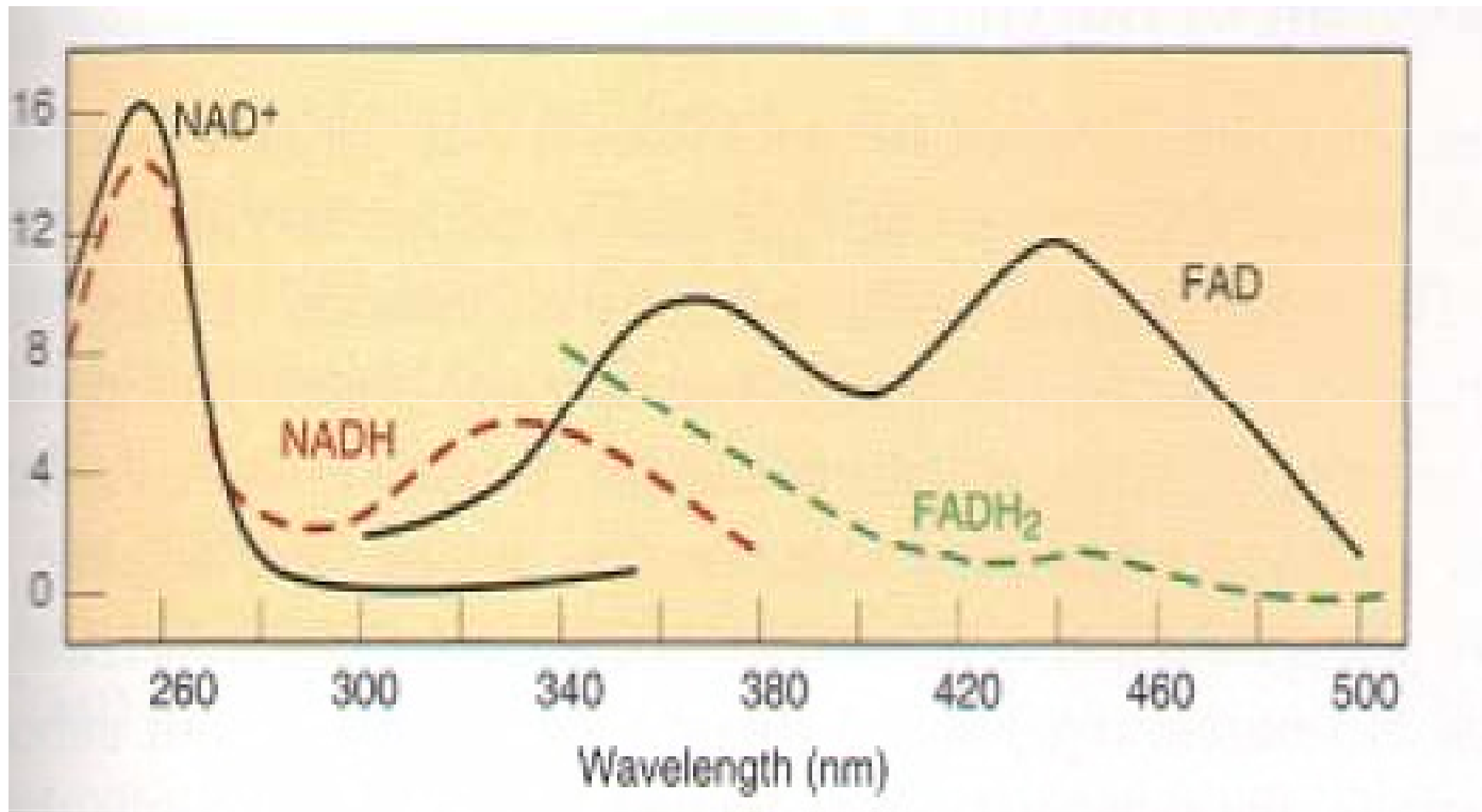


NADP⁺



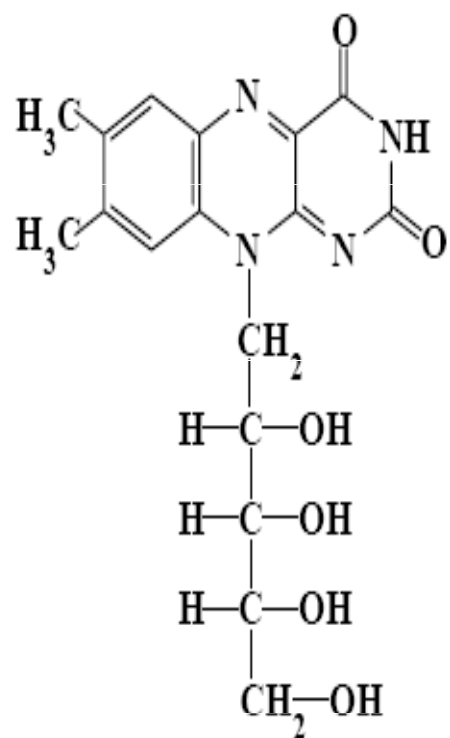


Warburgův optický test

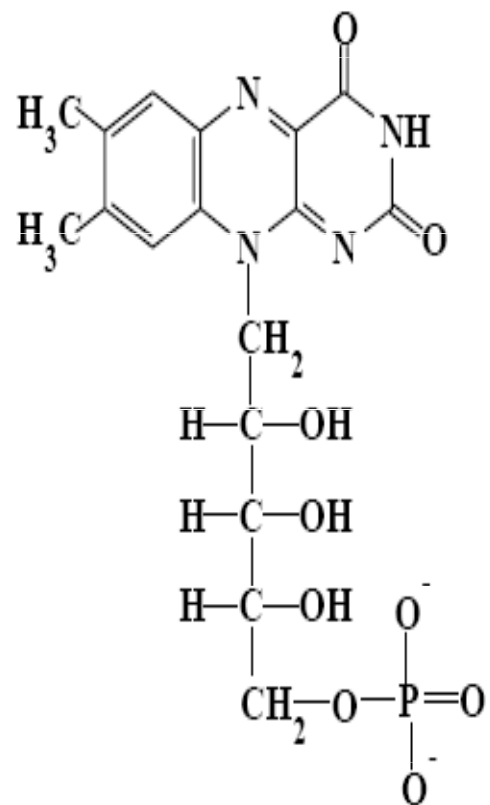


FLAVINOVÉ KOENZYMY

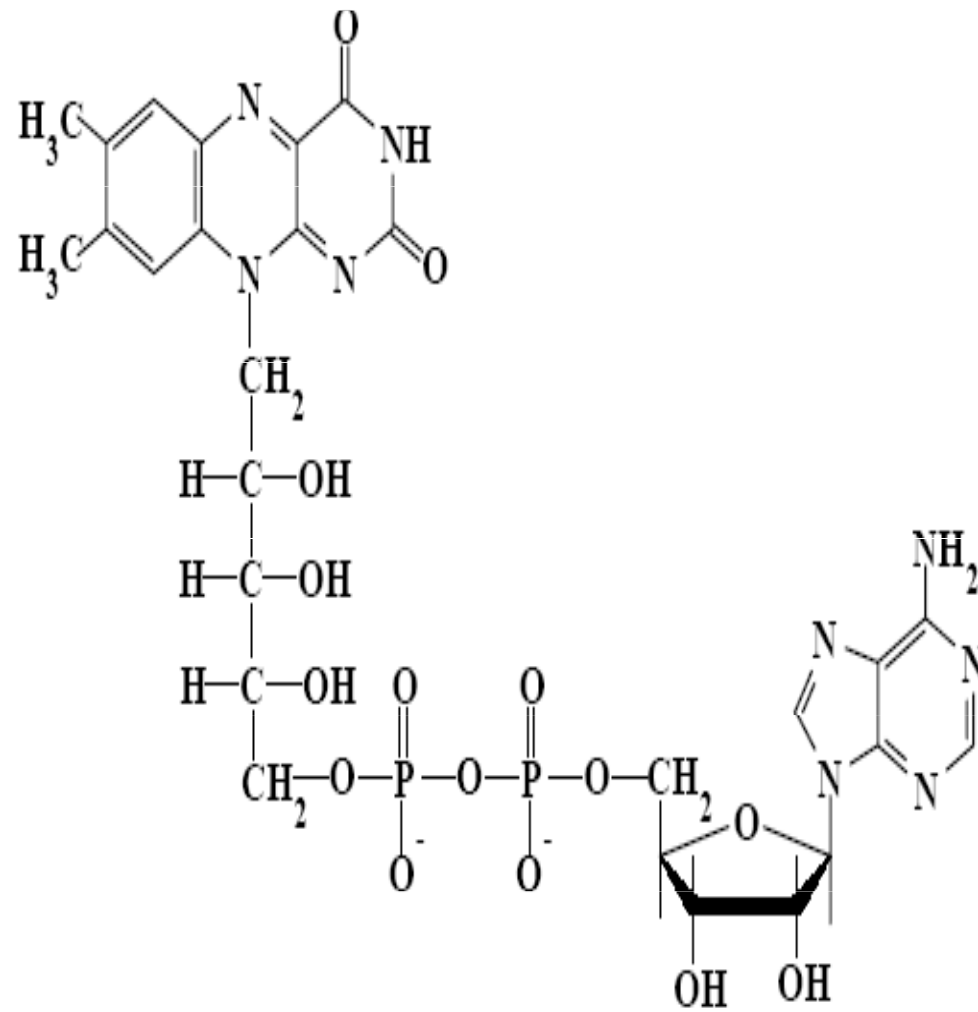
riboflavin



FMN



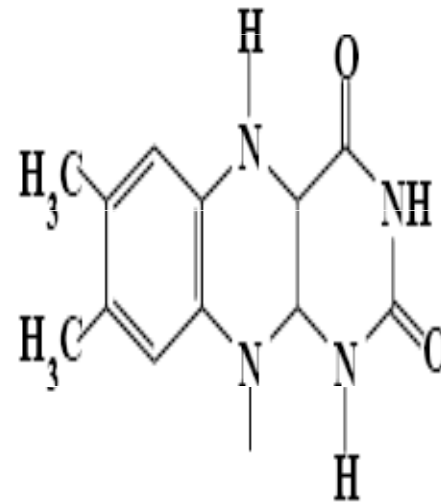
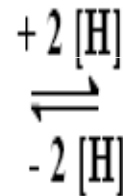
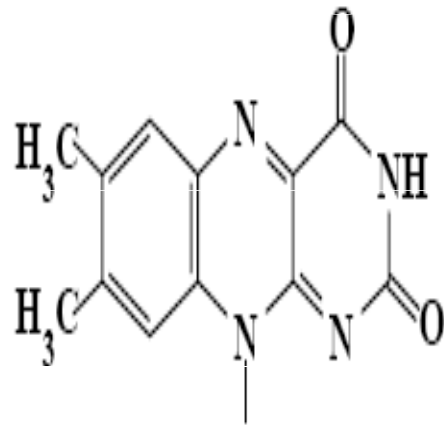
FAD

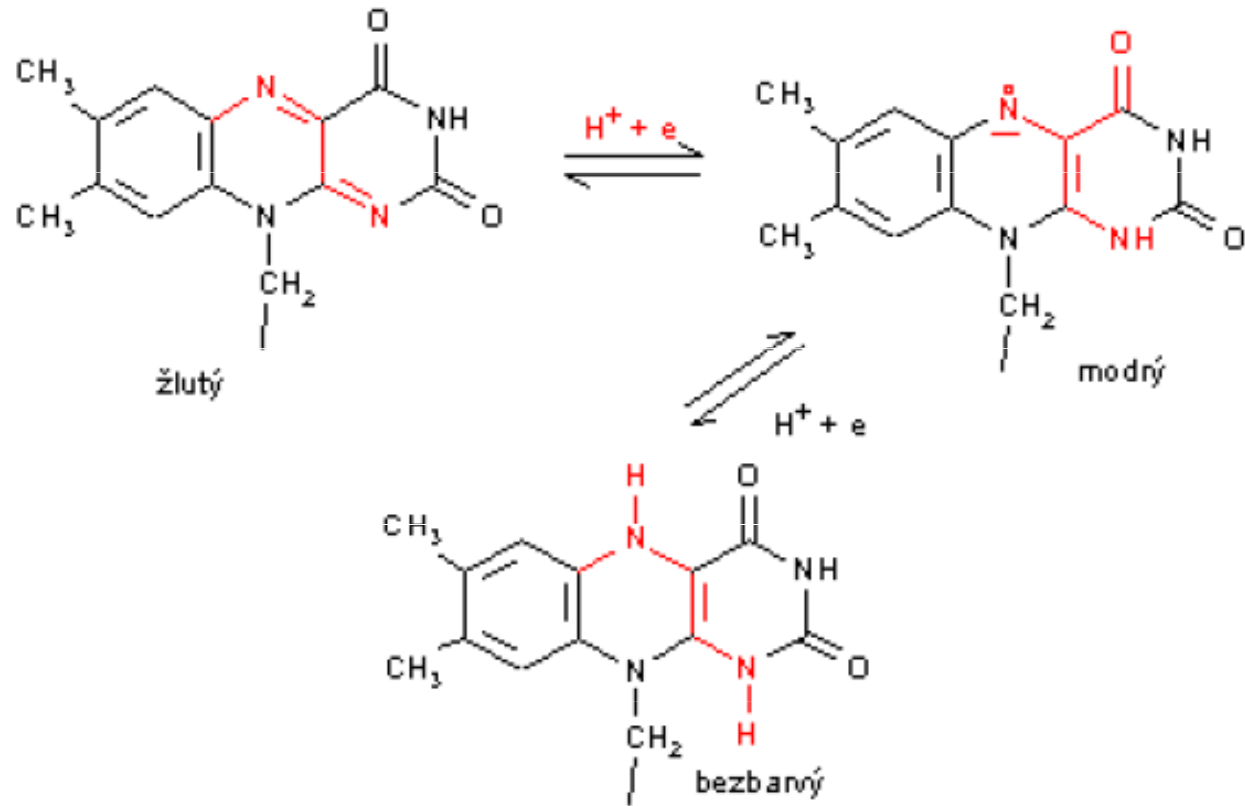
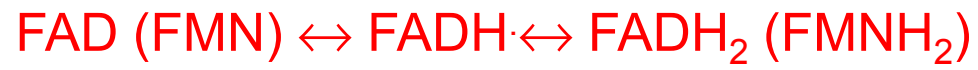


FAD (FMN)

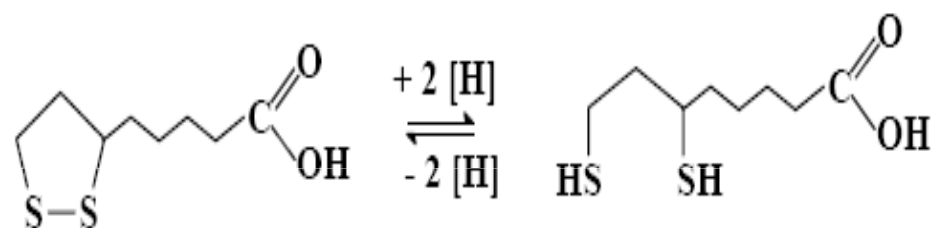


FADH₂ (FMNH₂)

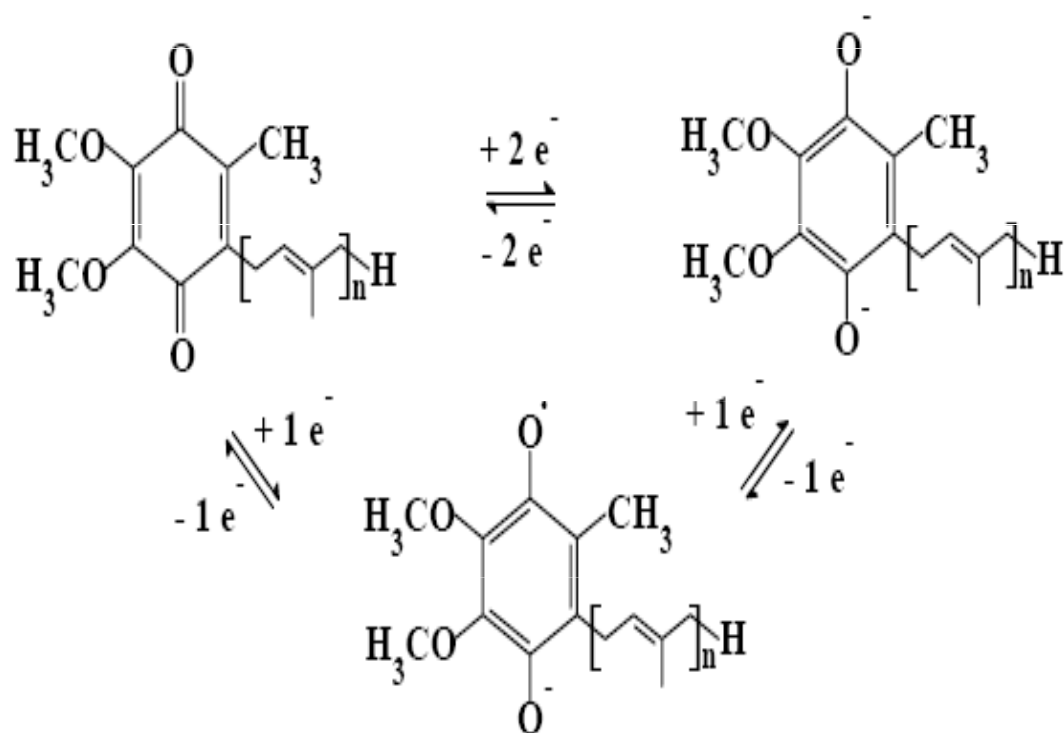




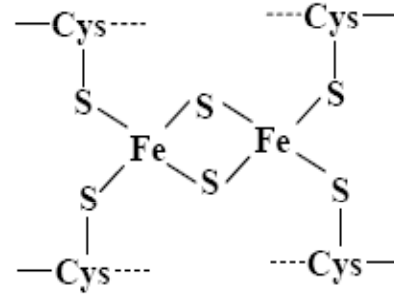
k.lipoová



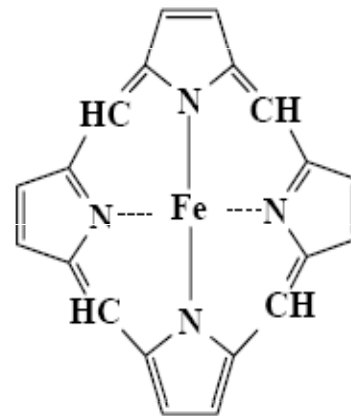
ubichinon



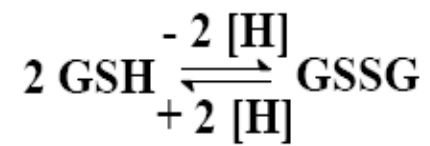
ferredoxin



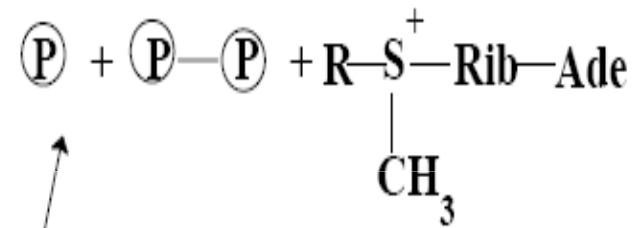
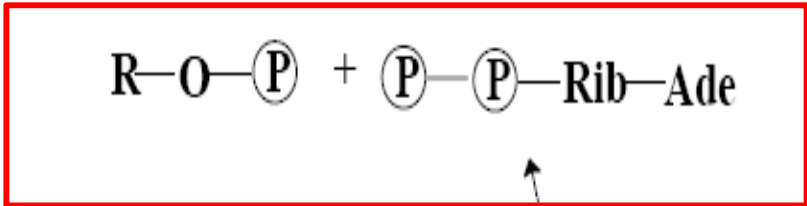
hem



glutathion

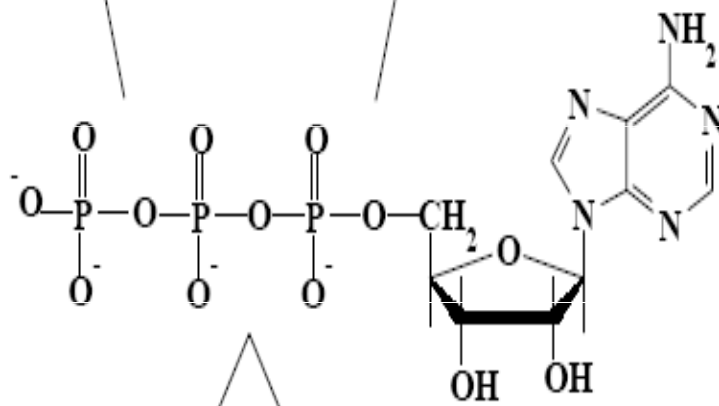


ATP



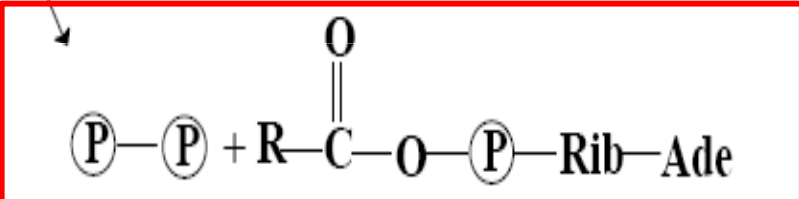
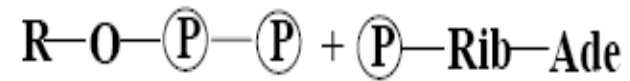
R-OH

R-S-CH₃

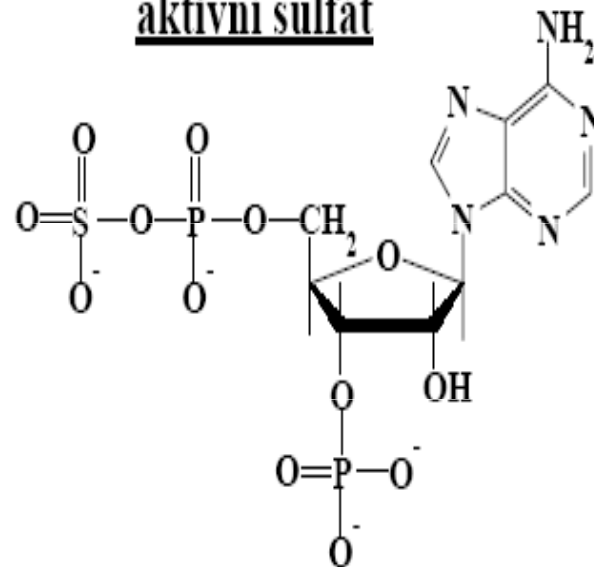


R-OH

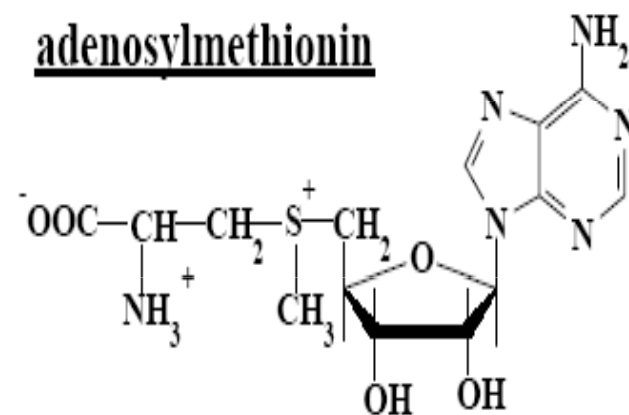
R-COOH



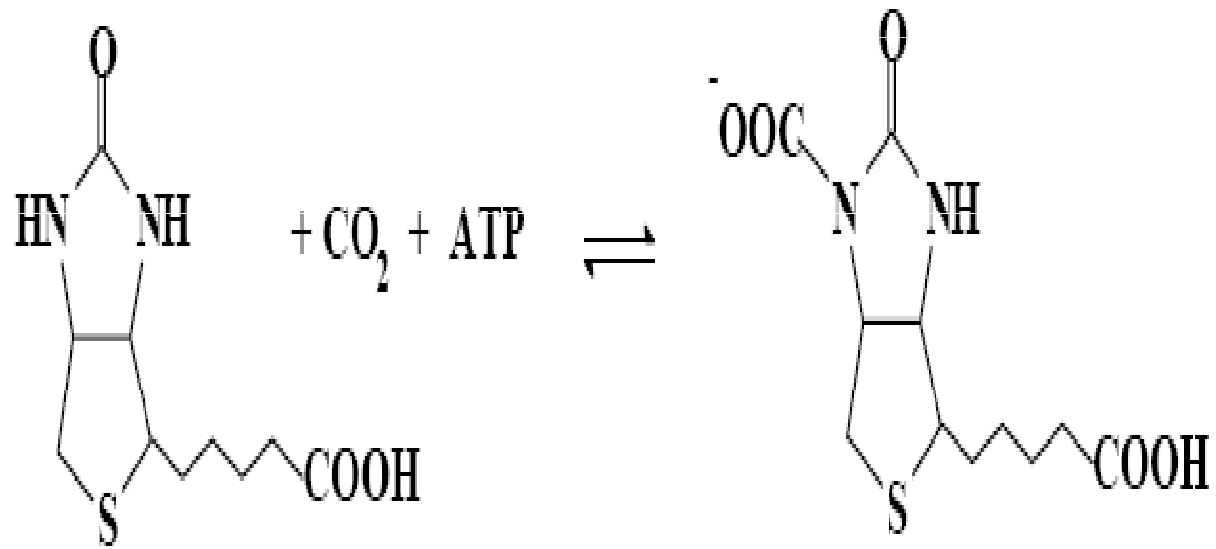
aktivní sulfát



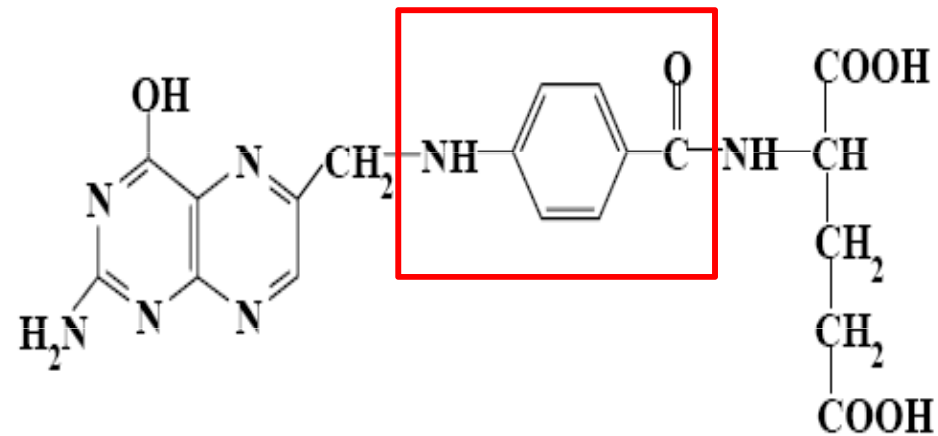
adenosylmethionin



biotin

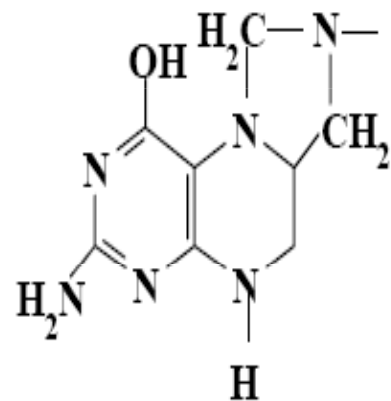


tetrahydrolistová k.



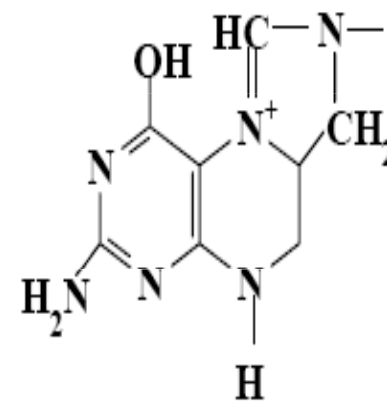
methylenetetrahydrolistová k.

-CH₂OH

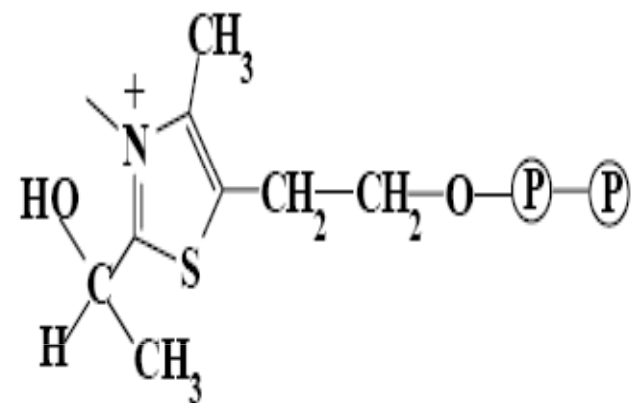
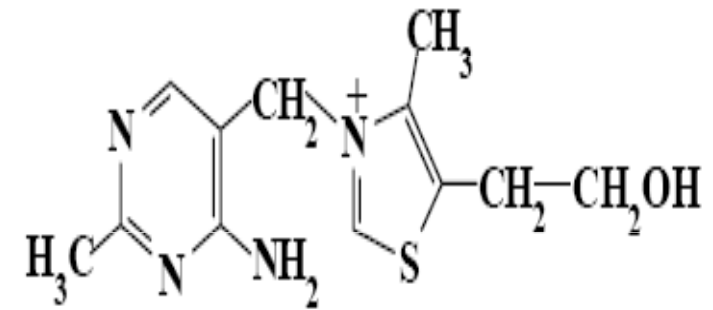


methenyltetrahydrolistová k.

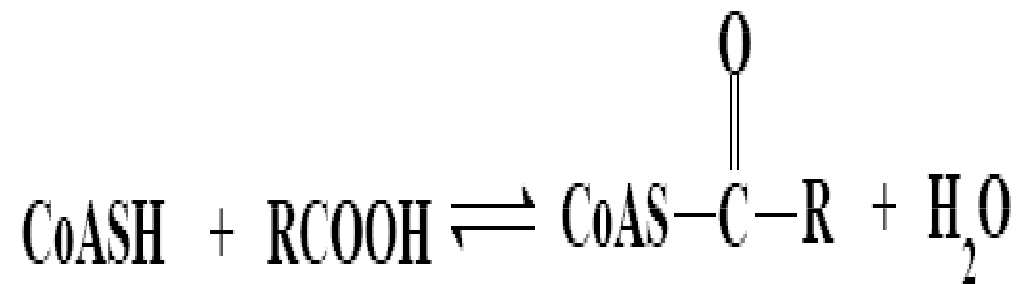
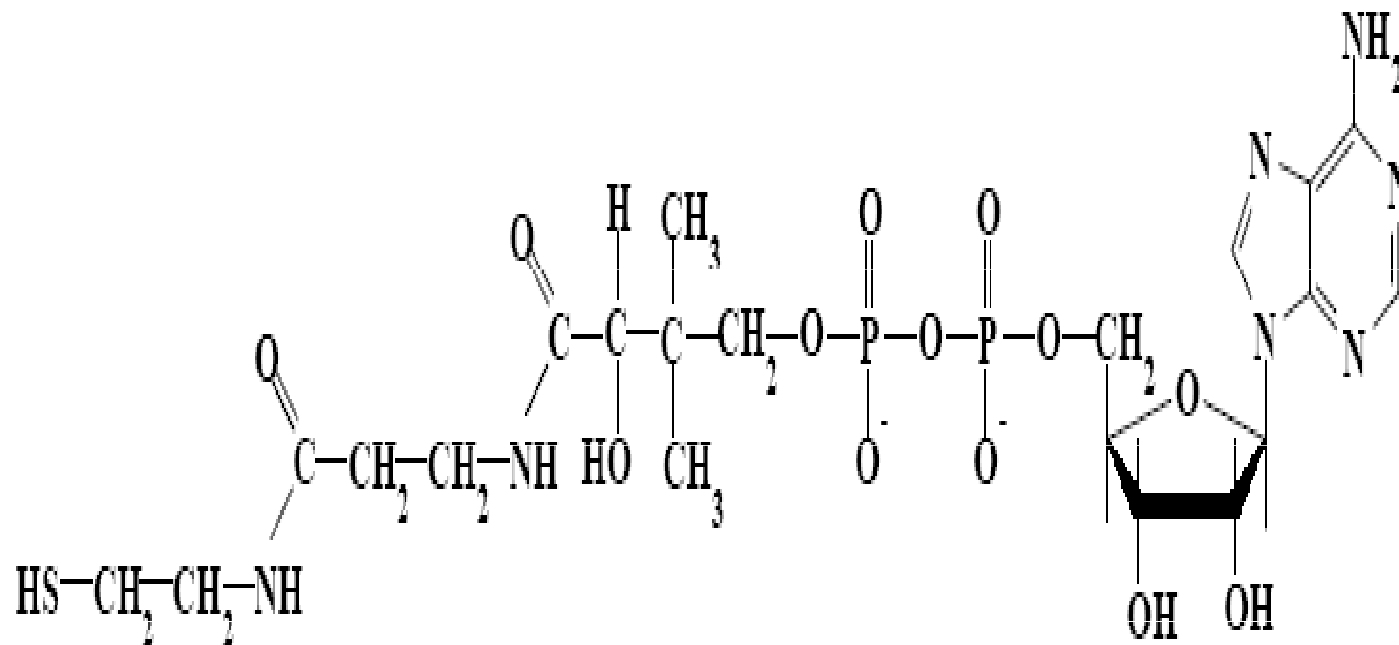
-CHO



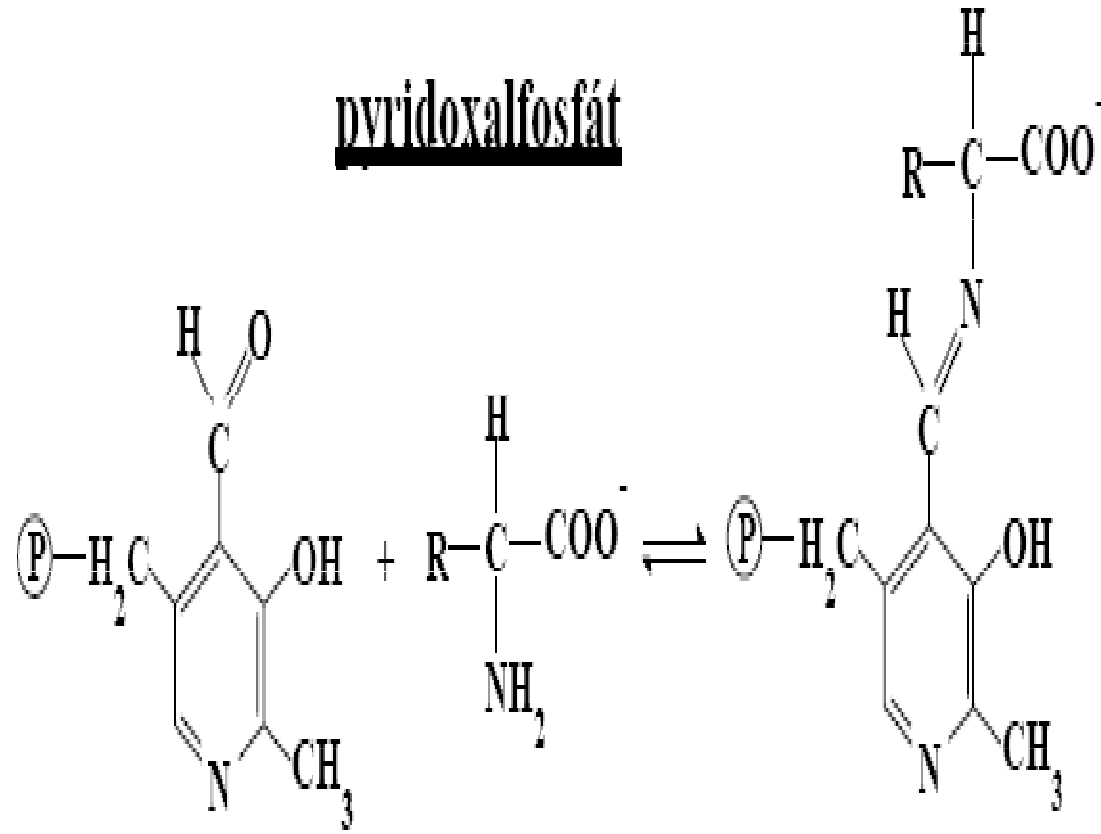
thiamin



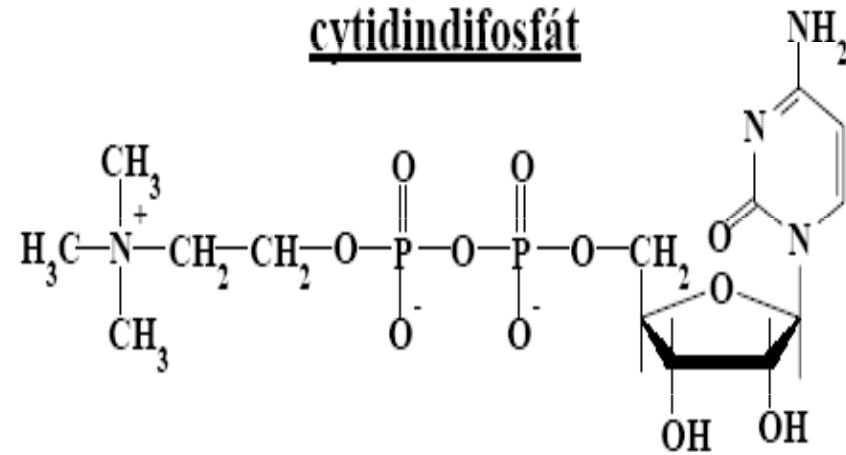
koenzym A - CoA - CoASH



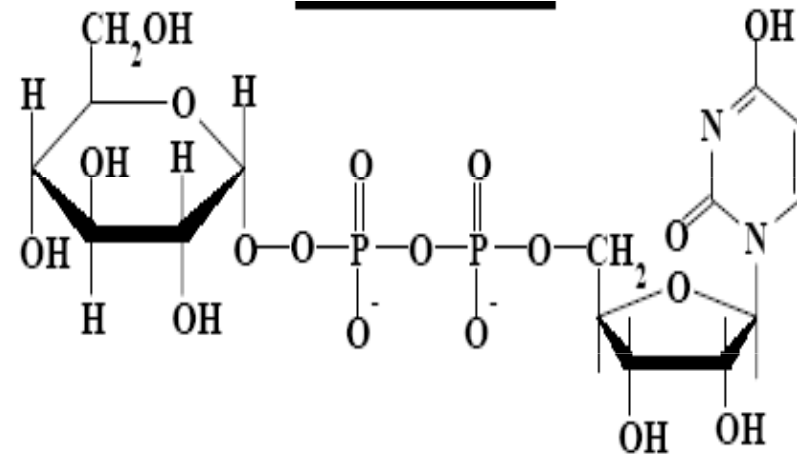
pyridoxalfosfát



cytidindifosfát



uridindifosfát



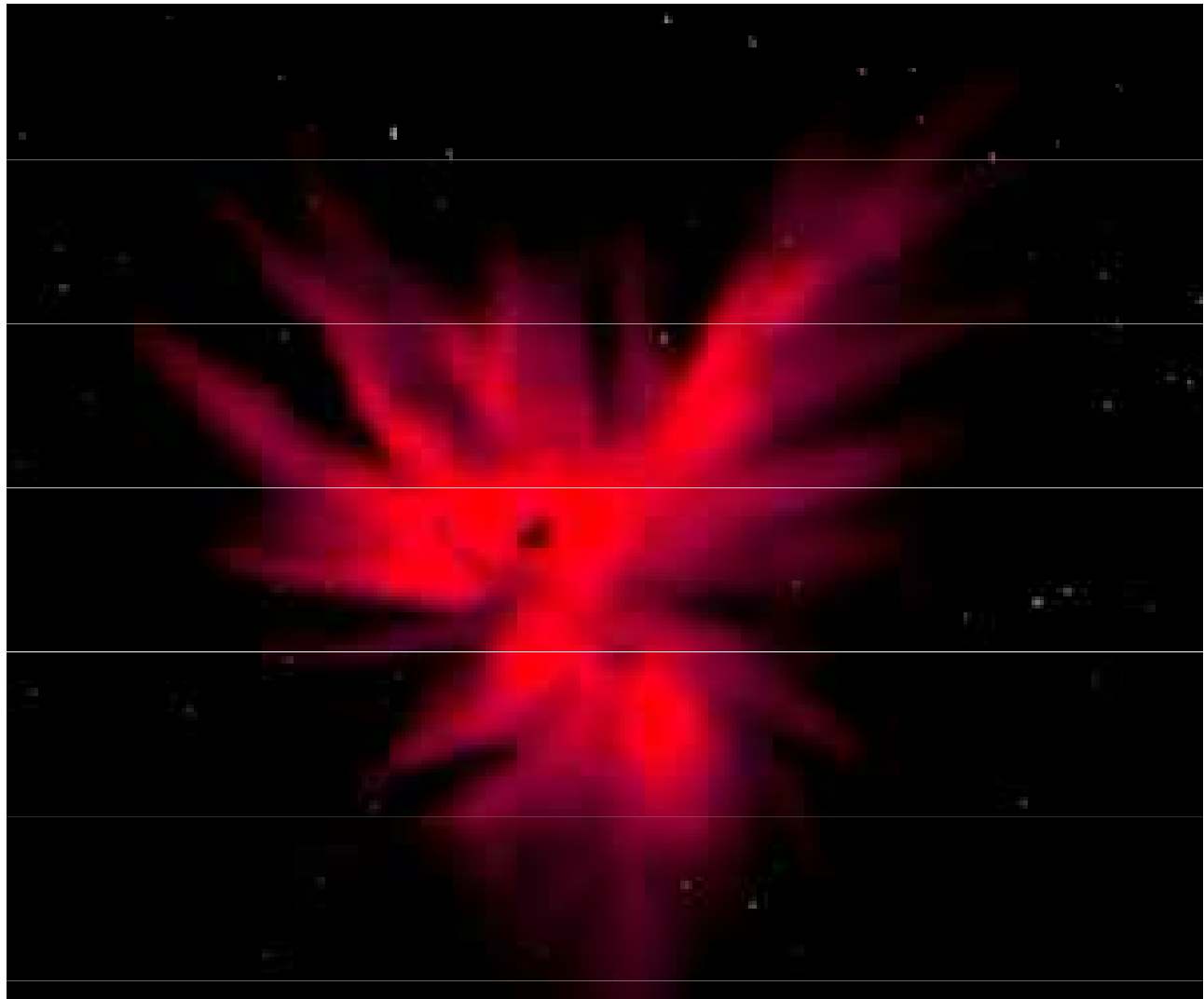
Lyasy a ligasy - bez kofaktoru nebo již popsáným kofaktorem TPP

Hydrolasy - bez kofaktoru

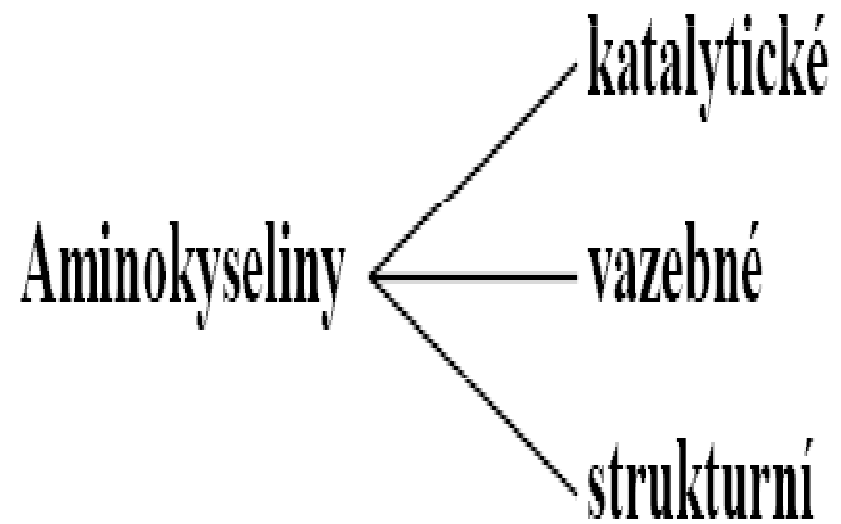
Izomerasy - většinou bez kofaktoru nebo kobalamin,

Enzymové bílkoviny

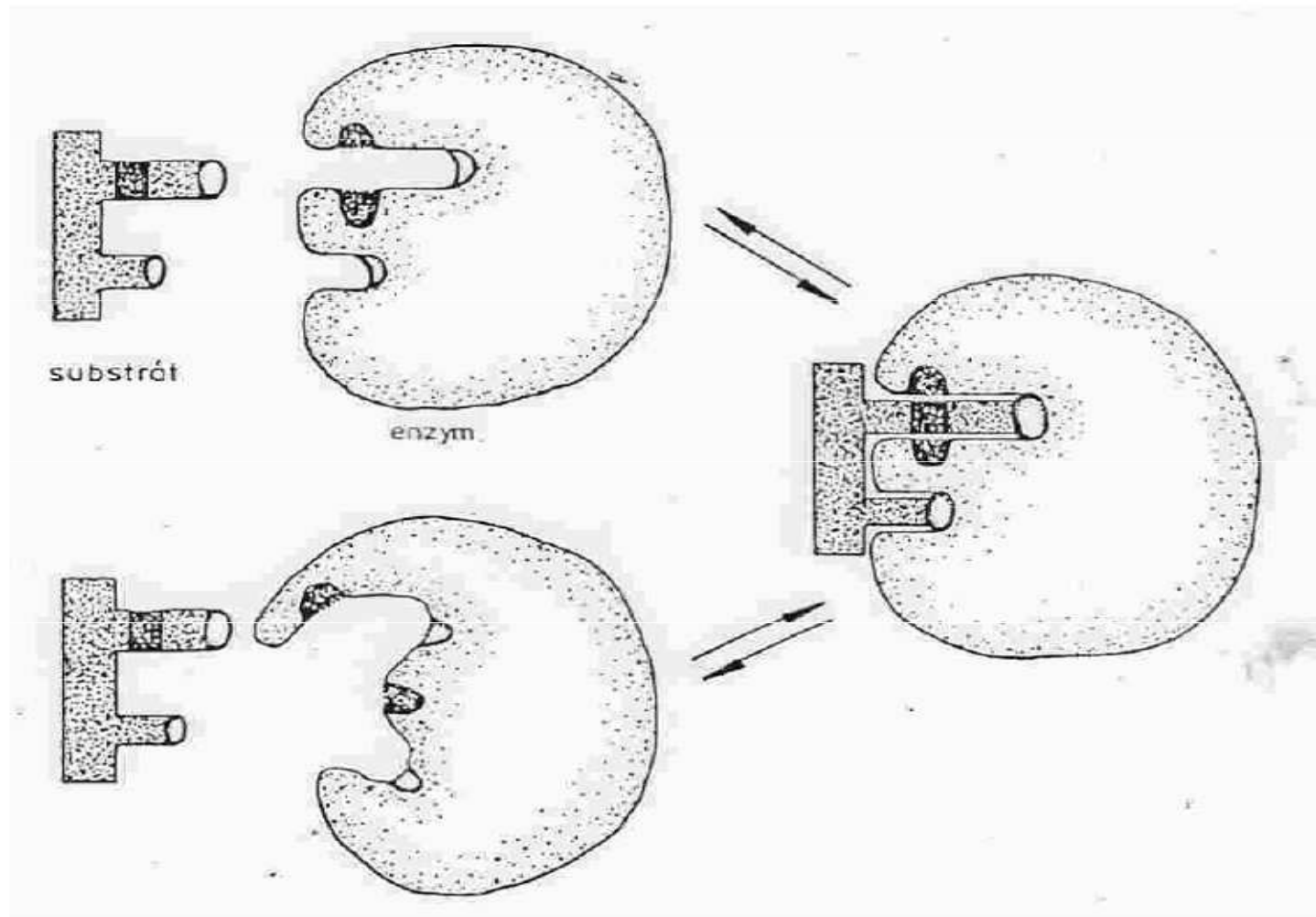
- monomerní
- oligomerní
- multienzymové komplexy



Aktivní místo enzymů

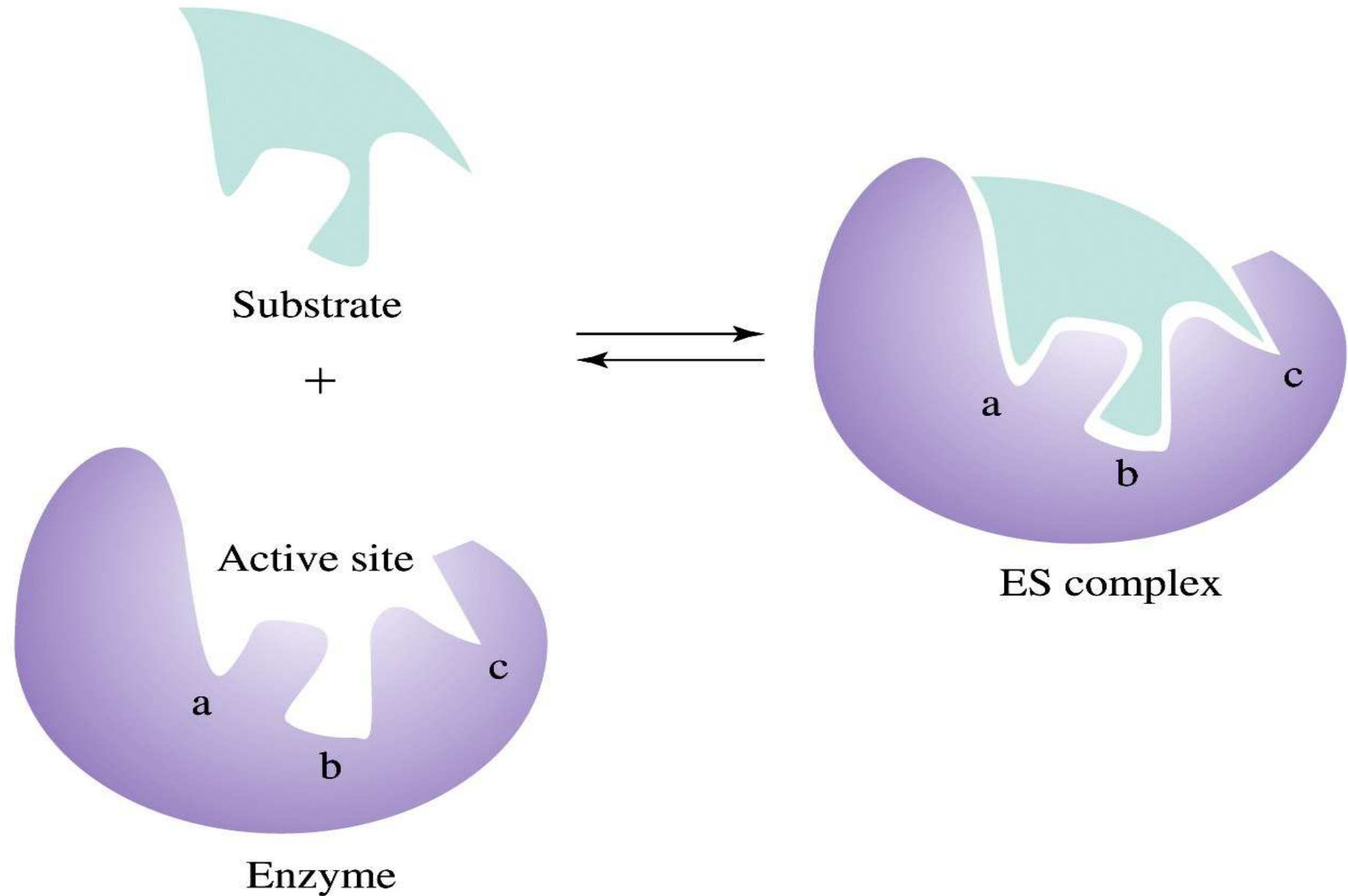


Fischer - 1894 - *teorie o zámku a klíči*



Koshland - 1959 - *teorie indukovaného přizpůsobení*

„Lock and key“ model



„Induced fit“ model

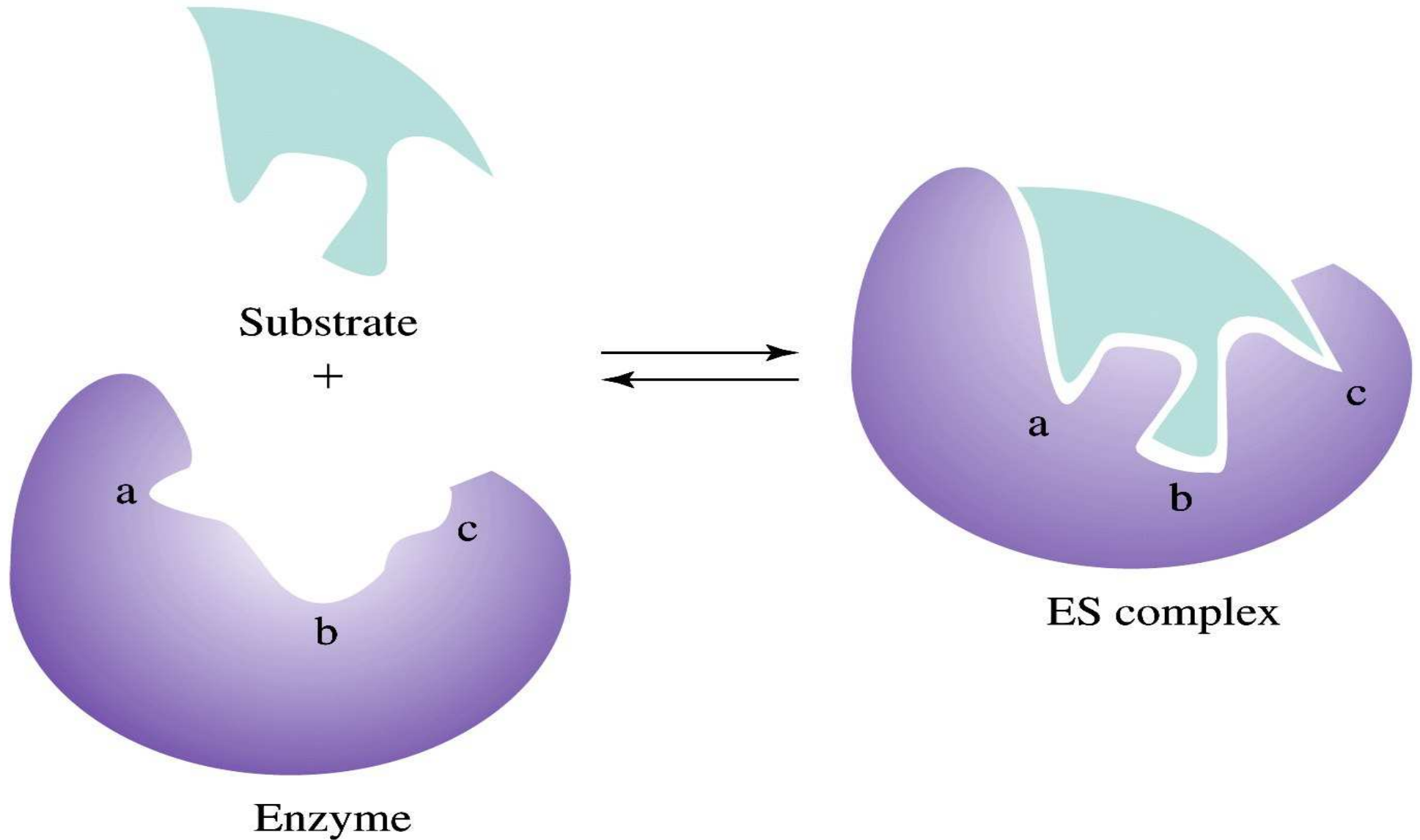


Figure 5-10 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

„Transition state“ model

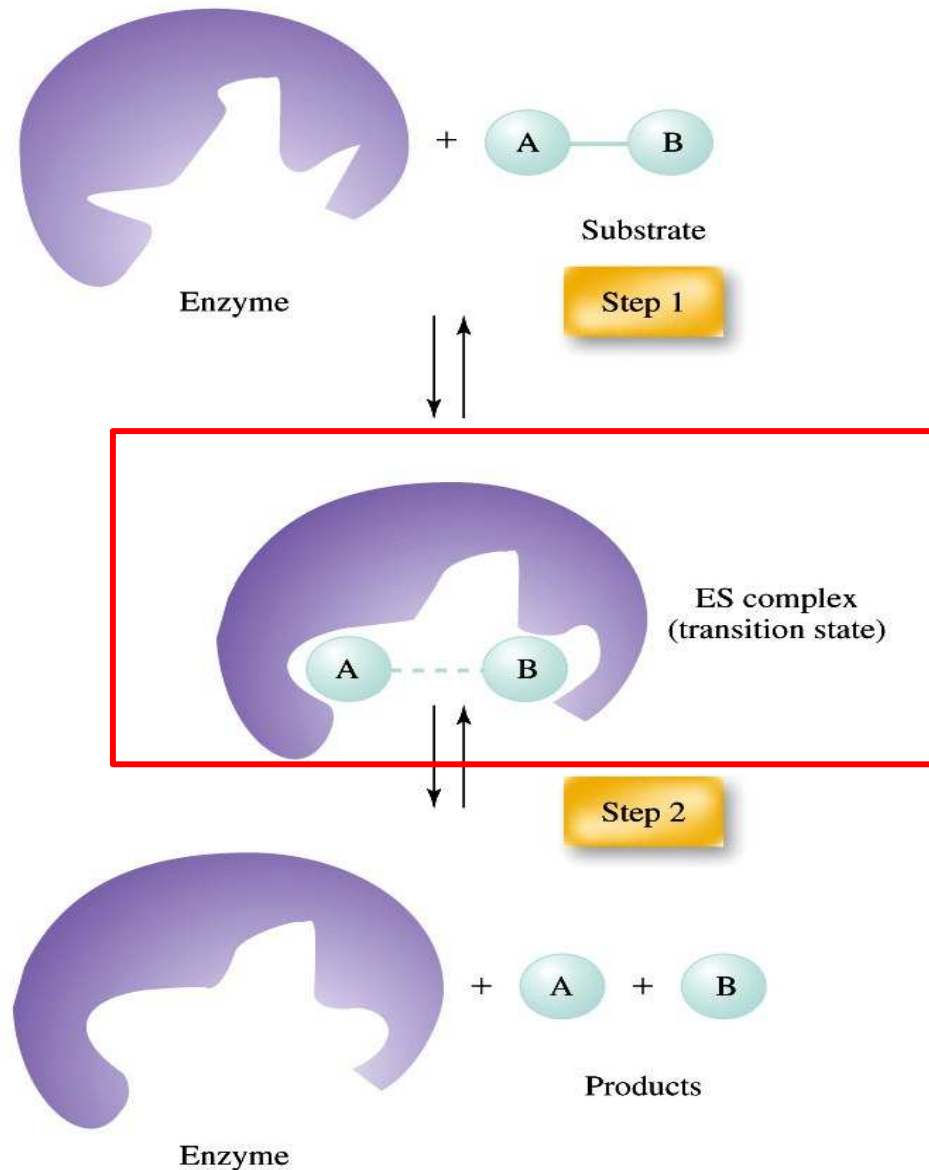
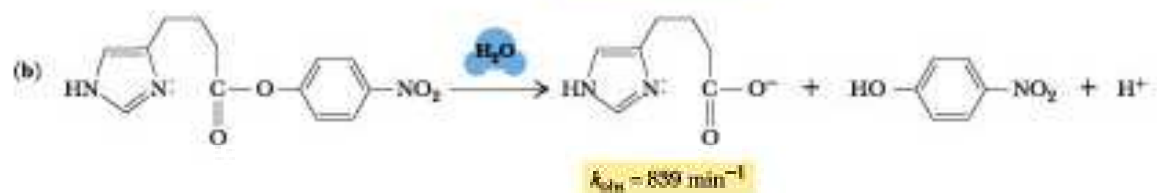
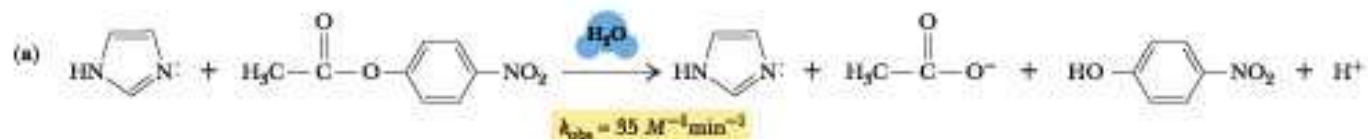



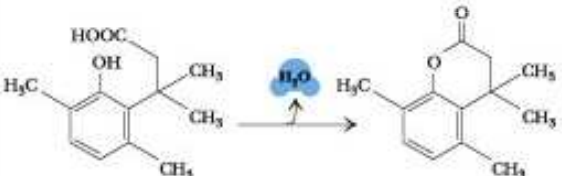
Figure 5-11 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

Aktivní místo

- Efekt přiblížení – překryv orbitalů
- Specifické mikroprostředí – pH, I, hydrofobita atd
- Dehydratace
- Koncentrační efekt - 10^5
- Vhodná orientace

Proximitní a orientační



Reaction	Rate const. ($\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$)	Ratio
	5.9×10^{-6}	
	1.5×10^6	2.5×10^{11}

Aktivační energie



Uvolněna při vazbě substrátu na enzym

Mechanismus katalýzy

- Acidobazická
- Kovalentní
- Kovovými ionty

Acidobazická

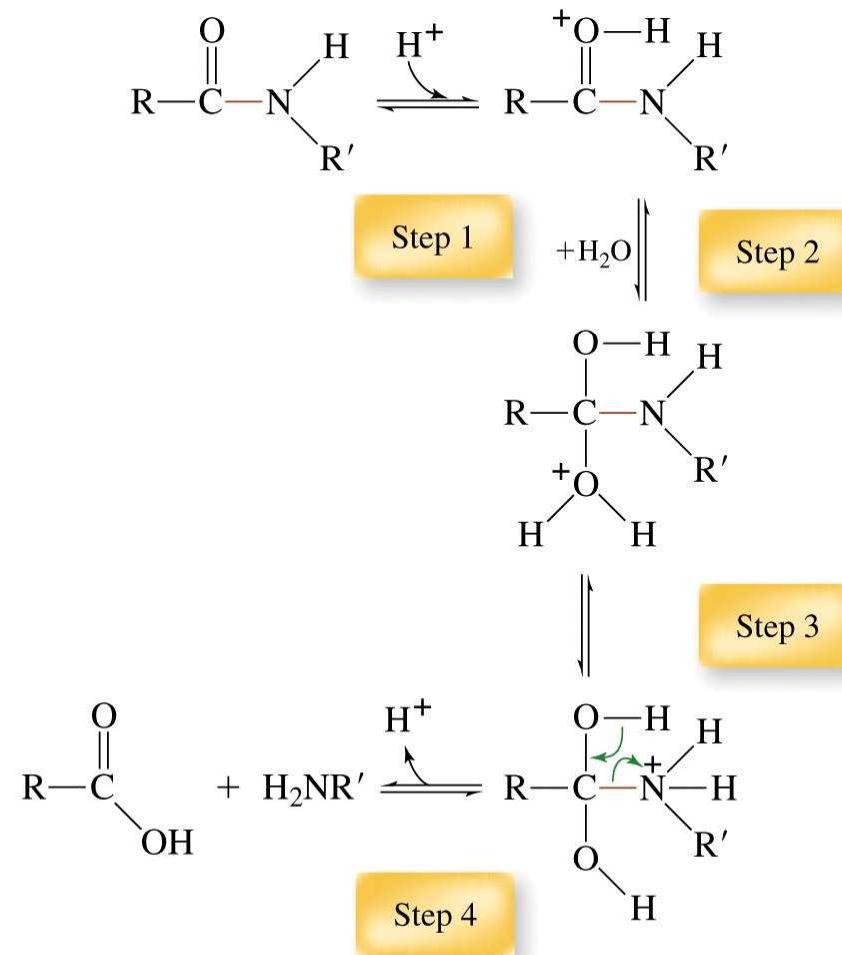
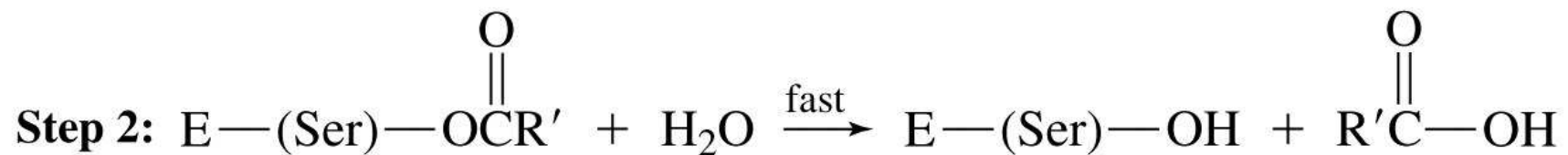
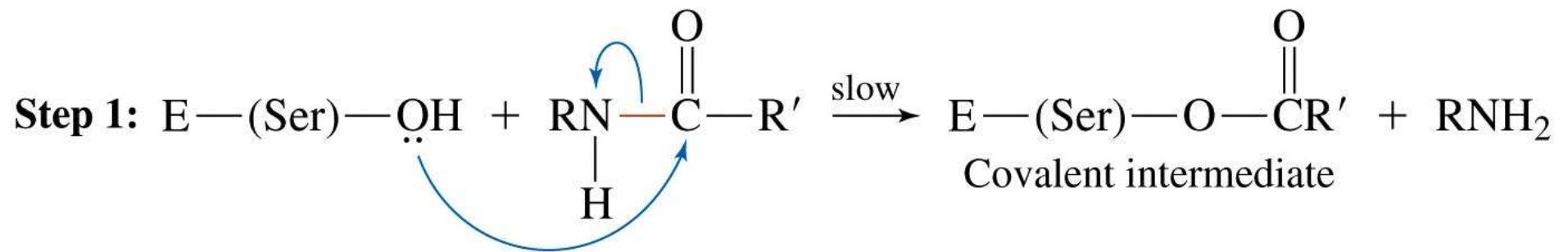


Figure 5-12 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

Kovalentní



Unnumbered figure pg150 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

Kovovými ionty

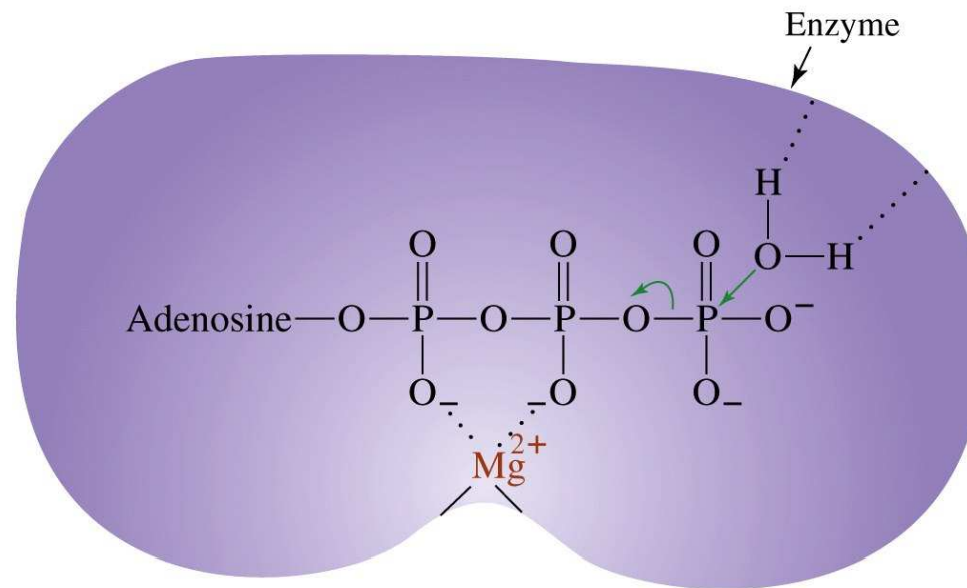


Figure 5-13a Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

Kovovými ionty

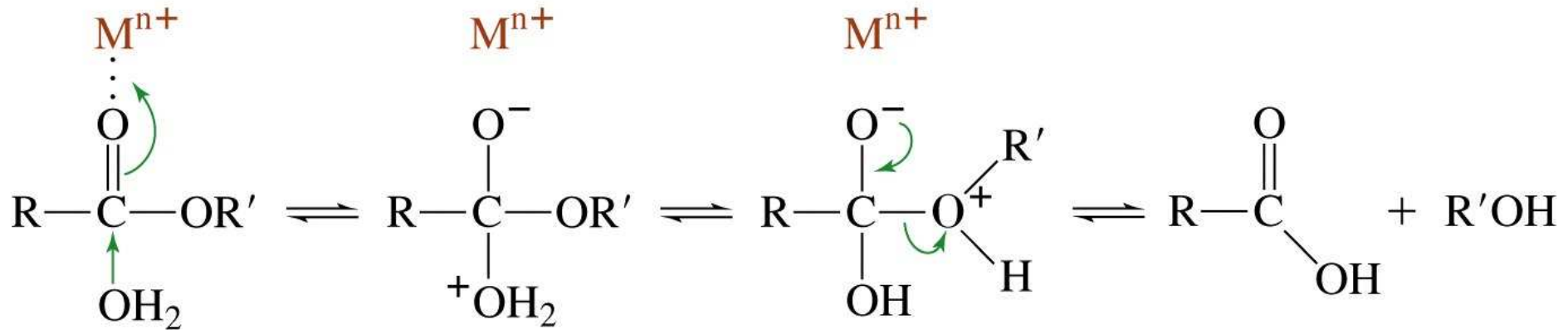


Figure 5-13b Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

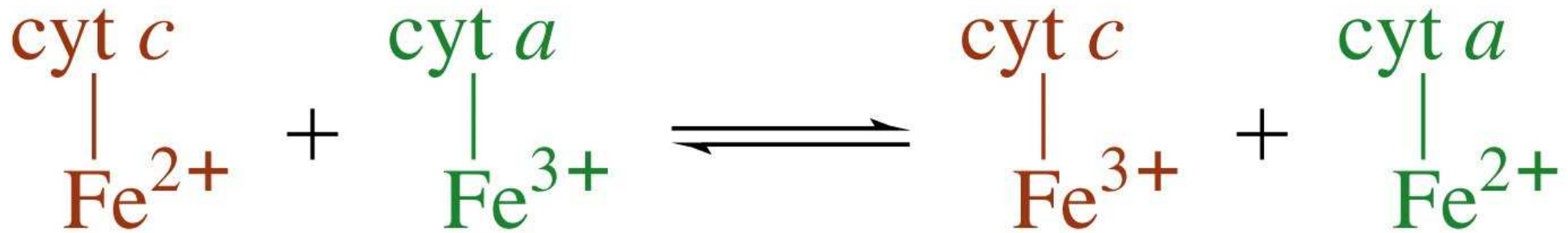
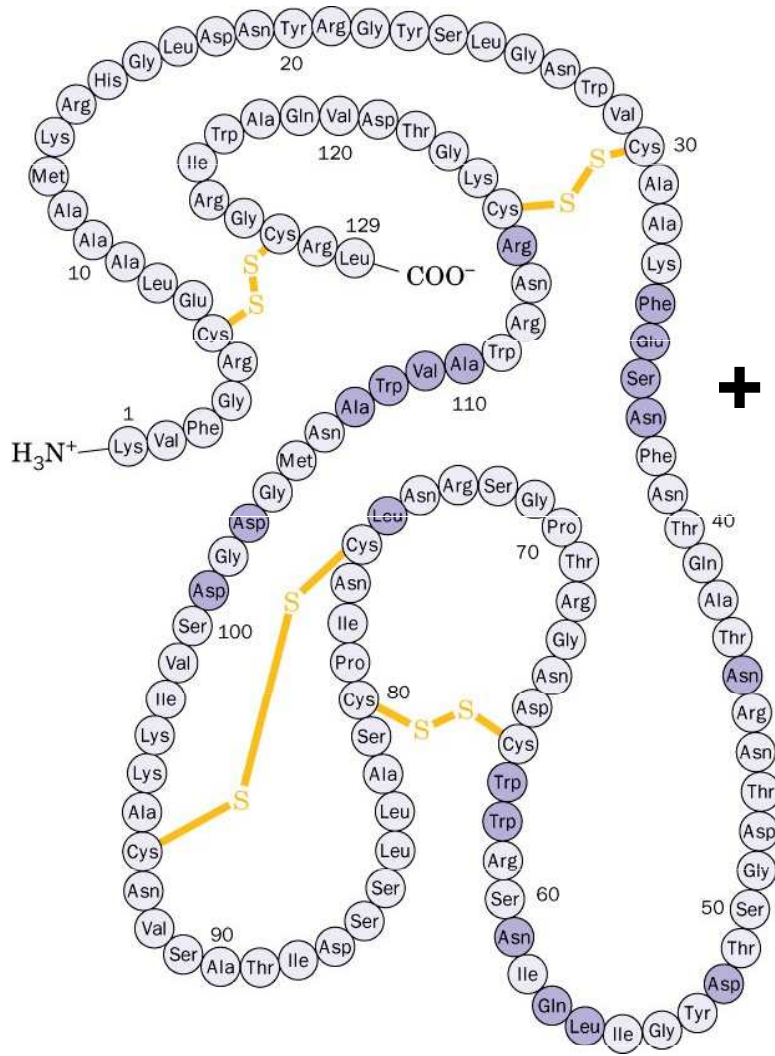
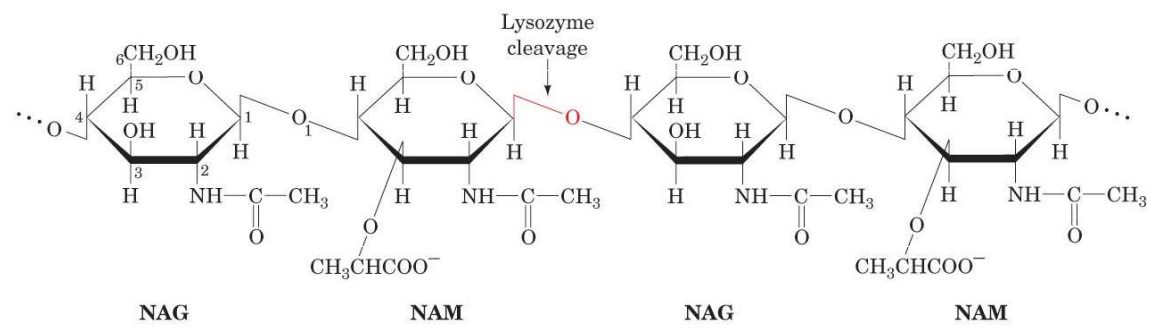


Figure 5-13c Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

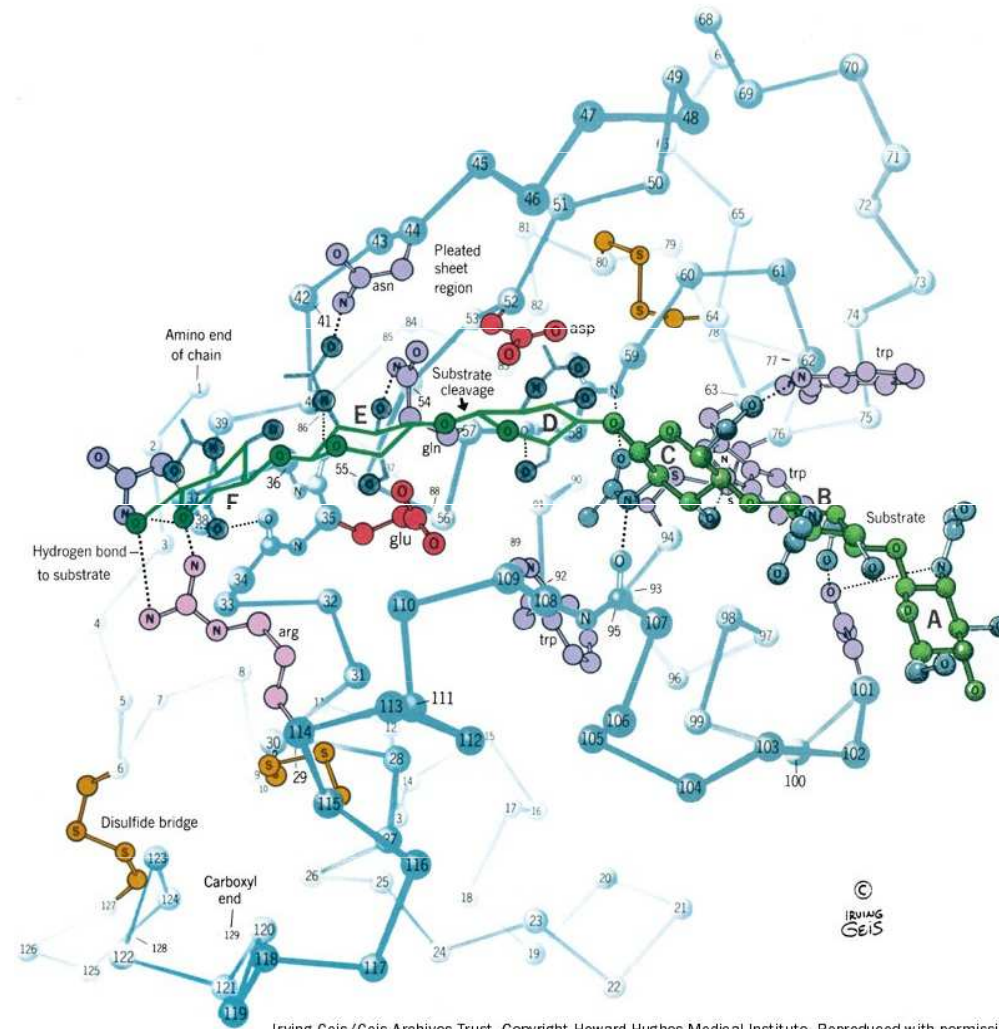
Lysozym



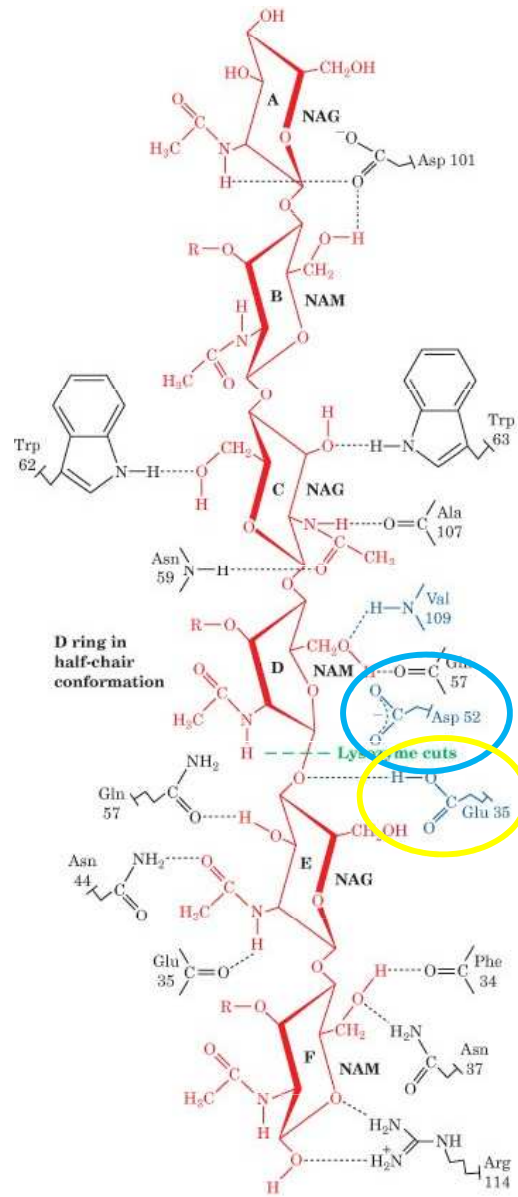
+



Lysozym

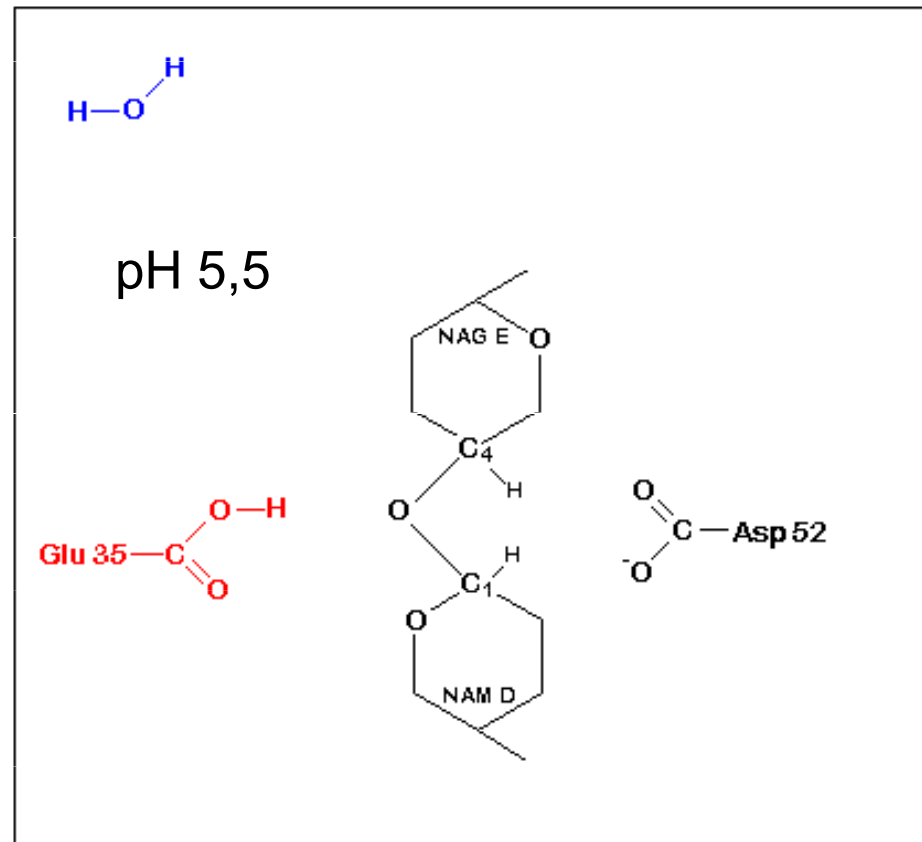


Irving Geis/Geis Archives Trust. Copyright Howard Hughes Medical Institute. Reproduced with permission



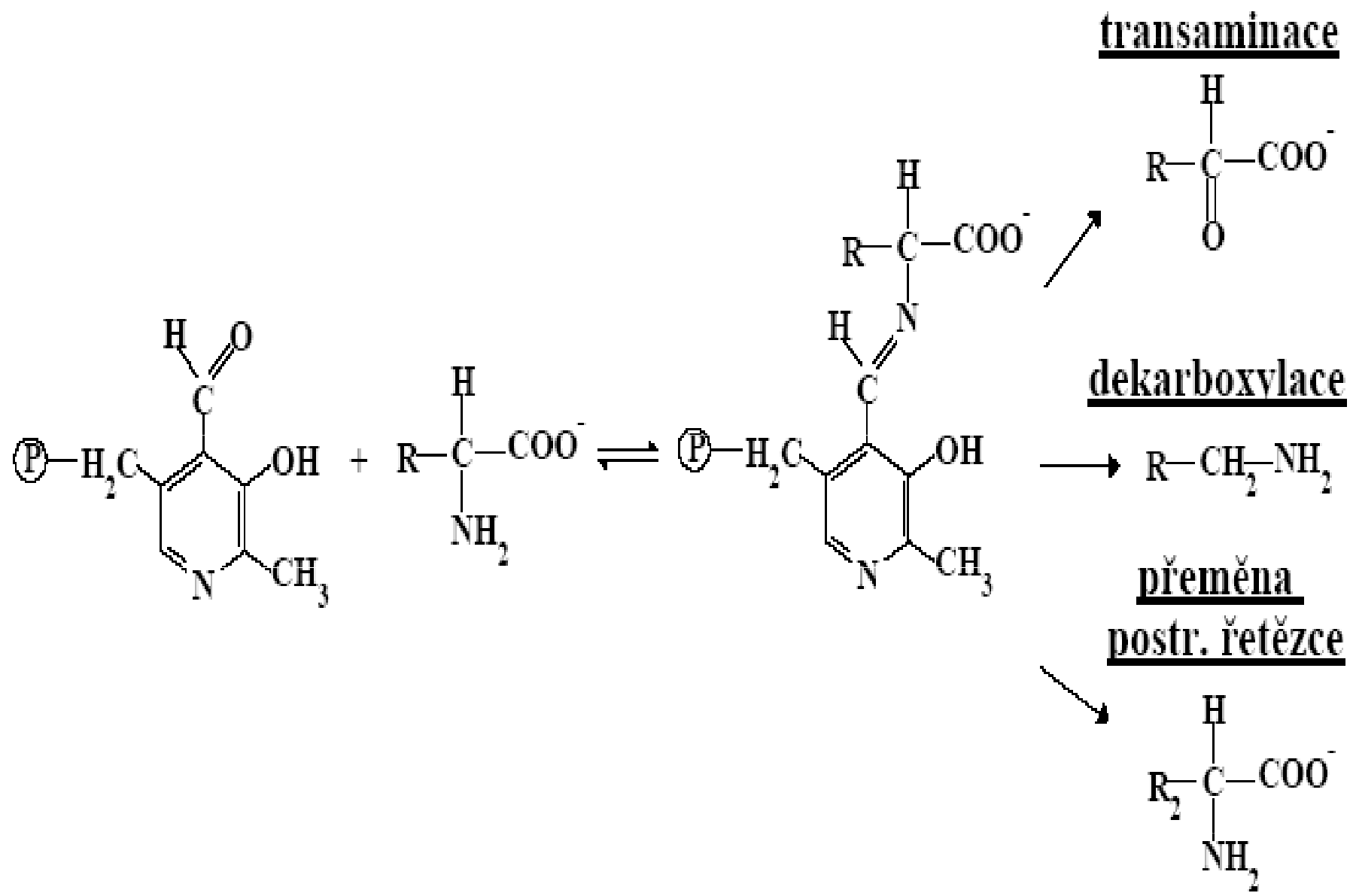
Irving Geis/Geis Archives Trust. Copyright Howard Hughes Medical Institute. Reproduced with permission

Lysozym



Specifita enzymové reakce

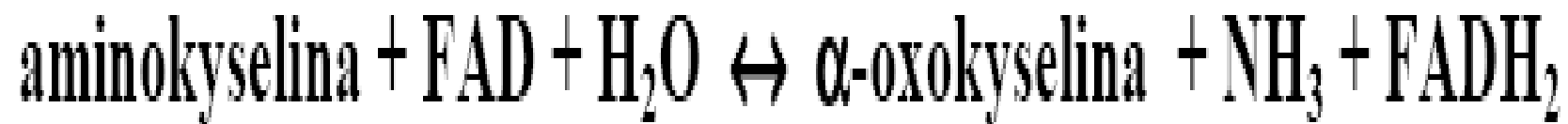
specifita reakční - účinku - jaká reakce proběhne



savci



vejcorodí

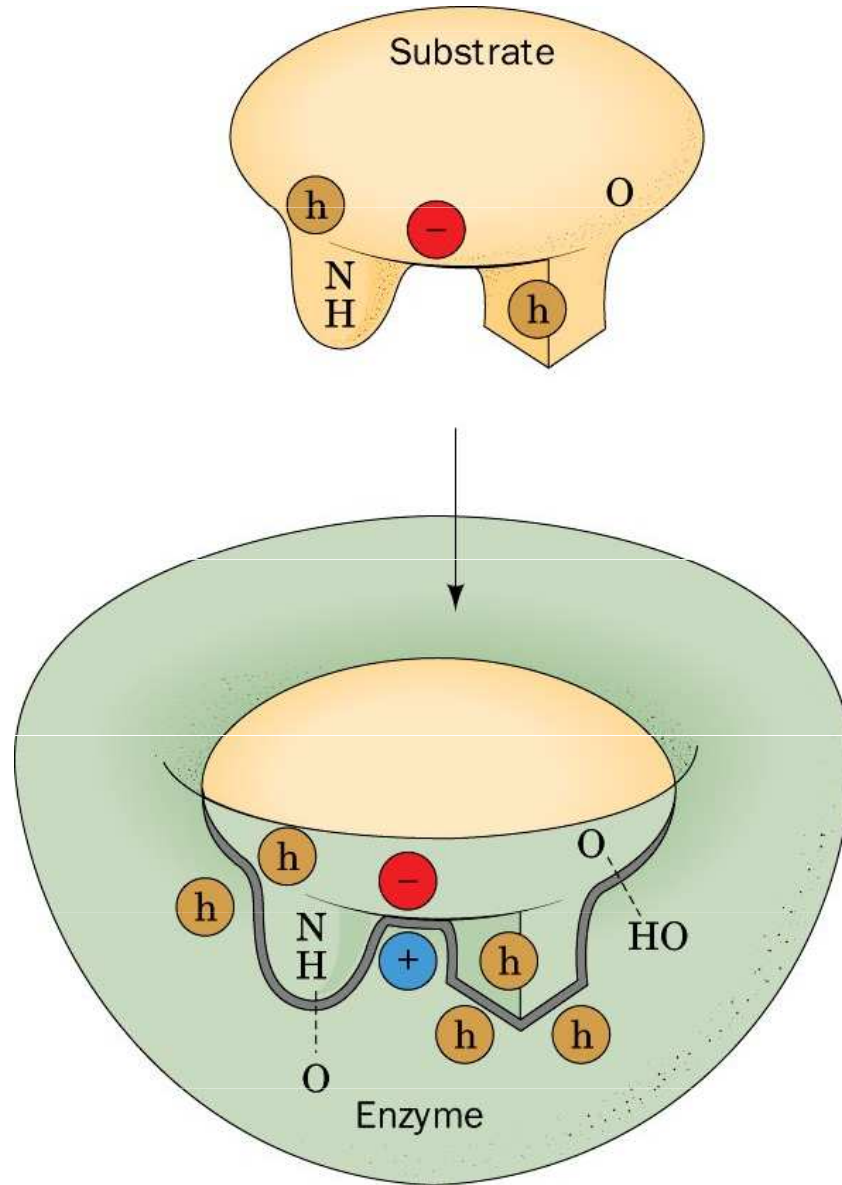


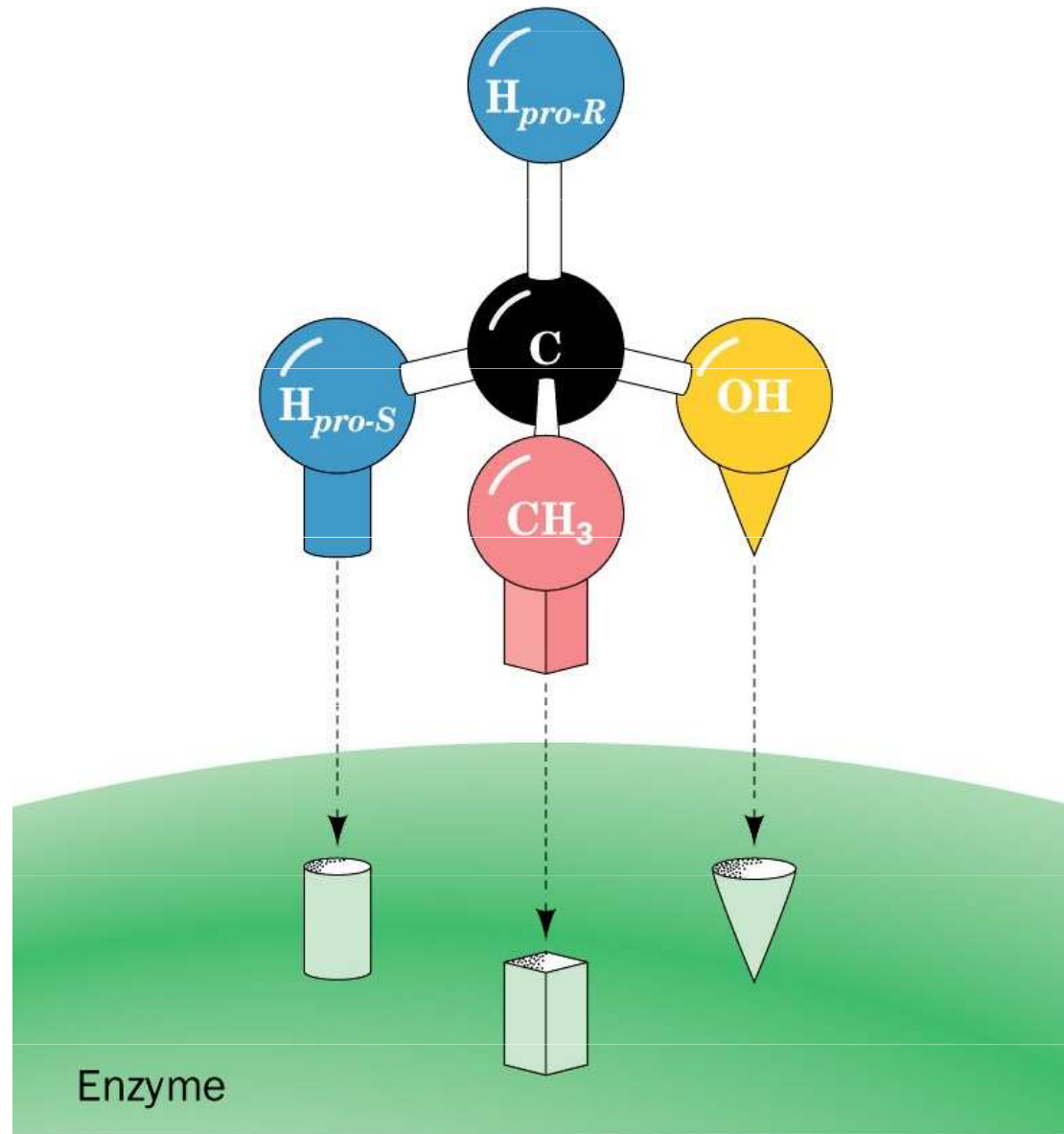
Specifita enzymové reakce

specifita substrátová - absolutní

- skupinová

- stereospecifita





ENZYMOVÁ KINETIKA

Reakce s jedním substrátem

BROWN 1902

MICHAELIS MENTENOVÁ 1913

a) závislost počáteční rychlosti na koncentraci enzymu

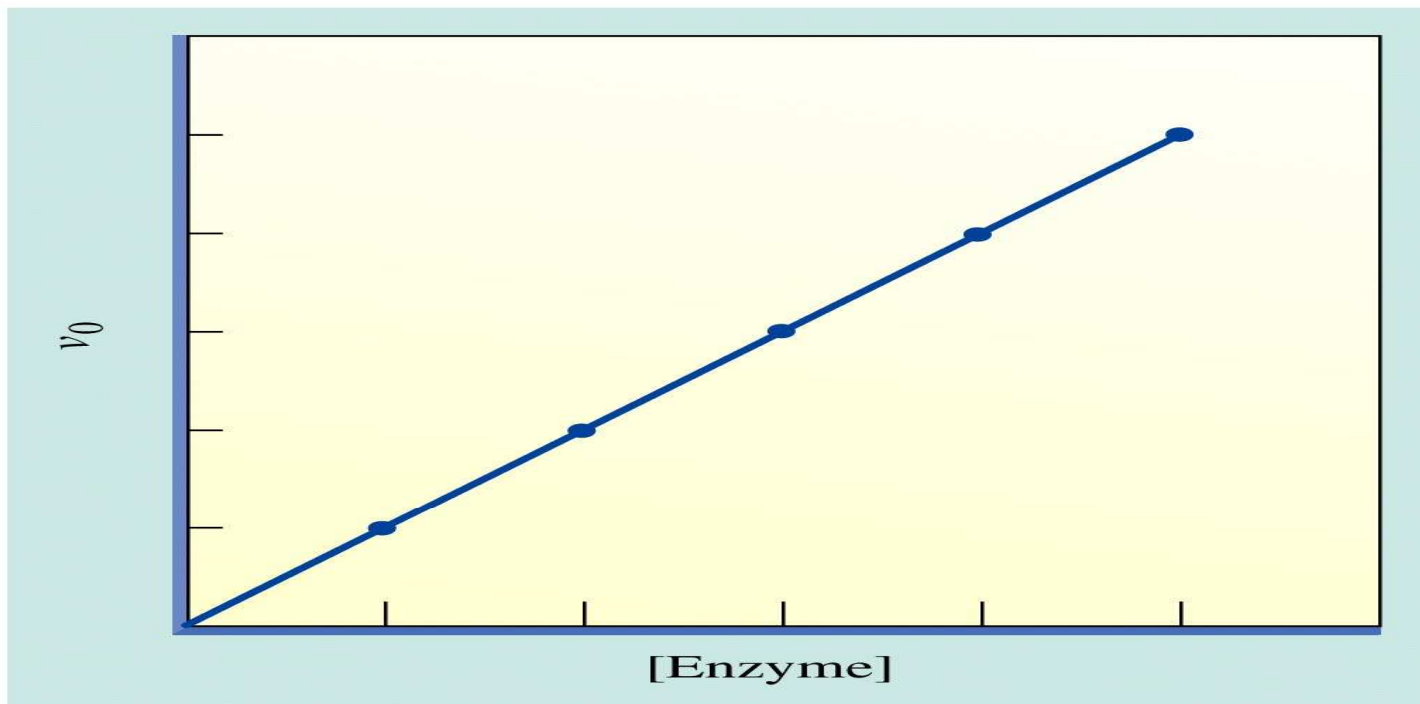


Figure 5-5 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

b) závislost počáteční rychlosti na koncentraci enzymu

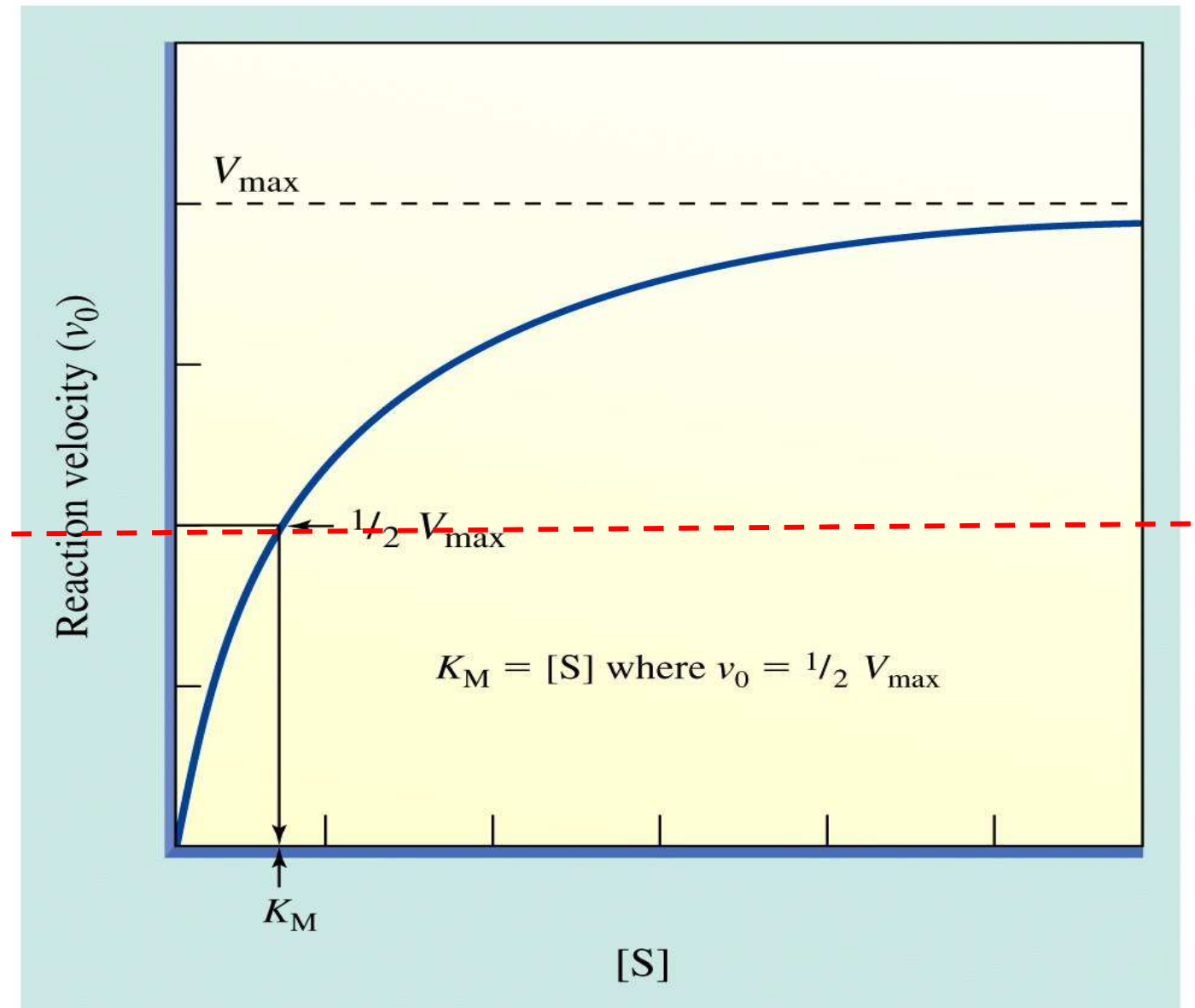
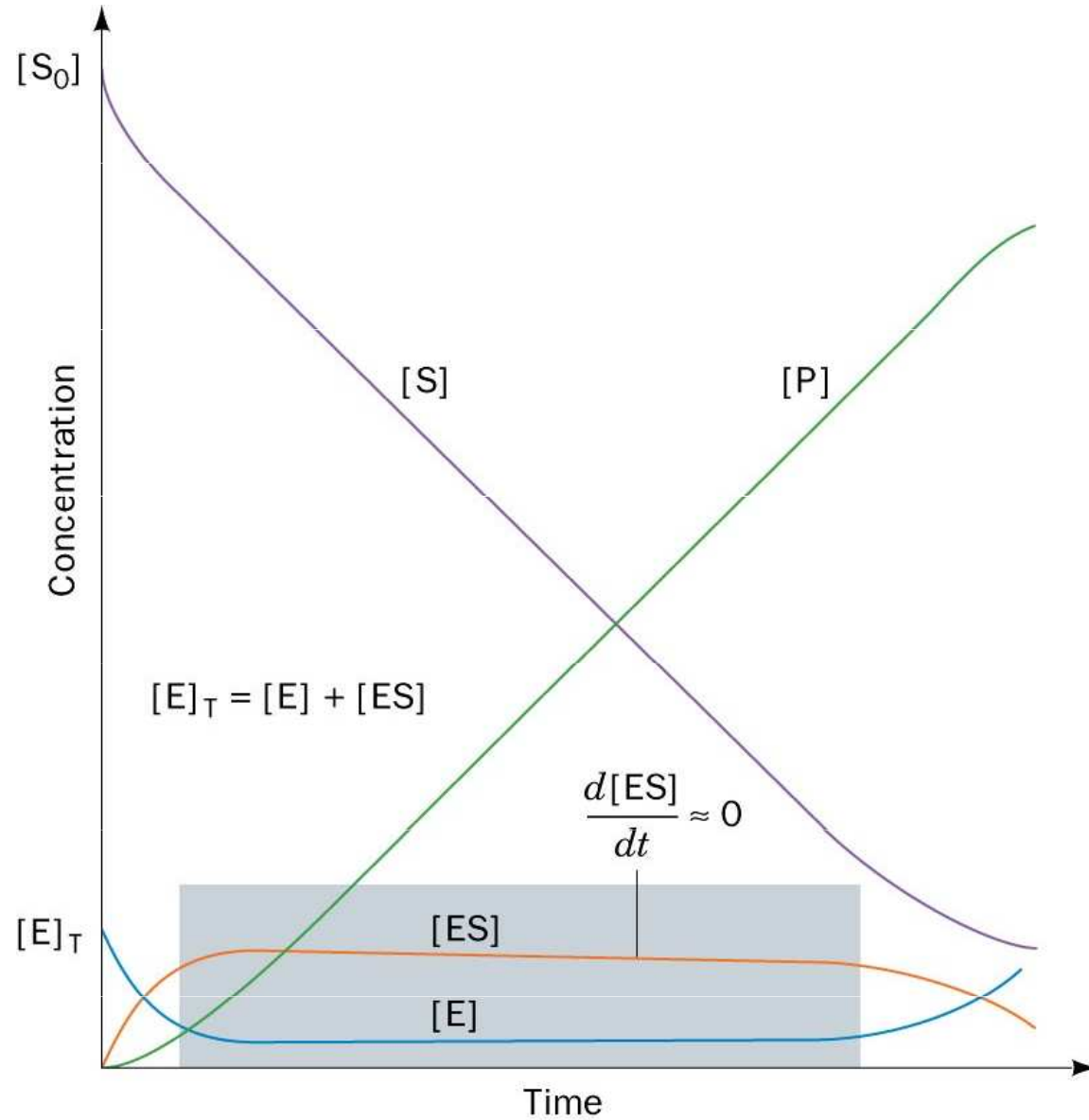
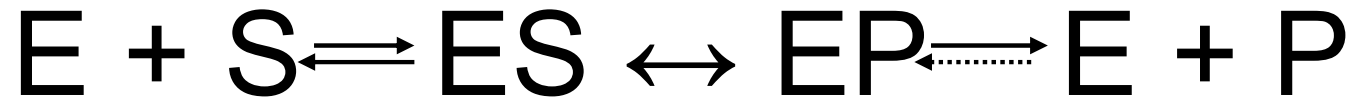
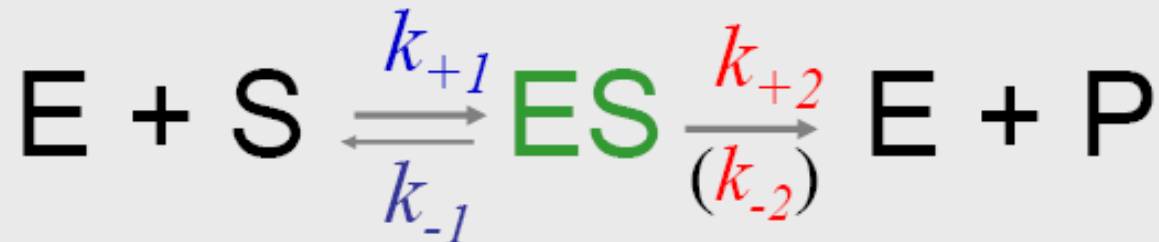


Figure 5-4 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

Ustálený stav

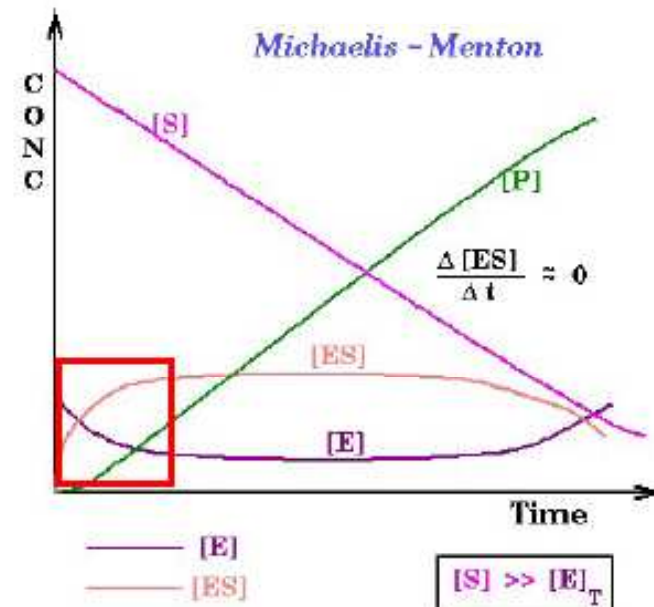


Základní model - Michaelis & Mentenová

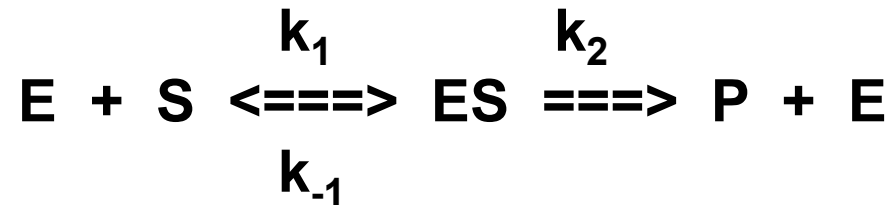


Předpoklady:

1. Koncentrace [ES] je v ustáleném stavu
2. Tvorba produktu P je přímo úměrná koncentraci [ES], tudíž $v_0 = k_2 [\text{ES}]$
3. Koncentrace [S] je mnohem vyšší než [E]
4. Zpětnou reakci lze zanedbat?



Odvození rovnice Michaelis Mentenové



1. Předpoklad – koncentrace [ES] se v ustáleném, stavu nemění

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0$$

$$k_1 [E][S] = k_{-1} [ES] + k_2 [ES]$$

$$[E]_{\text{tot}} = [E] + [ES]$$

$$k_1 ([E]_{\text{tot}} - [ES])[S] = k_{-1} [ES] + k_2 [ES]$$

$$[E] = [E]_{\text{tot}} - [ES]$$

$$([E]_{\text{tot}} - [ES])[S] = (k_{-1} + k_2/k_1) [ES]$$

$$K_m = (k_{-1} + k_2/k_1)$$

$$([E]_{\text{tot}} - [ES])[S] = K_m [ES]$$

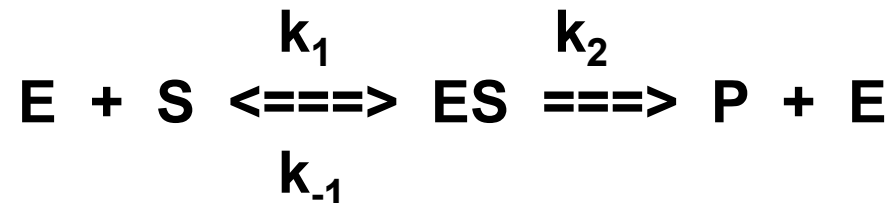
$$[E]_{\text{tot}} [S] - [ES][S] = K_m [ES]$$

$$[E]_{\text{tot}} [S] = K_m [ES] + [ES][S]$$

$$[E]_{\text{tot}} [S] = [ES] (K_m + [S])$$

$$[ES] = [E]_{\text{tot}} [S] / (K_m + [S])$$

Odvození rovnice Michaelis Mentenové



2. Předpoklad – tvorba produktu je přímo úměrná koncentraci [ES] $v_0 = k_2 \cdot [ES]$

$$[ES] = [E]_{\text{tot}} [S] / (K_m + [S])$$

$$[ES] = v_0 / k_2$$

$$v_0 / k_2 = [E]_{\text{tot}} [S] / (K_m + [S])$$

$$v_0 = k_2 [E]_{\text{tot}} [S] / (K_m + [S])$$

$$V_{\text{max}} = k_2 [E]_{\text{tot}}$$

$$v_0 = V_{\text{max}} [S] / (K_m + [S])$$

$$v_0 = \frac{V_{\text{max}} [S]}{K_m + [S]}$$

Rovnice Michaelis Mentenové

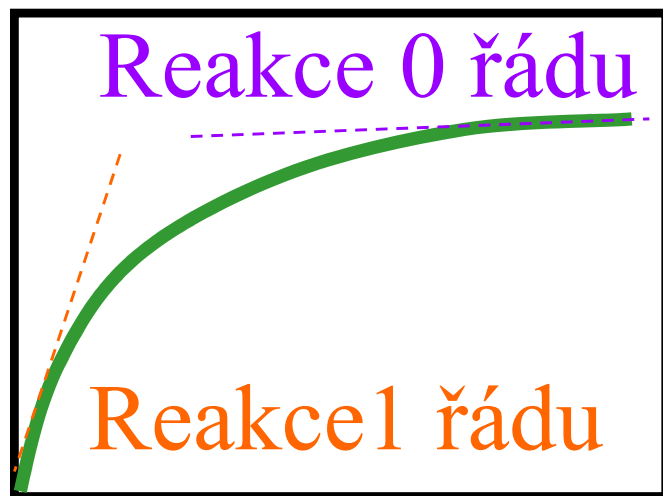
$$v = \frac{V \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

v - počáteční reakční rychlost

V - maximální (limitní) reakční rychlost

K_m - Michaelisova konstanta

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



$$[S] \ll K_m$$

$$v = \frac{V \cdot [S]}{K_m} = \text{konst.} \cdot [S]$$



$[S] = \text{nizká} \rightarrow \text{vysoká}$

Stanovení K_m a V_{max}

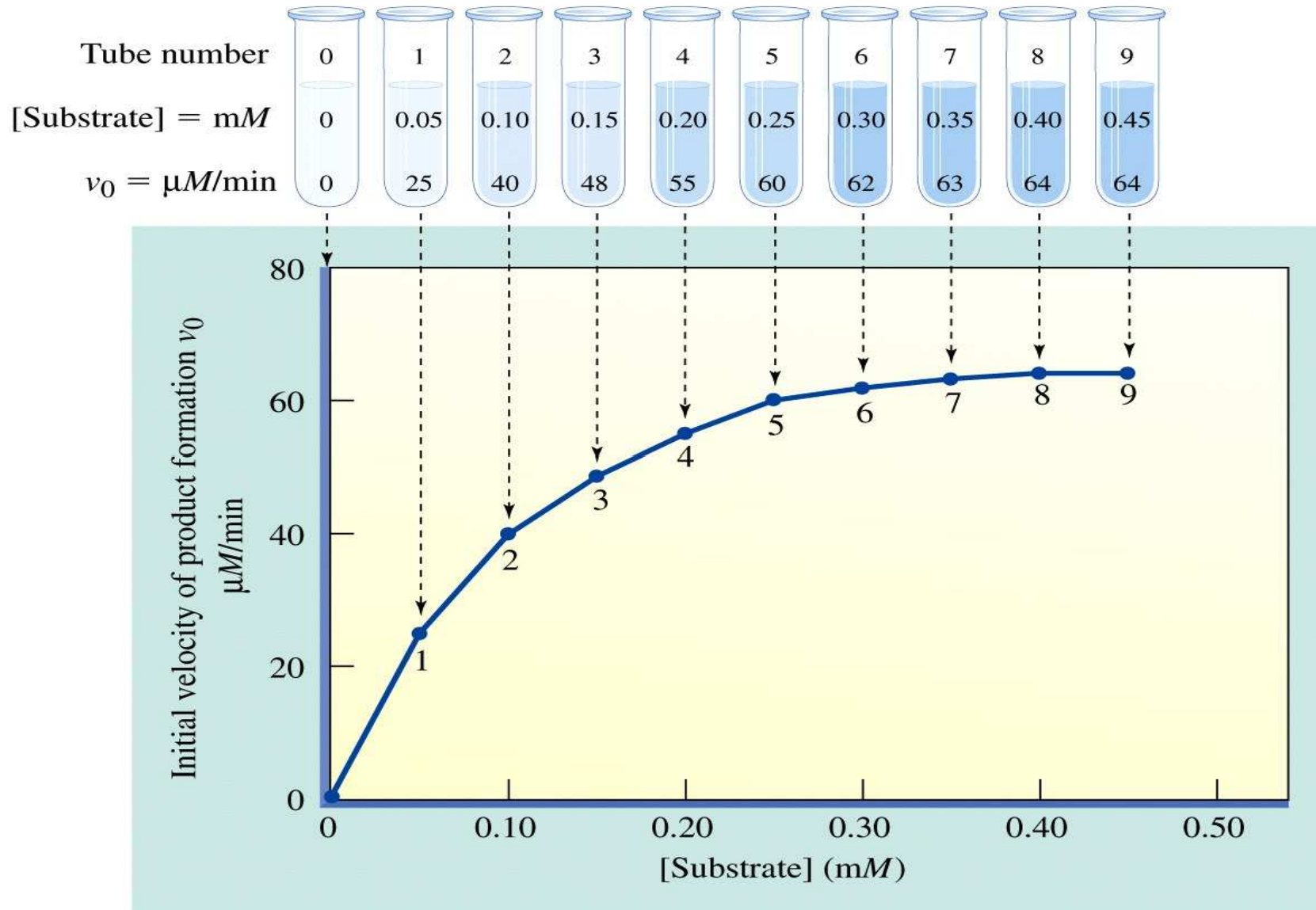


Figure 5-3 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

Stanovení K_m :

LINEWEAVER BURKE

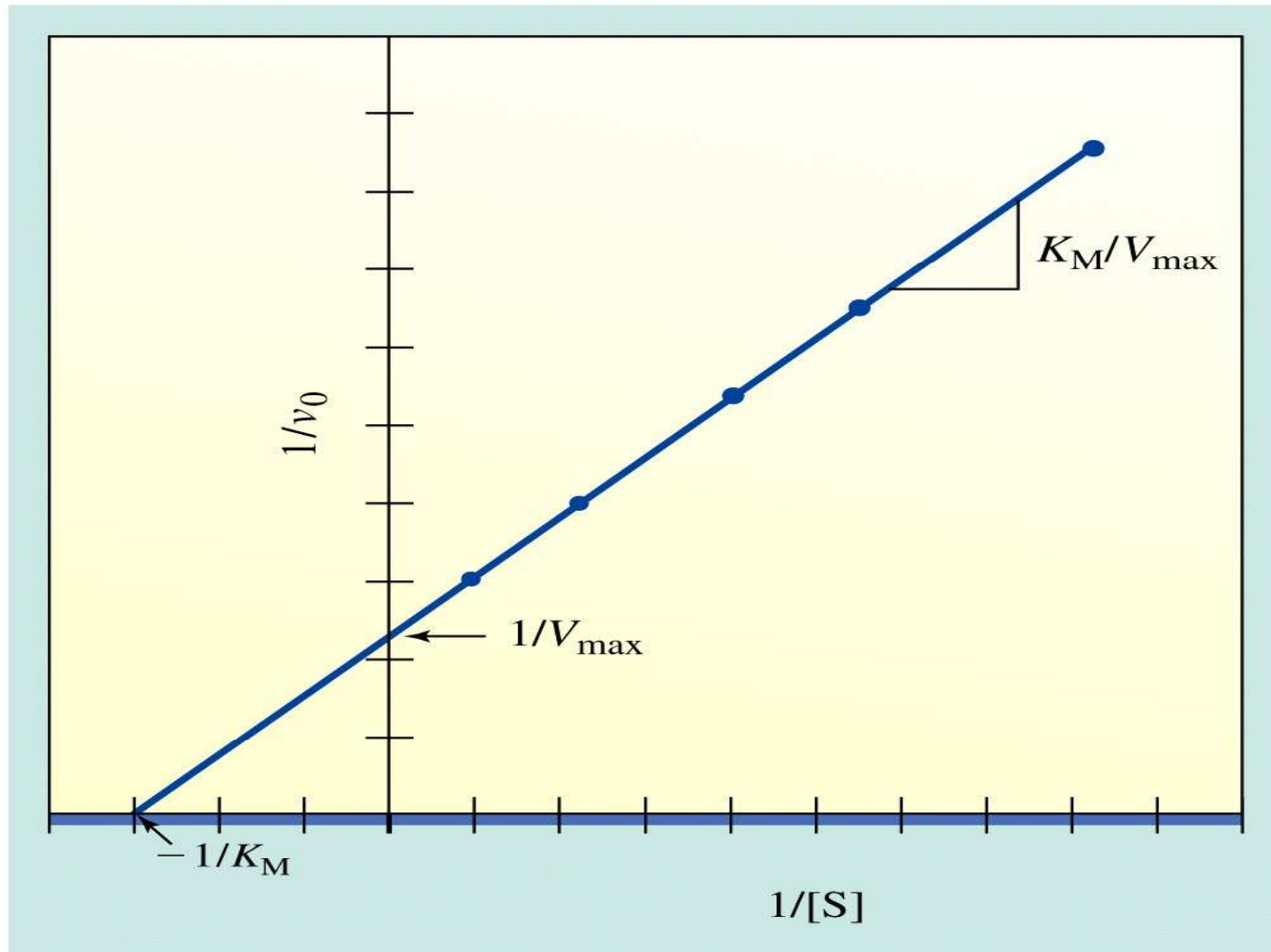


Table 5.3 **K_M values for some enzyme–substrate systems**

Enzyme	Substrate	K_M (mM)
Catalase	H ₂ O ₂	0.001
Hexokinase from brain	ATP	0.4
	D-Glucose	0.05
	D-Fructose	1.5
Carbonic anhydrase	HCO ₃ ⁻	9
Chymotrypsin	Glycyltyrosinylglycine	108
	<i>N</i> -Benzoyltyrosinamide	2.5
β-Galactosidase	Lactose	4.0
Penicillinase	Benzylpenicillin	0.050
Pyruvate carboxylase	ATP	0.060
	Pyruvate	0.40
	HCO ₃ ⁻	1.0
Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (rubisco)	Ribulose-1,5-bisphosphate	0.028
	CO ₂	0.009
Ribulose-1,5-bisphosphate oxygenase (rubisco)	Ribulose-1,5-bisphosphate	0.028
	O ₂	0.535

Table 5.4

Turnover numbers, k_3 , for some enzymes

Enzyme	Substrate	k_3 (sec ⁻¹)
Catalase	H ₂ O ₂	40,000,000
Carbonic anhydrase	HCO ₃ ⁻	400,000
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	25,000
Penicillinase	Benzympenicillin	2,000
Lactate dehydrogenase	Lactate	1,000
Chymotrypsin	Glycyltyrosinylglycine	100
DNA polymerase	DNA	15
Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase	Ribulose-1,5-bisphosphate + CO ₂	3.3
Ribulose-1,5-bisphosphate oxygenase	Ribulose-1,5-bisphosphate + O ₂	2.4

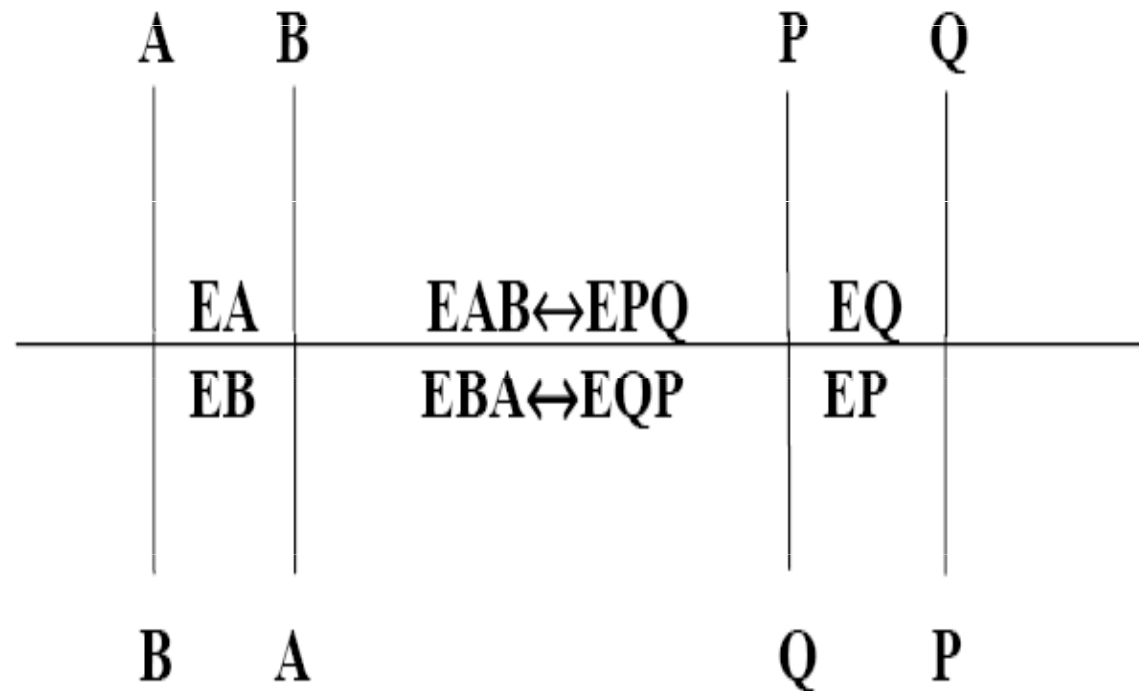
Table 5-4 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

Reakce se dvěma substráty

Mechanismy - CLELAND

Sekvenční :

a) *náhodný*



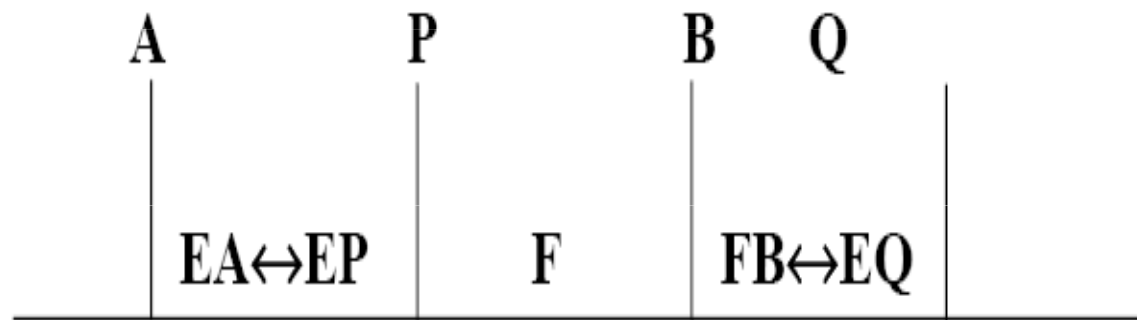
fosforyláza
kreatinkináza

b) *uspořádaný*



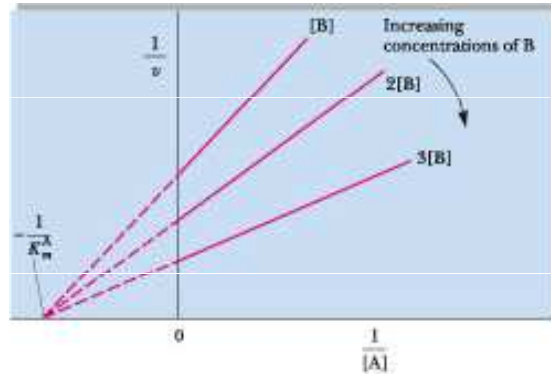
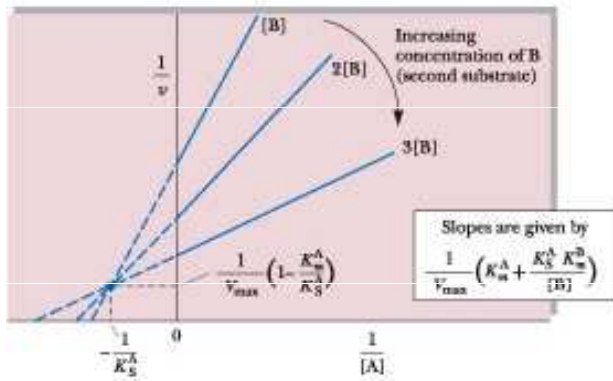
Alkoholdehydrogenáza
A – NAD⁺, B – EtOH)

Pingpongový

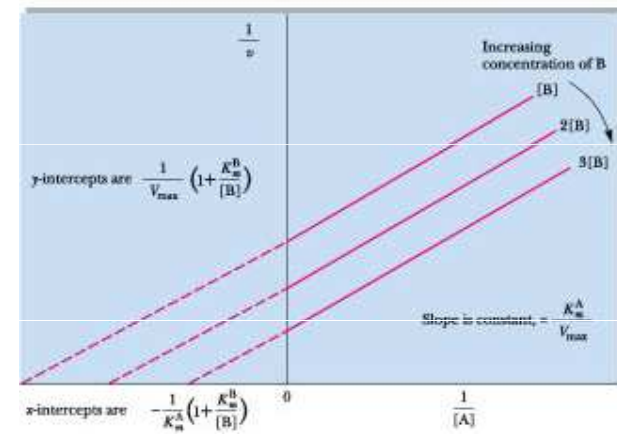


Transaminázy
A-AMK, B-OxoK

Double-reciprocal form of the rate equation: $\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \left(K_m^A + \frac{K_S^A K_m^B}{[B]} \right) \left(\frac{1}{[A]} + \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_m^B}{[B]} \right) \right)$

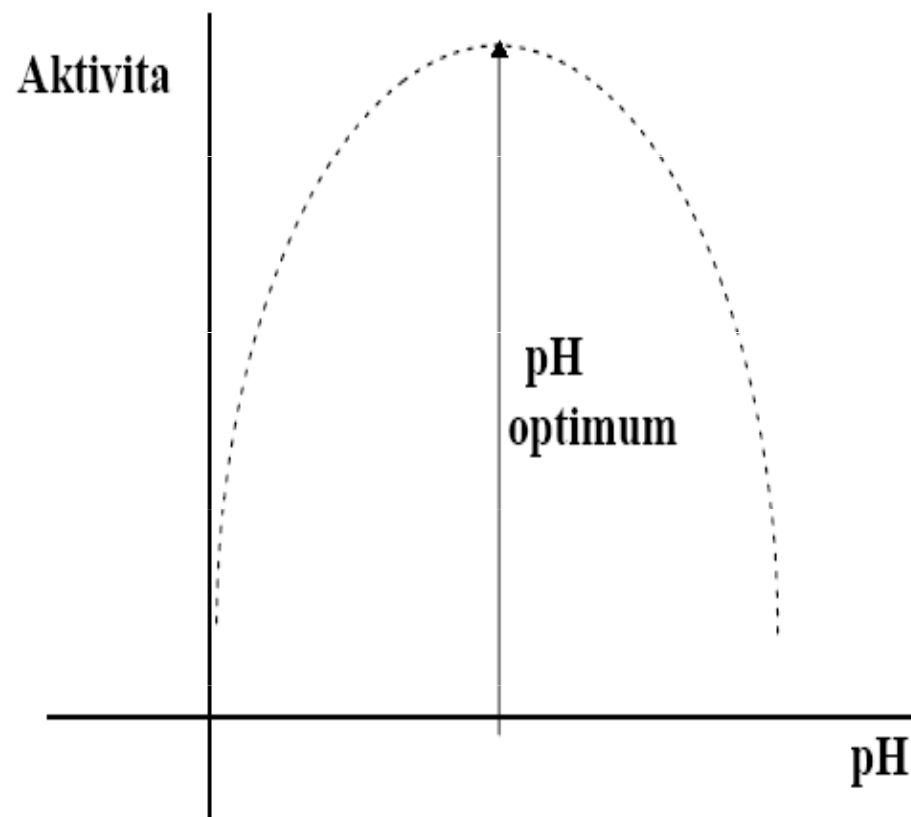


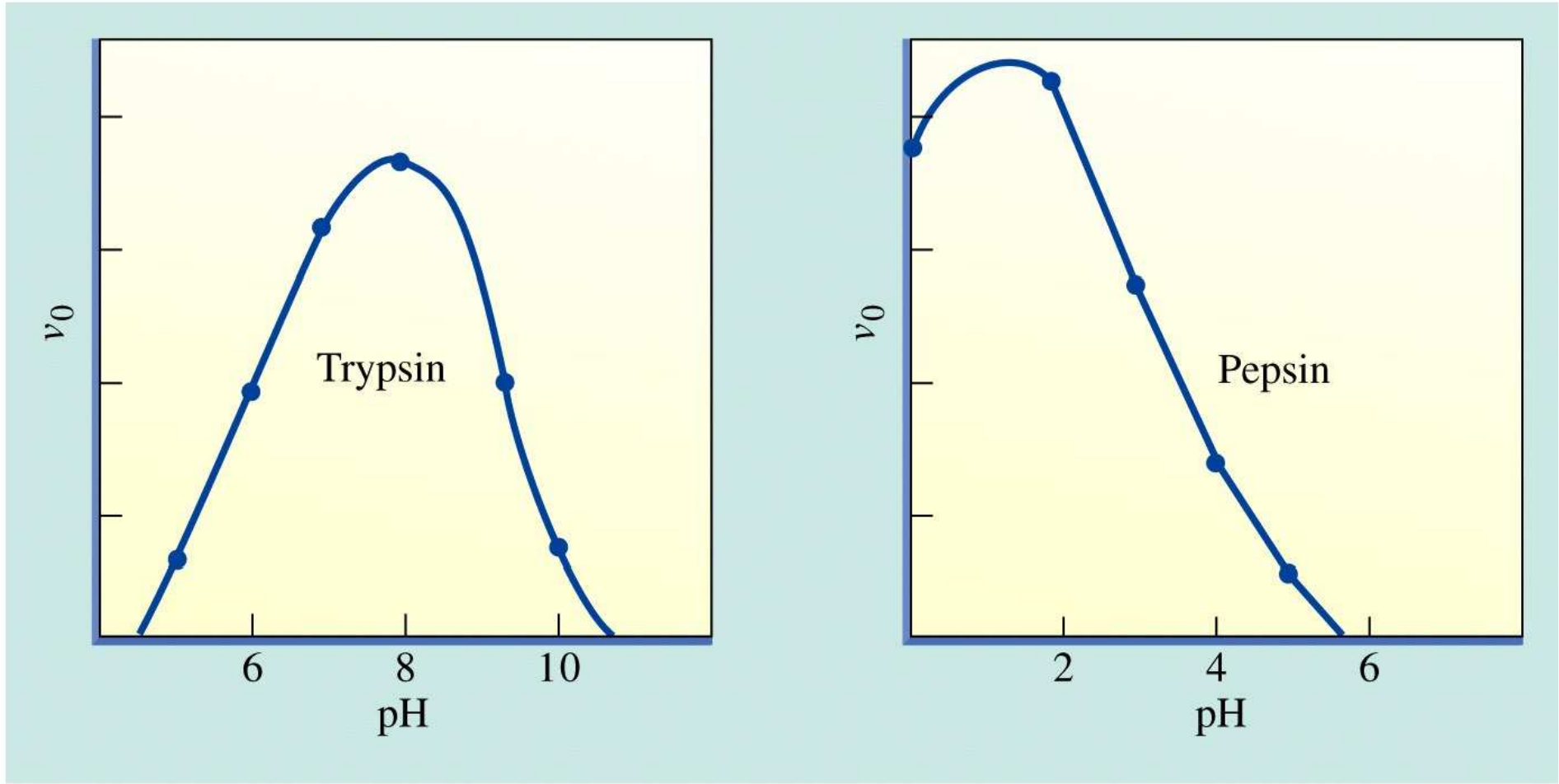
Double-reciprocal form of the rate equation: $\frac{1}{v} = \frac{K_m^A}{V_{max}} \left(\frac{1}{[A]} \right) + \left(1 + \frac{K_m^B}{[B]} \right) \left(\frac{1}{V_{max}} \right)$



Fyzikálně chemické faktory
ovlivňující rychlost enzymové reakce

Vliv pH



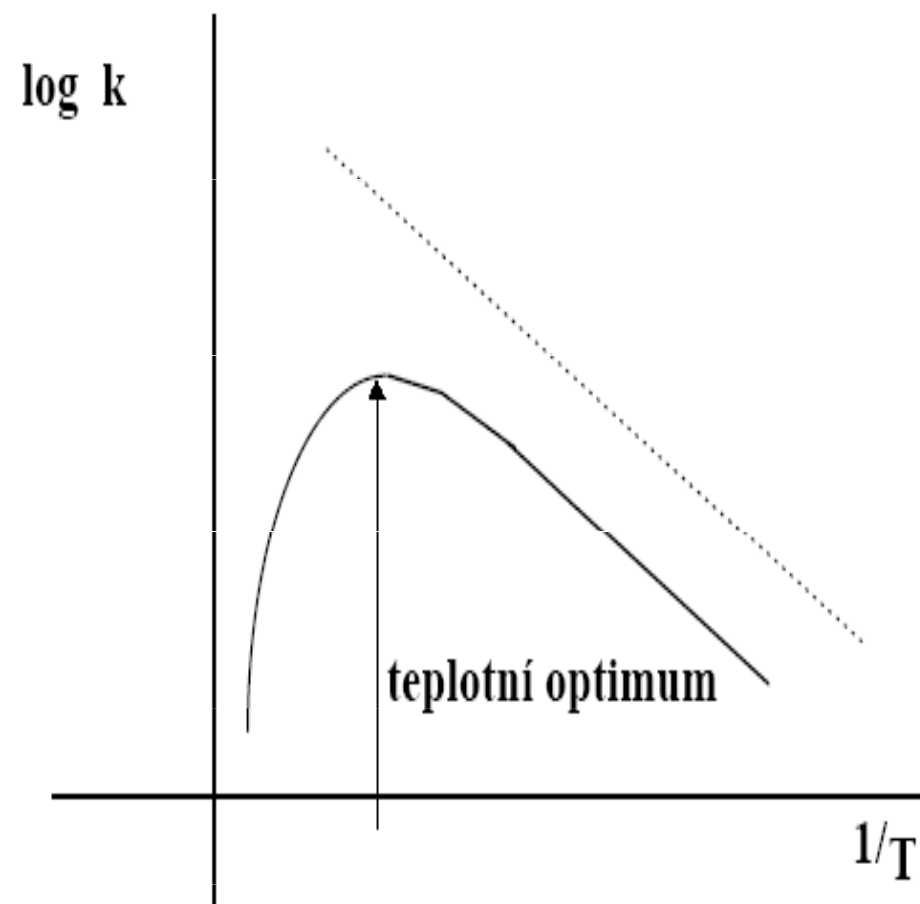


(a)

(b)

Figure 5-6 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

Vliv teploty



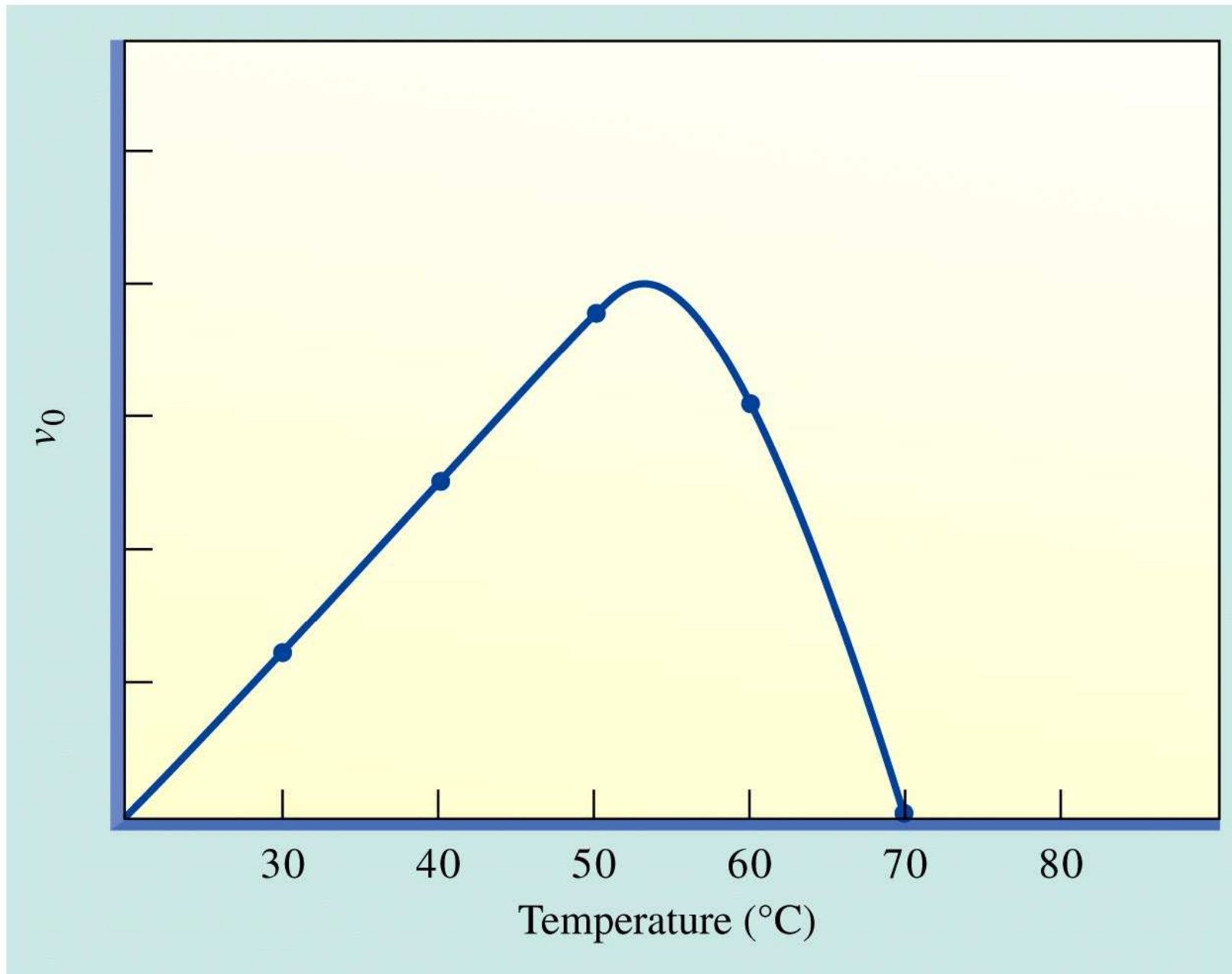
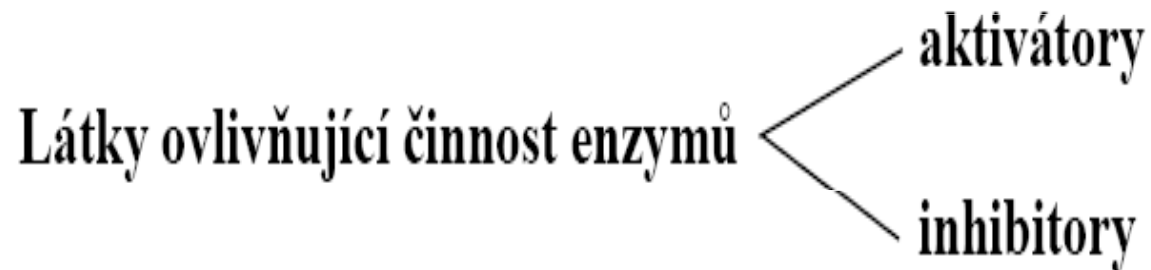


Figure 5-7 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

Látky ovlivňující činnost enzymů



Aktivátory - zvyšují rychlost enzymové reakce

Inhibitory - snižují rychlost enzymové reakce

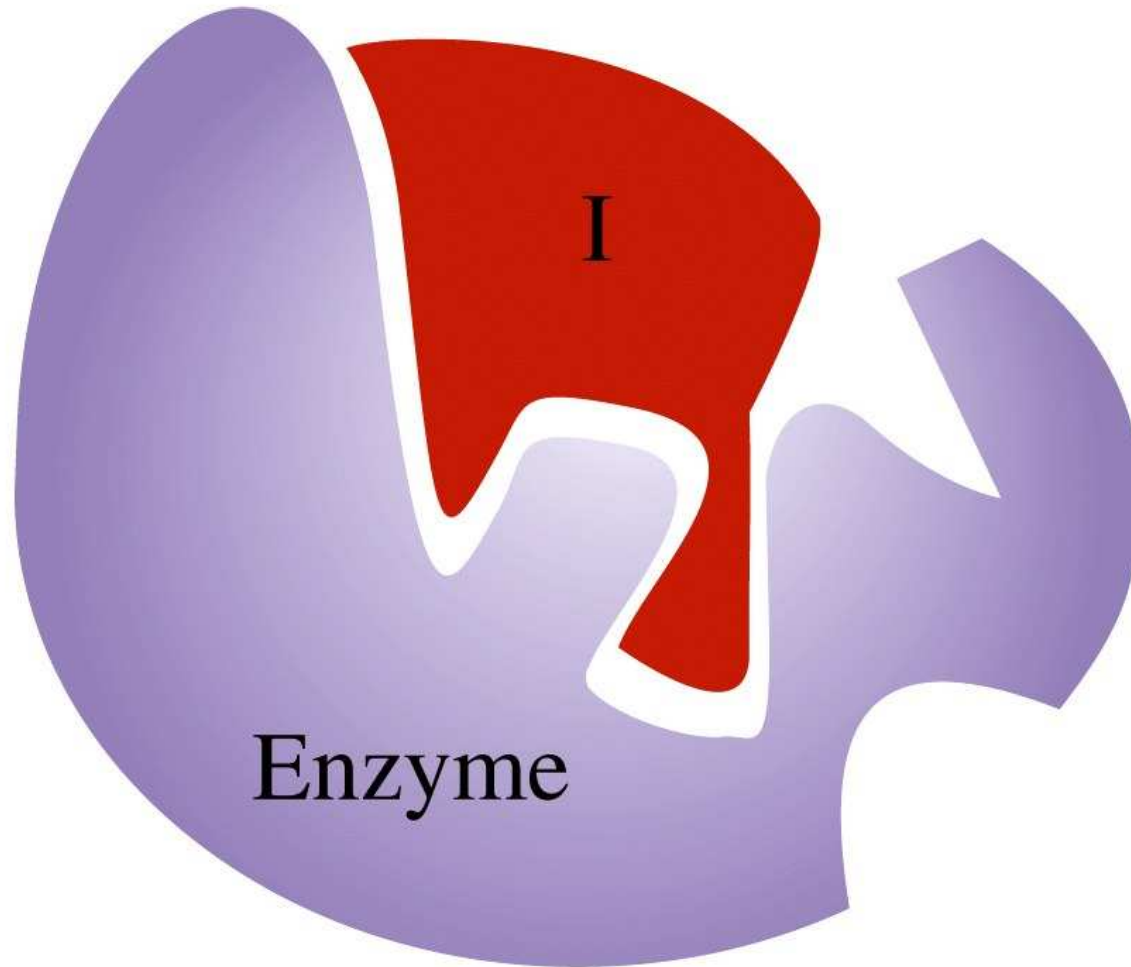
Inhibice

- Irreverzibilní inhibice



- Reverzibilní inhibice

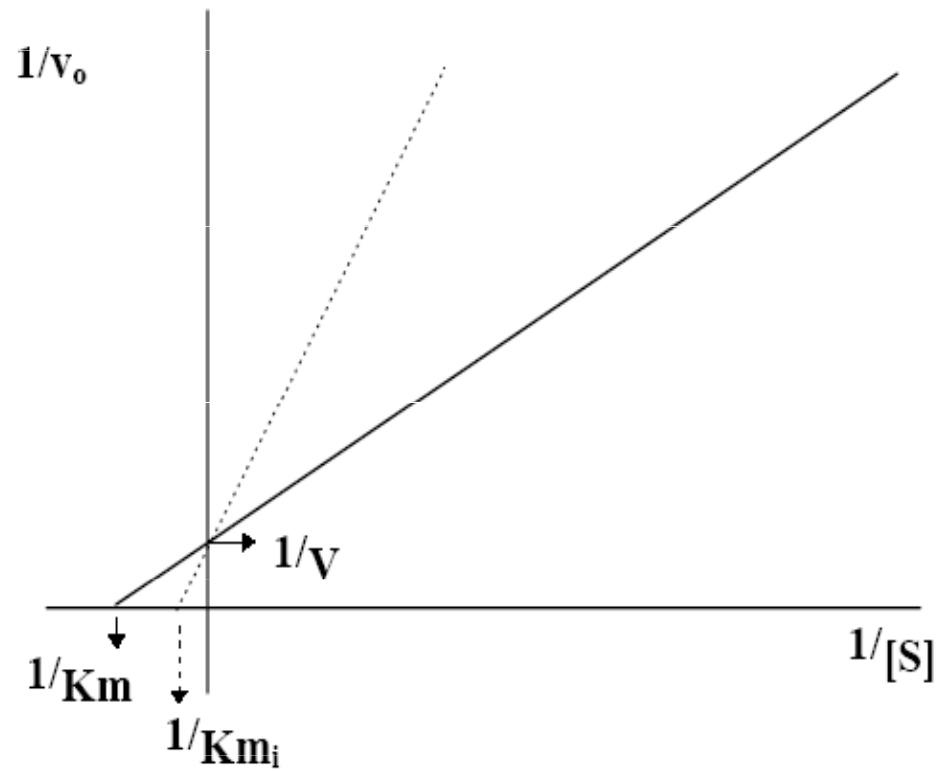
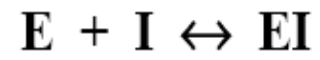
Kompetitivní inhibice



Competitive
(inhibitor binds
in active site)

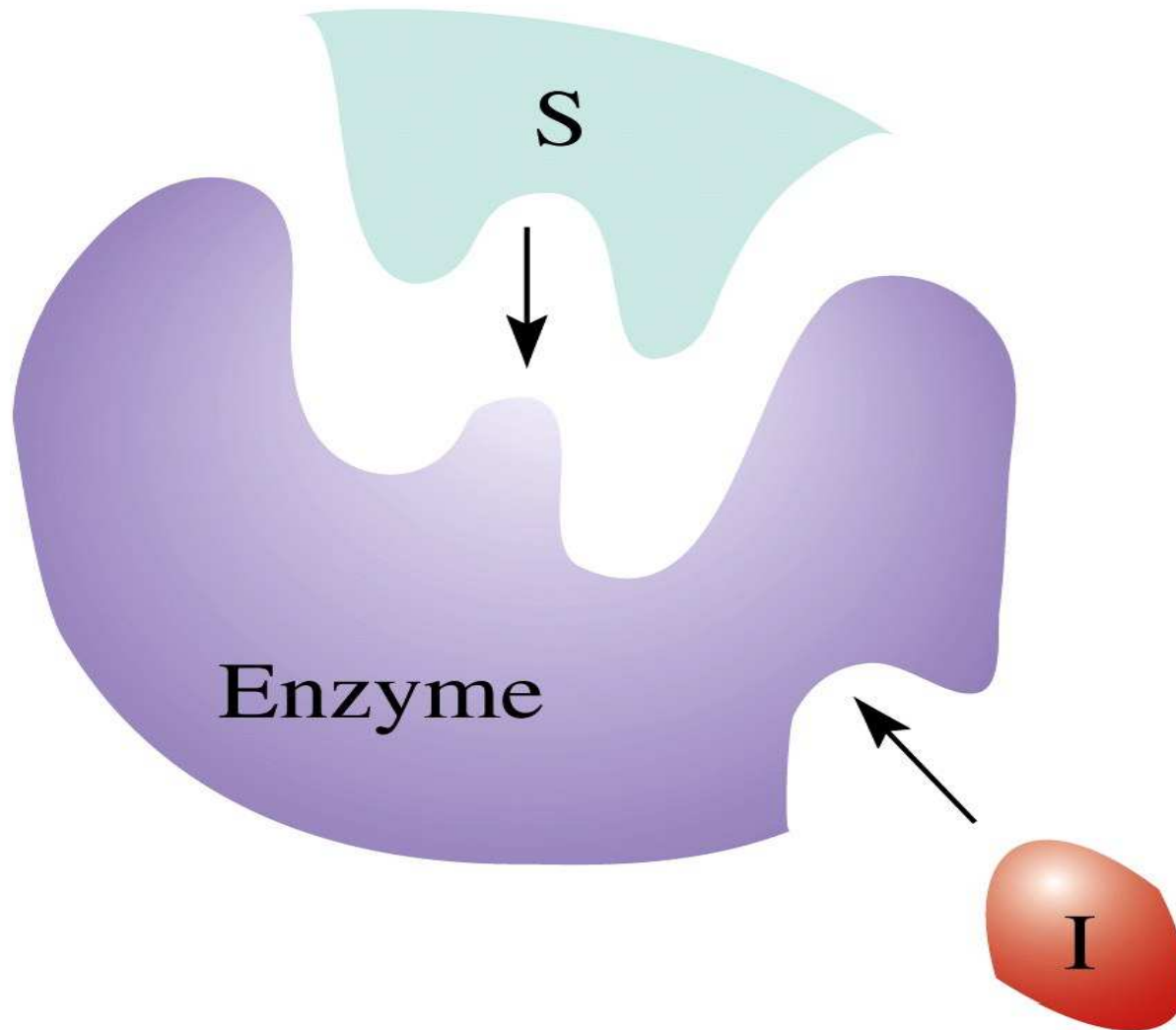
- Reverzibilní inhibice

Kompetitivní inhibice



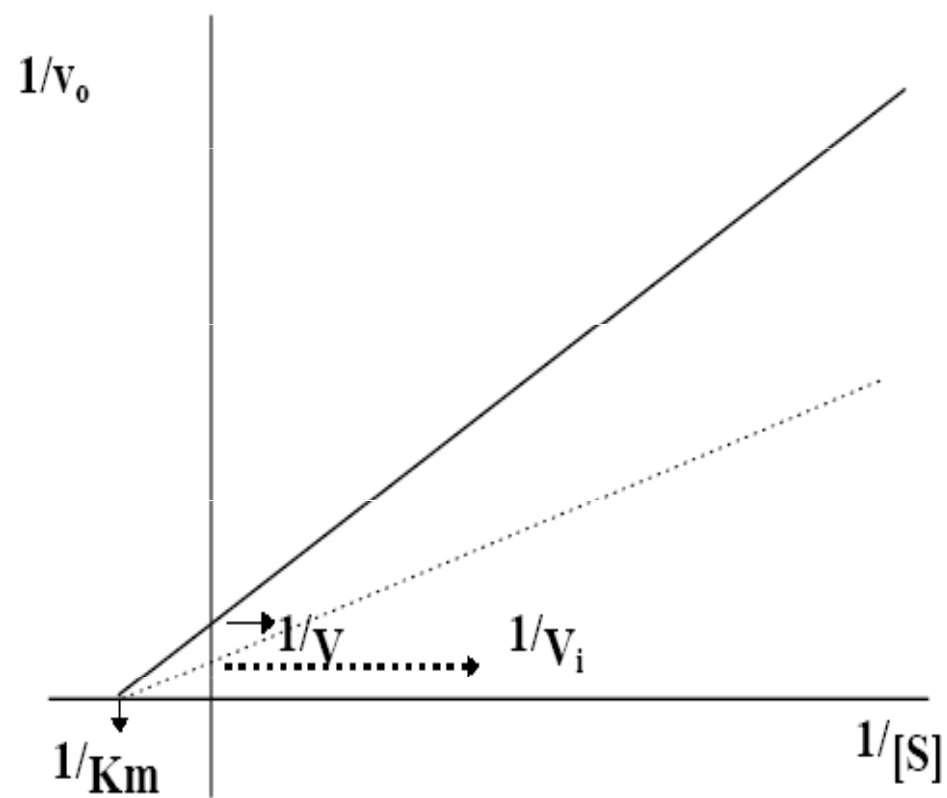
$$K_{m_i} > K_m \quad V_i = V$$

Nekompetitivní inhibice

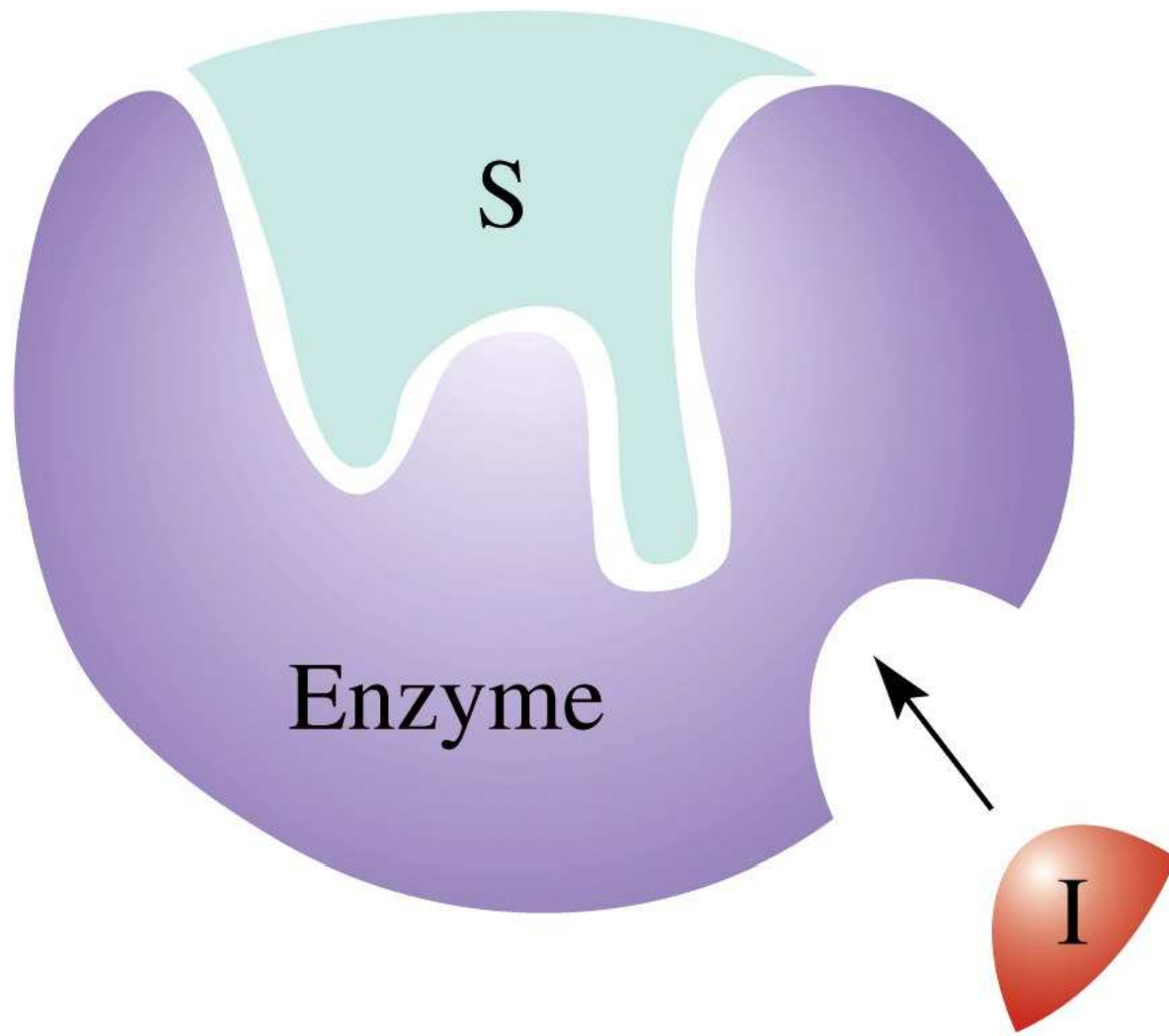


Noncompetitive
(inhibitor binds
at another site)

Nekompetitivní inhibice



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



Uncompetitive
(inhibitor binds
after S binding)

Figure 5-15d Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

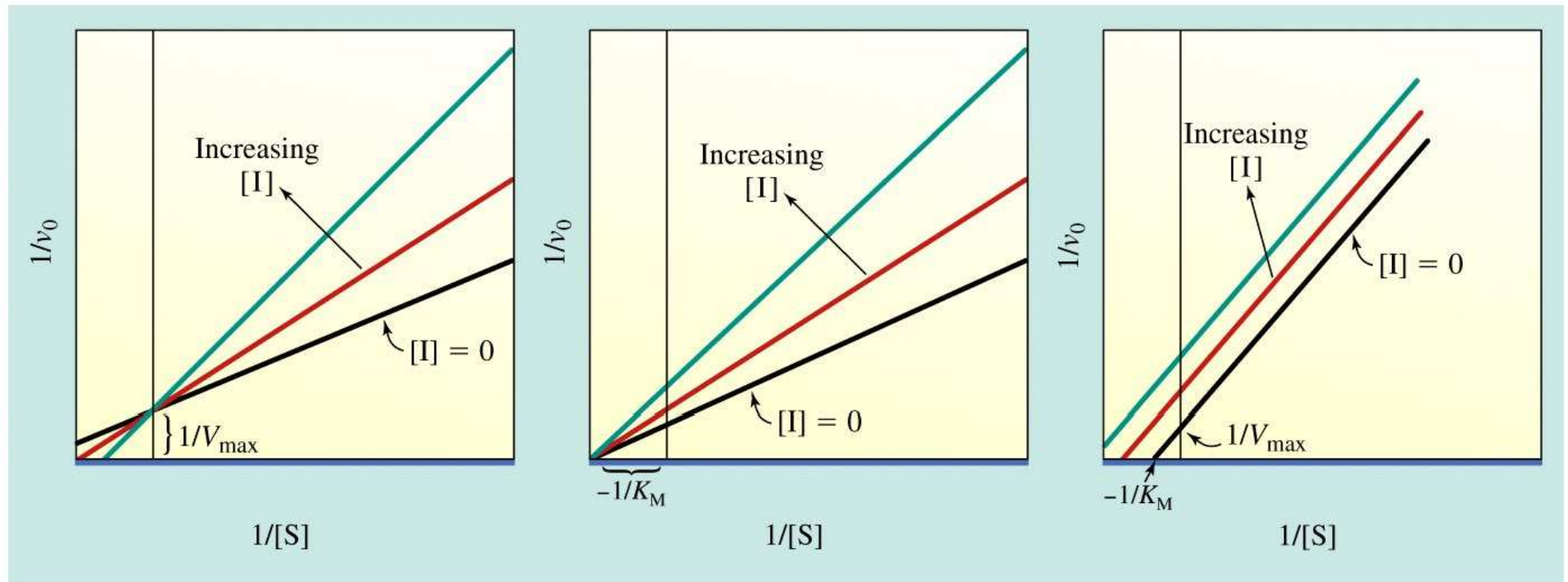
Table 5.5**Kinetic characteristics of reversible inhibition**

Type of Inhibition	<i>Effect of Inhibition^a</i>		
	K_M	V_{\max}	K_M/V_{\max} (slope)
Competitive	Higher	Same	Increase
Uncompetitive	Lower	Lower	Same
Noncompetitive			
Pure	Same	Lower	Increase
Mixed	Higher	Lower	Increase

^a Compared to uninhibited reaction.

Table 5-5 Concepts in Biochemistry, 3/e

© 2006 John Wiley & Sons



(a) Competitive inhibition

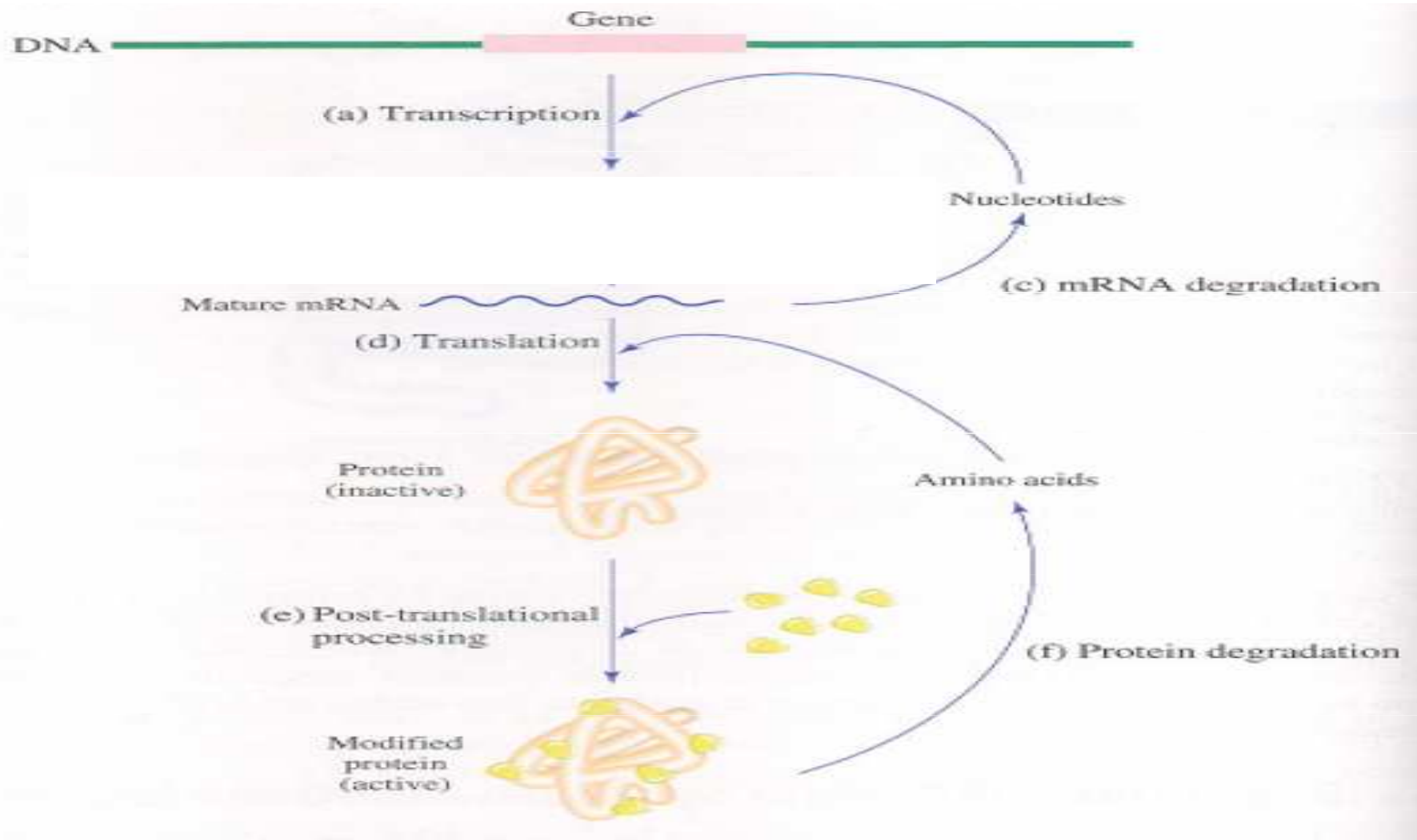
(b) Noncompetitive inhibition

(c) Uncompetitive inhibition

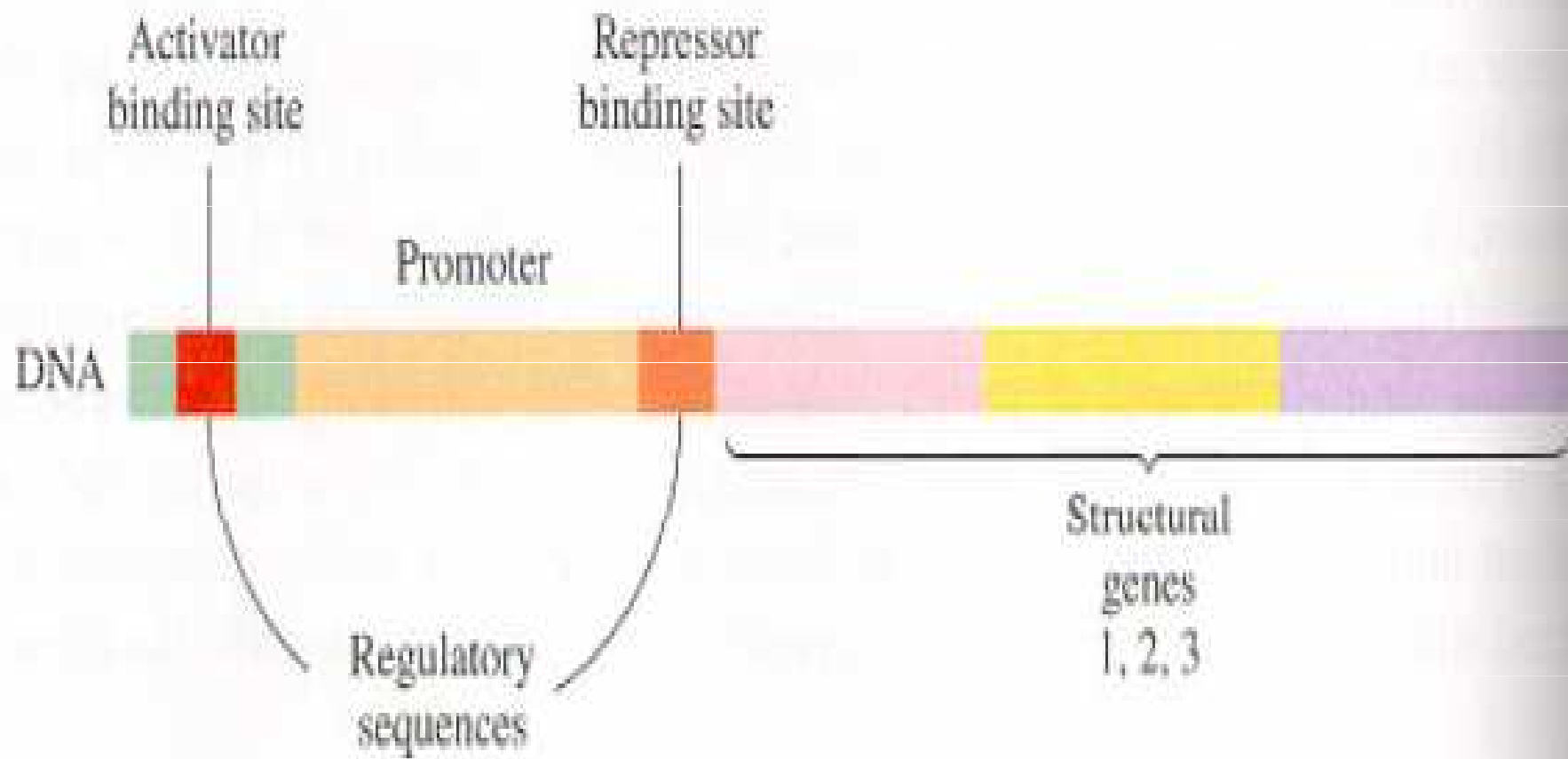
Regulace činnosti enzymu

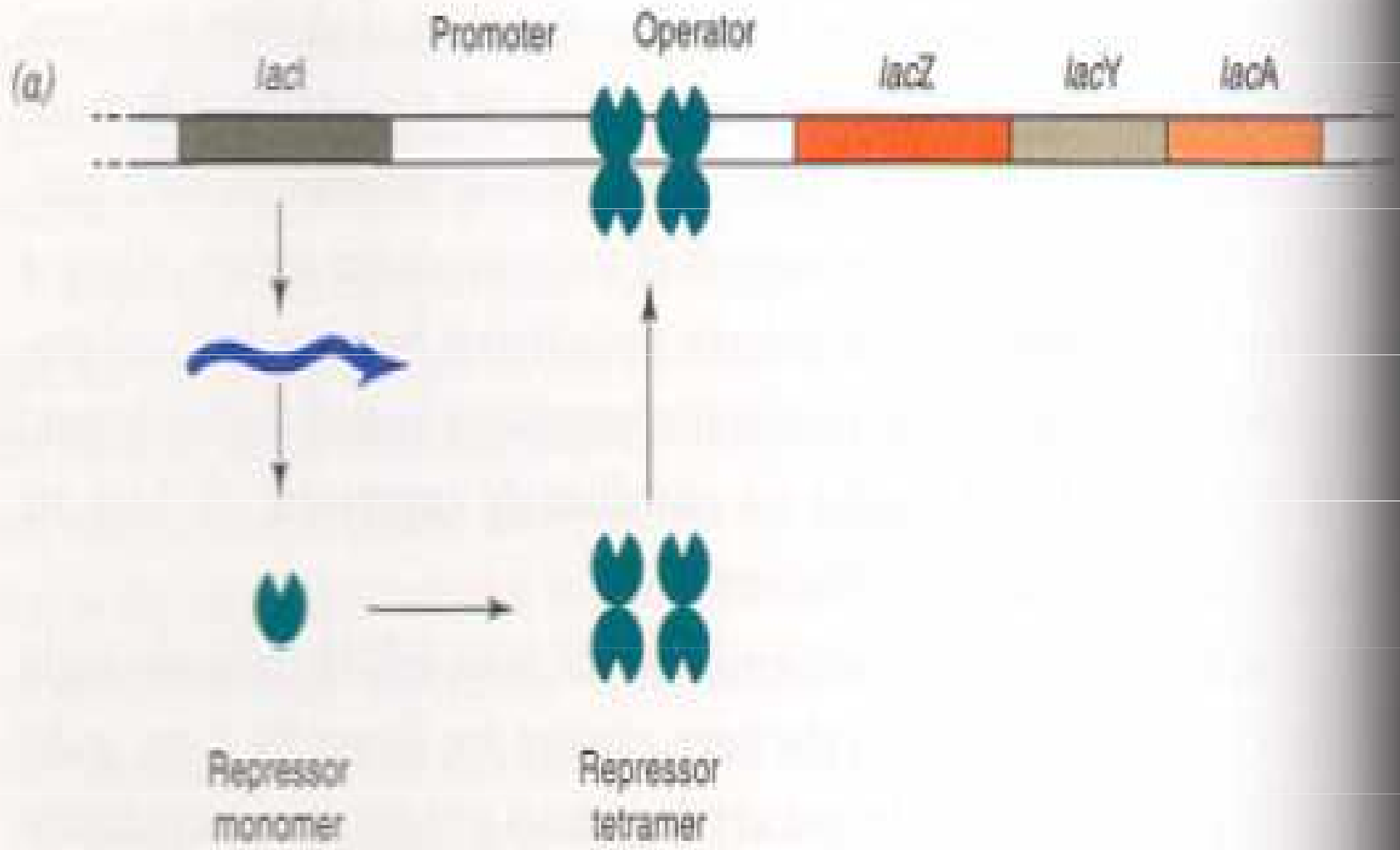
- Regulace koncentrace enzymu
- Allosterická regulace MONOD 1963
- Regulace zpětnou vazbou
- Regulace kovalentní modifikací
- Kompartmentace

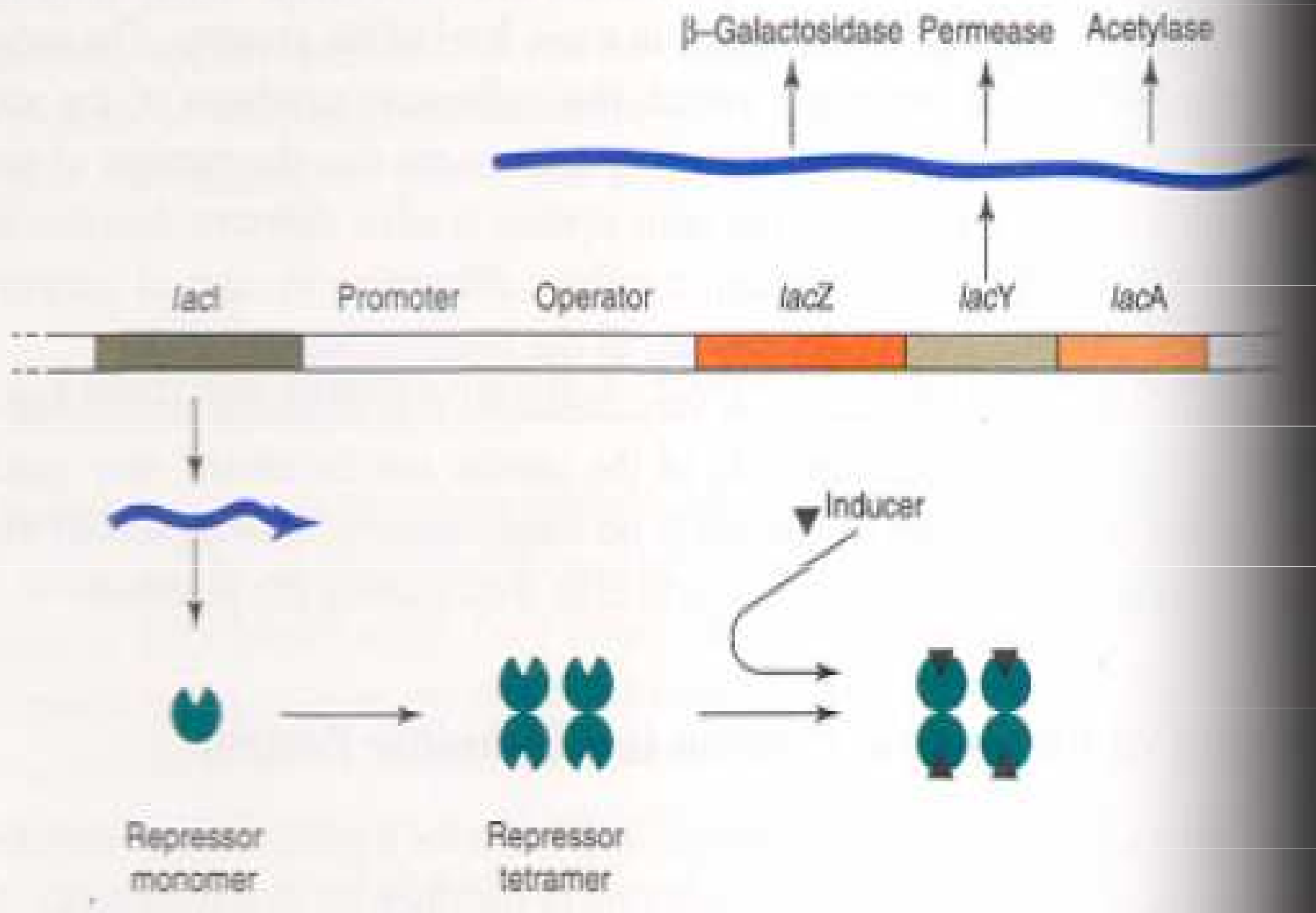
Regulace koncentrací enzymu



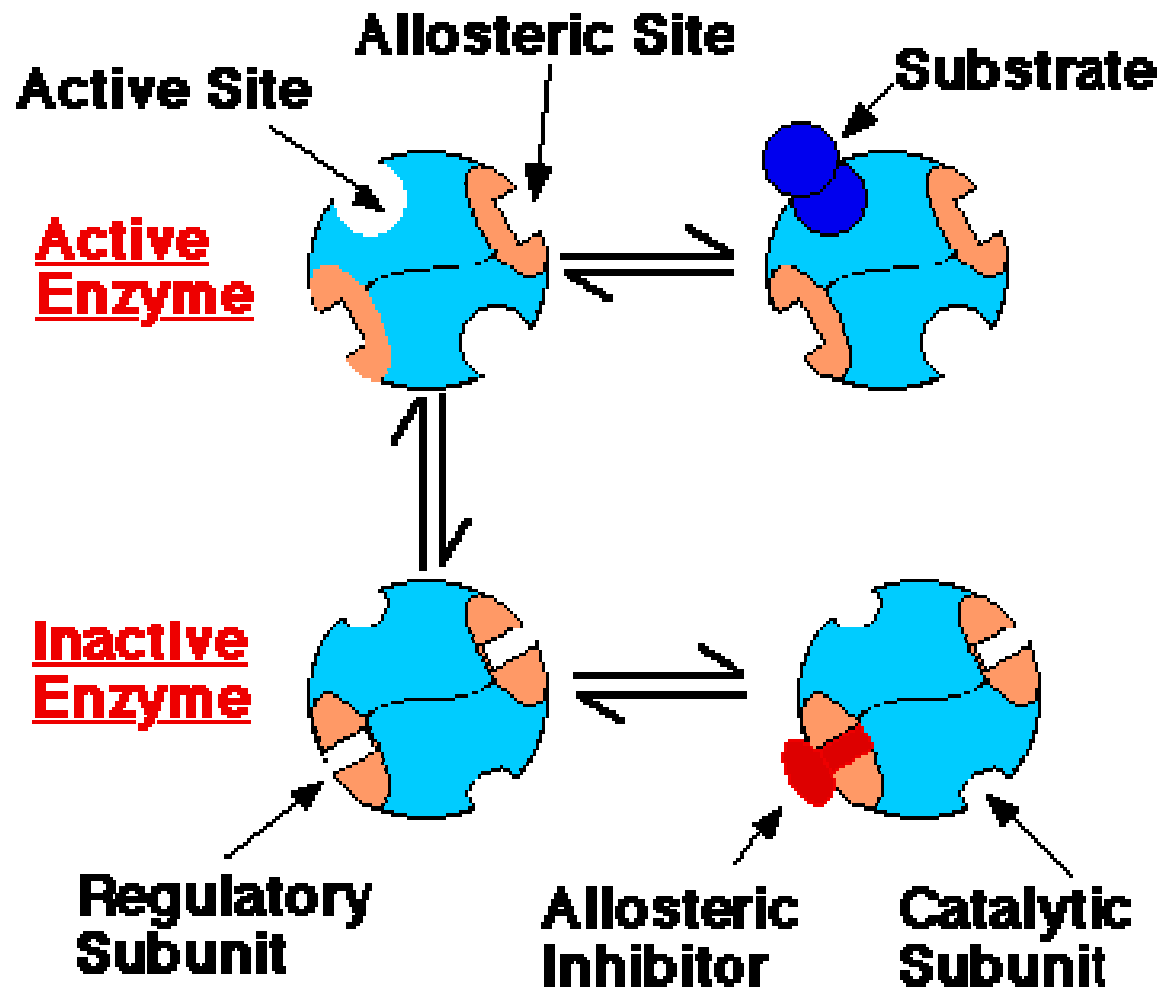
Operonový model



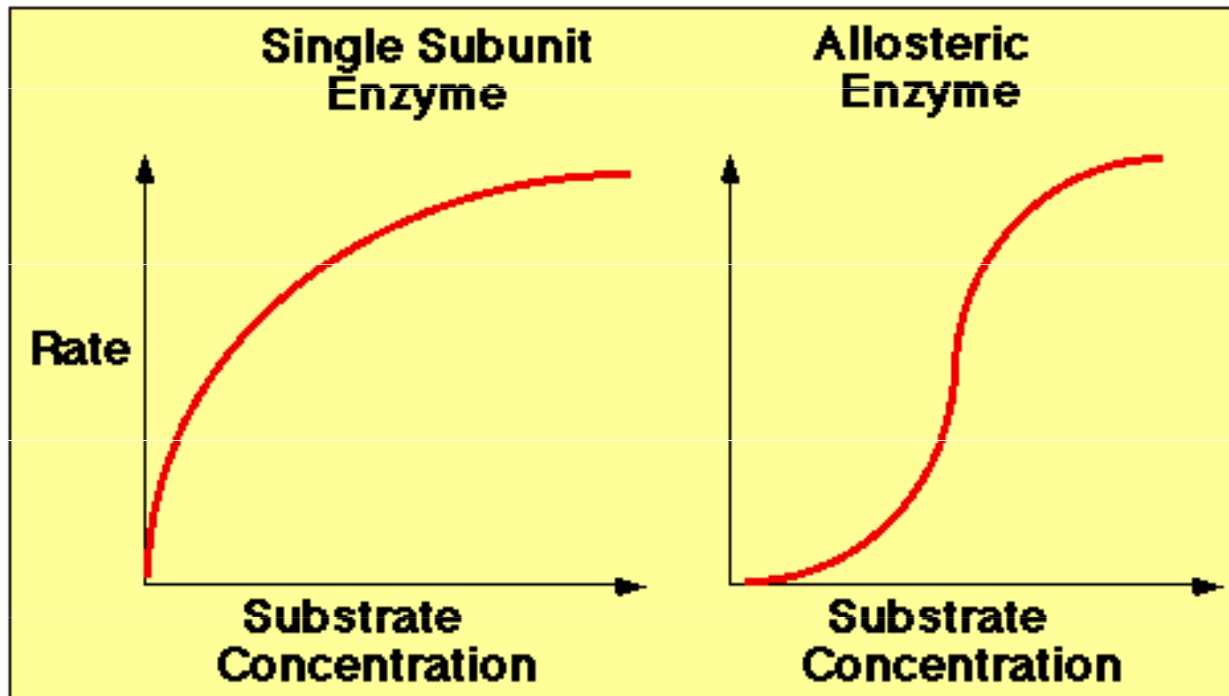




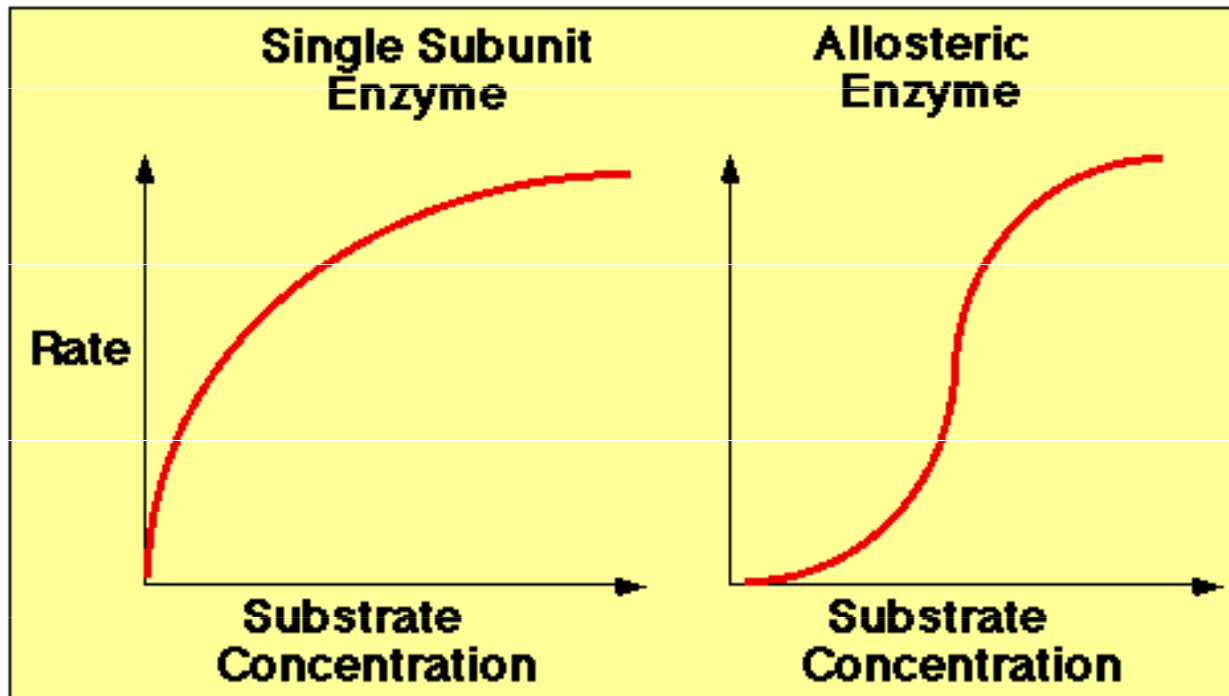
Allosterie



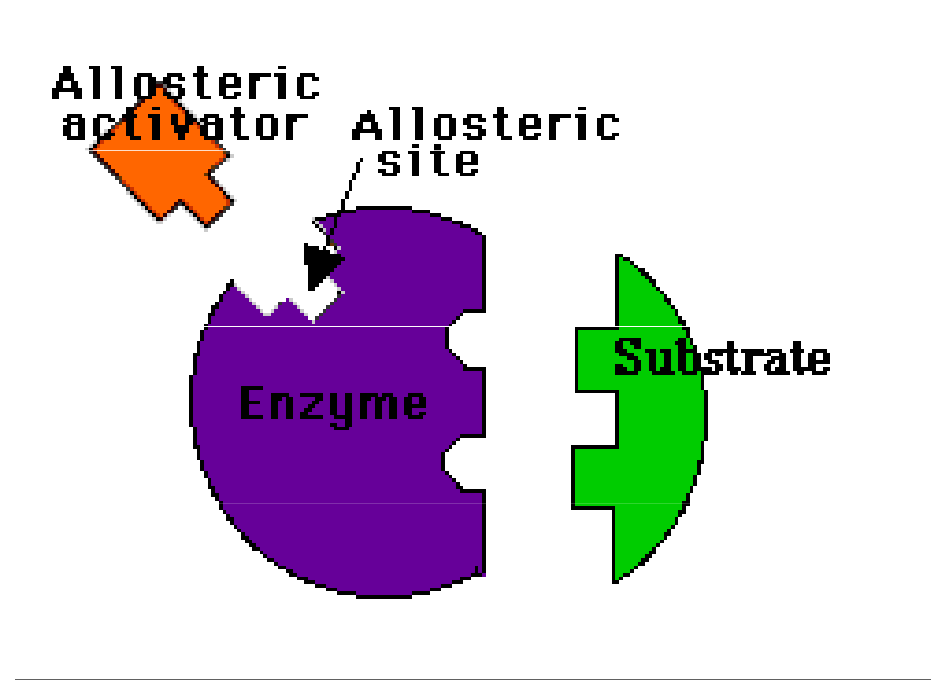
Allosterie



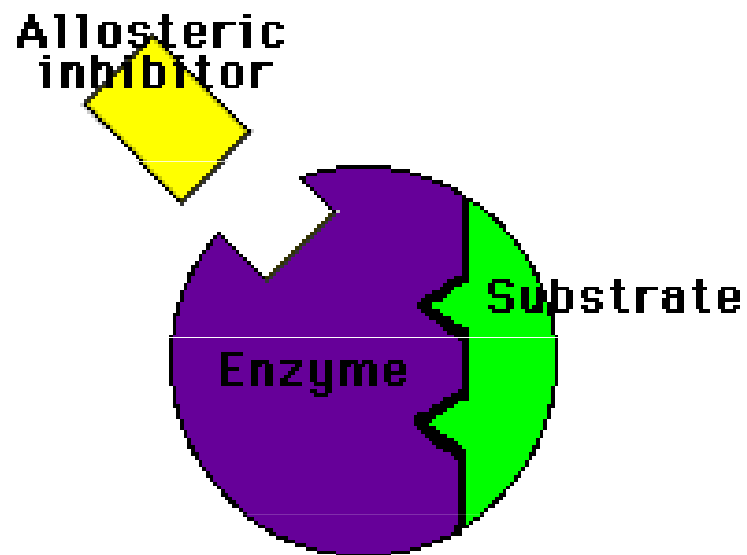
Allosterie



Allosterický aktivátor



Allosterický inhibitor



Symetrický model

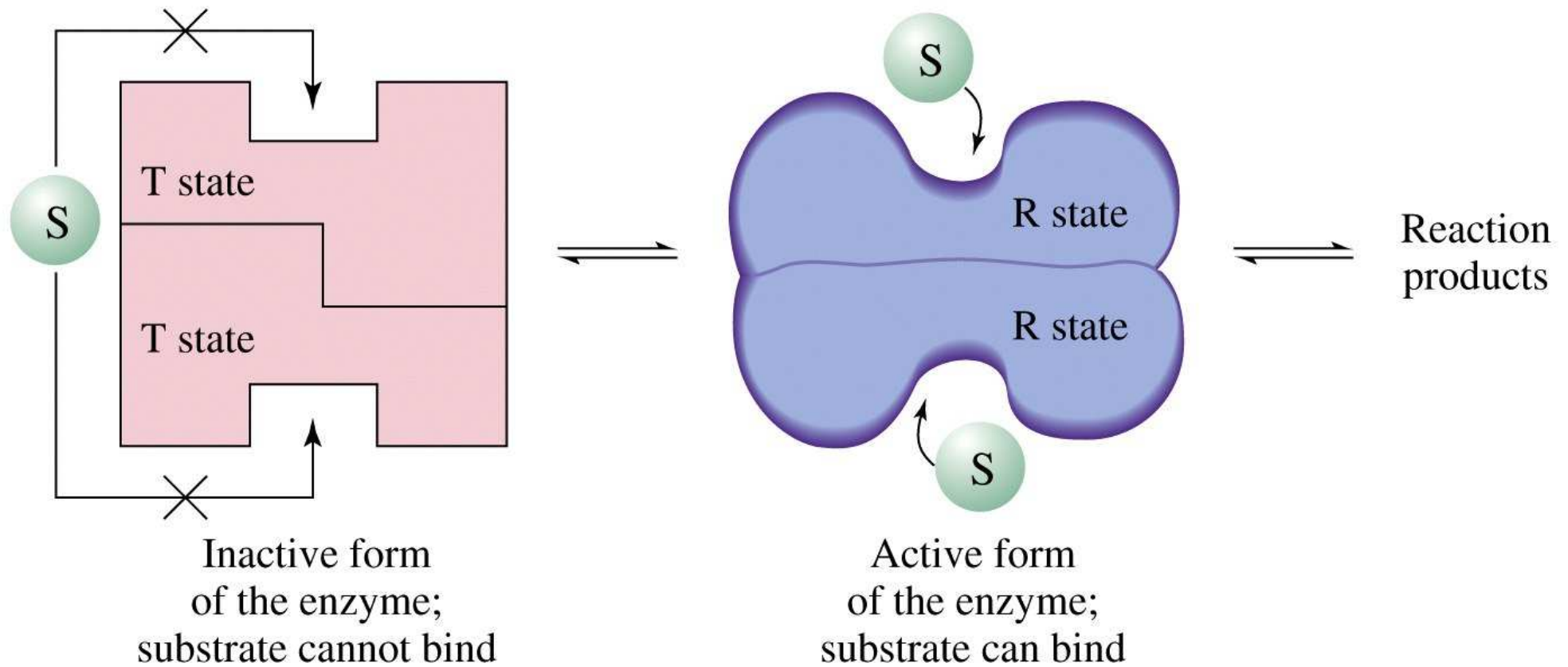


Figure 6-5 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

Sekvenční model

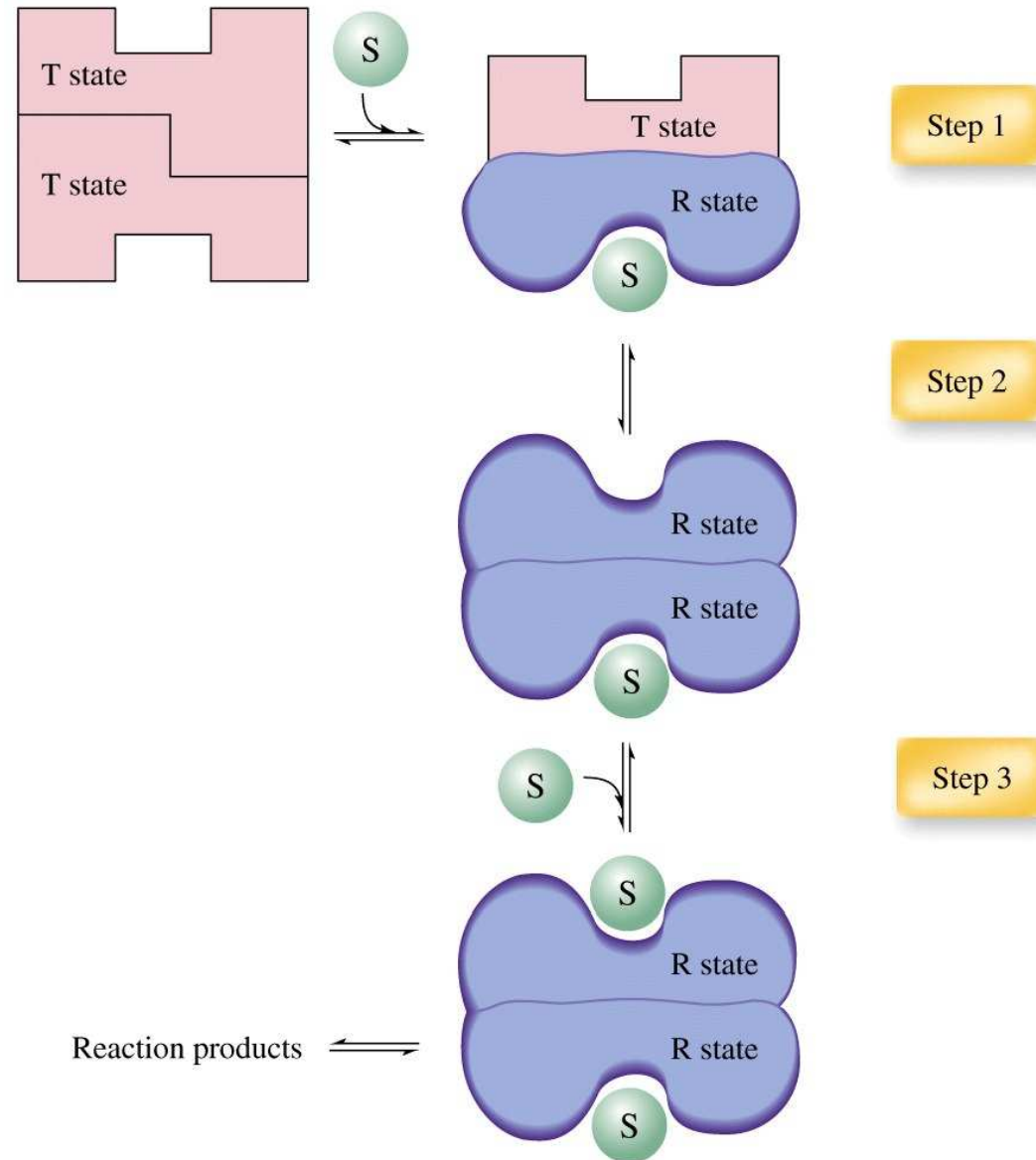
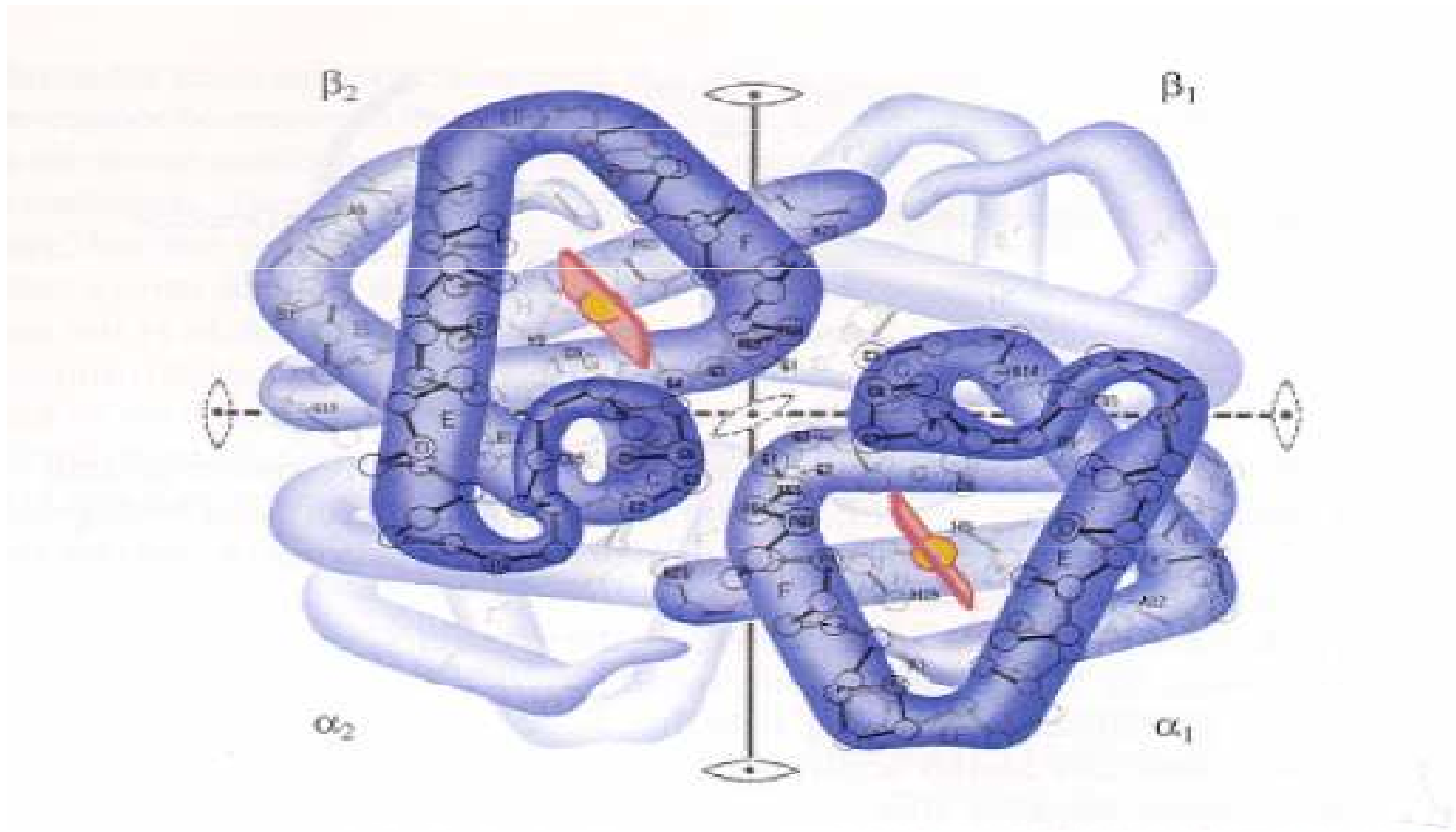
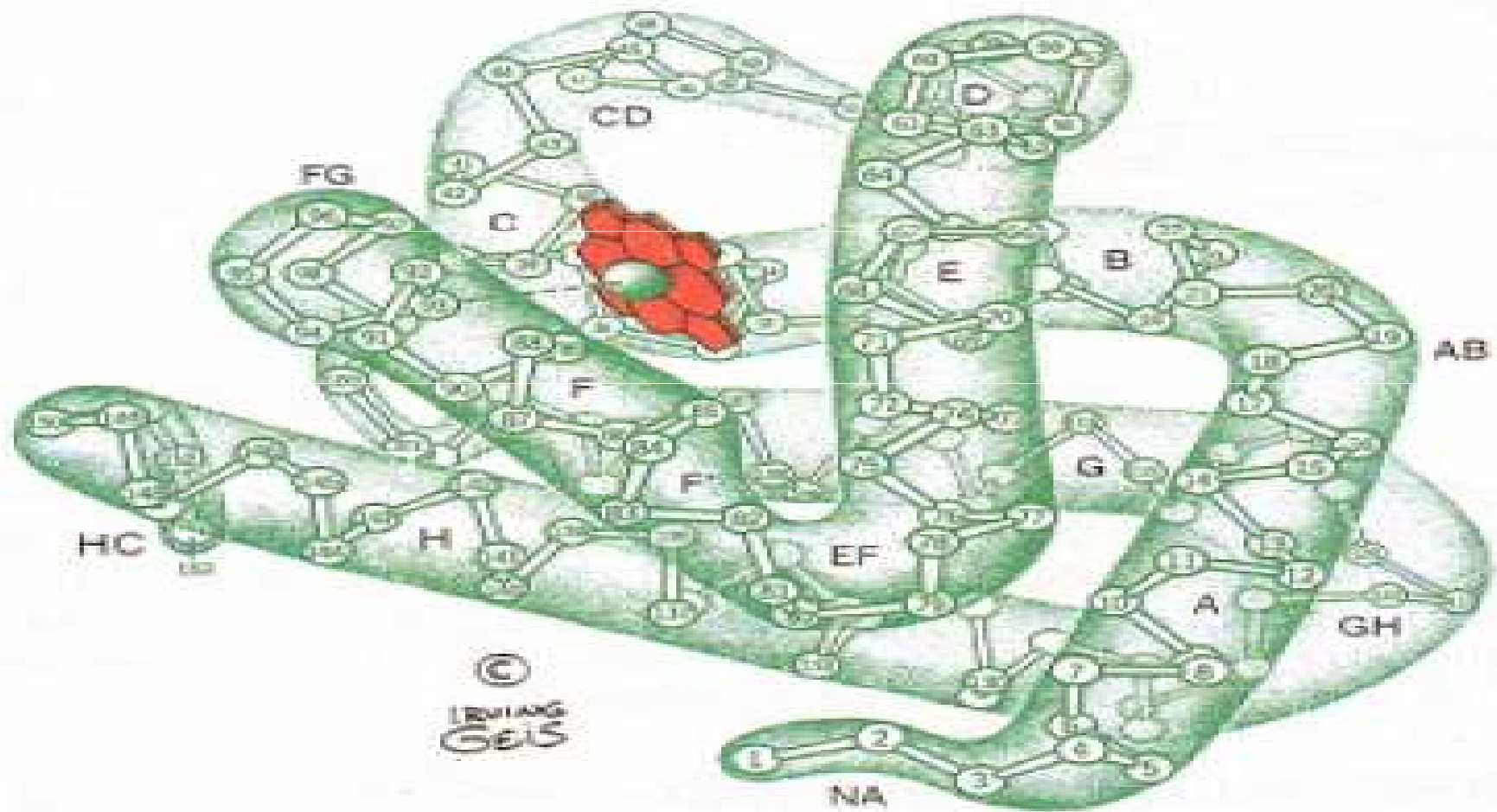


Figure 6-6 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

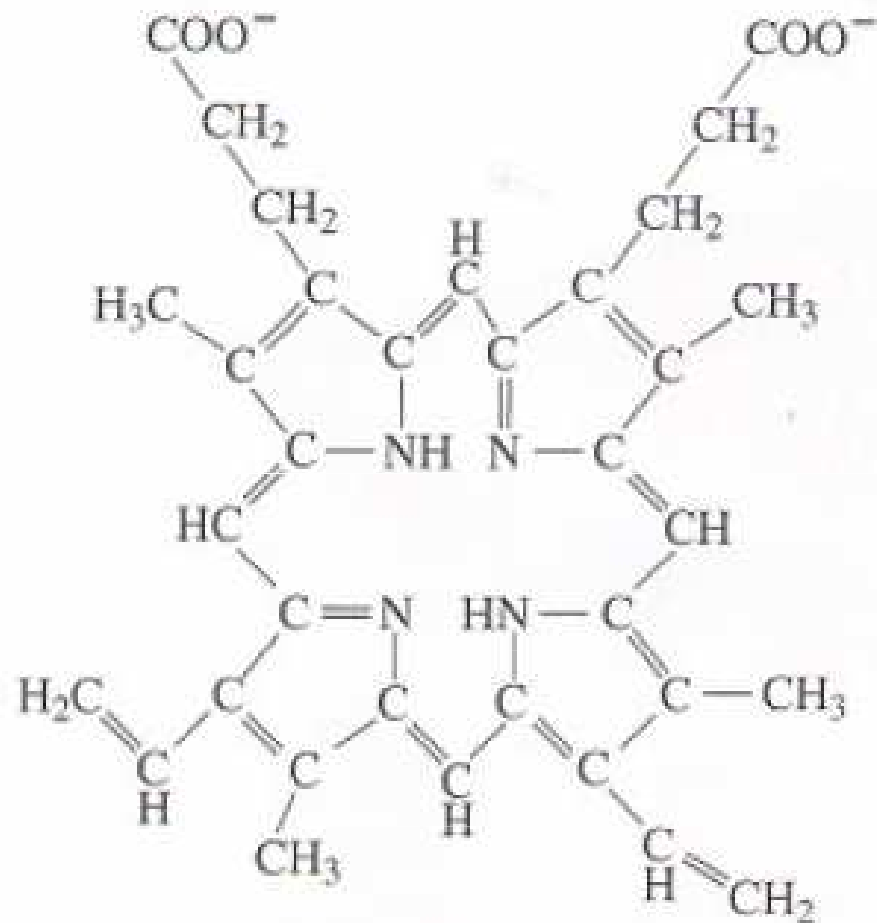
Allosterie hemoglobinu



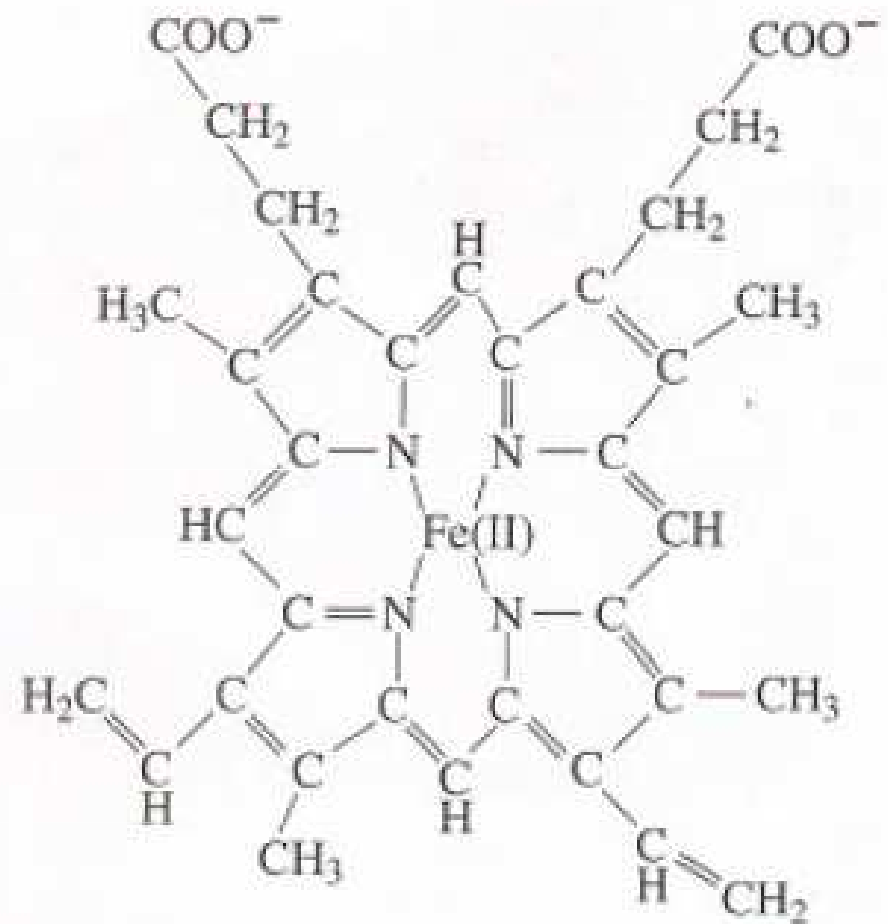
Myoglobin



Hem

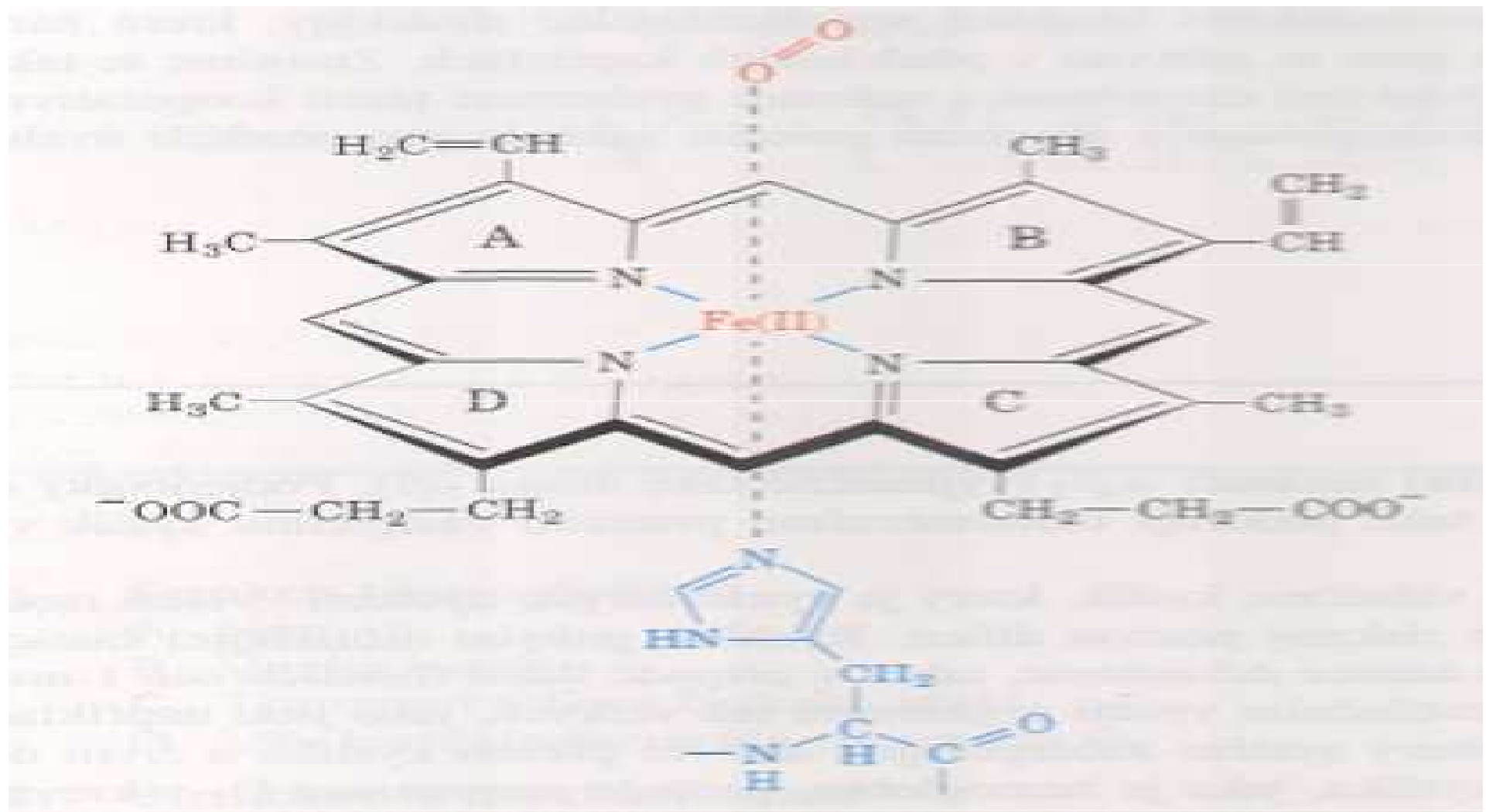


(a) Protoporphyrin IX

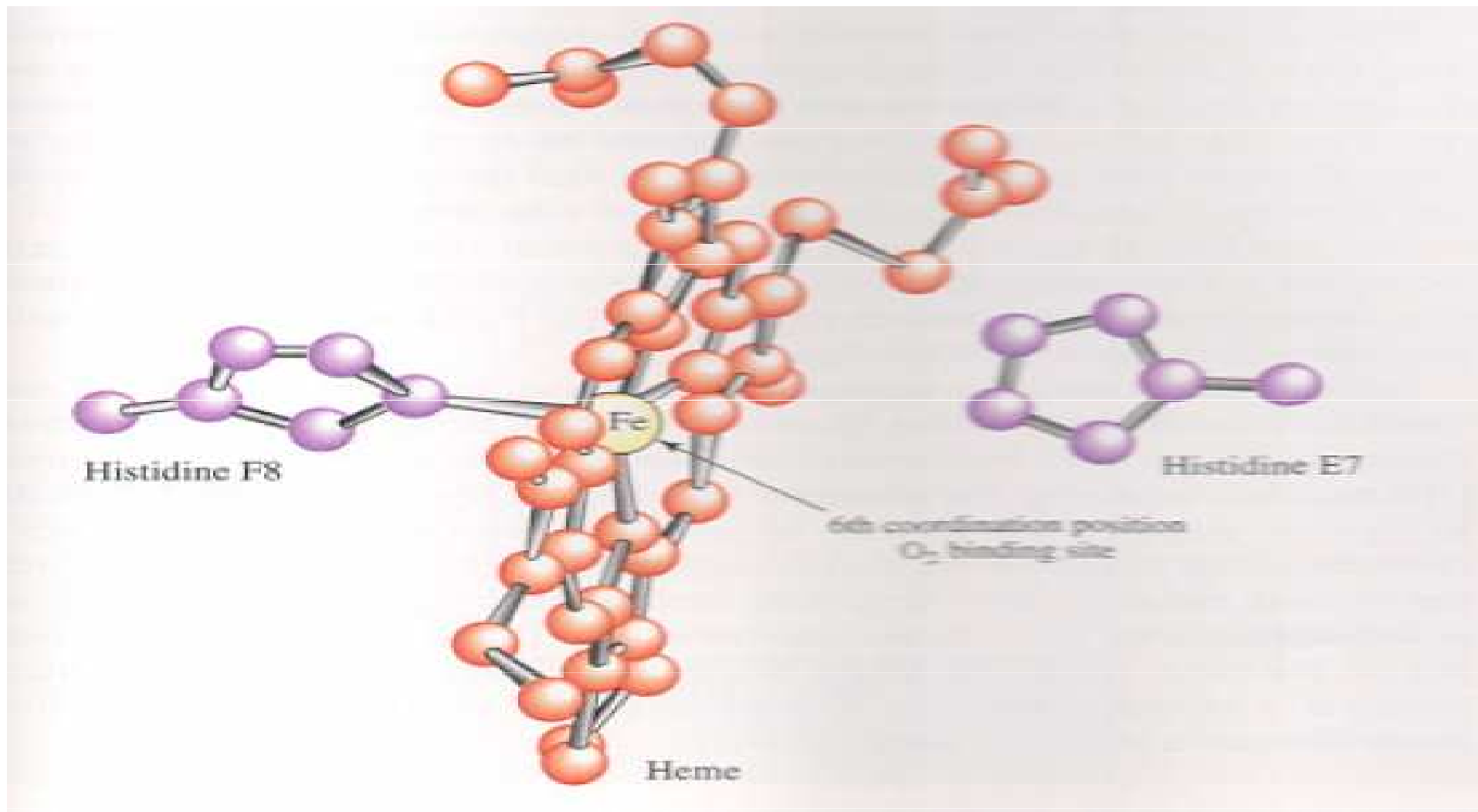


(b) Heme (Fe-protoporphyrin IX)

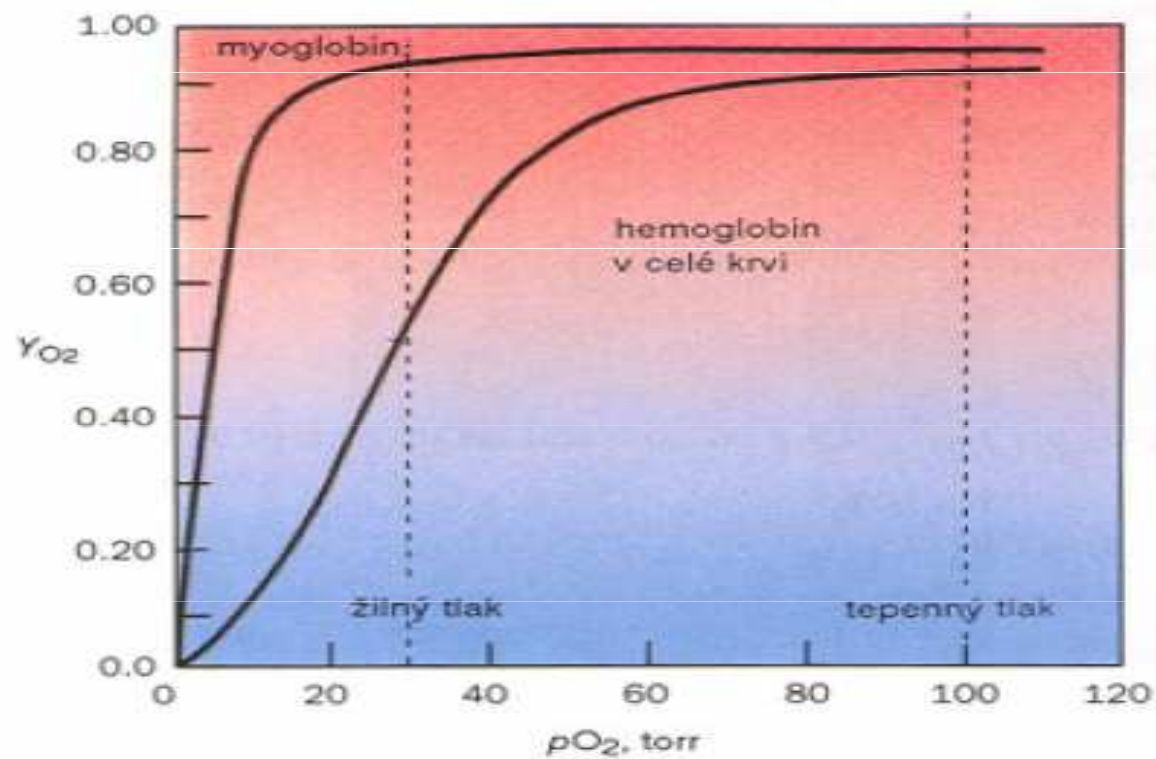
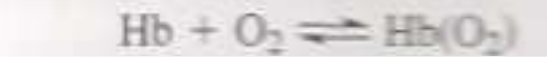
Vazba O₂ na Hb



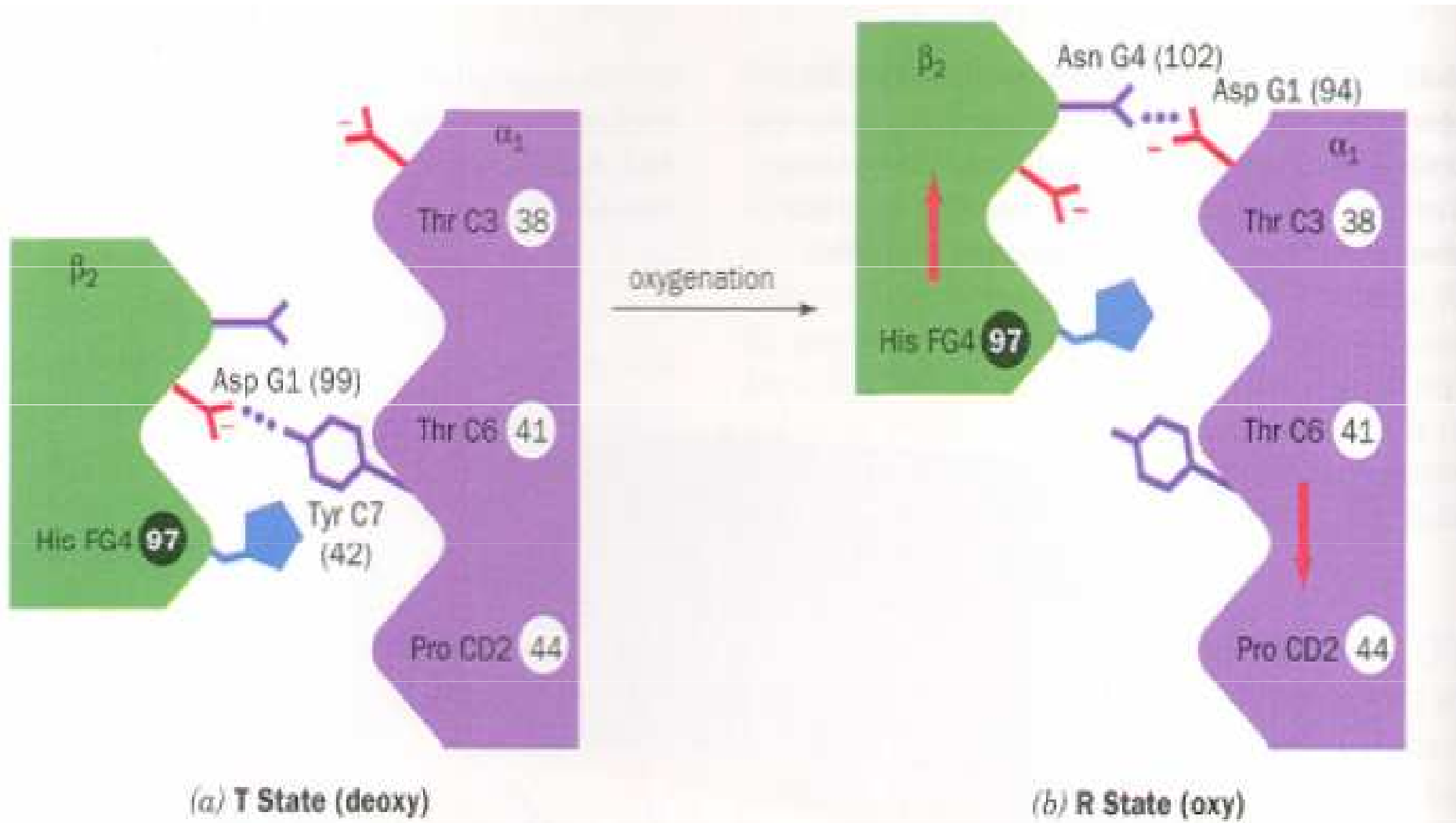
Vazba O_2 na Hb



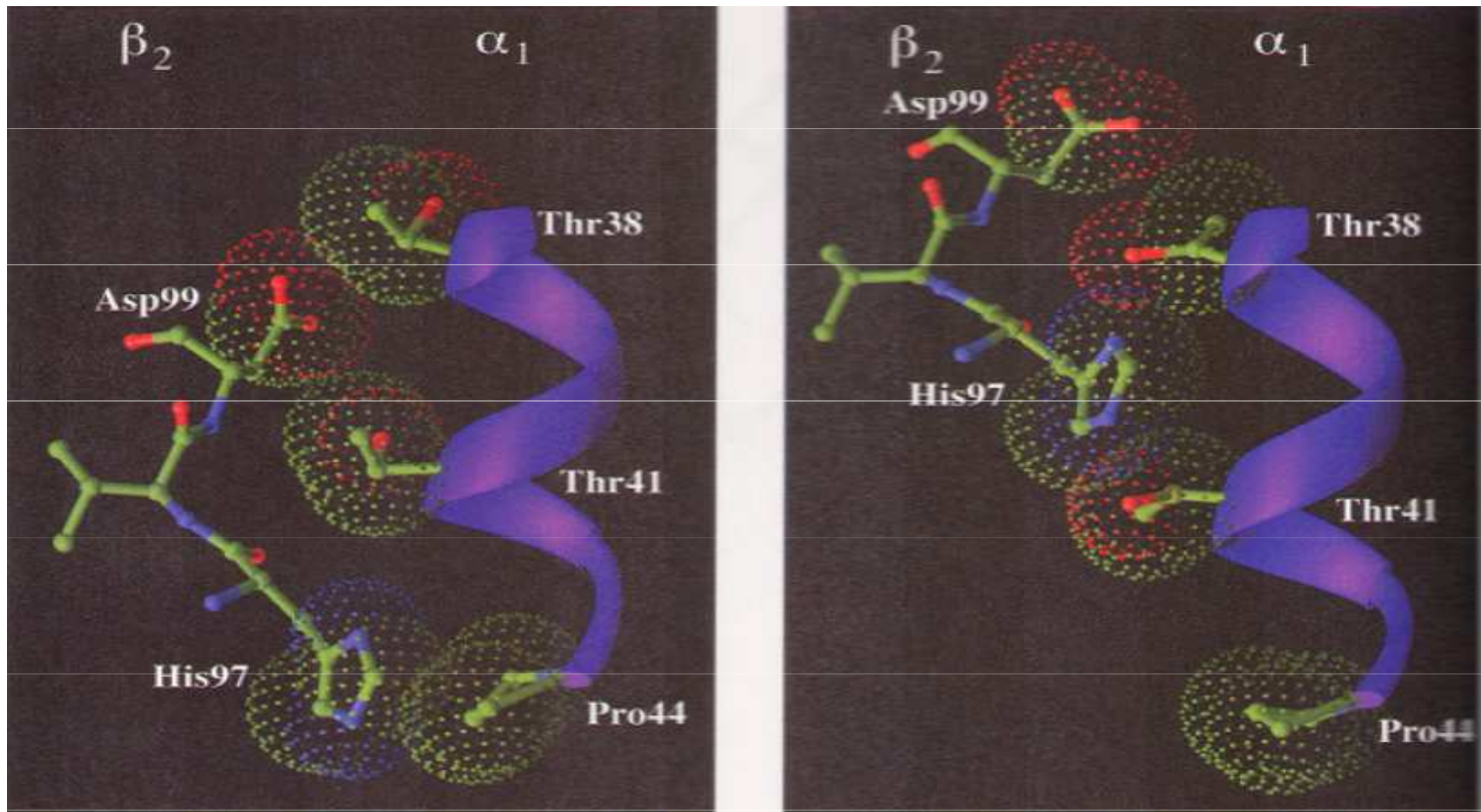
Hb versus Mb



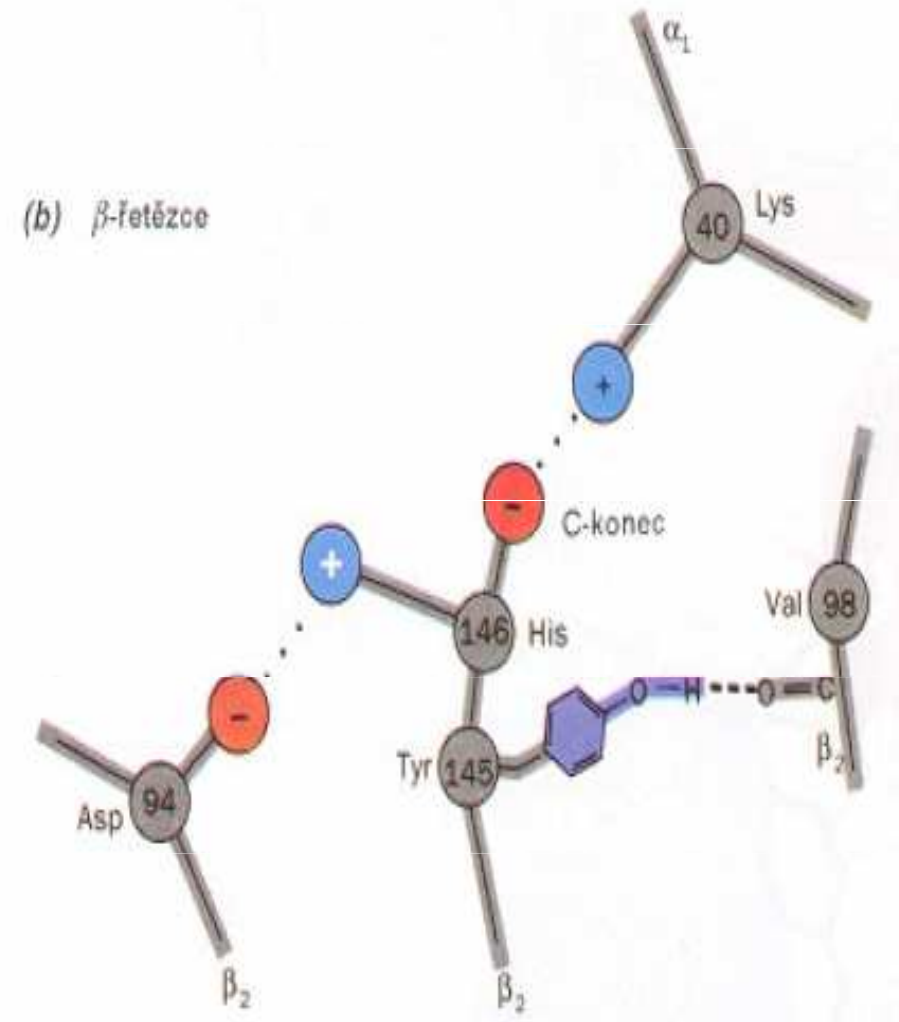
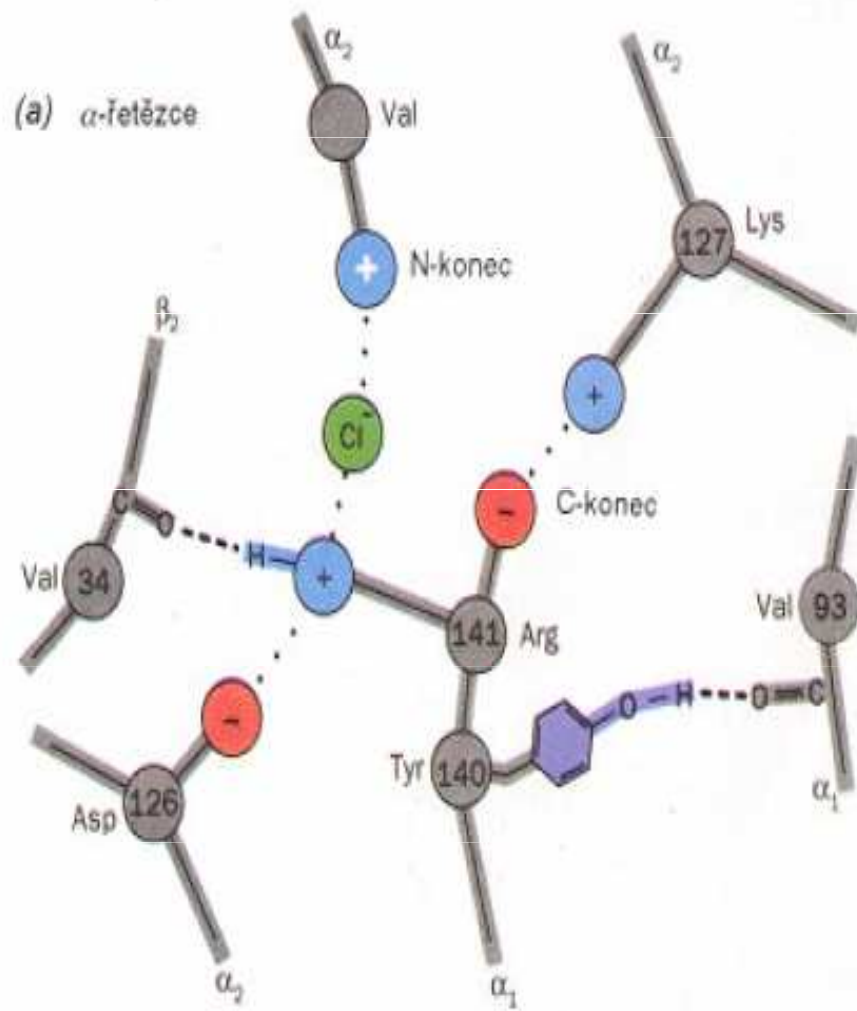
Solné můstky



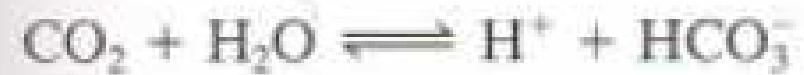
Solné můstky



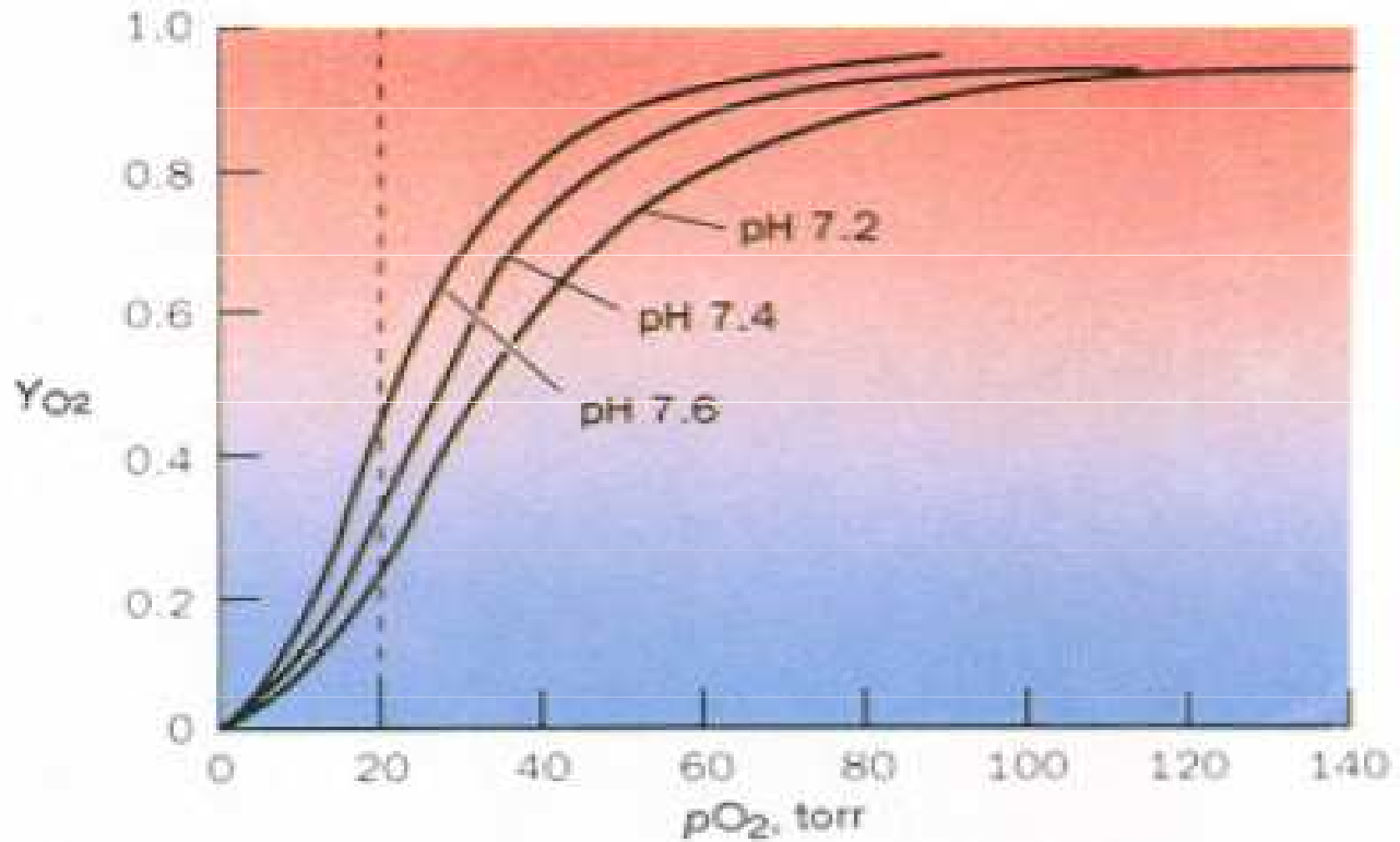
Solné můstky



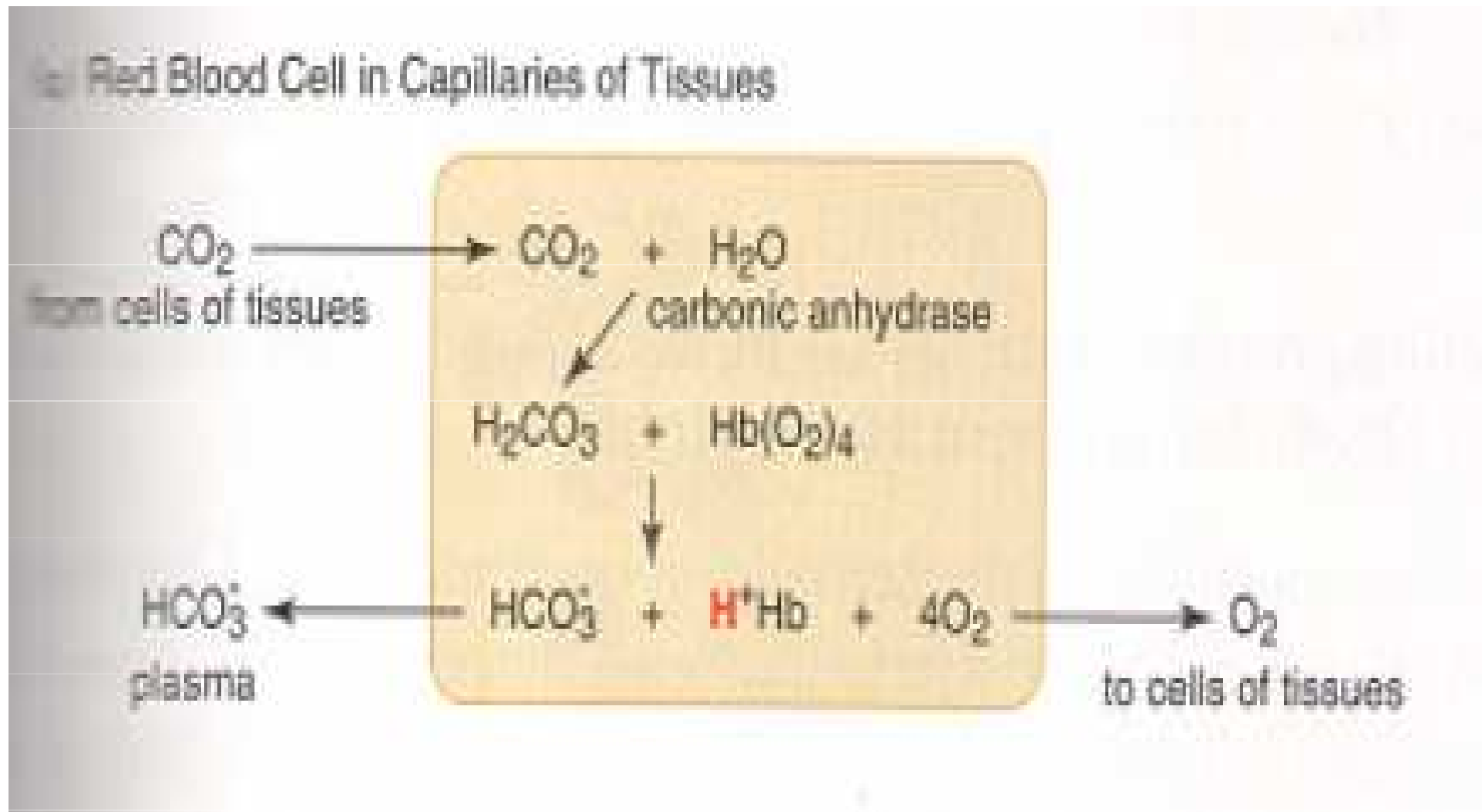
Bohrův efekt – vliv H^+ a CO_2



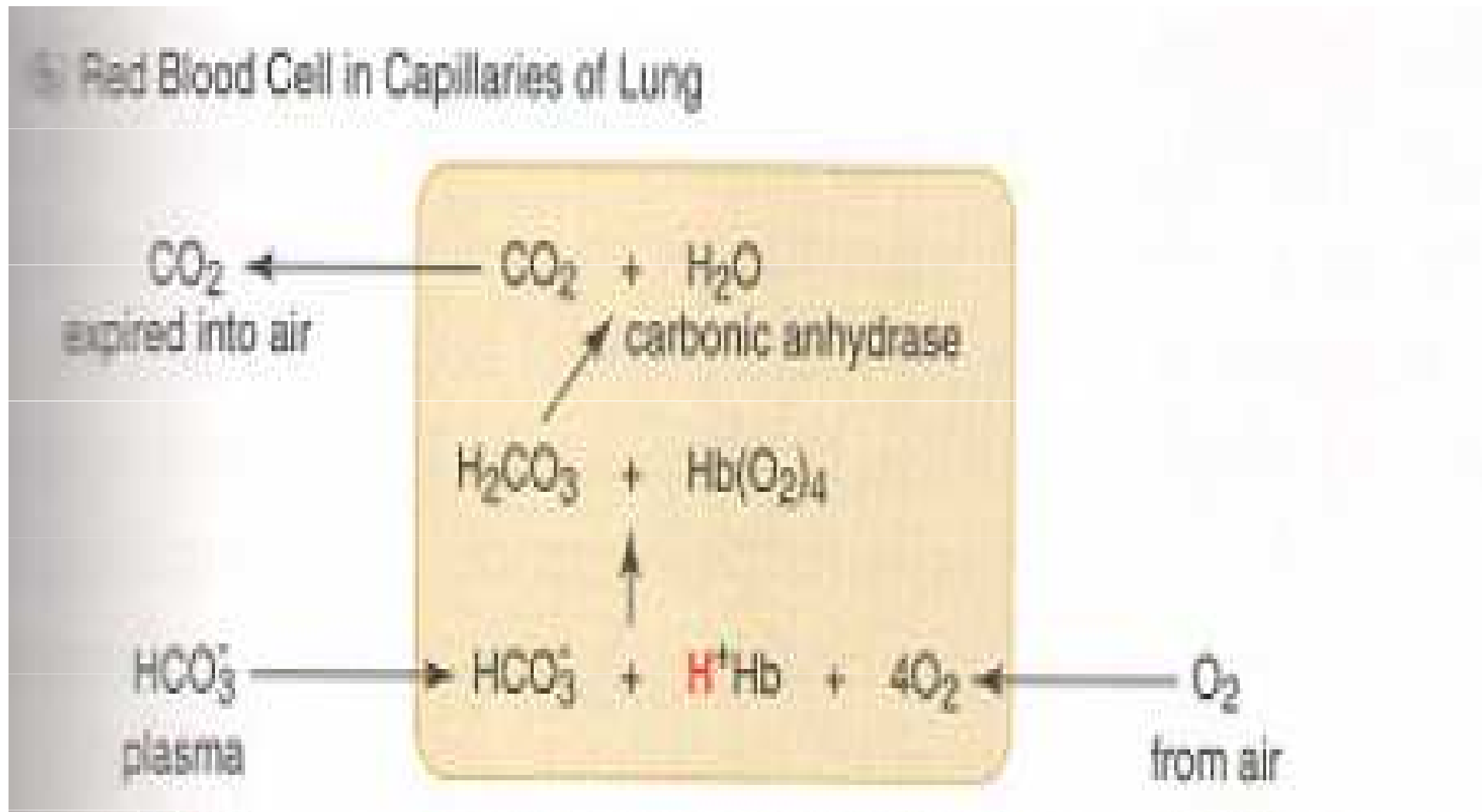
Bohrův efekt – vliv H^+ a CO_2



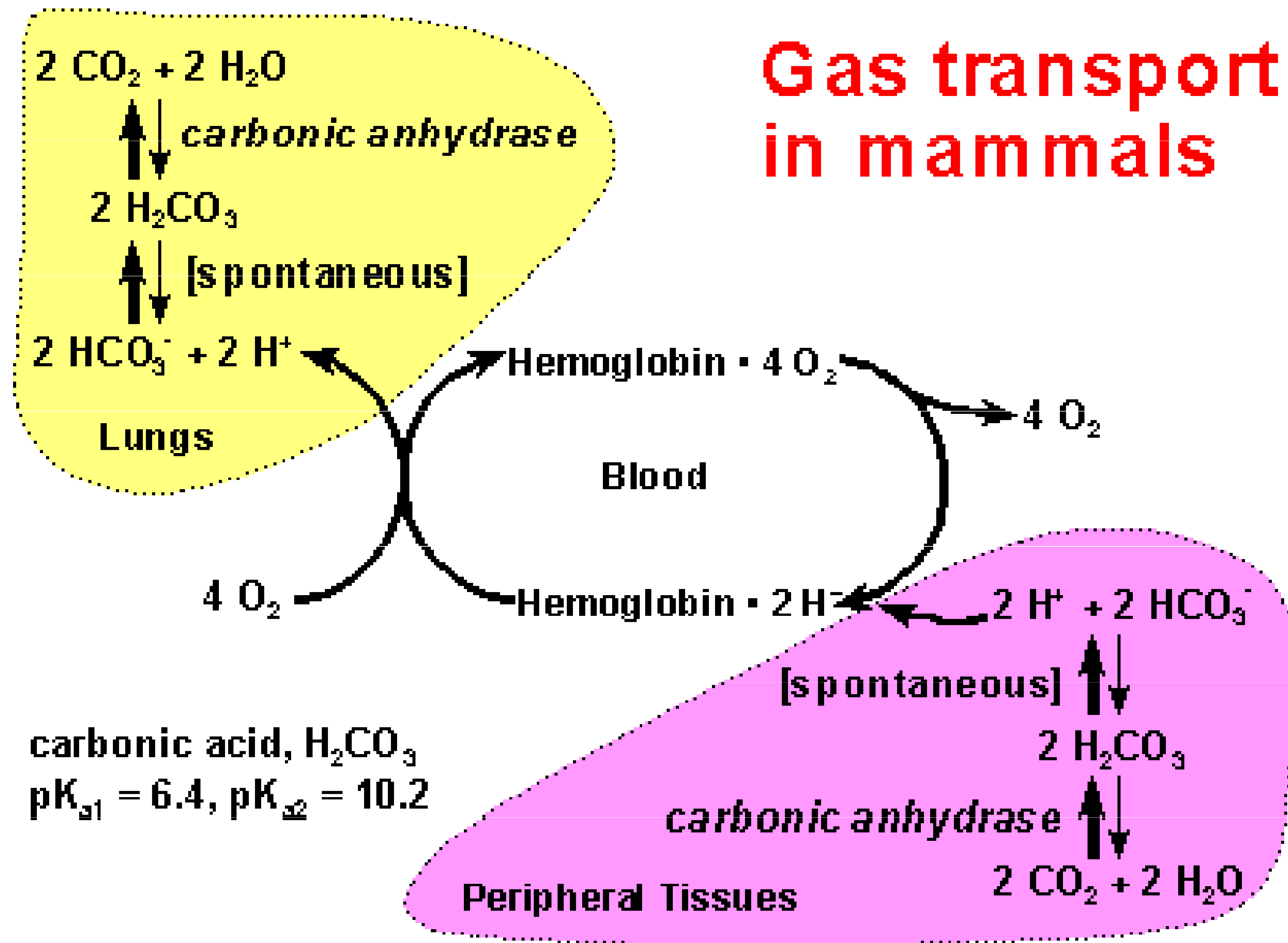
Bohrův efekt – vliv H^+ a CO_2



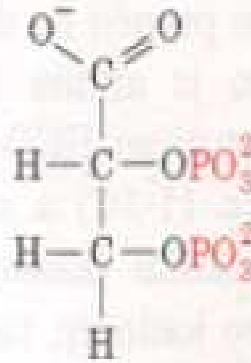
Bohrův efekt – vliv H^+ a CO_2



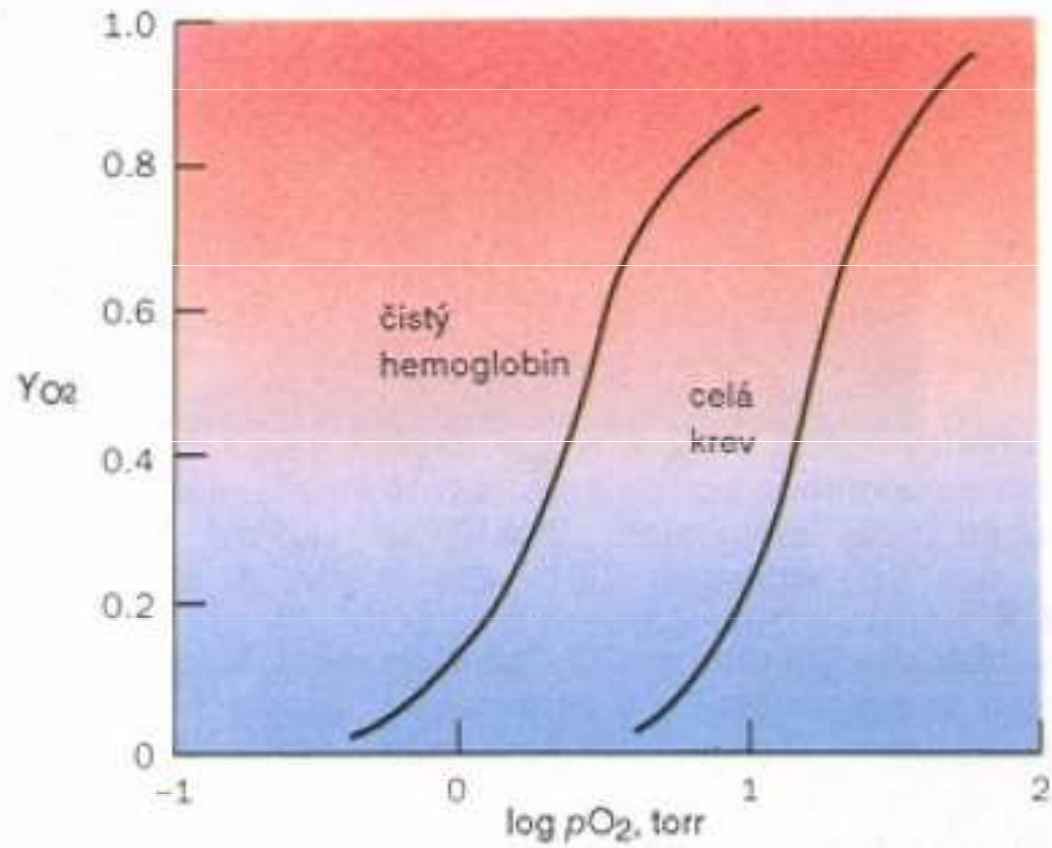
Gas transport in mammals



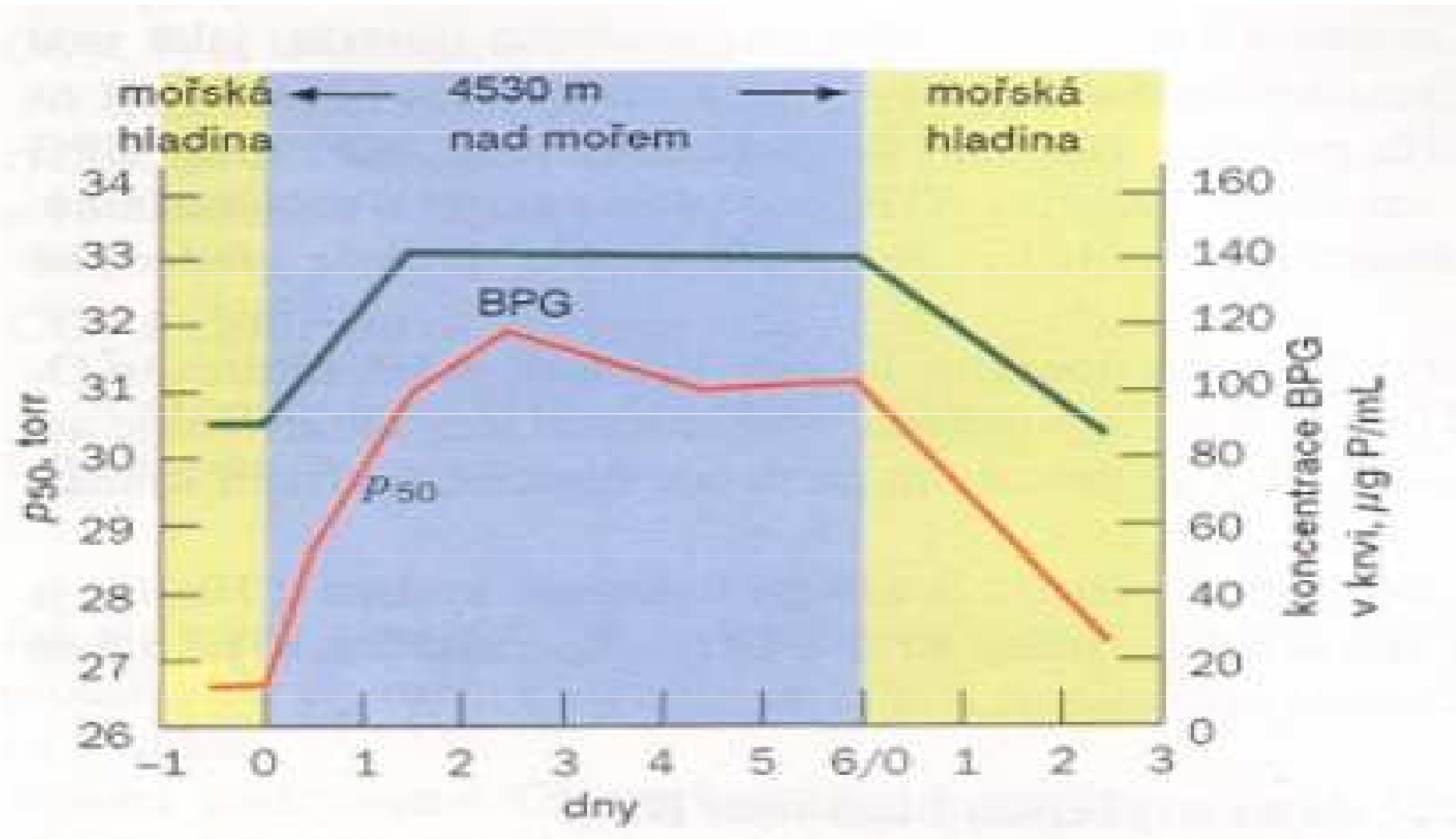
Vliv BPG



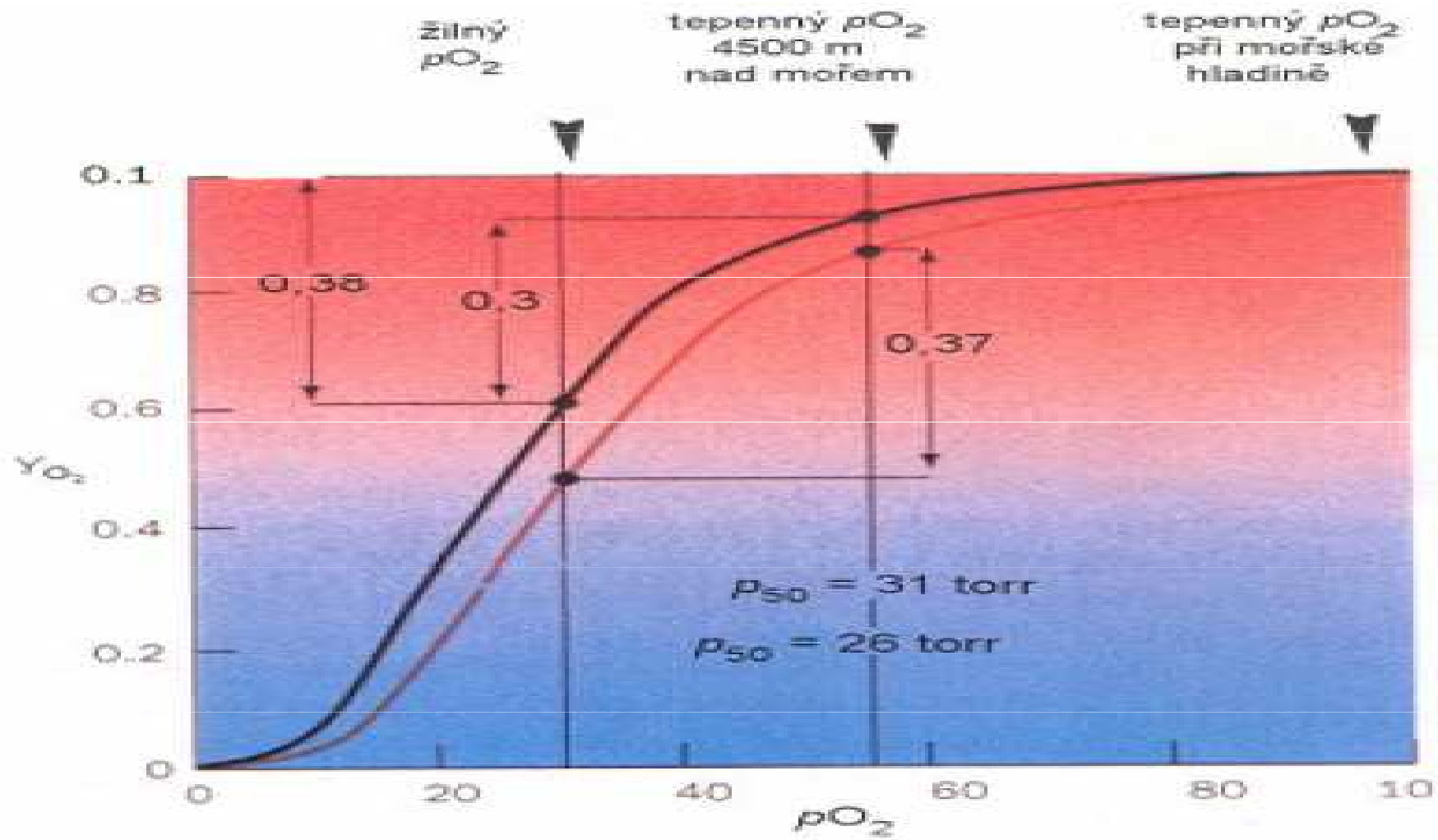
D-2,3-bisfosfoglycerát (2,3-P₂-G)



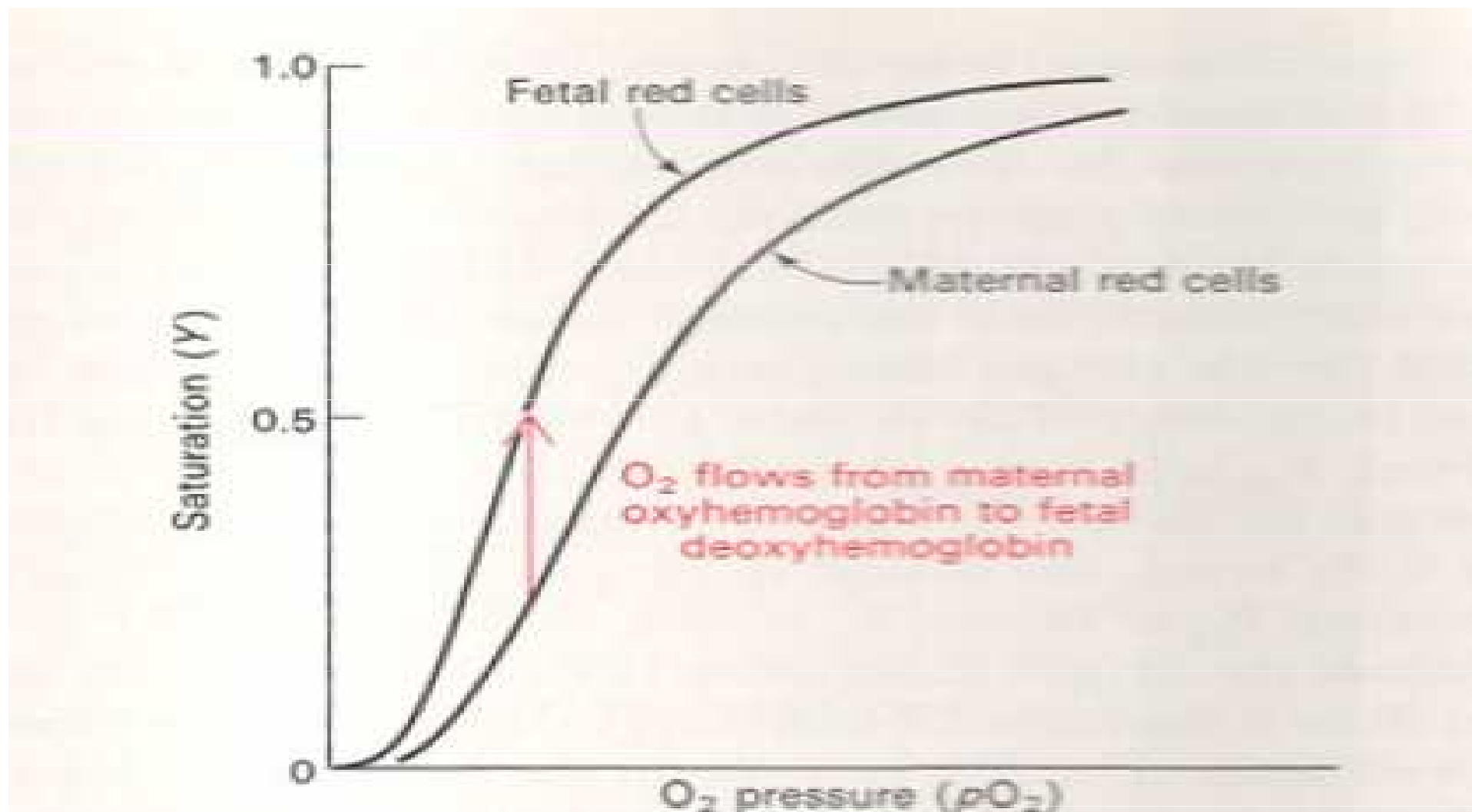
Vliv BPG a nadmořská výška



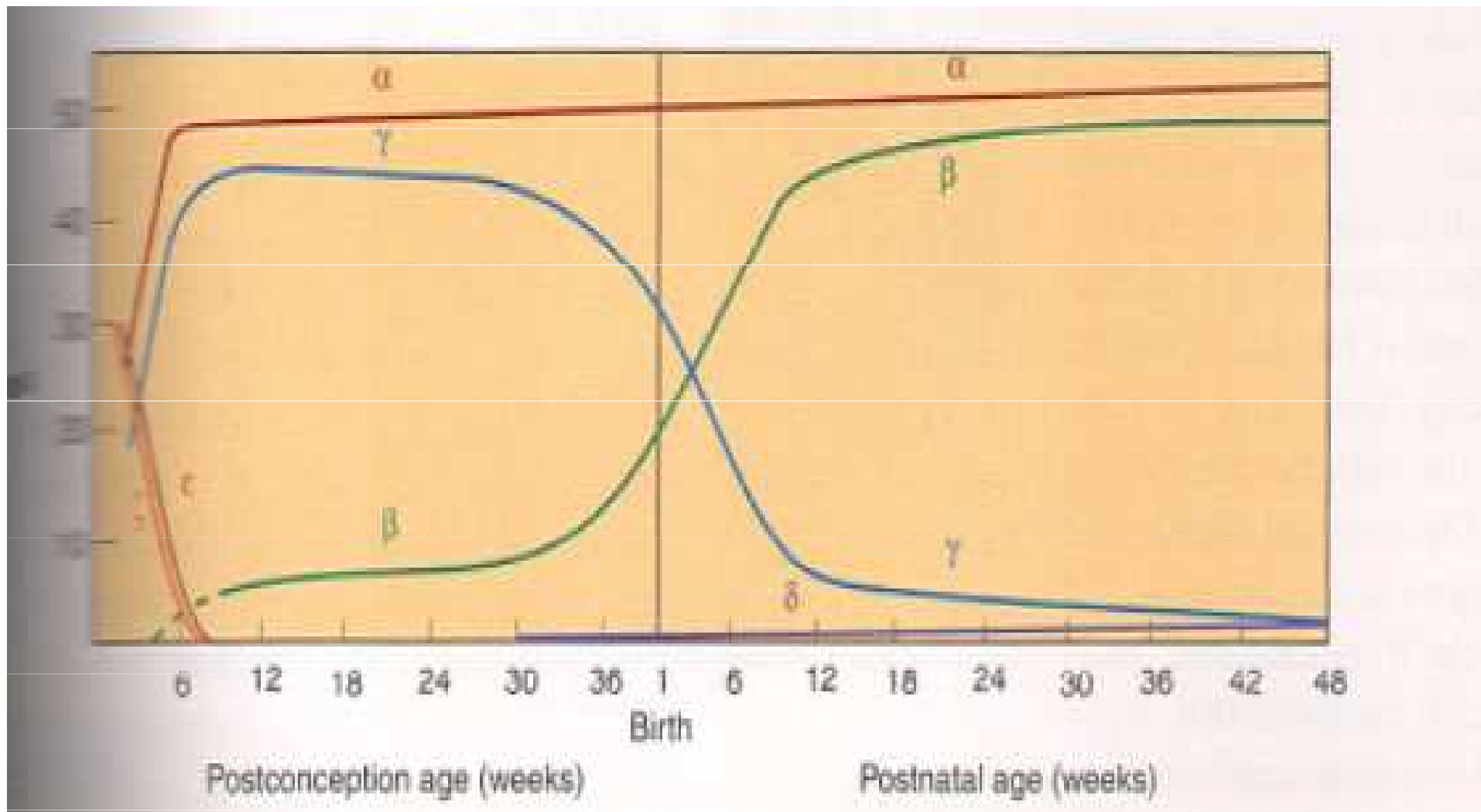
Vliv BPG a nadmořská výška



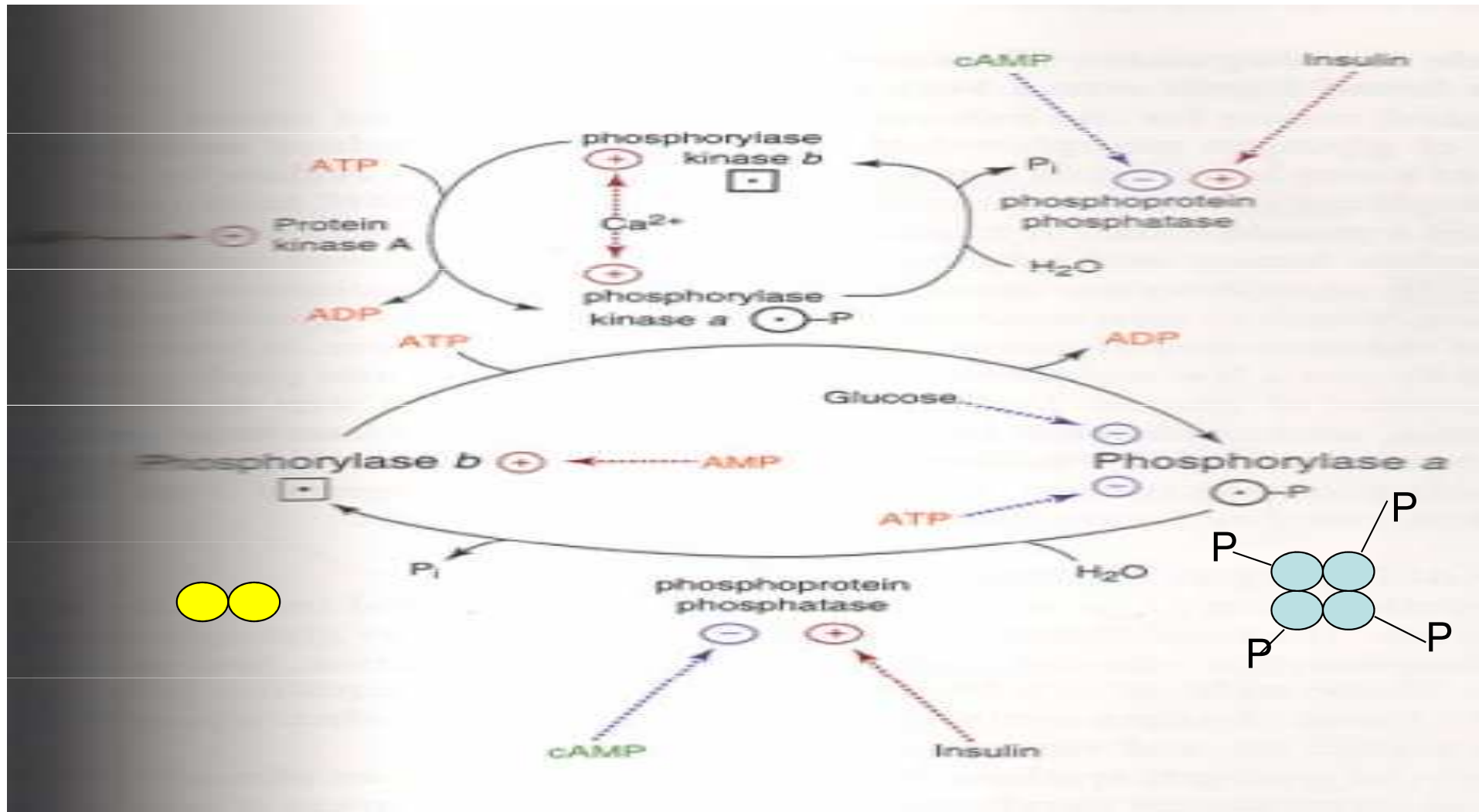
Fetální versus normální Hb



Fetální versus normální Hb



Regulace kovalentní modifikací glykogenfosforylasy



Regulace kovalentní modifikací glykogenfosforylasy

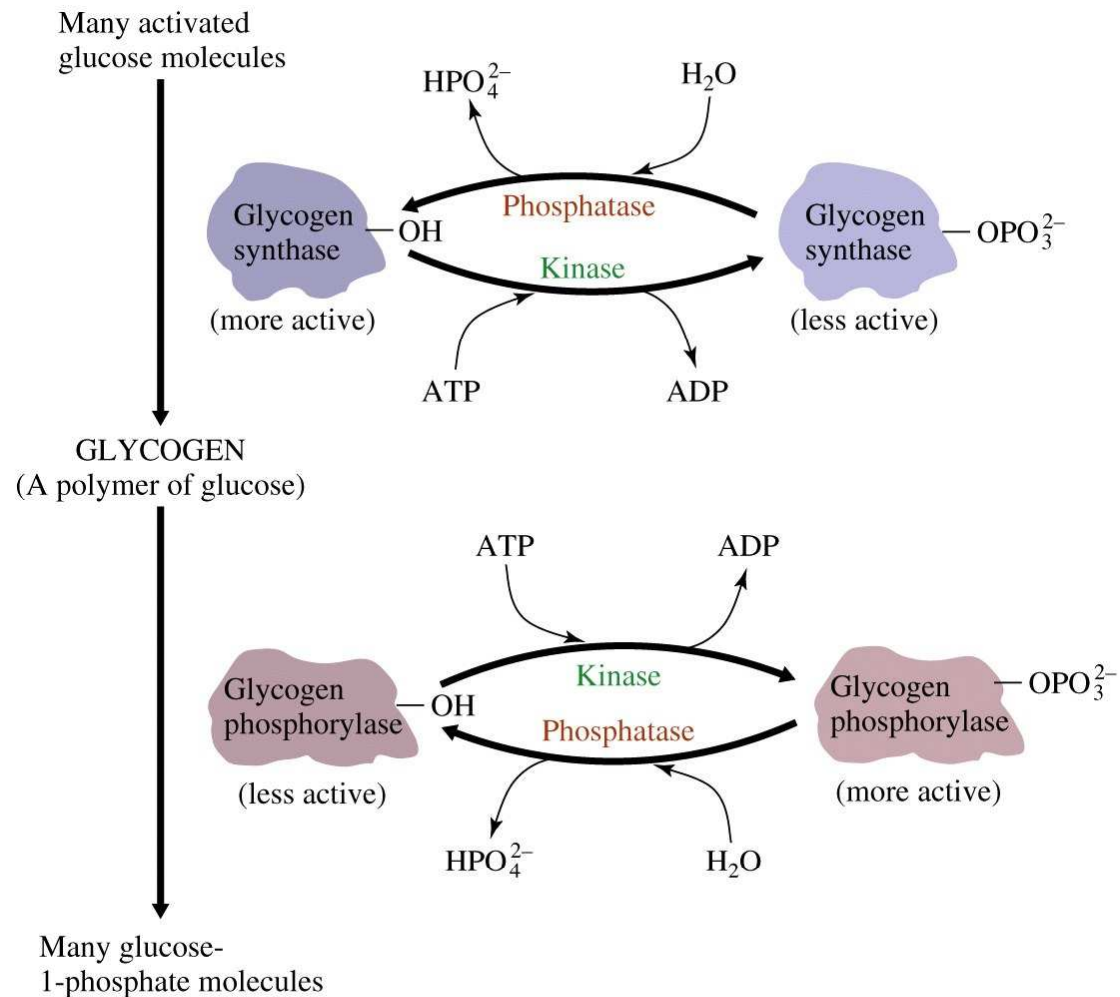
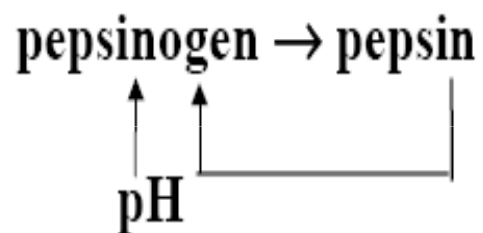


Figure 6-7 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

Aktivace zymogenů

žaludek



slinivka břišní

enterokinasa



trypsinogen → trypsin



chymotrypsinogen → chymotrypsin

proelastasa → elastasa



Regulace kovalentní modifikací

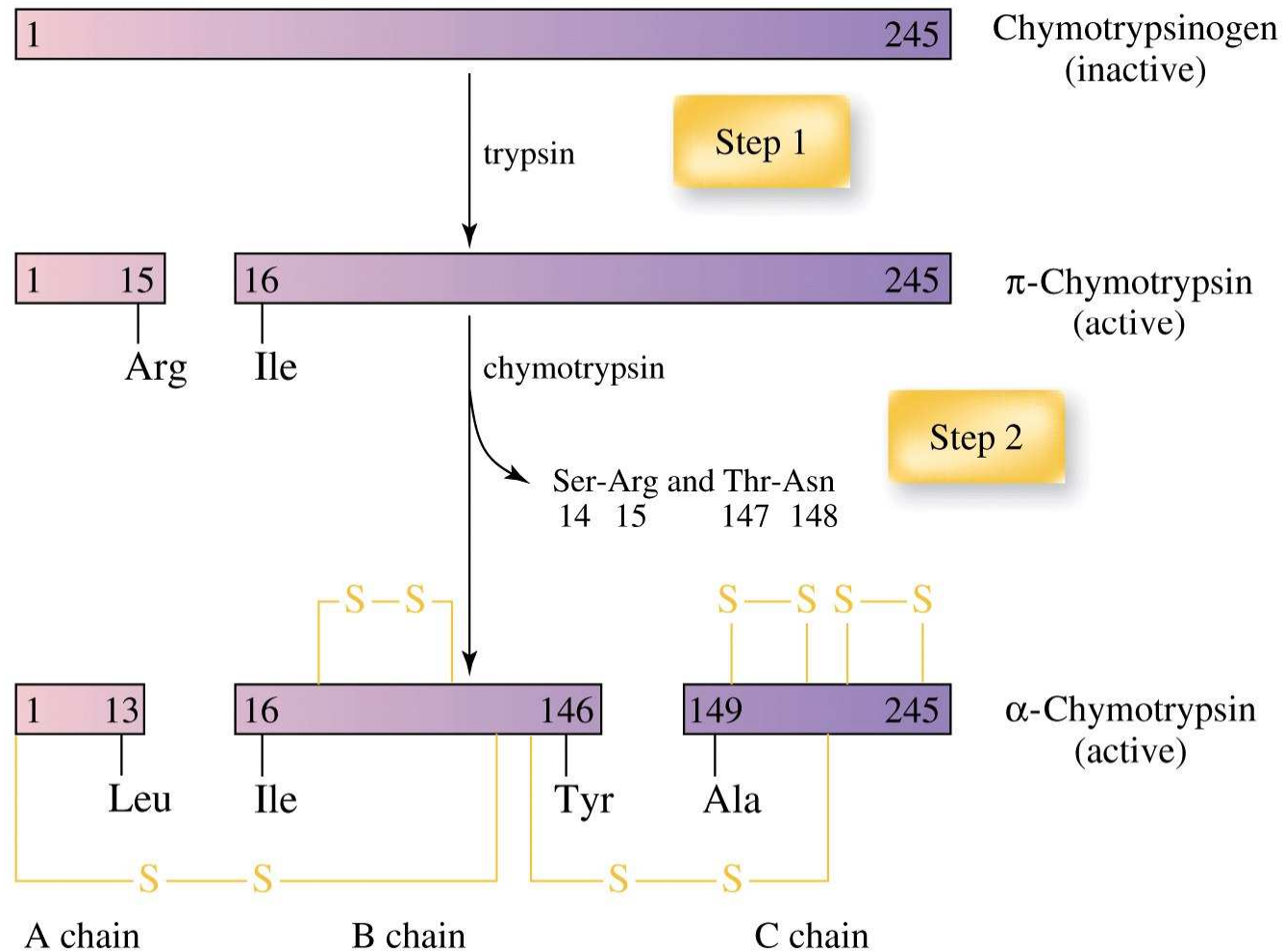
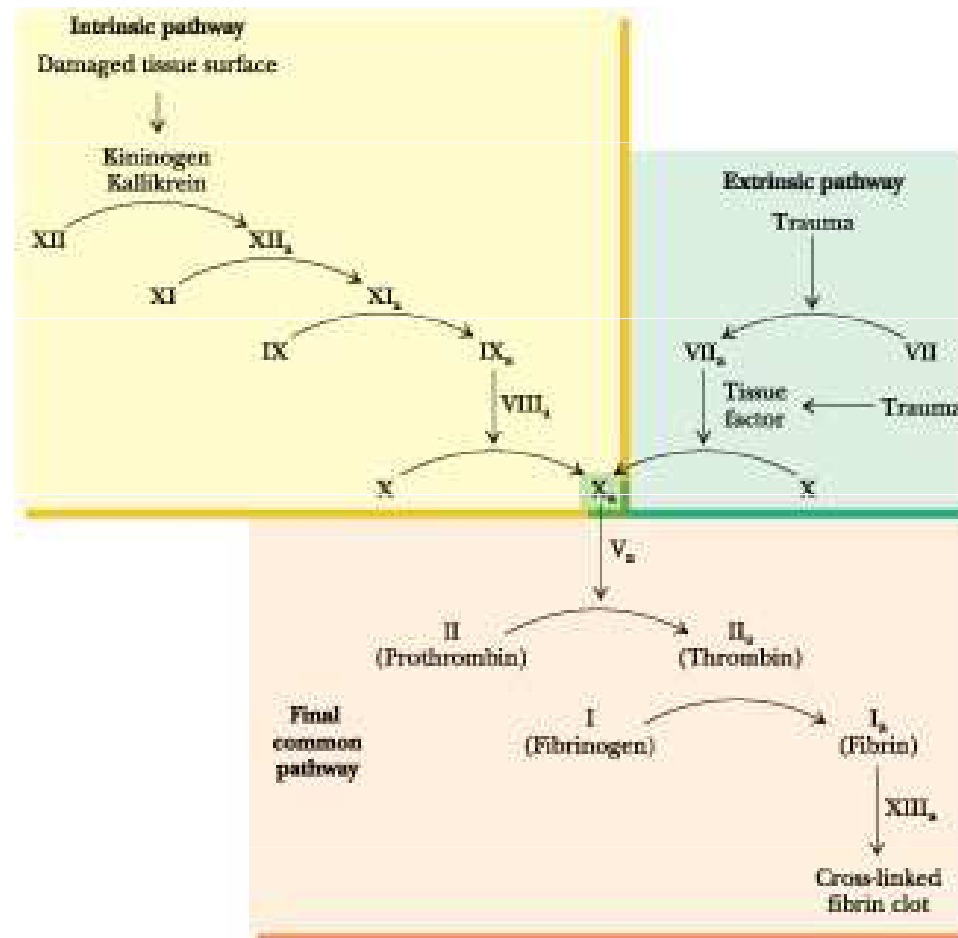
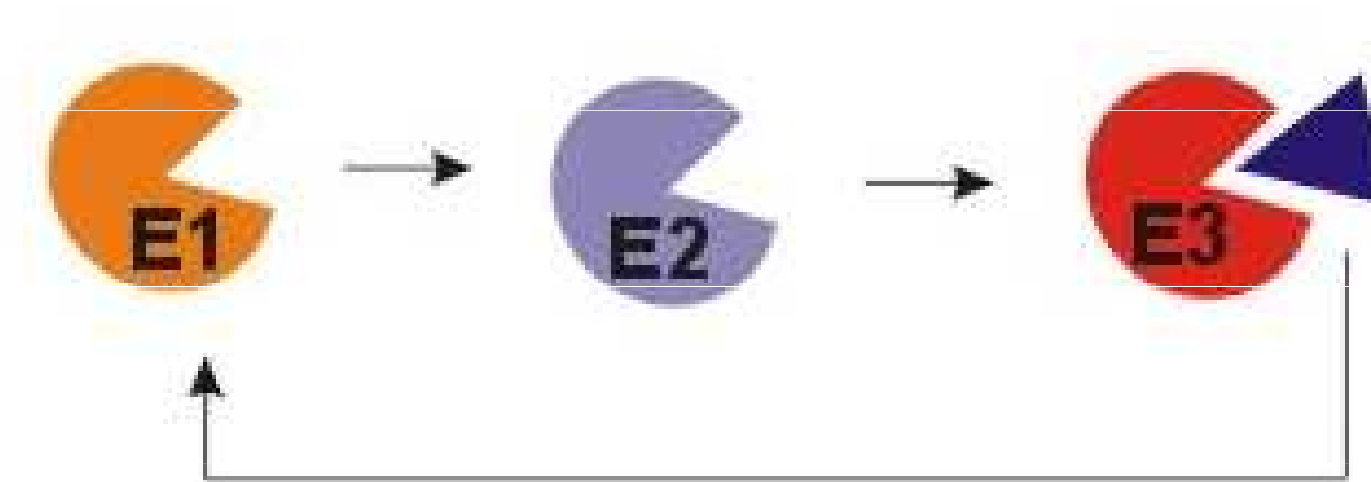


Figure 6-8 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

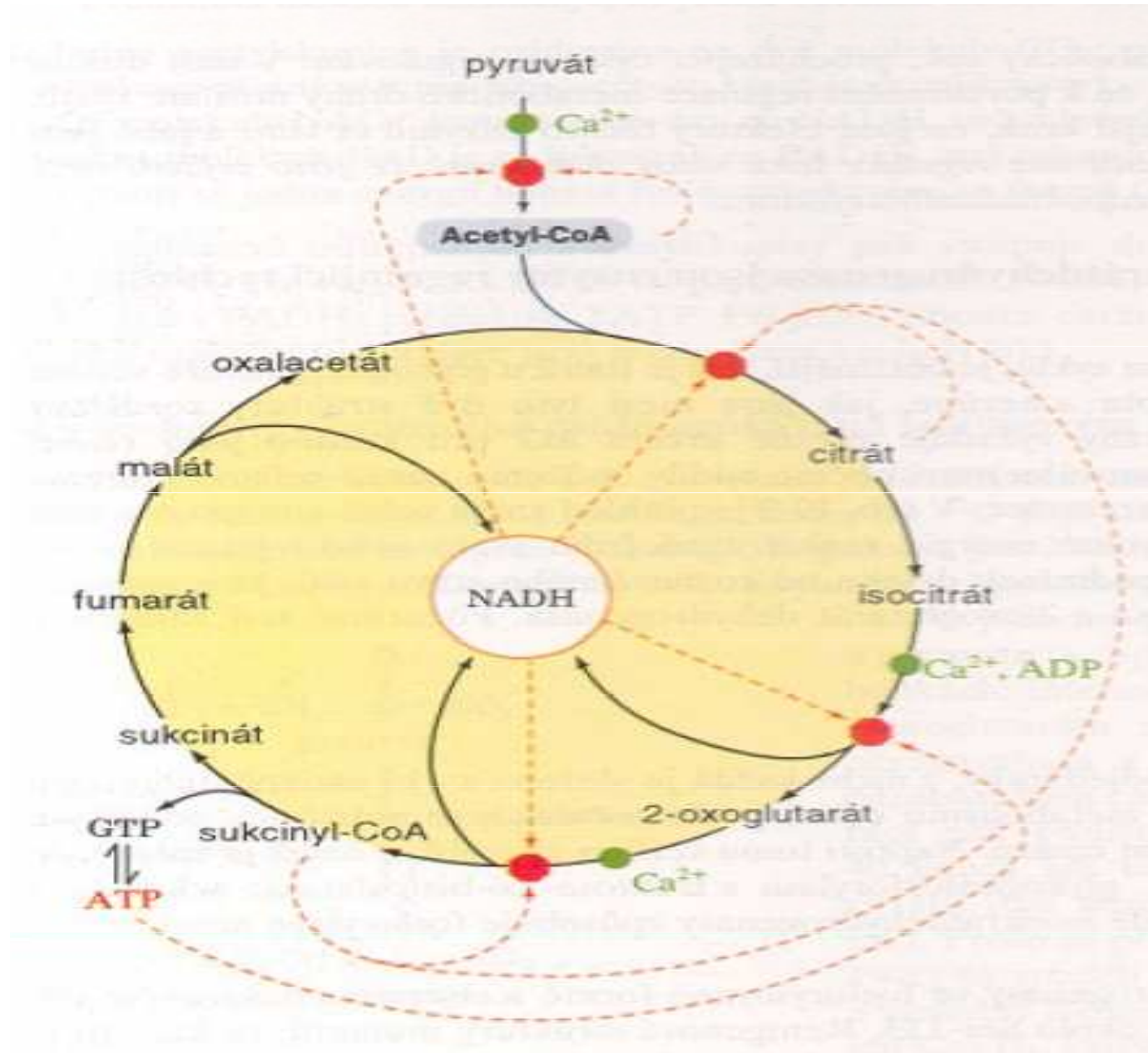
Regulace kovalentní modifikací



Regulace zpětnou vazbou



Regulace

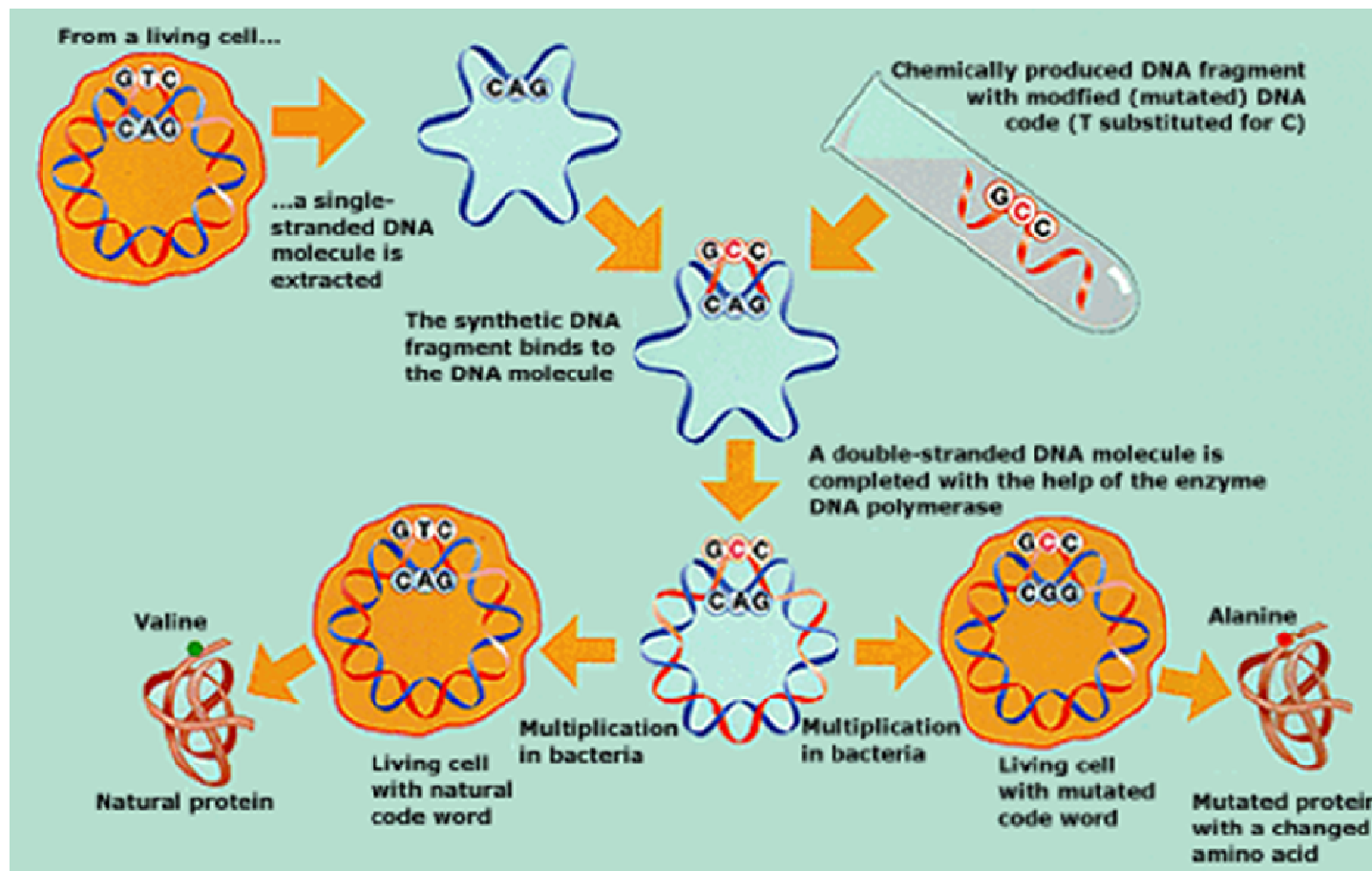


Regulace činnosti enzymu

- Kompartimentace

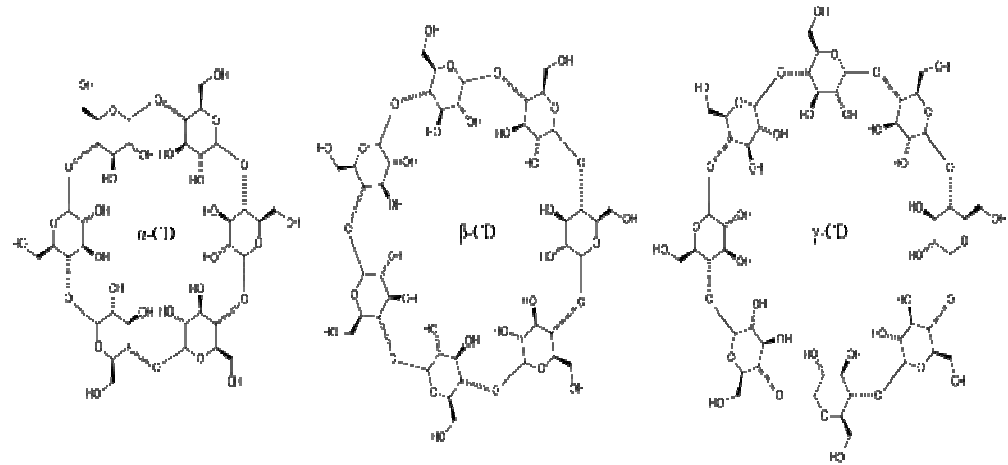
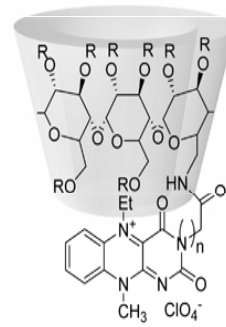
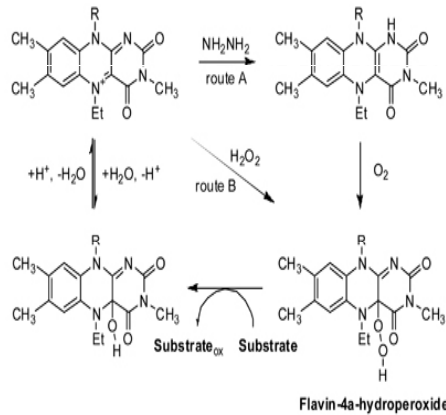
Umělé enzymy

Řízena evoluce *versus* Místně cílená mutageneze



Umělé enzymy

Synzymy



Abzyme

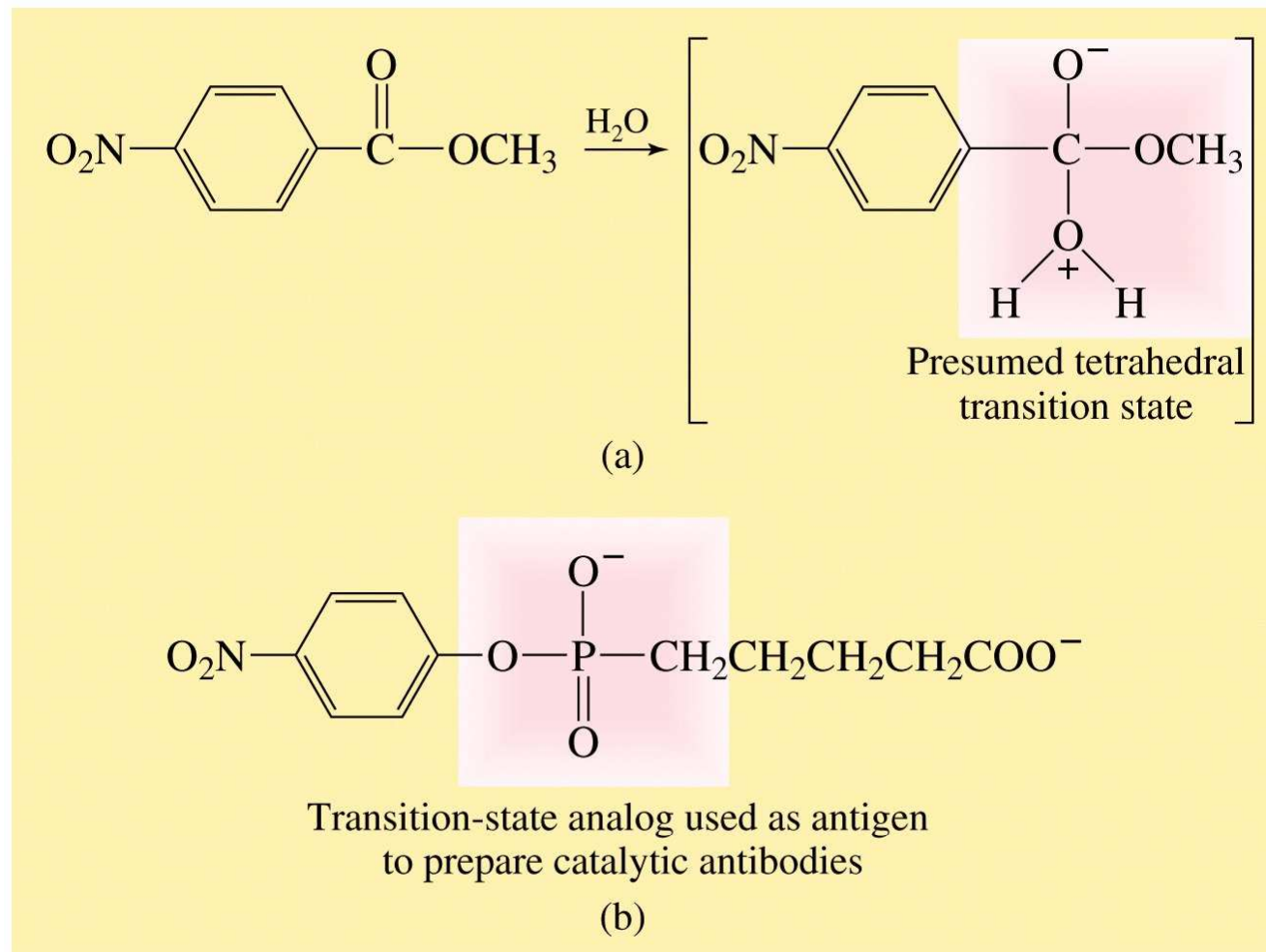


Figure 6-11 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

Ribozymy – katalytická RNA

1989 Nobelova cena

- Altman (Yale University) ribonukleasa P
- Cech (University of Colorado) mRNA



Ribonukleasa P

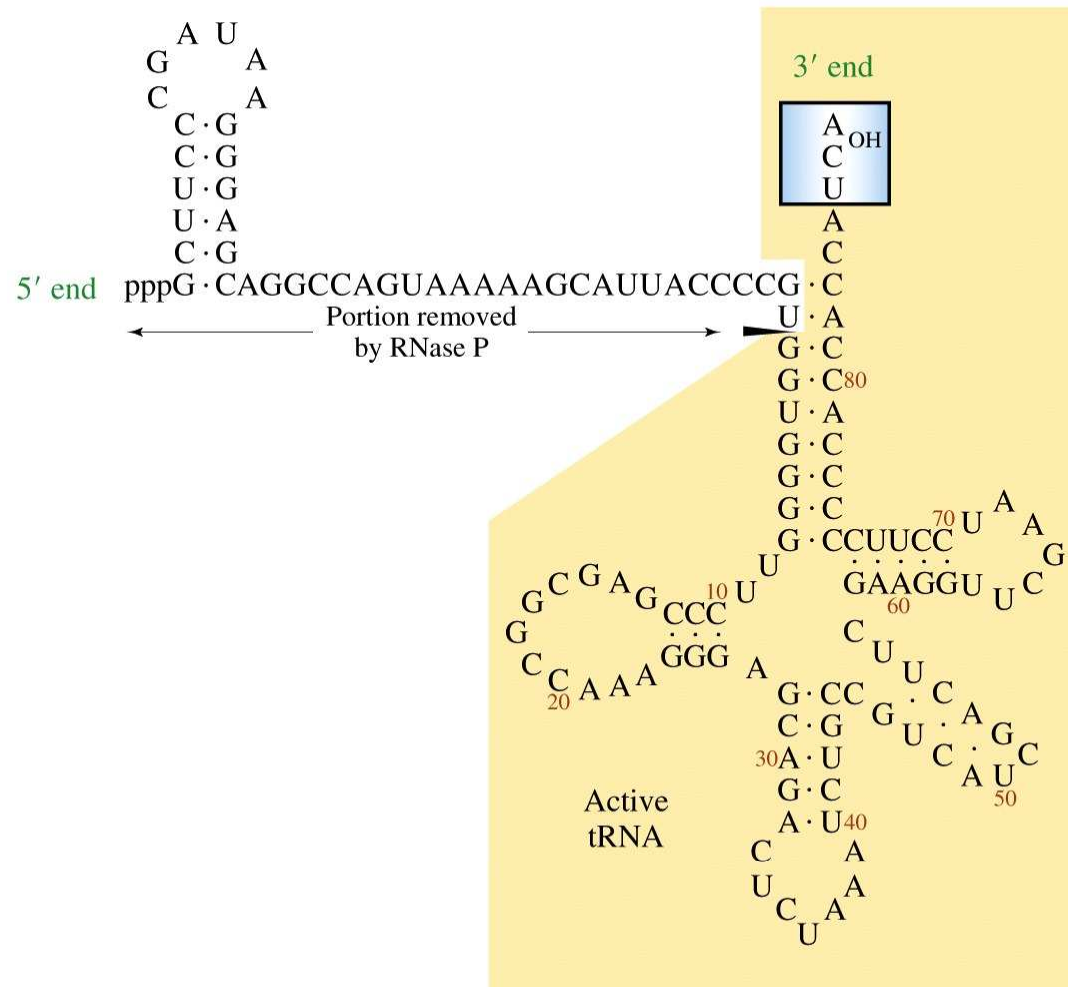


Figure 6-12 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

Autokatalytická mRNA

Tetrahymena thermophila

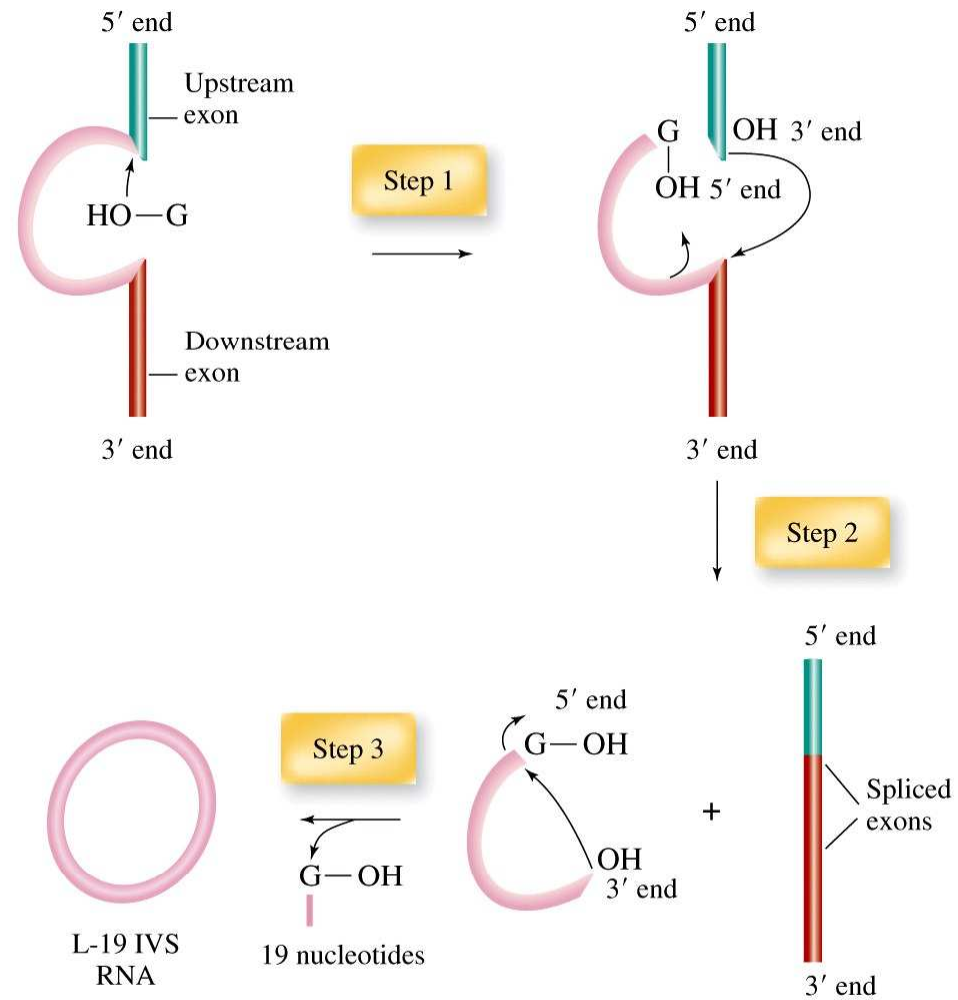


Figure 6-13 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons

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

Využití enzymů

- Celé buňky
- Volné enzymy
- Imobilizované enzymy

Volné versus imobilizované enzymy

Imobilizace enzymů

Vazba na nosič

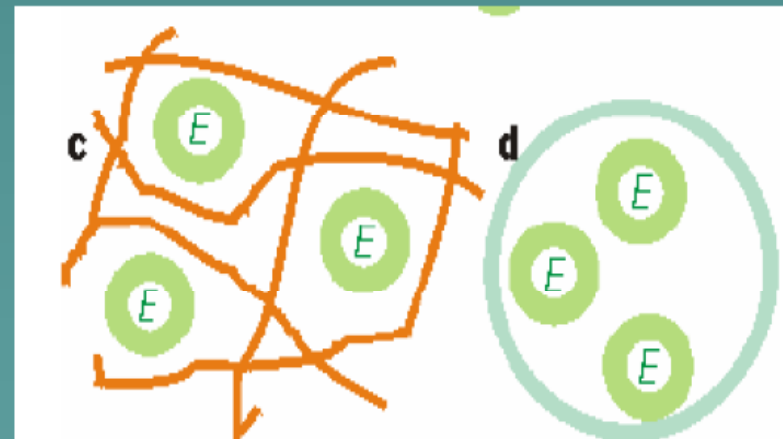
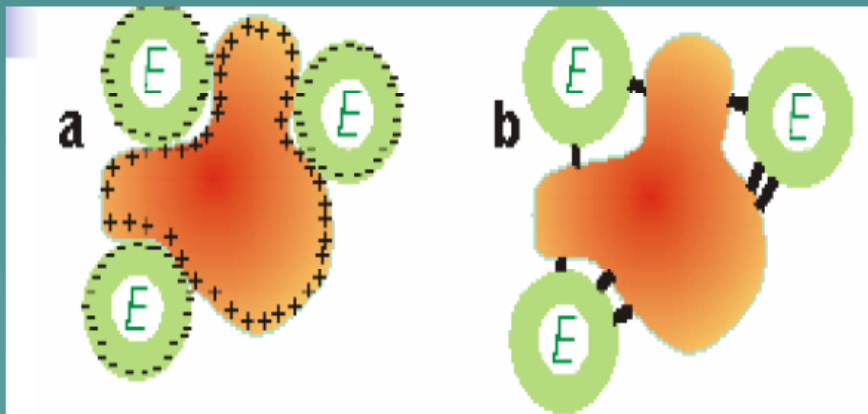
sorpcí

Kovalentní vazbou

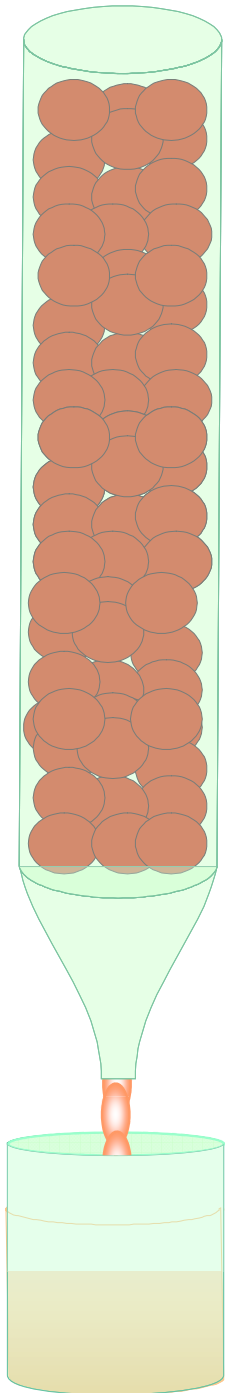
Zachycení (entrapment)

V matrici gelu

Opouzdření (encapsulation)



Výhody imobilizovaných enzymů



Stabilita enzymů vzrůstá v imobilizovaném stavu

Imobilizované enzymy mohou být používány opakovaně →
pokles nákladů

Produkt reakce není kontaminován enzymem →
odpadá potřeba purifikace

Imobilizované enzymy mohou být použity v kontinuálních procesech

Využití enzymů – celé buňky

- Nejstarší metody
- Potravinářství
 - Výroba sýrů a jogurtů (*Lactobacillus*)
 - Výroba piva a vína (*Saccharomyces cerevisiae*)
 - Výroba octa (*Saccharomyces cerevisiae*)
- Chemické výroby
 - Výroba kyseliny citronové (*Aspergillus niger*)
 - Výroba antibiotik (plísně)
 - Výroba vitaminů, steroidů a aminokyselin
- Těžké technologie
 - Čištění odpadních vod
 - Zpracování rud

Využití enzymů – izolované enzymy

- Široká paleta enzymových preparátů
- Invertasa – výroba invertovaného cukru
- Proteasy, lipasy – prací prostředky
- DNA-polymerasy, restriční endonukleasy, ligasy – genové technologie
- β -galaktosidasa – odstraňování laktosy z mléka
- Další možná využití:
 - chemické synthesisy

Nejvýznamnější technické aplikace enzymů

Proteolytické enzymy

- Biodetergenty (termostabilní, alkalické bakteriální proteasy)
- Mlékárenský průmysl (chymosin z telecích žaludků → specifická proteolýza kapa-kaseinu → tvorba sýřeniny)
- Krmivářský průmysl → výroba technických hydrolyzátů bílkovin
- Masný průmysl → tenderizace (změkčení) masa (rostlinná proteasa papain)
- Pivovarnictví → enzymové stabilizátory piva (odstraňování chladových zákalů)

Nejvýznamnější technické aplikace enzymů

Amylasy

- α -amylasy \rightarrow hydrolýza 1,4- α -glukosidických vazeb uvnitř polysacharidové molekuly
- Ztekucování škrobu (nezbytné při následné výrobě glukosových syrupů a glukosy)
- Součást biodetergentů (odstraňování škrobového pojidla z textilních vláken)
- Součást prostředků do automatických myček
- Zlepšování filtrovatelnosti cukrových a ovocných šťáv

Nejvýznamnější technické aplikace enzymů (glykosidasy)

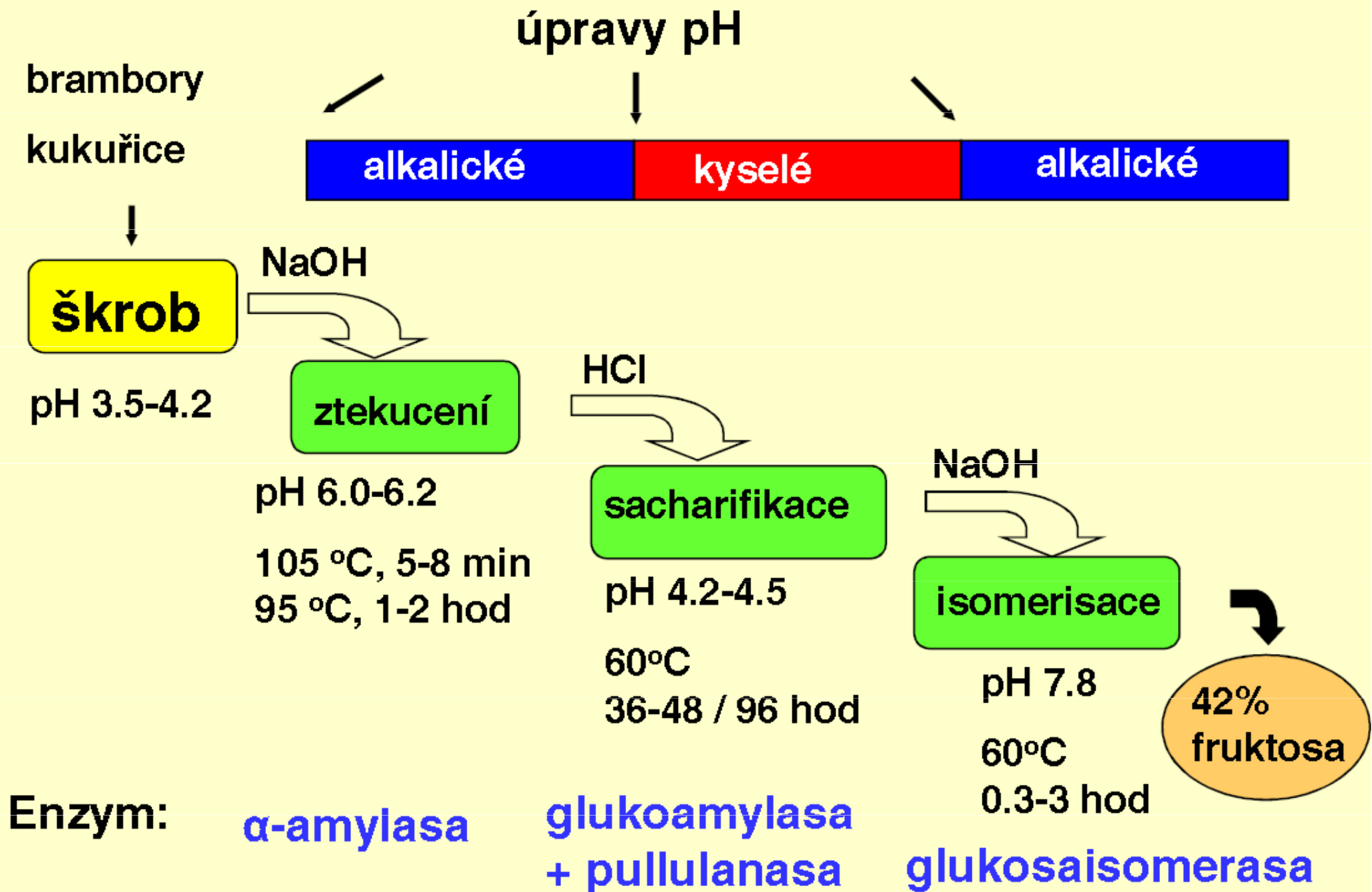
- β -amylasy \rightarrow odštěpují maltosové jednotky z neredukujícího konce polysacharidového řetězce
- Glukoamylasa \rightarrow odštěpuje glukosové jednotky od neredukujícího konce (zpracování škrobu na škrobové sirupy; odbourávání zbytkových dextrinů v pivu \rightarrow vyšší stupeň prokvašení, diabetické pivo)
- Invertasa \rightarrow hydrolýza sacharosy na glukosu a fruktosu, výroba invertního cukru
- β -galaktosidasa \rightarrow hydrolýza laktosy na glukosu a galaktosu (výroba delaktosovaného mléka, mléko pro výrobu zmrzliny (zabránění krystalizace laktosy))

Nejvýznamnější technické aplikace enzymů

Glukosaisomerasa (xylosaisomerasa)

- Isomerace glukosy na fruktosu
- Výroba fruktosových sirupů (42 % - 55 % fruktosy) z glukosových sirupů (zejména z kukuřičných a obilních škrobů) → vyšší sladivost

Sacharidy ze škrobu



Nejvýznamnější technické aplikace enzymů

Celulasy

- Komplexní enzymový systém katalyzující hydrolýzu celulosy
- Celulasa z *Trichoderma viridae* → odbourání nativní celulosy
- Zpracování celulosové suroviny (dřevěné odpady, odpadní papír)
- Výroba instantních potravin (káva, čaj), digestiva v krmných směsích, zvýšení účinnosti extrakce šťav z rostlinných materiálů

Nejvýznamnější technické aplikace enzymů

Lipasy

- Postupná hydrolýza lipidů (triacylglyceroly → diacylglyceroly → monoacylglyceroly → glycerol [+ uvolněné mastné kyseliny])
- Ovlivnění chuti a vůně potravinářských výrobků (sýrařství !!!)
- Součást digestivních přípravků

Příklady lékařských aplikací enzymů

- Fibrinolýza (cílené rozpouštění krevních sraženin) → plasmin, **streptokinasa, urokinasa (aktivátory plasminogenu)**
- Cílená tvorba krevních sraženin → thrombin
- Trávicí enzymy
- Trypsin → čištění ran od hnisu
- Lysozym → oční kapky

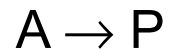
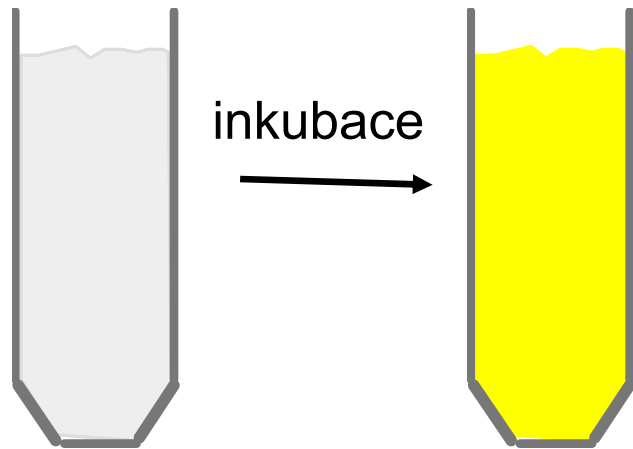
Enzymy jako analytická čidla

- Specifita – reagují pouze s daným substrátem
- Citlivost
- Analýza nepřečištěným vzorků – tělní tekutiny

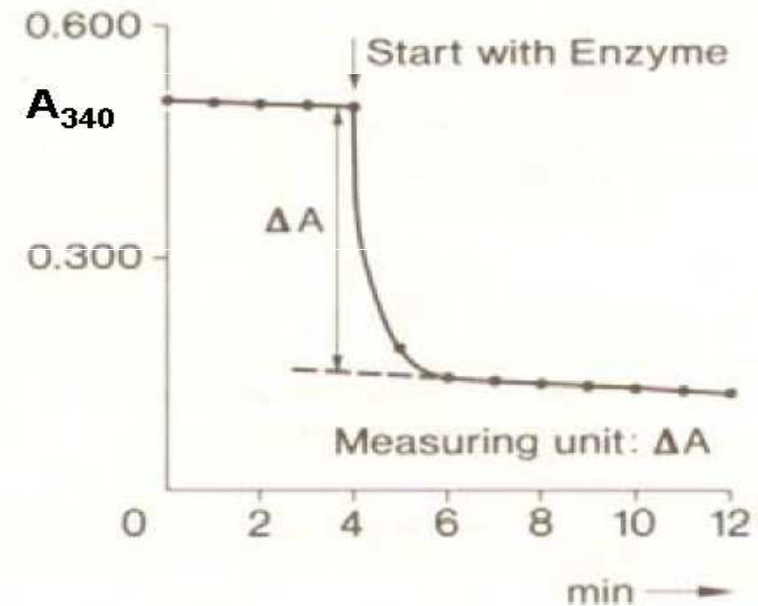
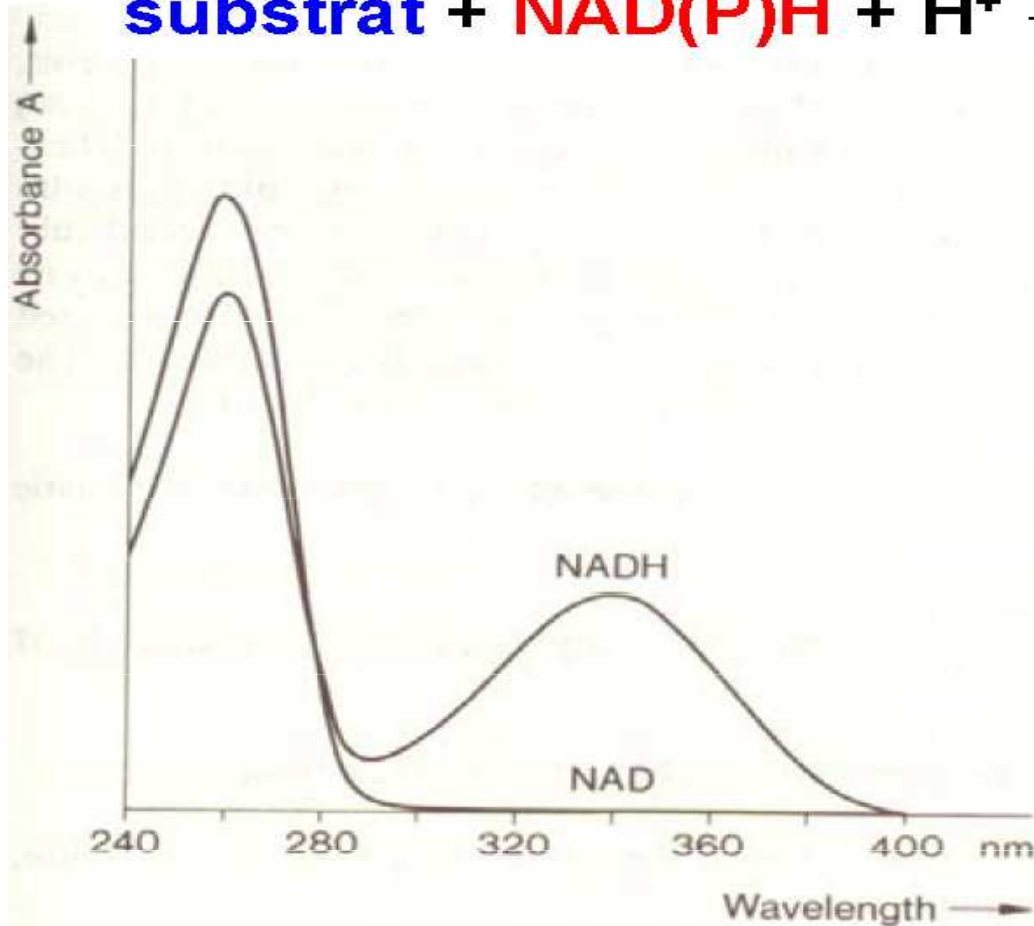
Analytická biochemie

- Stanovení substrátů
- Stanovení inhibitorů
- Stanovení aktivity enzymů

End-point versus kinetické stanovení



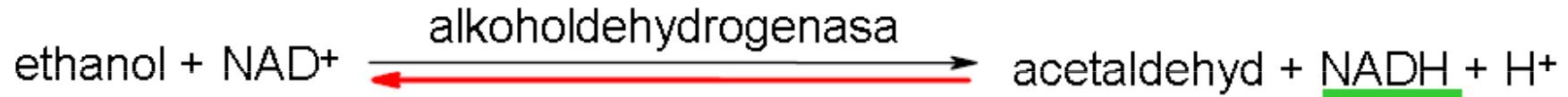
Reakce v roztoku



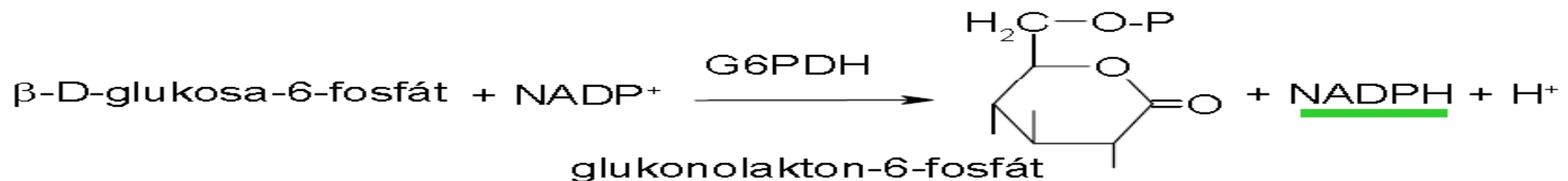
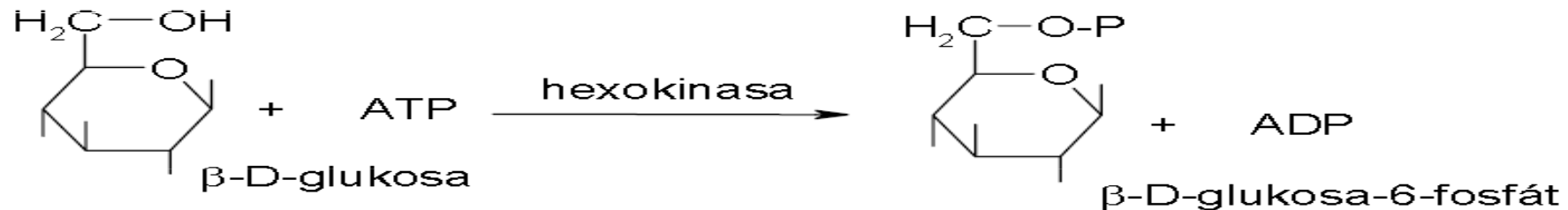
Výpočet látkového množství substrátu:

$$n = \frac{V \cdot \Delta A}{\epsilon_{\text{NADH}} \cdot l}$$

- **Přímé stanovení**



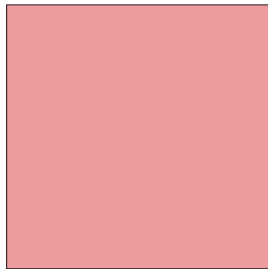
- **Pomocná reakce**



Automatické analyzátořy



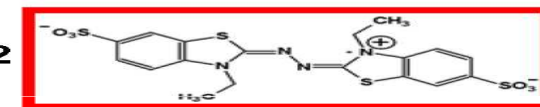
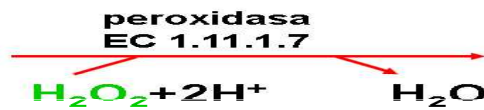
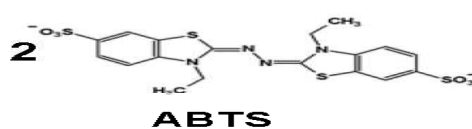
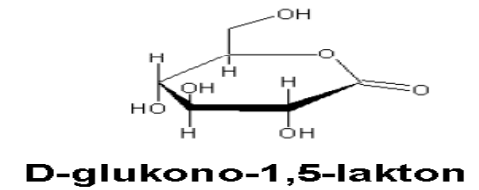
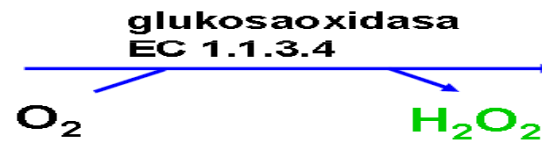
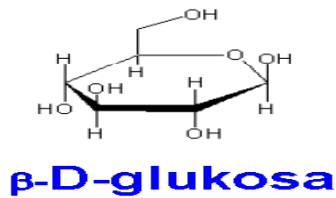
Diagnostické proužky



žádná
glukosa

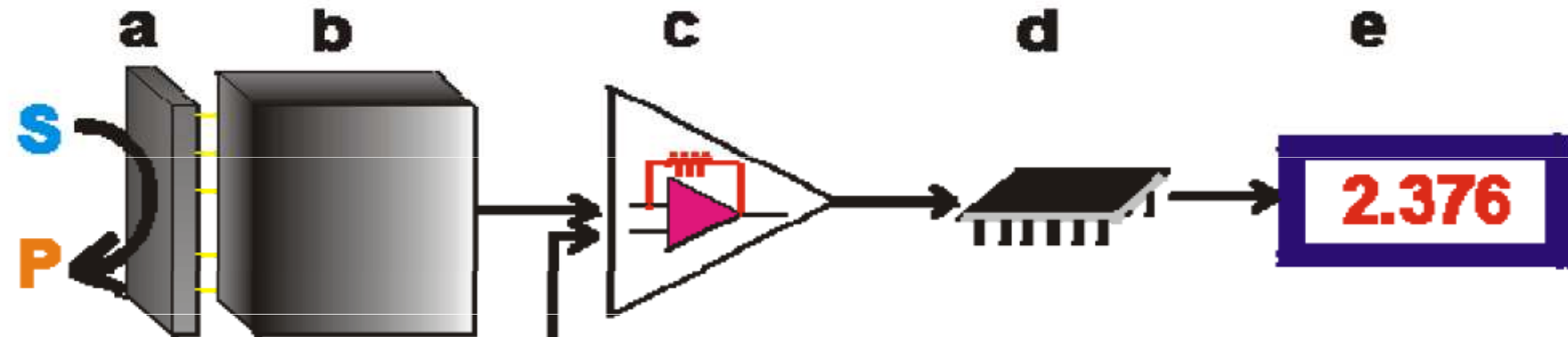


Zvyšující se množství glukosy →



$\lambda_{max} = 417, 645, 728 \text{ nm}$

Biosenzory



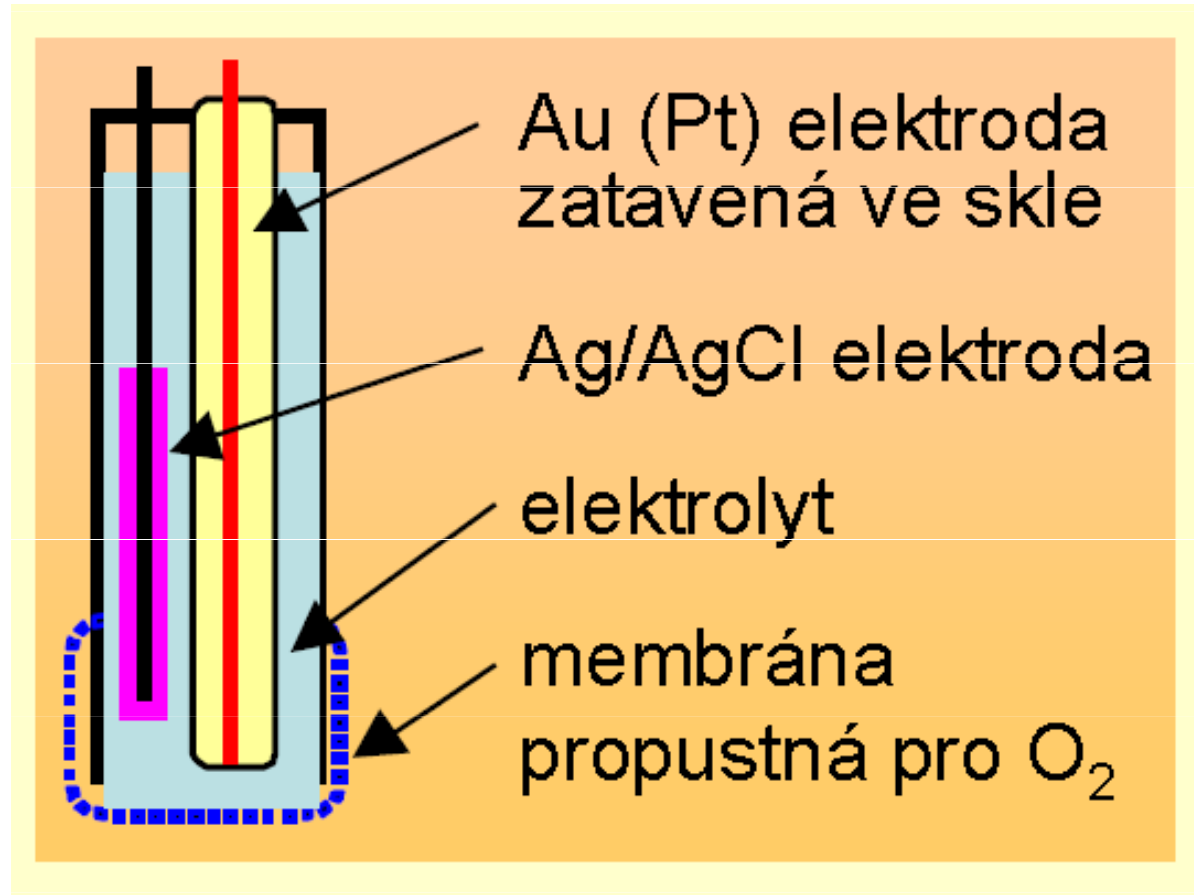
Reference

- a) Biokatalyzátor (přeměna substrátu na produkt)
- b) Převodník (generování elektrického signálu)
- c) Zesilovač (zesílení signálu)
- d) Procesor (vyhodnocení signálu)
- e) Výstup výsledku

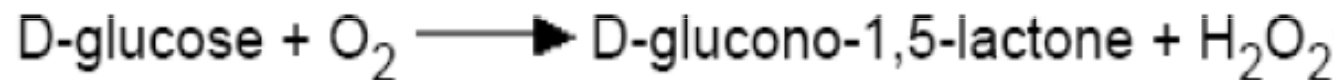
- výměna tepla
- redistribuce iontů a změna elektrického potenciálu
- výměna elektronů
- změna vodivosti
- změna optických vlastností
- změna hmotnosti

Amperometrické biosenzory

Leland C. Clark Jr.
1956



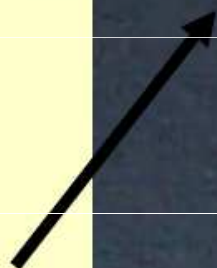
glucose oxidase



Biosensor pro glukosu

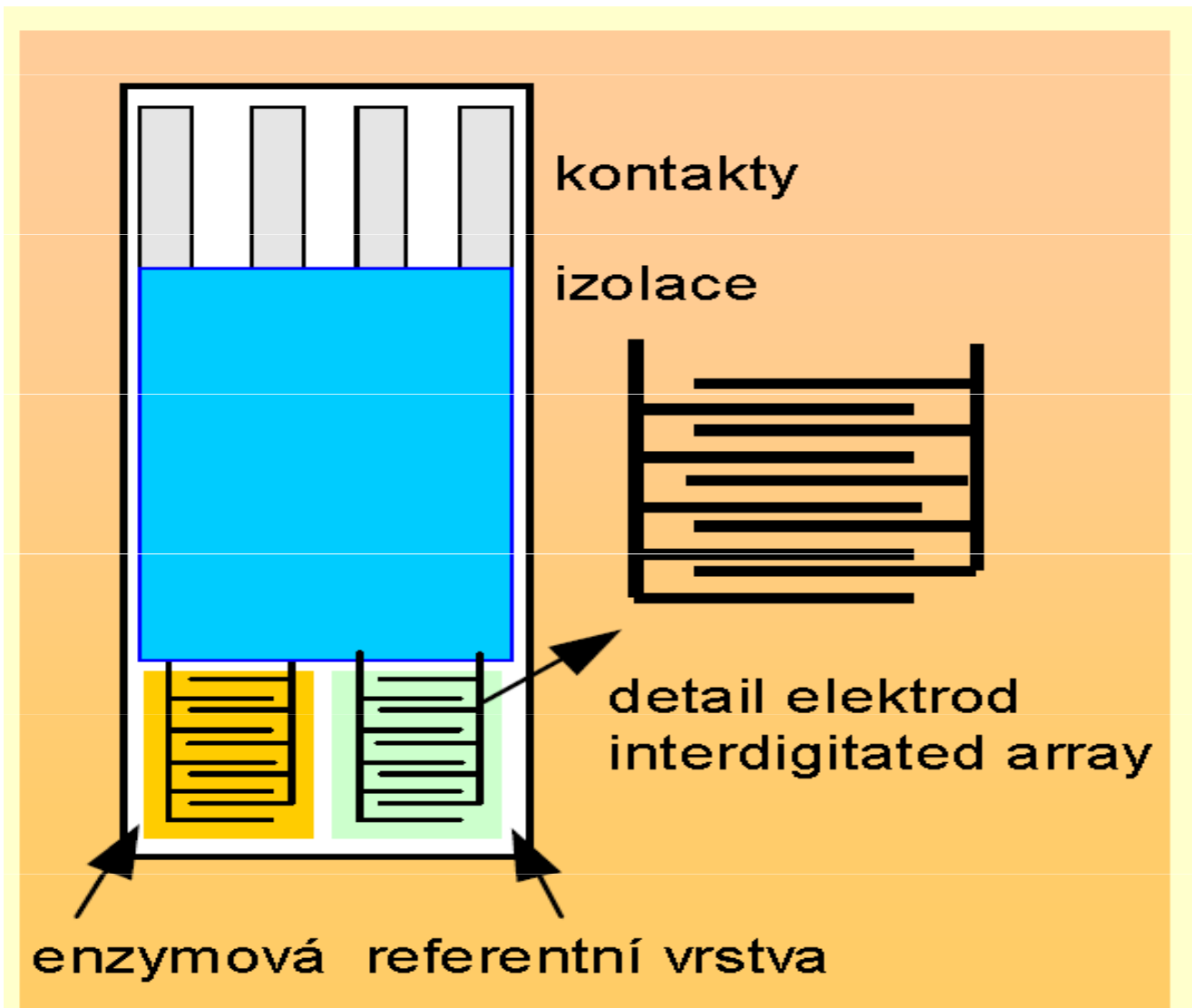


Enzymová elektroda
na jedno použití

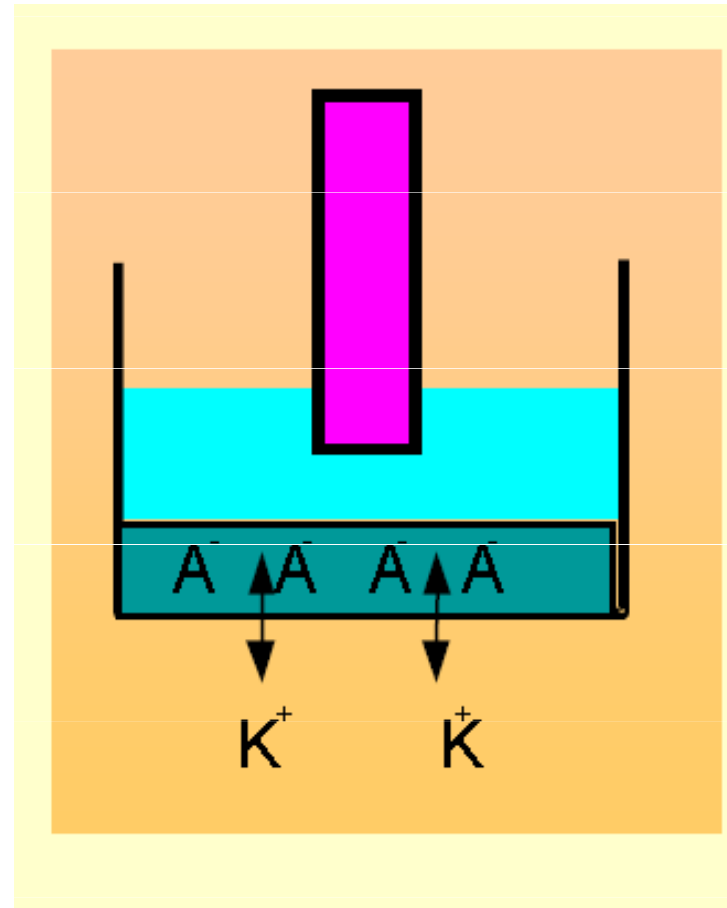


Měřicí jednotka

Konduktometrické biosenzory

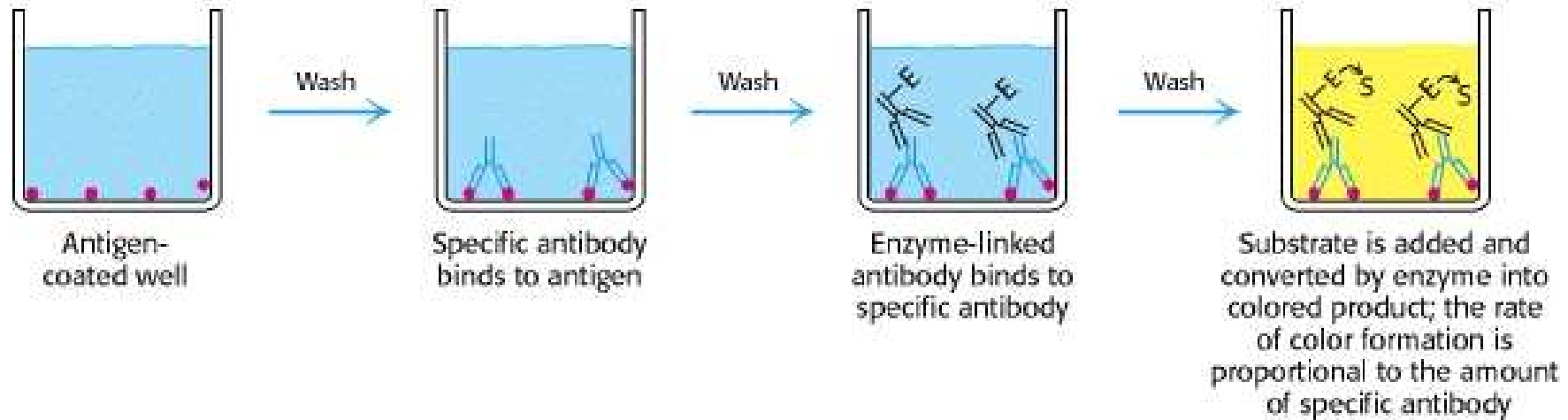


Potenciometrické biosenzory

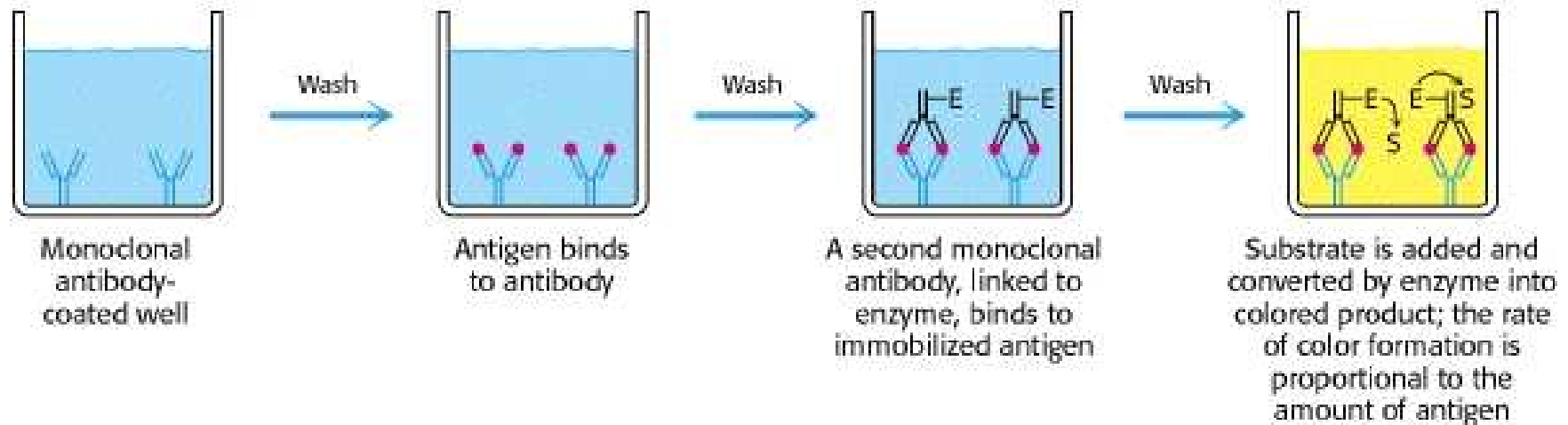


ELISA

(A) Indirect ELISA



(B) Sandwich ELISA

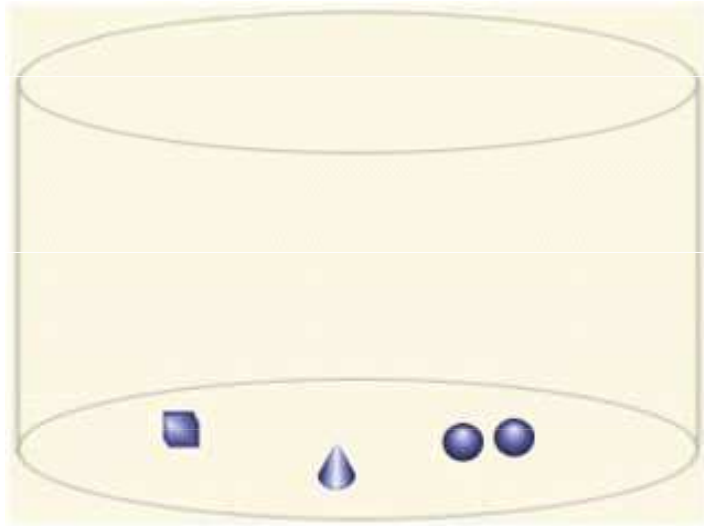


ELISA – stanovení antigenu

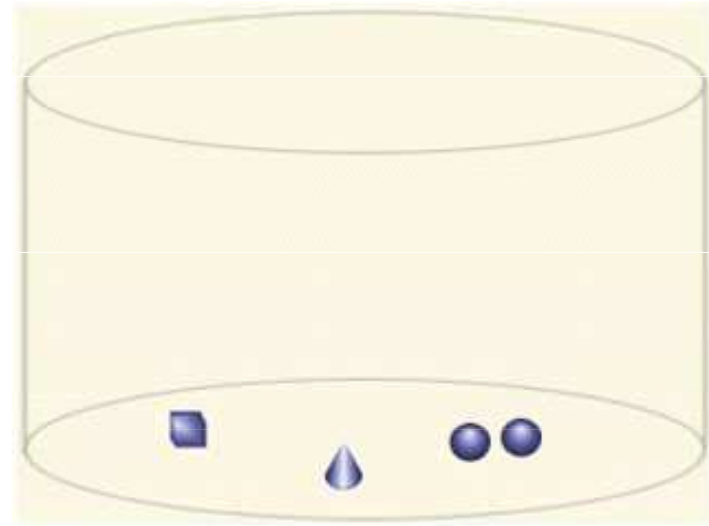


ELISA – stanovení protilátky

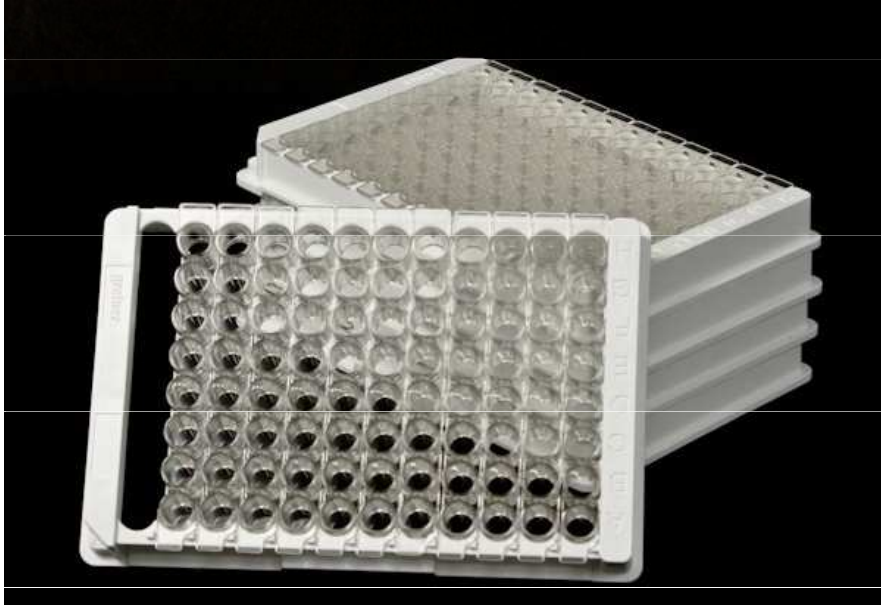
negativní



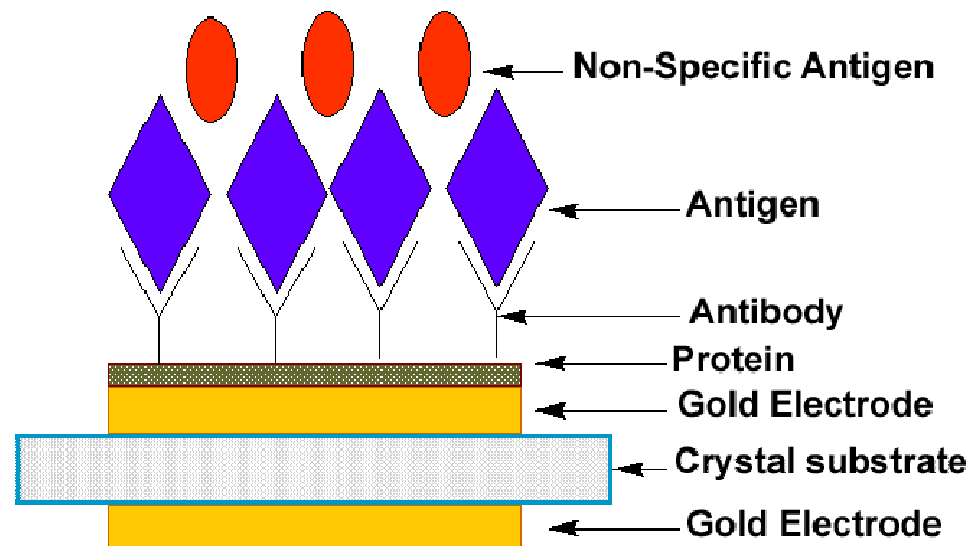
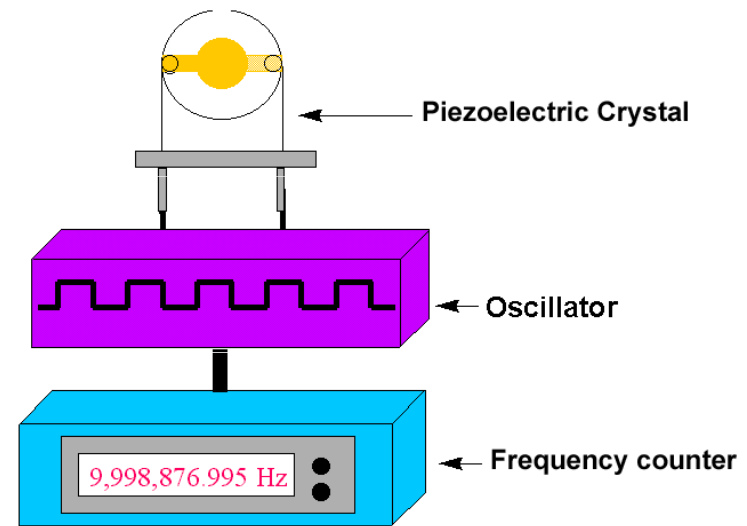
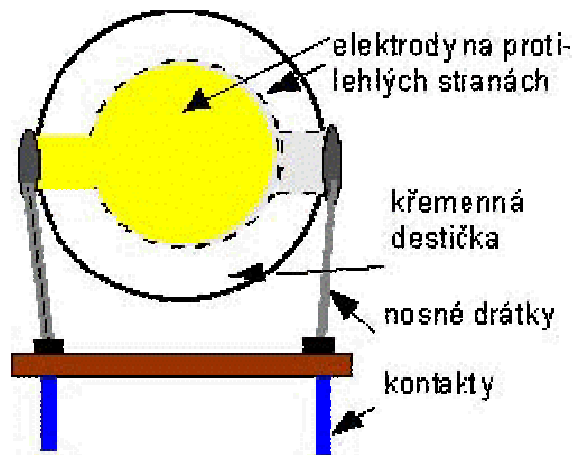
pozitivní



ELISA - vybavení



Piezoelektrický biosenzor



Kantilever

