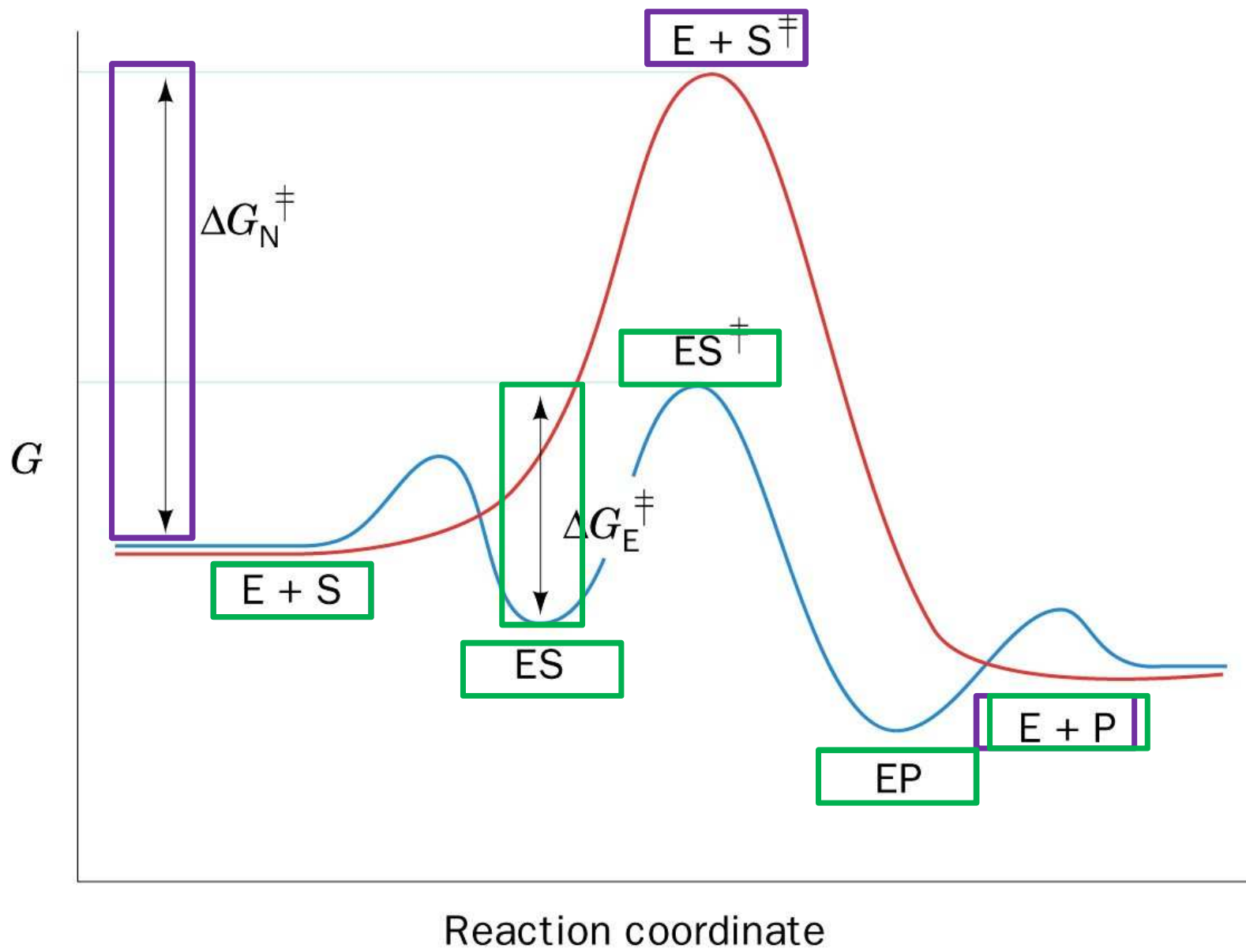


**Biokatalyzátory – enzymy, RNA**

# ENZYMLOGIE

Katalýza - Berzelius 1838



## Požadavky na biokatalyzátory :

A. Reakce musí probíhat cíleně.

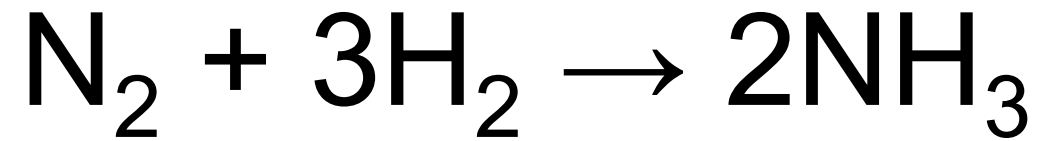
**konstitutivní**

**inducibilní**

# Bio- versus chemokatalyzátory



- Vyšší reakční rychlostí
- Mírnější podmínky



**Haber-Boschova syntesa**  
**Fe 450 °C 20 MPa**

**Nitrogenasa**  
**pH 7 normální tlak a teplota ATP**

# Bio- versus chemokatalyzátory



- Vyšší reakční rychlostí
- Mírnější podmínky
- Vyšší specifita – typ reakce a typ substrátu
- Schopnost regulace

# Bio- versus chemokatalyzátory



**Citlivost vůči řadě vlivů a menší stabilita**



# Biokatalyzátory

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

# 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

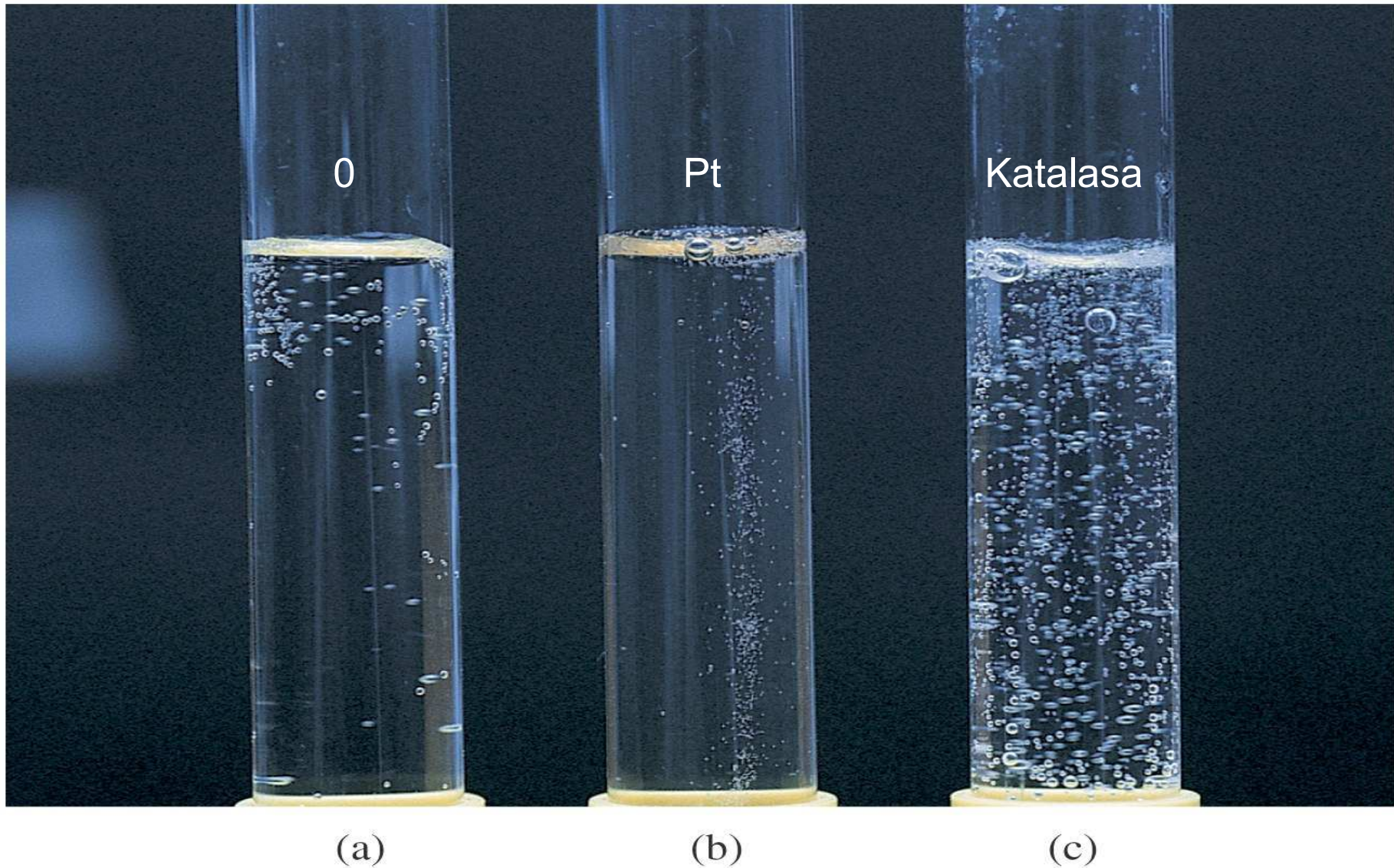
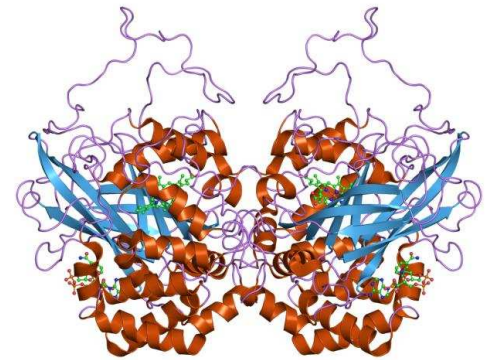
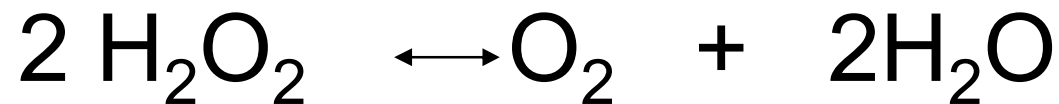


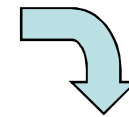
Figure 5-1 Concepts in Biochemistry, 3/e

# Enzymy – molekulární stroje

*Katalasa*



Číslo přeměny **40 000 000**



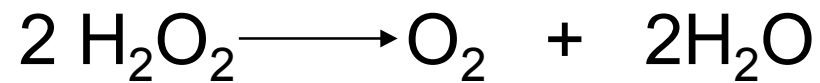
**1** molekula enzymu přemění

**40 000 000** molekul substrátu za **1** s

# Typy reakcí

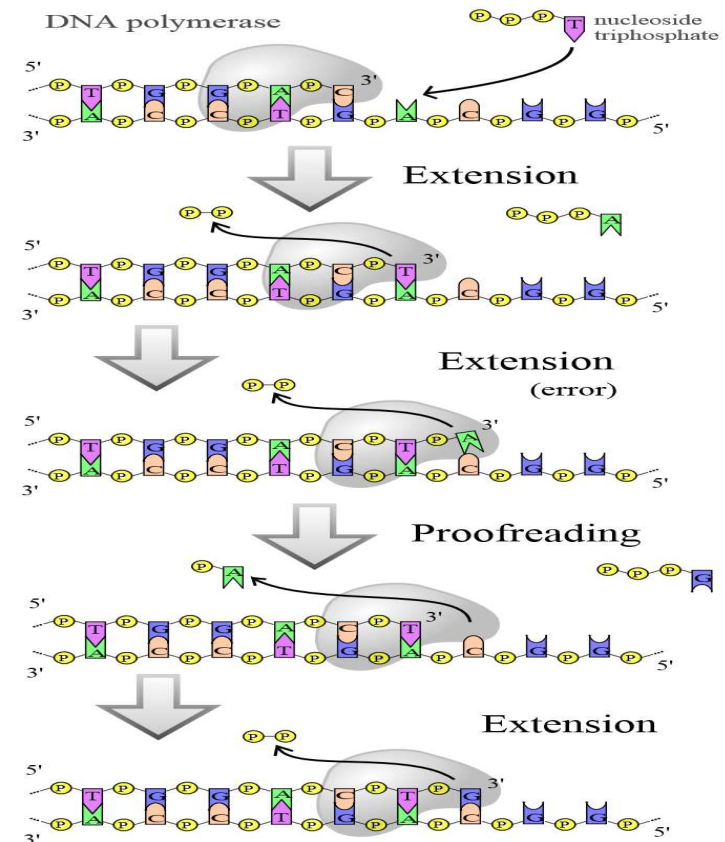
## jednoduché

- Katalasa



## složité

- DNA polymerasa



## Historie poznání enzymů

## Počátky biochemie – fermentace a trávení

- 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*

## INTRODUCTION

The isocitrate dehydrogenase (ICDH) [isocitrate-NAD(P)<sup>+</sup> oxidoreductase (decarboxylating), EC 1.1.1.42] catalyses the oxidative decarboxylation



# Názvosloví

- asa

- áza

Jednotně v celé práci !

## Enzymová nomenklatura

IUB 1961 - nejnovější 1984

1. **OXIDOREDUKTASY** - oxidačně redukční reakce
  - *alkoholdehydrogenasa*
  
2. **TRANSFERASY** - přenos skupin
  - *aspartátaminotransferasa*
  
3. **HYDROLASA** - hydrolytické štěpení (+ H<sub>2</sub>O)
  - *proteasy*

#### **4. LYASY**

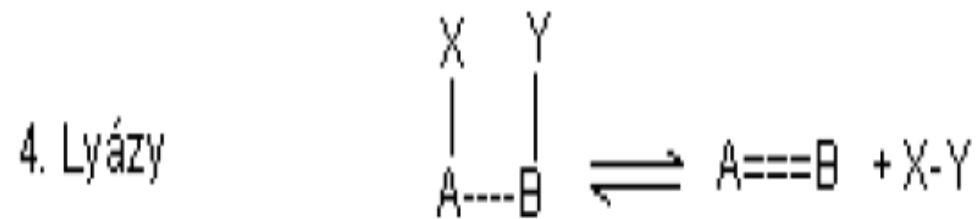
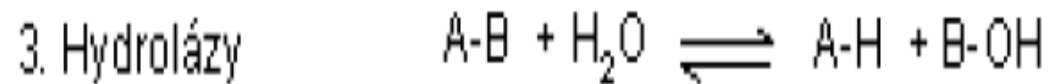
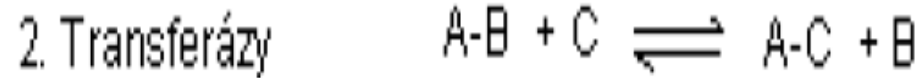
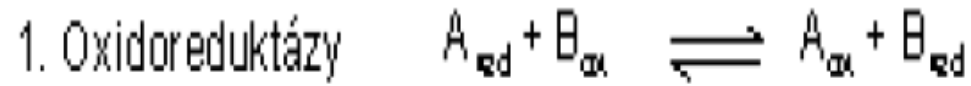
- **nehydrolytické štěpení (bez H<sub>2</sub>O)**
- *karbonátanhydrasa*

#### **5. IZOMERASY**

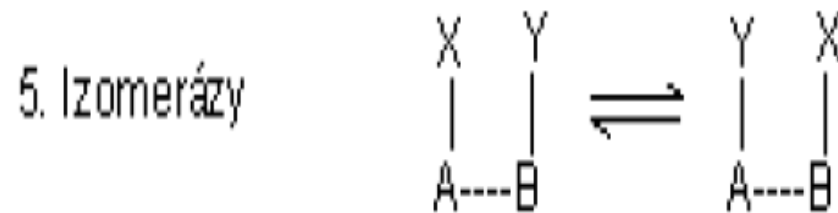
- **přesuny atomů a skupin**
- *glukosafosfátizomerasa*

#### **6. LIGASY**

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



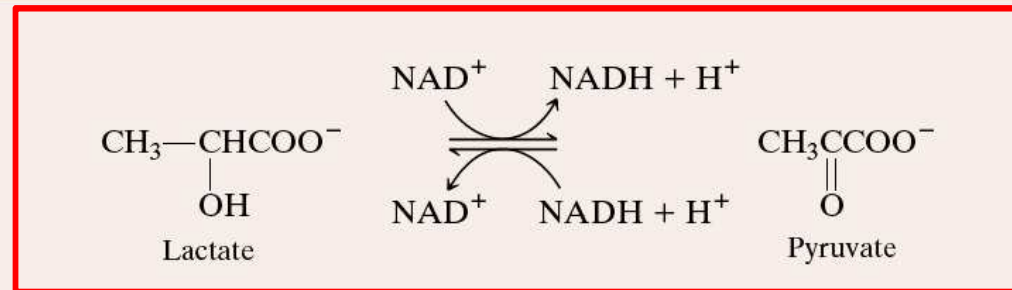
Synthasy



Synthasy

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

## 1. Oxidoreductases



Common name: Lactate dehydrogenase

Official name: L-Lactate:NAD<sup>+</sup> oxidoreductase

Official number: 1.1.2.3

## 2. Transferases

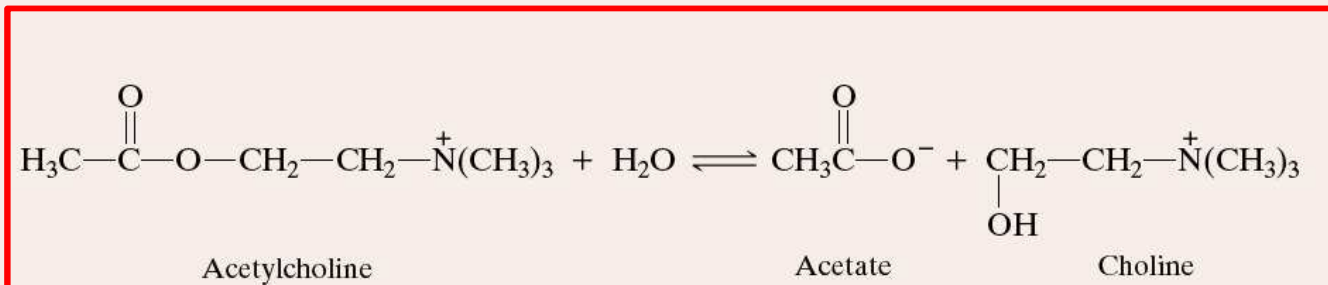
 $(dNMP)_n$  = DNA with  $n$  nucleotides $dNTP$  = deoxynucleoside triphosphate $(dNMP)_{n+1}$  = DNA with  $n + 1$  nucleotidesPP<sub>i</sub> = Pyrophosphate

Common name: DNA polymerase

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

Official number: 2.7.7.7

## 3. Hydrolases



Common name: Acetylcholinesterase

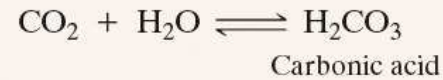
Official name: Acetylcholine acetylhydrolase

Official number: 3.1.1.7

## Table 5.2

### An example of each class of enzyme

#### 4. Lyases

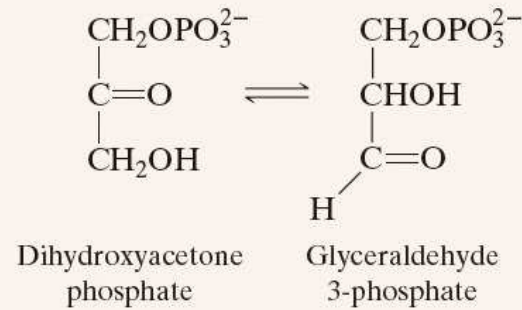


Common name: Carbonic anhydrase

Official name: Carbonate hydrolyase

Official number: 4.2.1.1

#### 5. Isomerases

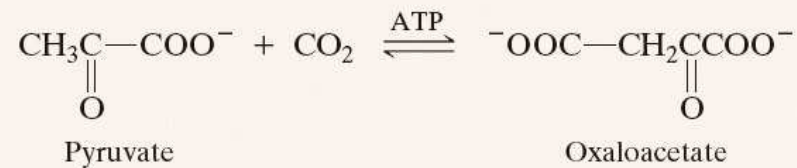


Common name: Triose phosphate isomerase

Official name: D-Glyceraldehyde-3-phosphate ketoisomerase

Official number: 5.3.1.1

#### 6. Ligases



Common name: Pyruvate carboxylase

Official name: Pyruvate CO<sub>2</sub> ligase (ADP-forming)

Official number: 6.4.1.1

**EC 1.1.1.27**

1.

1.

1.

27

Enzyme Commission

Třída - *oxidoreduktasa*

Podtřída - *skupina CHOH*

Podpodtřída - *koenzym NAD*

Číslo enzymu

Copyrighted Material

# ENZYME NOMENCLATURE

*Recommendations (1992)  
of the Nomenclature Committee  
of the International Union of Biochemistry  
and Molecular Biology*



Published for the International Union of Biochemistry and Molecular Biology by Academic Press, Inc.  
Copyrighted Material



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

The screenshot shows the BRENDA website interface. At the top, there is a browser address bar with the URL <http://www.brenda-enzymes.info/>. Below the browser, the website 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". A red banner announces a "NEW feature online!". Below this is a table with three columns: "Nomenclature", "Reaction & Specificity", and "Functional Parameters". The table lists various enzyme-related categories and their associated parameters. At the bottom, there is contact information for the webmaster, Sandra Placzek, and a note about JavaScript requirements.

**Navigation Menu (Left):**

- 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

**Search Bar:**

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 <b>NEW</b>
<b>Isolation &amp; Preparation</b>		<b>Organism-related information</b>
Purification Cloned Expression Renatured Crystallization		Organism Source Tissue Localization Protein-Specific Search
<b>Stability</b>	<b>Enzyme Structure</b>	<b>Disease &amp; References</b>
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
		<b>Application &amp; Engineering</b>
		Engineering Application

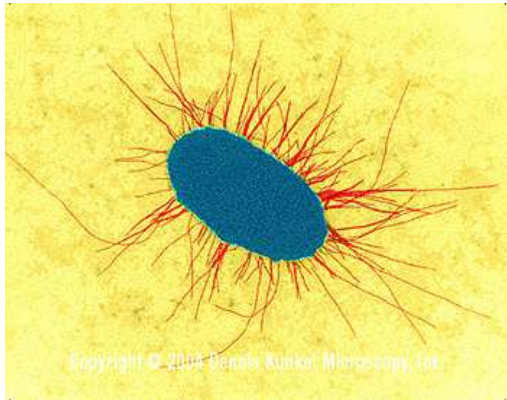
**Webmaster: Sandra Placzek**  
s.placzek@tu-bs.de

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

Release 2012.2 (July 2012)

# Enzymy – stanovení koncentrace

*Escherichia coli*



3 000 bílkovin

*Homo sapiens*



25 000 bílkovin

Koncentrace ↔ Katalytická aktivita



Substrát ↔ Produkt

# Stanovení aktivity enzymů

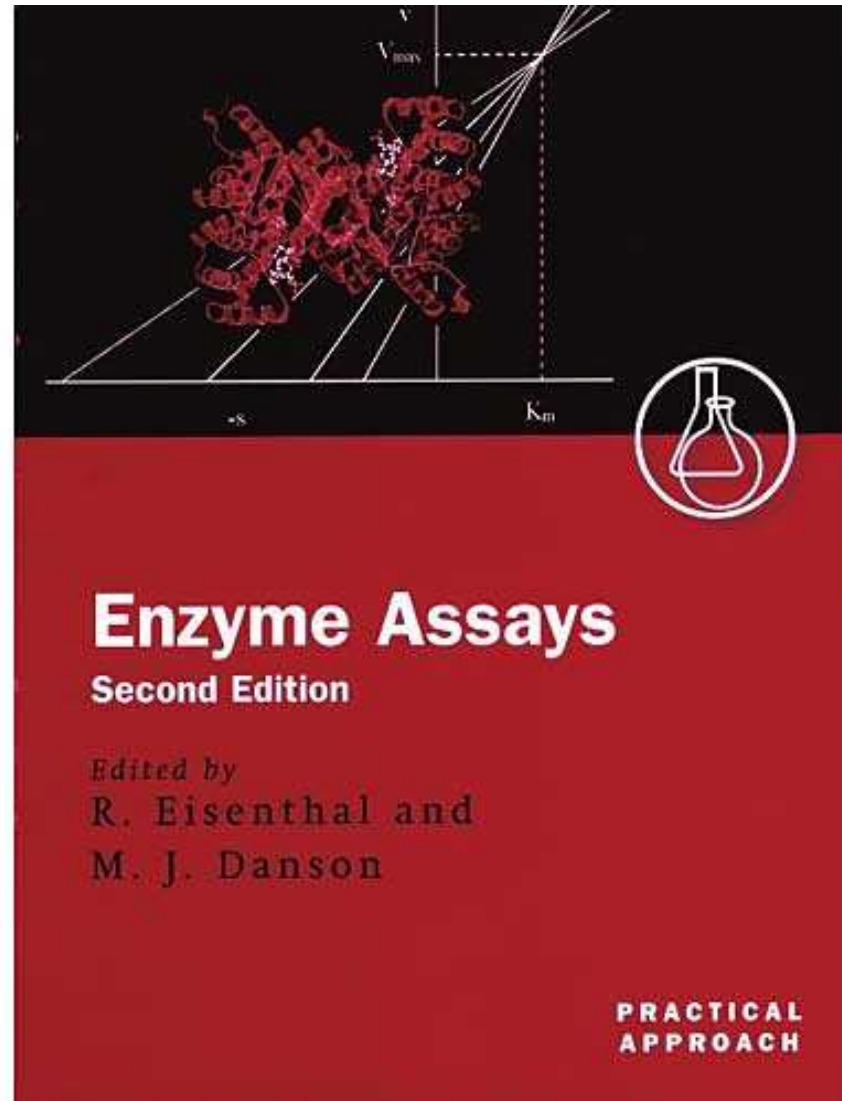
- *Biochemie*
- *Molekulární biologie*
  
- *Klinická diagnostika*
- *Farmakologie – vývoj léčiv*
- *Biotechnologické procesy*
- *Bioanalytická chemie*

# Metody používané pro stanovení aktivity enzymů

- Spektrofotometrické
- Spektrofluorimetrické
- Elektrochemické
- Radiochemické
- Separační – HPLC, GC, CE

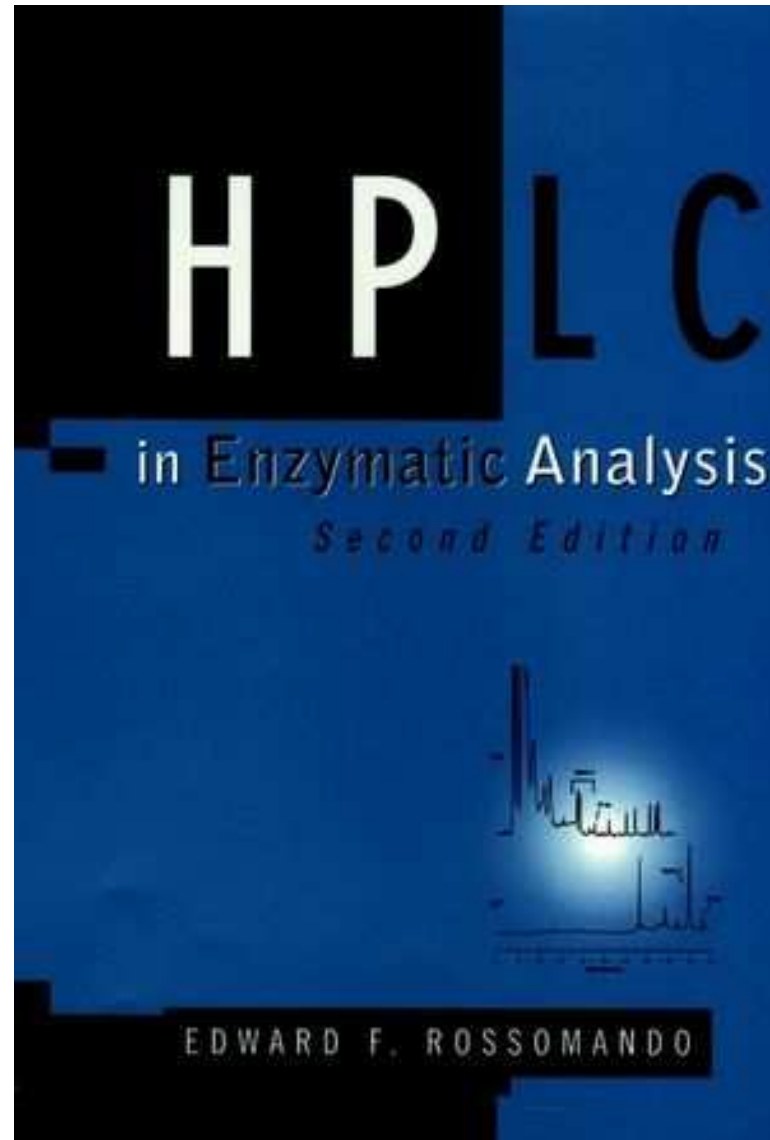
# Enzyme Assays

R. Eisinger 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**

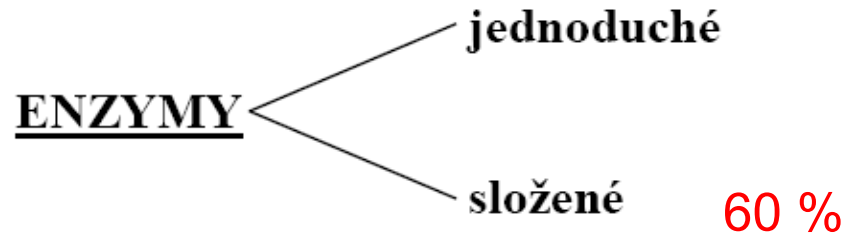
- **kat - katal (IUB 1971)**  
**- počet molů přeměněného substrátu za sekundu**  
mikrokatal ( $\mu\text{kat}$ ) =  $10^{-6}$  kat  
nanokatal ( $\text{nkat}$ ) =  $10^{-9}$  kat  
pikokatal ( $\text{pkat}$ ) =  $10^{-12}$  kat

$$1 \text{ IU} = 1 \mu\text{mol}/\text{min} = 1/60 \mu\text{mol}/\text{s} = 1/60 \mu\text{kat} = 16,67 \text{ nkat}$$

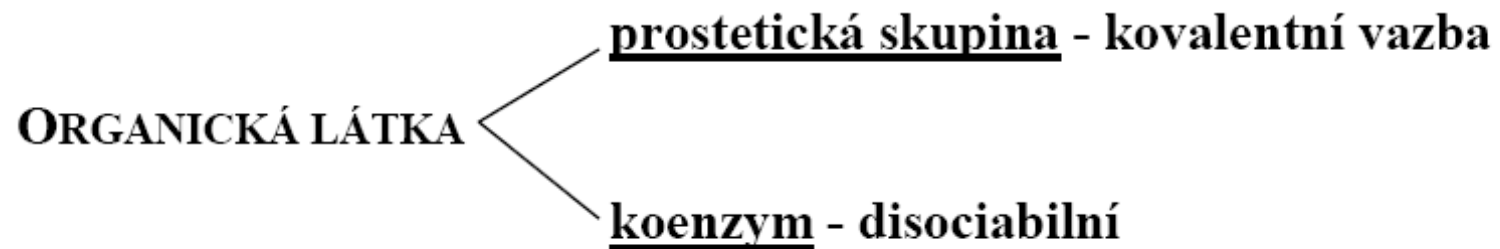
Specifická aktivita - aktivita vztažená na mg bílkoviny

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

## STRUKTURA ENZYMŮ



**KOFAKTOR + APOENZYM → HOLOENZYM**





## Kofaktor - kovový ion nebo organická látka

### METALOENZYMY

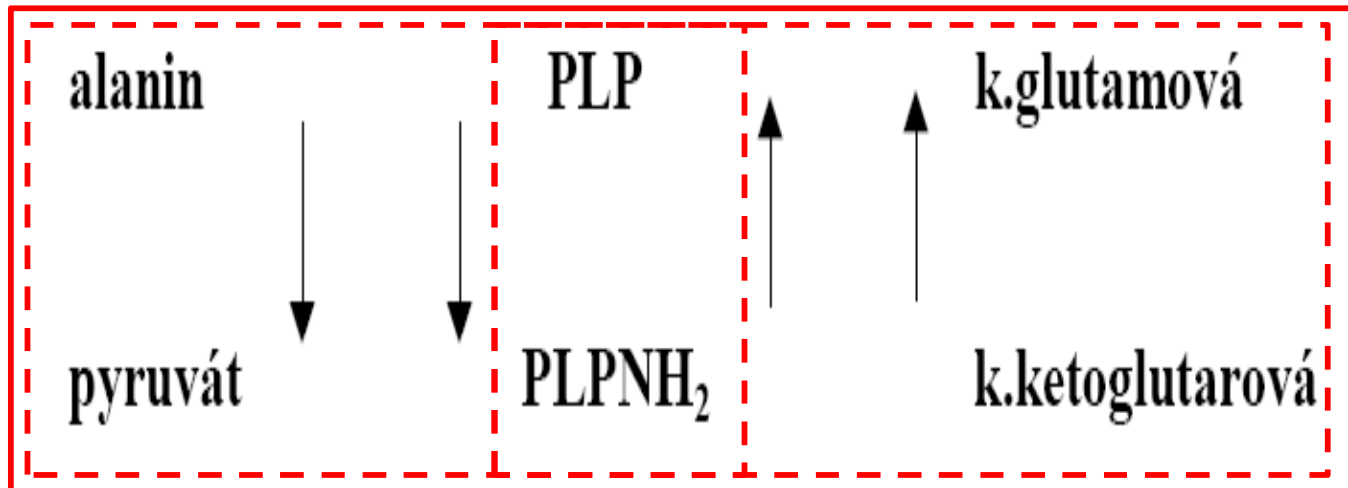
kovový ion	enzym
$\text{Zn}^{2+}$	alkoholdehydrogenasa alkalická fosfatasa karbonátanhydrasa
$\text{Mg}^{2+}$	fosfohydrolasy fosfotransferasy
$\text{Mn}^{2+}$	arginasa
$\text{Fe}^{2+}, \text{Fe}^{3+}$	cytochromy peroxidasa katalasa
$\text{Cu}^{2+}, \text{Cu}^{+}$	tyrosinasa diaminoxidasa

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

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

## 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 :

ADH



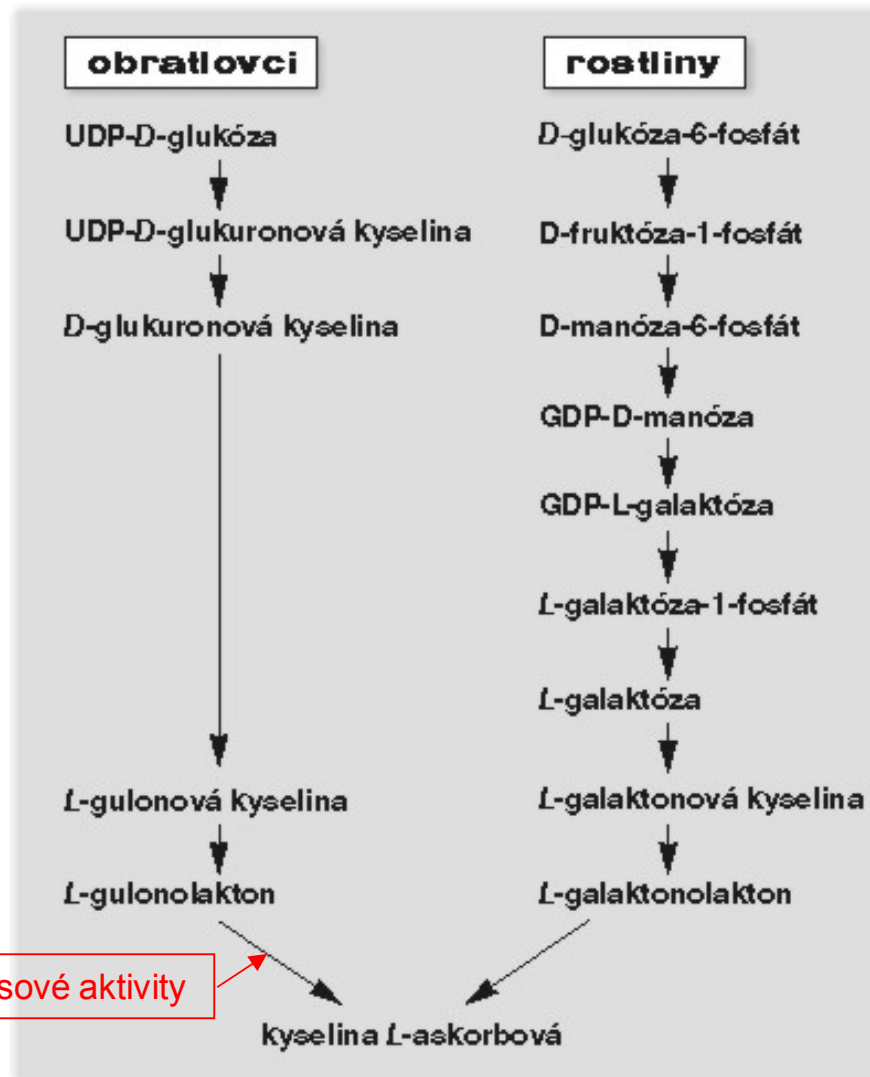
Dýchací řetězec

## KOFAKTORY A VITAMINY

**VITAMIN - FUNK - "amin potřebný pro život"**

Vitamin	Kofaktor	Funkce
<u>rozpuštěné ve vodě</u>		<u>přenos (reakce)</u>
<u>thiamin - B<sub>1</sub></u>	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

# Vitamín C

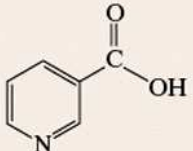
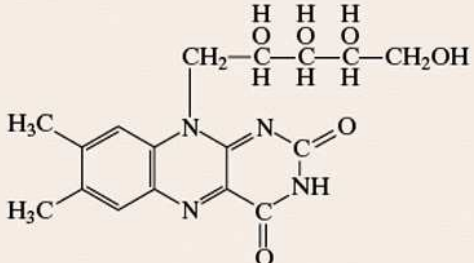
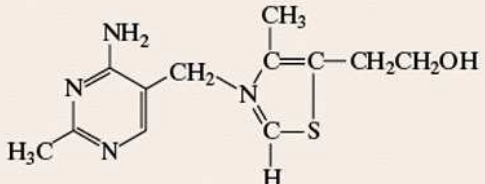
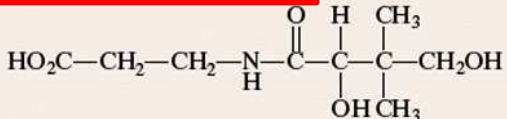


absence L-gulonolaktonoxidase activity

# Vitamíny rozpustné ve vodě

Table 6.1

Characteristics of vitamins and coenzymes

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

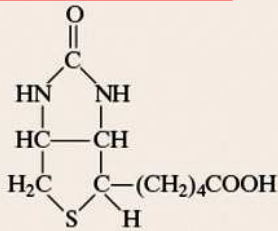
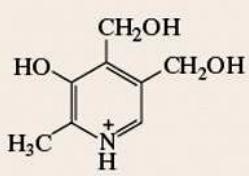
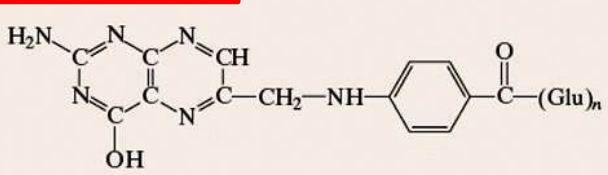
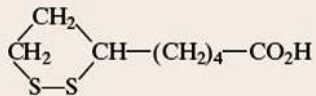
Biotin	Biotinylated enzymes	CO <sub>2</sub> activation and transfer (pp. 465-466)	Dermatitis (humans)
			
Pyridoxine (vitamin B <sub>6</sub> )	Pyridoxal phosphate	Amino group transfer (pp. 605-606)	Dermatitis (rats): neurological symptoms
			
Folic acid	Tetrahydrofolate	Transfer of one carbon unit (pp. 600-601)	Anemias
			
Lipoic acid (may not be a vitamin)	Attached to ε-NH <sub>2</sub> group of Lvs in protein	Acyl group activation and transfer (pp. 485-493)	Growth deficiencies
			

Table 6.1 (continued)

Characteristics of vitamins and coenzymes

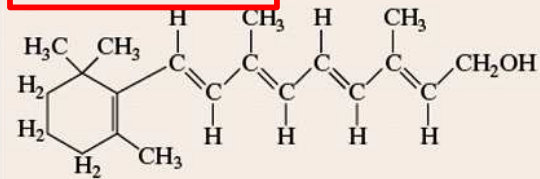
Name/Structure of Vitamin	Related Coenzyme	Reaction type (page numbers <sup>d</sup> )	Deficiency Disease
<b>Water-Soluble Vitamins (continued)</b>			
<p><b>Cobalamin (vitamin B<sub>12</sub>)</b></p>	5'-Deoxyadenosylcobalamin	<p><b>Methyl group transfer</b> (pp. 570-571)</p>	Pernicious anemia
<p><b>L-Absorbic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



# Vitamíny rozpustné v tucích

## Fat-Soluble Vitamins

### *trans*-Retinol (vitamin A)



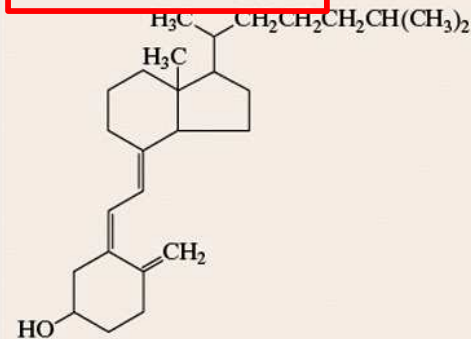
Associated with visual pigment

(pp. 123-125, 252)

Night blindness, other effects

procesy vidění

### Cholecalciferol (vitamin D<sub>3</sub>)



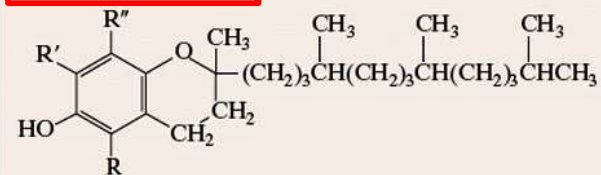
None

(pp. 252, 582-584)

Rickets

metabolismus Ca a P  
křivice

### Tocopherol (vitamin E)



(several variants, with R, R', R''=H or CH<sub>3</sub>)

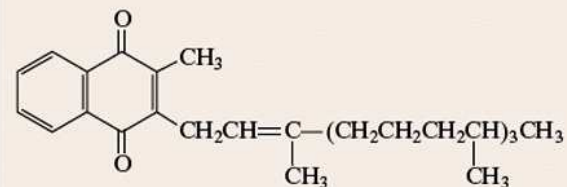
None

(p.252)

Reproductive and other problems in rats; uncertain in humans

antioxidant

### Phylloquinone (vitamin K<sub>1</sub>)



None

(pp. 252, 539-544)

Problems in blood clotting

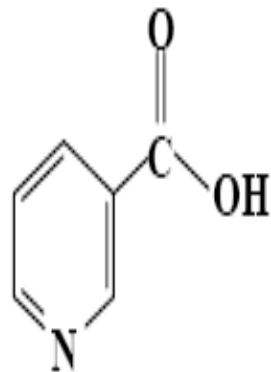
procesy srážení krve

<sup>a</sup> Page numbers listed here refer to page numbers in this book.

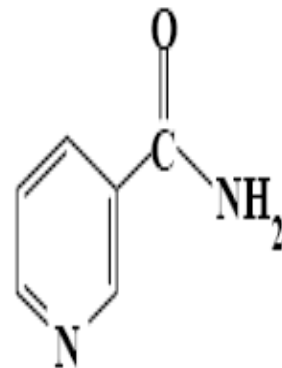
# NIKOTINAMIDOVÉ KOENZYMY

1906

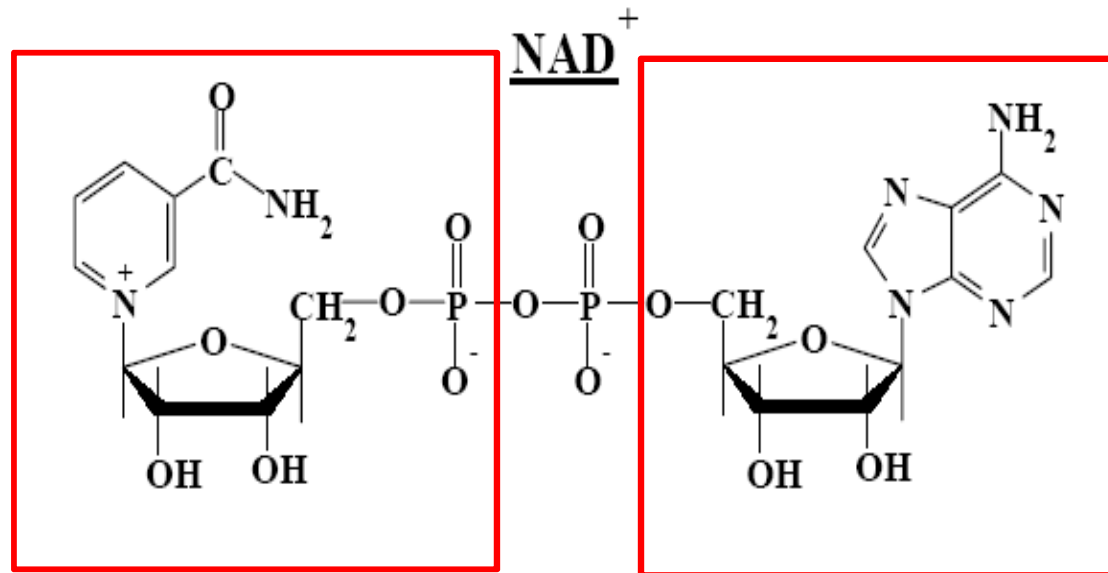
k. nikotinová



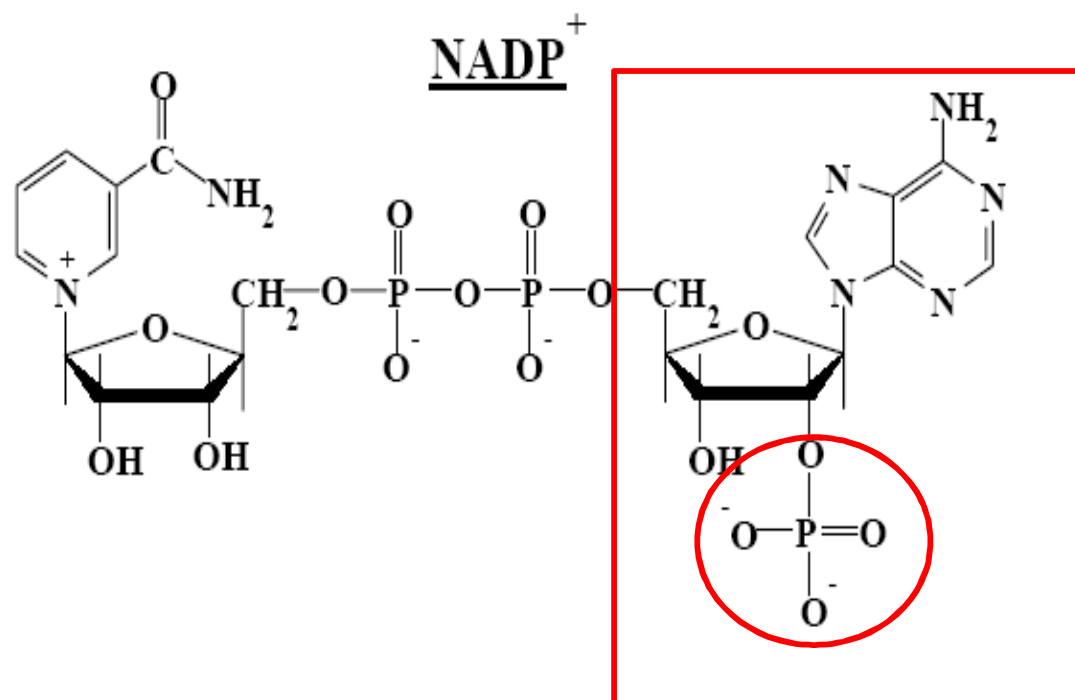
nikotinamid



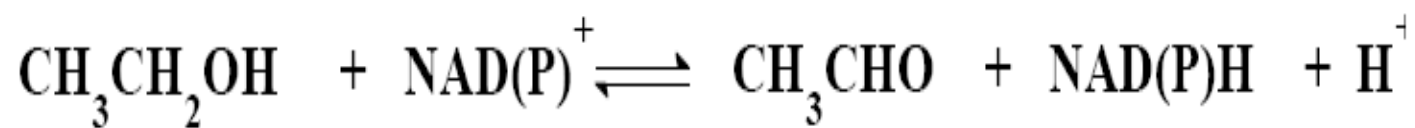
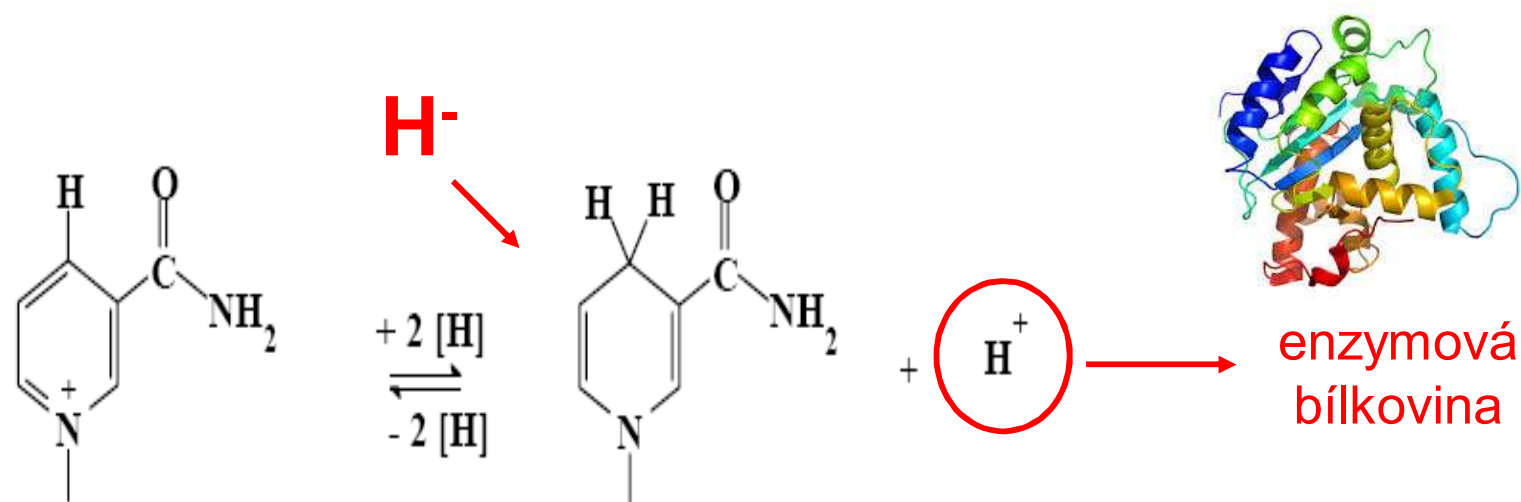
Katalytická  
část



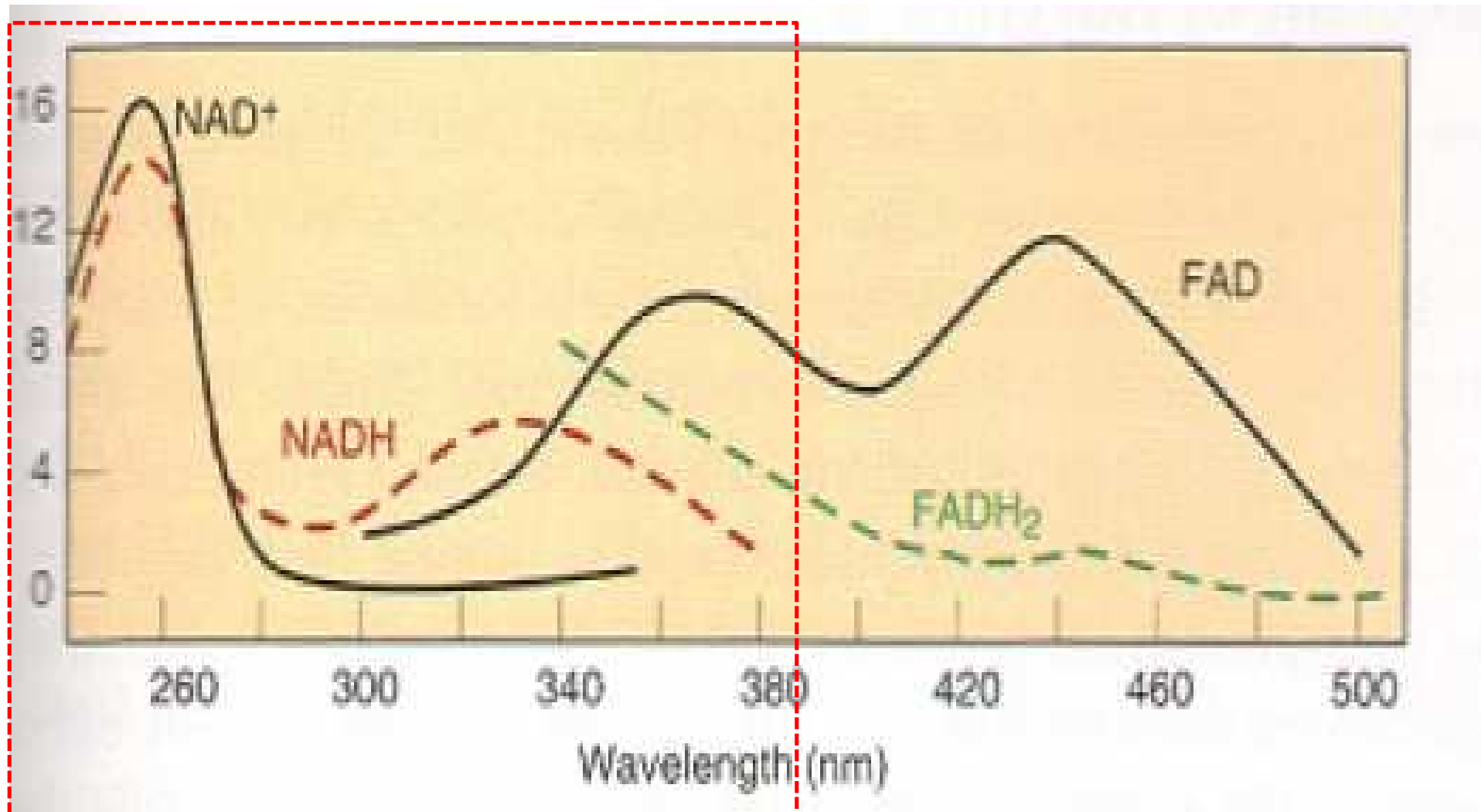
Vazebná  
část



Vazebná  
část

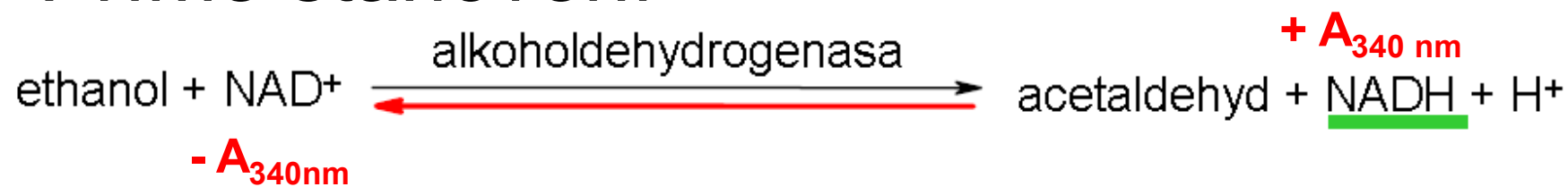


# Warburgův optický test

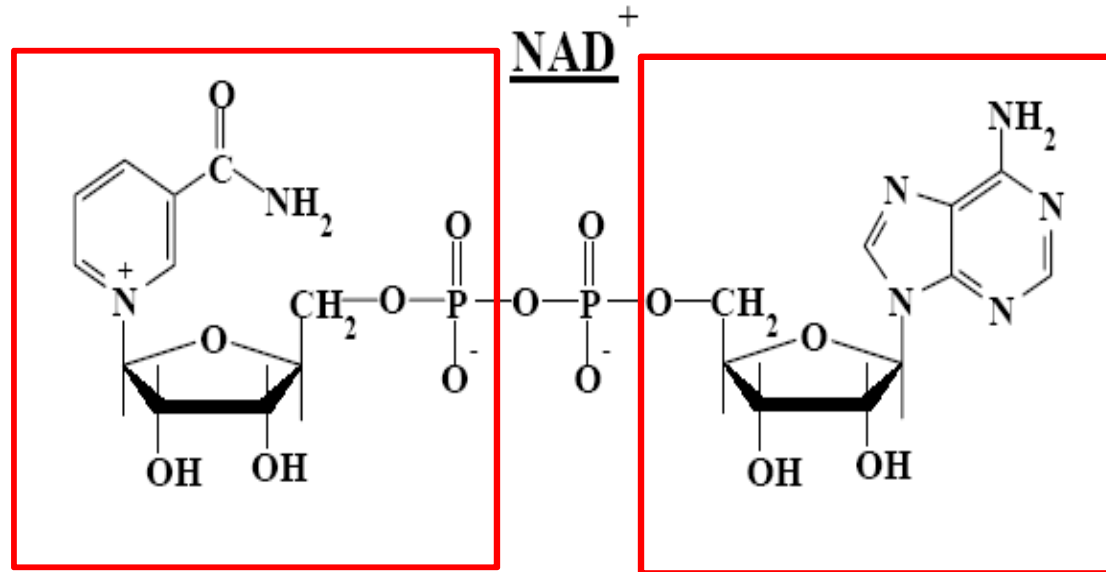


**Δ 340 nm**

- Přímé stanovení

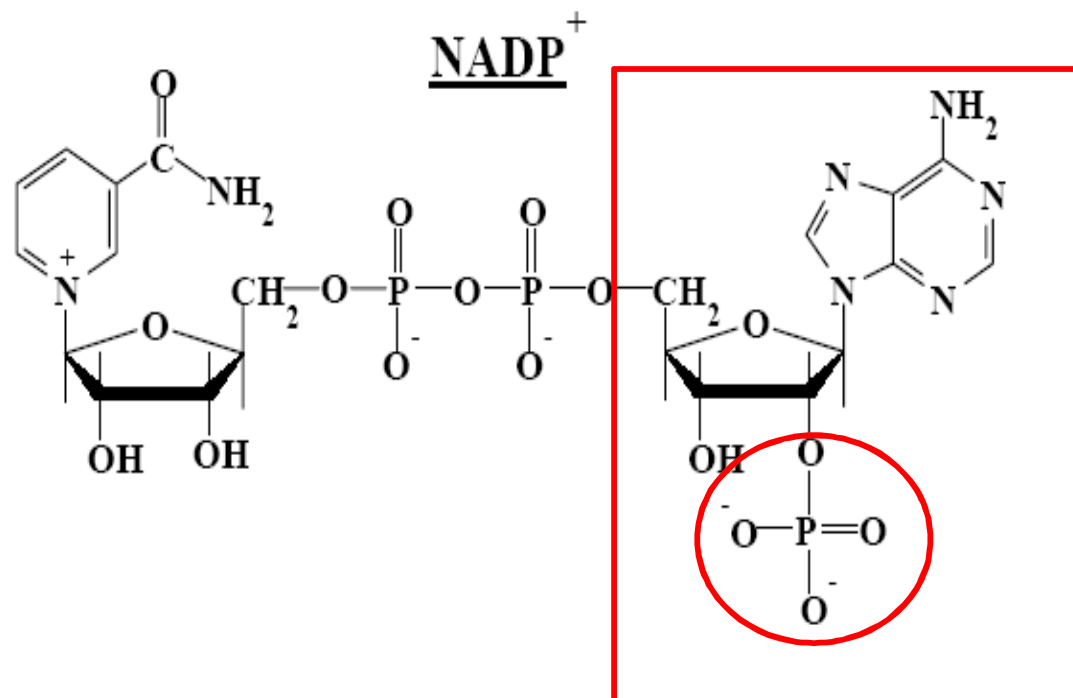


Katalytická  
část



Energetická role

Vazebná  
část

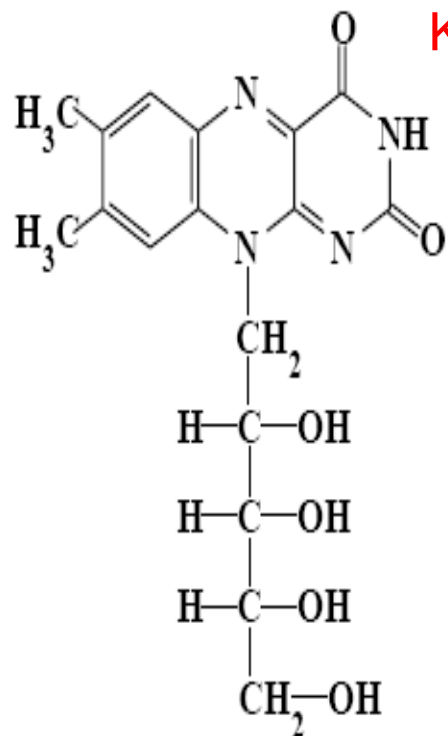


Biosyntetická role

Vazebná  
část

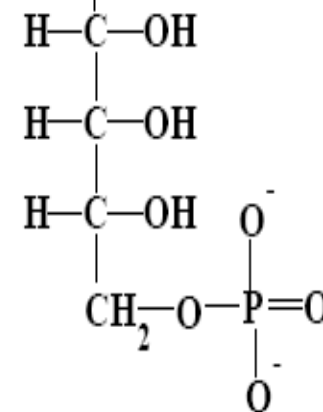
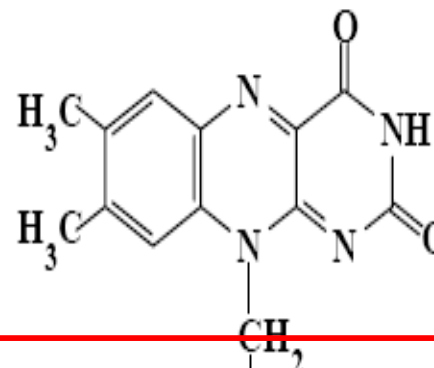
# FLAVINOVÉ KOENZYMY

riboflavin



Katalytická  
část

FMN

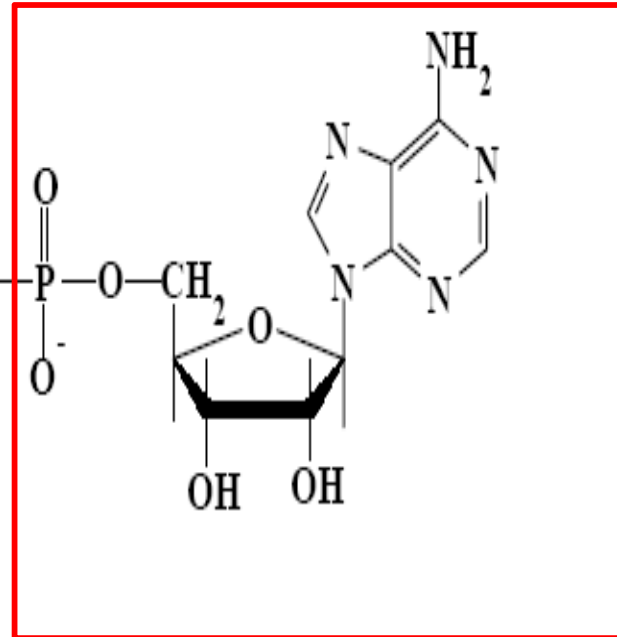
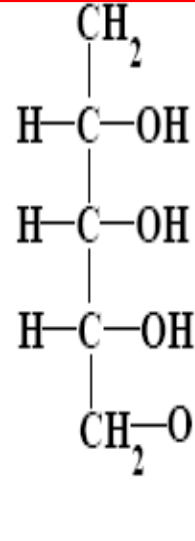
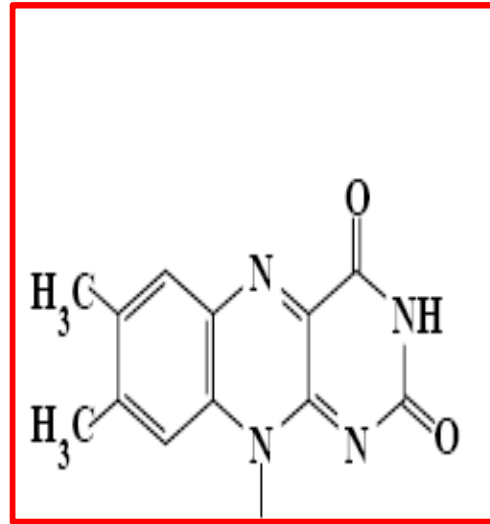


Vazebná  
část



FAD

Katalytická  
část

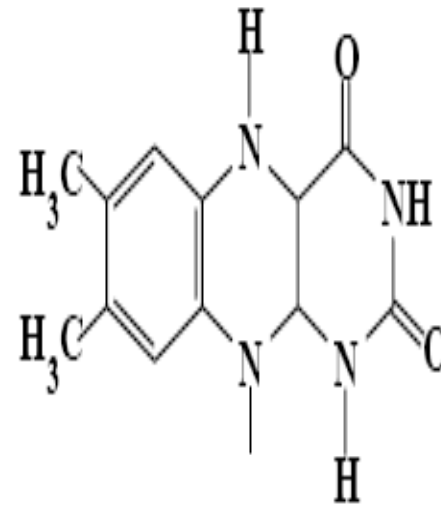
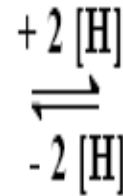
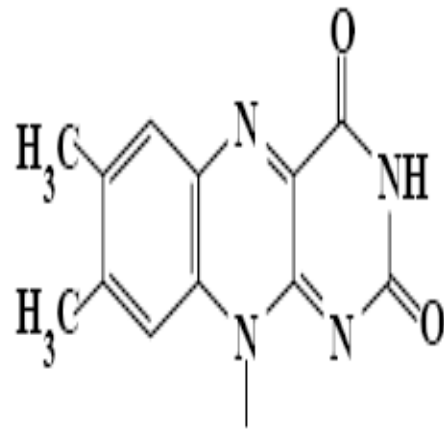


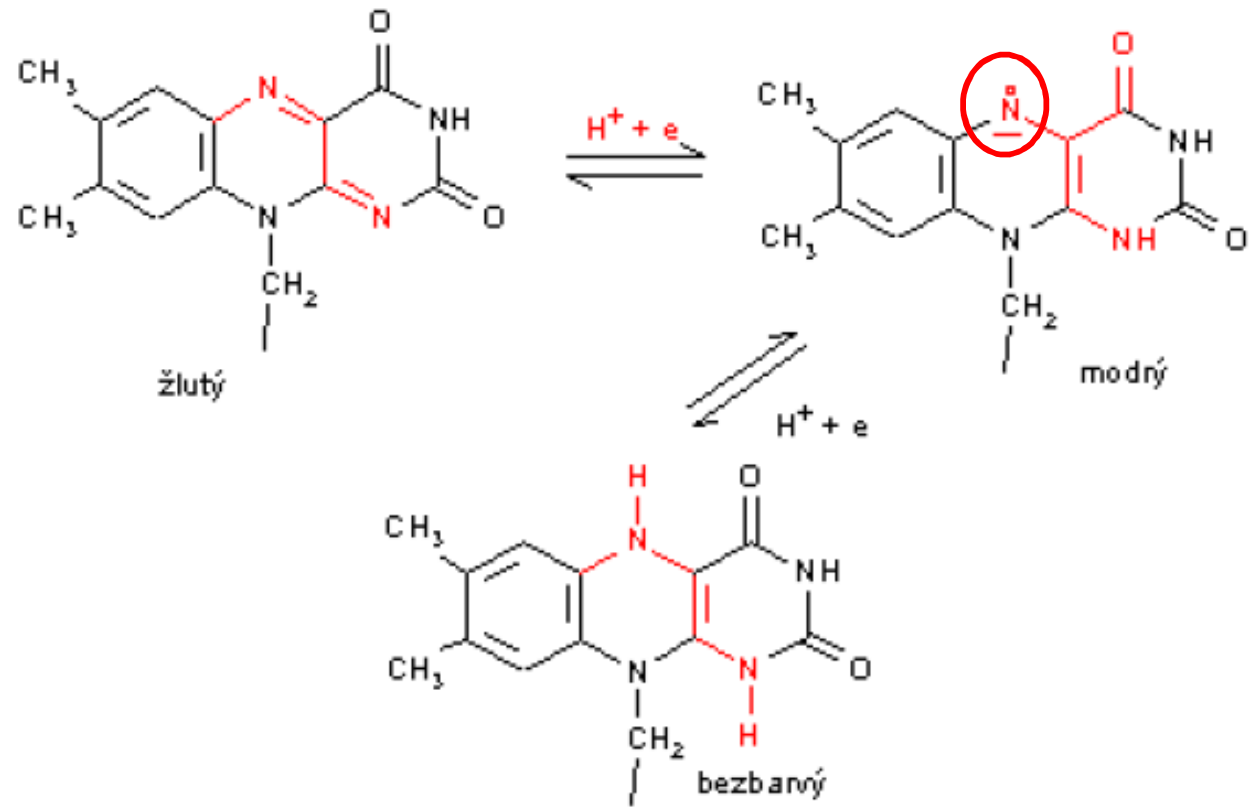
Vazebná  
část

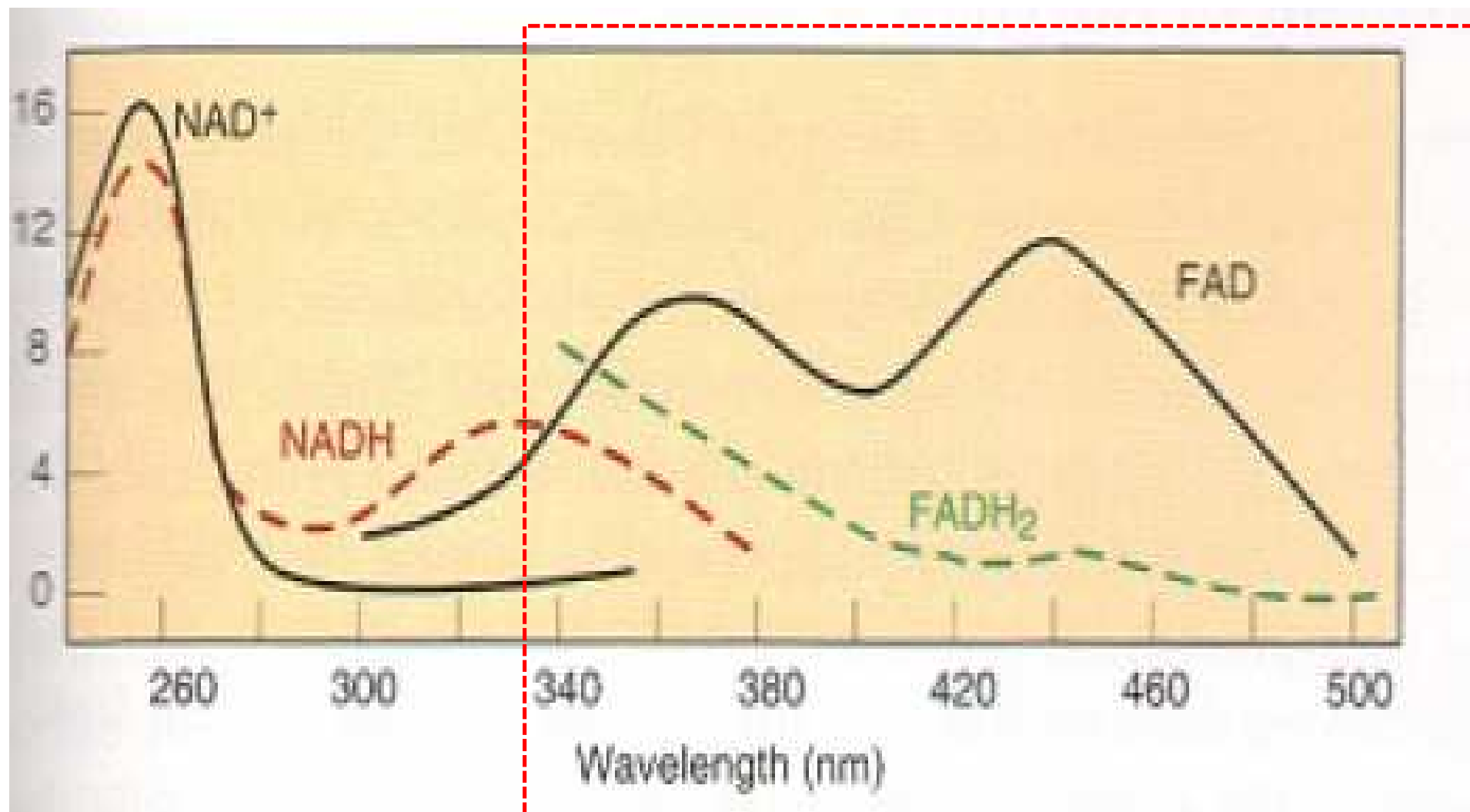
FAD (FMN)



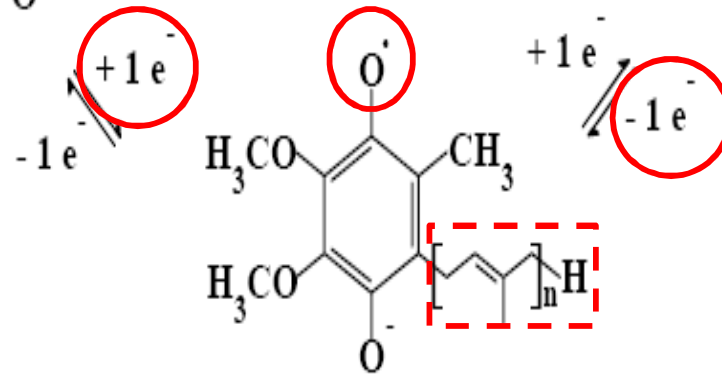
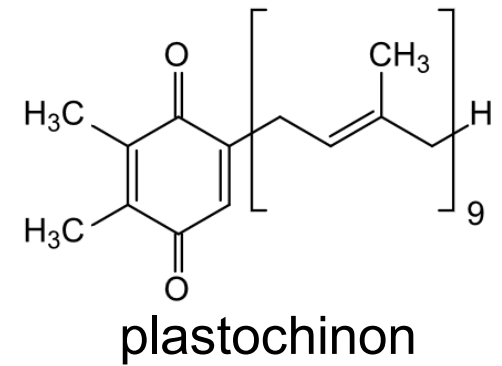
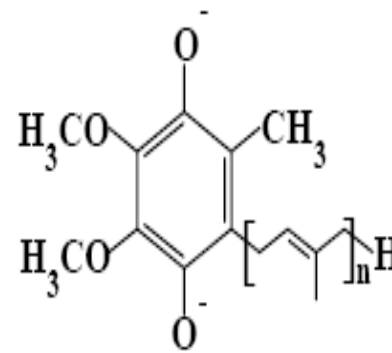
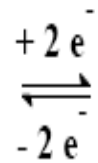
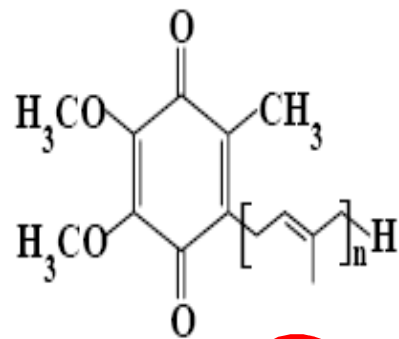
FADH<sub>2</sub> (FMNH<sub>2</sub>)







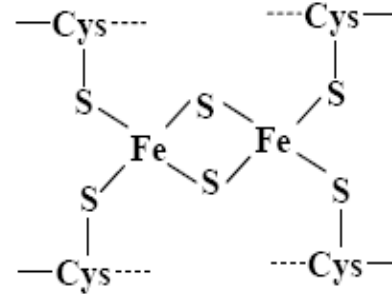
ubichinon



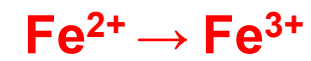
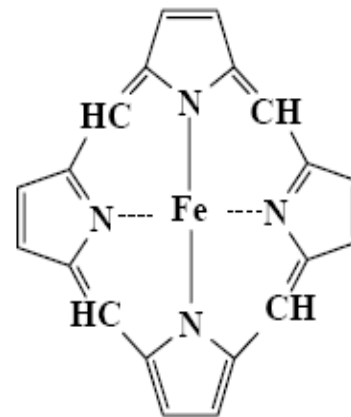
Q6

Q10

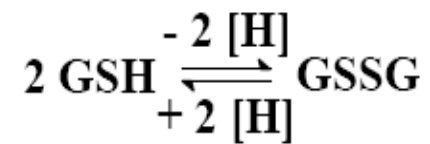
### ferredoxin



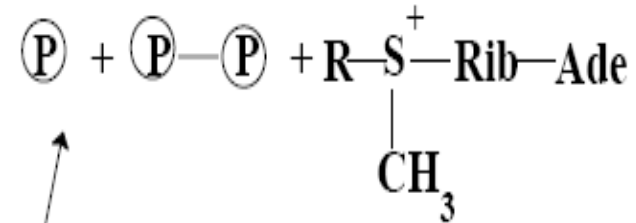
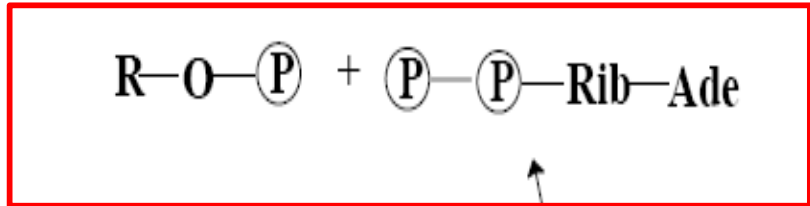
### hem



### glutathion

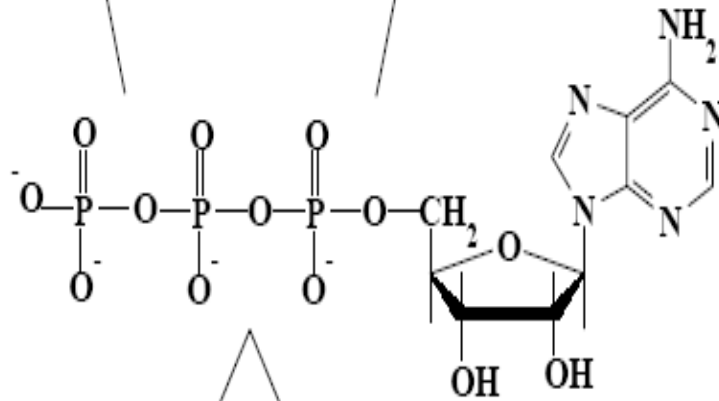


ATP



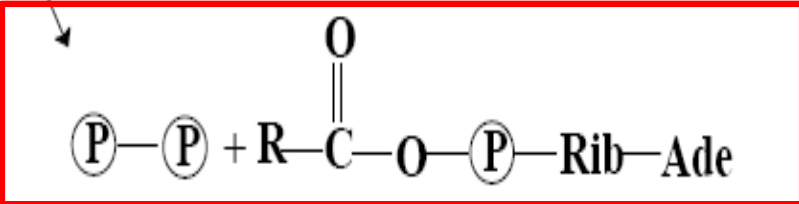
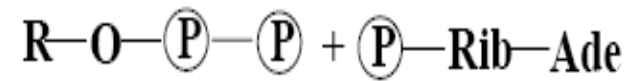
R-OH

R-S-CH<sub>3</sub>

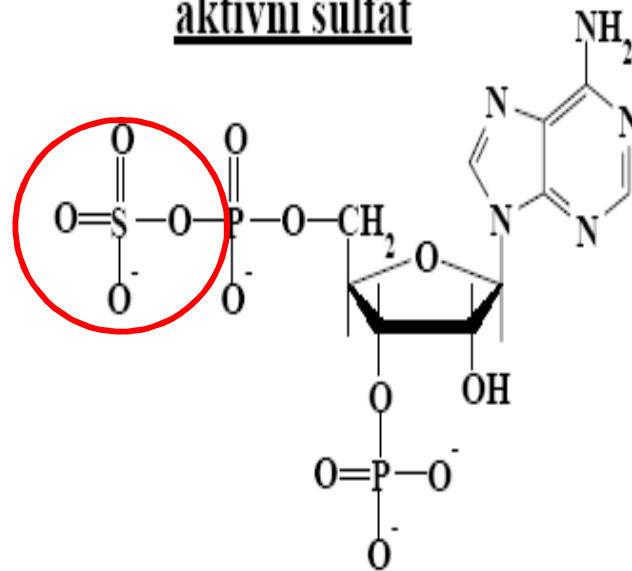


R-OH

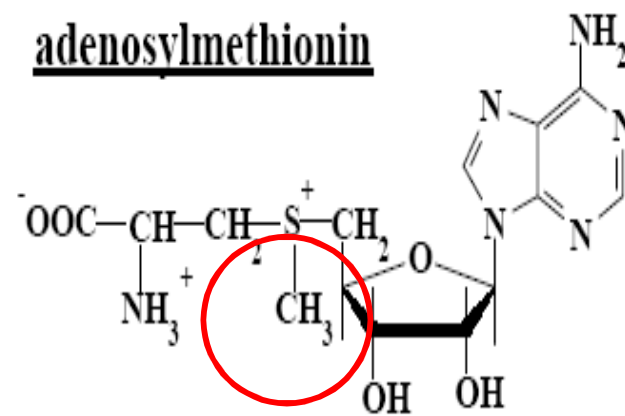
R-COOH



aktivní sulfát

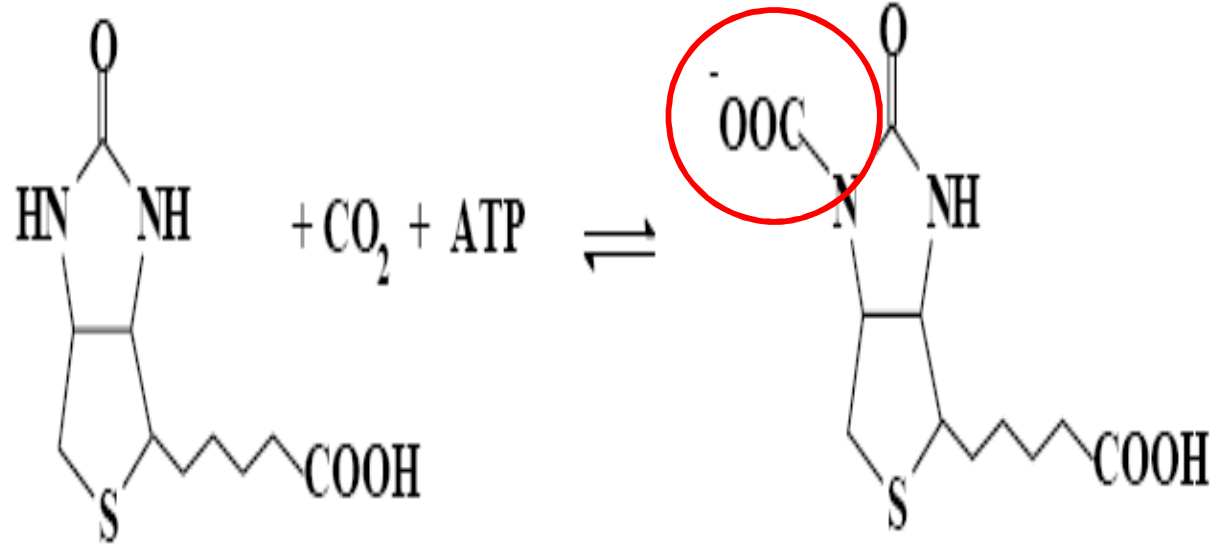


adenosylmethionin

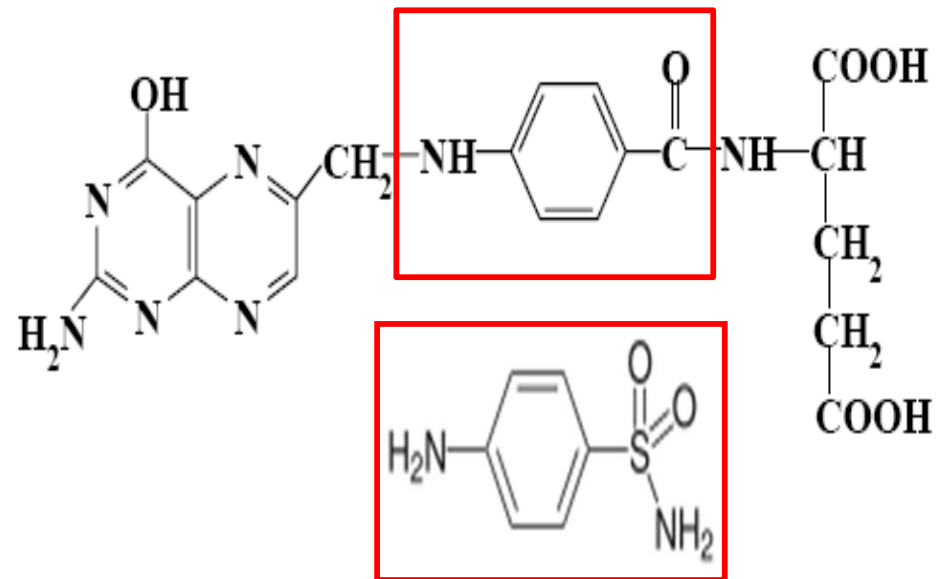




biotin

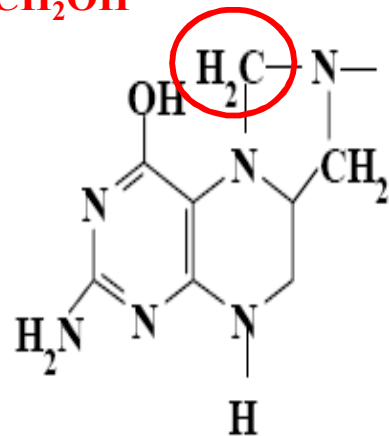


## tetrahydrolistová k.



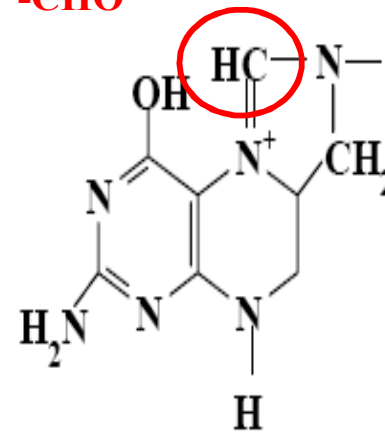
## methylenetetrahydrolistová k.

-CH<sub>2</sub>OH

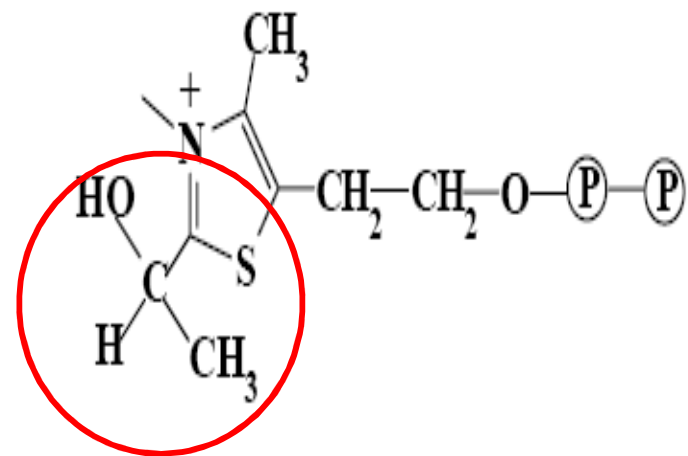
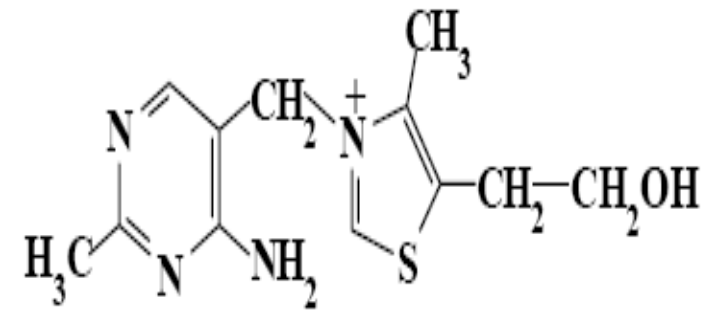


## methenyltetrahydrolistová k.

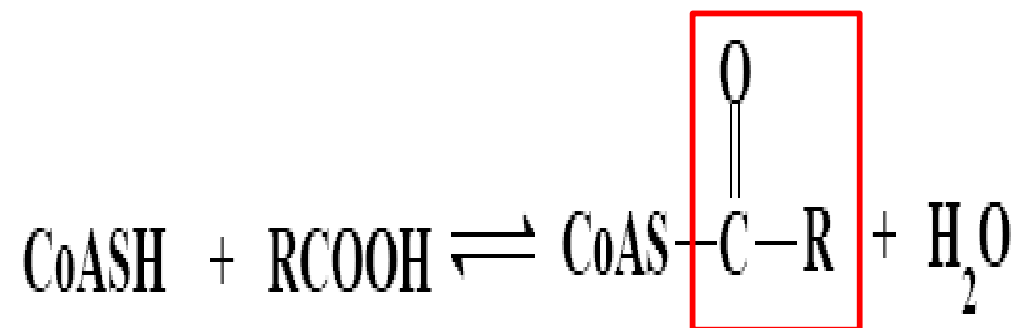
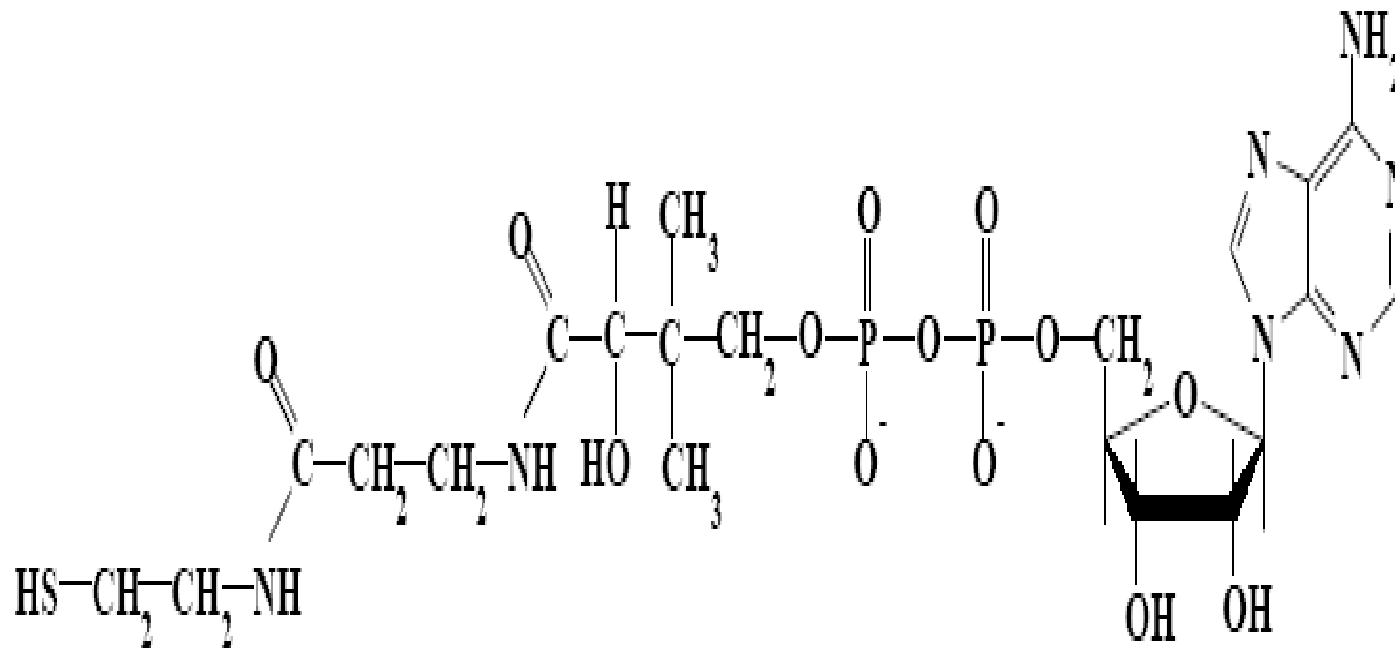
-CHO



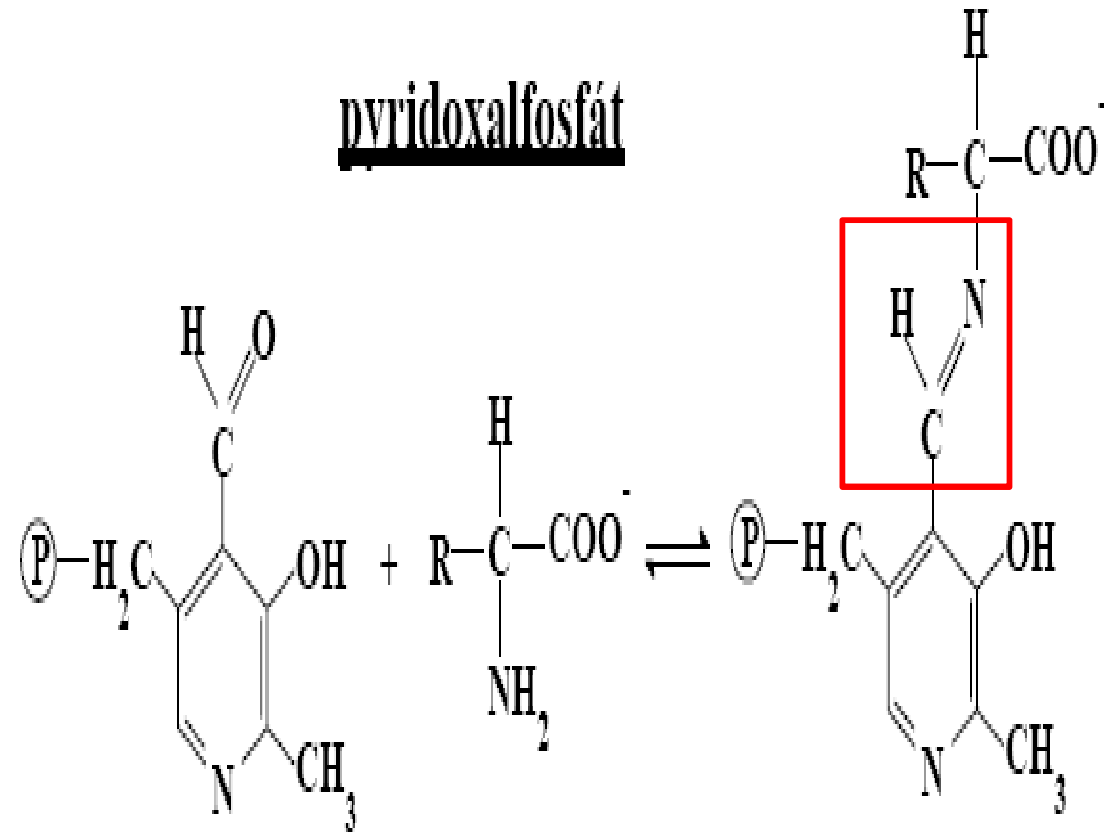
# thiamin



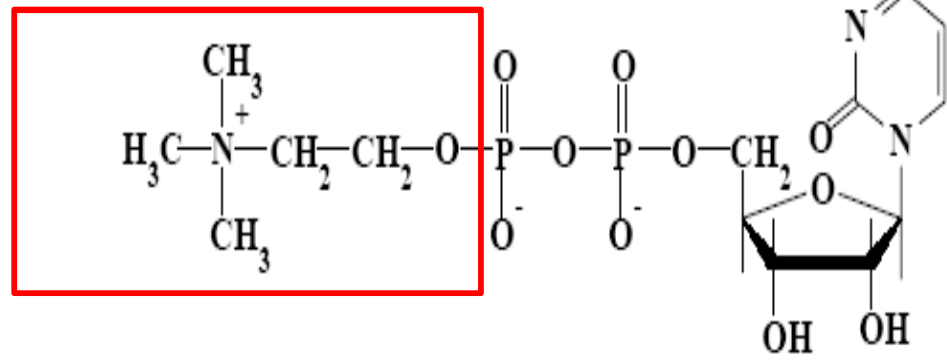
## koenzym A - CoA - CoASH



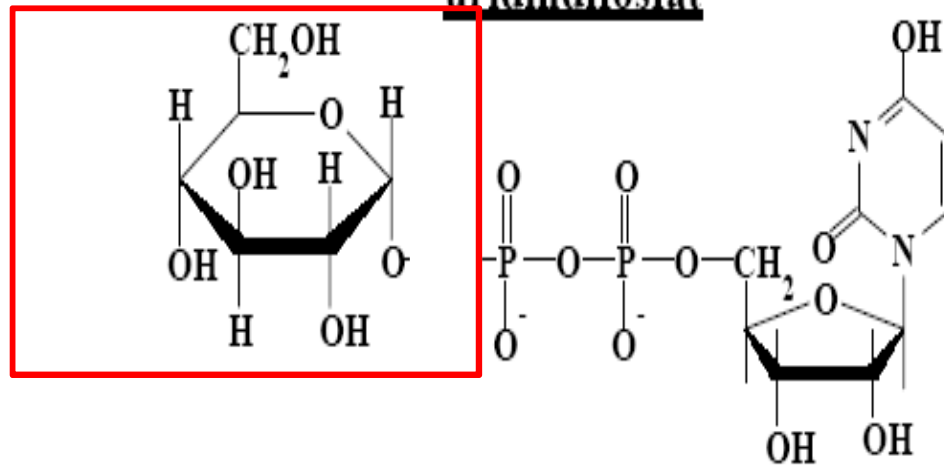
pyridoxalfosfát



cytidindifosfát



uridindifosfát



**Lyasy a ligasy - bez kofaktoru nebo již popsáným kofaktorem TPP**

**Hydrolasy - bez kofaktoru**

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

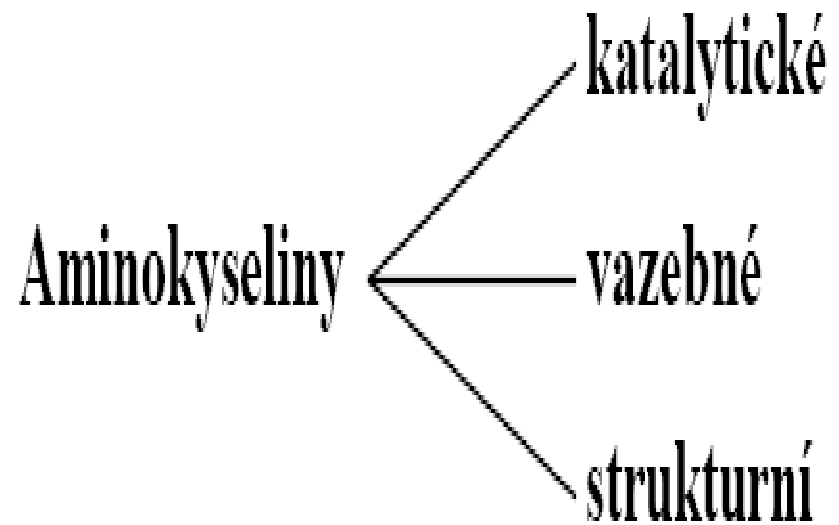
## Enzymové bílkoviny

- monomerní
- oligomerní
- multienzymové komplexy

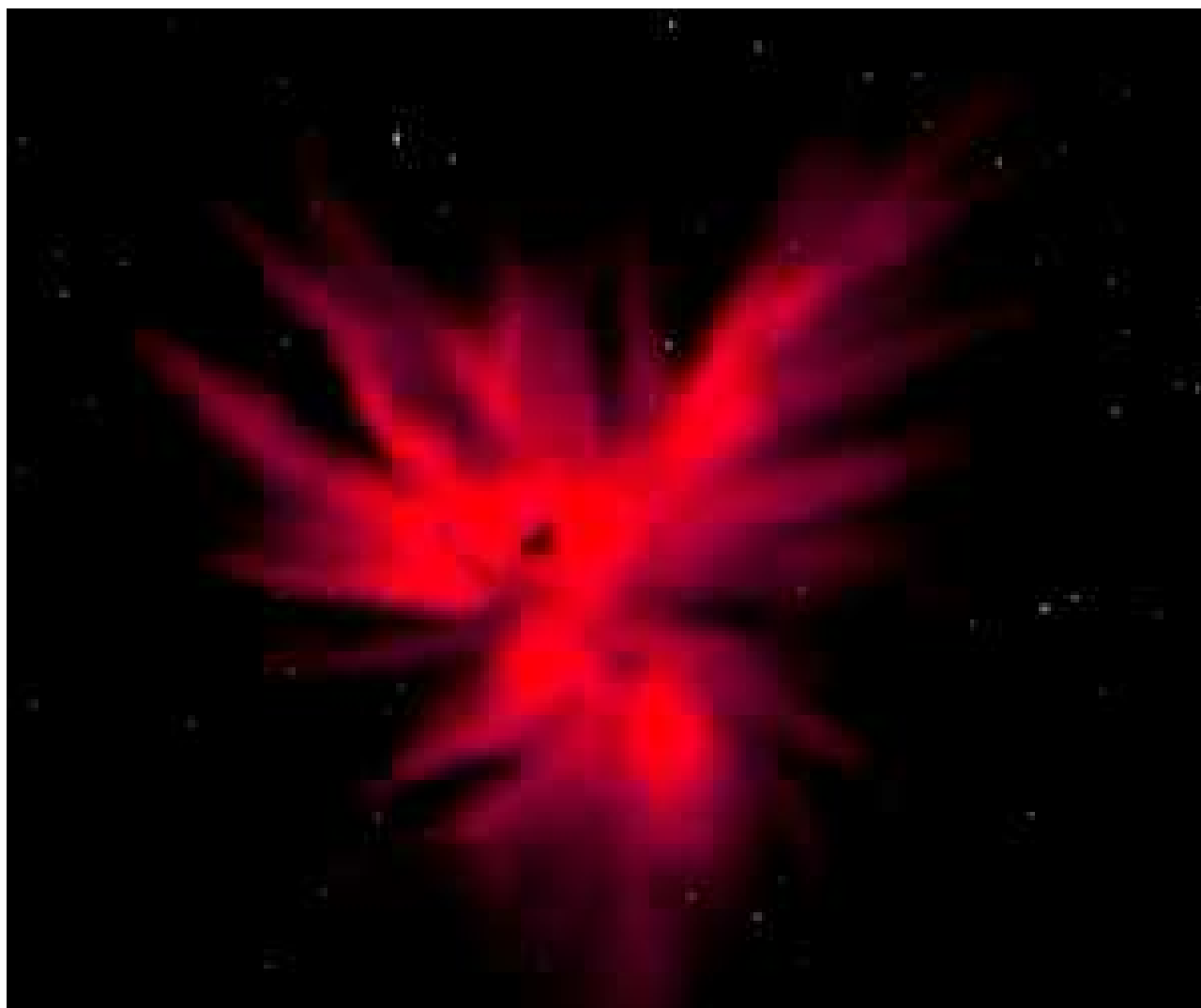
Izoenzymy



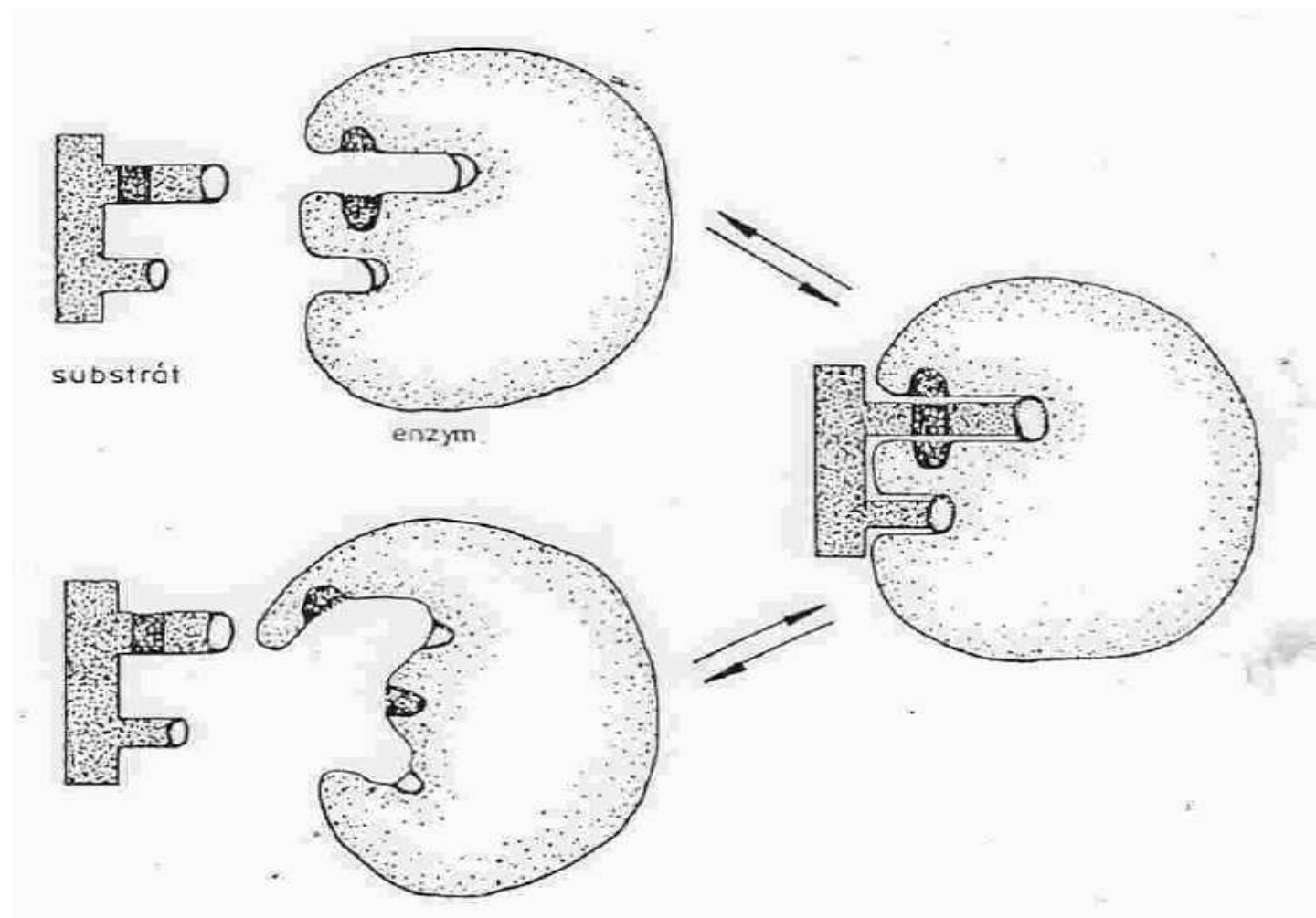
## Aktivní místo enzymů



Katalytická triáda

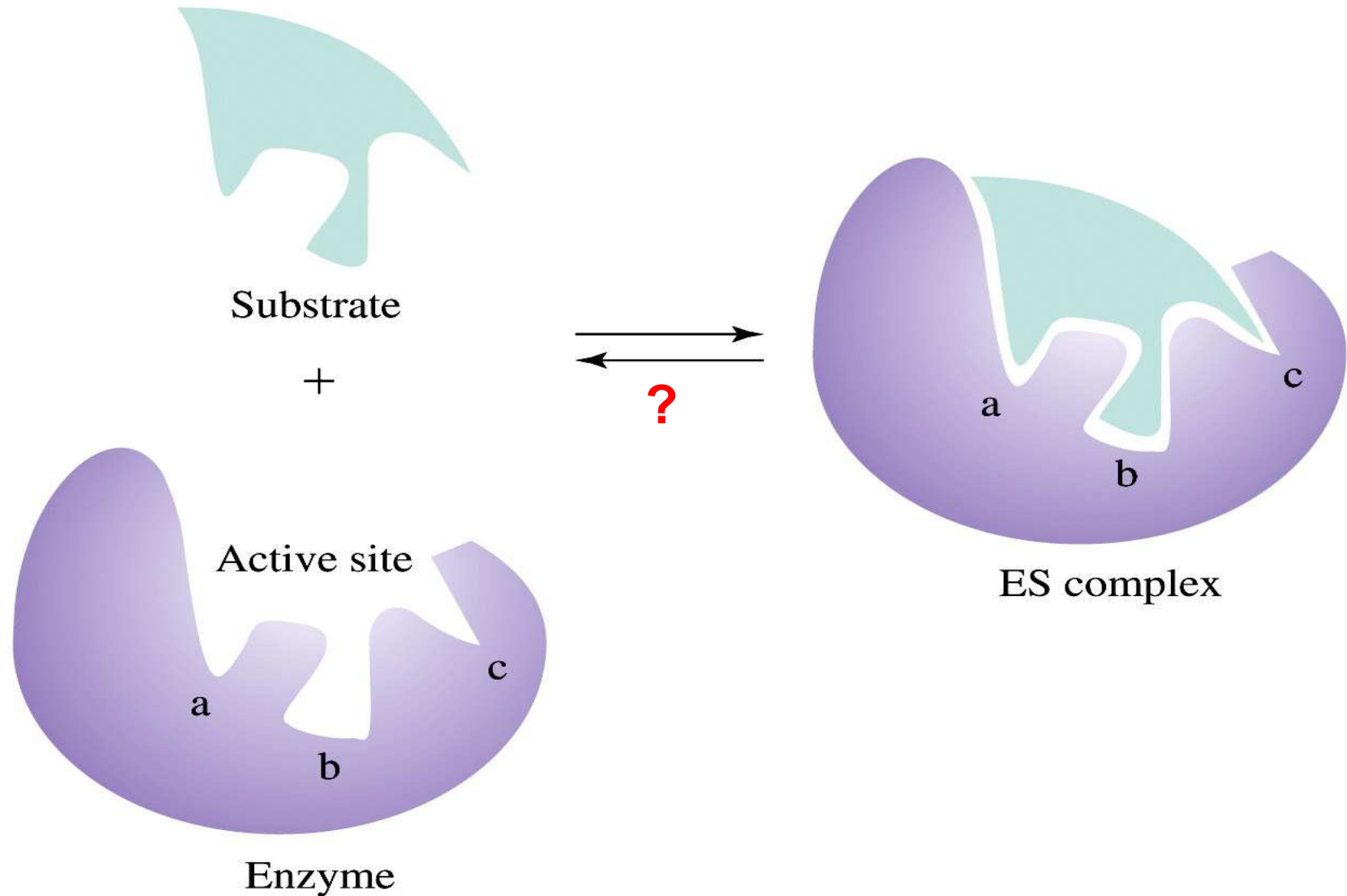


**Fischer - 1894 - *teorie o zámku a klíči***



**Koshland - 1959 - *teorie indukovaného přizpůsobení***

# „Lock and key“ model



# „Induced fit“ model

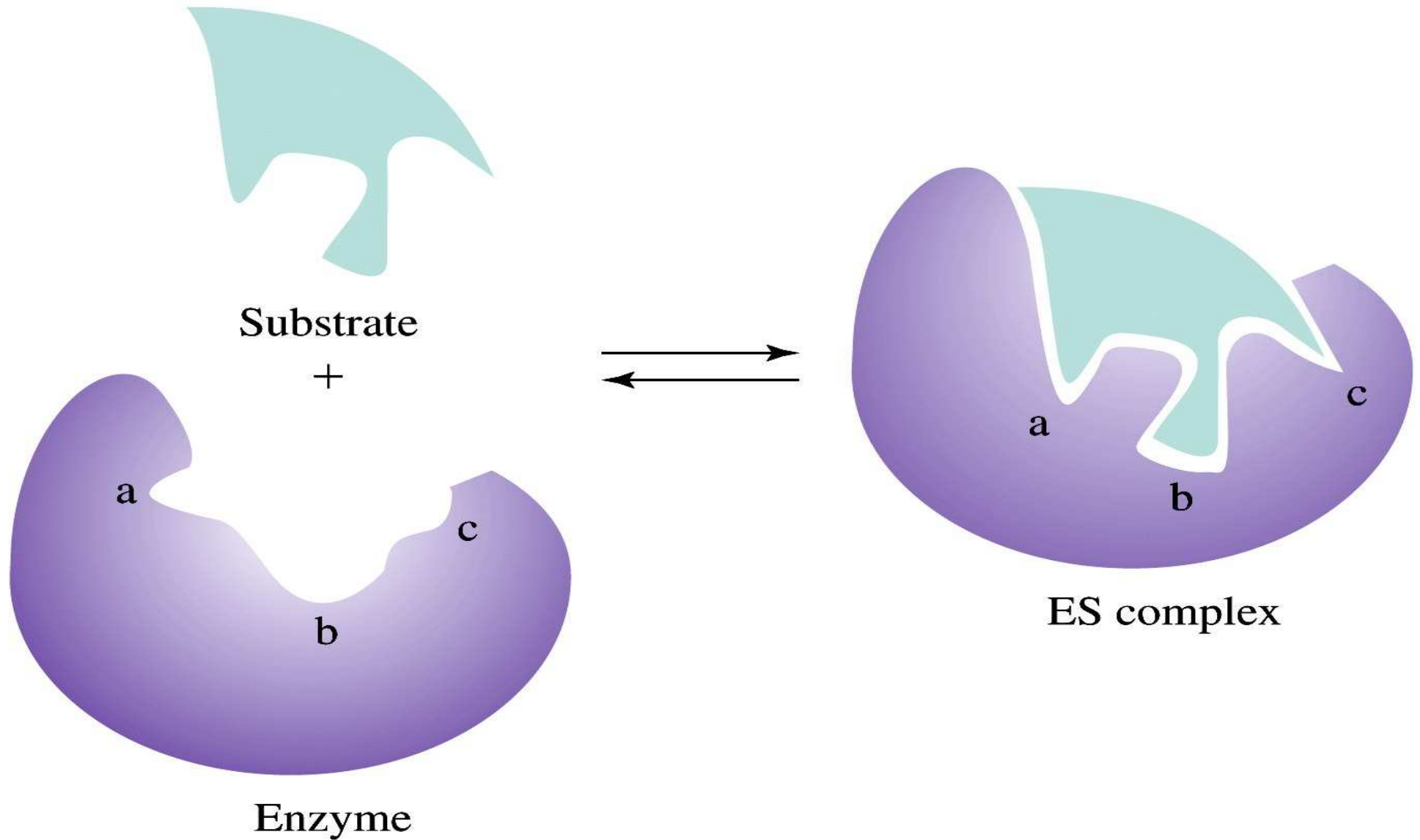


Figure 5-10 Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons

# „Transition state“ model

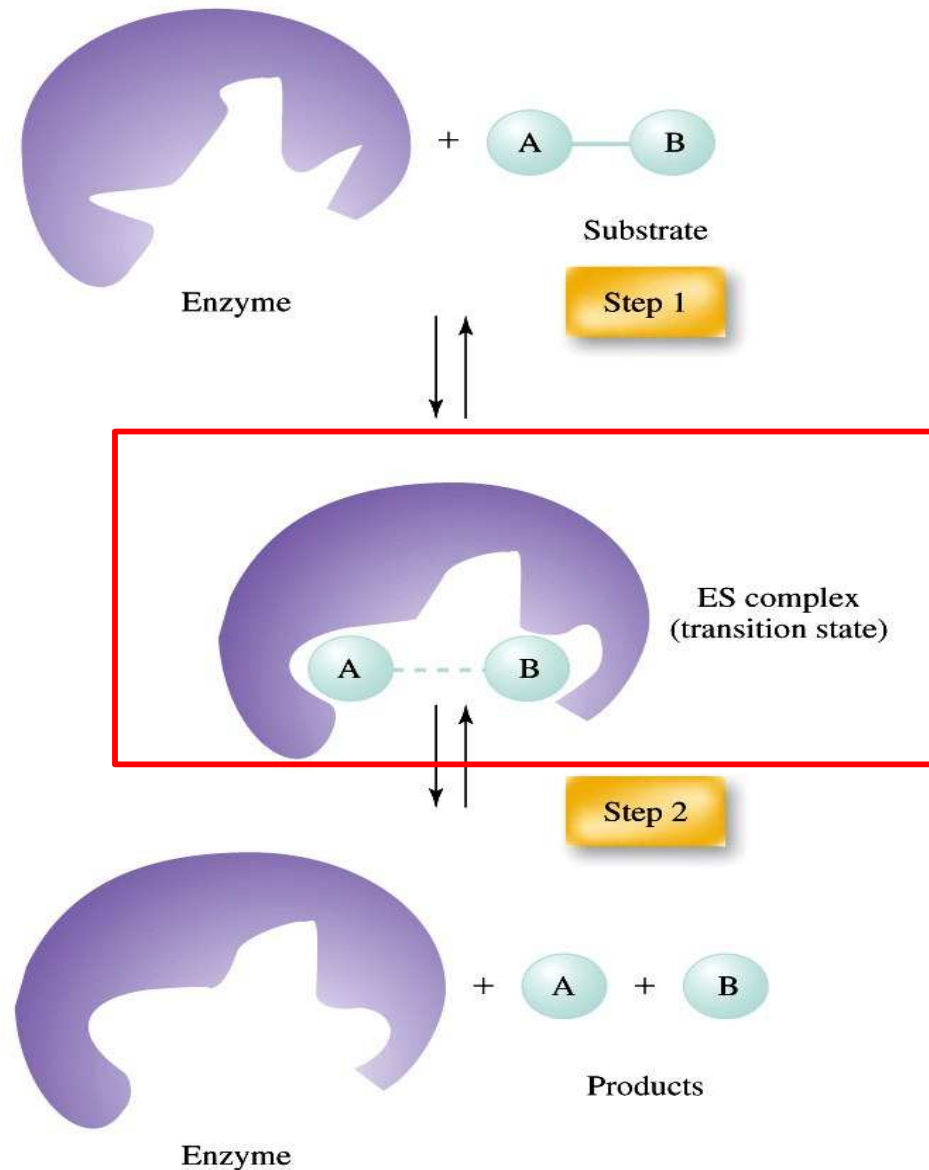


Figure 5-11 Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons

# Aktivní místo


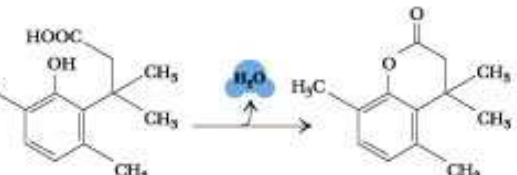
- Efekt přiblížení – překryv orbitalů
- Specifické mikroprostředí – pH, I, hydrofobita atd
- Dehydratace
- Koncentrační efekt -  $10^5$
- Vhodná orientace

# Proximitní a orientační

## INTRAMOLEKULÁRNÍ REAKCE



## INTERMOLEKULÁRNÍ REAKCE

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





# Aktivační energie



Uvolněna při vazbě substrátu na enzym

# Mechanismus katalýzy

- Acidobazická – Asp, Glu, His, Lys, Arg, Cys, Ser, Tyr

Aminokyselina	Kyselá forma (donor protonů)		Zásaditá forma (akceptor protonů)			
Glu, Asp	R - COOH		R - COO <sup>-</sup>			
L C H S	Skupina	pK	Skupina	pK	Skupina	pK
	<b>α</b> COOH	1.8 - 2.5	<b>β</b> COOH	3.9	<b>γ</b> COOH	4.1
	<b>α</b> NH <sub>2</sub>	9 - 10	<b>ε</b> NH <sub>2</sub>	10.8	guanidin	12.5
	imidazol	6.0	SH	8.3	OH	10.1
Tyr						

# Acidobazická kyselá proteázy

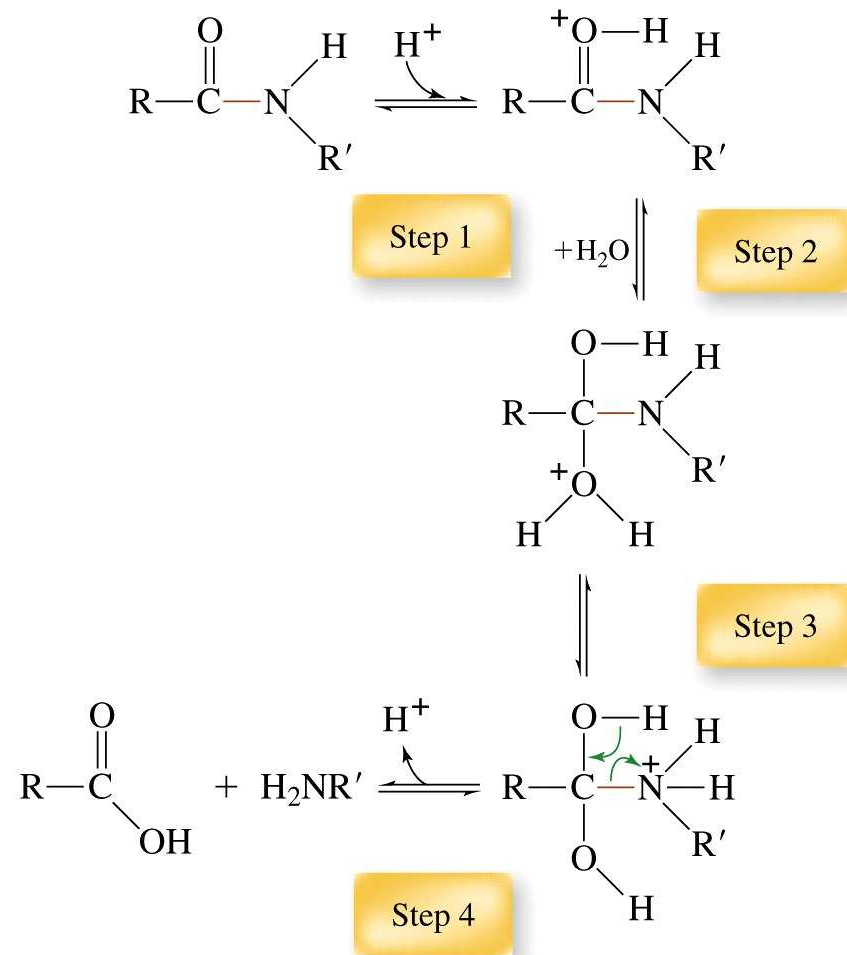
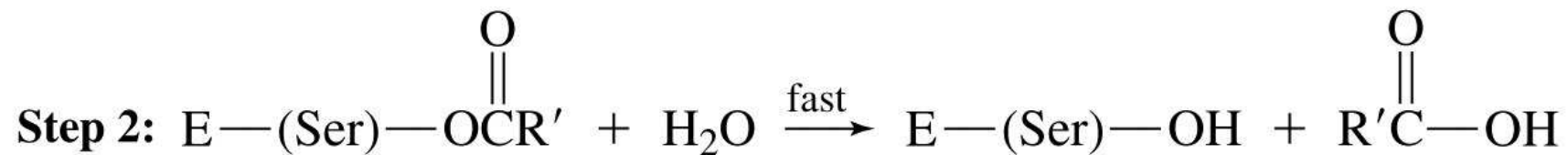
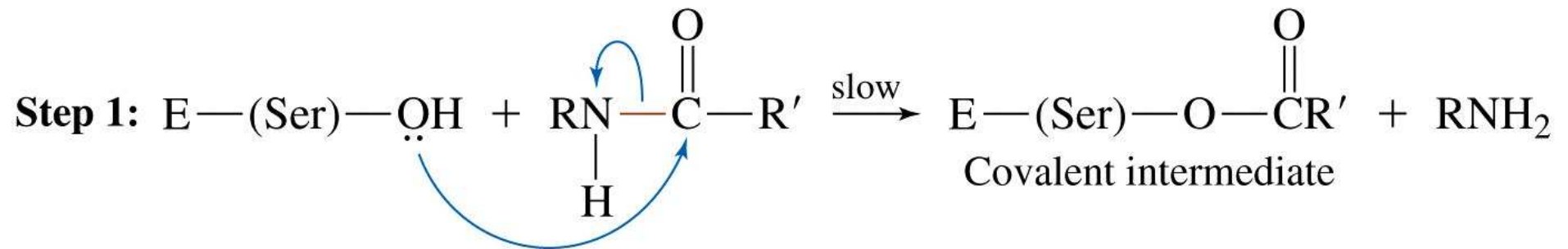


Figure 5-12 Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons

# Kovalentní serinové proteázy



# Kovovými ionty

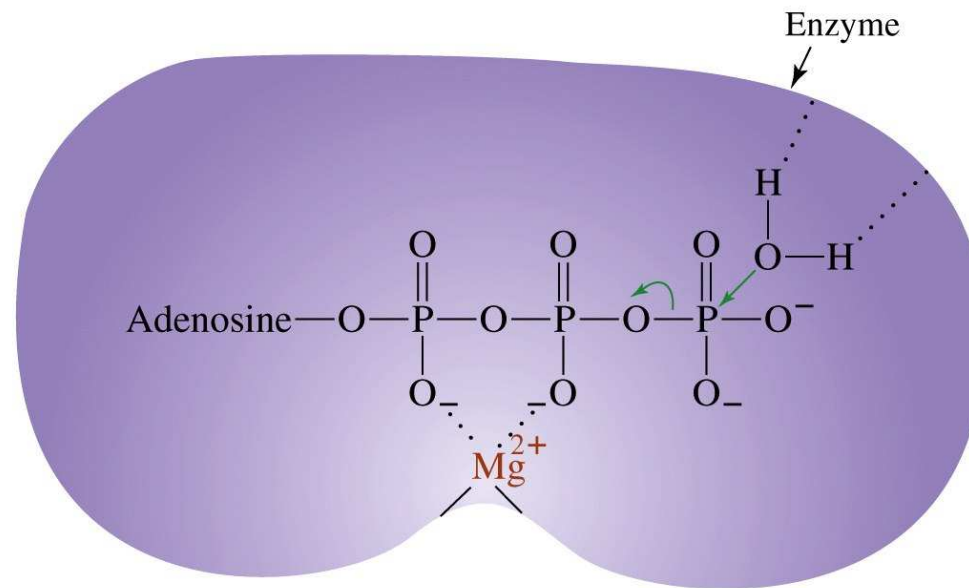


Figure 5-13a Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons

# Kovovými ionty

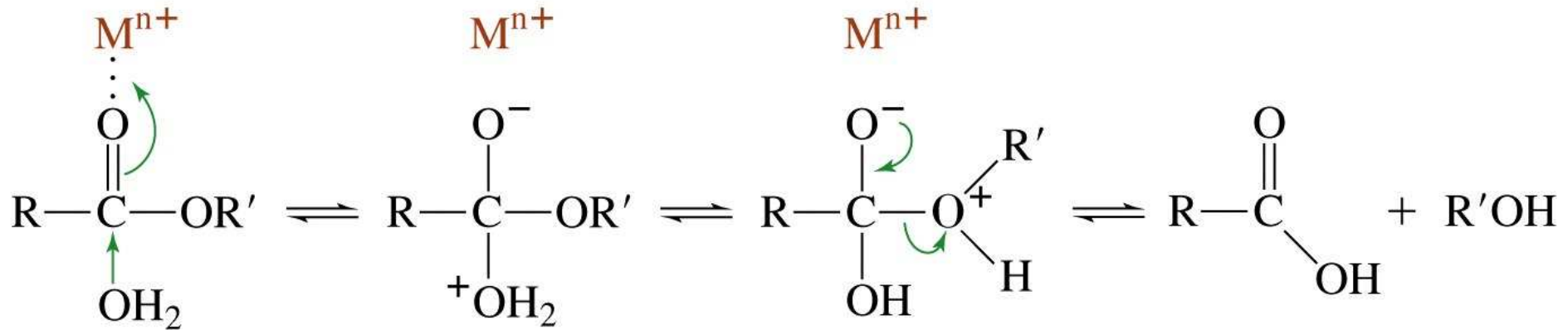


Figure 5-13b Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons

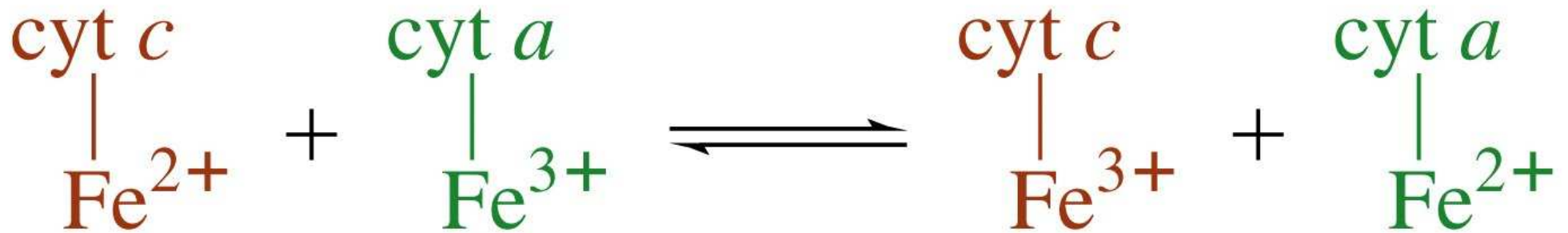
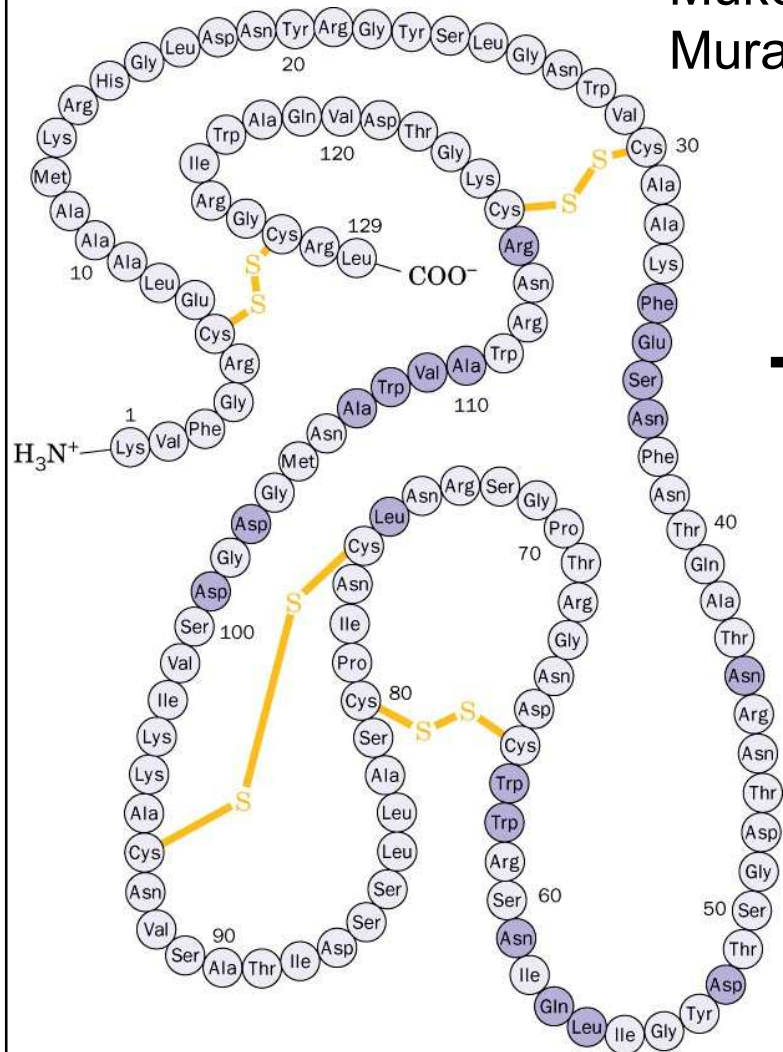
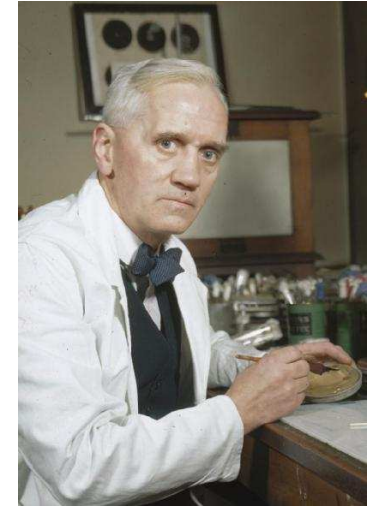


Figure 5-13c Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons

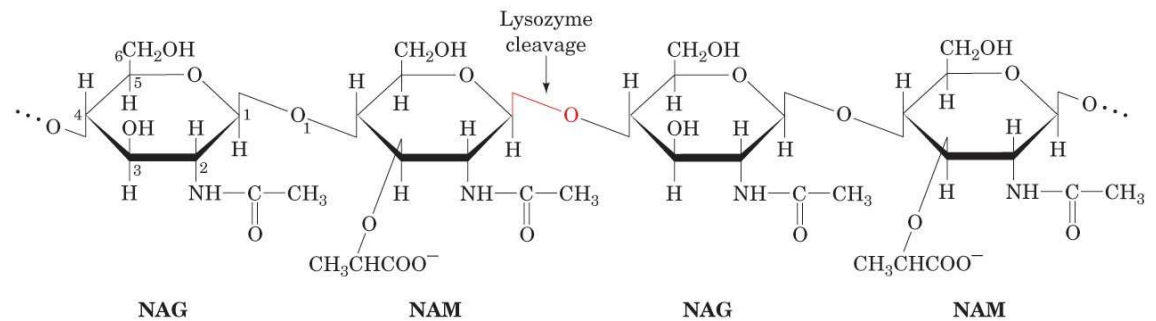
# Lysozym

EC 3.2.1.17 peptidoglykan *N*-acetylmuramoylhydrolase

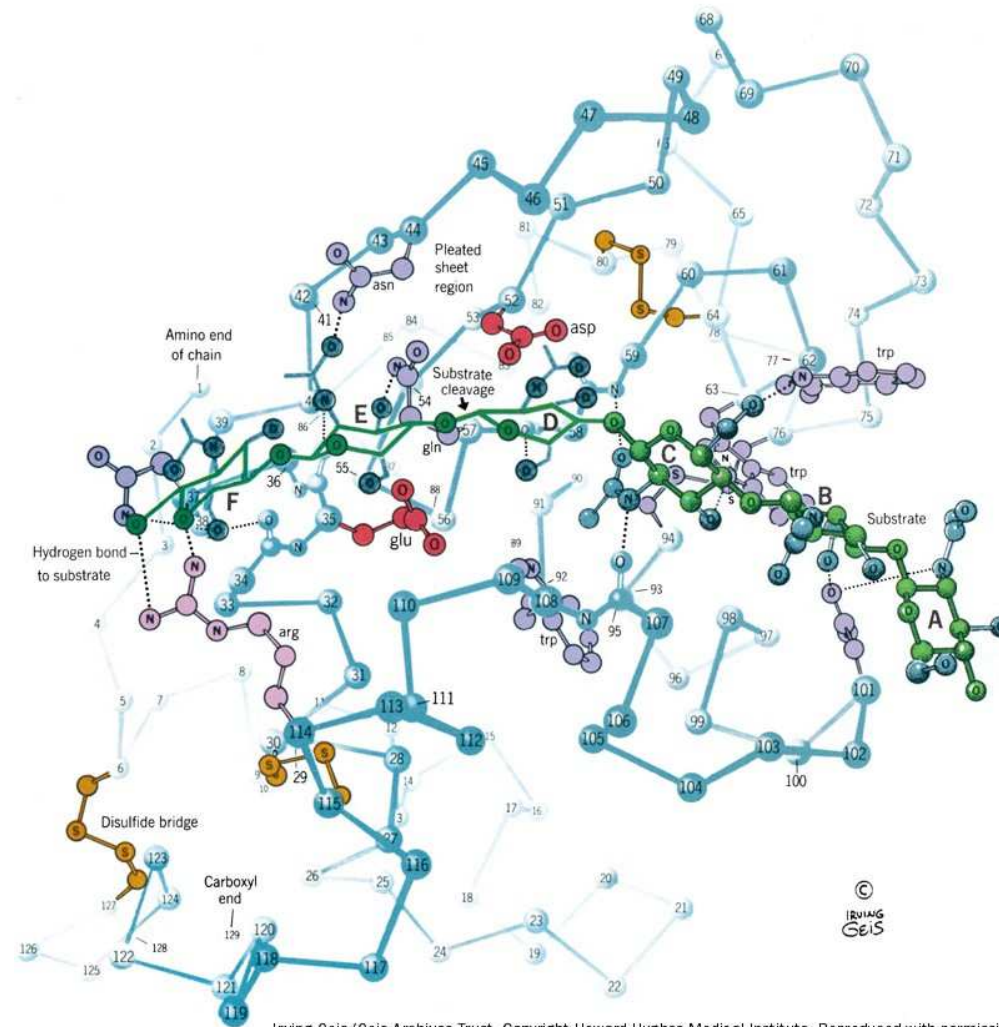
Mukopeptid *N*-acetylmuramoylhydrolase,  
Muramidase



+

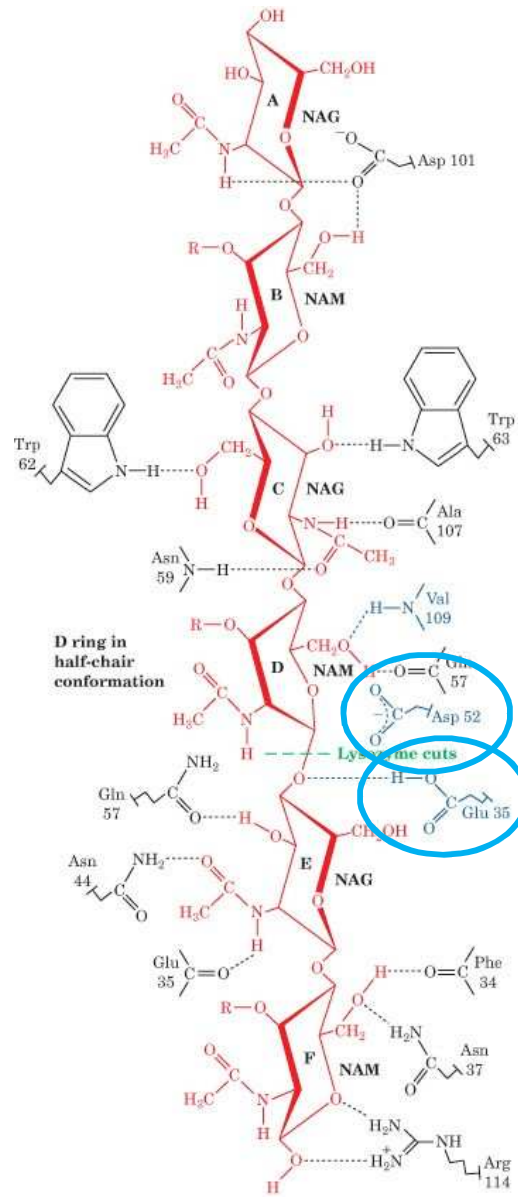


# Lysozym



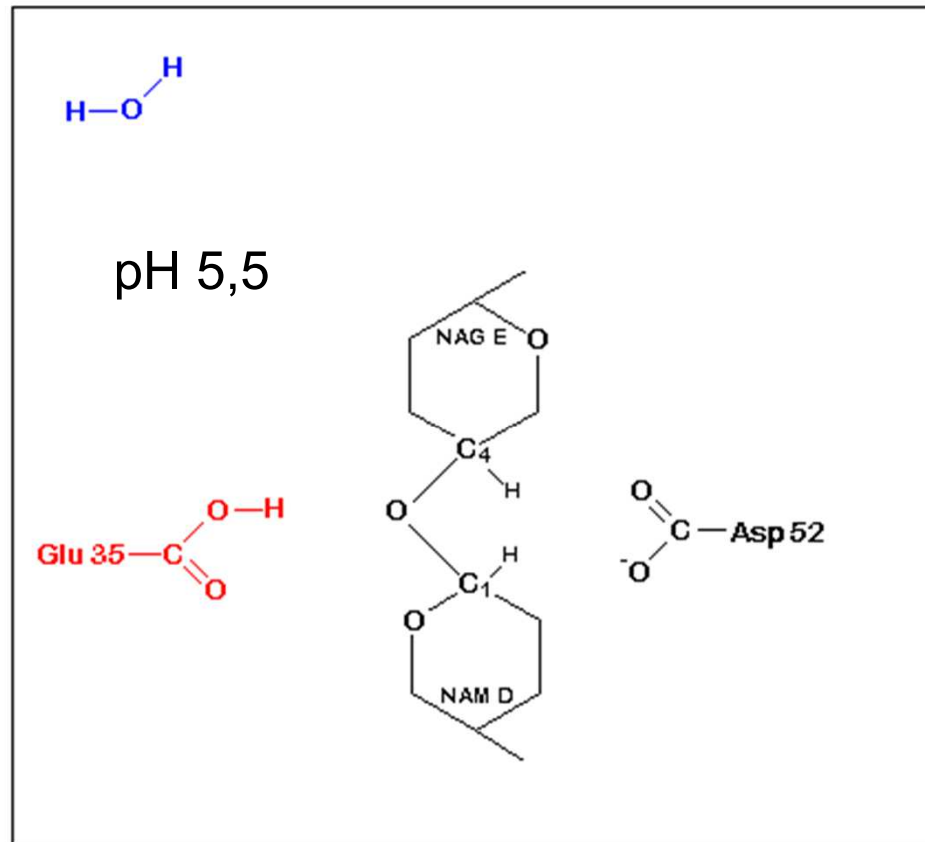
Irving Geis/Geis Archives Trust. Copyright Howard Hughes Medical Institute. Reproduced with permission





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

# Lysozym

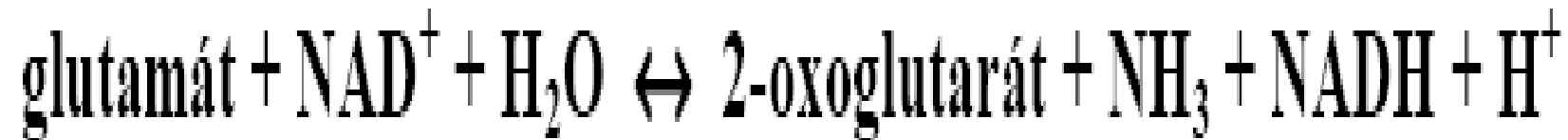


## Specifita enzymové reakce

specifita reakční - účinku - jaká reakce proběhne

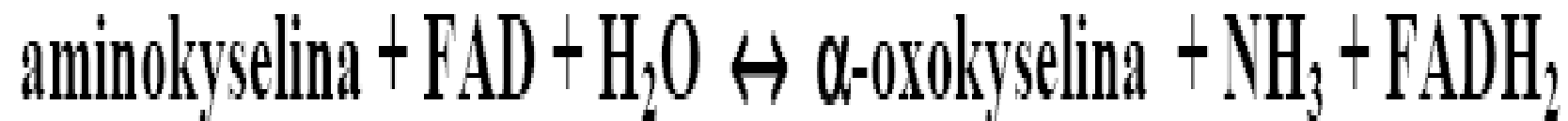
*savci*

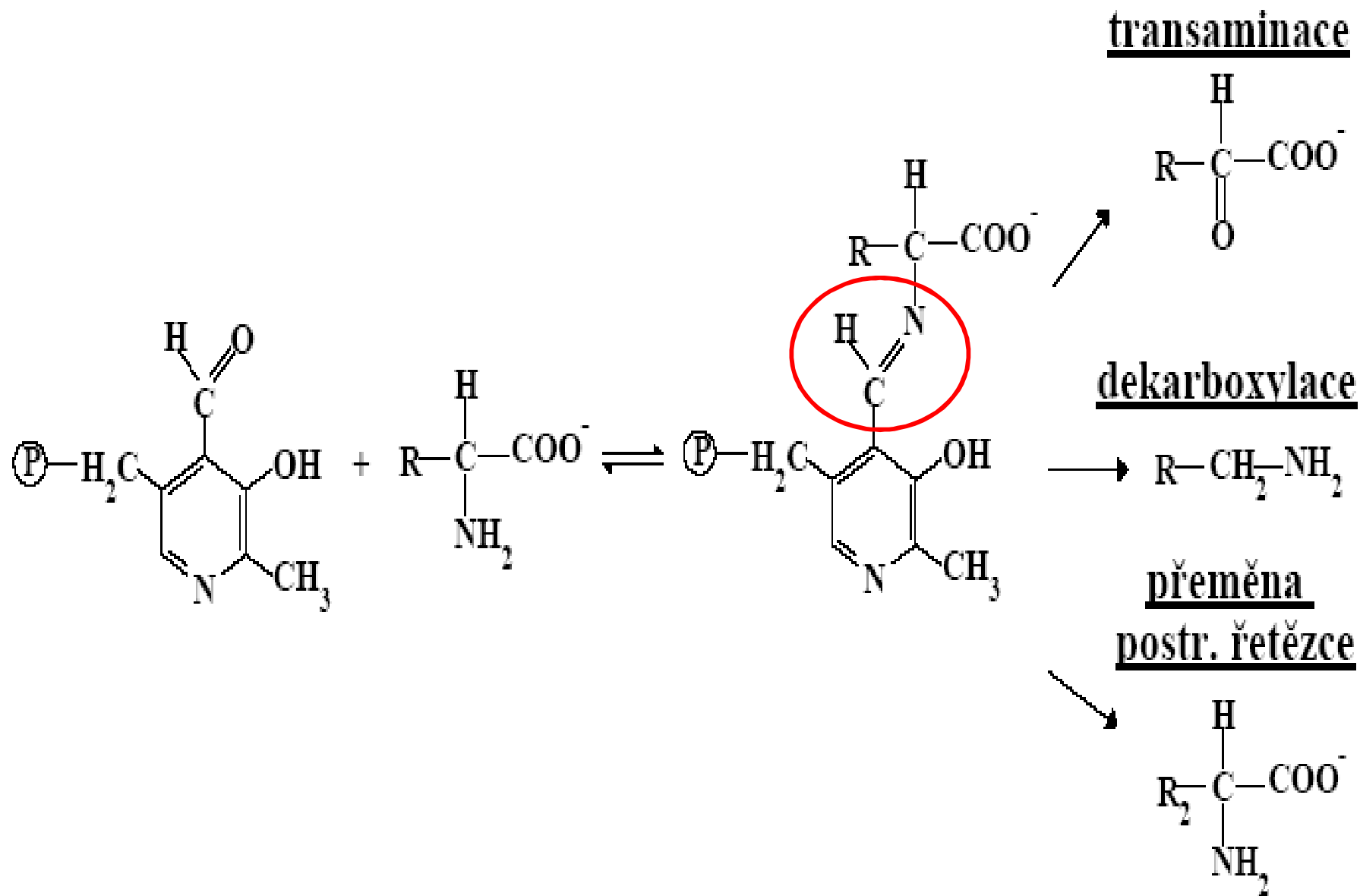
**Glutamát dehydrogenasa**



*vejcorodi*

**Oxidasa aminokyselín**





# Specifita enzymové reakce

specifita substrátová - absolutní

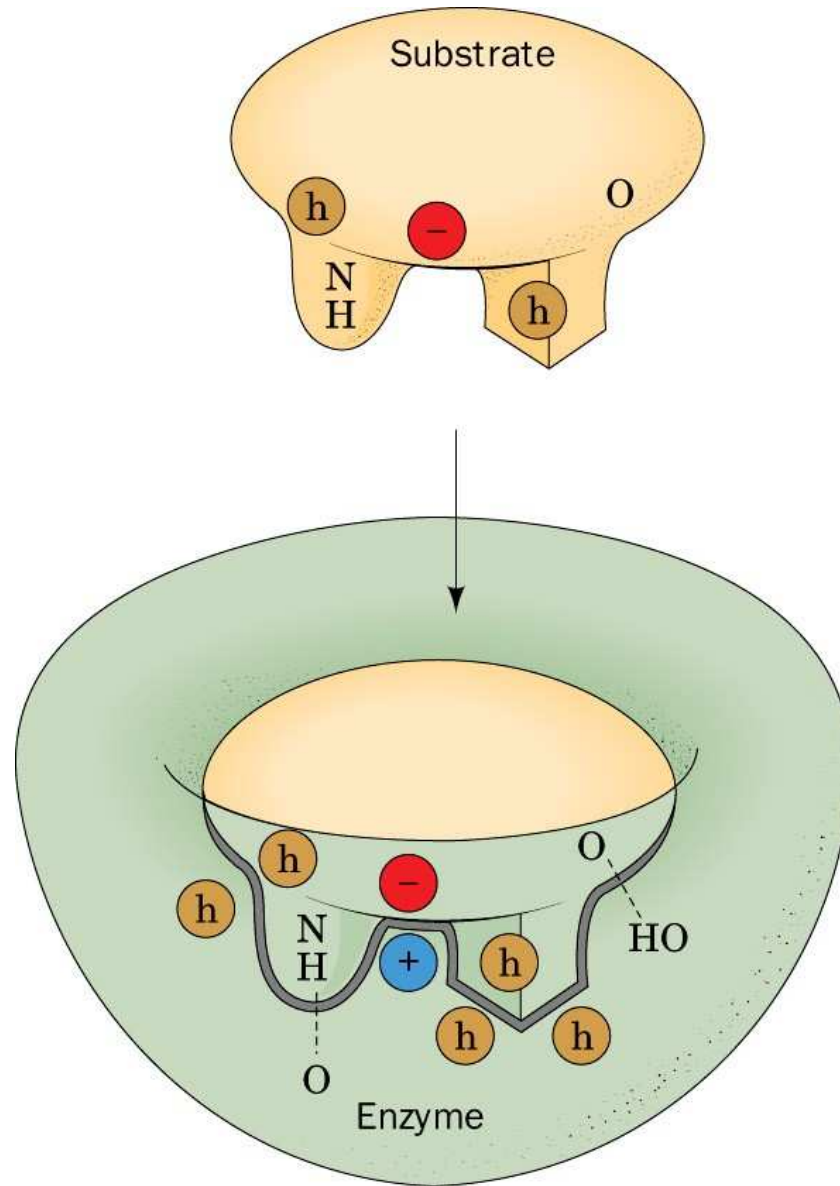
**ureasa**

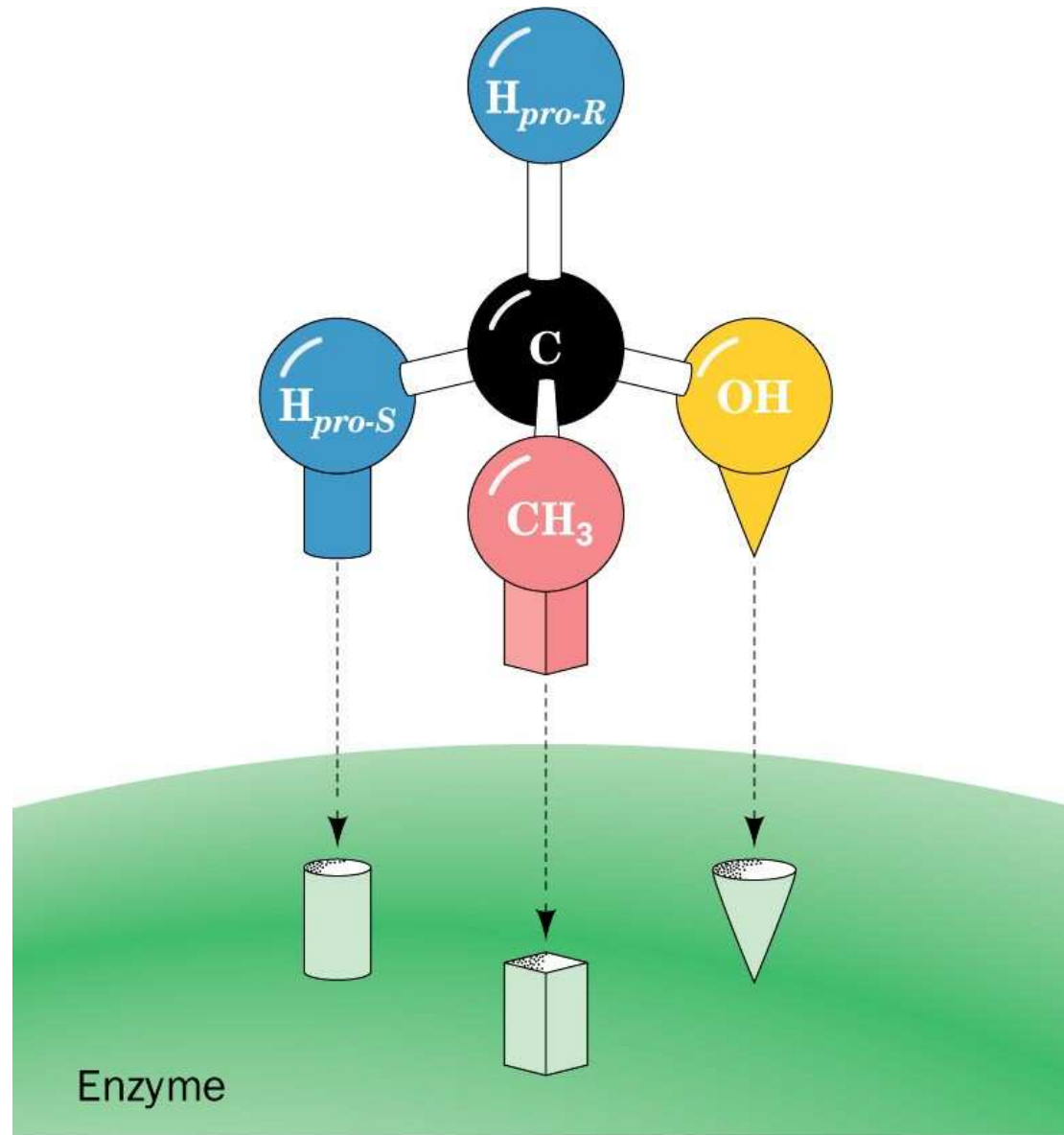
- skupinová

**ADH**

- stereospecifita

**oxidasa L-aminokyselin**







# Regulovatelnost

Studium vlivu různých chemických a fyzikálních faktorů na enzymové reakce

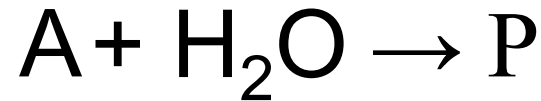
[E], [S], [I], pH, I, T



- Mechanismus reakce
- Stavba aktivního místa
- Regulaci

# Enzymové reakce

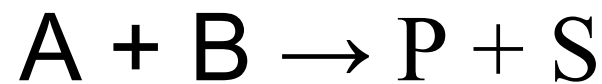
- Jednosubstrátové



$$v = -\frac{d[A]}{dt}$$

$$v = k[A]$$

- Dvousubstrátové



$$v = -\frac{d[A]}{dt} \quad \left( = -\frac{d[B]}{dt} \right)$$

$$v = k[A]^g [B]^h$$

- Vícesubstrátové



# ENZYMOVÁ KINETIKA

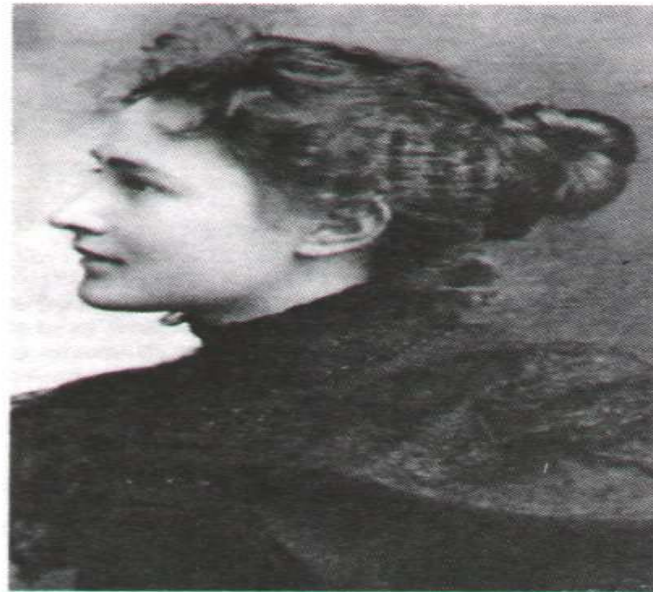
## Reakce s jedním substrátem

**BROWN 1902**

**MICHAELIS MENTENOVÁ 1913**

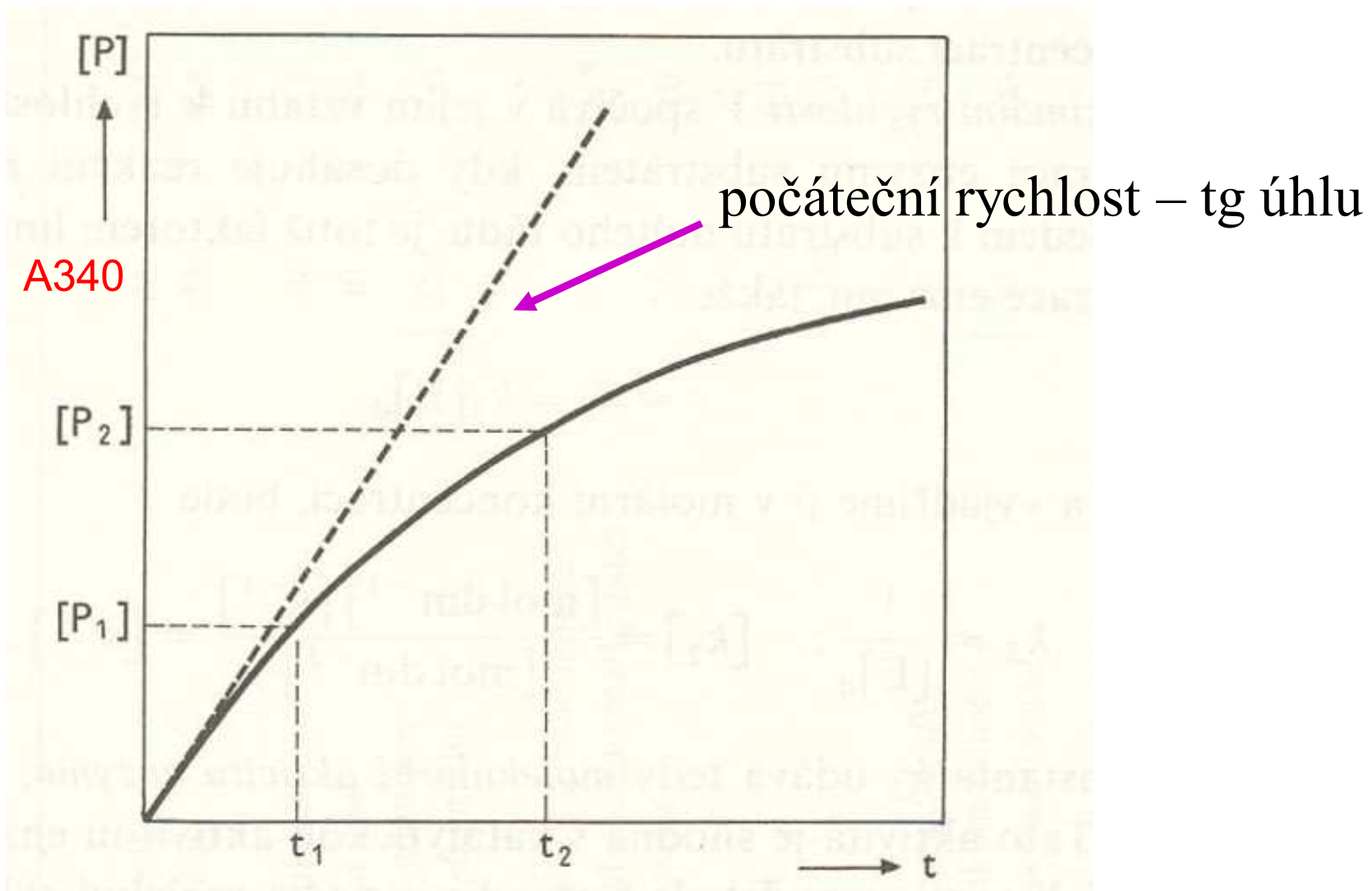
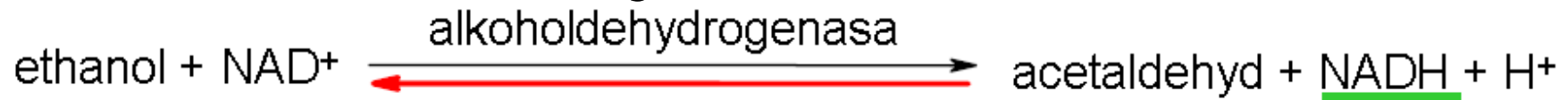


**Leonor Michaelis**  
1875–1949



**Maud Menten**  
1879–1960

# Počáteční rychlost enz.reakce



## b) závislost počáteční rychlosti na koncentraci substrátu

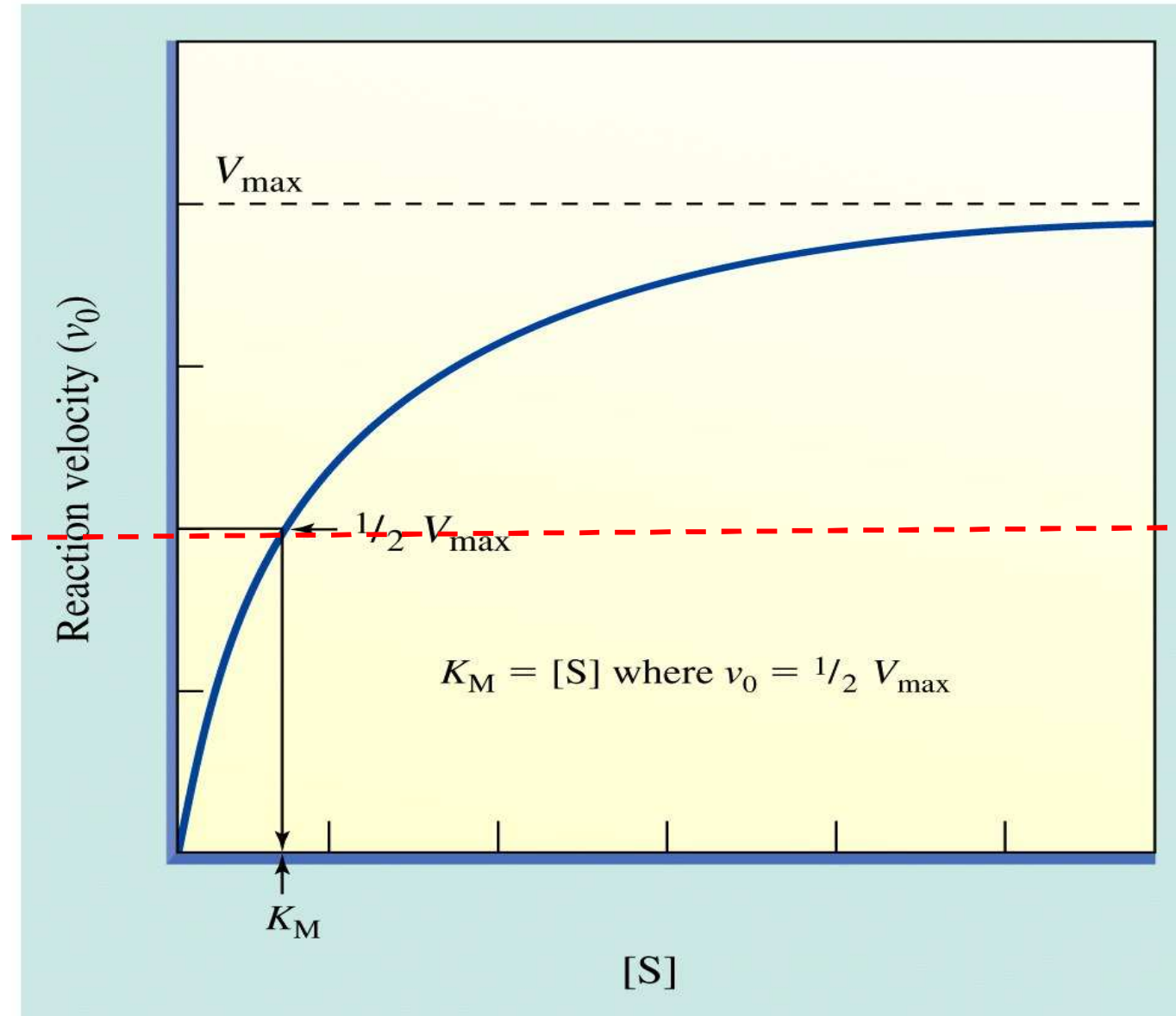
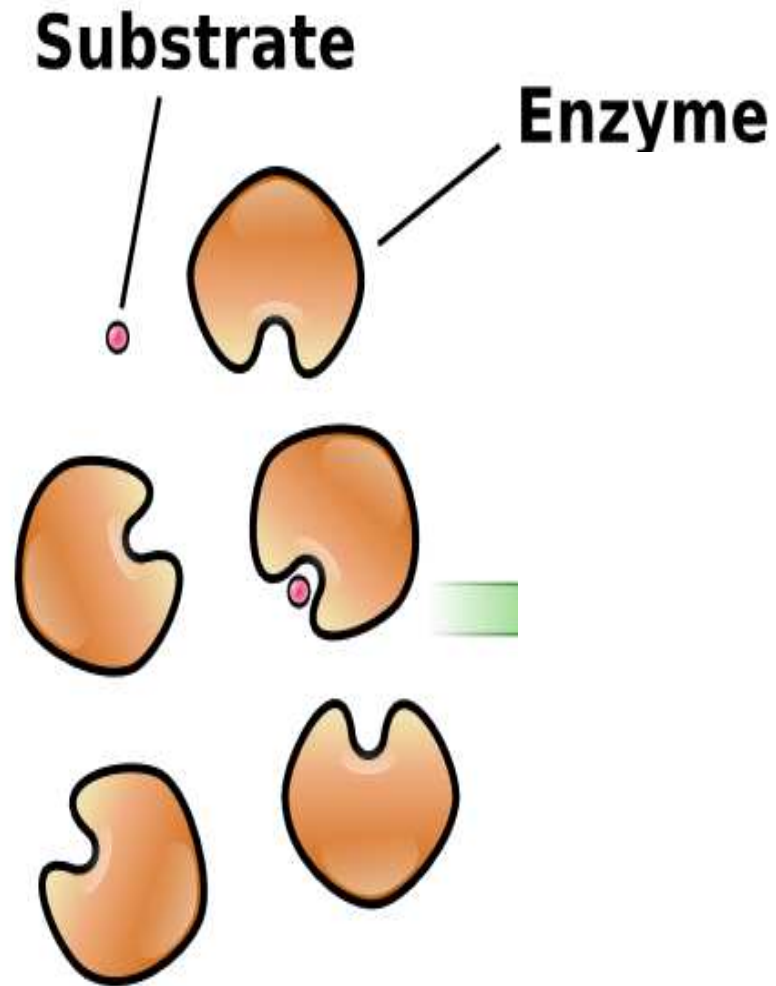


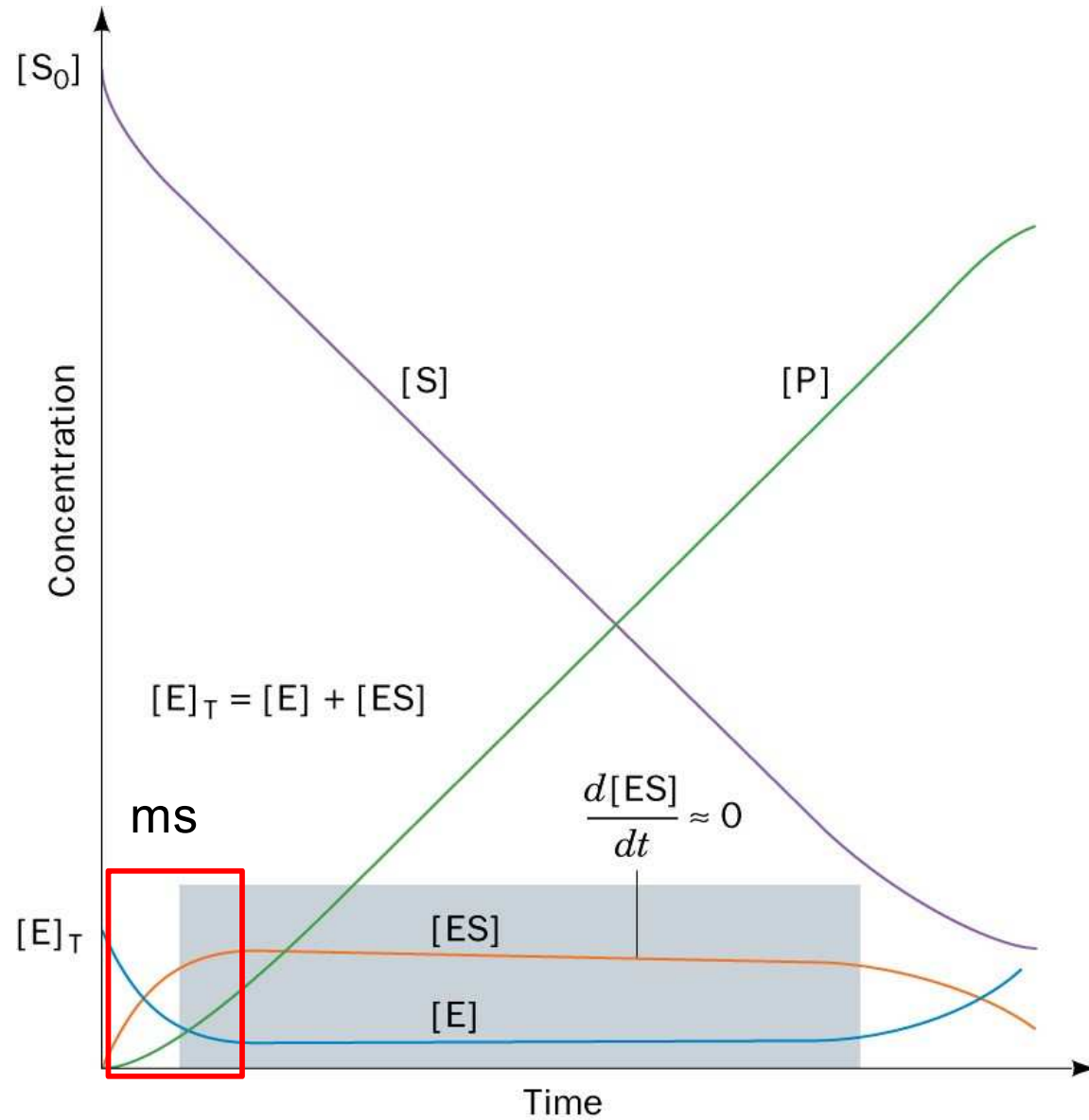
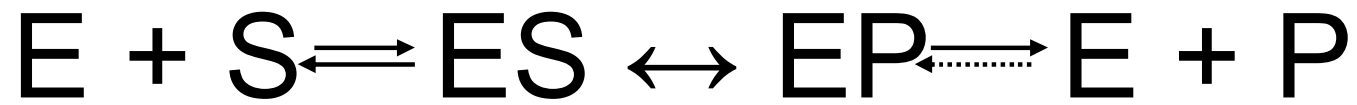
Figure 5-4 Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons

b) závislost počáteční rychlosti na koncentraci **substrátu**

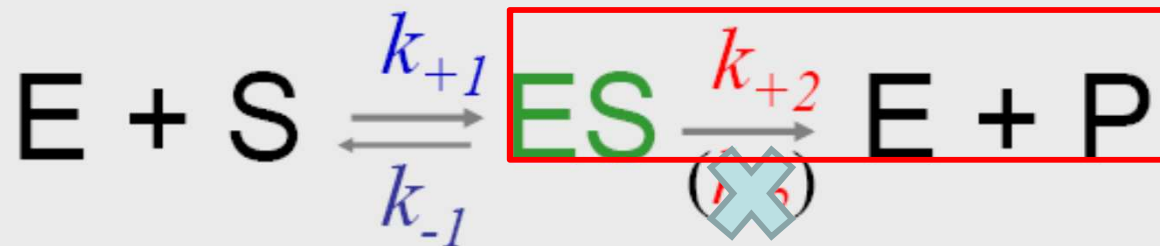


**Low substrate**

# Ustálený stav

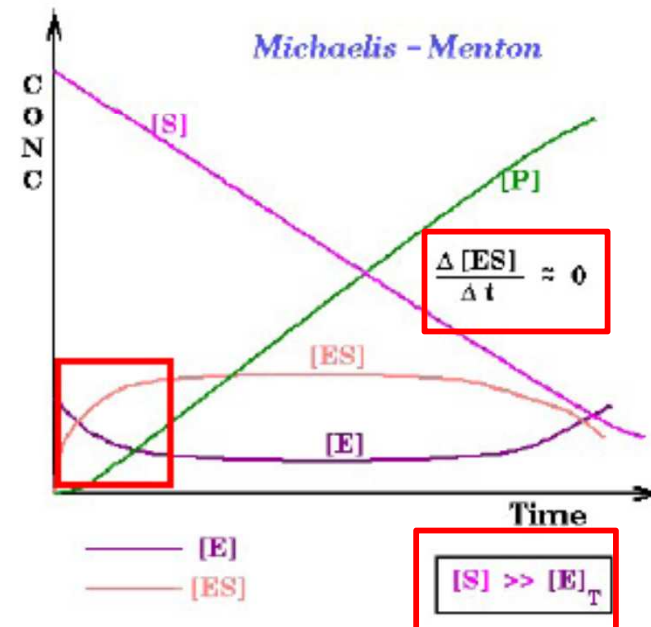


## Základní model - Michaelis & Mentenová



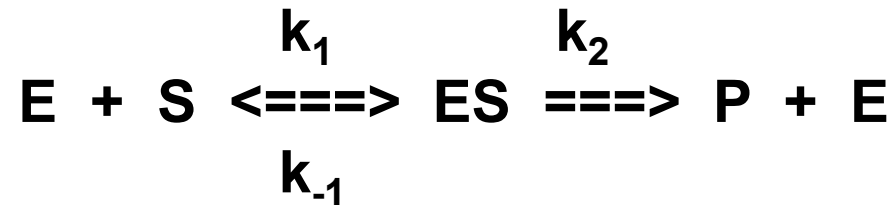
Předpoklady:

1. Koncentrace [ES] je v ustáleném stavu
2. Tvorba produktu P je přímo úměrná koncentraci [ES], tudíž  $v_0 = k_2 [ES]$
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

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

$$v_1 = v_{-1} + v_2$$

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

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

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

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

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

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

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

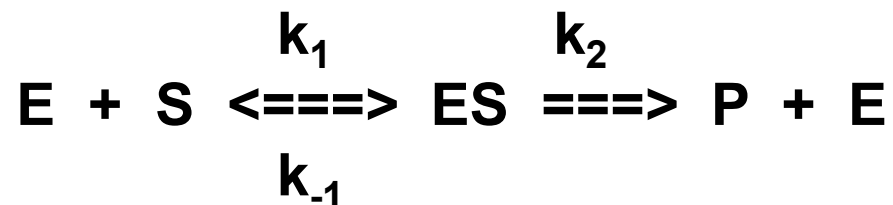
$$[E]_{\text{tot}} [S] = K_m [ES] + [ES][S]$$

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

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

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

# Odvození rovnice Michaelis Mentenové



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

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

$$[ES] = v_0 / k_2$$

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

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

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

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

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

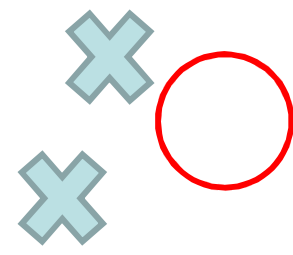
## Rovnice Michaelis Mentenové

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

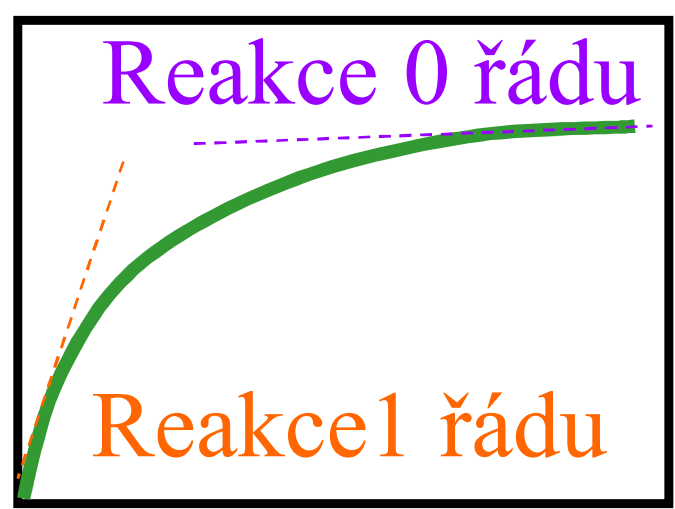
**v** - počáteční reakční rychlost

**V** - maximální (limitní) reakční rychlost

**K<sub>m</sub>** - 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 $V_{max}$

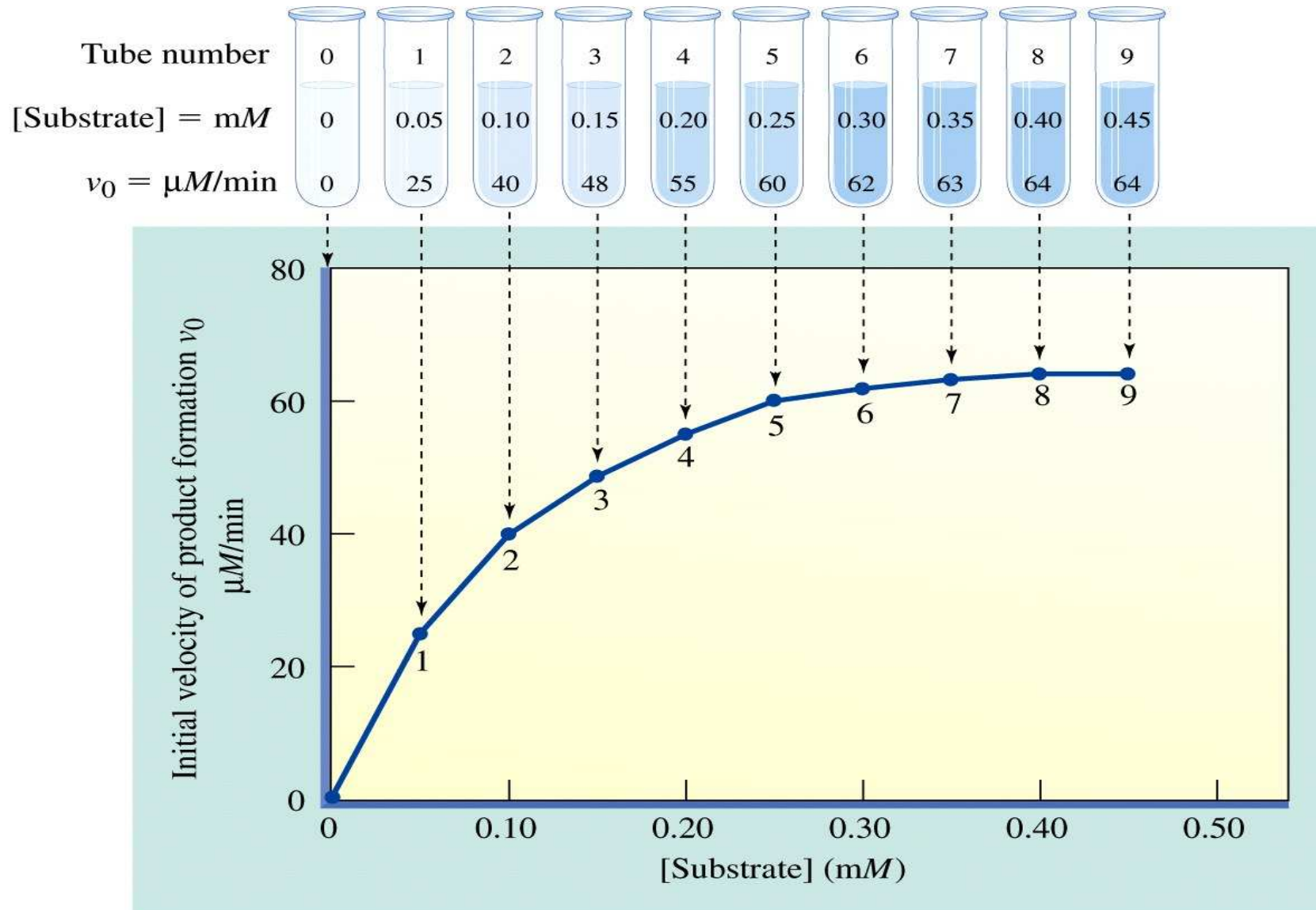
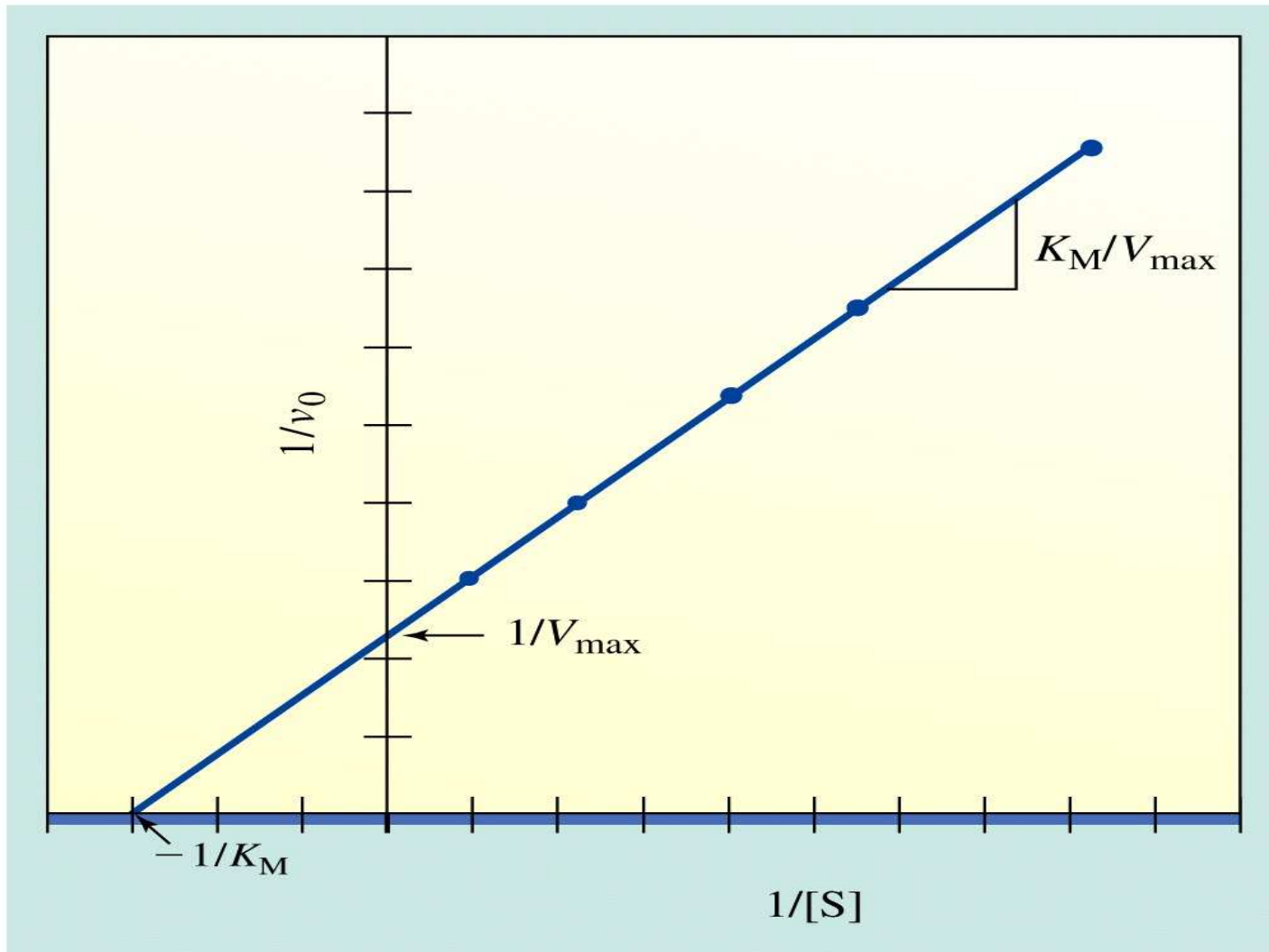


Figure 5-3 Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons

Stanovení  $K_m$  :

## LINEWEAVER BURKE



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

Enzyme	Substrate	$K_M$ (mM)
Catalase	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.001
Hexokinase from brain	ATP	0.4
	D-Glucose	0.05
	D-Fructose	1.5
Carbonic anhydrase	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	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 <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1.0
Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (rubisco)	Ribulose-1,5-bisphosphate	0.028
	CO <sub>2</sub>	0.009
Ribulose-1,5-bisphosphate oxygenase (rubisco)	Ribulose-1,5-bisphosphate	0.028
	O <sub>2</sub>	0.535

**Table 5.4****Turnover numbers,  $k_3$ , for some enzymes**

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

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



# K<sub>m</sub> ??

- Taková koncentrace substrátu, že reakce pobeží polovinou V<sub>max</sub>  
[mol/dm<sup>3</sup>]
- Je mírou afinity substrátu k enzymu
- Nezávisí na koncentraci enzymu, závisí na prostředí T, I, pH, efekторы atd.

# Proč $K_m$ ??

- Přibližná hodnota intracelulární koncentrace substrátu
- Substrát s nižší hodnotou  $K_m$  je pravděpodobně fyziologický
- Hodnotu lze ovlivňovat – možnost regulace
- Srovnání enzymů
- Stanovení enzymové aktivity

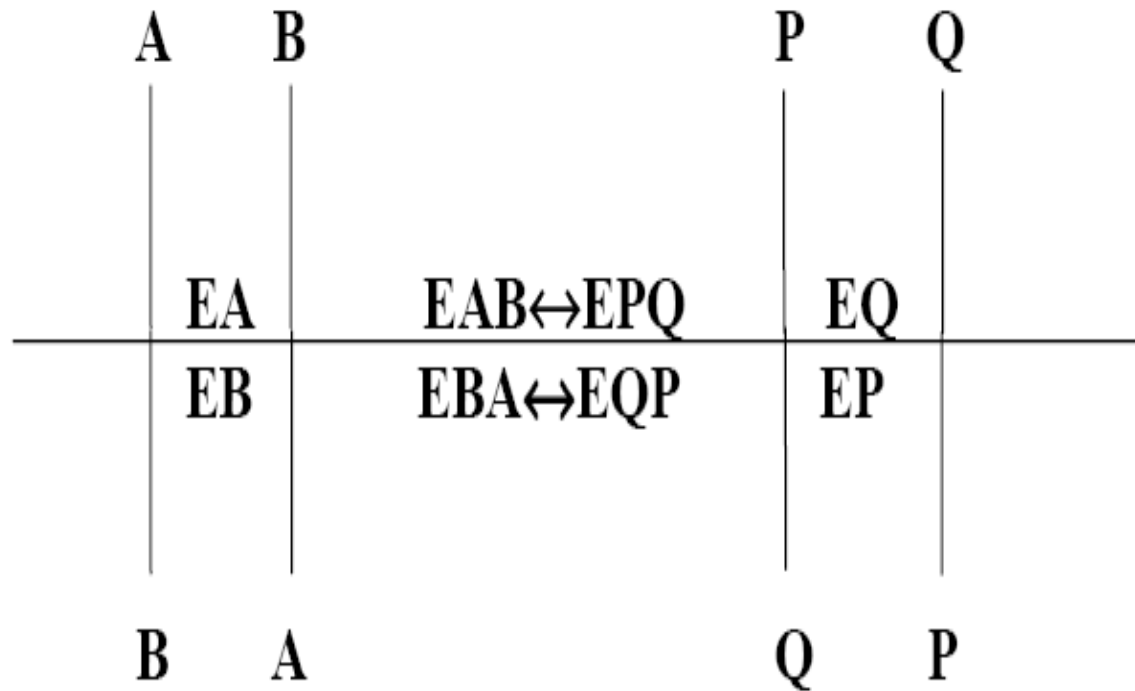
# Reakce se dvěma substráty

(akceptory elektronů, koenzymy)

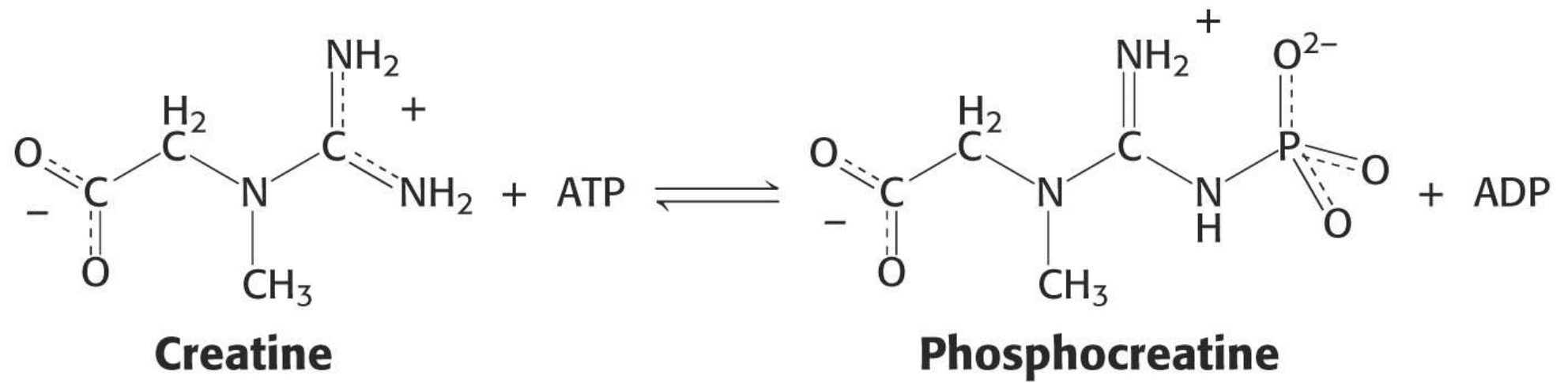
Mechanismy - CLELAND

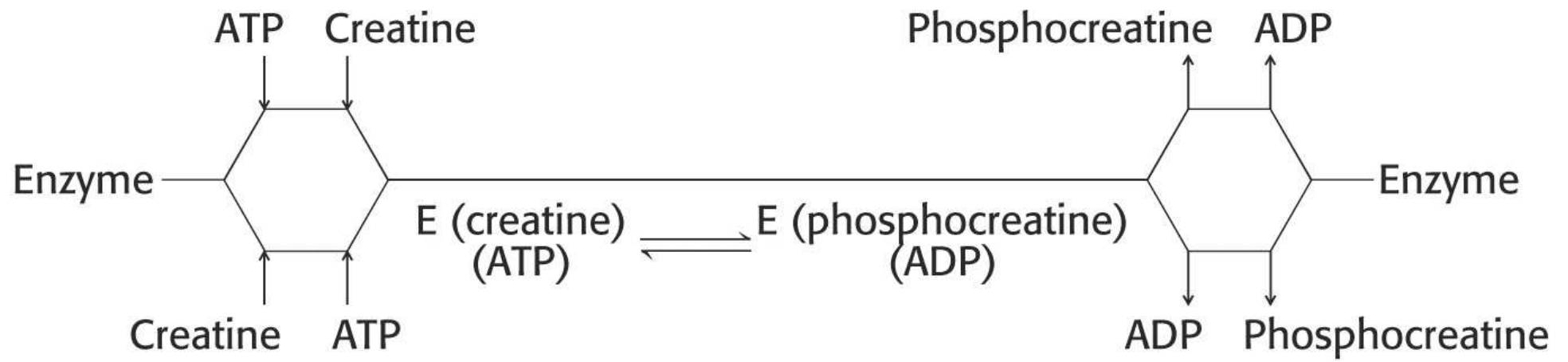
Sekvenční :

a) *náhodný*



fosforylaza  
kreatinkinasa

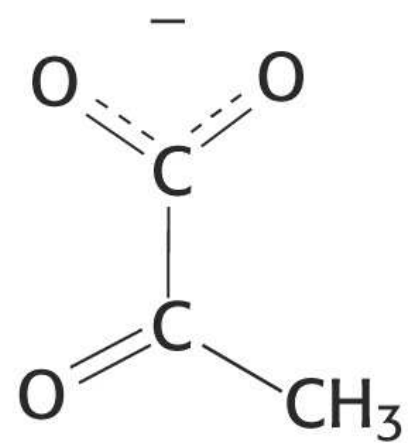




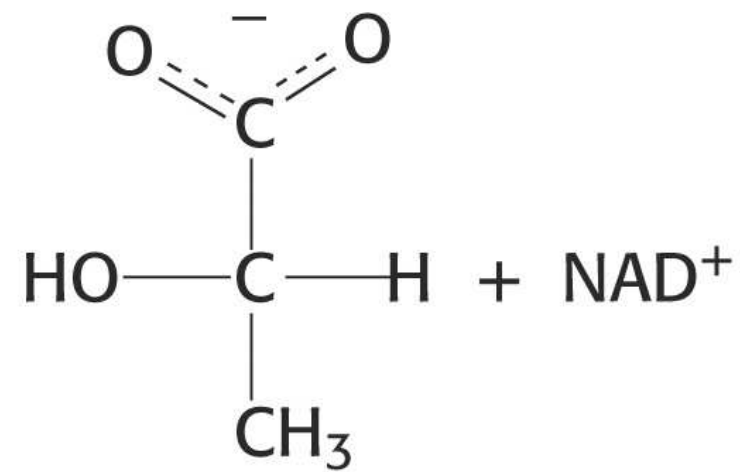
b) *uspořádaný*



Laktátdehydrogenasa  
A – NADH, B – Pyr)

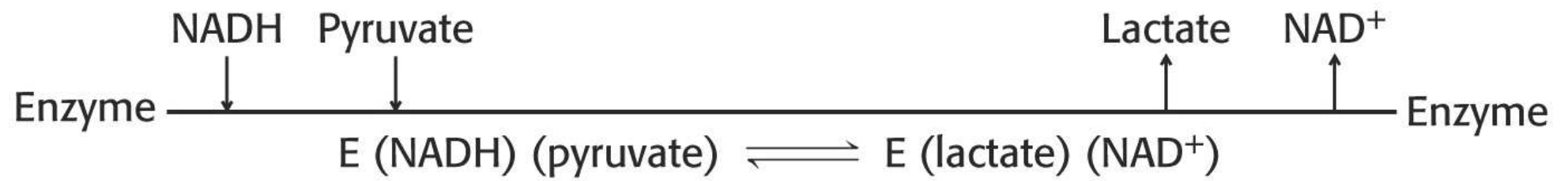


**Pyruvate**



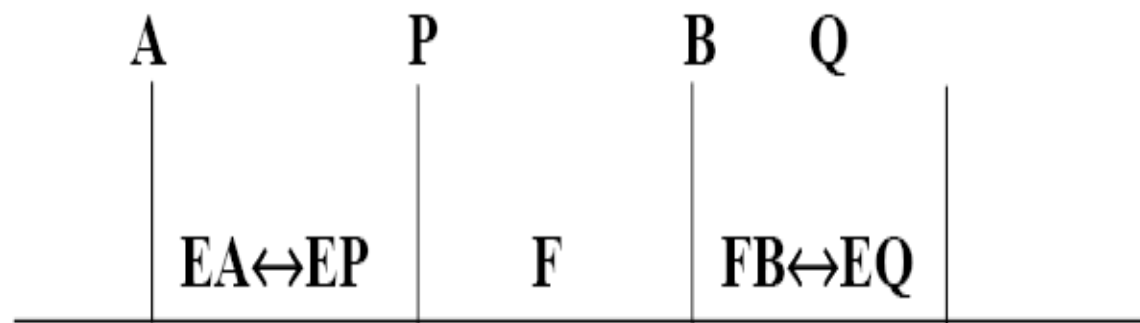
**Lactate**



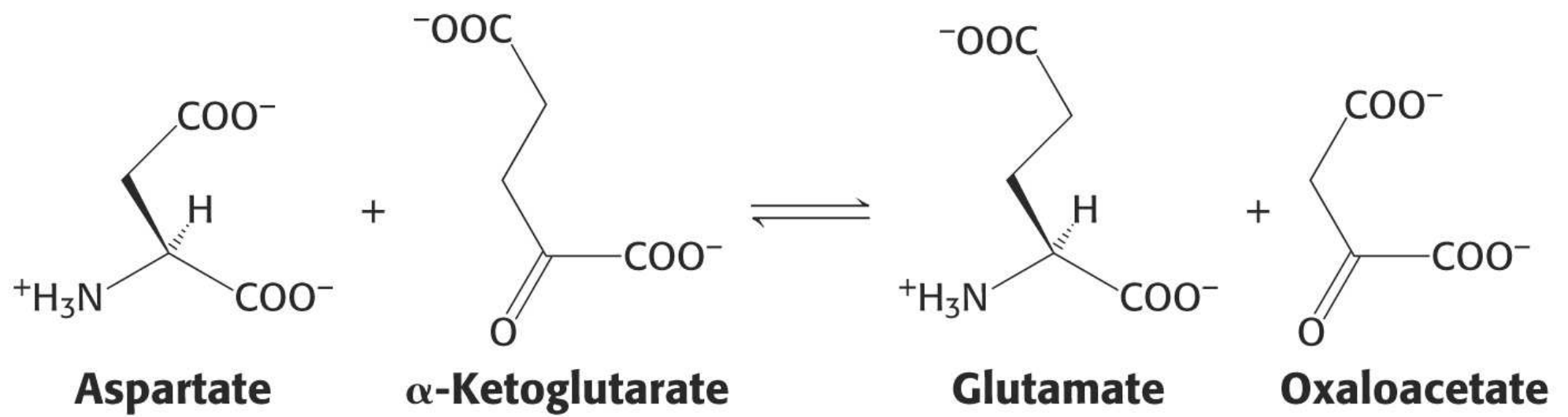




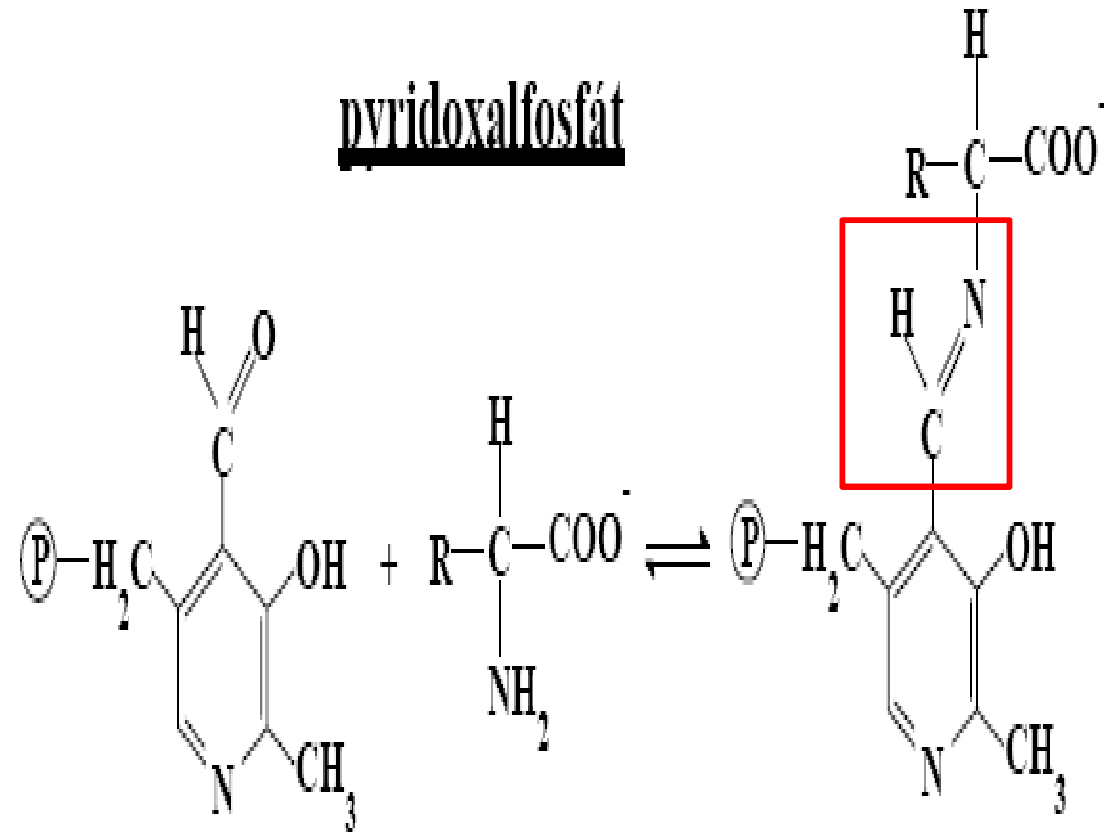
## Pingpongový

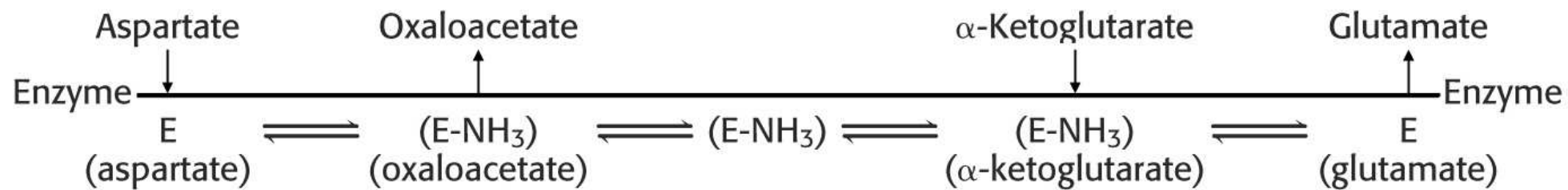


Transaminasy  
A-AMK, B-OxoK



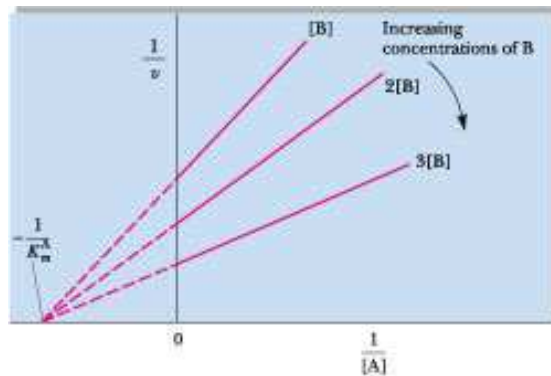
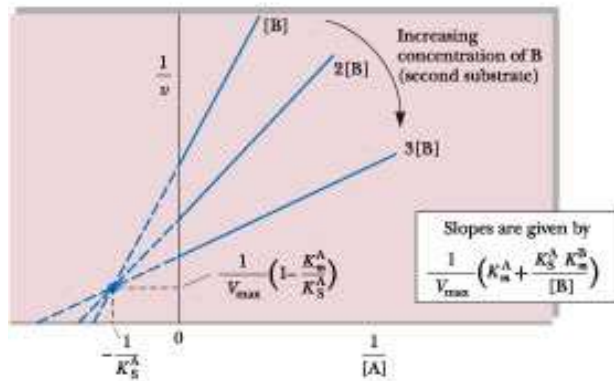
pyridoxalfosfát





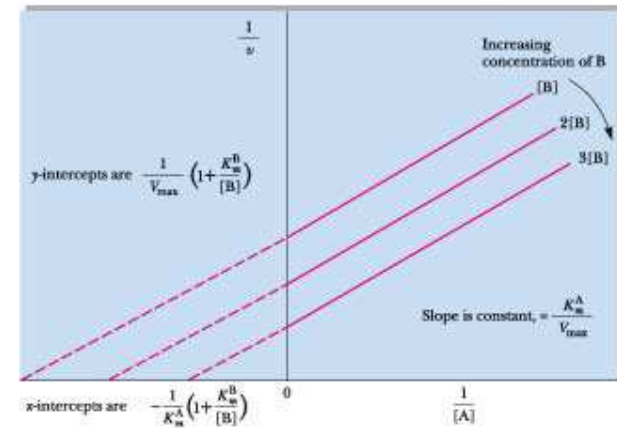
## Sekvenční

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



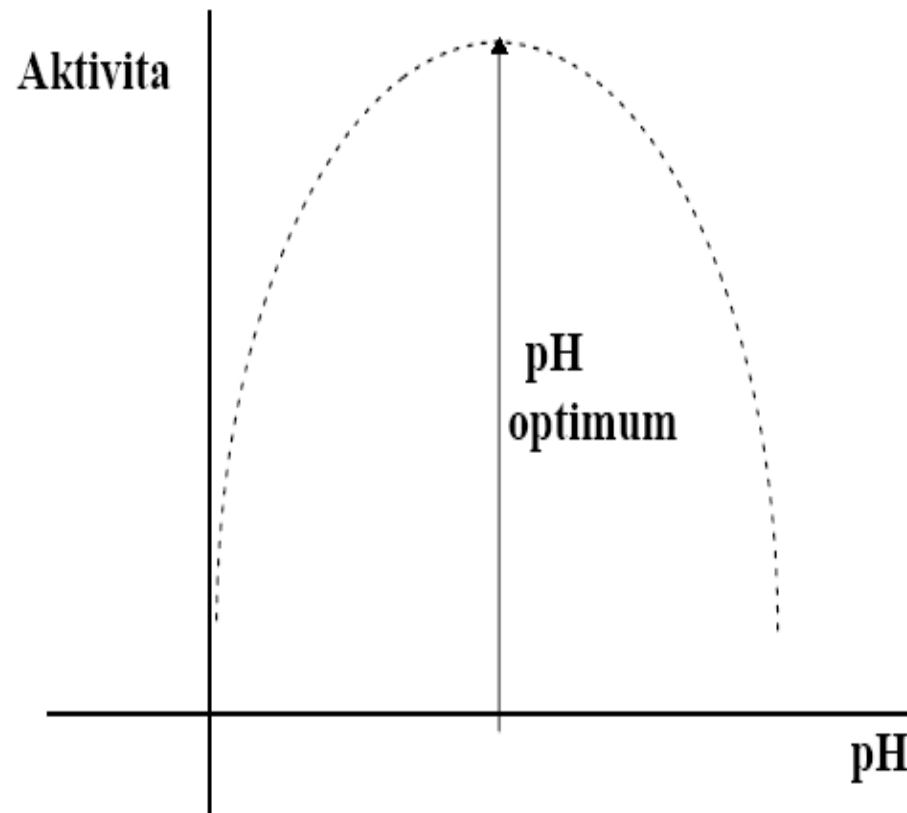
## Ping-pongový

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*

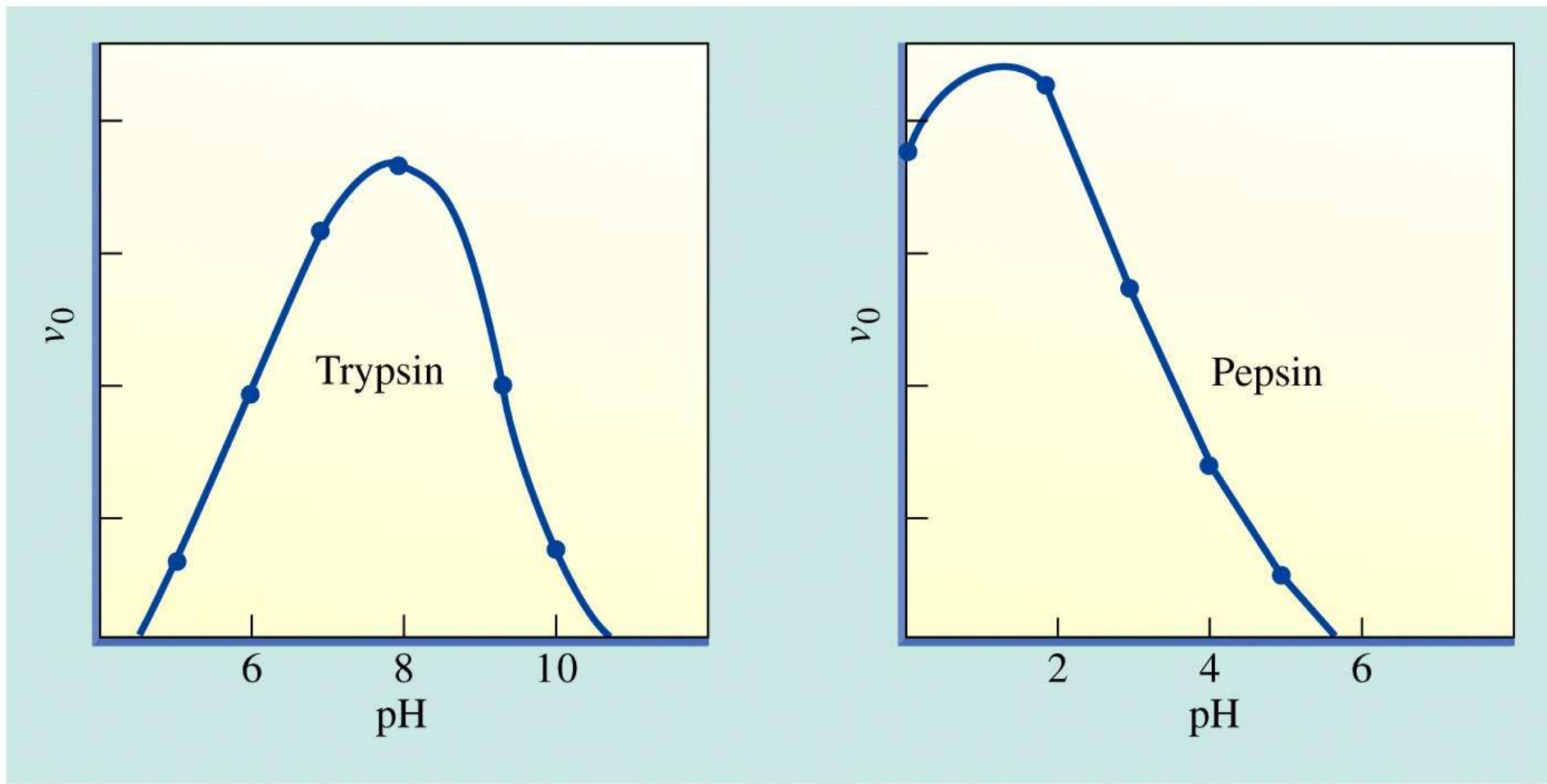


**Disociace nabitých skupin enzymu**

**Disociace nabitých skupin substrátu**

**Denaturace**

**pH stabilita!!!**

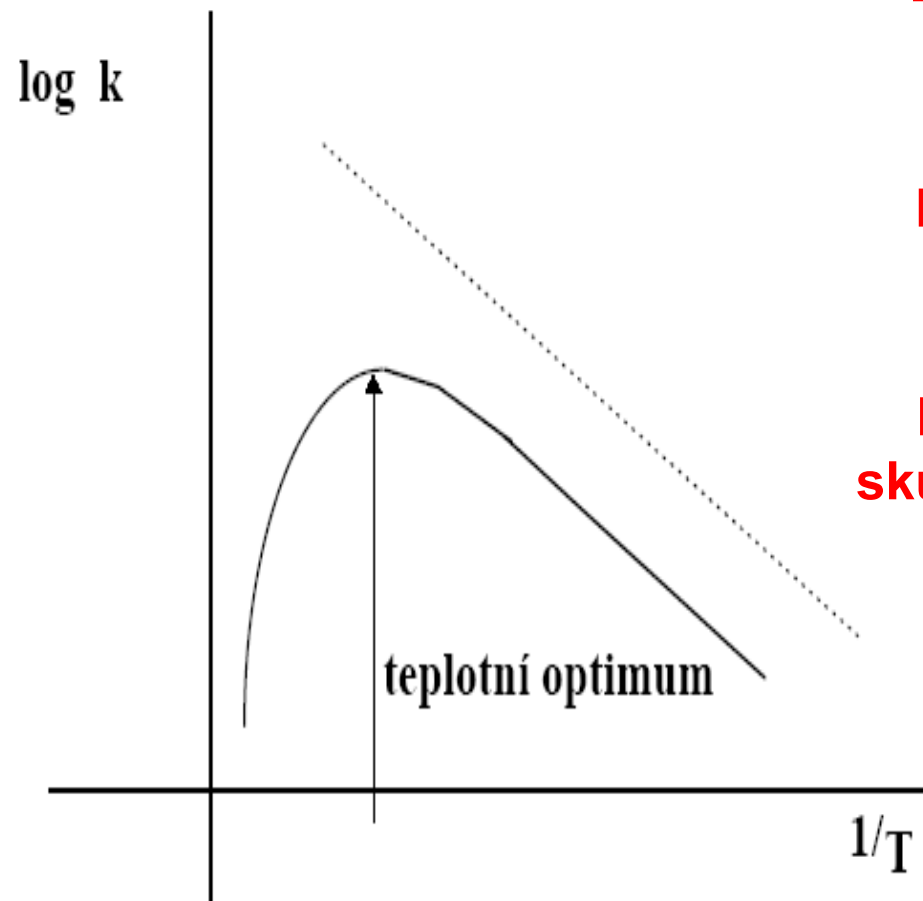


(a)

(b)

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

## *Vliv teploty*



**Disociace nabitých skupin enzymu**

**Disociace nabitých skupin substrátu**

**Disociace nabitých skupin složek pufru - pH**

**Denaturace**



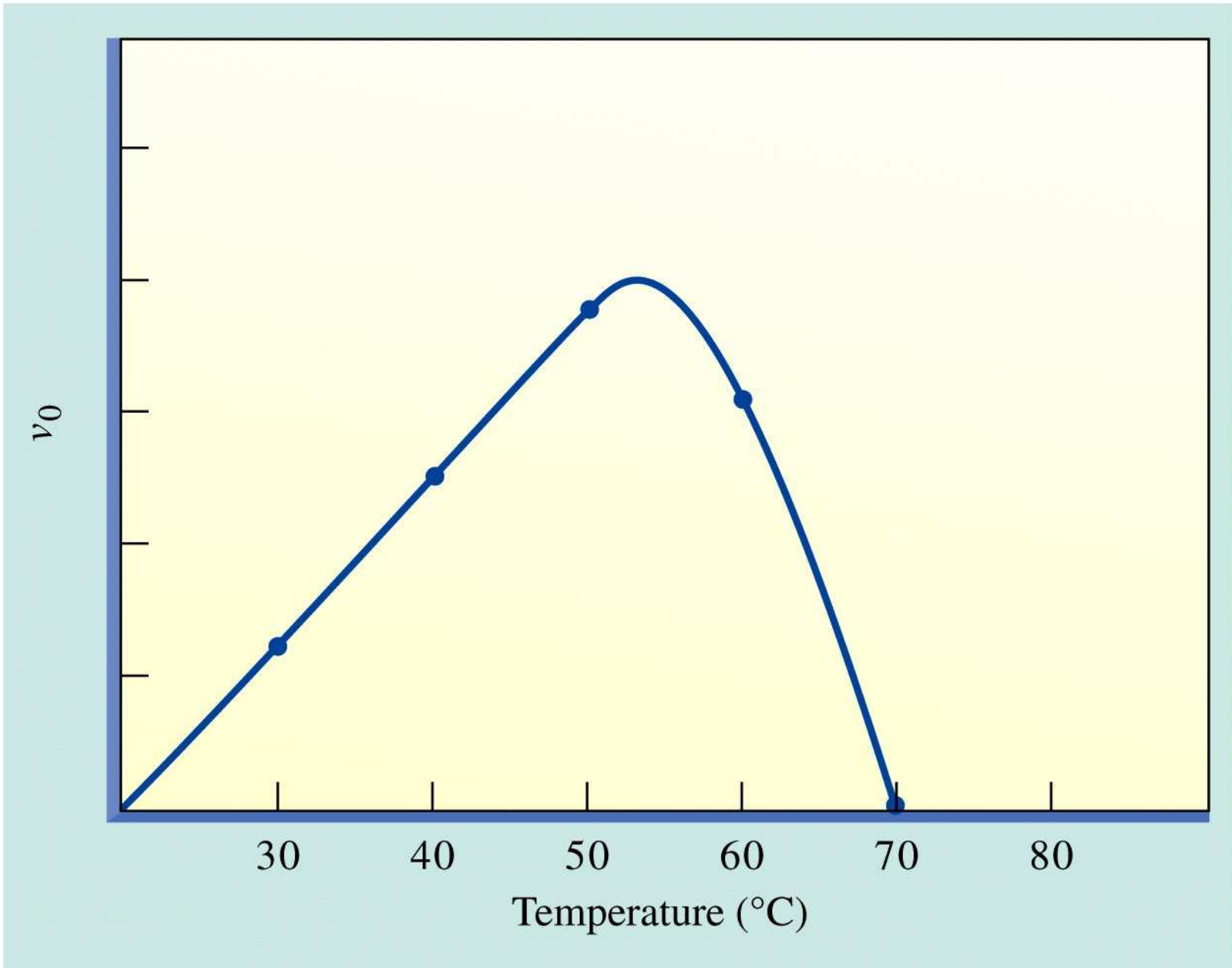
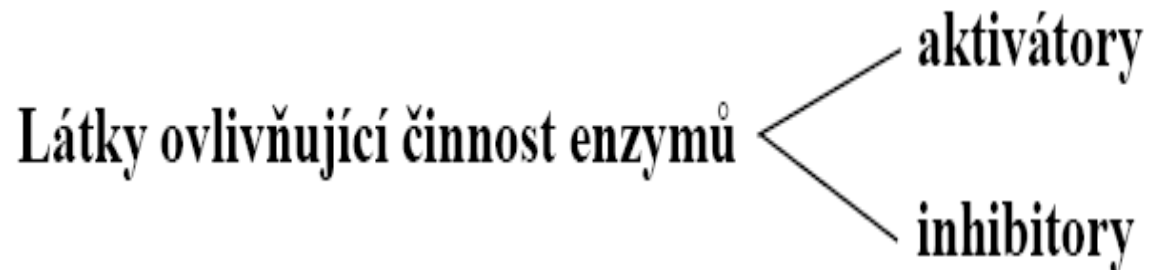


Figure 5-7 Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons

## Látky ovlivňující činnost enzymů



*Aktivátory* - zvyšují rychlost enzymové reakce

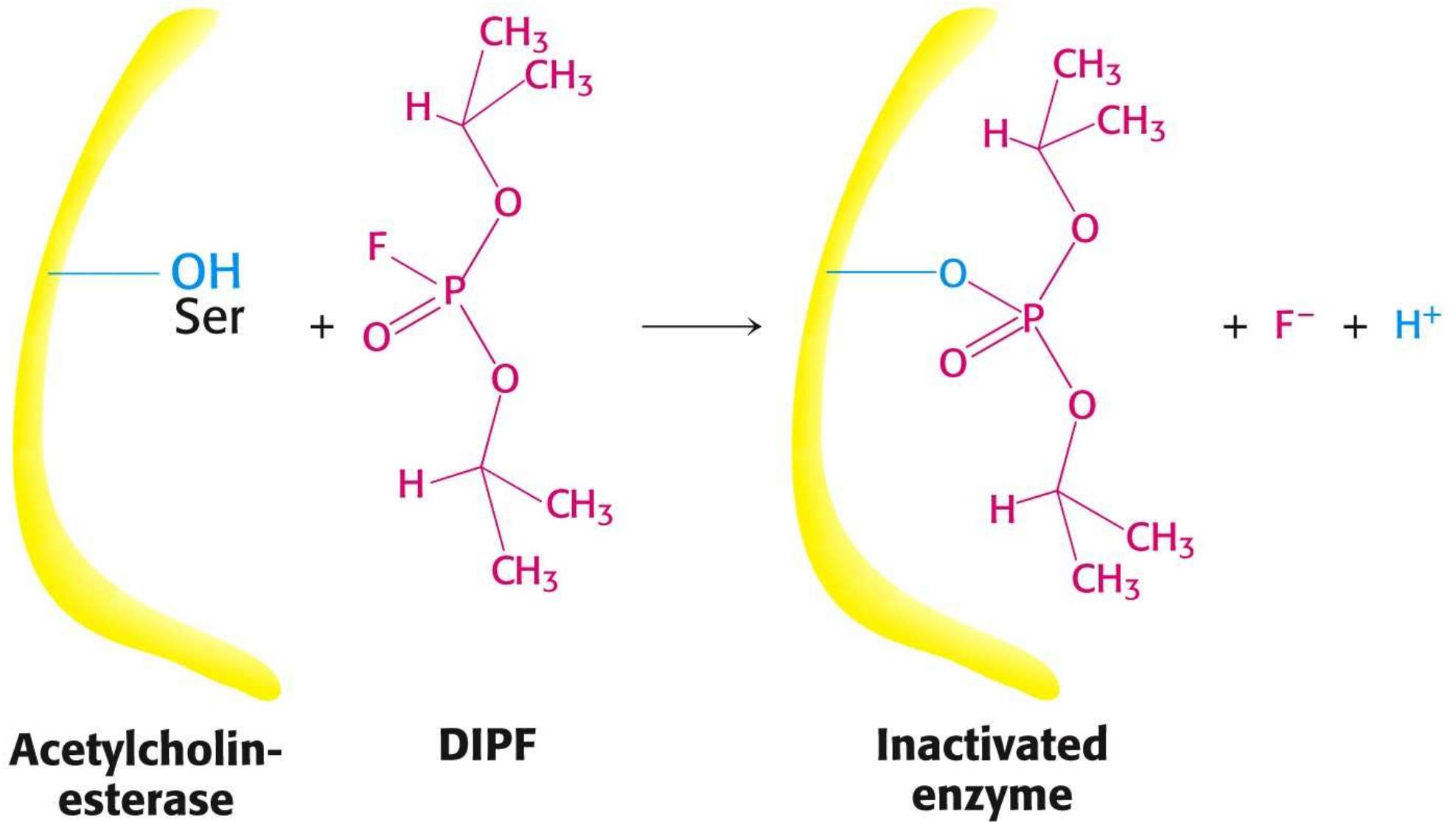
*Inhibitory* - snižují rychlost enzymové reakce

## Inhibice

- Ireverzibilní inhibice

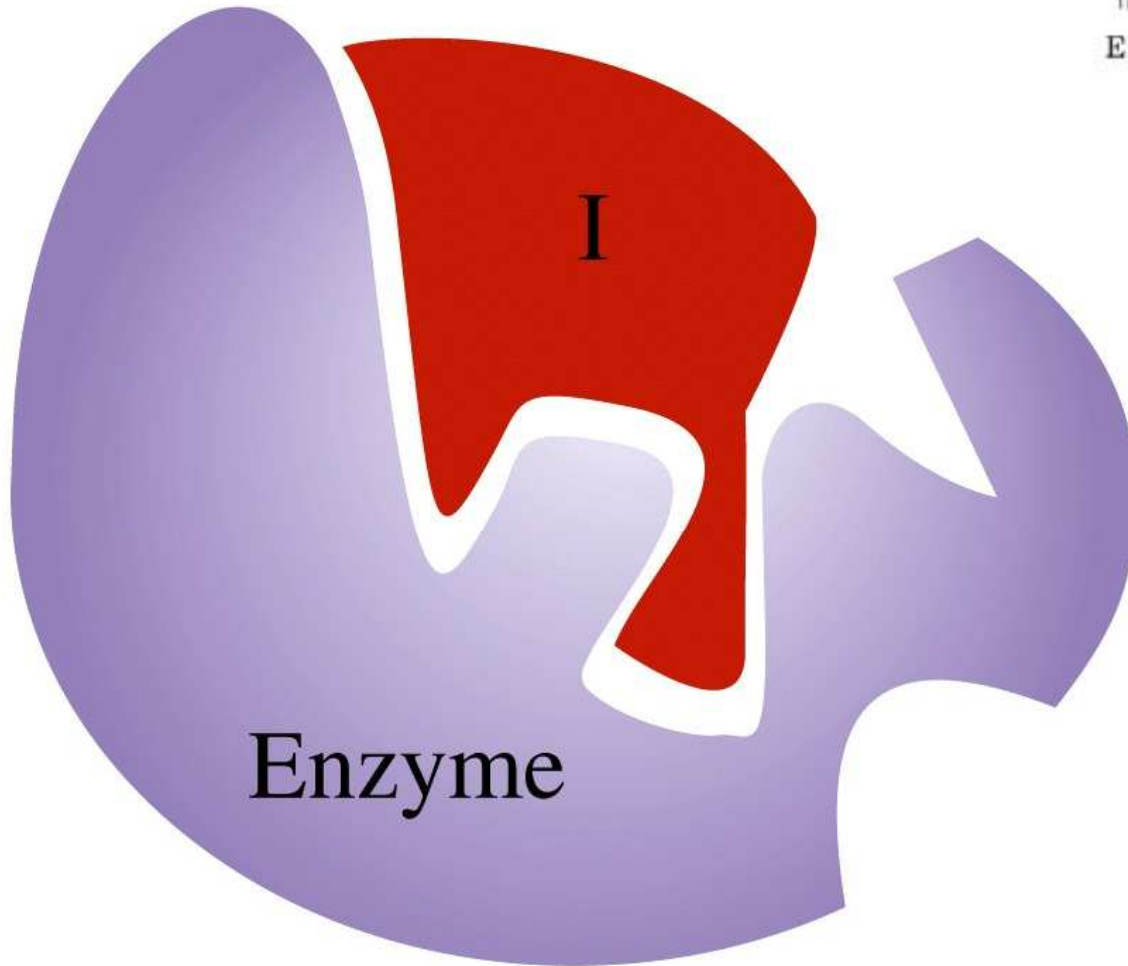


# Inaktivace Ser diisopropylfosfofluoridem (**DIPF**)



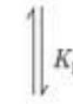
- Reverzibilní inhibice

*Kompetitivní inhibice*

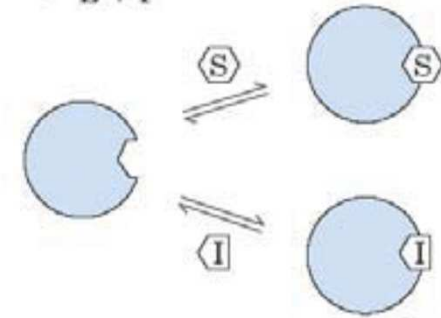


+

I

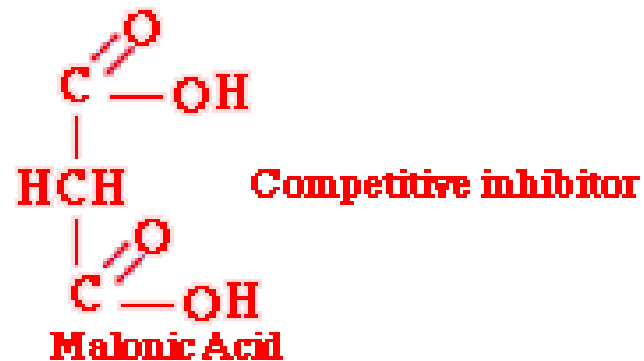
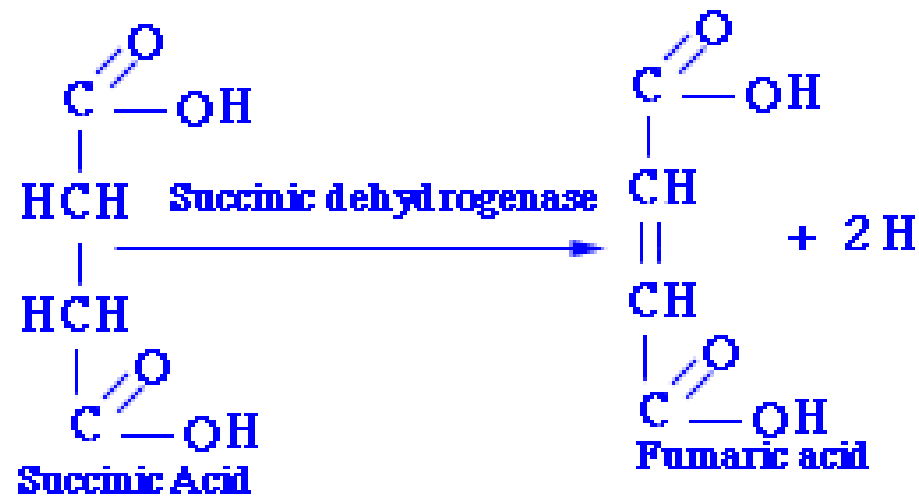


EI



Competitive  
(inhibitor binds  
in active site)

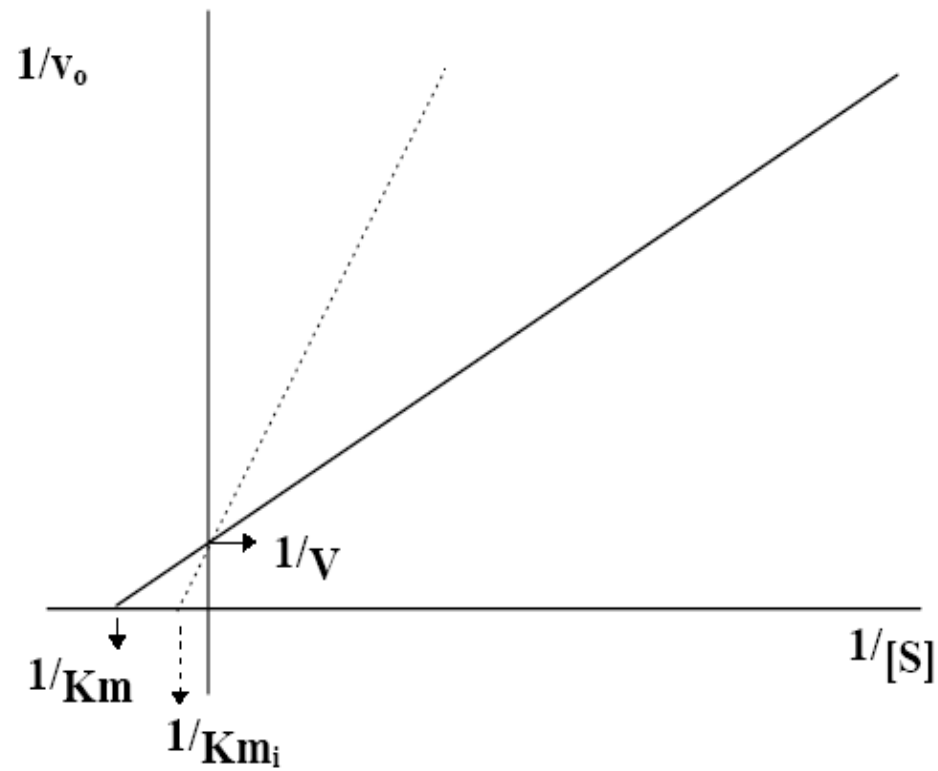
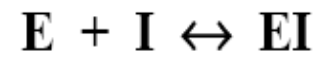
# Inhibice SDH malonátem



$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

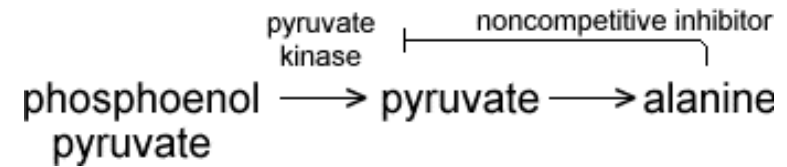
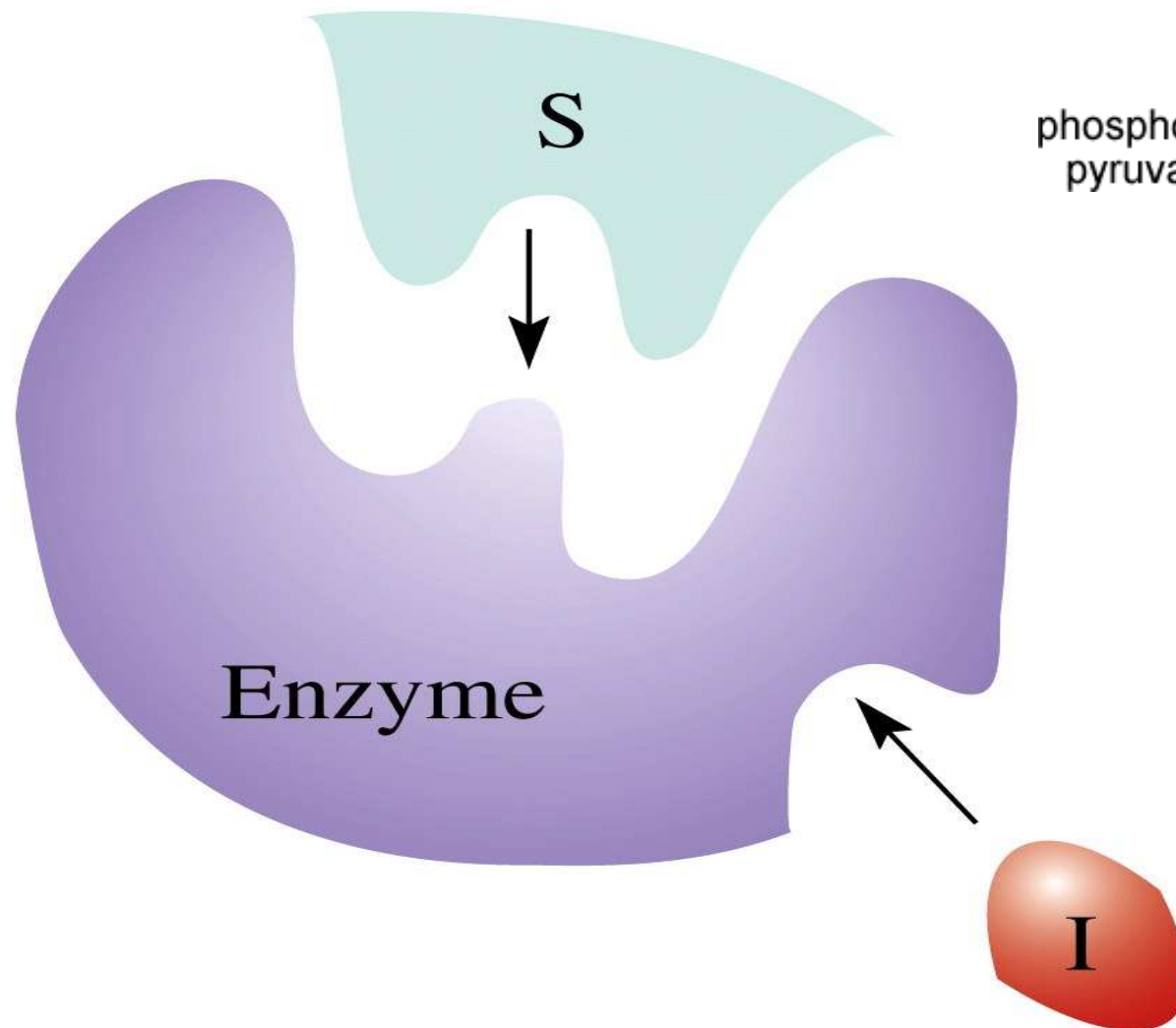
- Reverzibilní inhibice

*Kompetitivní inhibice*



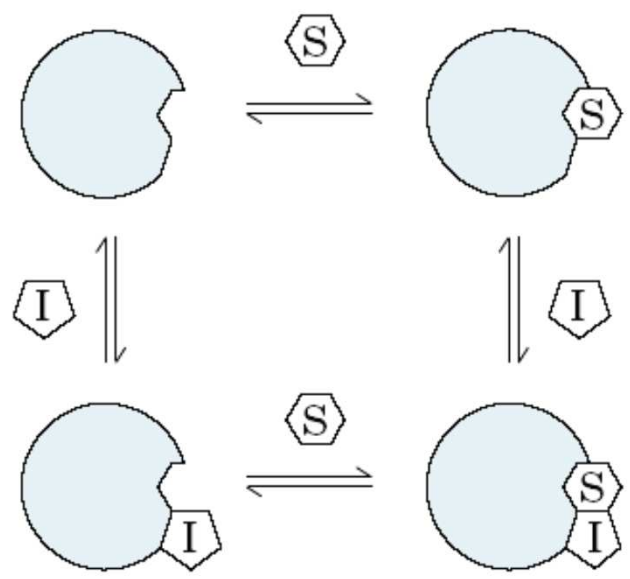
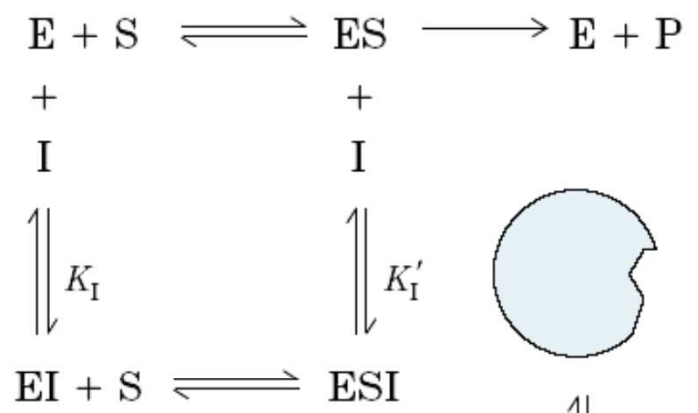
$$K_{m_i} > K_m \quad V_i = V$$

## *Nekompetitivní inhibice*



Noncompetitive  
(inhibitor binds  
at another site)

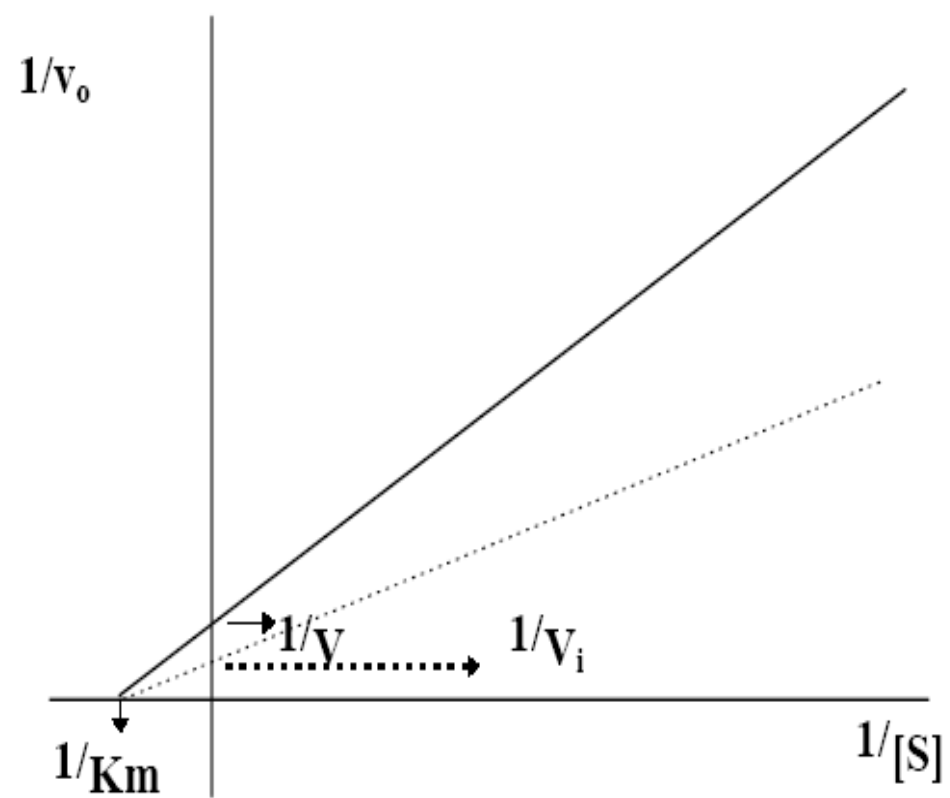




čistá

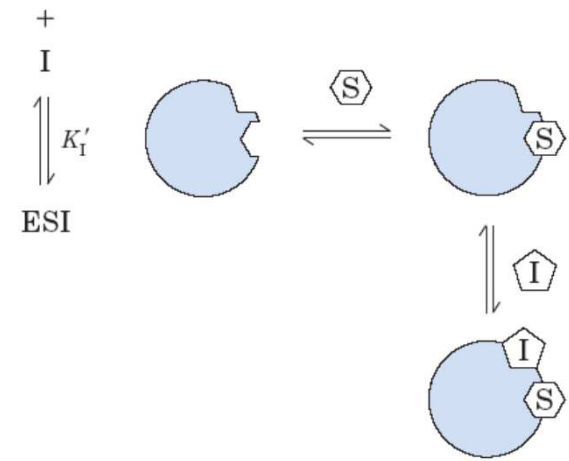
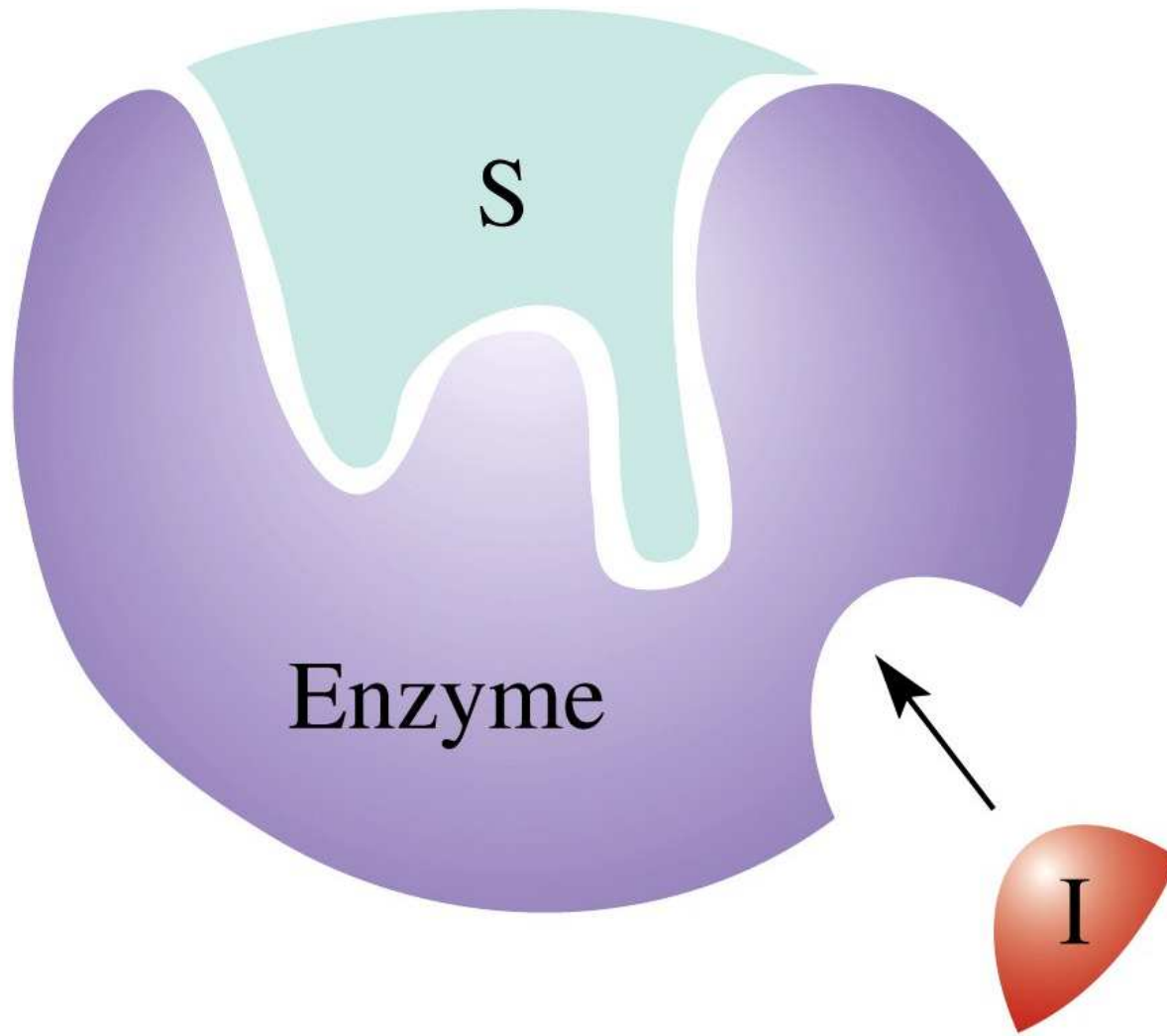
směsná

## *Nekompetitivní inhibice*



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

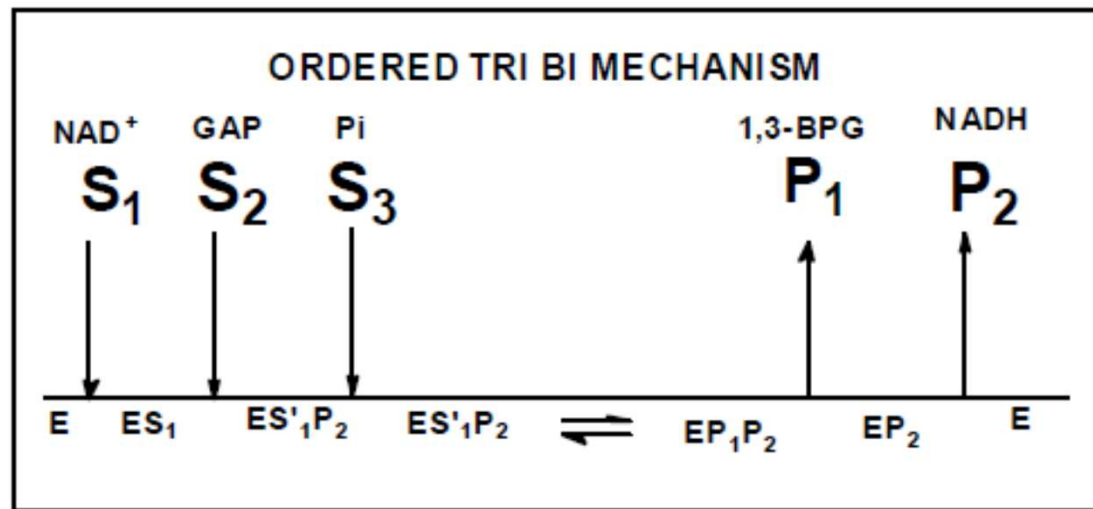
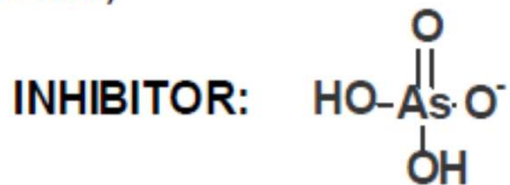
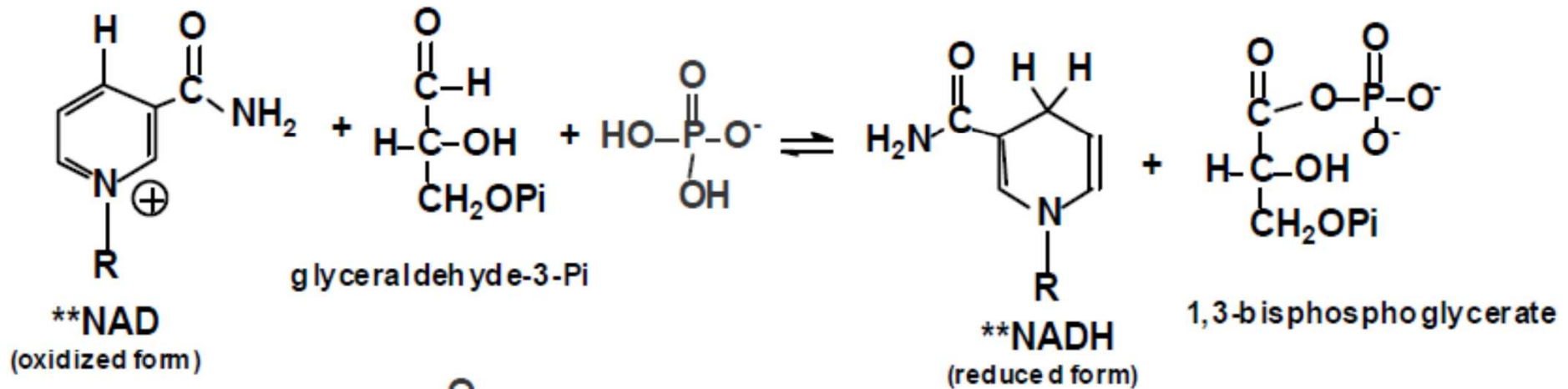
*Akompetetivní inhibice*



Uncompetitive  
(inhibitor binds  
after S binding)

# *Akompetitivní inhibice*

## GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE



**Table 5.5****Kinetic characteristics of reversible inhibition**

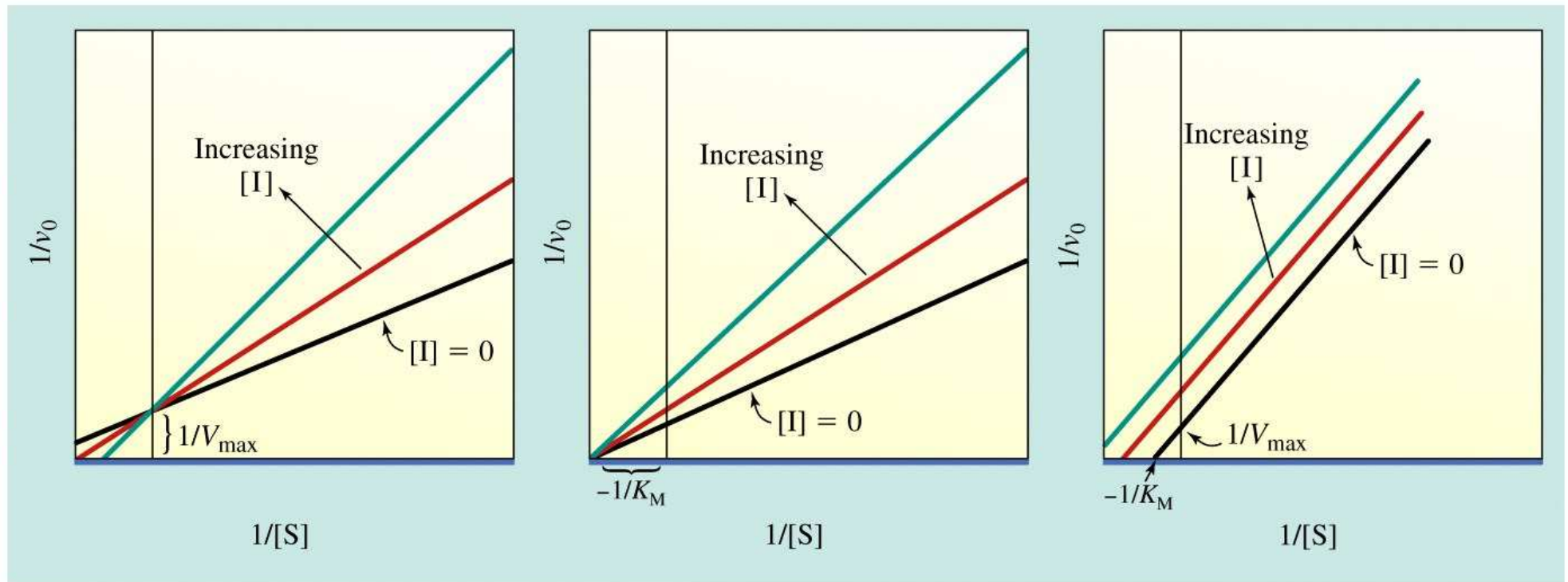
Type of Inhibition	<i>Effect of Inhibition<sup>a</sup></i>		
	$K_M$	$V_{\max}$	$K_M/V_{\max}$ (slope)
Competitive	Higher	Same	Increase
Uncompetitive	Lower	Lower	Same
Noncompetitive			
* Pure	Same	Lower	Increase
** Mixed	Higher	Lower	Increase

<sup>a</sup> Compared to uninhibited reaction.

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

**\*Inhibitor se váže mimo vazebné místo ( $K_{ii} = K_{is} \equiv K_i$ )**

**\*\*Inhibitor se váže částečně na i mimo vazebné místo ( $K_{ii} \neq K_{is}$ )**



(a) Competitive inhibition

(b) Noncompetitive inhibition

(c) Uncompetitive inhibition

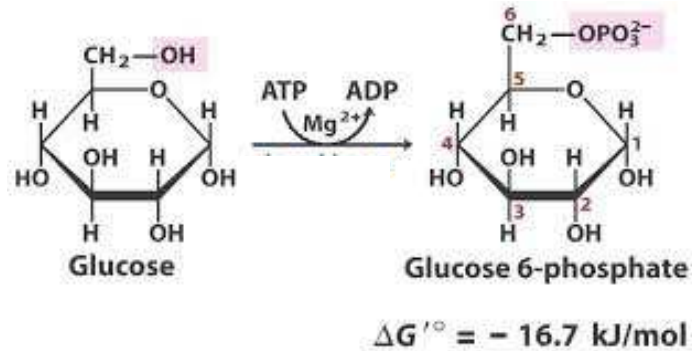
## Regulace činnosti enzymu

- **Regulace kinetikou**
- Regulace koncentrace enzymu
- Allostेरická regulace MONOD 1963
- Regulace zpětnou vazbou
- Regulace kovalentní modifikací
- Kompartmentace

# Regulace kinetikou enzymu

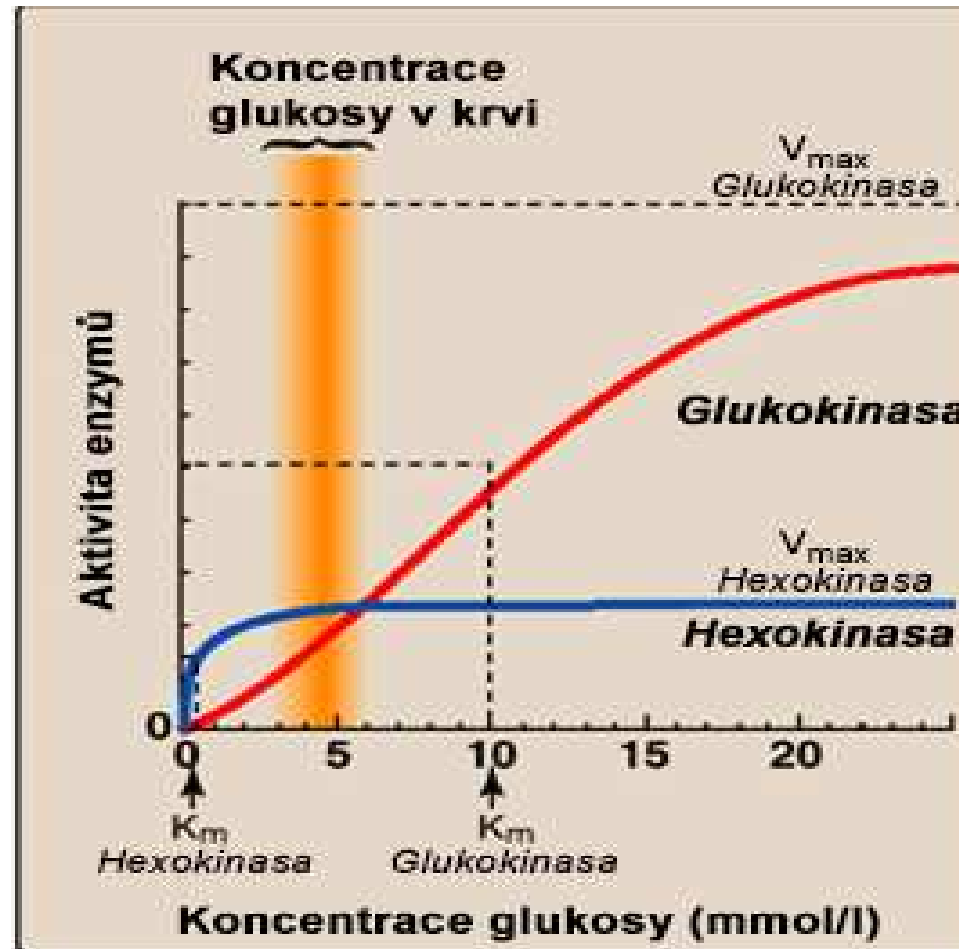
ostatní  
hexokinasa

játra  
glukokinasa



$K_m = 0,1 \text{ mM}$

$K_m = 10 \text{ mM}$

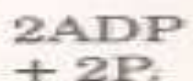




# GLYKOLÝZA



glukosa



fruktosa-1,6-bisfosfát



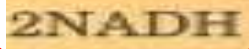
2 pyruvát

anaerobní mléčné kvašení

aerobní oxidace

anaerobní alkoholové kvašení

CITRÁTOVÝ CYKLUS



$\downarrow \text{pH}$



2 laktát

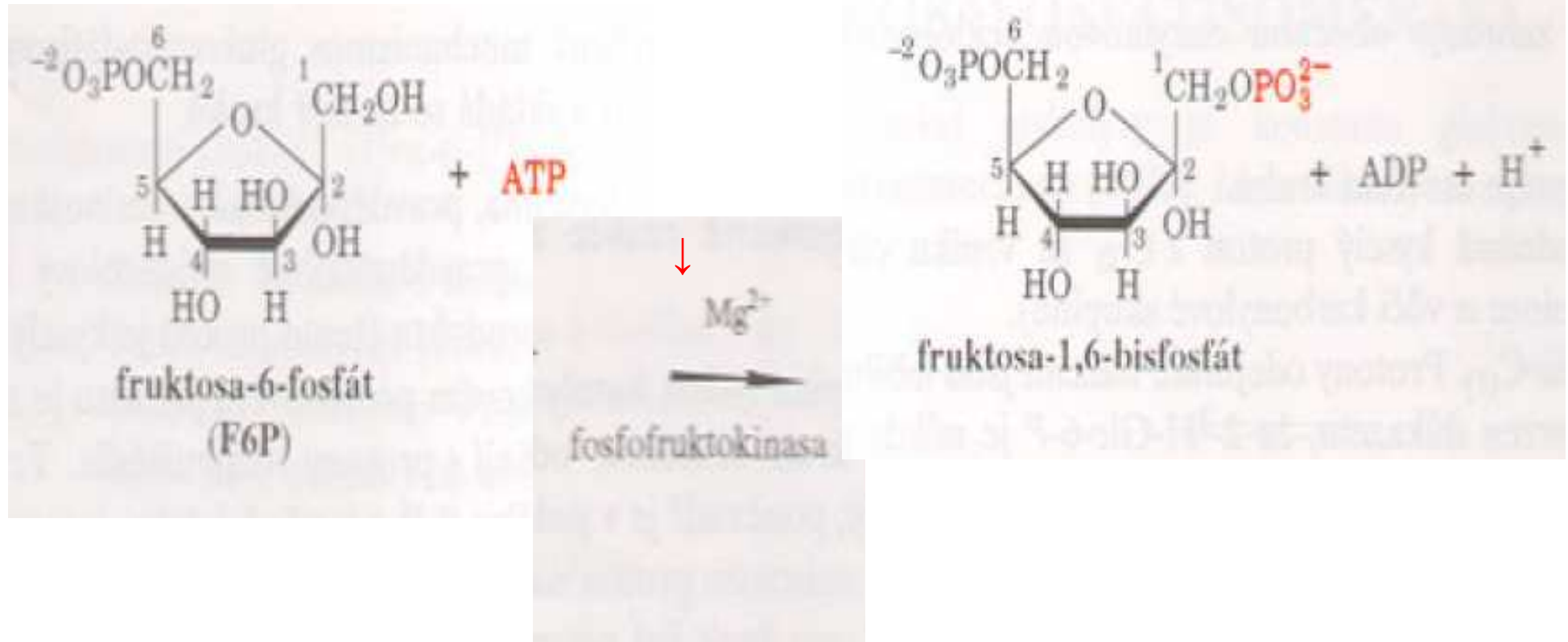
$6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$

$2\text{CO}_2 + 2\text{ethanol}$

oxidační fosforylace

# Fosfofruktokinasa

## regulace snížením pH



# GLYKOLÝZA

ATP +

glukosa

2ADP + 2P<sub>i</sub>

2NAD<sup>+</sup>

fruktosa-1,6-bisfosfát

2ATP

2NADH

2 pyruvát

anaerobní mléčné kvašení

aerobní oxidace

anaerobní alkoholové kvašení

CITRÁTOVÝ CYKLUS

2NADH

2NADH

6 O<sub>2</sub>

2NADH

2NAD<sup>+</sup>

2NAD<sup>+</sup>

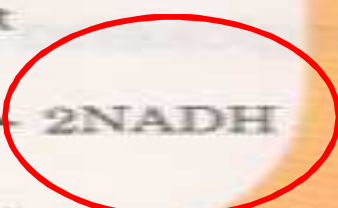
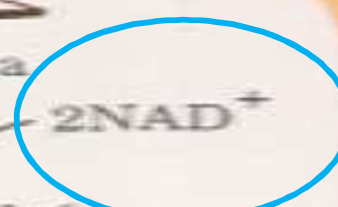
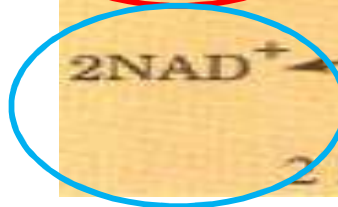
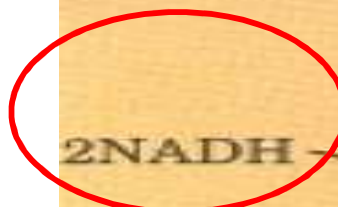
2NAD<sup>+</sup>

2 laktát

6CO<sub>2</sub> + 6H<sub>2</sub>O

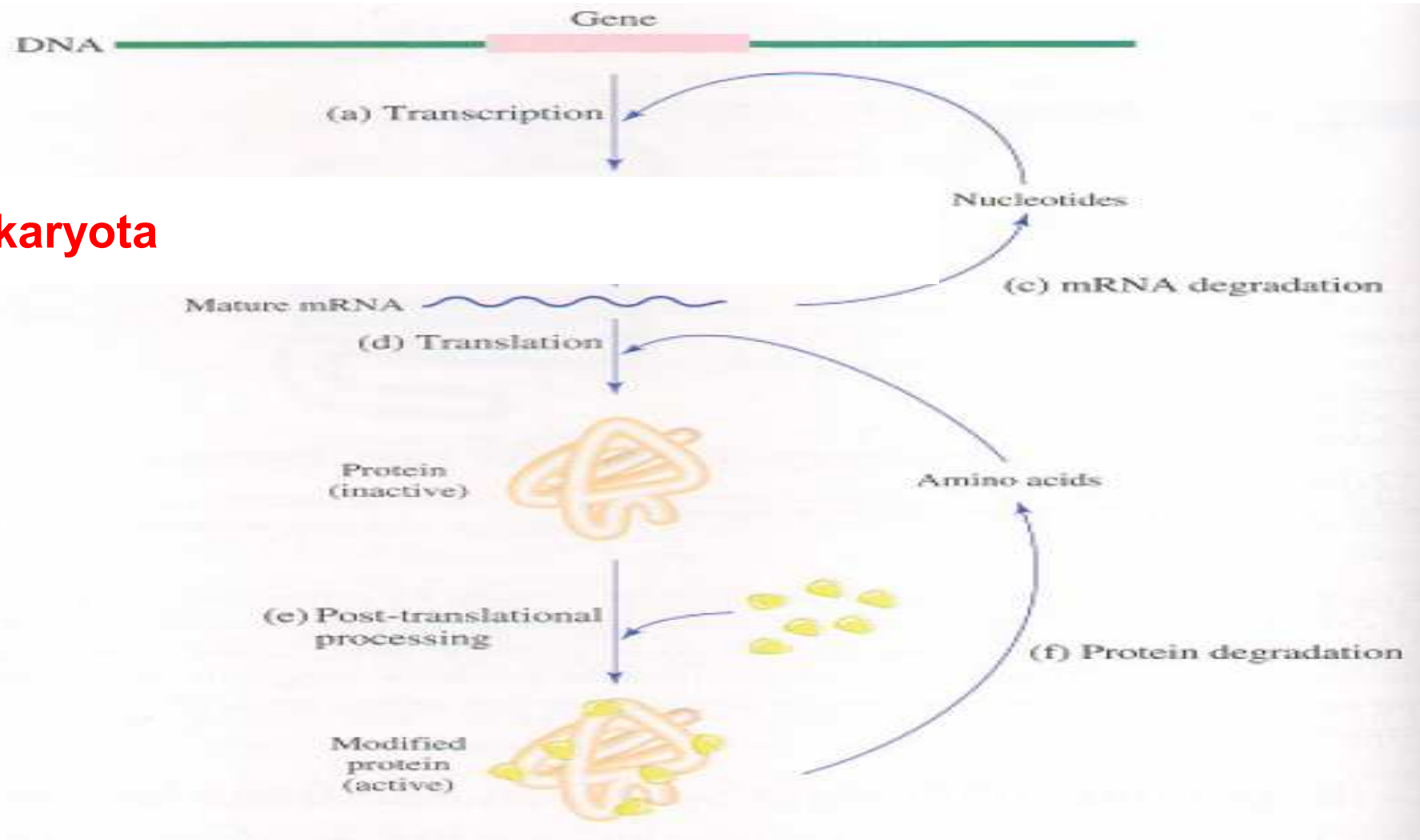
2CO<sub>2</sub> + 2 ethanol

↓ pH

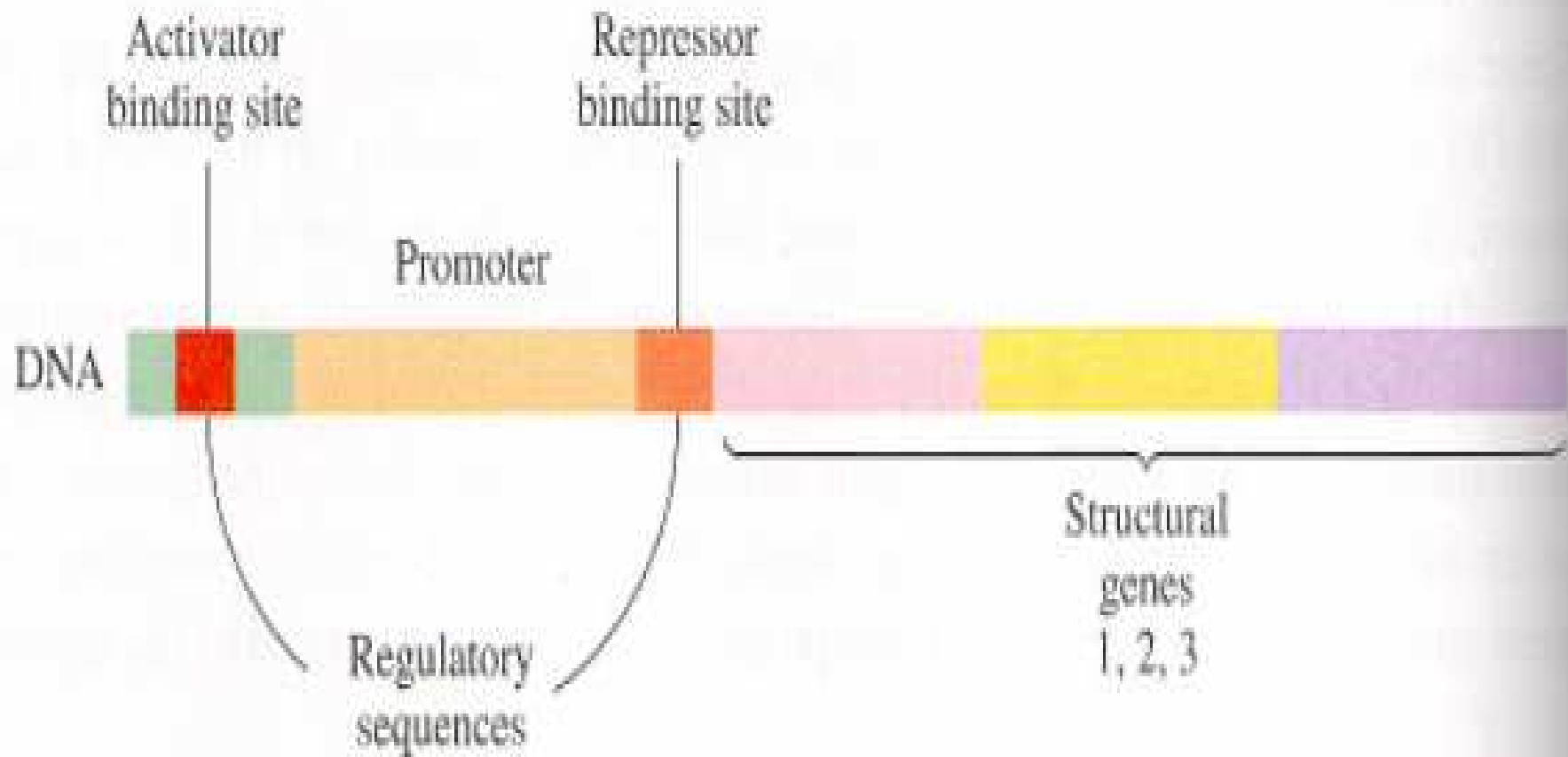


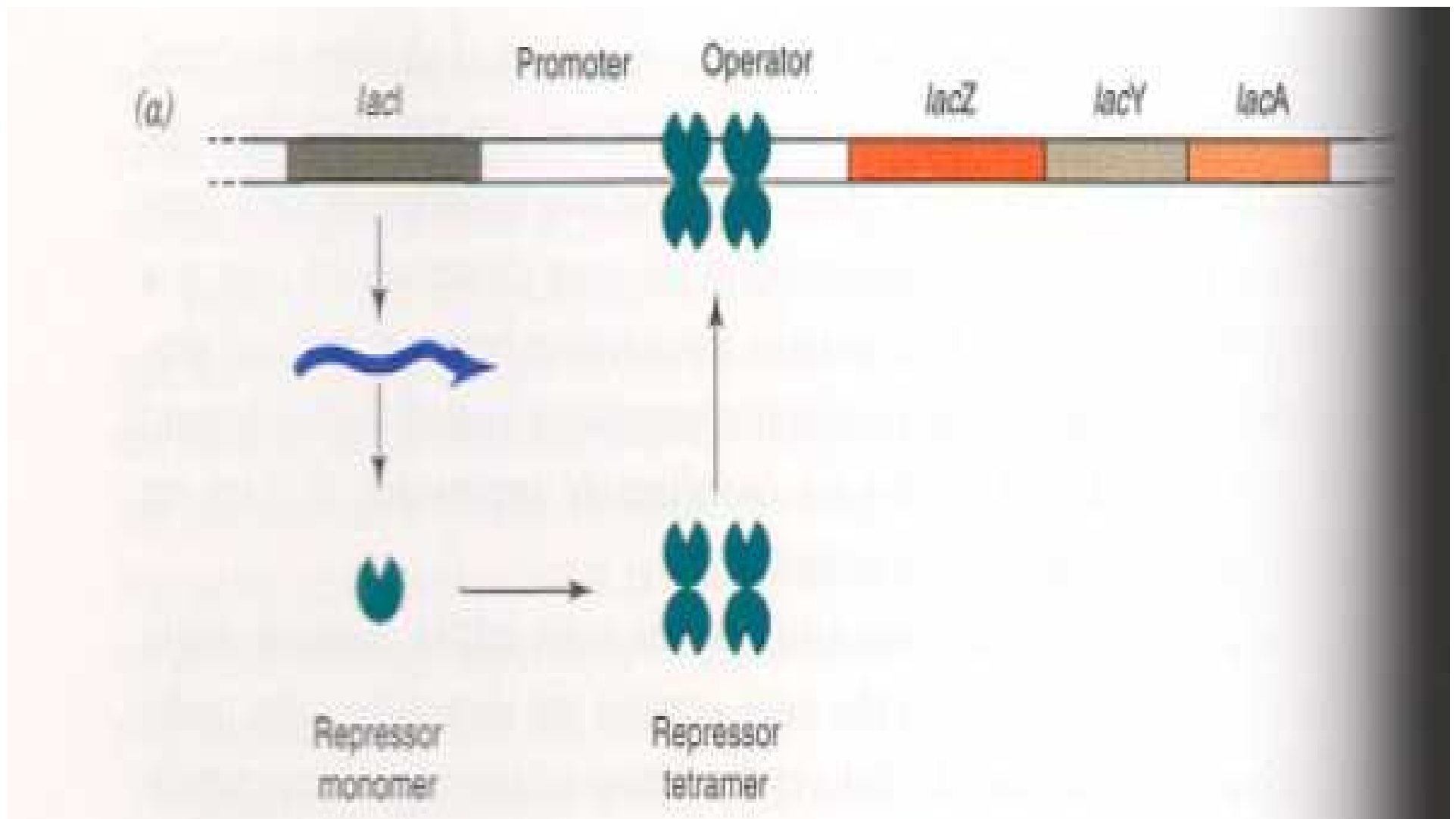
# Regulace koncentrací enzymu

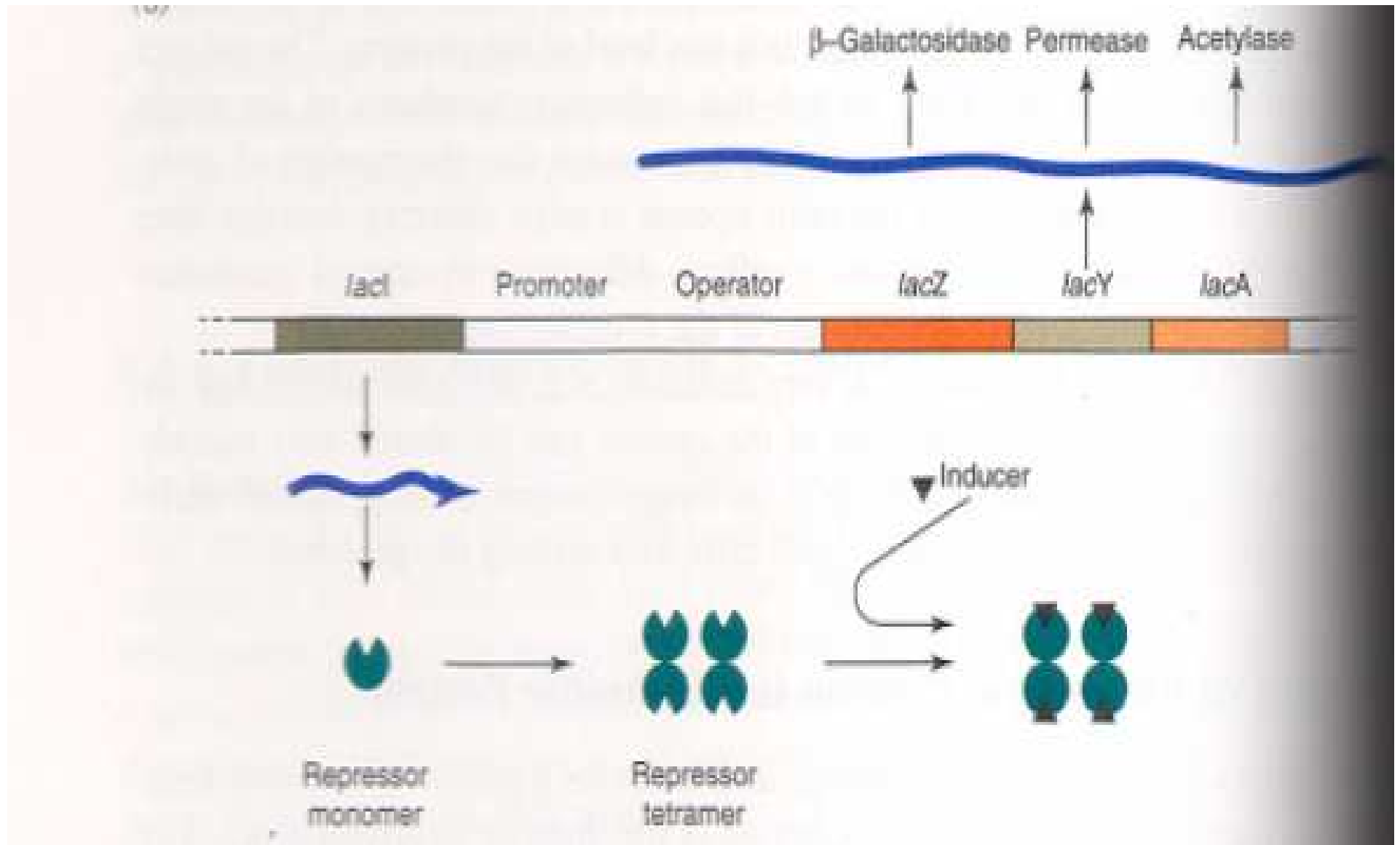
**Prokaryota**



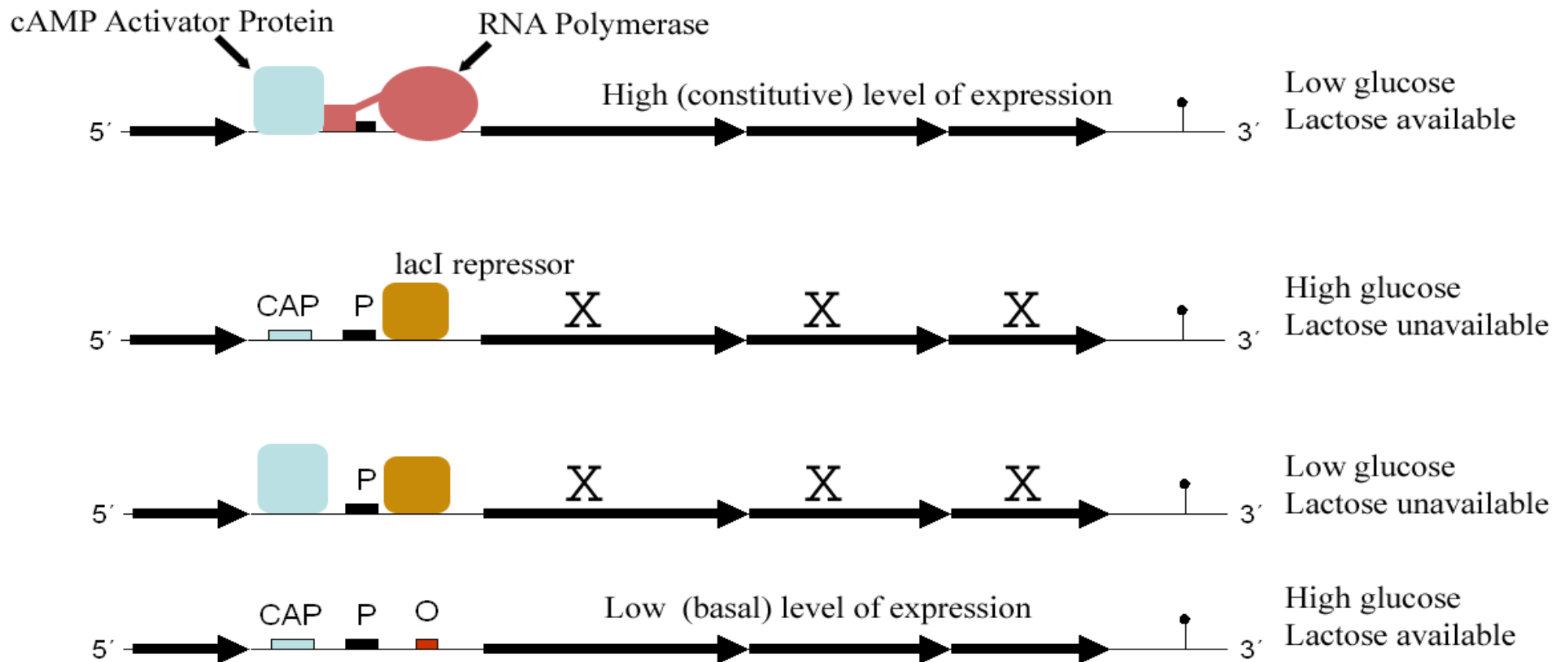
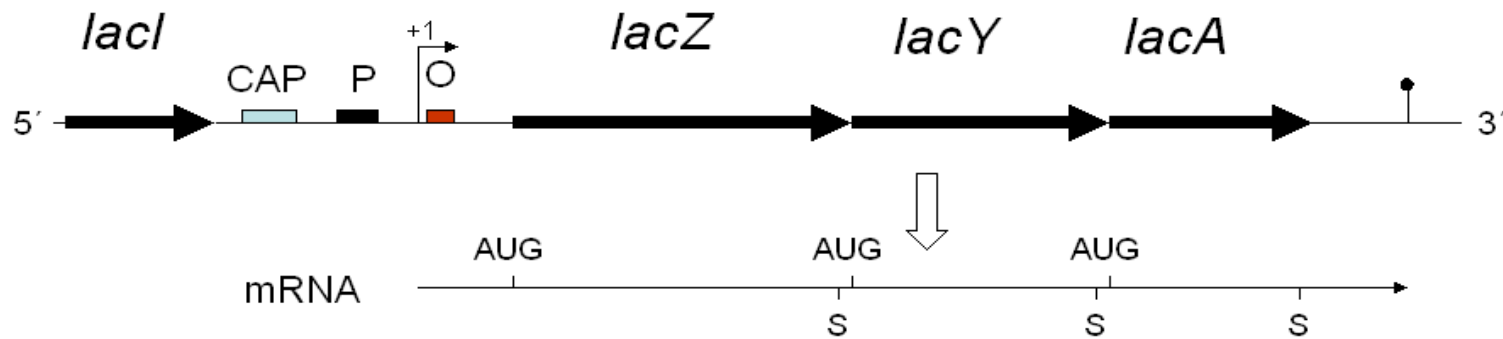
# Operonový model





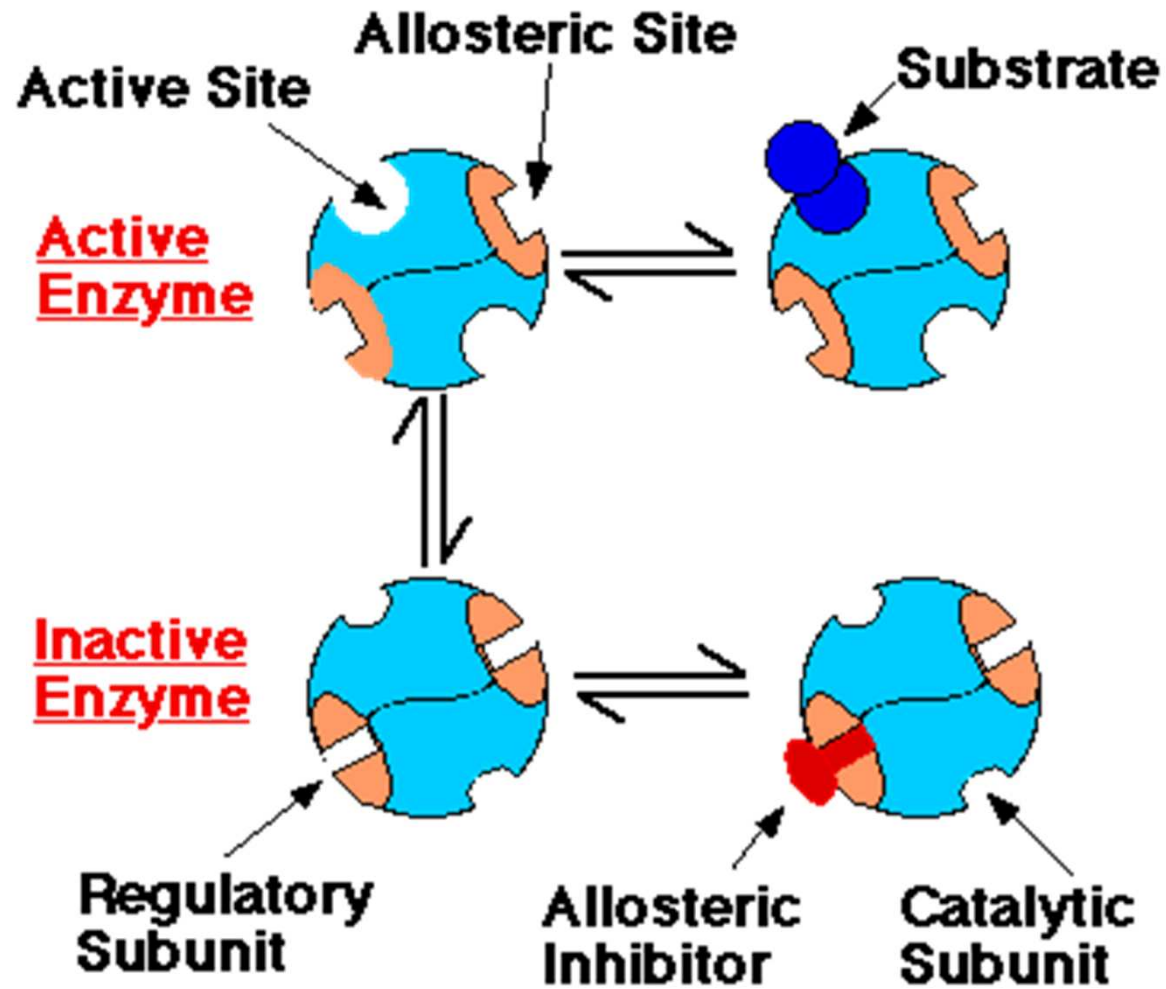


## The *lac* Operon and its Control Elements

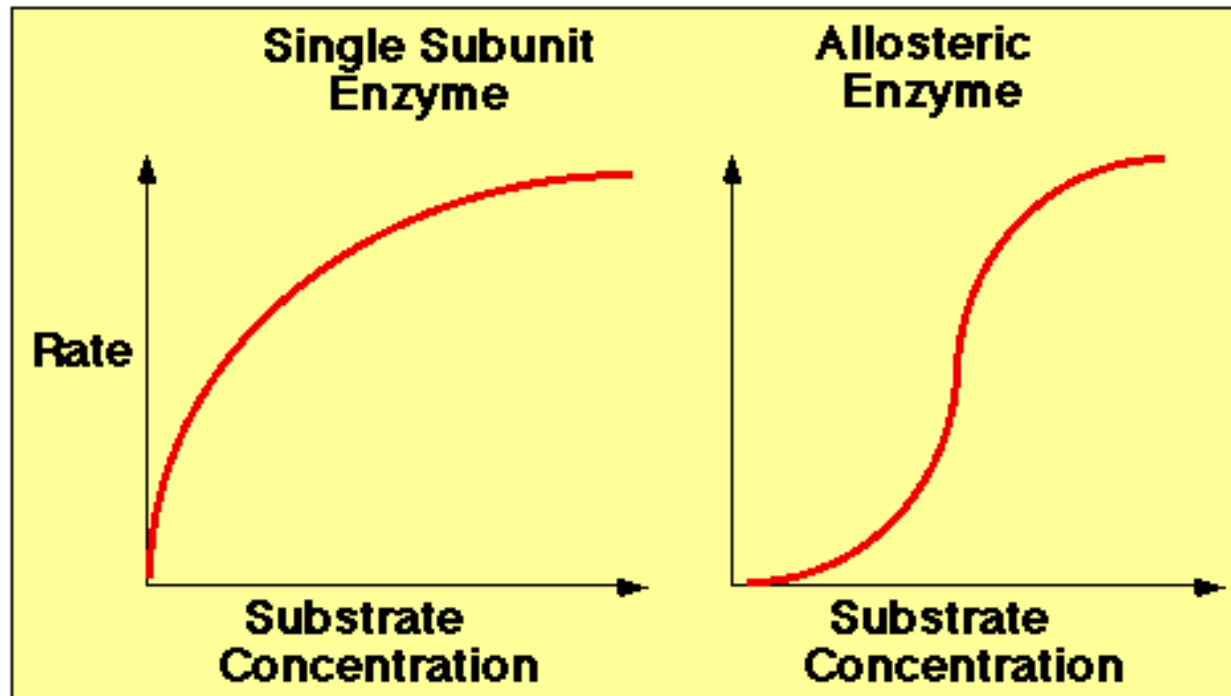




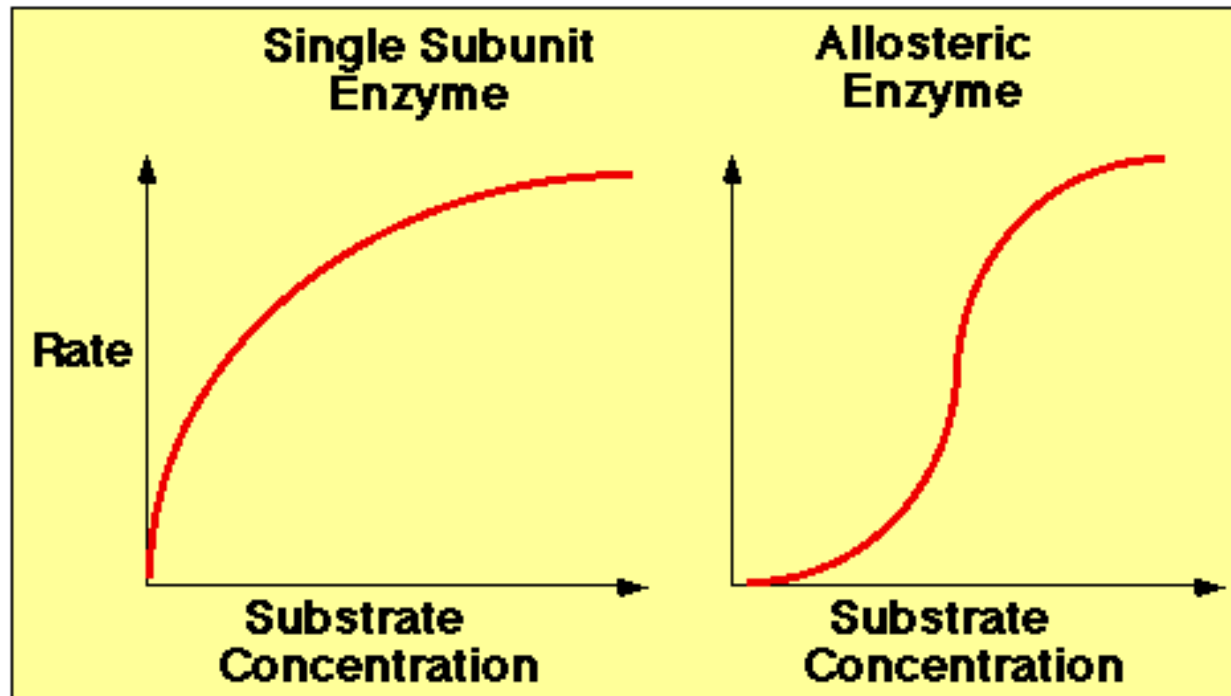
# Allosterie



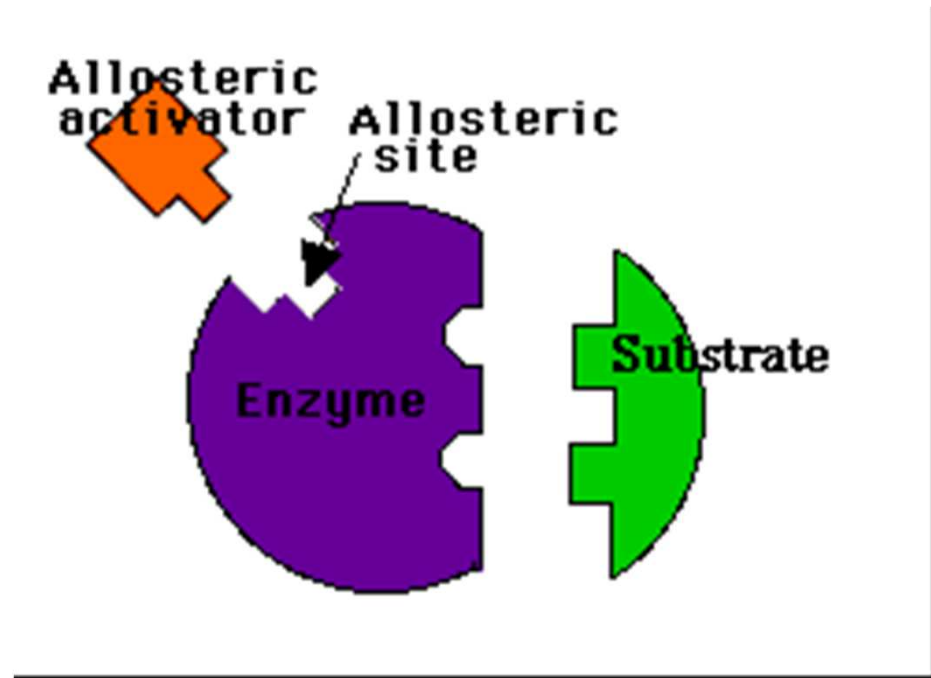
# Allosterie



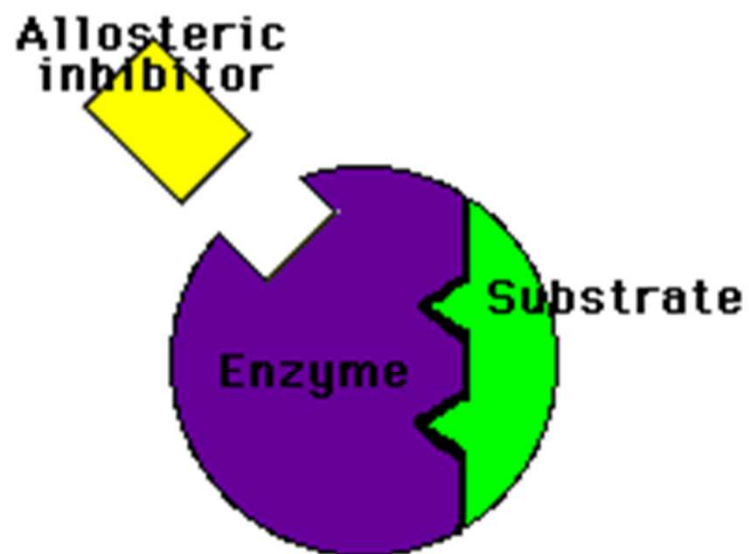
# Allosterie



# Allosterický aktivátor



# Allosterický inhibitor



# Symetrický model

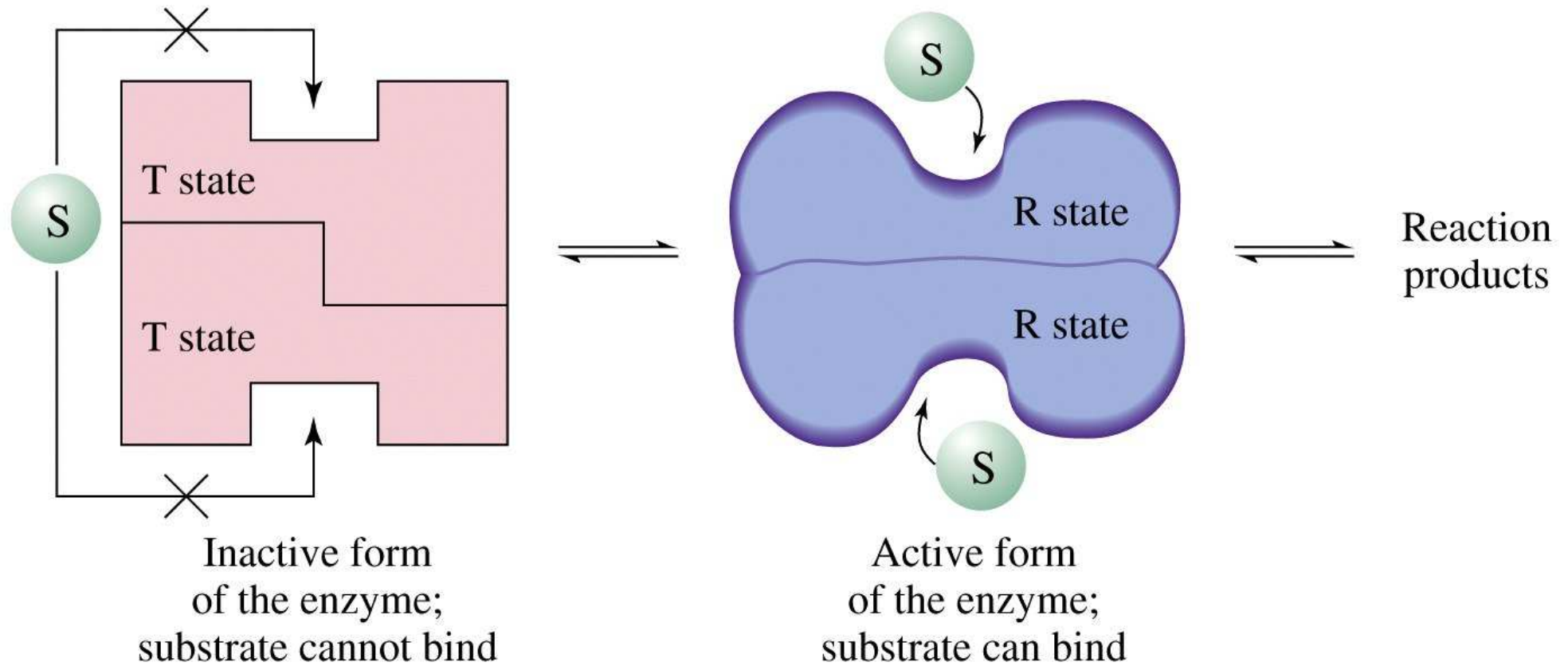


Figure 6-5 Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons

# Sekvenční model

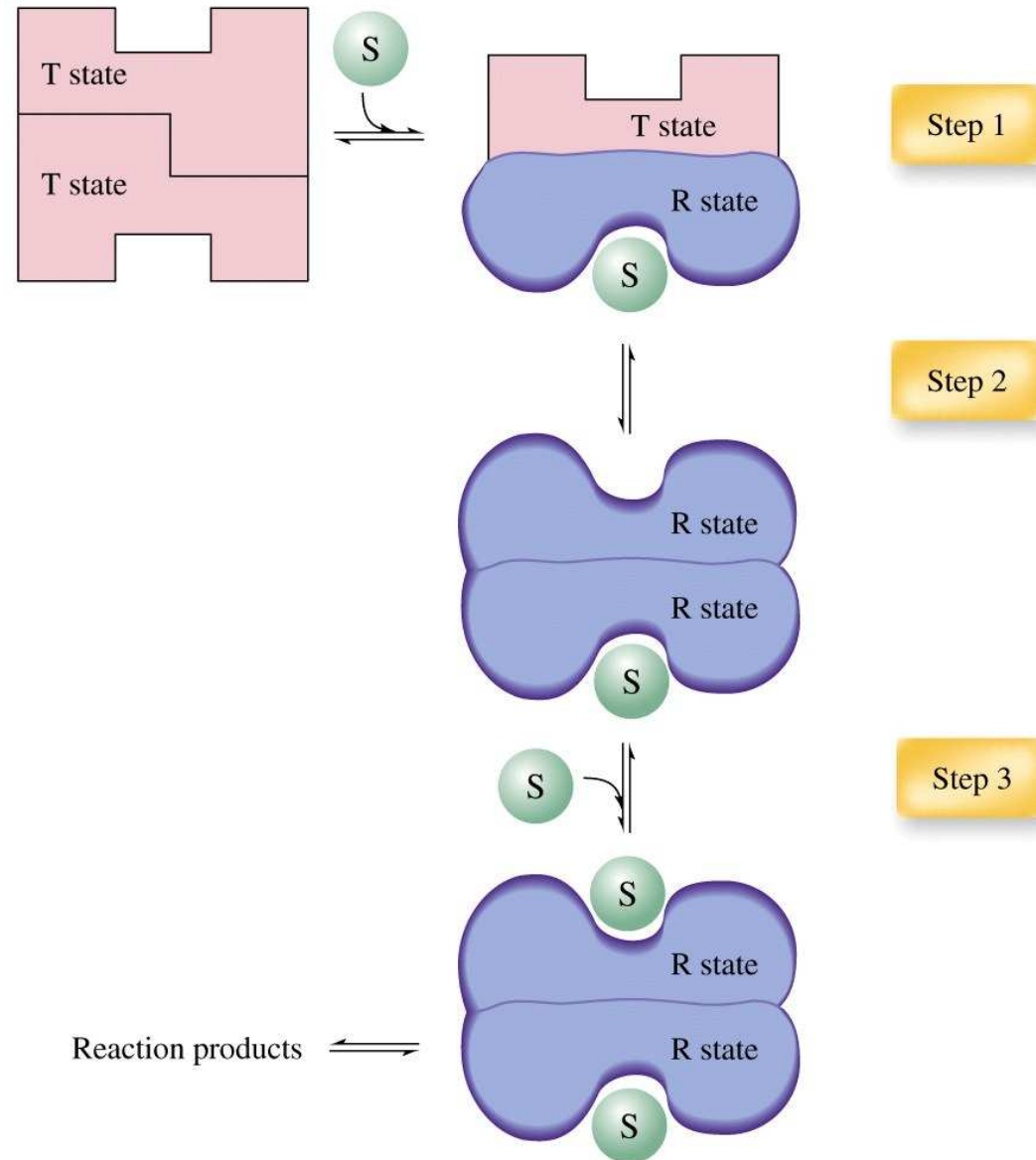
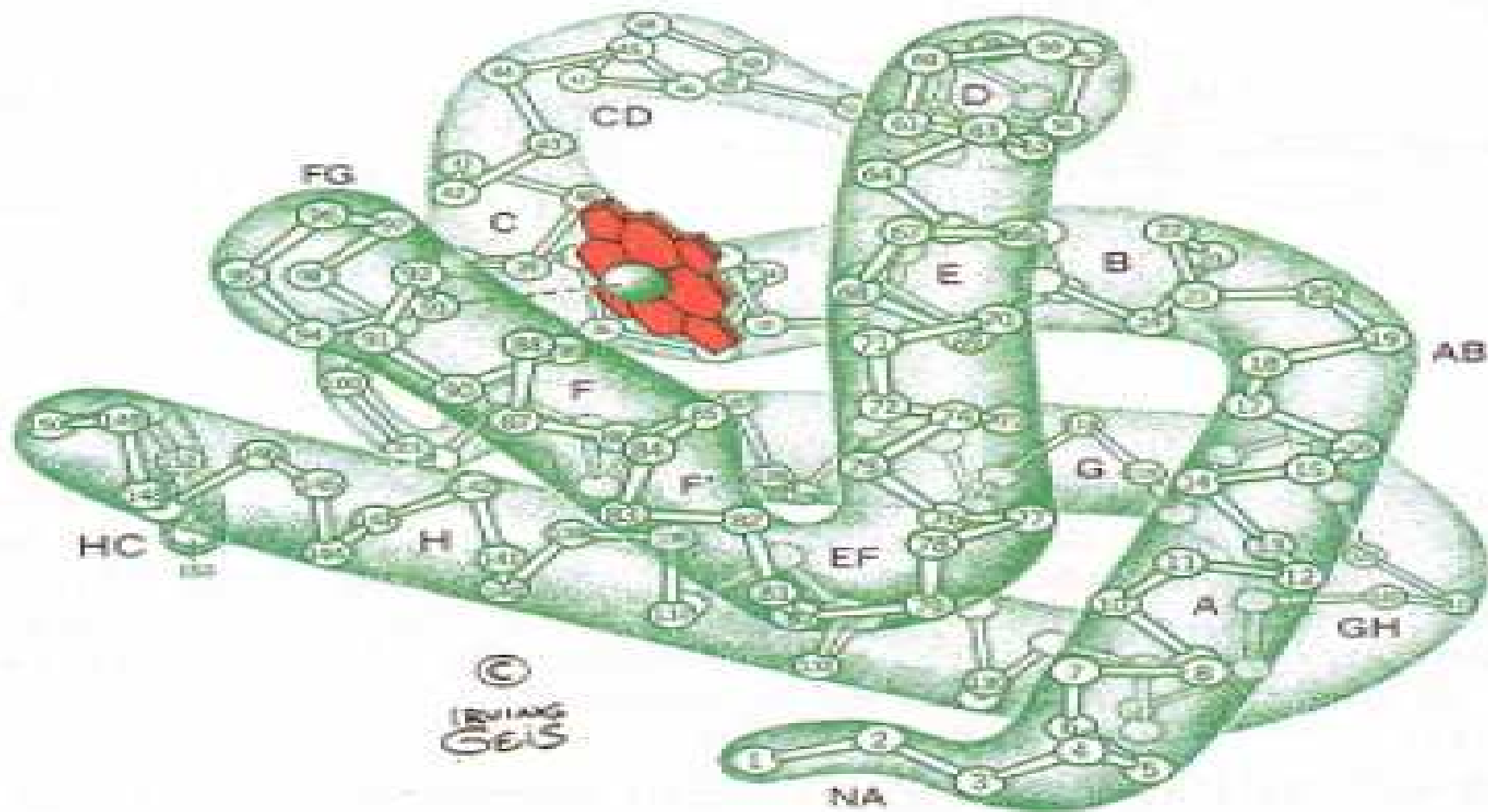


Figure 6-6 Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons

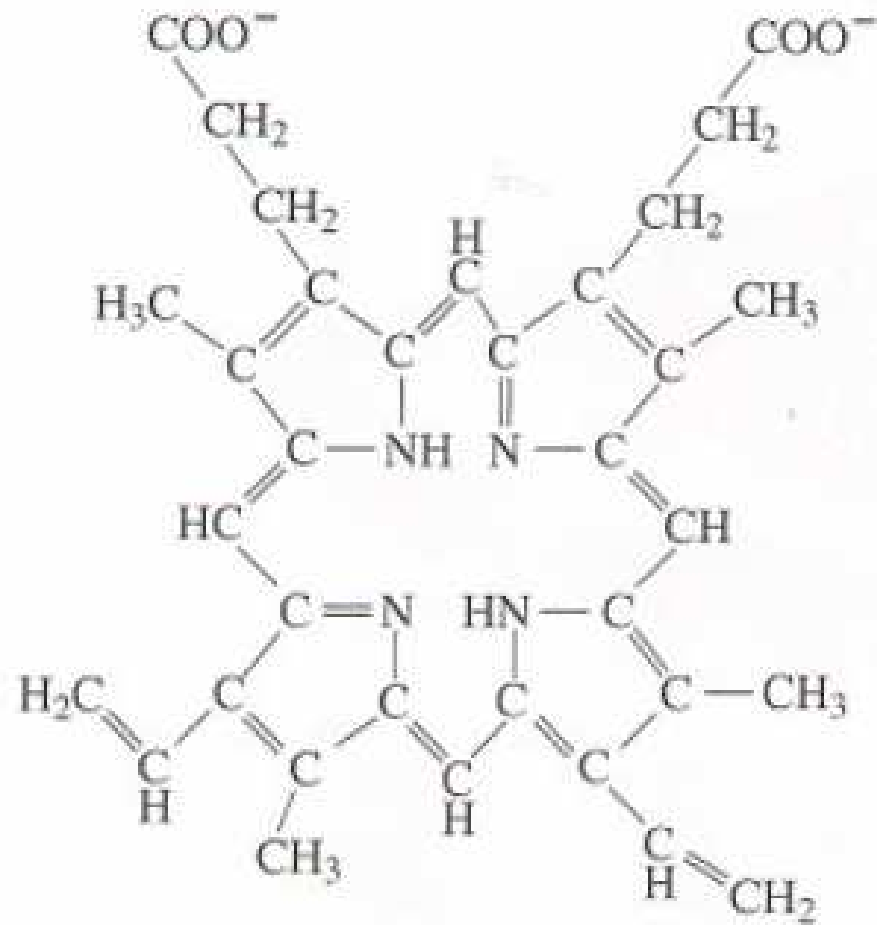




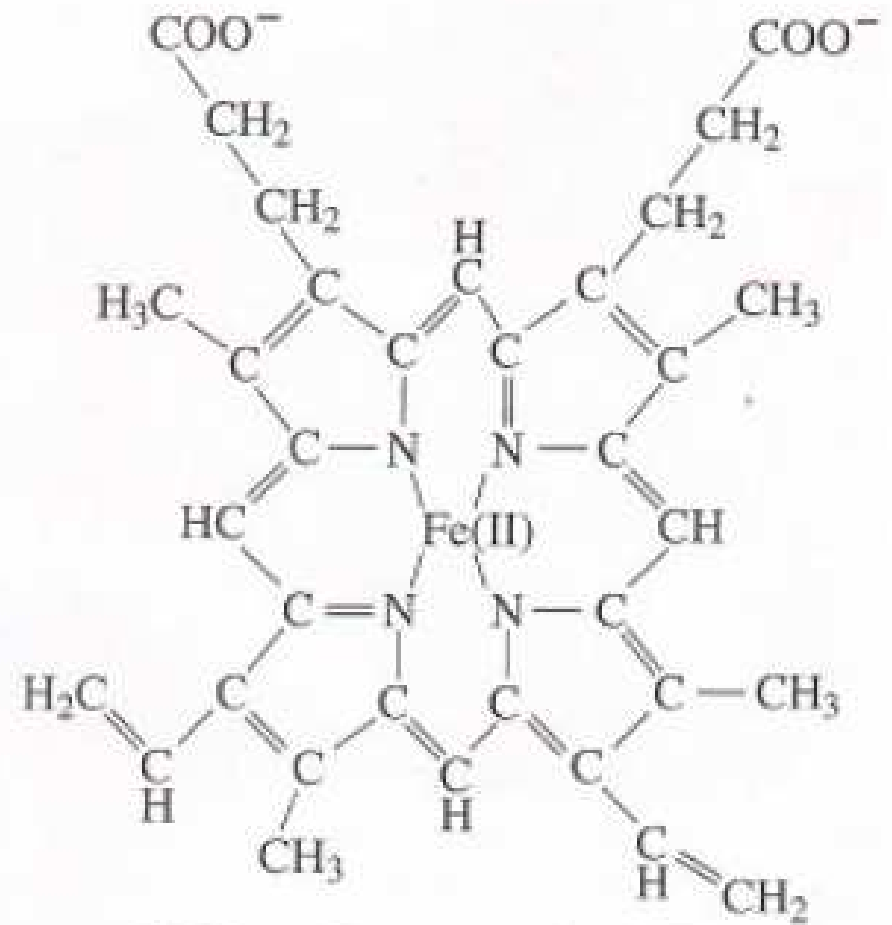
# Myoglobin



# Hem

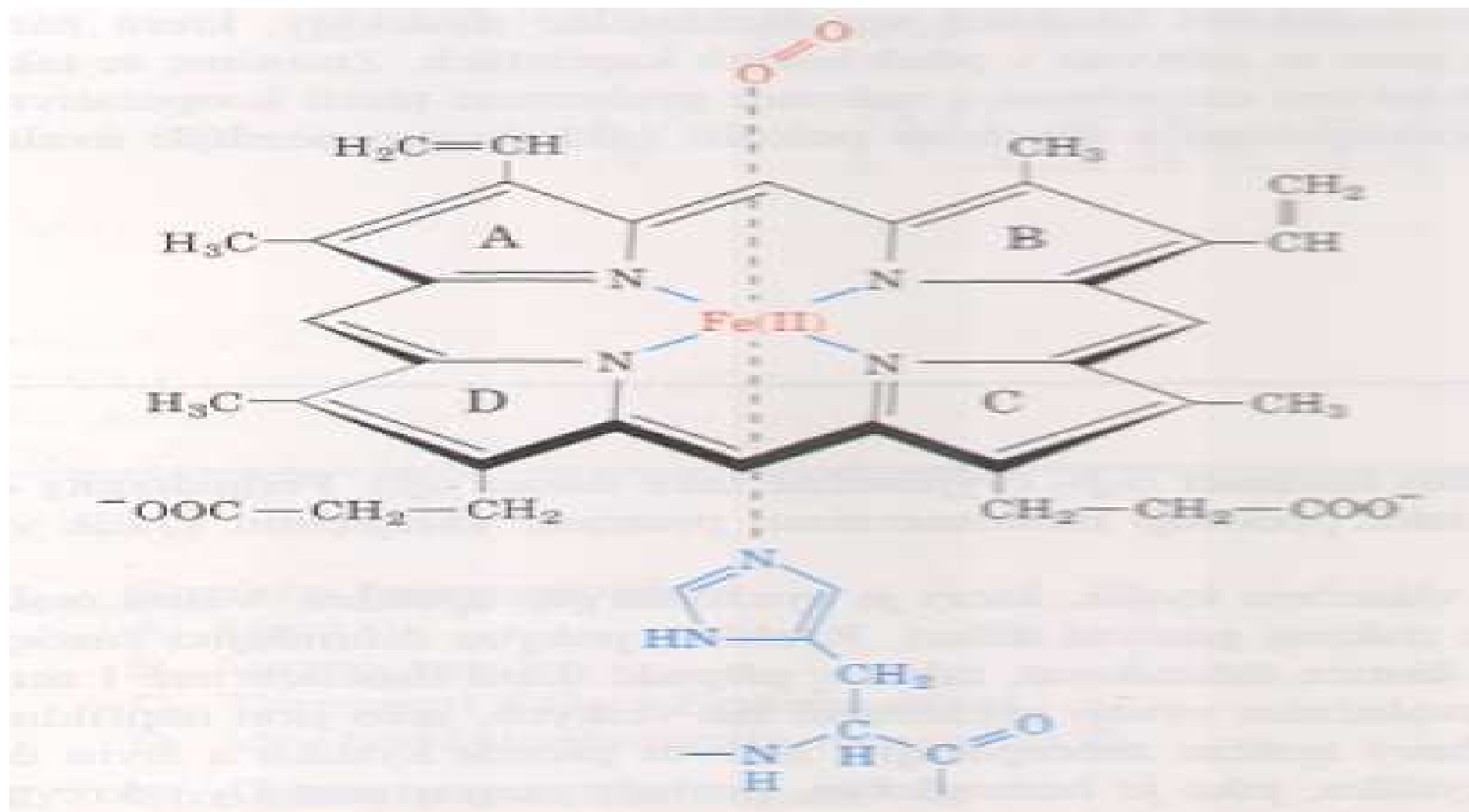


(a) Protoporphyrin IX

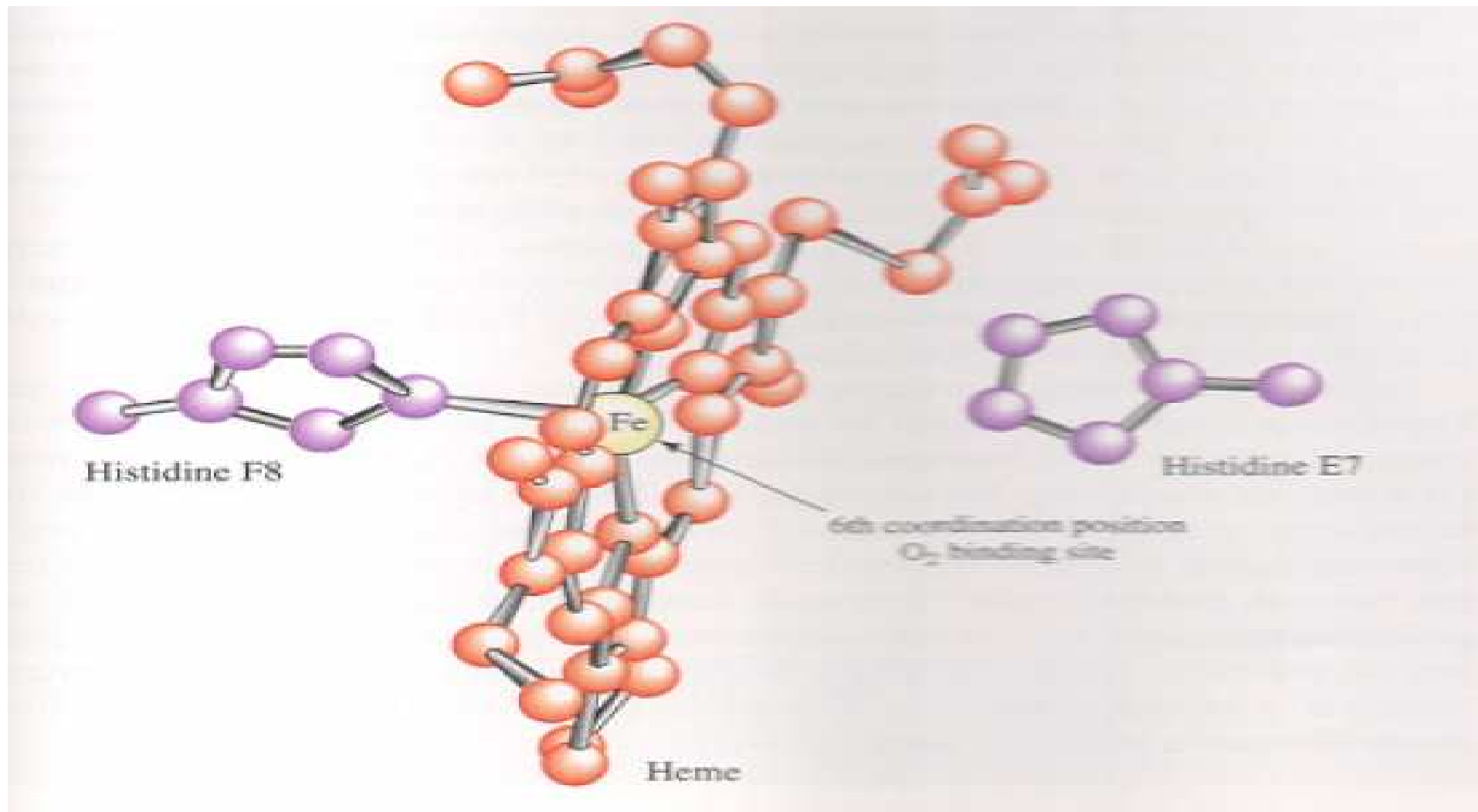


(b) Heme (Fe-protoporphyrin IX)

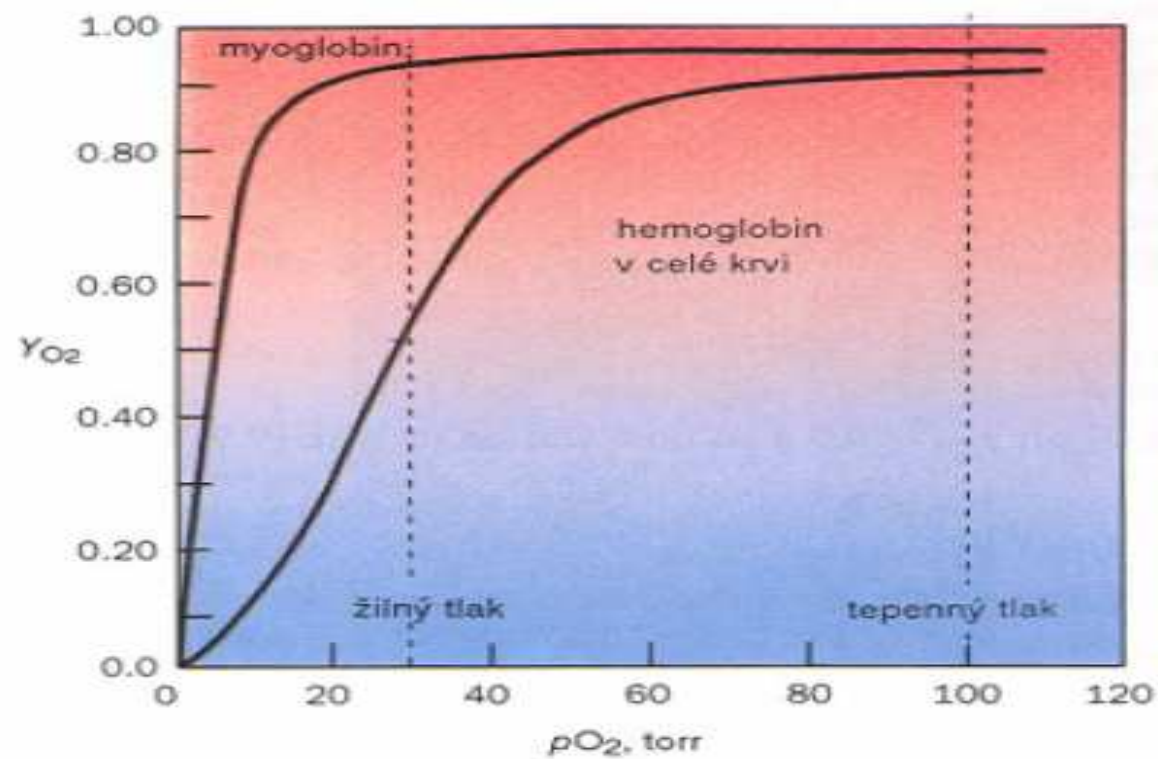
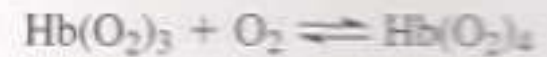
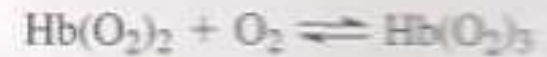
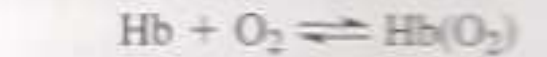
# Vazba O<sub>2</sub> na Hb



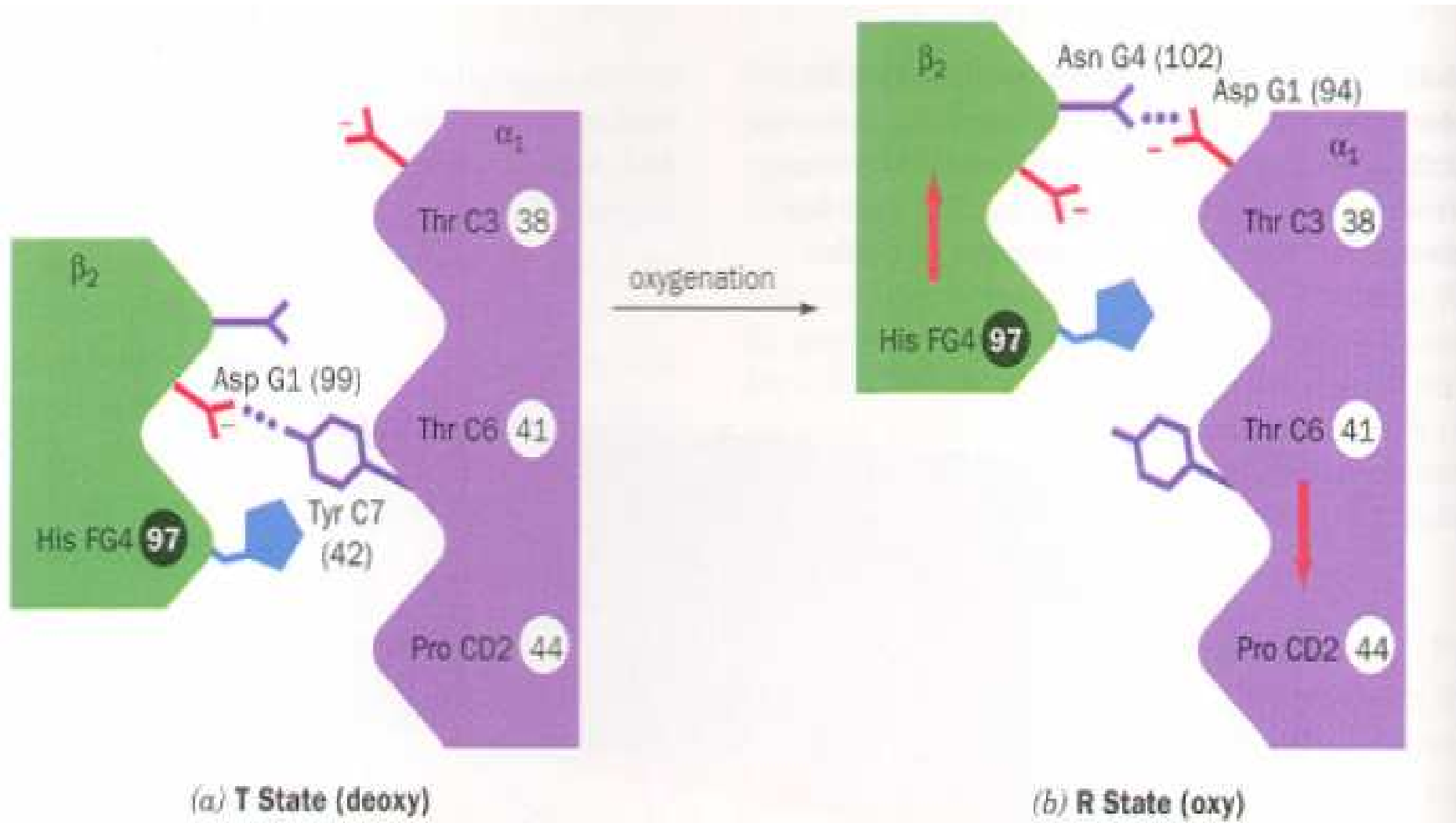
# Vazba $O_2$ na Hb



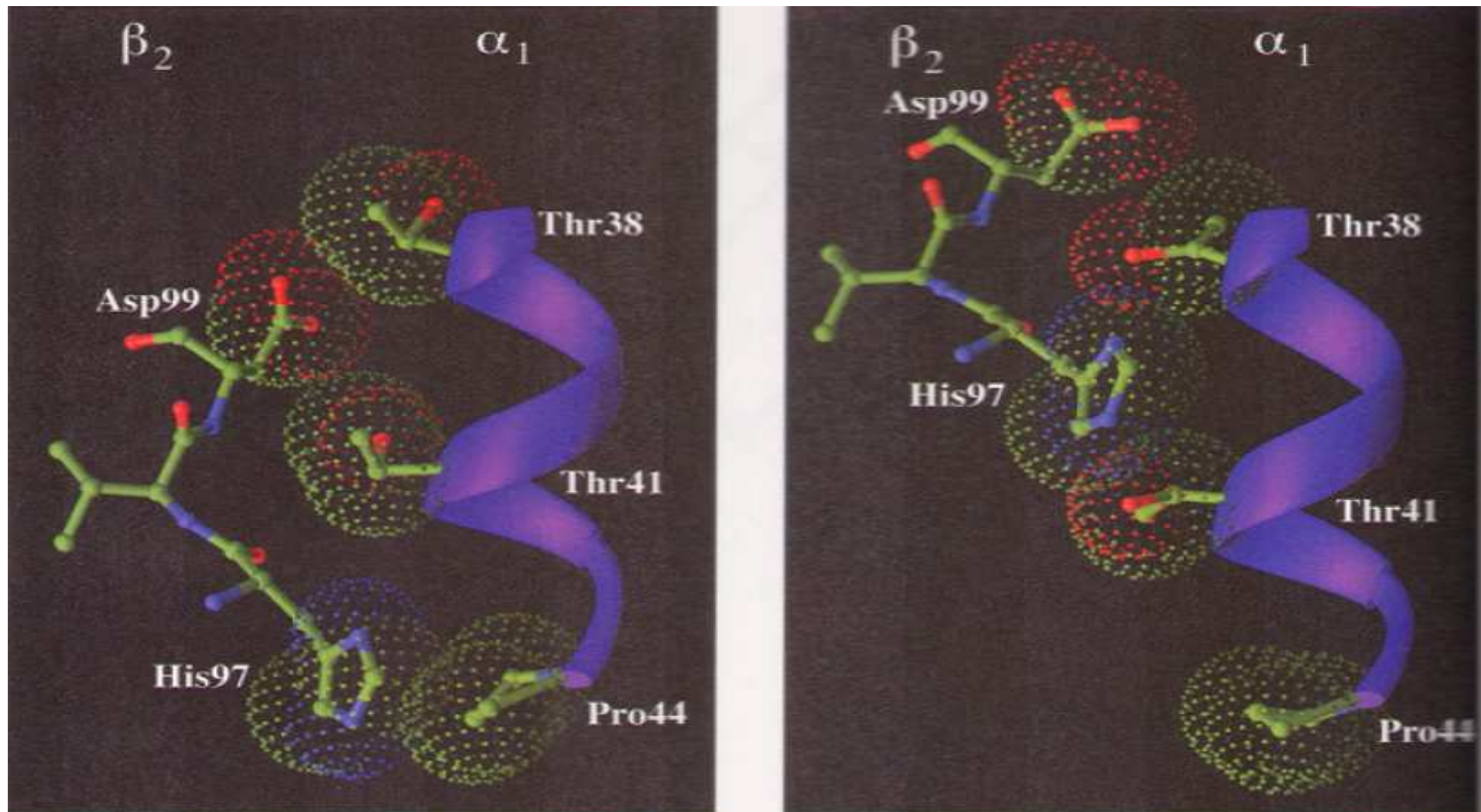
# Hb versus Mb



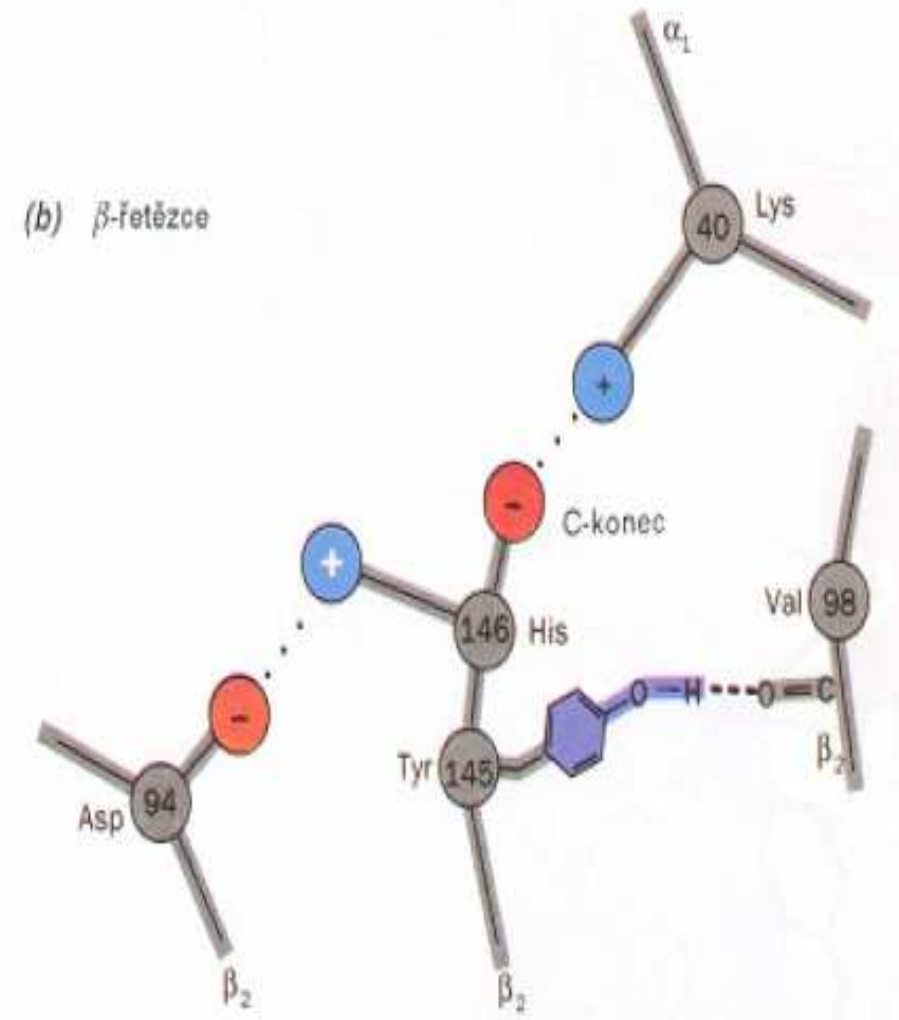
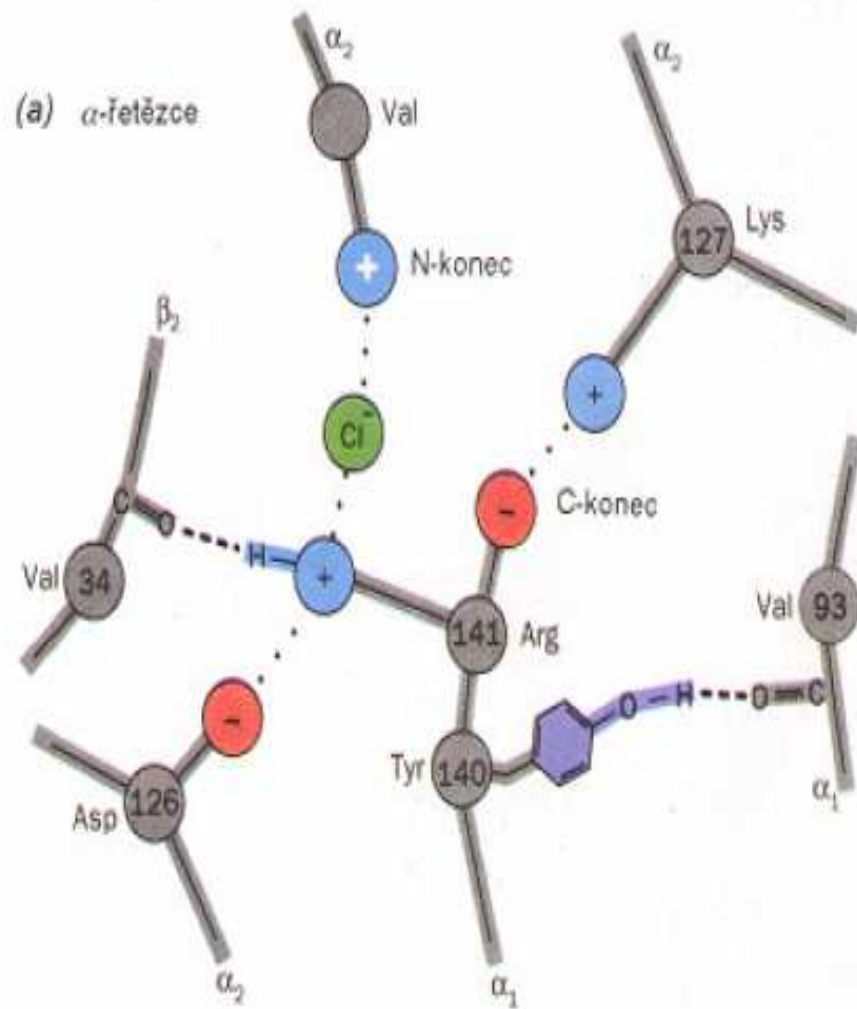
# Solné můstky



# Solné můstky

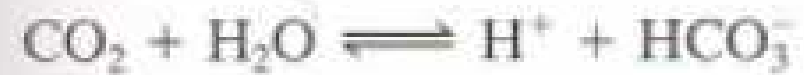


# Solné můstky

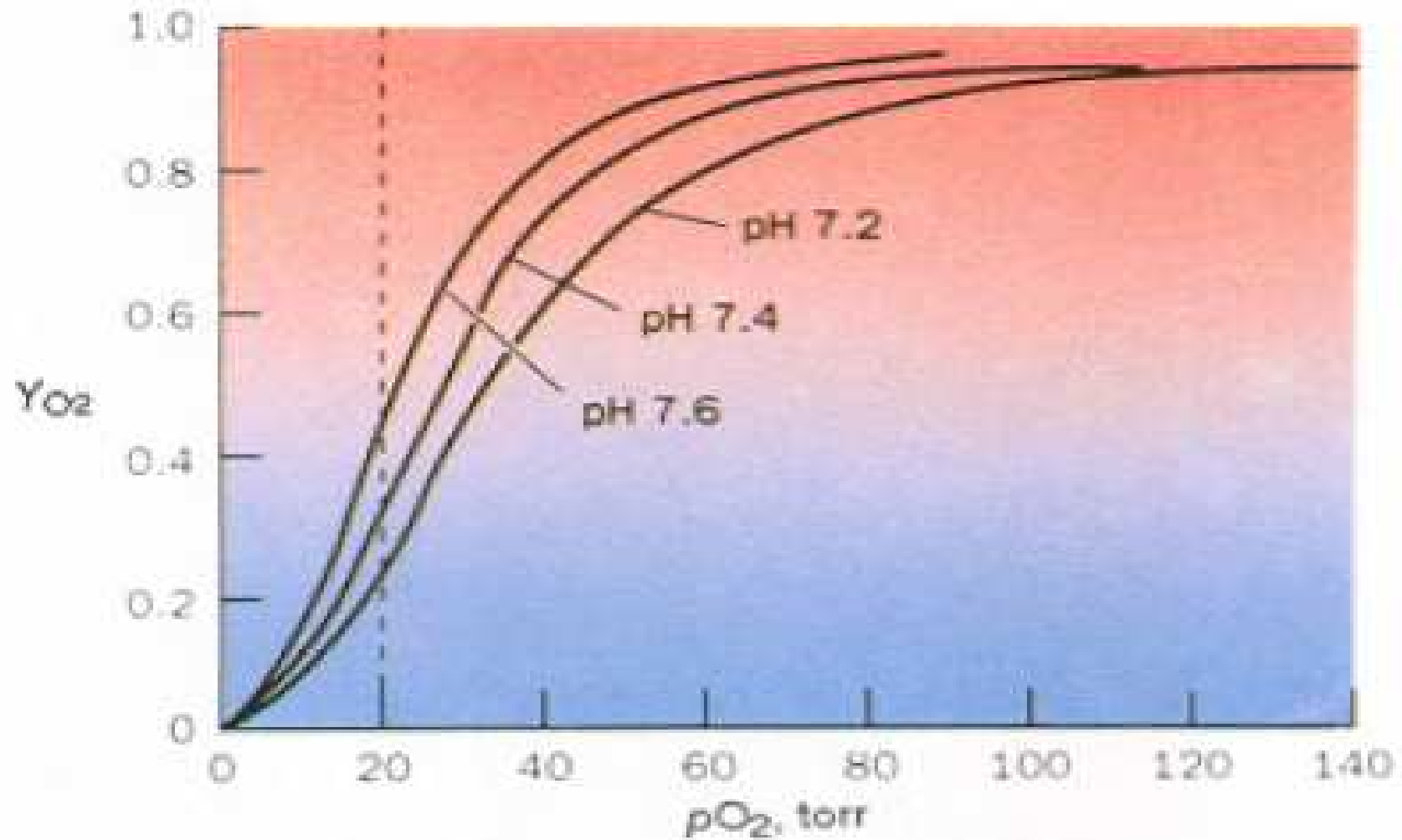




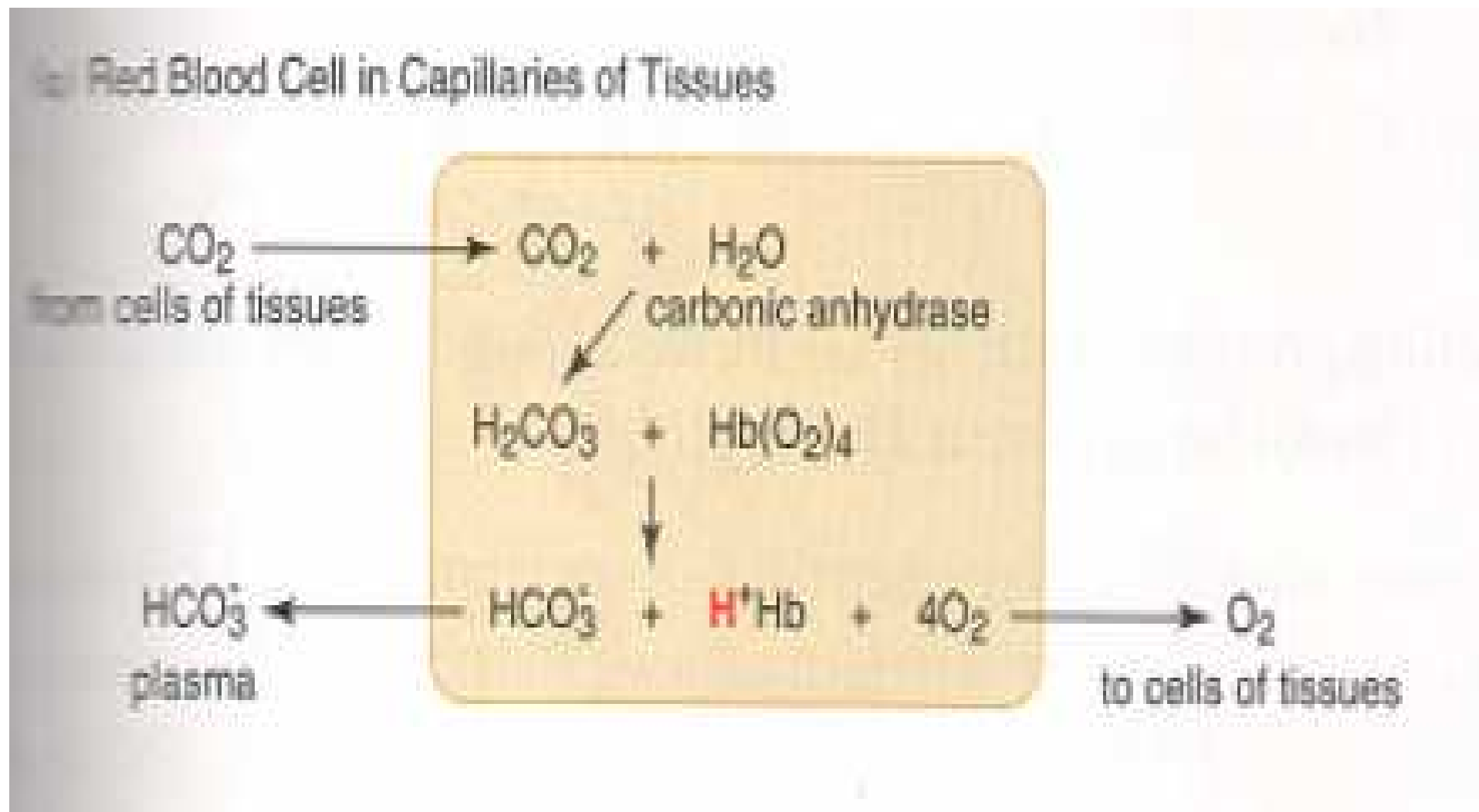
# Bohrův efekt – vliv $H^+$ a $CO_2$



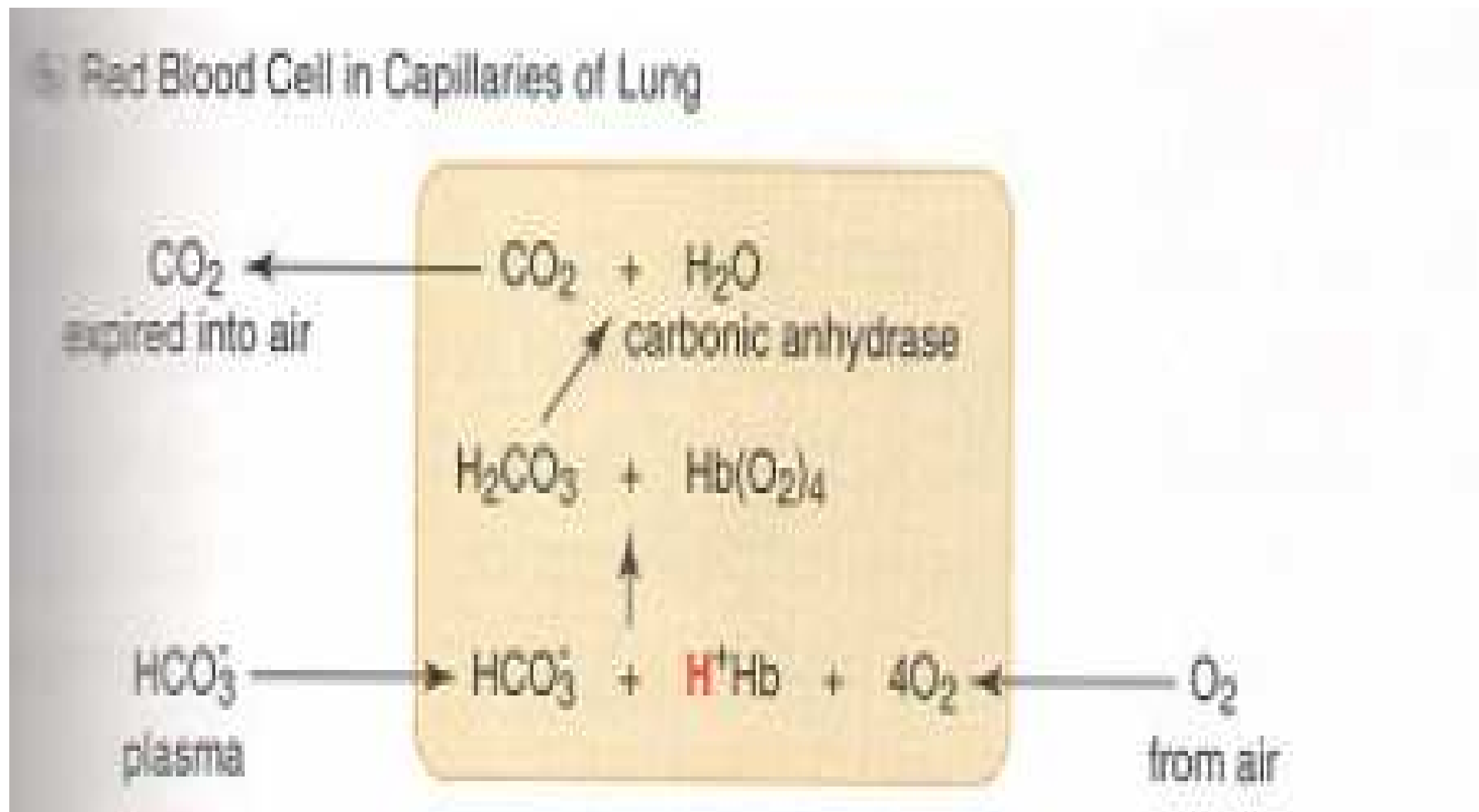
# Bohrův efekt – vliv $H^+$ a $CO_2$



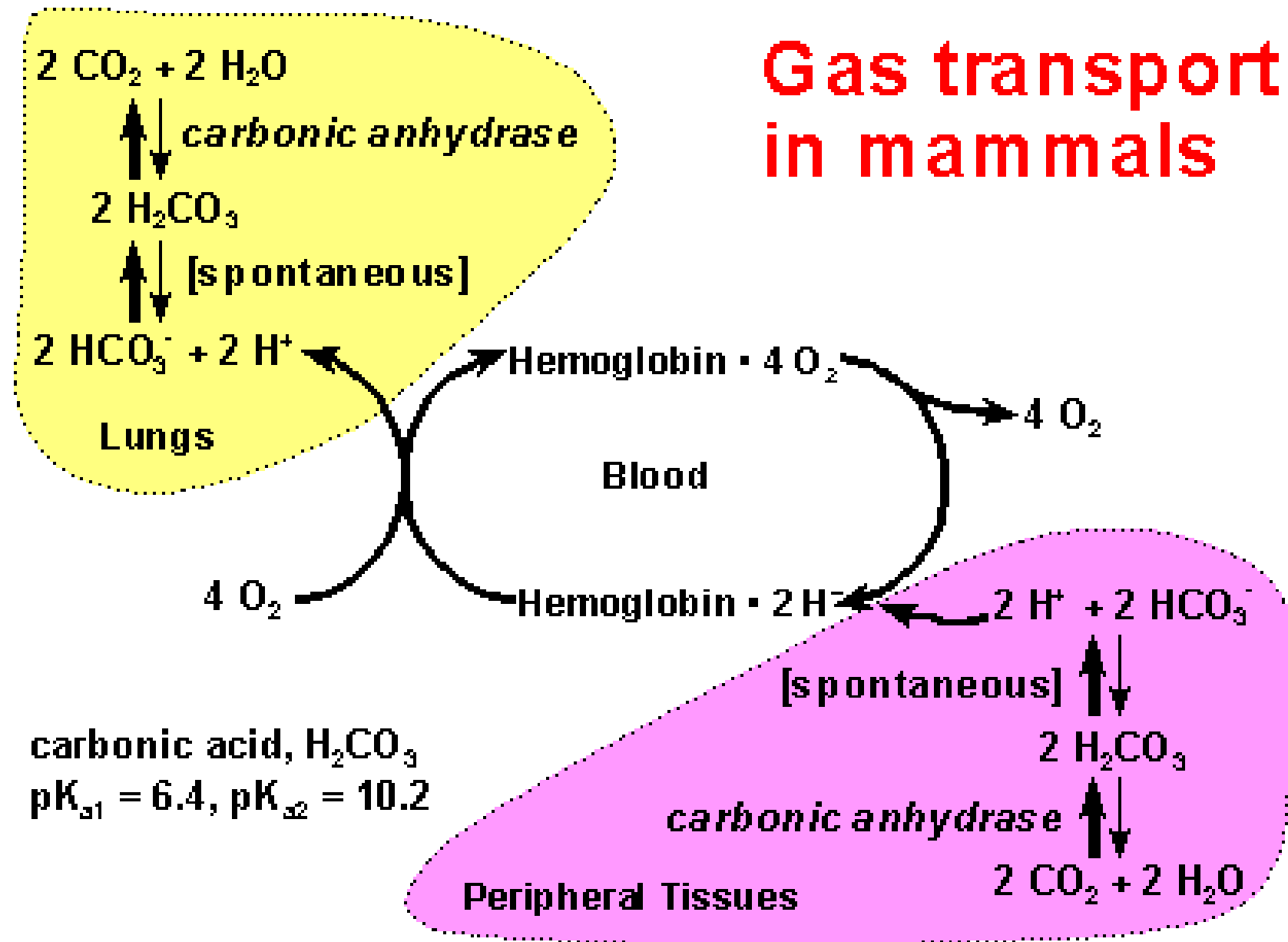
# Bohrův efekt – vliv $H^+$ a $CO_2$



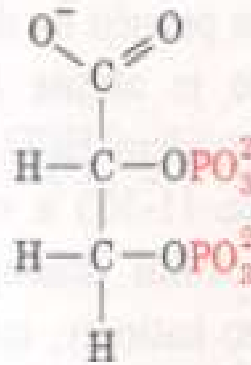
# Bohrův efekt – vliv $H^+$ a $CO_2$



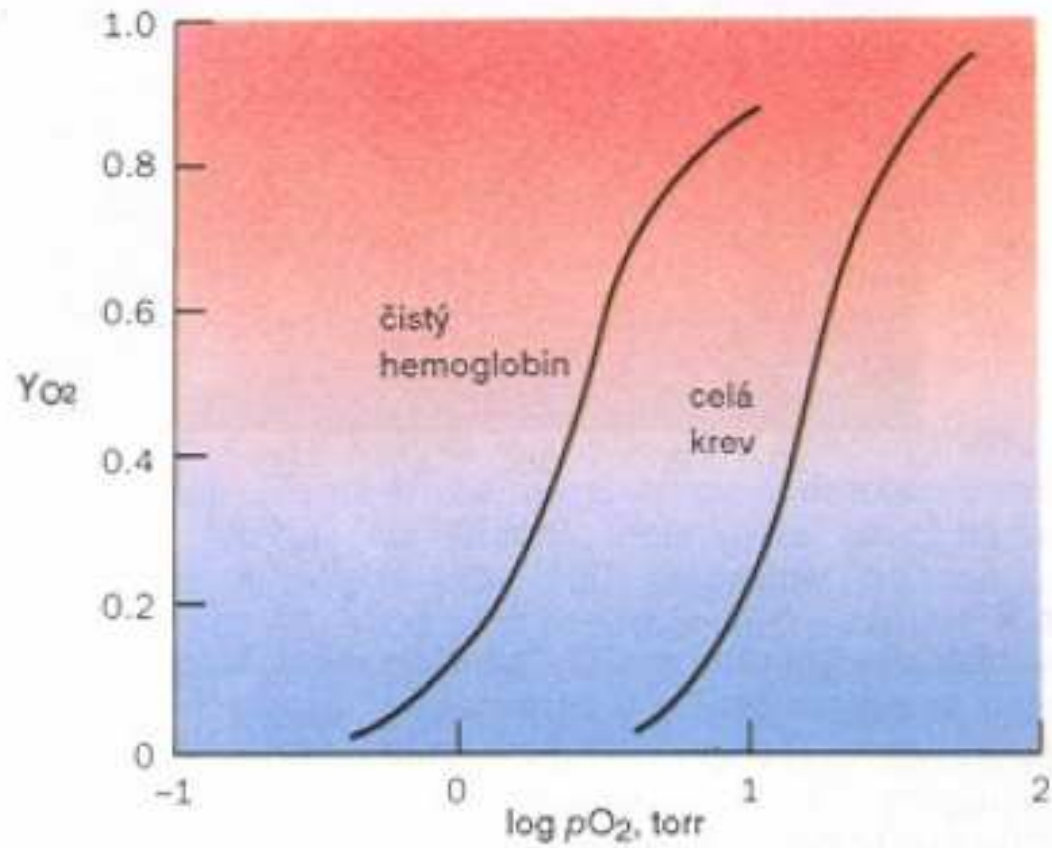
# Gas transport in mammals



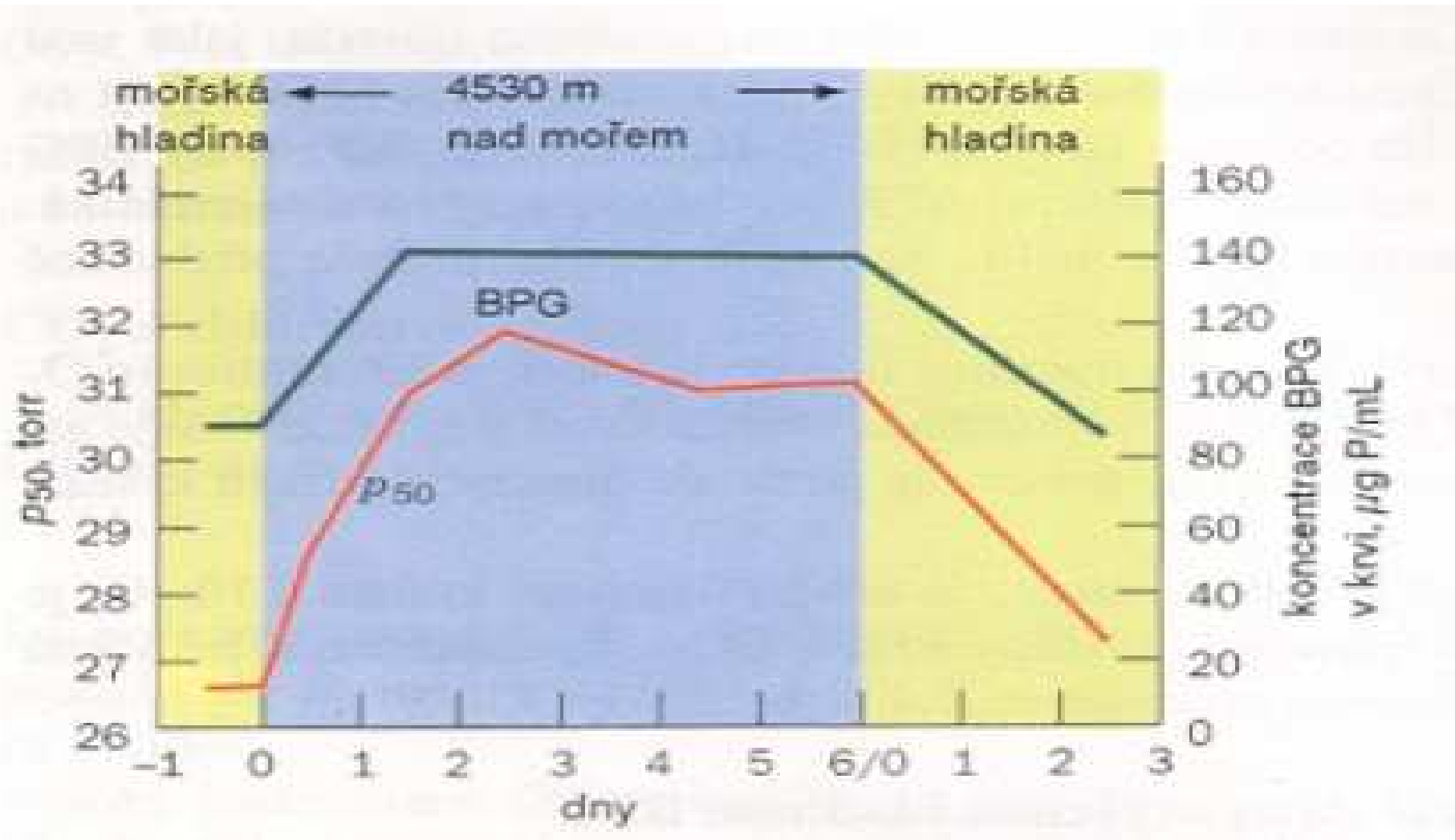
# Vliv BPG



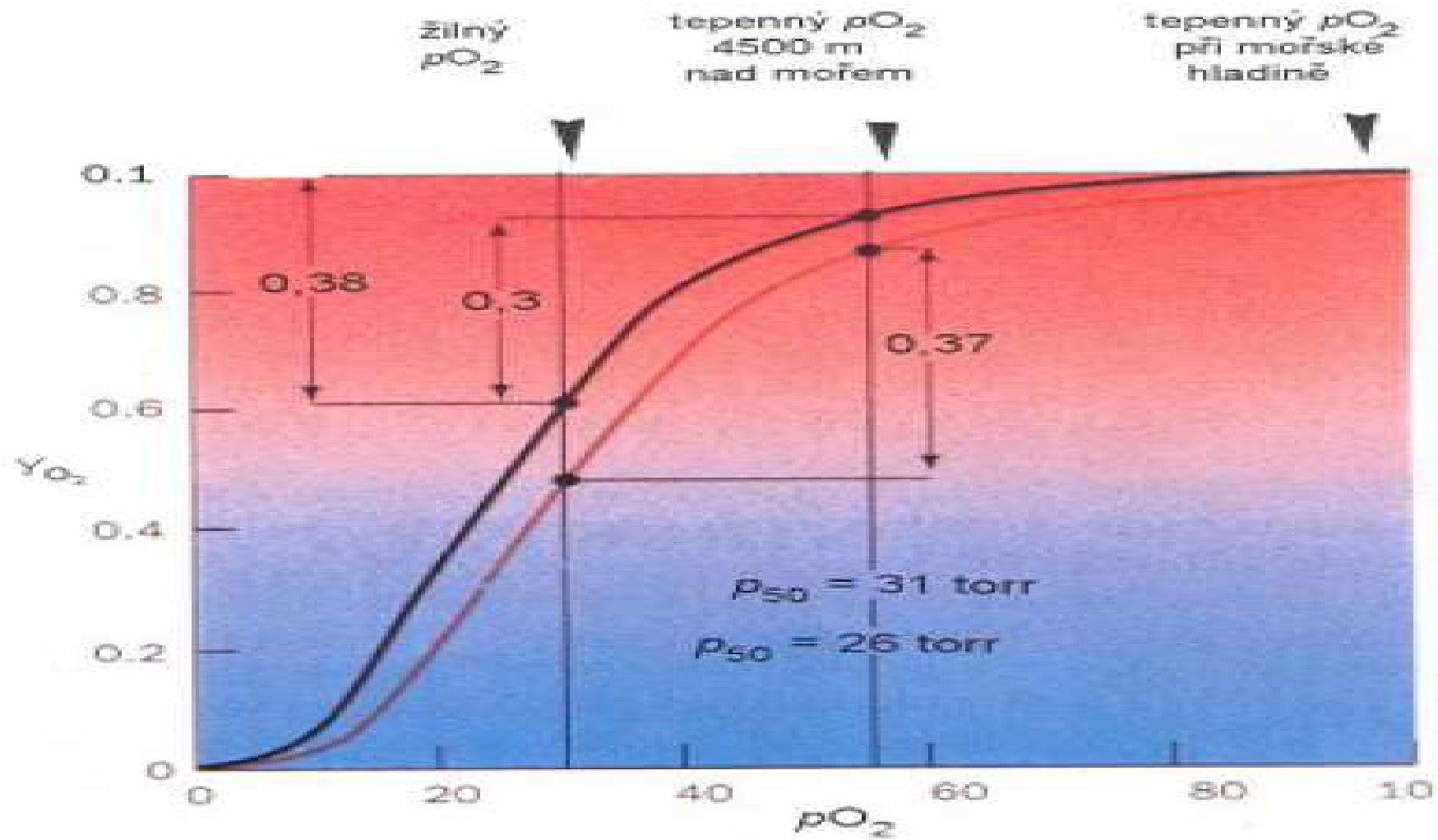
D-2,3-bisfosfoglycerát (2,3-P<sub>2</sub>-G)



# Vliv BPG a nadmořská výška

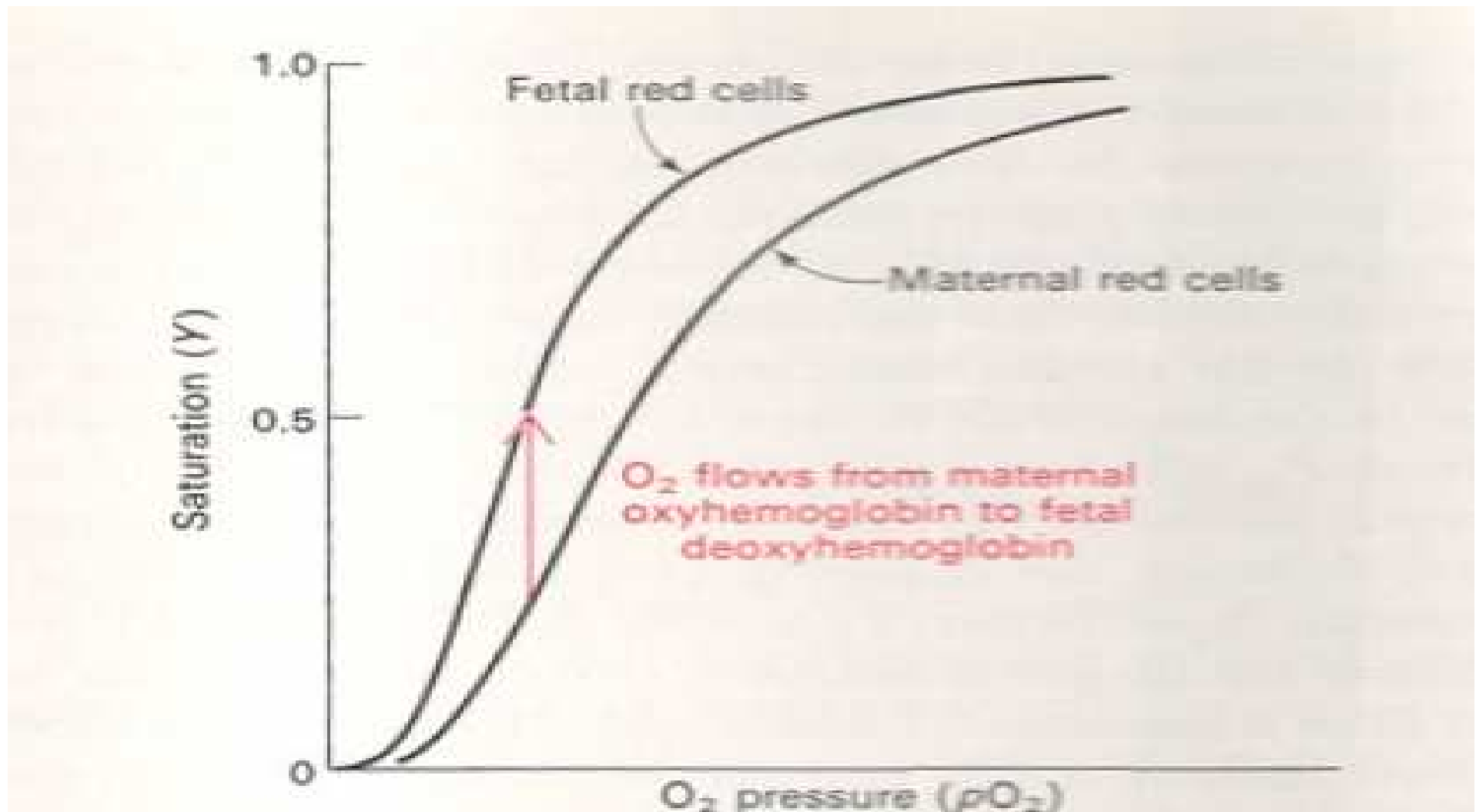


# Vliv BPG a nadmořská výška

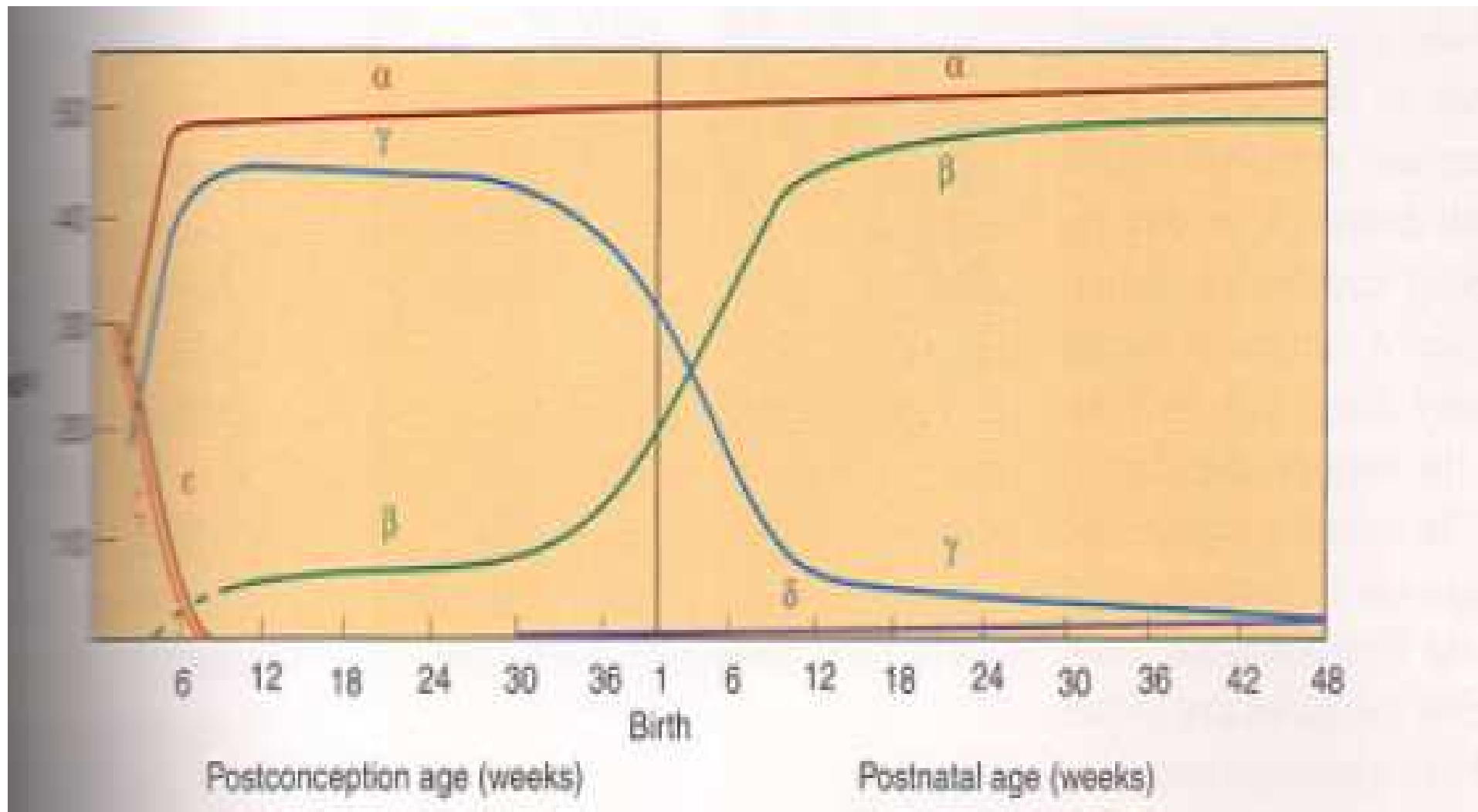




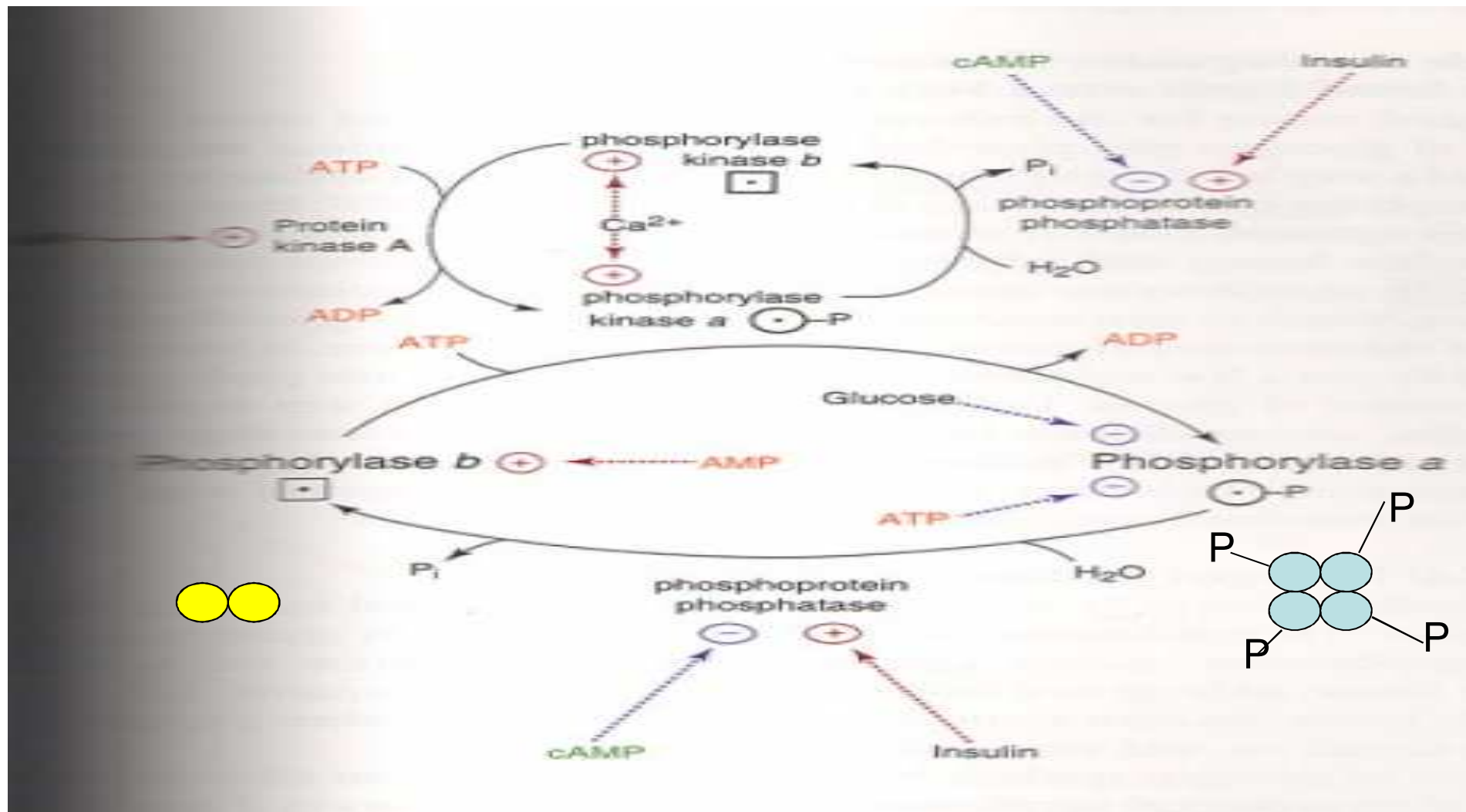
# Fetální versus normální Hb



# Fetální versus normální Hb

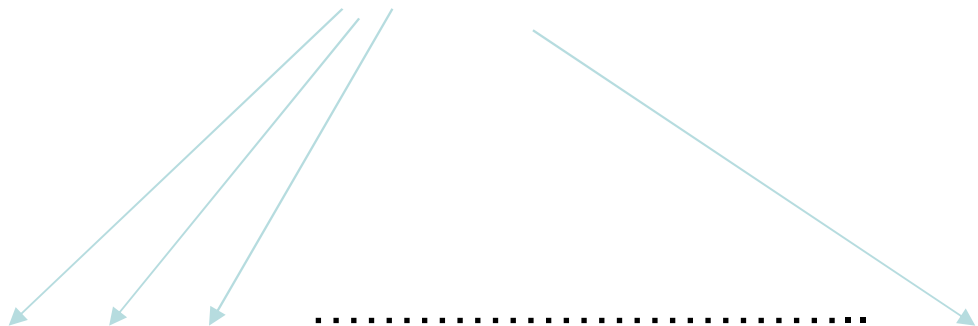


# Regulace kovalentní modifikací glykogenfosforylasy

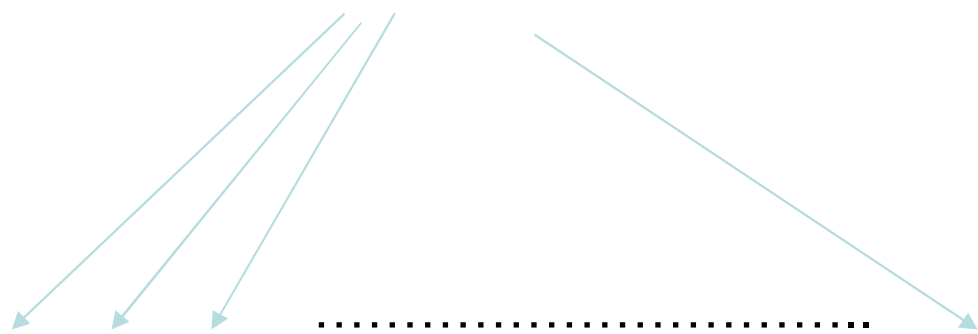


**Amplifikace signálu**

hormon



enzym<sub>a</sub>.....enzym<sub>n</sub>



enzym<sub>a</sub>.....enzym<sub>n</sub>

# Regulace kovalentní modifikací glykogenfosforylasa

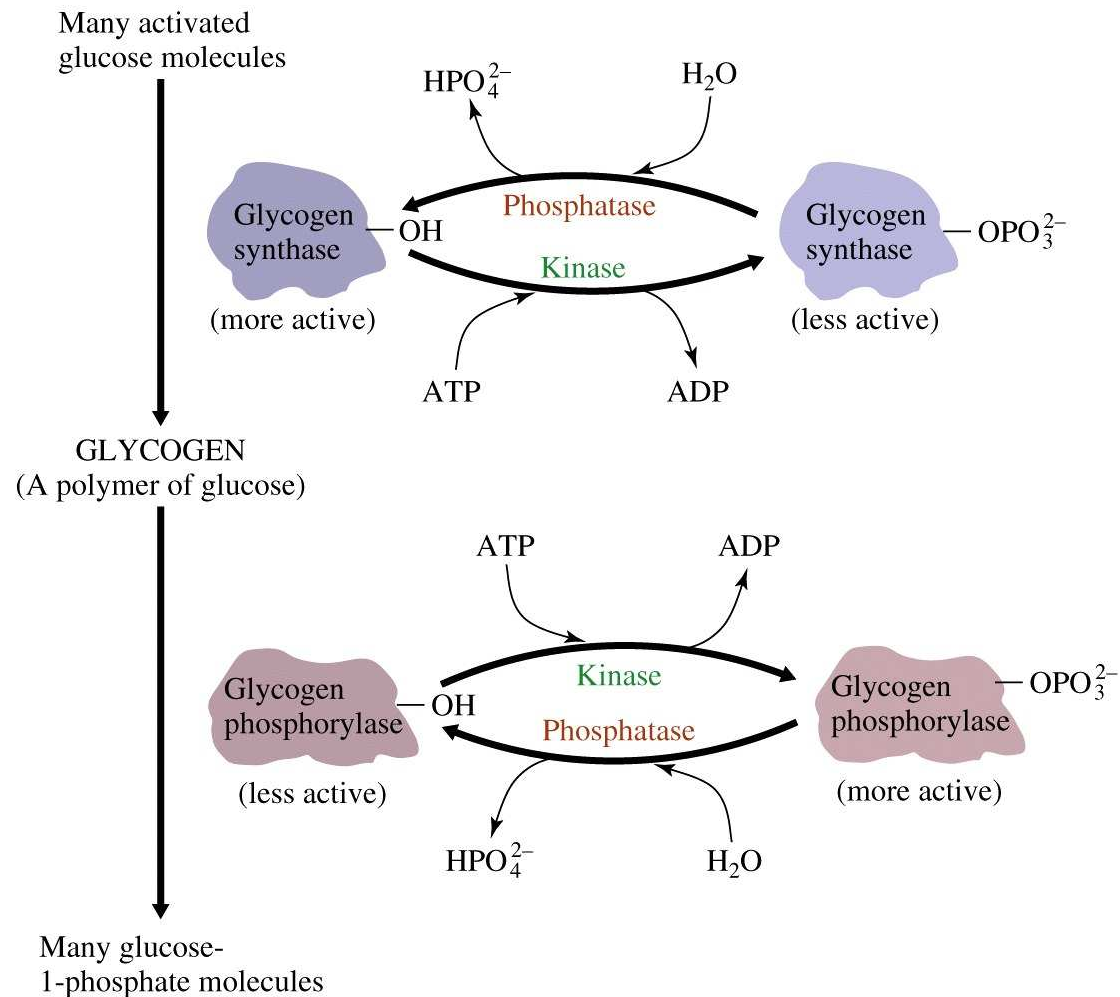
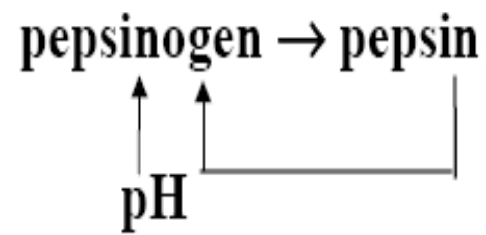


Figure 6-7 Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons

## Aktivace zymogenů

*žaludek*



*slinivka břišní*

enterokinasa



trypsinogen → trypsin



chymotrypsinogen → chymotrypsin

proelastasa → elastasa



# Regulace kovalentní modifikací

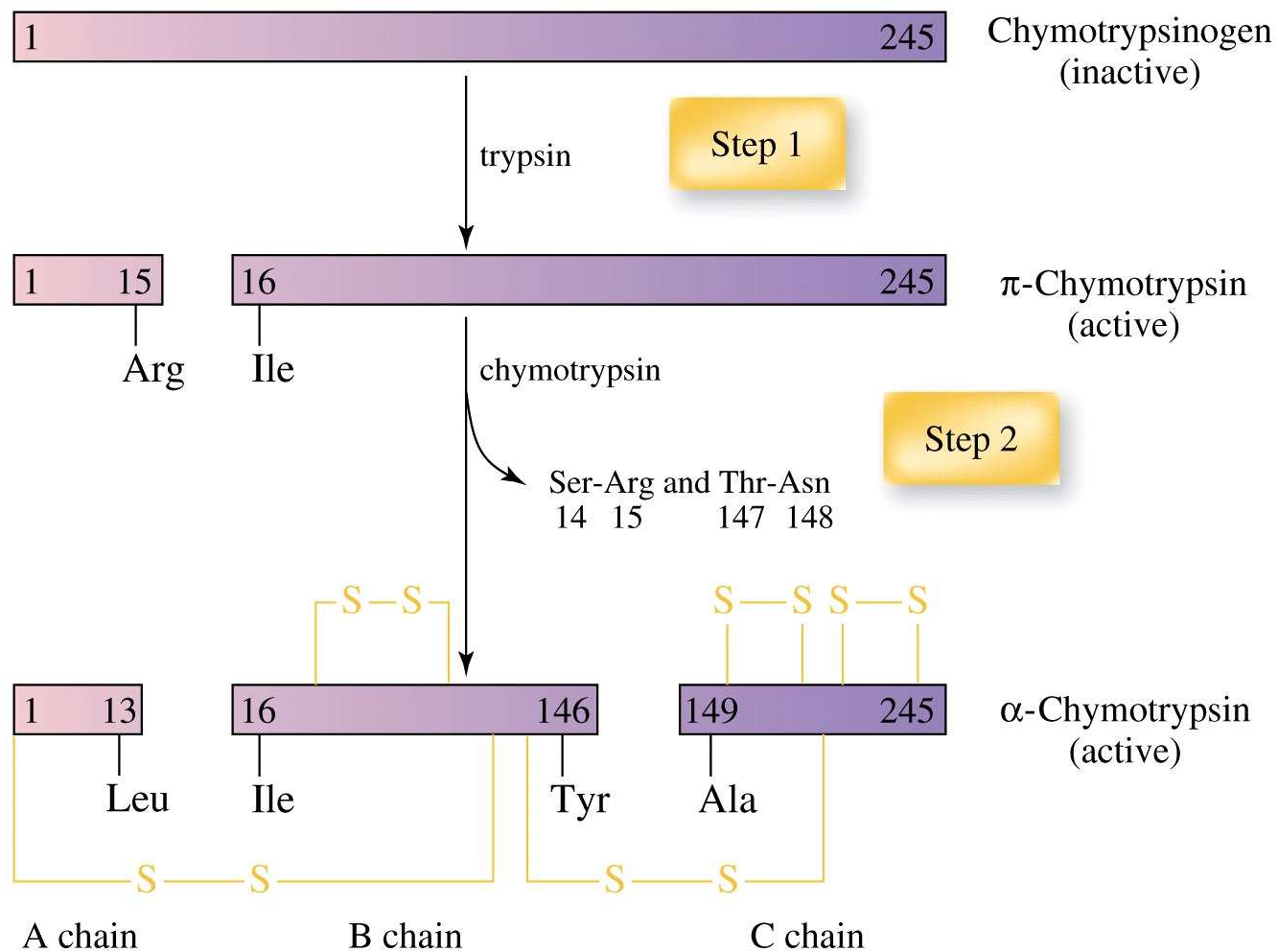
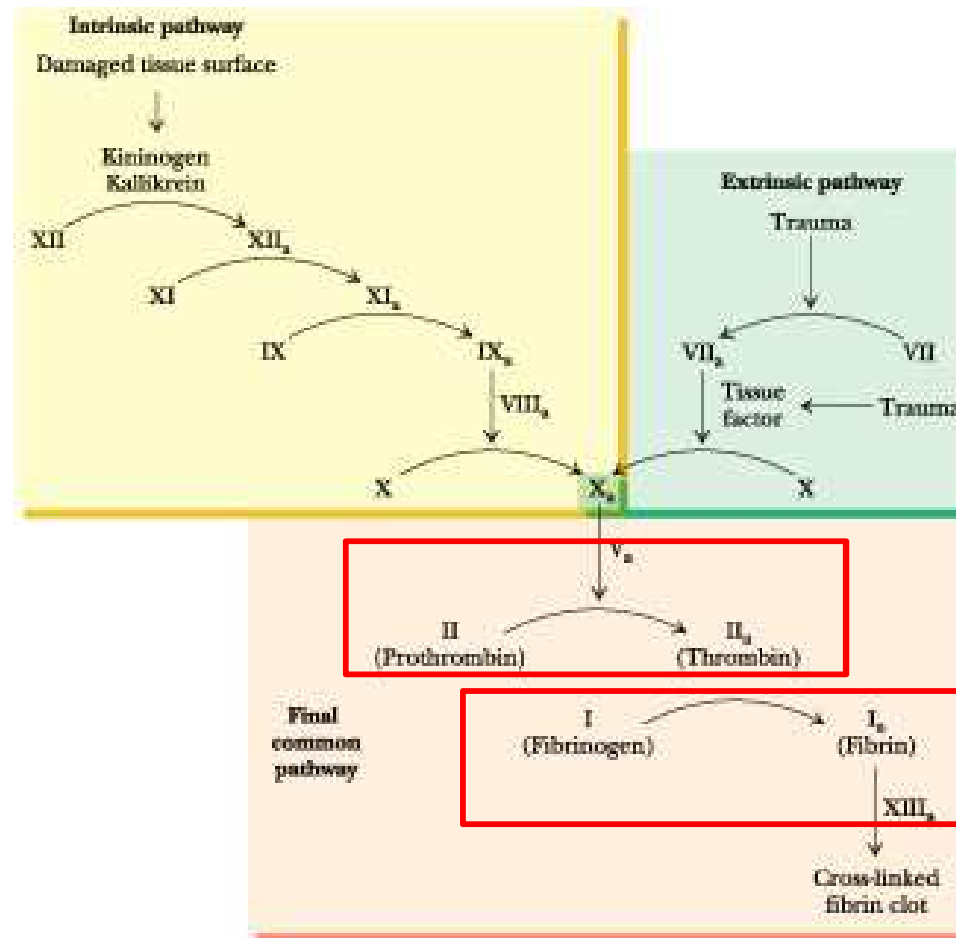


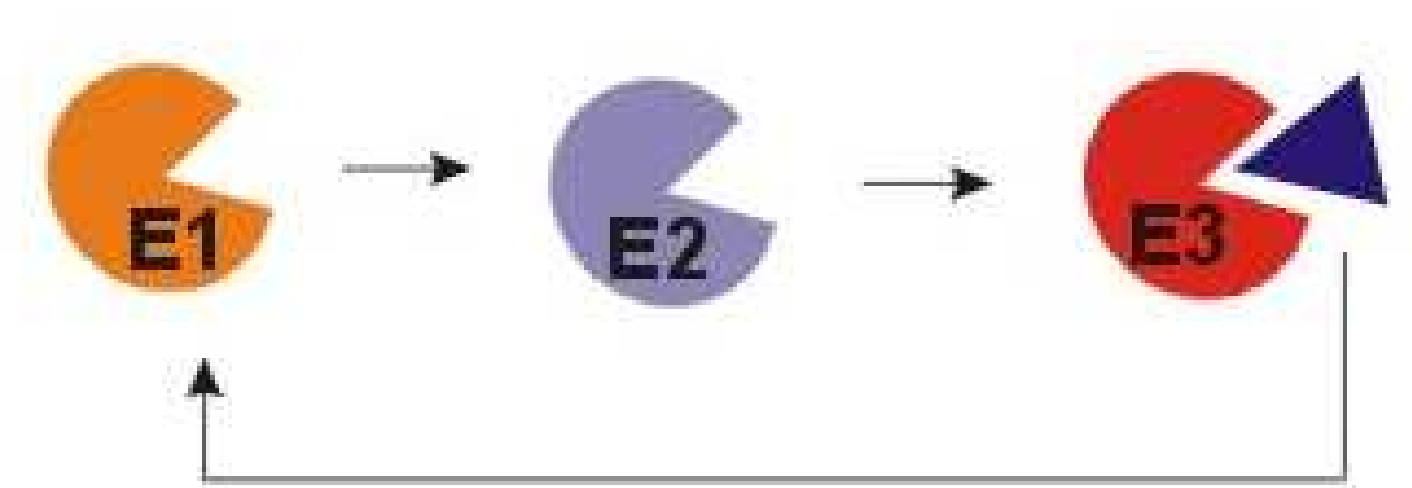
Figure 6-8 Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons

# Regulace kovalentní modifikací

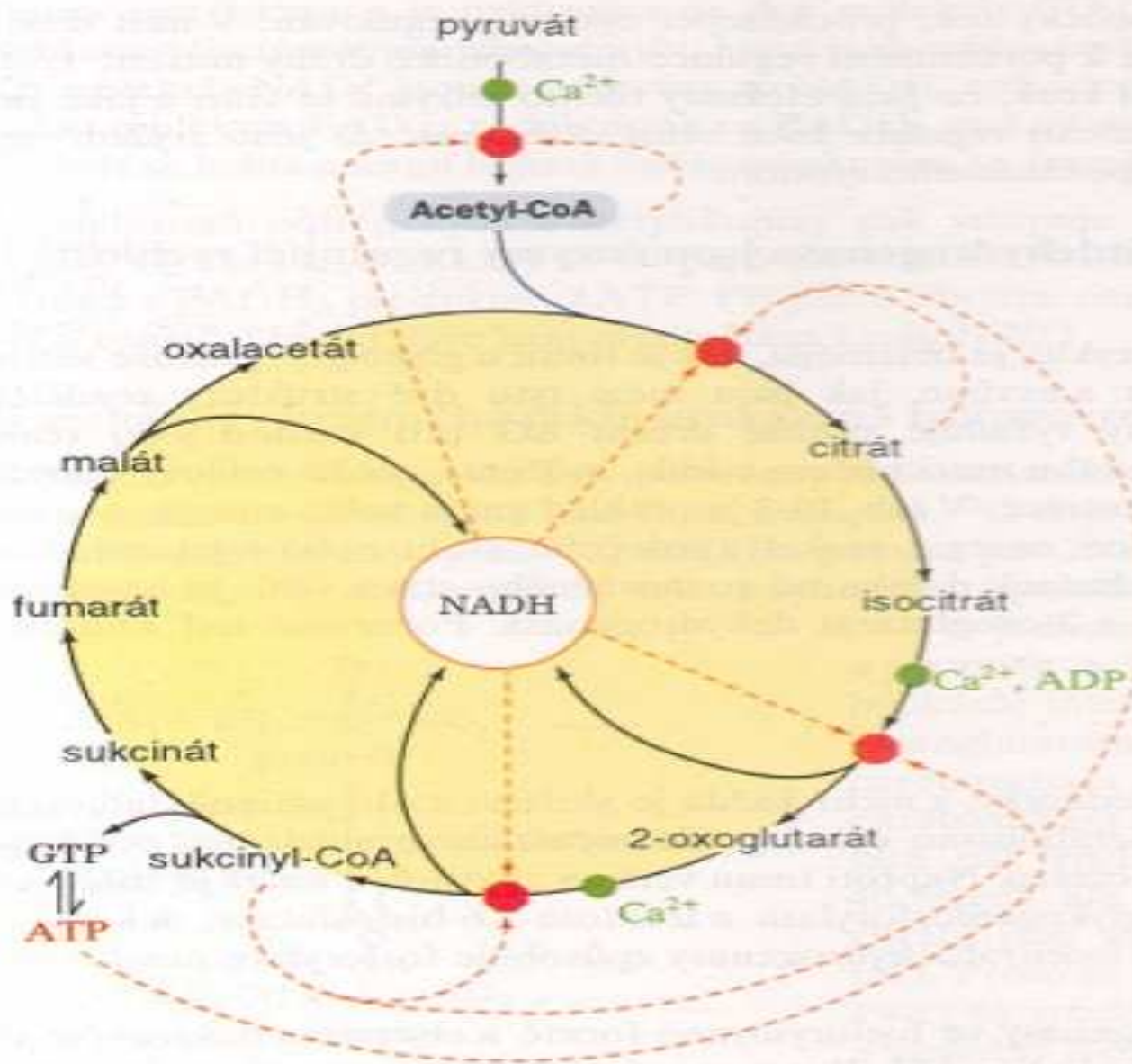




# Regulace zpětnou vazbou



# Regulace



## Regulace činnosti enzymu

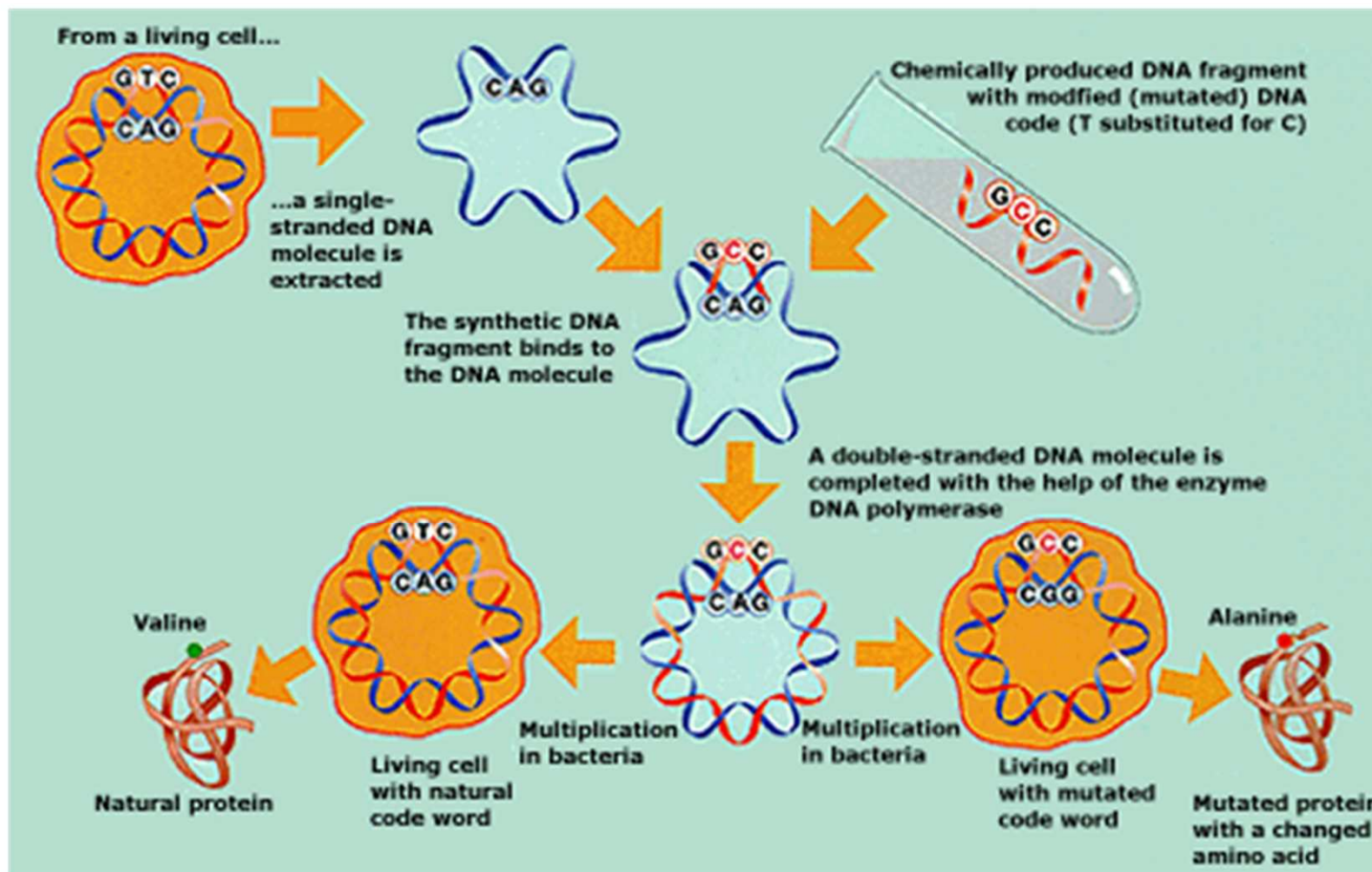
- Kompartimentace

# Umělé enzymy



## Úprava přírodních enzymů

Řízena evoluce *versus* Místně cílená mutageneze



# RACIONÁLNÍ DESIGN

1. Počítačové modelování



2. Místně cílená mutagenese



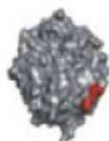
Samostatný mutovaný gen

3. Transformace

4. Expres proteinu

5. Purifikace proteinu

6. *není aplikován*



Zkonstruovaný mutantní enzym

7. Biochemické testování

# ŘÍZENÁ EVOLUCE

1. *není aplikováno*

2. Náhodná mutagenese



Knihovna mutovaných genů  
( >10,000 klonů )

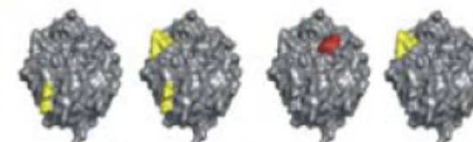
3. Transformace

4. Expres proteinu

5. *není aplikována*

6. Screening a výběr

- stabilita
- selektivita
- afinita
- aktivita



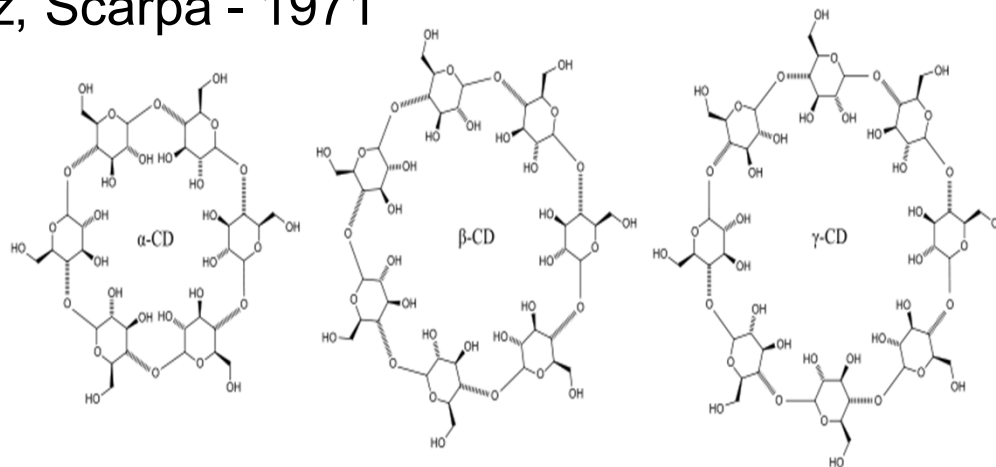
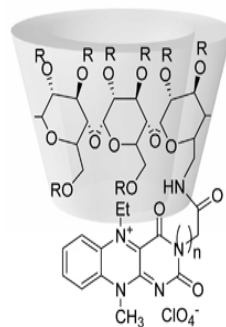
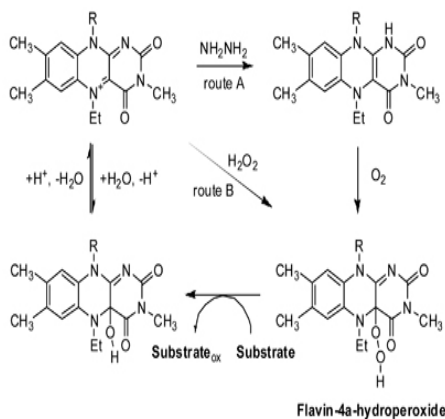
Vybrané mutantní enzymy

**VYLEPŠENÝ  
ENZYM**

# Umělé enzymy

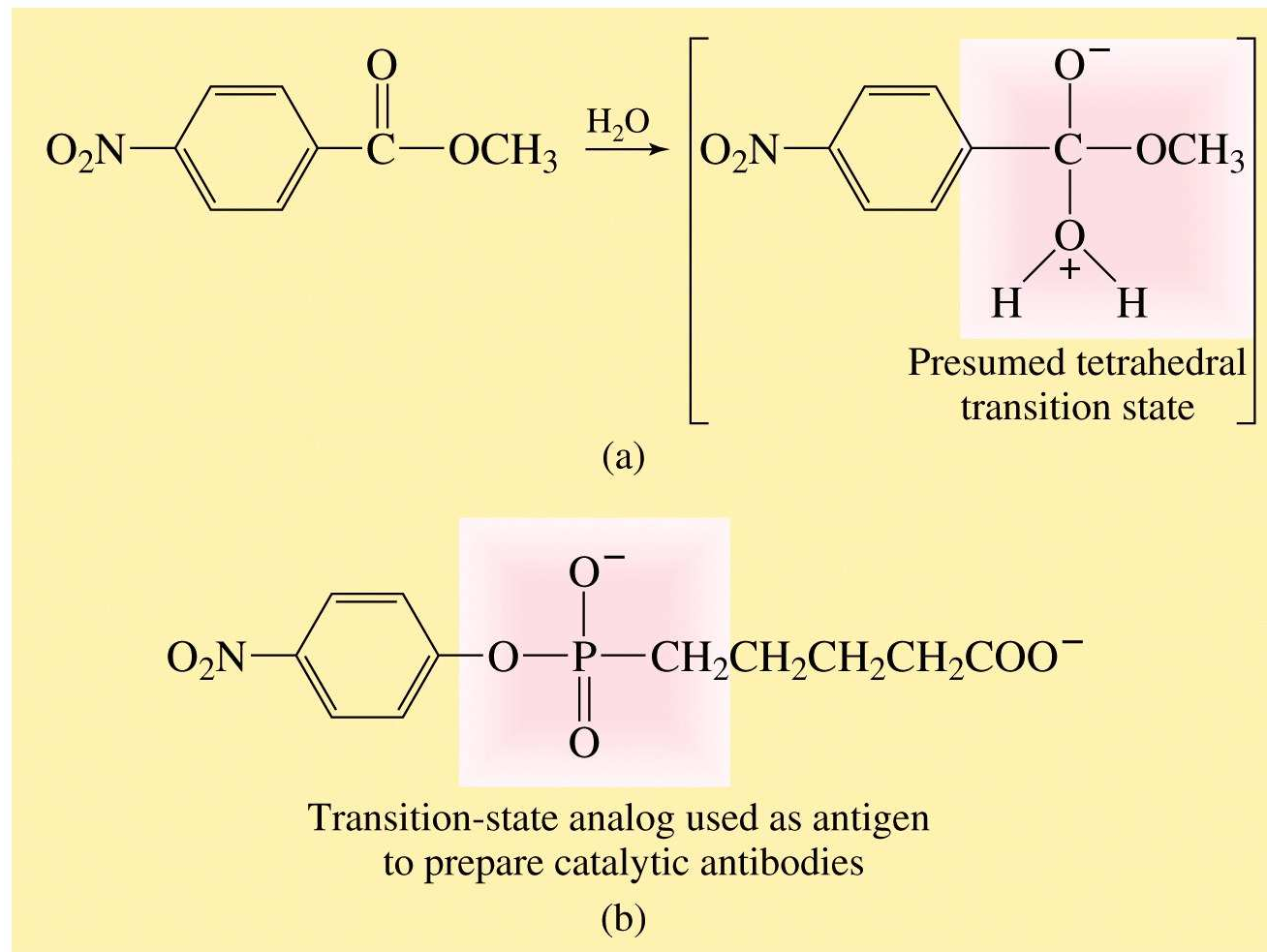
Klotz, Scarpa - 1971

## Synzymy



# Abzymy

Schultz, Lerner - 1986



# Ribozymy – katalytická RNA

1989 Nobelova cena

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







# Autokatalytická mRNA (Cech)

*Tetrahymena thermophila*

splicing

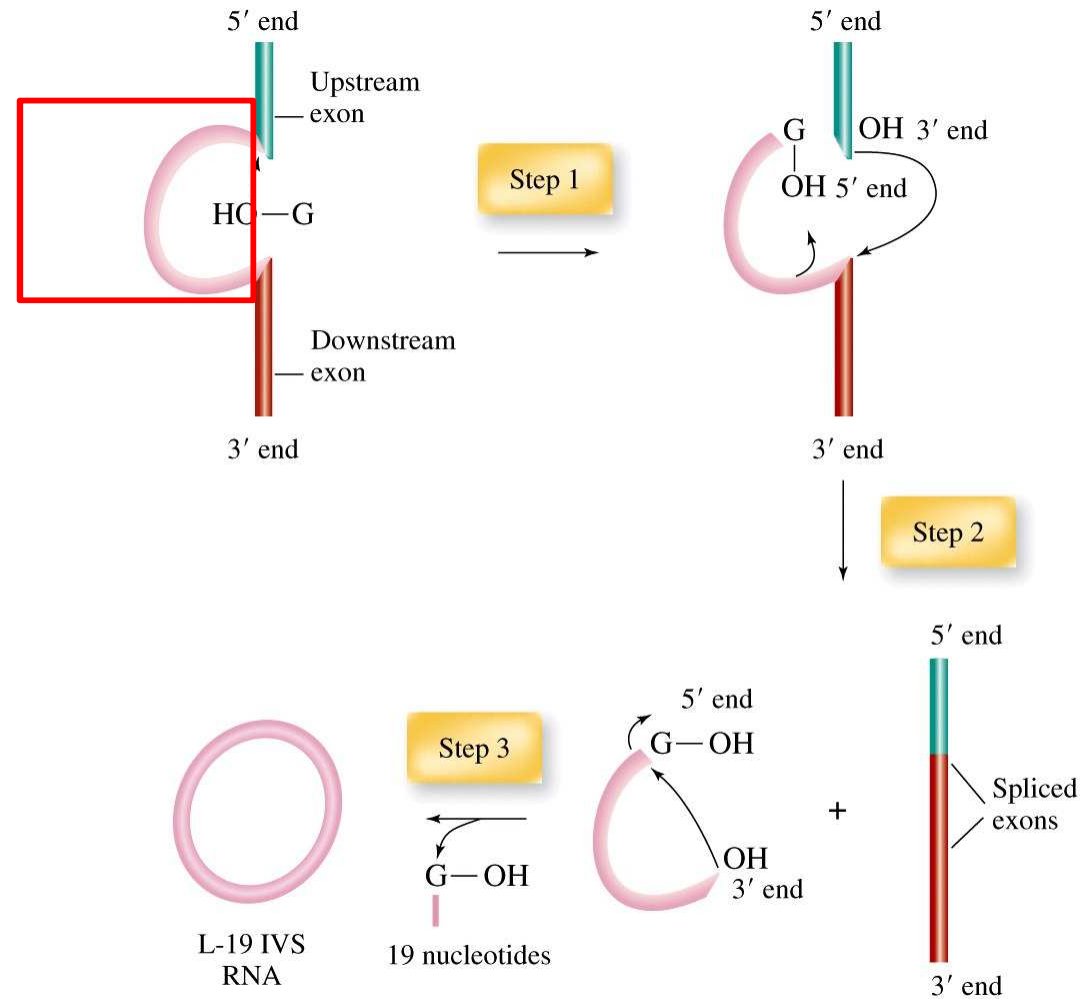
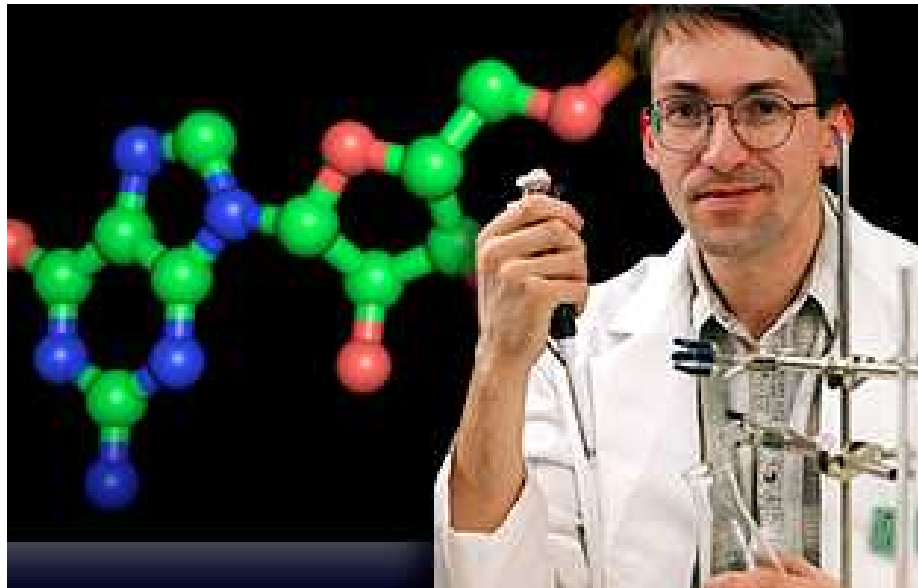


Figure 6-13 Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons

# DNAzymy (1994)

- Ronald R. Breaker (Yale University)
- Štěpení RNA v přítomnosti  $Pb^{2+}$

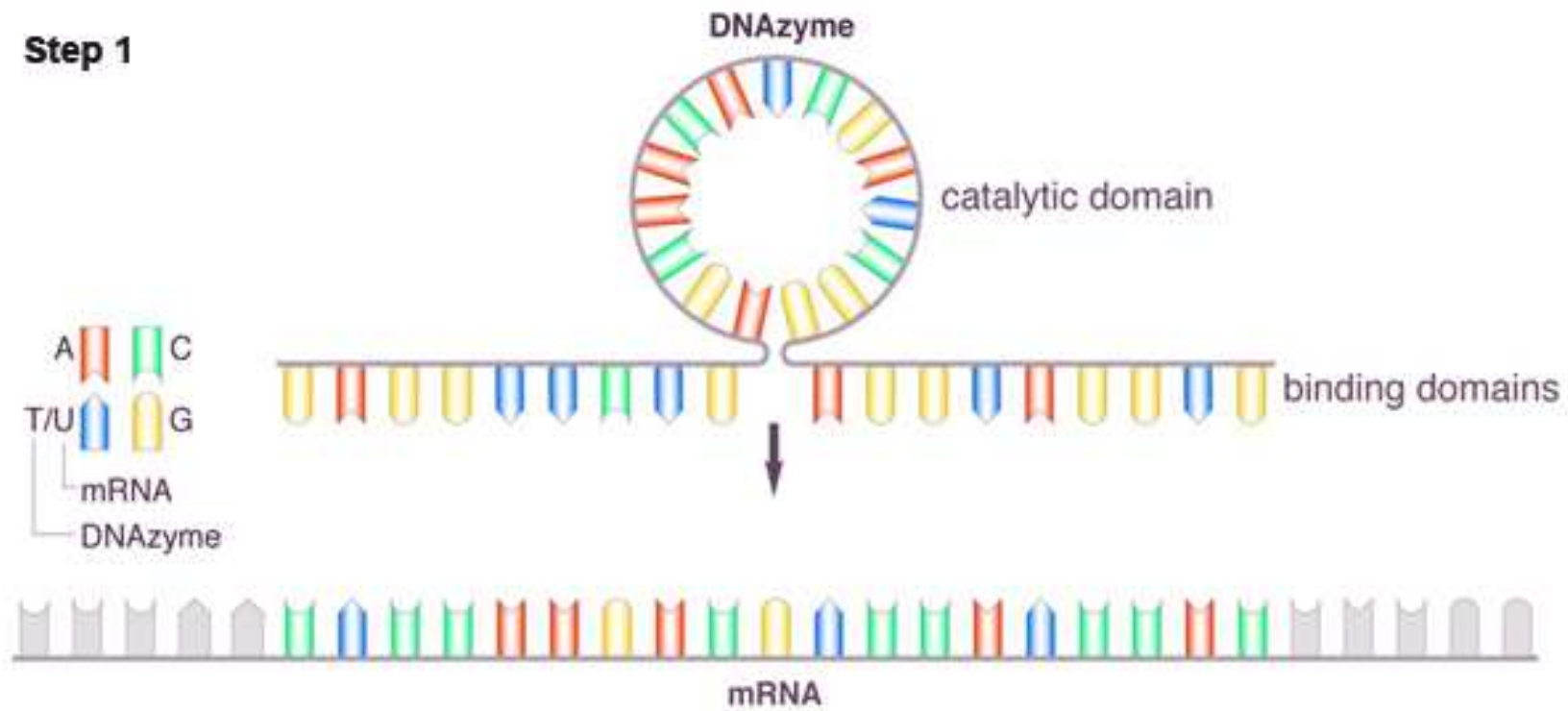


# DNAzymy

- Katalyzují např. :
  - DNA fosforylaci
  - DNA adenylaci
  - DNA deglykosylaci
  - DNA štěpení

# 10-23 DNAzyme

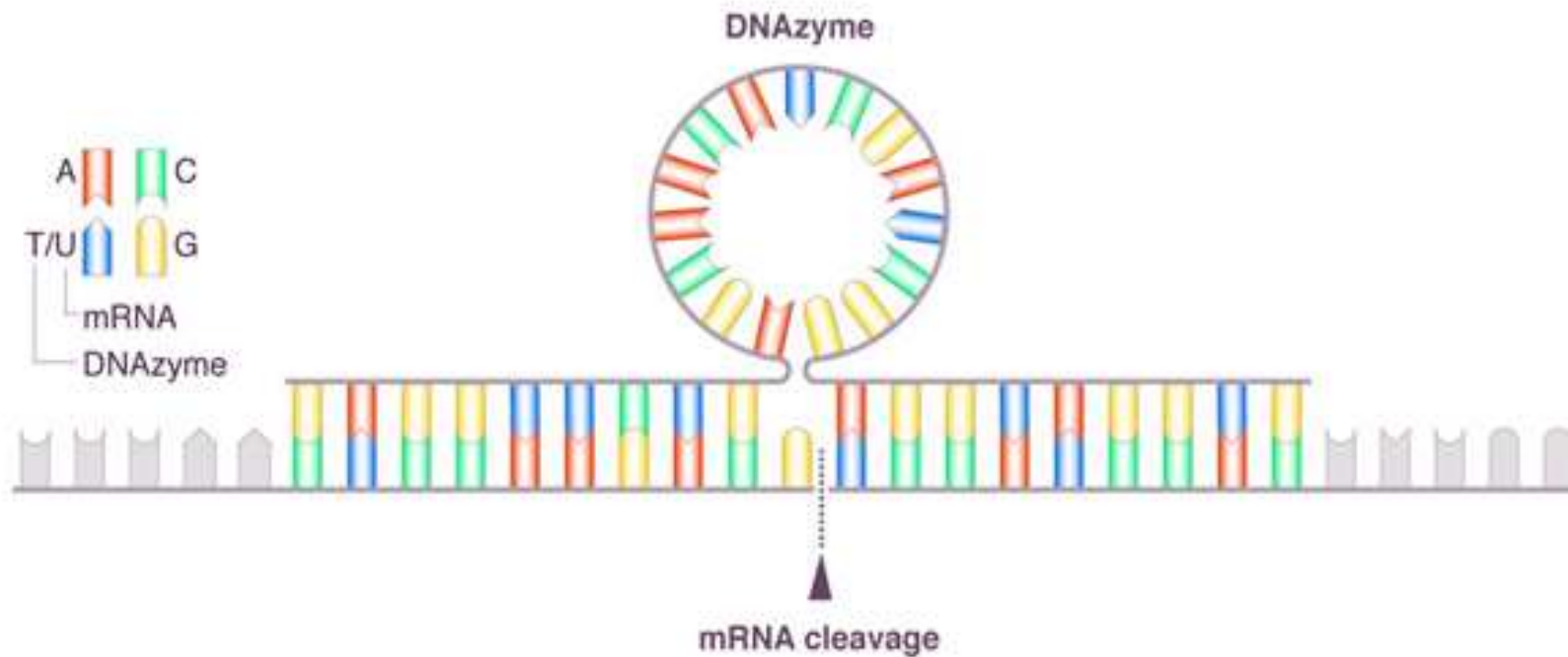
**Step 1**



*Copyright sterna biologicals, all rights reserved.*

# 10-23 DNzyme

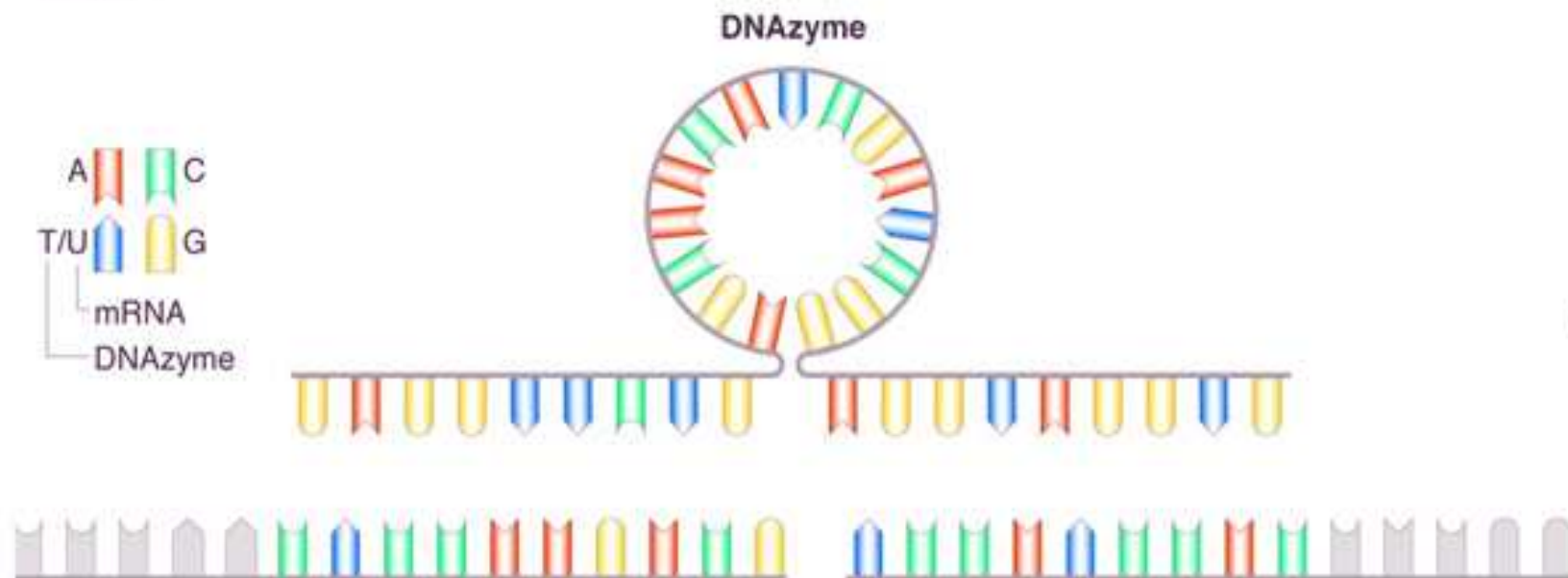
**Step 2**



*Copyright sterna biologicals, all rights reserved.*

# 10-23 DNzyme

**Step 3**



*Copyright sterna biologicals, all rights reserved.*

# Aptamery

Synteticky vytvořené :

- RNA oligonukleotidy
- ssDNA oligonukleotidy
- peptidy

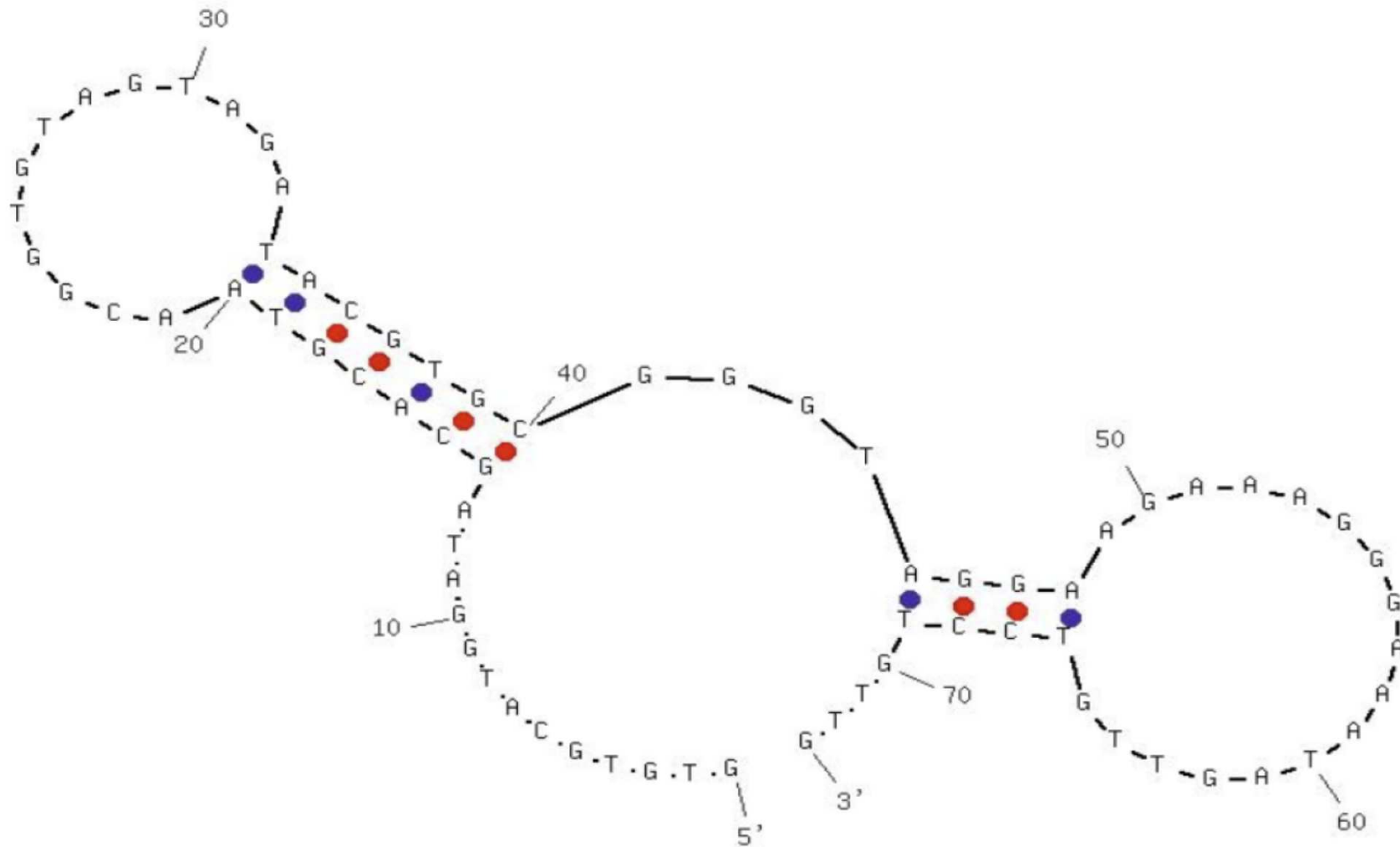


# Aptamery

Synteticky vytvořené molekuly schopné se vázat na cílové molekuly :

- s vysokou afinitou
- s vysokou specifitou

# Struktura aptameru proti hemaglutininu viru chřipky typu H5N1

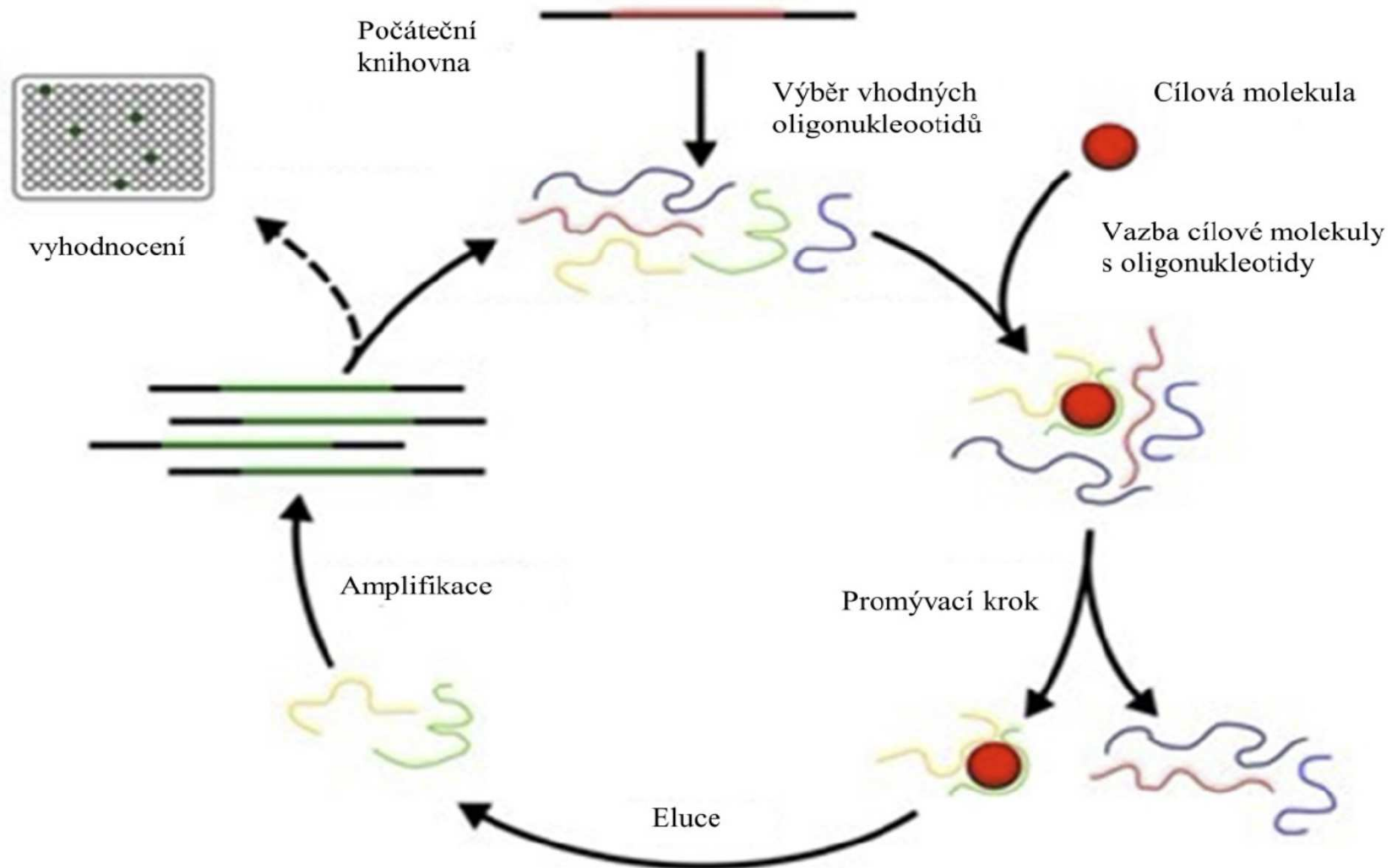


# Aptamery versus protilátky

- Vysoká stabilita
- Jednoduchá výroba
- Nízká imunogenita
- Různé cílové molekuly

# SELEX

## Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment



## 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

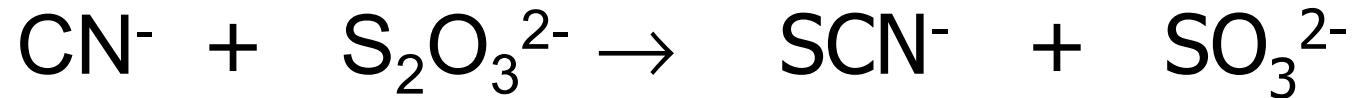
# Využití enzymů

- Celé buňky
- Extrakty z buněk
- Enzymy volné *versus* imobilizované

# 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

# Rhodanasa (EC 2.8.1.1)



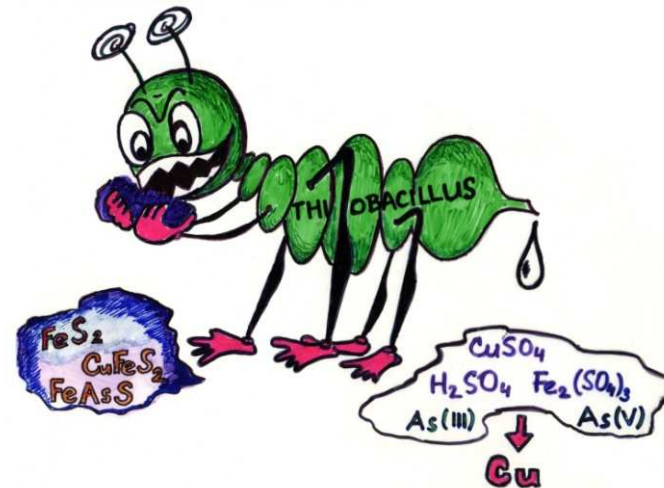
## Homo sapiens

- Detoxikace kyanidu - otravy
- cigaretový kouř
  - glykosinoláty *Brassicaceae*

## Acidithiobacillus ferrooxidans

Biohydrometalurgie

Životní prostředí





# Využití enzymů – izolované enzymy

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

# Organické syntézy

- +
  - specifita (stereospecifita)
  - neextrémní podmínky (ekonomika, ŽP)
- - malá stabilita
  - nevodná prostředí
  - omezená dostupnost (cena)
  - regenerace

# Volné *versus* imobilizované enzymy

## Imobilizace enzymů

Vazba na nosič

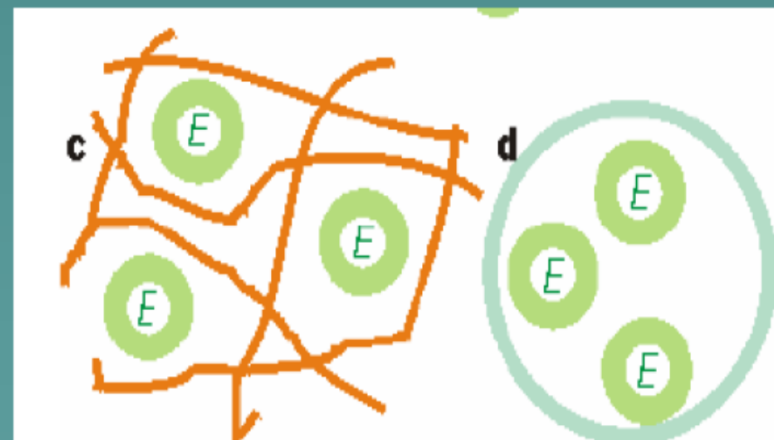
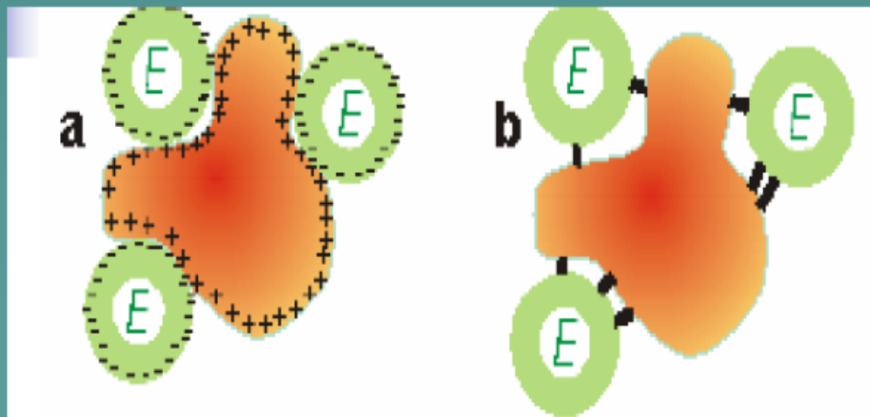
sorpcí

Kovalentní vazbou

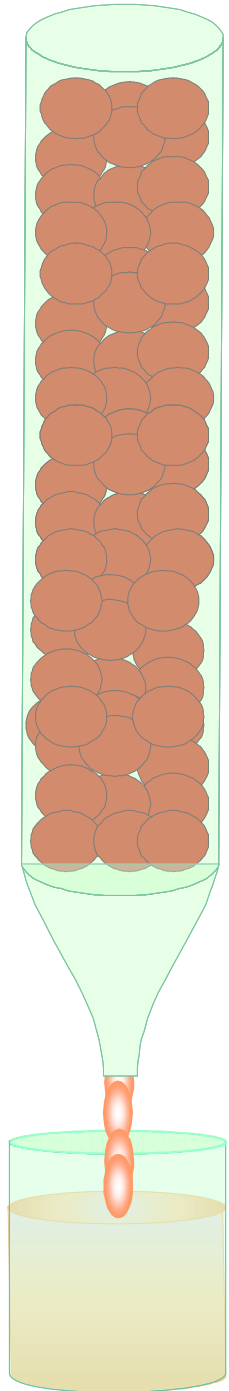
Zachycení (entrapment)

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

# 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

$\alpha$ -amylasy → hydrolýza 1,4- $\alpha$ -glukosidických vazeb uvnitř polysacharidové molekuly

- Ztekucování škrobu (nezbytné při následné výrobě glukosových syrupů a glukosy)
- Součást biodetergentů (odstraňování škrobového pojidla z textilních vláken)

# Nejvýznamnější technické aplikace enzymů (glykosidasy)

$\beta$ -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
- $\beta$ -galaktosidasa  $\rightarrow$  hydrolýza laktosy na glukosu a galaktosu (výroba delaktosovaného mléka, mléko pro výrobu zmrzliny (zabránění krystalizace laktosy))

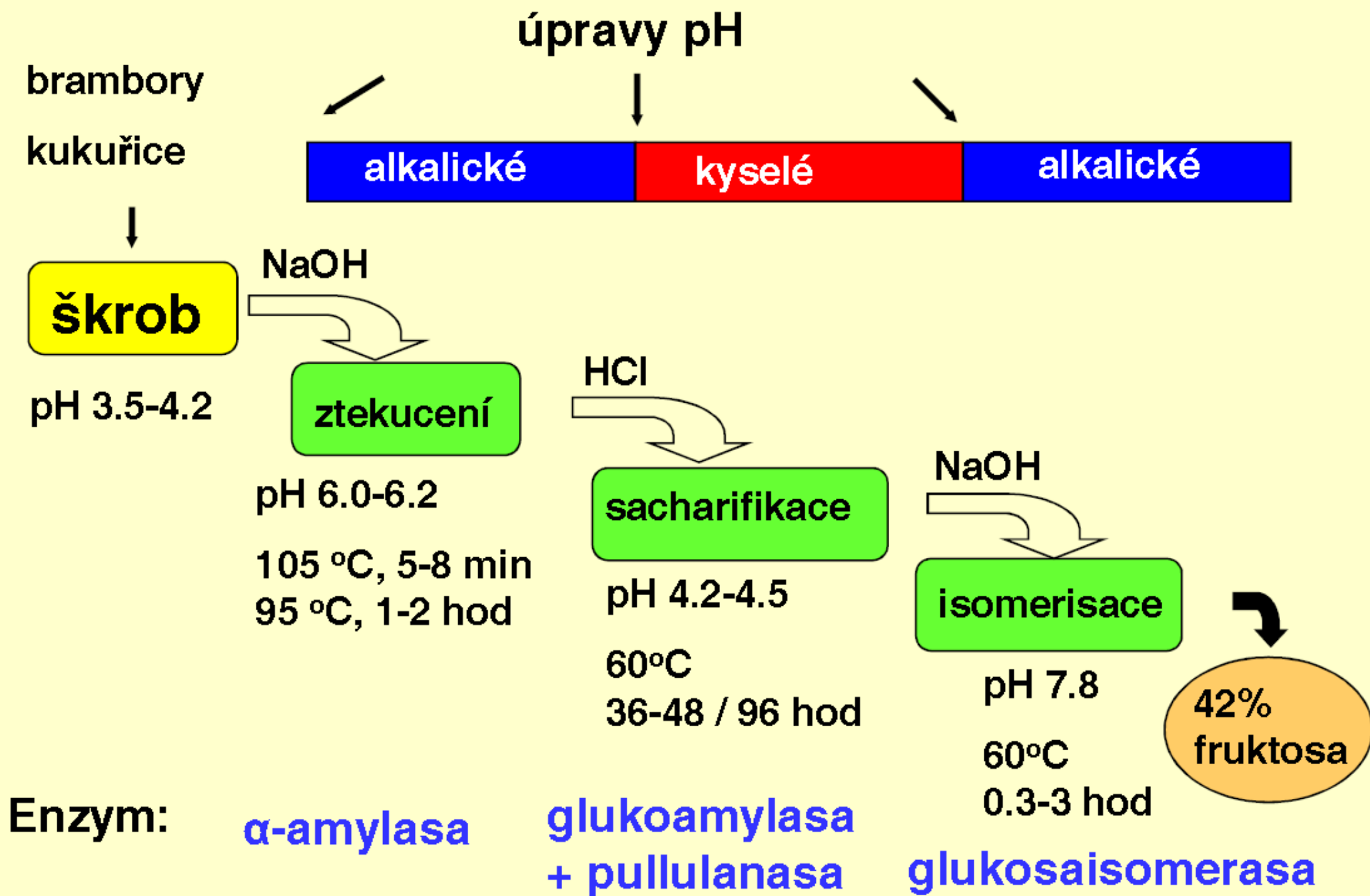
# Nejvýznamnější technické aplikace enzymů

## 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

- Biodetergenty
- 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

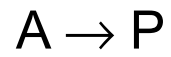
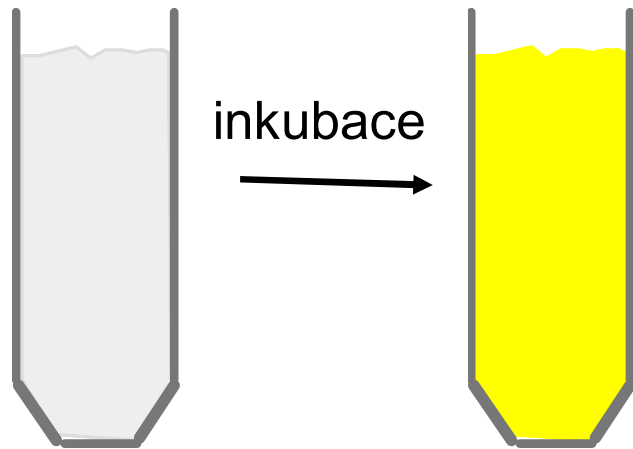
# Enzymy jako analytická čidla

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

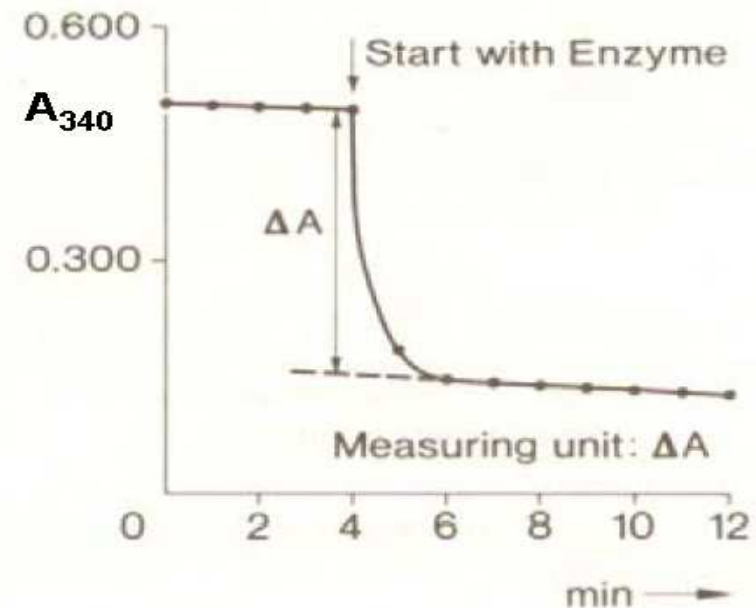
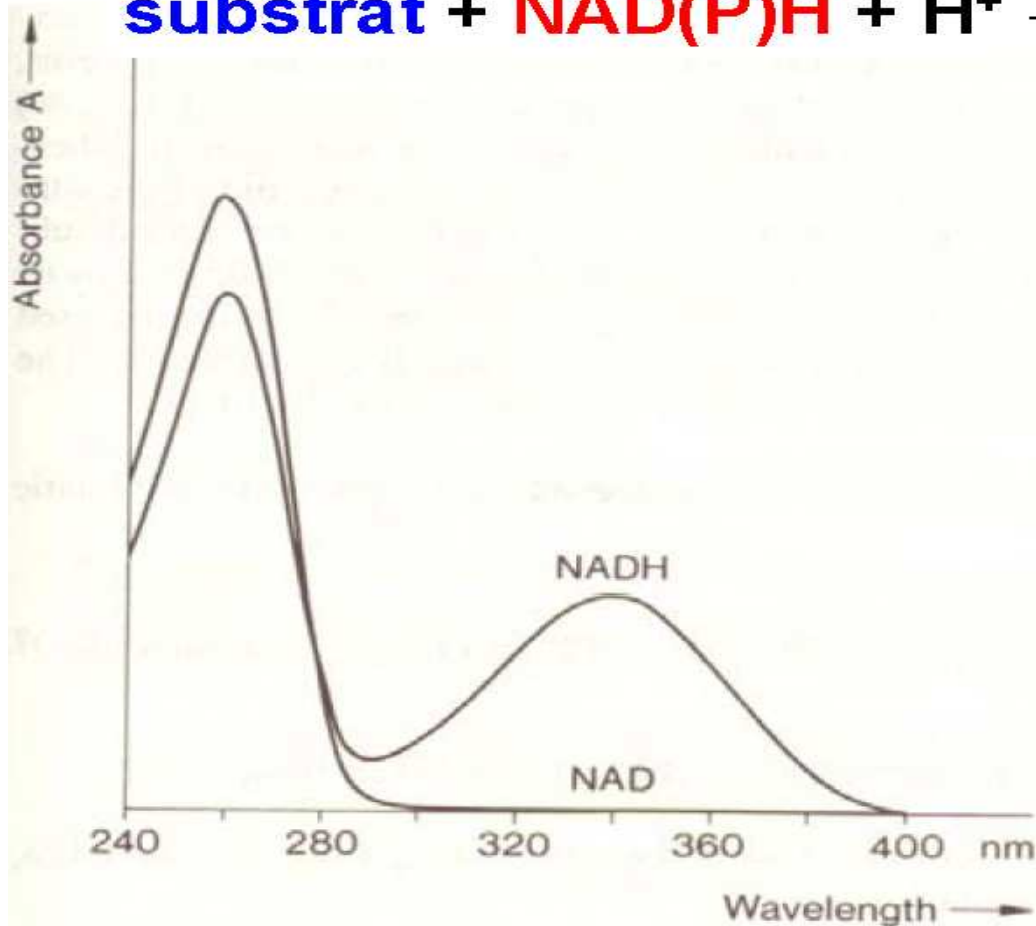
# Analytická biochemie

- Stanovení substrátů
- Stanovení inhibitorů
- Stanovení aktivity enzymů

# End-point versus kinetické stanovení



# Reakce v roztoku

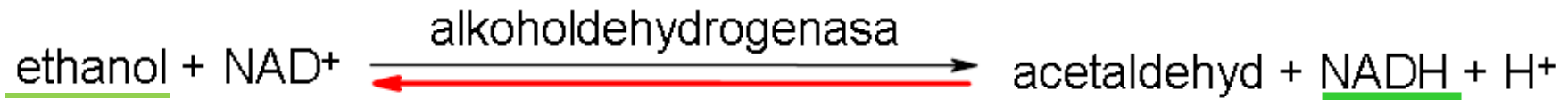


Výpočet látkového množství substrátu:

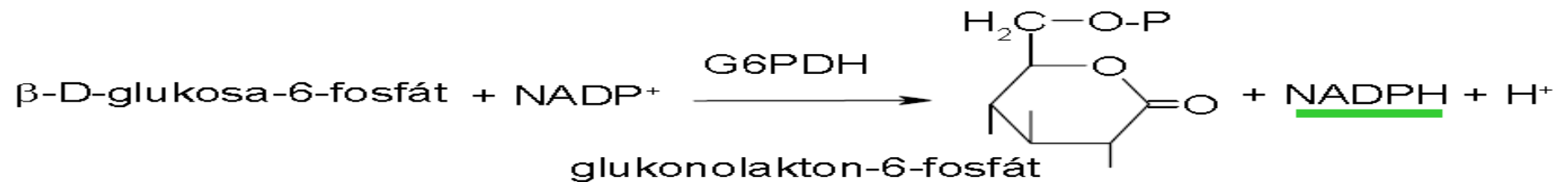
$$n = \frac{V \cdot \Delta A}{\epsilon_{\text{NADH}} \cdot l}$$



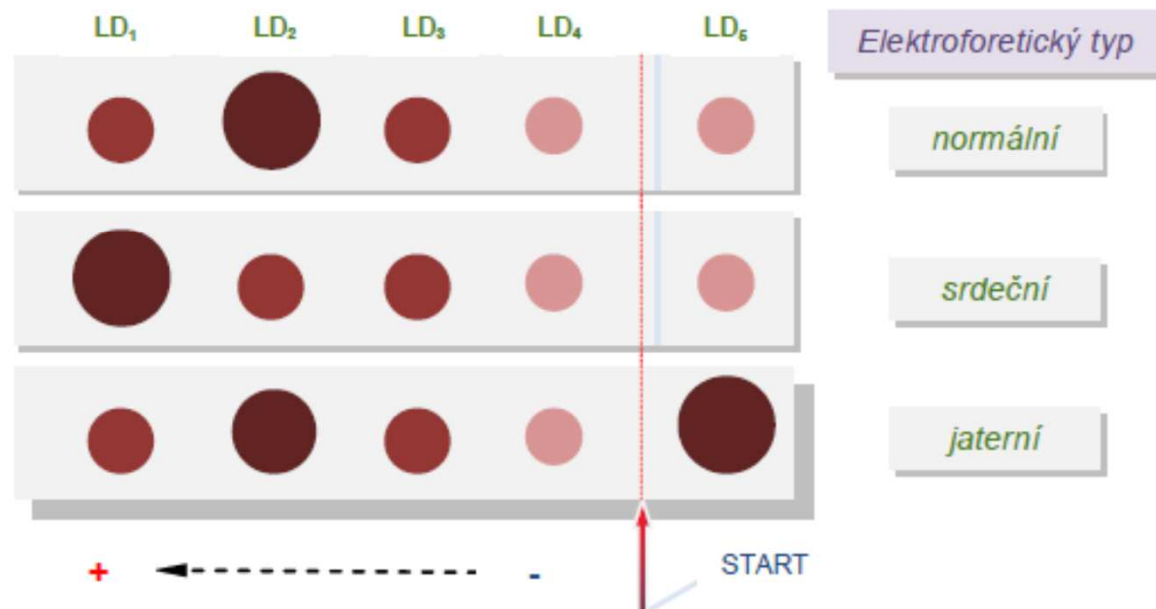
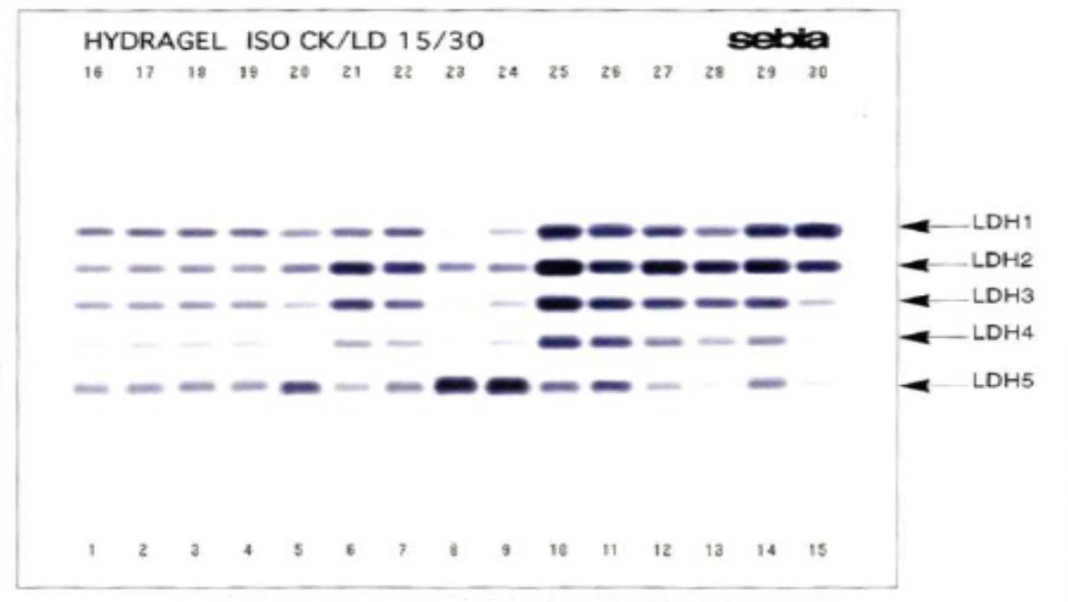
- Přímé stanovení



- Pomocná reakce



# Izoenzymy LHD



# Automatické analyzátořy

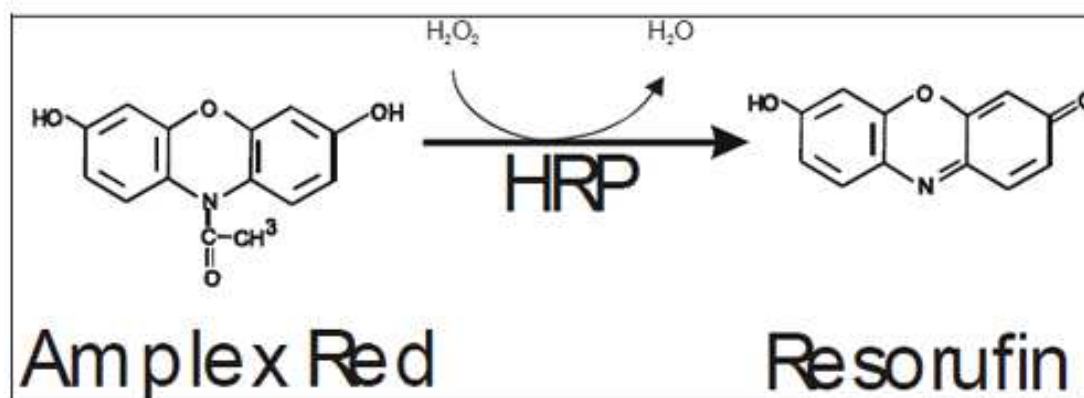
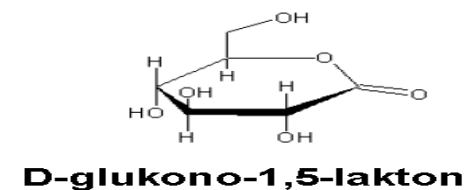
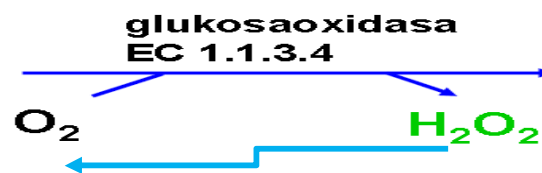
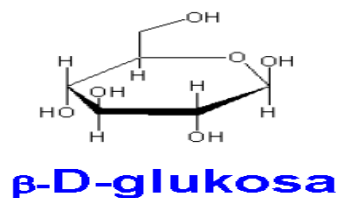


# Diagnostické proužky

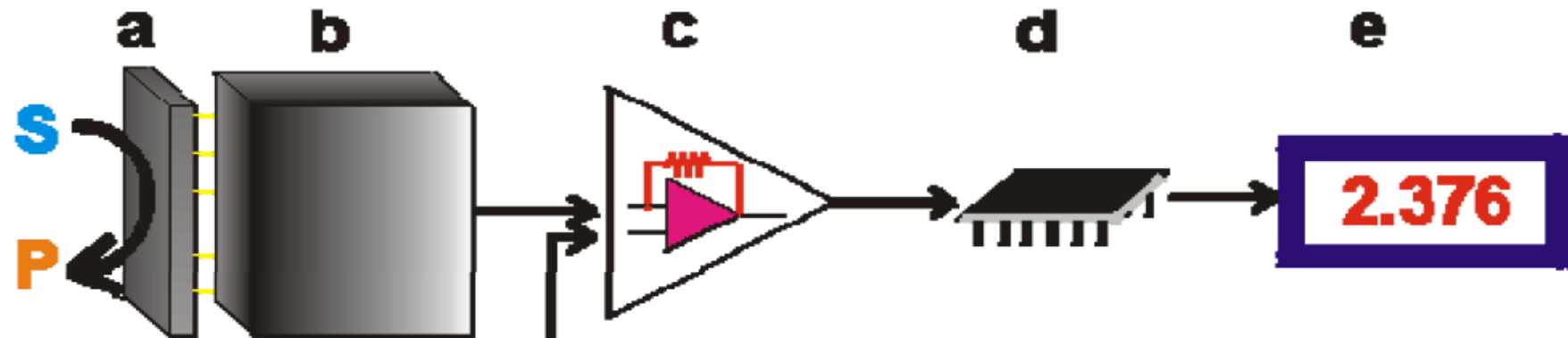


žádná  
glukosa

Zvyšující se množství glukosy →



# Biosenzory

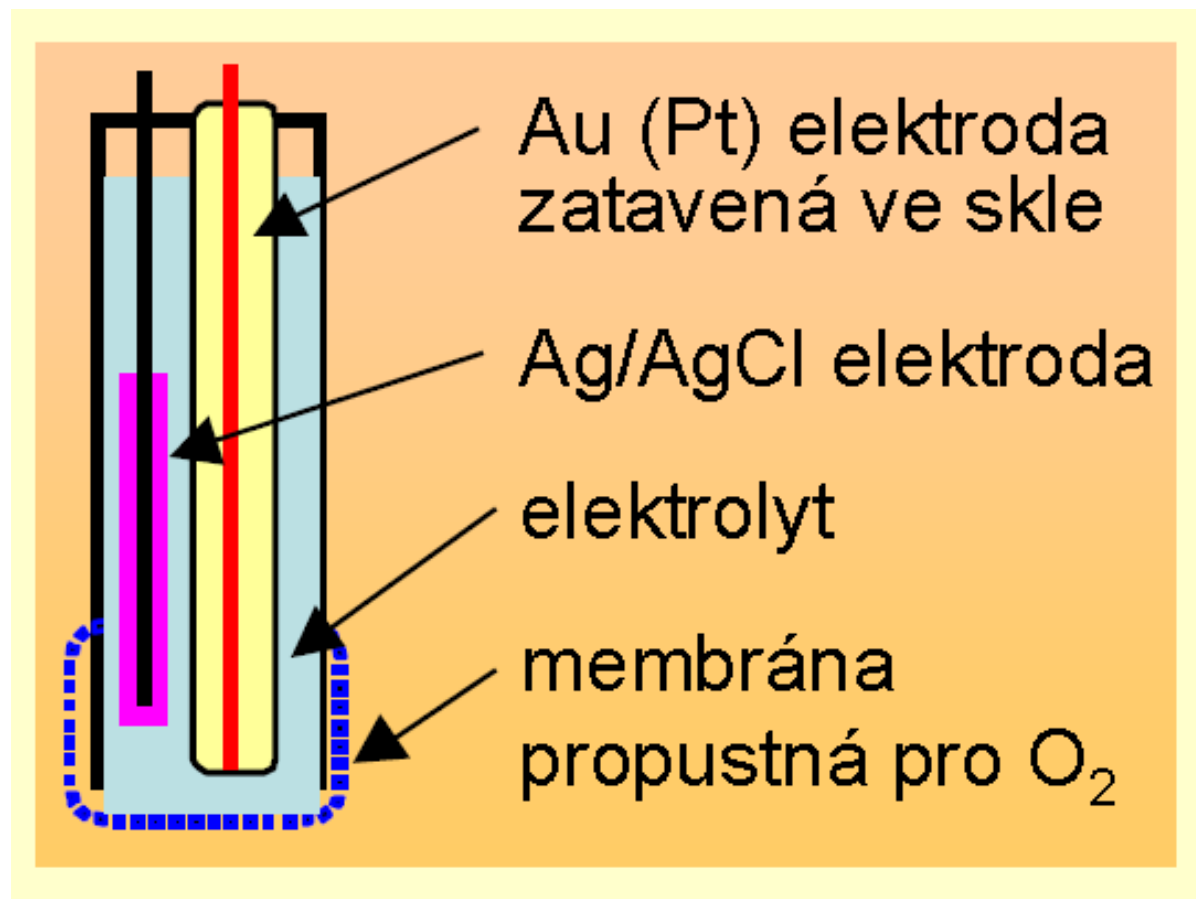


- Reference**
- a) Biokatalyzátor (přeměna substrátu na produkt)
  - b) Převodník (generování elektrického signálu)
  - c) Zesilovač (zesílení signálu)
  - d) Procesor (vyhodnocení signálu)
  - e) Výstup výsledku

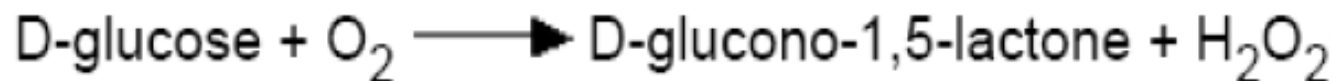
- výměna tepla
- redistribuce iontů a změna elektrického potenciálu
- výměna elektronů
- změna vodivosti
- změna optických vlastností
- změna hmotnosti

# Amperometrické biosenzory

Leland C. Clark Jr.  
1956



glucose oxidase



# Biosensor pro glukosu

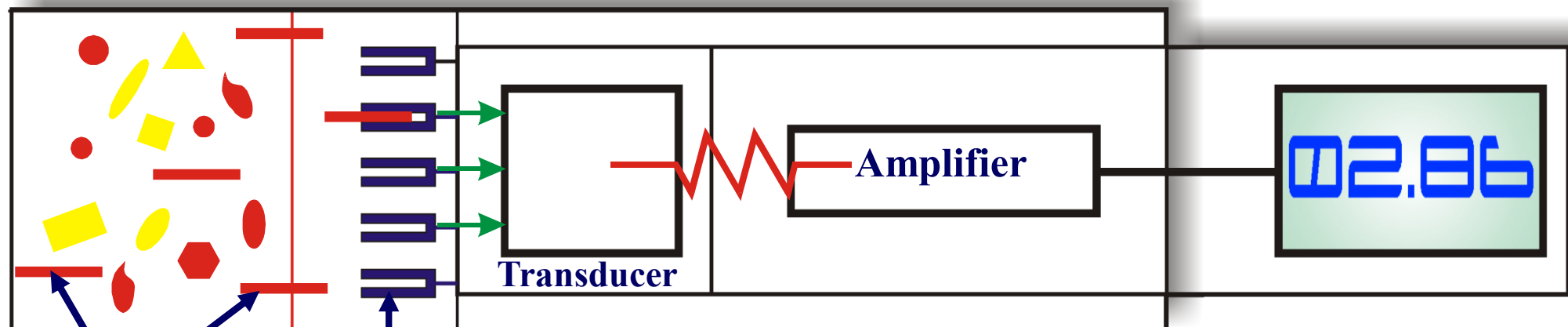


Enzymová elektroda  
na jedno použití



Měřicí jednotka

# Biosensor na glukosu



**Glukosa  
V krvi**

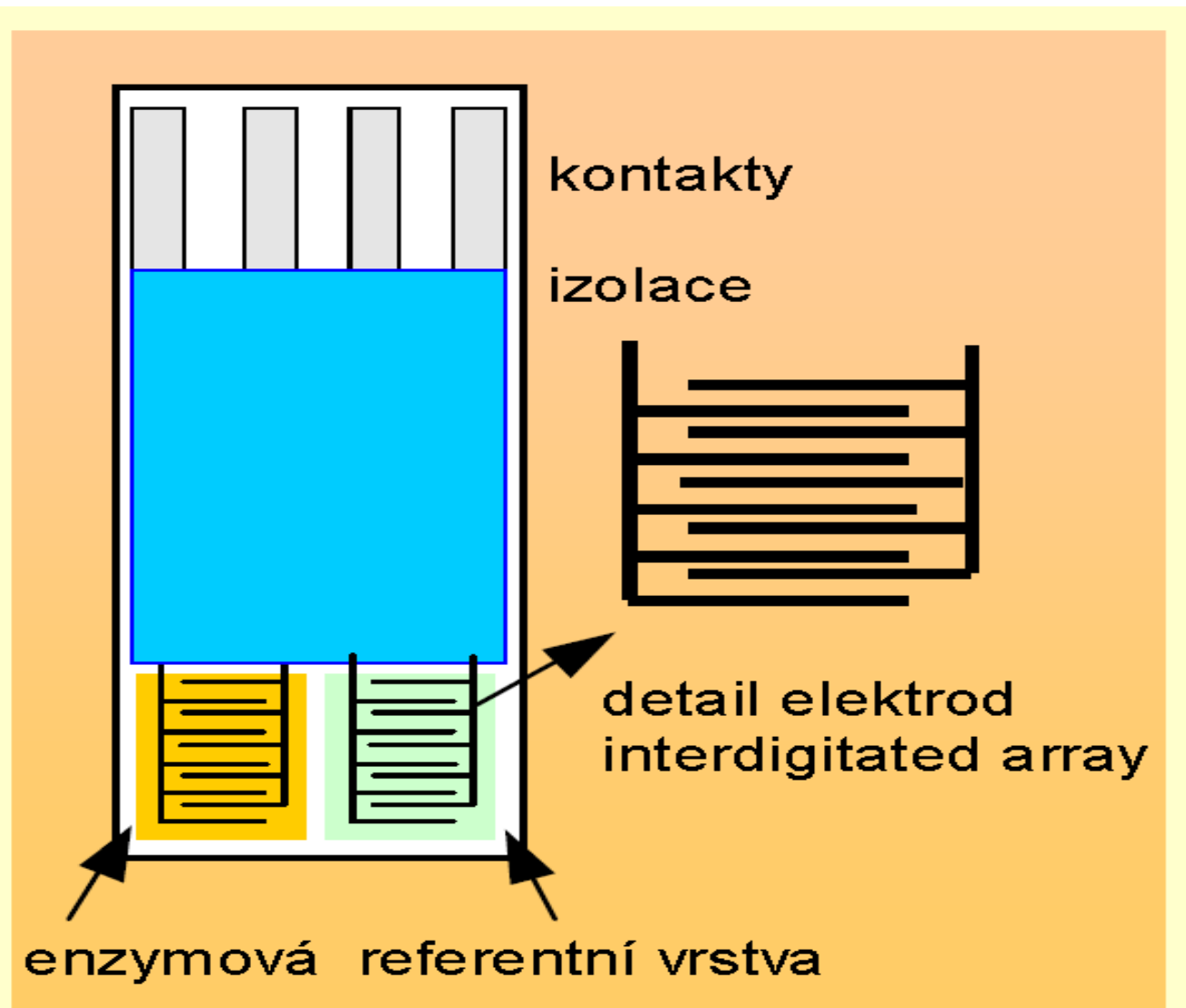
**Glukosa  
oxidasa**

**Glukosa oxidasa  
oxiduje glukosu  
za uvolnění  
elektronů – které  
jsou detekovány převodníkem  
A převedeny na elektrický proud**

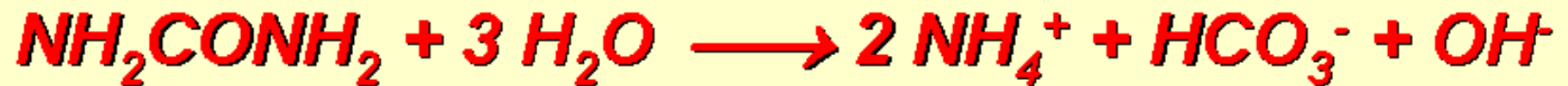
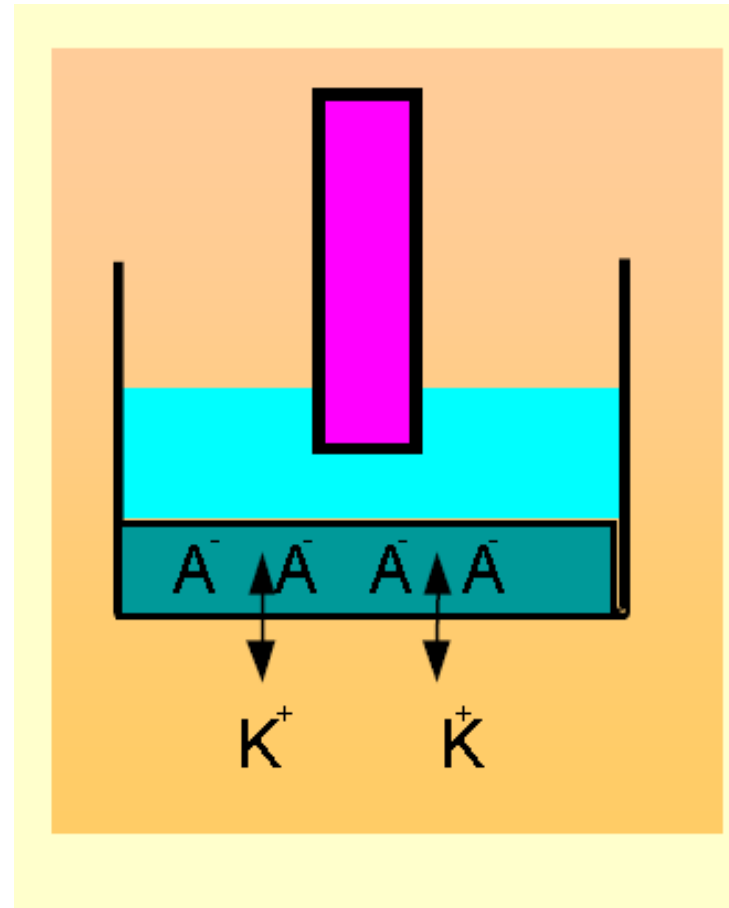
**Generovaný proud je  
proporcionální  
množství glukosy  
znázorněnému na display**



# Konduktometrické biosenzory

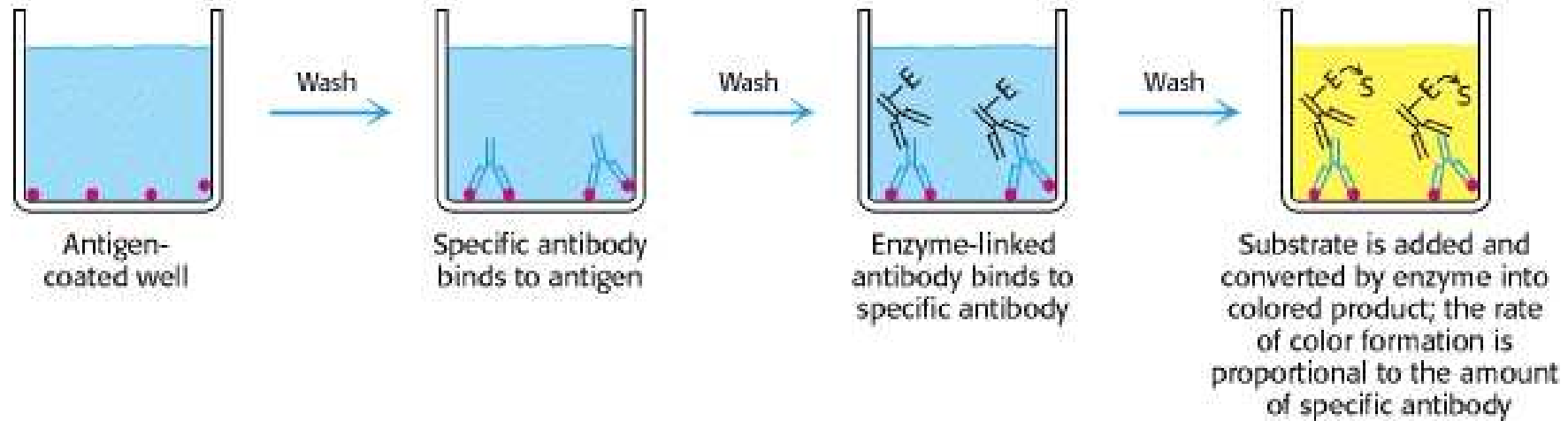


# Potenciometrické biosenzory

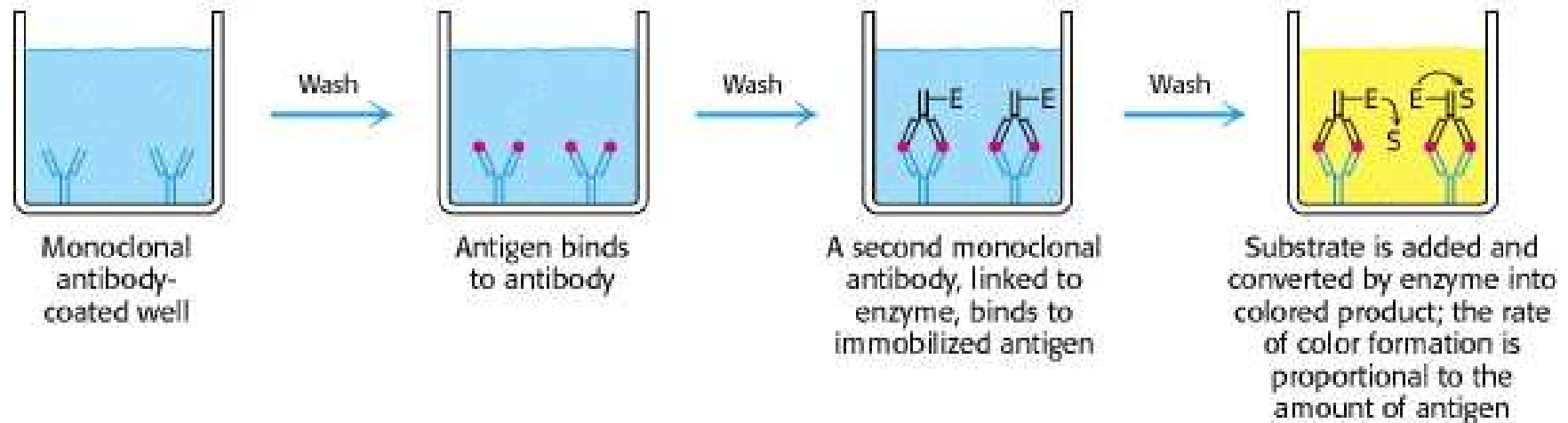


# ELISA

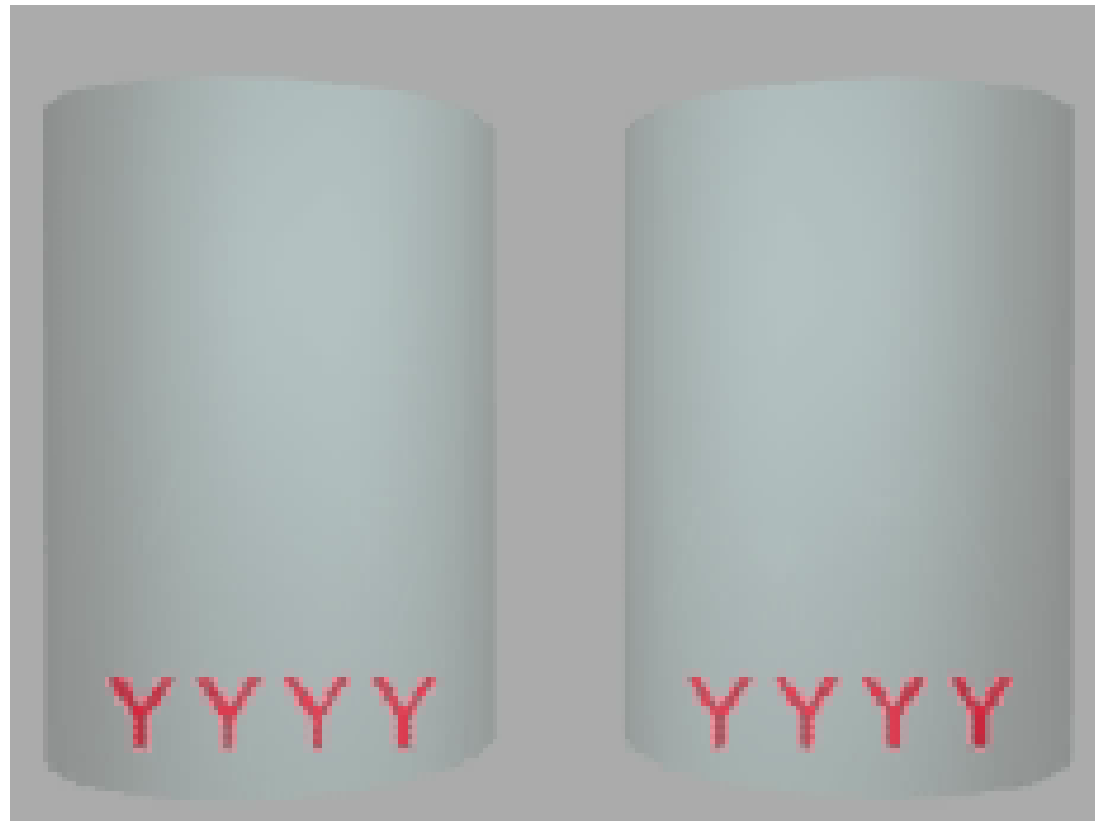
(A) Indirect ELISA



(B) Sandwich ELISA

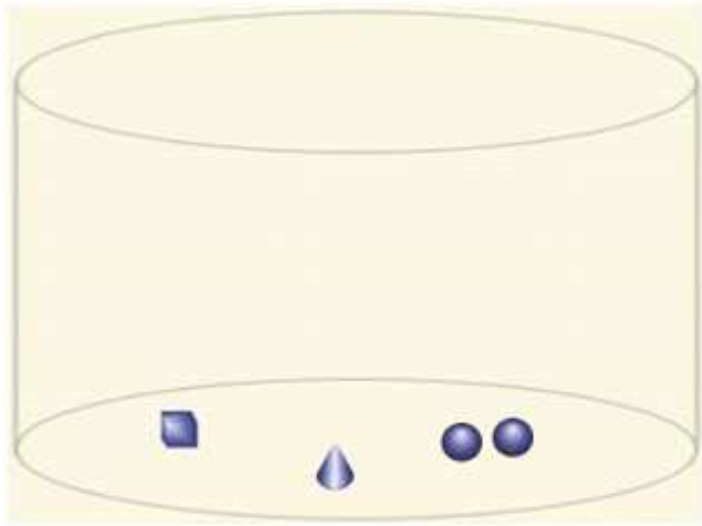


# ELISA – stanovení antigenu

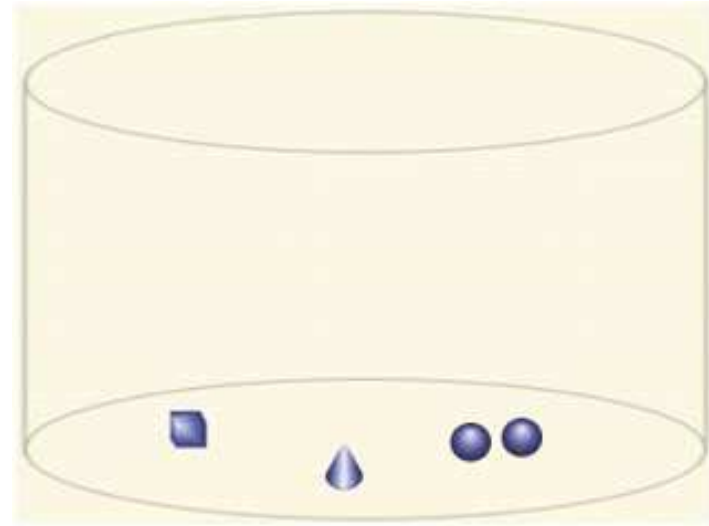


# ELISA – stanovení protilátky

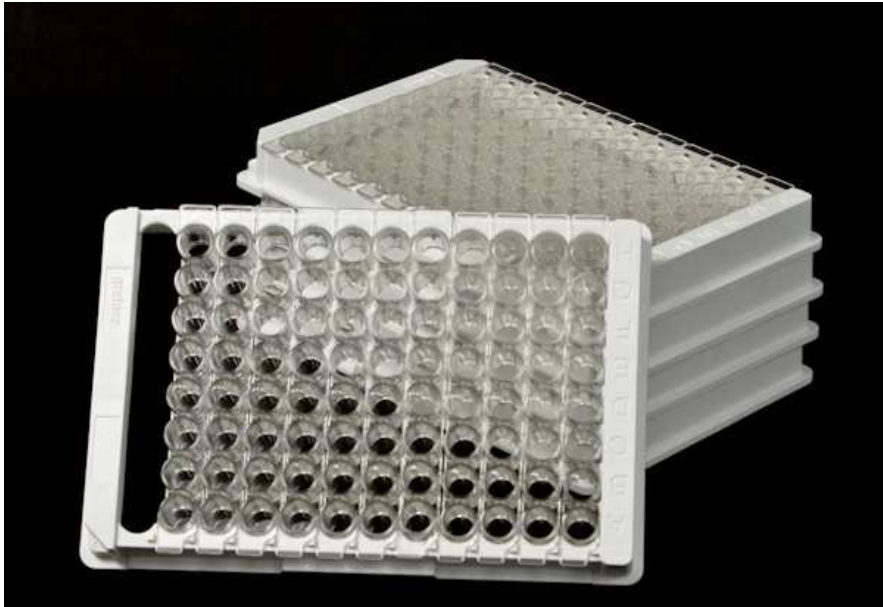
negativní



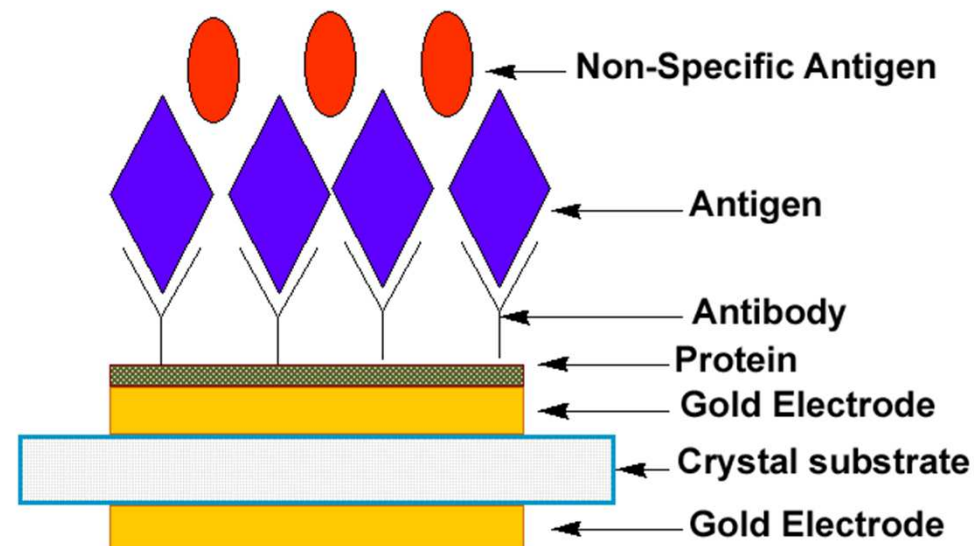
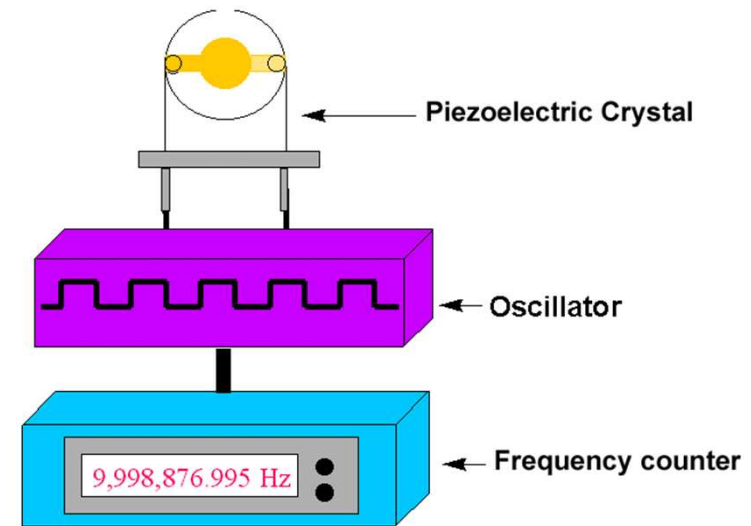
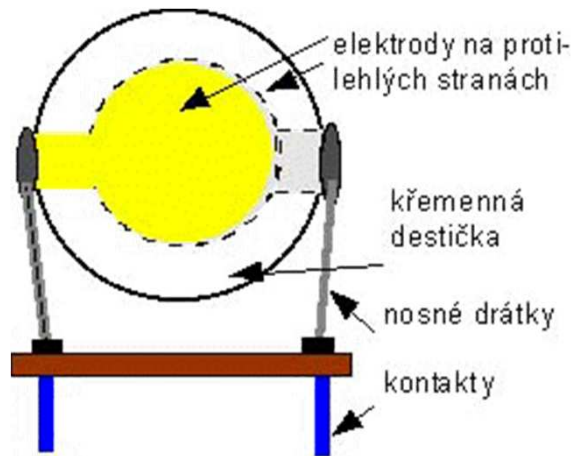
pozitivní



# ELISA - vybavení



# Piezoelektrický biosenzor



# Kantilever

