

ENZÝMY - BIOKATALYZÁTORY

Predmet: biotechnológia

E. Kulichová

Základná charakteristika enzýmov

- Po chemickej stránke patrí väčšina enzýmov medzi proteíny, sú to väčšinou oligo – až polypeptidy . Ich základ tvoria aminokyseliny spojené peptidovou väzbou a usporiadané do trojrozmernej štruktúry.
- Riadia viac ako 5000 typov biochemických procesov vo všetkých živých organizmoch – vrátane človeka
- Ich základnou funkciou je – rovnako ako u iných katalyzátorov - znižovanie aktivačnej energie biochemických reakcií
- Vyznačujú sa veľkou špecifičnosťou (jeden enzým katalyzuje len konkrétnu biochemickú premenu) a vysokou účinnosťou.
- Veda o enzýmoch sa nazýva ENZYMOLÓGIA

Stavba enzýmu

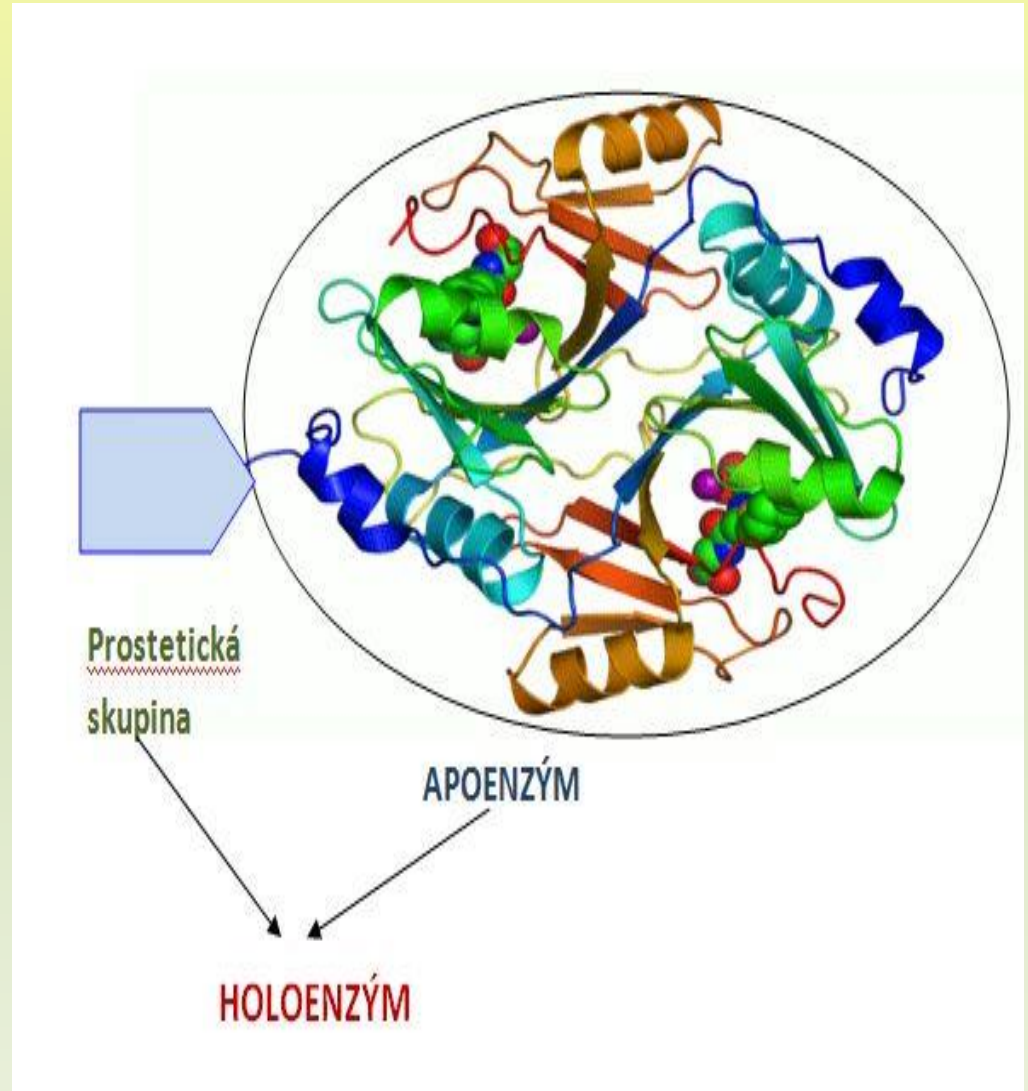
Základom väčšiny enzýmov je proteínová sekvencia, vytvárajúca priestorový útvar.

Menšiu, časť enzýmov tvoria prostetické skupiny, ktoré sú na enzým viazané a umožňujú jeho katalytickú funkciu.

Proteínová časť enzýmu sa nazýva apoenzým.

Apoenzým spolu s prostetickou skupinou tvorí výsledný aktívny holoenzým.

Okrem proteínových enzýmov existuje aj malý počet enzýmov, ktoré majú namiesto proteínovej časti časť zloženú z RNA. Nazývajú sa rybozýmy a patria k nim napríklad rRNA v ribozóme.



Proteínová zložka APOENZÝM

Stavba

- Skladá sa z proteogénnych aminokyselín
- Počet aminokyselín je 62 až 2500
- Na aktivite enzýmu sa však podieľa zvyčajne len niekoľko (3 -4) aminokyselín
- Niekedy tvorí proteínovú časť enzýmu aj niekoľko samostatných proteínových jednotiek

Vlastnosti

- Táto časť enzýmu môže denaturovať
- Denaturácia – proces zmeny štruktúry proteínu, ktorý je vyvolaný:
 - Teplotou
 - Chemickými látkami
 - Žiarením
- Denaturácia zničí celý enzým

Prostetické skupiny a kofaktory

Prostetické skupiny

Sú pevne viazané na proteínovú zložku – kovalentnou väzbou.

Môžu mať charakter organickej štruktúry

Môžu to byť niektoré ióny kovov napr. Fe, Zn - enzýmy, ktoré tvoria, nazývame metaloenzýmy

Kofaktory

- sú viazané voľnejšie,
- ľahko disociujú,
- delia sa do niekoľkých skupín, podľa toho, aké reakcie katalyzujú.

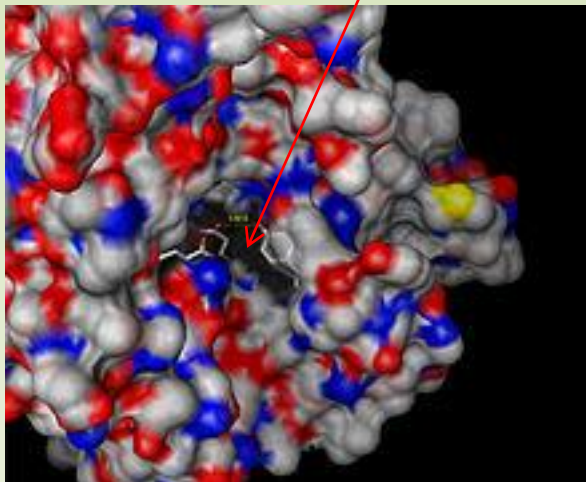
V kategorizácii prostetických skupín a kofaktorov zatiaľ nepanuje zhoda, jednotliví autori učebníc používajú rôzne rozdelenie

Tvar enzýmov

Aktívne miesto

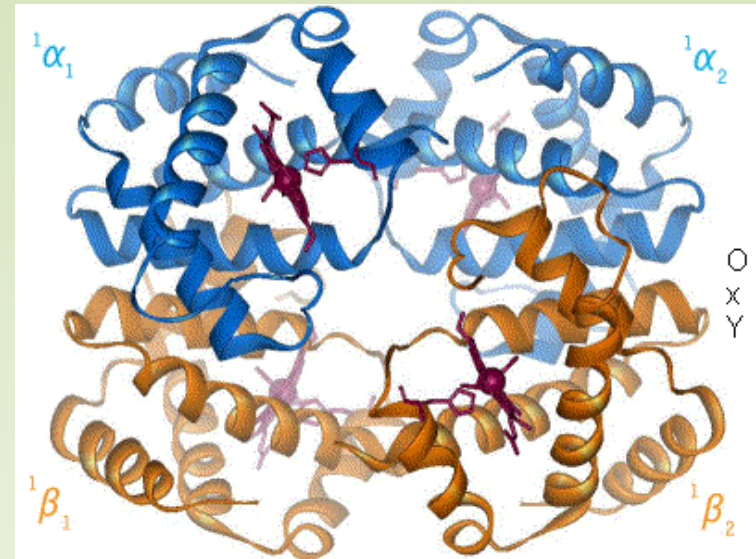
je taká oblasť enzýmu, kde dochádza k enzýmovej reakcii. Má tvar

- jamky
- pukliny
- priehlbinky



Alosterické miesto

je miesto, kde sa časti molekúl substrátu naviažu (ako keby zachytia), ale nedochádza tu ešte k enzýmovej premene

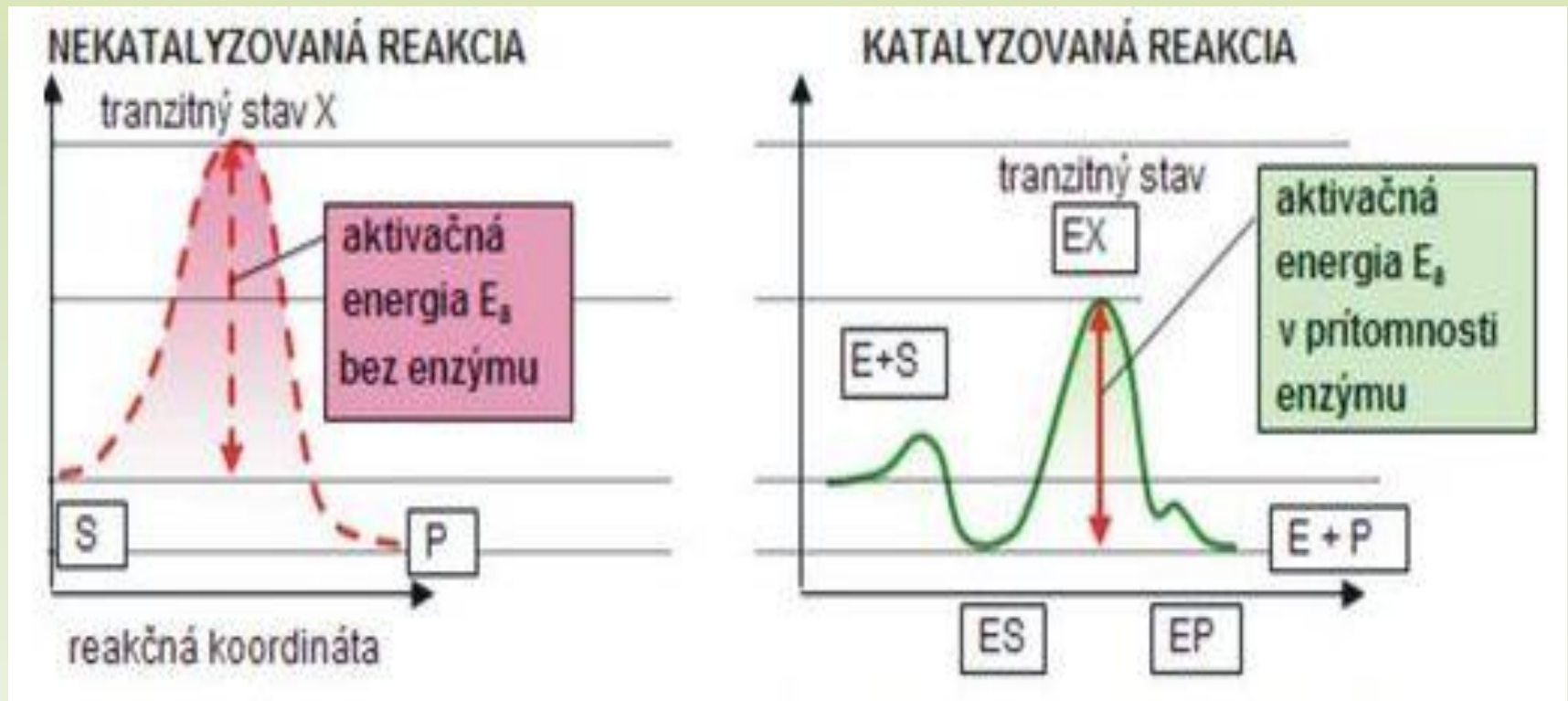


Účinok enzýmov

- Katalýza biochemických reakcií
- To znamená zníženie aktivačnej energie biochemickej premeny

SUBSTRÁT → PRODUKT

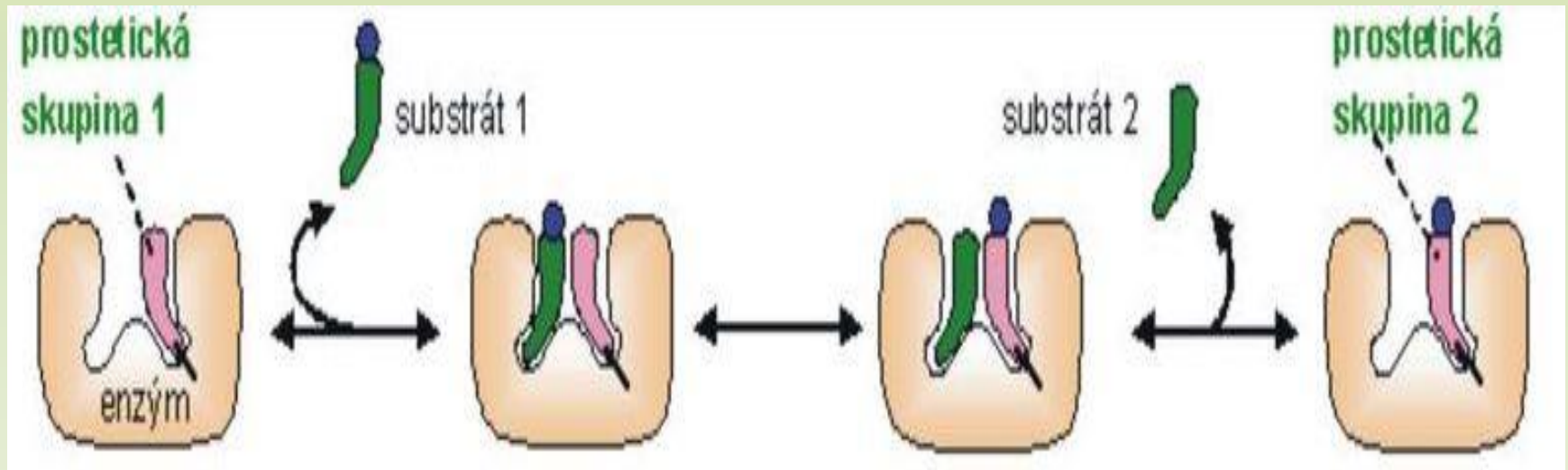
ako to znázorňuje schéma:



Mechanizmus pôsobenia enzýmov

Enzýmy s prostetickou skupinou

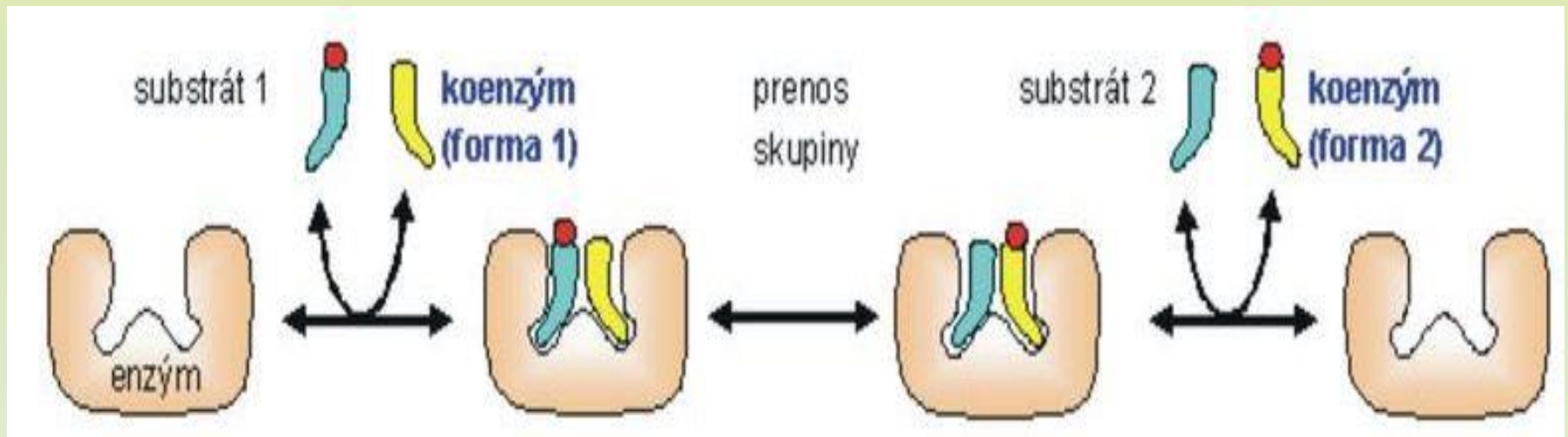
Prostetická skupina 1 je uložená na vhodnom (alosterickom) mieste enzýmu. Keď sa k nej priblíži substrát 1, dôjde k vzájomnej reakcii a touto reakciou sa substrát 1 zmení na substrát 2. Dôjde aj k viac alebo menej vratnej zmene prostetickej skupiny (vznikne prostetická skupina 2).



Mechanizmus pôsobenia enzýmov

Enzým s kofaktorom

Enzým neobsahuje žiadnu prostetickú skupinu, len vhodné miesto, na ktorom môže prebehnúť reakcia. K tomuto miestu sa transportuje substrát 1 aj vhodný koenzým vo forme 1. Dôjde k prenosu skupiny a vznikne substrát 2. Svoje zloženie zmení aj koenzým, vznikne forma 2. Substrát 2 aj koenzým 2 opustia alosterické miesto.



Enzýmy sa najčastejšie rozdeľujú podľa typu reakcií, ktoré katalyzujú

Skupiny enzýmov podľa katalyzovaných reakcií

Trieda	typ reakcie	dôležité podtriedy
1. Oxidoreduktázy	• redukčné ekvivalenty $A_{red} + B_{ox} \rightleftharpoons A_{ox} + B_{red}$	<i>dehydrogenázy</i> <i>oxidázy, peroxidázy</i> <i>reduktázy</i> <i>monooxygenázy</i> <i>dioxygenázy</i>
2. Transferázy	$A-B + C \rightleftharpoons A + B-C$	<i>C1-transferázy</i> <i>glykozyltransferázy</i> <i>aminotransferázy</i> <i>fosfotransferázy</i>
3. Hydrolázy	$A-B + H_2O \rightleftharpoons A-H + B-OH$	<i>esterázy</i> <i>glykozidázy</i> <i>peptidázy</i> <i>amidázy</i>
4. Lyázy (syntázy)	$A + B \rightleftharpoons A-B$	<i>C-C-lyázy</i> <i>C-O-lyázy</i> <i>C-N-lyázy</i> <i>C-S-lyázy</i>
5. Izomerázy	$A \rightleftharpoons \text{izo-A}$	<i>epimerázy</i> <i>cis-trans-izomerázy</i> <i>intramolekulové transferázy</i>
6. Ligázy (syntetázy)	$A + B + XTP \xrightarrow{X=A, G, C \text{ a } U} A-B + XDP + P_i$	<i>C-C-ligázy</i> <i>C-O-ligázy</i> <i>C-N-ligázy</i> <i>C-S-ligázy</i>

Vyjadrenie aktivity enzýmu

- Aktivita enzýmov sa vyjadruje v jednotkách podľa medzinárodnej sústavy jednotiek SI
- Jednotkou na vyjadrovanie enzýmovej aktivity v sústave SI je 1 **KATAL** - skratka **kat**, ktorý je najčastejšie používaný v prepočte na 1 liter biologickej tekutiny.
- Definícia: 1 kat je taká aktivita enzýmu, ktorá premení 1 mol substrátu za 1 s.
- Staršou jednotkou je U. 1 kat je približne 60 000 U

Rýchlosť enzýmovej reakcie

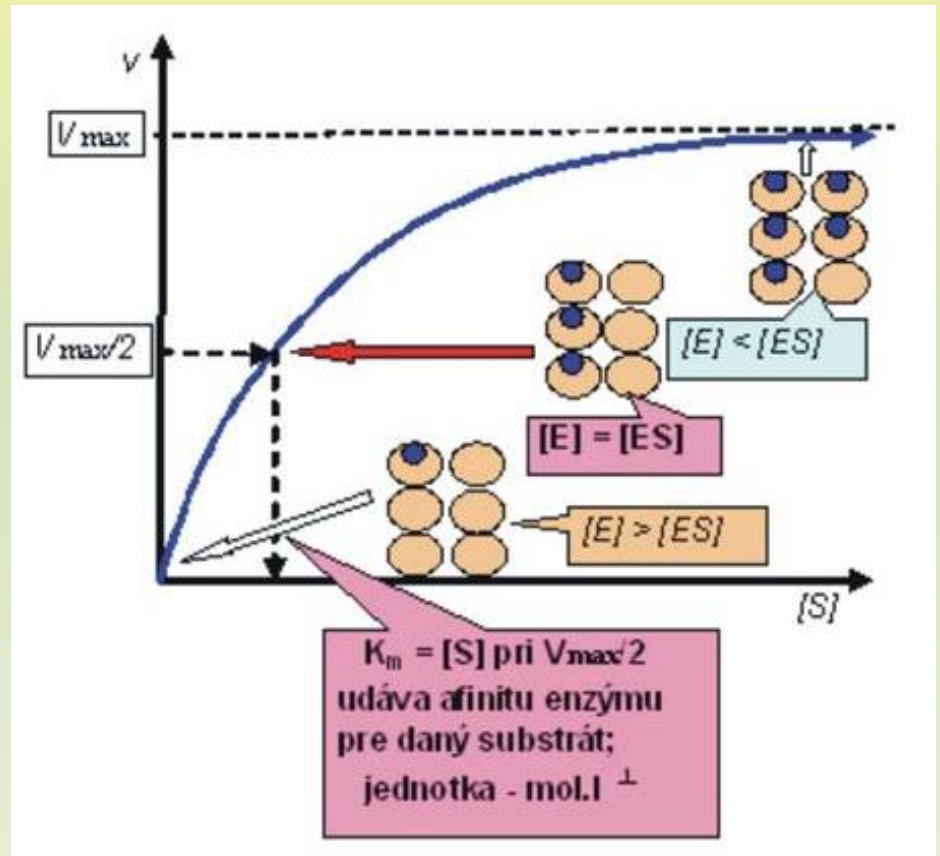
Michaelisova konštanta je definovaná ako koncentrácia substrátu, pri ktorej sa rýchlosť reakcie katalyzovanej daným enzýmom rovná polovici maximálnej rýchlosti

$$K_m = [S] \cdot \left[\frac{V_{max}}{V - 1} \right]$$

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

jednotka - mol.l⁻¹.s⁻¹

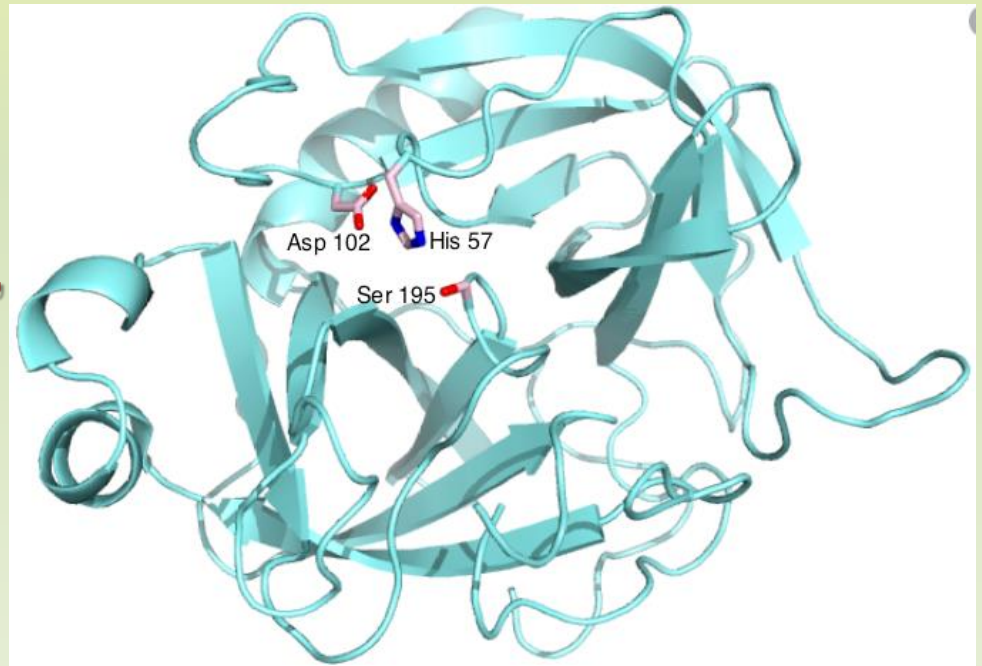
Kinetika enzýmovej reakcie



Faktory ovplyvňujúce rýchlosť enzýmovej reakcie

Na rýchlosť enzýmami katalyzovanej reakcie vplývajú najmä:

- koncentrácia substrátu,
- koncentrácia enzýmu,
- teplota,
- pH reakčného prostredia (pH),
- prítomnosť aktivátorov a inhibítorov.



Vplyv teploty na aktivitu enzýmov

Teploty 20 – 50 °C - so zvyšovaním teploty sa zvyšuje aktivita enzýmov

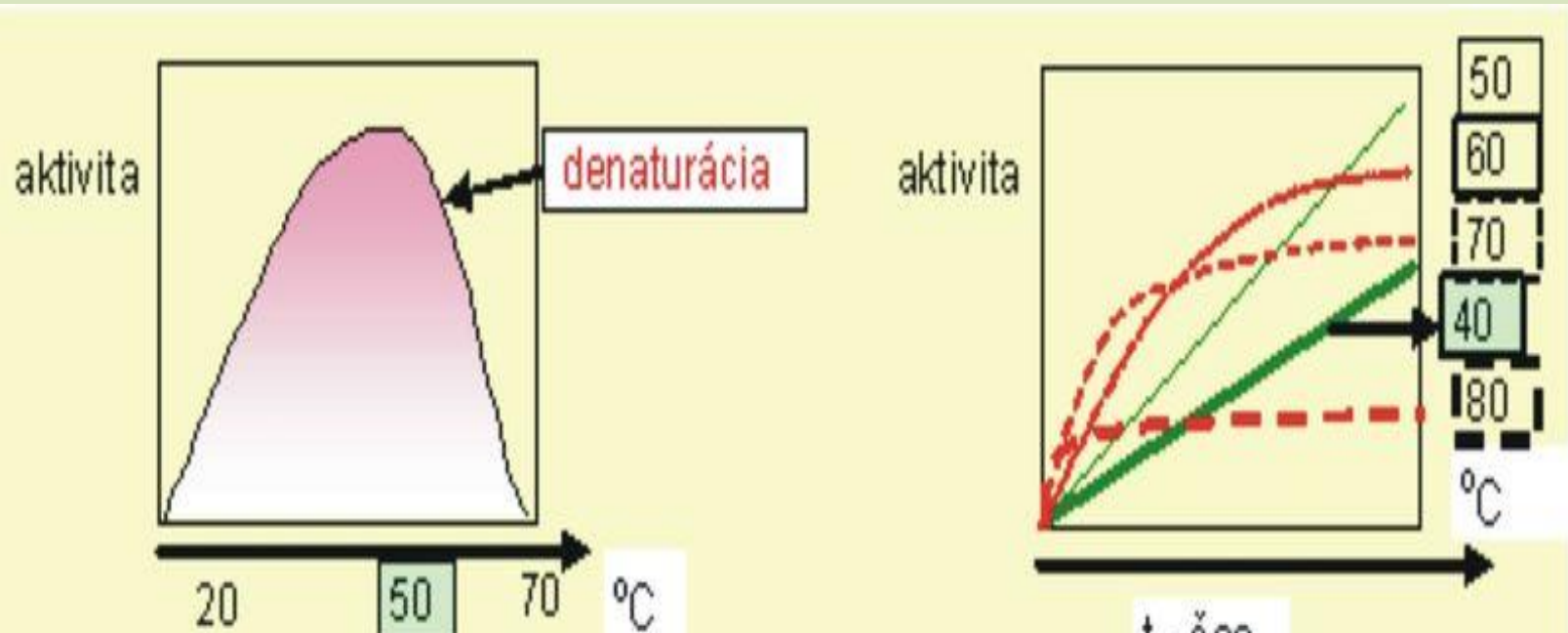
Teploty nad 50 °C - rýchlosť reakcie sa postupne znižuje, pretože enzýmy denaturujú

Teplotné optimum enzýmu je teplota, pri ktorej enzým vykazuje maximálnu aktivitu.

Pre väčšinu enzýmov je teplotné optimum v rozmedzí 35 – 45 °C.

Teploty okolo 0°C - enzýmové reakcie sa výrazne spomaľujú, takmer neprebiehajú

Teploty pod – 20 °C – enzýmové reakcie sa úplne zastavujú.



Vplyv pH na aktivitu enzýmov

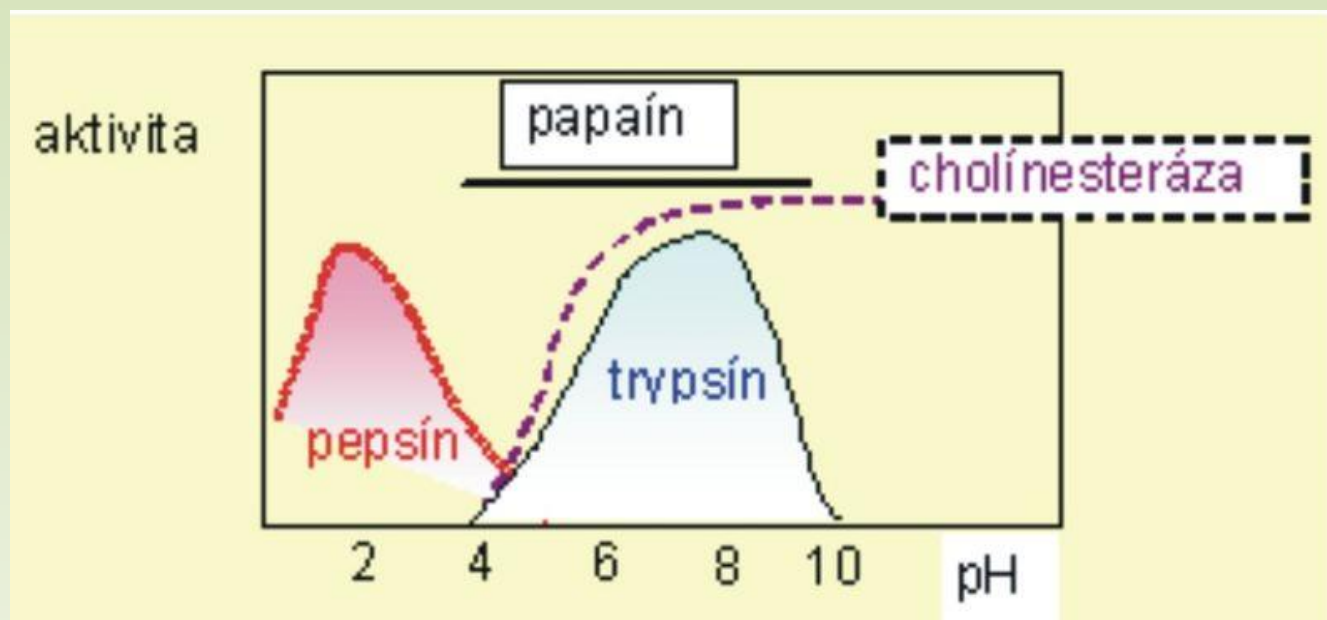
Závislosť aktivity enzýmu od pH má tvar krivky s maximom

Maximum – zvyčajne pH od 5 do 8 – optimum pH

Silne kyslé a silne zásadité prostredie – denaturácia enzýmu a výrazný pokles aktivity

Výnimky :

- pepsín – je aktívny aj v silne kyslom prostredí
- papaín – aktivita prakticky nezávisí od pH
- cholínesteráza – vysoká aktivita v celej oblasti nad určitým pH



Ovplyvnenie rýchlosti enzýmovej reakcie prítomnosťou aktivátorov a inhibítorov

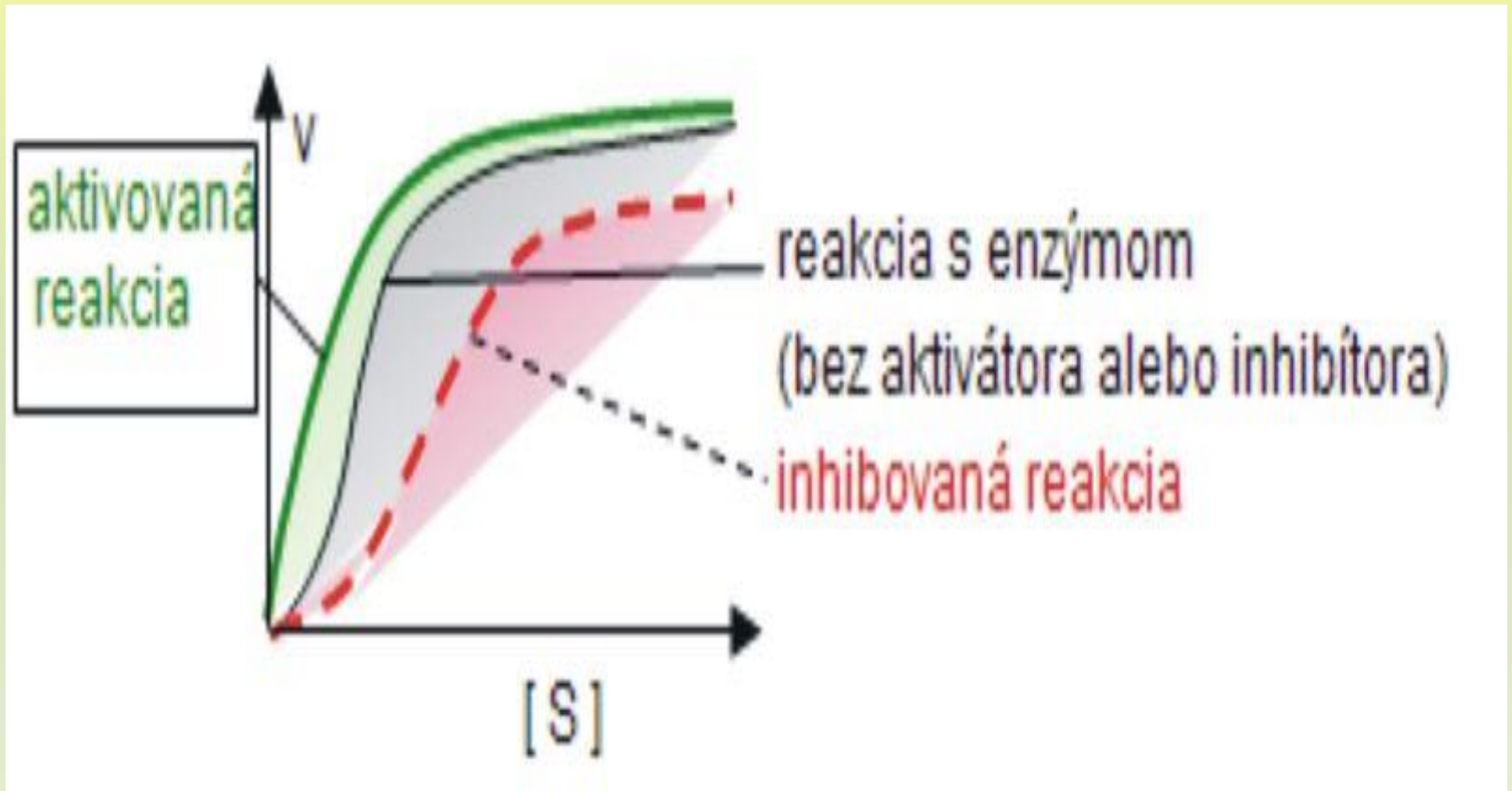
Enzýmy sa vyznačujú vysokou špecifickosťou voči substrátu (substrátová špecifickosť) i typu katalyzovanej reakcie (účinková špecifickosť).

Ich aktivita sa môže rýchlo meniť v závislosti od potrieb bunky i celého organizmu.

Aktivátory zvyšujú urýchľujú rýchlosť enzýmových reakcií

Inhibítory spomaľujú enzýmové reakcie.

Ovplyvnenie rýchlosti enzýmovej reakcie prítomnosťou aktivátorov a inhibítorov



Účinok viacerých liekov (napríklad antipyretík) spočíva v inhibovaní enzymatických reakcií

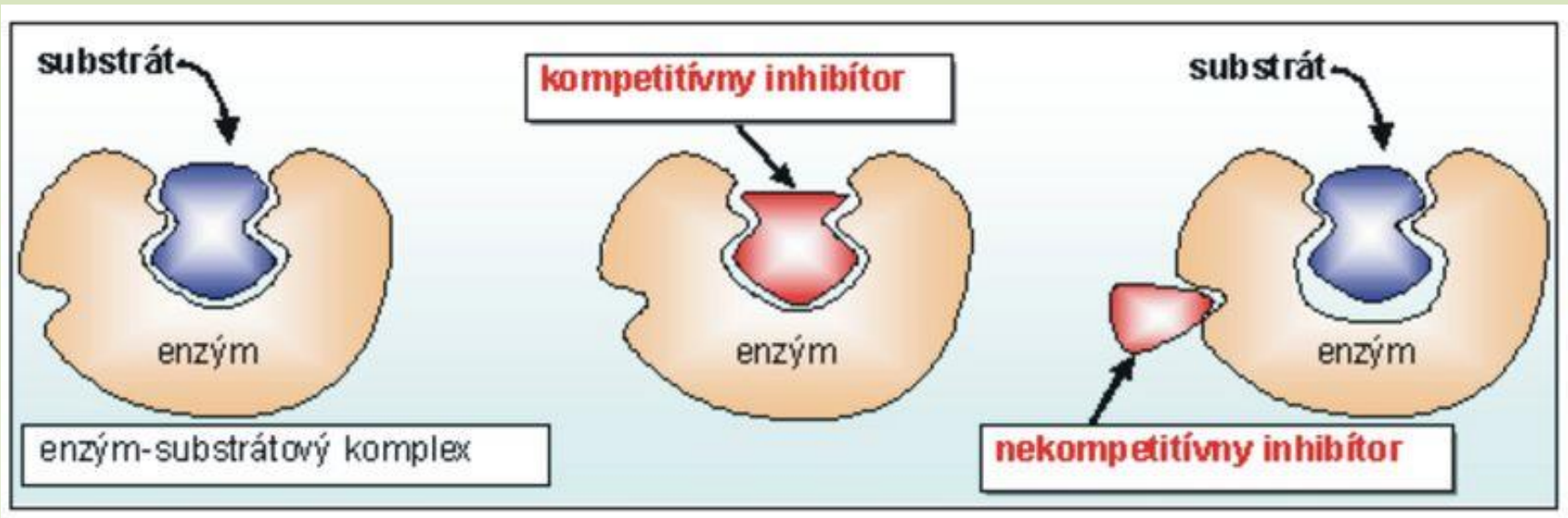
Inhibítory enzýmovej reakcie

Inhibícia enzýmu môže byť:

- reverzibilná (vratná) - medzi inhibítorom a enzýmom vzniká nekovalentná väzba
- ireverzibilná (nevratná) – medzi inhibítorom a enzýmom vzniká kovalentná väzba.

Podľa mechanizmu rozoznávame:

- kompetitívnu inhibíciu (inhibítor „vytlačí“ substrát z alesterického miesta)
- nekompetitívnu inhibíciu (inhibítor neobsadí alesterické miesto, ale ovplyvní napríklad jeho štruktúru)



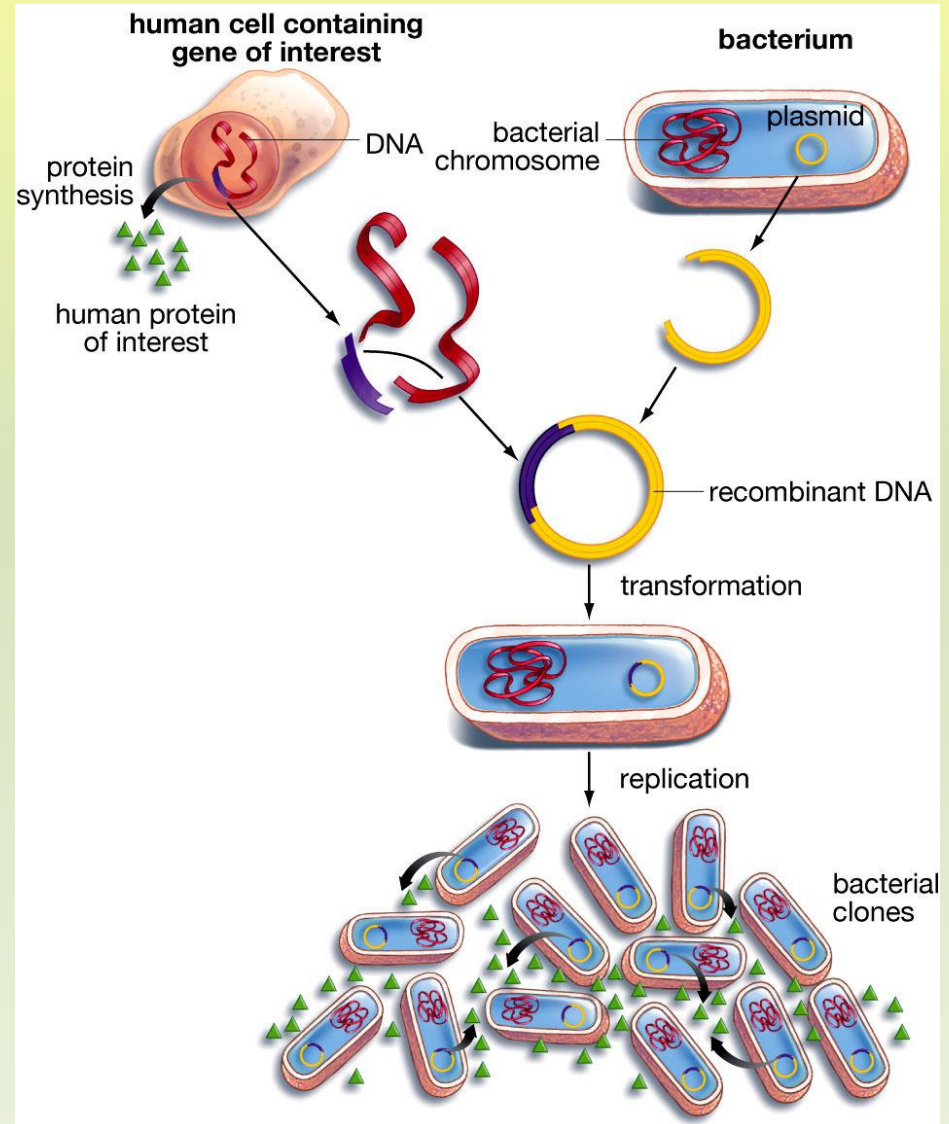
Priemyselná výroba enzýmov

V súčasnosti sa priemyselne vyrábajú viaceré druhy enzýmov. Postup priemyselnej výroby možno ukázať na príklade inzulínu, ktorý sa dlho vyrábal izoláciou z pankreasov ošípaných.

Na začiatku je dôležité zistiť, ktoré gény v bunke (human cell containing gene of interest) kódujú tvorbu inzulínu (human protein of interest) v prirodzenej proteosyntéze.

Gény sa „vystrihnú“ a vložia sa do plazmidu baktérie, čím vzniknú baktérie (napríklad *E. coli*) s rekombinovanou DNA (recombinant DNA),

Geneticky modifikované baktérie sa množia (replication) a použijú ako produkčný kmeň vo výrobe inzulínu



Priemyselná výroba enzýmov

- Mikroorganizmy sa pri výrobe enzýmov uprednostňujú najmä preto, že:
 - Výroba je omnoho lacnejšia, než výroba z rastlinných alebo živočíšnych organizmov
 - Zloženie produktu pri kultivácii je omnoho jednoduchšie, teda enzýmy sa ľahšie izolujú a čistia
 - Pri priemyselnej výrobe sa uprednostňujú mikroorganizmy, ktoré dokážu produkovať extracelulárne enzýmy. Tým sa zjednodušuje ich izolácia
 - GMO produkčné mikroorganizmy sa musia pre priemyselné účely pripraviť veľmi starostlivou kultiváciou, aby sa predišlo ich znehodnoteniu

Priemyselne sa enzýmy vyrábajú povrchovou alebo submerznou kultiváciou

Substrát sa musí vybrať tak, aby stimuloval činnosť produkčných mikroorganizmov

Ďalšie spracovanie po kultivácii závisí od typu produkcie – či sa produkuje intracelulárny alebo extracelulárny enzým. V prípade intracelulárnych enzýmov sa musí zaradiť stupeň dezintegrácie buniek, čím sa enzýmy dostanú do roztoku

Nasleduje ultrafiltrácia - oddelenie enzýmov z roztoku získajú sa surové enzýmy vhodné pre priemyselné použitie

Pre farmaceutické použitie sa enzýmy musia čistiť:

- odparením rozpúšťadla destiláciou pri zníženom tlaku alebo osmózou
- zrážaním
- chromatografiou

Priemyselná výroba enzýmov

Ak sa enzýmy používajú v priemyselnej produkcii, často sa využívajú v tzv. imobilizovanej forme, aby sa po katalýza príslušnej reakcie dali ľahko odstrániť a znova využiť.

Vyrobené enzýmy (lipázy, proteázy, amylázy) sa využívajú napríklad pri:

- výrobe pracích prostriedkov,
- modifikácii a spracovaní prírodných produktov (ovocné šťavy, škrob, cereálie),
- výrobe liekov a doplnkov výživy



Úlohy na opakovanie:



- ❖ Opíšte štruktúru a vlastnosti apoenzýmu
- ❖ Uvedte názvy aspoň troch skupín enzýmov podľa
- ❖ Vysvetlite, ktorá z častí enzýmu podlieha denaturácii. Uvedte, ktoré faktory môžu denaturáciu vyvolať
- ❖ Vysvetlite, prečo kvasnice, ktoré prešli tepelnou úpravou nebudú už v procese prípravy kysnutého cesta aktívne
- ❖ Enzýmové koncentráty sú dnes už dostupné ako koncentráty. Diskutujte o požiadavkách na uskladnenie takýchto preparátov.
- ❖ Vysvetlite, prečo sa pri priemyselnej izolácii enzýmov využíva vákuová destilácia