



ENZYMY i WYTRYCH DO METABOLIZMU

DR ELŻBIETA WINNICKA

Zakład Chemii Fizycznej i Radiochemii

Pracownia Elektrochemicznych Źródeł Energii

Historia

XVIII i XIX wiek

Pracowanie *in vitro* mięsa przez wydzieliny wątróbki,

Przekształcanie skrobi do cukrów prostych przez ekstrakty roślinne lub ślinę.

XIX wiek

Louis Pasteur i termin **fermentem** fermentacji cukrów do alkoholu przeprowadzanej przez drożdże.

1878 rok

Wilhelm Kühne i termin **enzym** (z języka greckiego **ένζυμο** i oznacza **wzmacniacz**).

1897 rok

Eduard Buchner - zdolność ekstraktów drożdżowych do fermentacji cukrów przy nieobecności żywych komórek,

zymaza - enzym przeprowadzający fermentację sacharozy nazwą

1907 rok

Eduard Buchner Nagroda Nobla w dziedzinie chemii za badania biochemiczne i odkrycie fermentacji bez udziału komórek.

Historia cd.

1946 rok

J. B. Sumner, J. H. Northrop i W. M. Stanley nagroda Nobla w dziedzinie chemii za izolację enzymów w formie krystalicznej:

J. B. Sumner wykrystalizował enzymy ureazę i katalazę,

J. H. Northrop wykrystalizował enzymy pepsynę,

W. M. Stanley wykrystalizował wirus mozaiki tytoniowej.

1965 rok

Lizozym – pierwszy enzym o poznanej strukturze (enzym w śluzach, ślinie, białku).

1989 rok

S. Altman i T. R. Cech Nagroda Nobla w dziedzinie chemii za odkrycie właściwości katalitycznych RNA.

Enzymy

Enzymy sŃ biologicznymi polimerami katalizujŃcymi liczne procesy, bez których Źycie nie byŹby moŹliwe. Enzym to **biokatalizator** białkowy (i nie tylko) wytwarzany przez Źywe komórki organizmu, który ma zdolnoŹ do obniŹania energii aktywacji danej reakcji chemicznej, co skutkuje jej przyspieszeniem. KatalizujŃ one reakcje w ukłŹdach biologicznych. Bez ich obecnoŹci dana reakcja nie zachodzi, lub przebiega tak wolno, Źe jej rezultat jest niezauwaŹalny.

Enzymy sŃ białkami prostymi i zŹłŹonymi. Enzym zŹłŹony skłŹda siŹ z czŹŹci białkowej i skłŹdnika niebiałkowego, zwanego **kofaktorem**. CzŹŹ białkowa takiego enzymu jest zwana apoenzymem, a poŹŹczenie apoenzymu z kofaktorem nosi nazwŹ **holoenzym**.

Holoenzym = kofaktor + apoenzym

Gdy kofaktor tj. czŹŹ niebiałkowa jest zwiŹzana na stale z apoenzymem i nazywamy jŹn inaczej grupŹ prostetycznŹ

Gdy kofaktor jest nietrwale zwiŹzany z apoenzymem i jest zwany **koenzymem**.

ory, grupy prostetyczne i koenzymy

Wiele enzymów potrzebuje dodatkowych składników do uaktywnienia czy osiągnięcia pełnej aktywności katalitycznej. Niebiałkowe składniki enzymów to **kofaktory**. Kofaktory można podzielić na dwie grupy:

grupy prostetyczne (metaloenzymy) to kofaktory silnie, często kowalencyjnie, związane przez enzym przez cały czas jego istnienia. Zwykle są to cząsteczki nieorganiczne i jony metali np.: Zn^{2+} ale także mogą być cząsteczki organiczne np.: flawiny i hem.

koenzymy to mogą być, niebiałkowe cząsteczki organiczne, wiążące się z enzymem tylko na czas reakcji i przenoszące grupy chemiczne pomiędzy poszczególnymi reakcjami. Koenzymy mogą być traktowane jak kosubstraty, ponieważ są wiązane i uwalniane z enzymów jako substraty i produkty oraz biorą bezpośredni udział w reakcji.

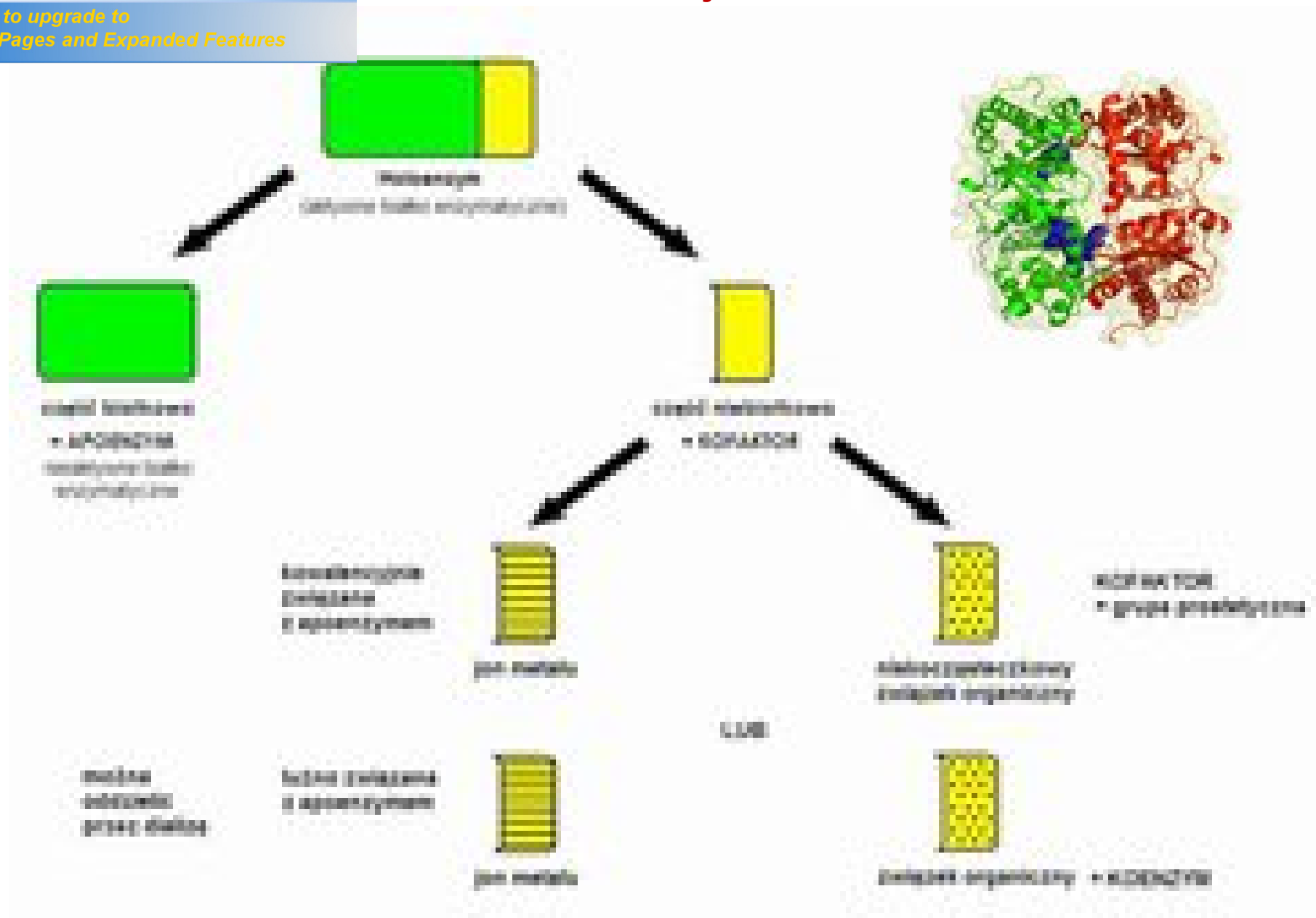


PDF
Complete

Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Budowa enzymu



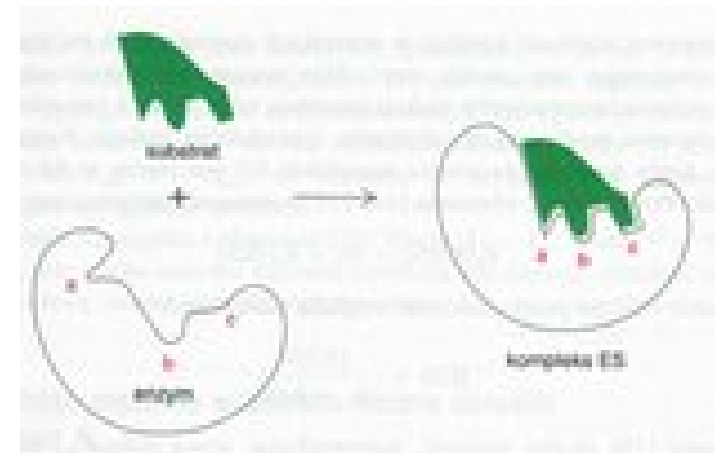
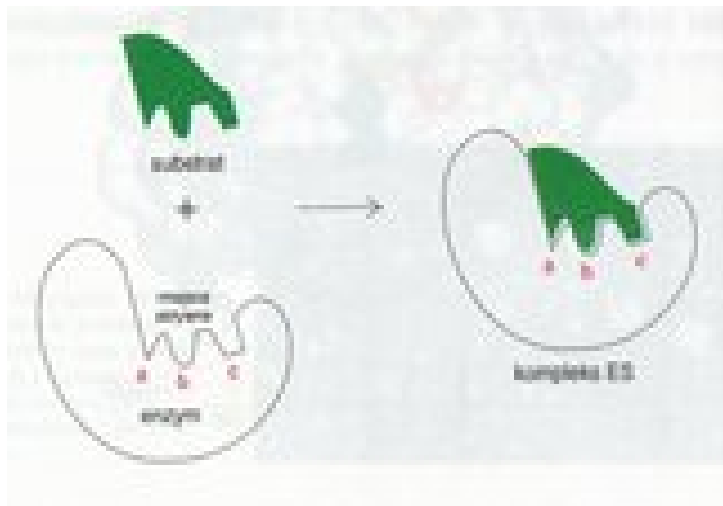
Miejsce (centrum) aktywne enzymu

W wiązaniu substratu i w przetwarzaniu go w produkt uczestniczy specyficzny region cząsteczki białka enzymatycznego, nazywany miejscem aktywnym lub centrum aktywnym enzymu. W jego strukturze można wyróżnić dwa elementy funkcjonalne. SĄ to: miejsce wiązania substratu i miejsce katalityczne. Centrum aktywne cechuje się następującymi właściwościami:

- zajmuje stosunkowo mały fragment cząsteczki enzymu. Tylko nieliczne reszty aminokwasowe białka enzymatycznego wchodzi w bezpośredni kontakt z substratem;
- miejsce aktywne jest układem przestrzennym, zbudowanym z grupów bocznych reszt aminokwasowych, zajmujących różne odległe pozycje;
- w tworzeniu miejsca aktywnego uczestniczą przede wszystkim te reszty aminokwasowe, które w grupach bocznych mają grupy mogące być donorami lub akceptorami protonów;
- miejsca aktywne są zagłębieniami lub szczelinami w strukturze cząsteczki białka enzymatycznego.

Miejsce (centrum) aktywnego enzymów cd.

- Å SpecyficznoŹ wiŹzania zaleŹy od precyzyjnie okreŹonego uŹŹenia w miejscu aktywnym. Substrat musi mieŹ odpowiedni ksztaŹ, mógŹpasowaŹ do miejsca aktywnego. Porównanie przez E. Fischera z 1890 r. ukŹadu enzym-substrat do **klucz i zamka** okazaŹ siŹ w peŹni prawdziwe.
- Å Procesy dynamicznego rozpoznania nazwano **wymuszonym dopasowaniem**. Miejsca aktywne niektórych aminokwasów nie sŹ strukturami sztywnymi, a ich ksztaŹ ulega modyfikacjom na skutek zwiŹzania substratu (D. E. Koshland, Jr., 1958 r.). Komplementarny wzglŹdem substratu ksztaŹ miejsca aktywnego pojawia siŹ dopiero po zwiŹzaniu substratu.



Właściwości substratowa katalizy enzymatycznej

Specyficzność w stosunku do substratu (specyficzność substratowa):

- jest to zdolność do wiązania tylko określonych substratów i katalizowania reakcji z ich udziałem,
 - jest uwarunkowana budową centrum aktywnego (konfiguracją przestrzenną grup wiążących substrat) i jego zdolnością do konformacyjnego dopasowania do substratu.
1. Specyficzność absolutna i np.: ureaza oksydaza glukozowa.
 2. Specyficzność grupowa i atakowana jest jedna grupa funkcyjna w pokrewnych związkach np.: dehydrogenaza alkoholowa (różne alkohole i metanol, etanol, butanol).
 3. Specyficzność względem pojęcia rozkładanego wiązania np.: egzo- i endo-proteazy.
 4. Specyficzność względem długości łańcucha węglowego w substracie.
 5. Stereospecyficzność i względem tylko jednego z izomerów np.:
 - szeregu konformacyjnego L i D np.: oksydaza glukozowa (6-D-glukoza),
 - izomerów geometrycznych *cis* i *trans* np.: hydroliza jabłczanowa (fumarat-*cis*),
 - wiązań i 6-glikozydowych np.: α-glikozydaza (maltoza)

Właściwości specyficzne katalizy enzymatycznej

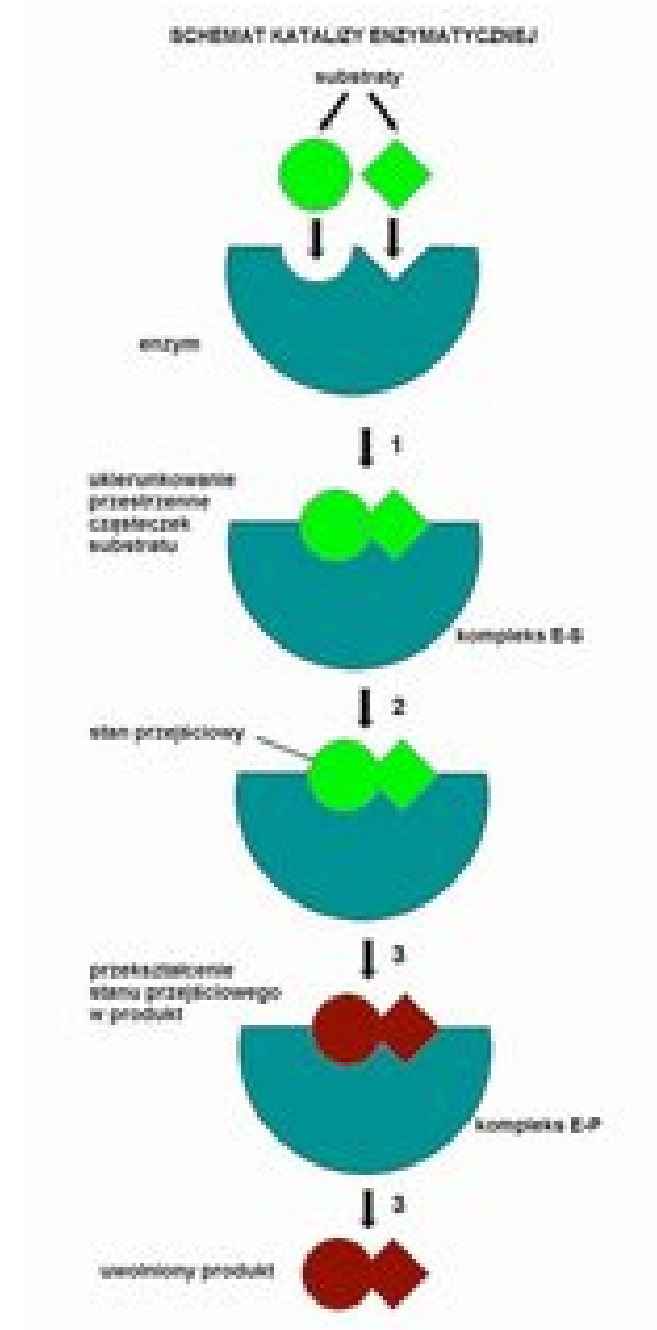
Niektóre enzymy wykazują specyficzność w stosunku do określonego typu reakcji i mają mniejsze wymagania co do typu substratu.:

- lipazy i hydrolizują wiązania estrowe w dowolnych tłuszczach, ale te nie mogą rozkładać estrów innych alkoholi niż glicerol.
- proteazy i katalizują specyficznym rozpad określonego rodzaju wiązań peptydowych w dowolnym białku.

Reakcji enzymatycznej



1. Etap pierwszy i zwińzanie czństeczek substratu na powierzchni enzymu, powstanie kompleksu E-S.
2. Etap drugi i oddziaływanie S i E polegajńce na przegrupowaniach elektronów pomińdzy grupami funkcyjnymi S i grupami funkcyjnymi aminokwasów kontaktowych E, utworzenie stanu przejściowego E-S.
3. Etap trzeci i zajńcie reakcji katalitycznej, przekształćenie kompleksu E-S w kompleks E-P i rozpad tego kompleksu na E i P.



Zalety biokatalizy

Enzymy to efektywne katalizatory i zwi kszej  przynajmniej 10^6 szybkości reakcji. W razie ich nieobecności i szybkości reakcji w układach biologicznych jest niezauważalna.

Współczynnik przyspieszenia reakcji przez działanie enzymu					
Enzym	Prędkość reakcji z substratem (wobec nieaktywnego katalizatora)		Prędkość reakcji z substratem (z enzymem)	Prędkość reakcji z substratem (z enzymem)	Prędkość reakcji z substratem (z enzymem)
Amilaza (skrobi)	10 000 000	100	1.0×10^{-10}	100	1.0×10^{-10}
Amilaza (skrobi)	1 000 000	100	1.0×10^{-10}	100	1.0×10^{-10}
Amilaza (skrobi)	10 000	100	1.0×10^{-10}	100	1.0×10^{-10}
Amilaza (skrobi)	1.0	100	1.0×10^{-10}	100	1.0×10^{-10}
Amilaza (skrobi)	1	1000	1.0×10^{-10}	1000	1.0×10^{-10}
Amilaza (skrobi)	1.0	100	1.0×10^{-10}	100	1.0×10^{-10}
Amilaza (skrobi)	1.0	1000	1.0×10^{-10}	100	1.0×10^{-10}
Amilaza (skrobi)	1.0	1000	1.0×10^{-10}	100	1.0×10^{-10}

Zalety biokatalizy cd.

Enzymy charakteryzują się dużą specyficznością.

jeden enzym na ogół katalizuje pojedynczą reakcję chemiczną lub zestaw ściśle pokrewnych reakcji;

specyficzność enzymu wobec substratu jest zwykle bardzo znaczna, a czasami praktycznie absolutna np.: swoistość substratowa L-asparaginazy.

Substrat	Aktywność względna	$K_M \times 10^5 \text{ M}$	V
L-asparagina	100	1	0.965
D-asparagina	5	6200	0.177
Amid kwasu bursztynowego	20	1500	0.240
Diamid kwasu bursztynowego	0	-	-

Zalety biokatalizy cd.

Enzymy charakteryzują się selektywnością

chemoselektywność (np. hydrolizuje estry, a nie hydrolizuje acetali lub amidów).

regioselektywność i diastereoselektywność (np. z kilku takich samych grup funkcyjnych w substracie wyróżnia tylko jedną).

enantjoselektywność (np. katalizuje tylko reakcje z L-aminokwasem lub tylko z D-sacharydem).

Zalety biokatalizy cd.

Enzymy działają w łagodnych warunkach tj.

przy ciśnieniu atmosferycznym;

w większości przypadków w przedziale temp. 20 - 40°C;

przy pH bliskim neutralnemu;

reakcje przebiegają w środowisku wodnym.

Odpady z reakcji są mało szkodliwe dla środowiska.

Reakcje enzymatyczne prowadzi się w prostych aparatach.

Reakcje enzymatyczne wyróżniają się wysoką wydajnością

Enzym nie katalizuje reakcji ubocznych.



Wady przy stosowaniu enzymów

Mikroskala.

Wymagana jest wysoka czystość substratów. Niektóre zanieczyszczenia, nawet w małej ilości powodują inhibicję enzymów.

Niektóre enzymy są bardzo drogie. Nie wszystkie znajdują się w sprzedaży. Wydzielanie ich z materiału biologicznego jest bardzo pracochłonne i kosztowne.

Podziały enzymów

EC 1. Oksydoreduktazy - katalizują reakcje utleniania i redukcji



EC 2. Transferazy - katalizują przenoszenie grup funkcyjnych (np. aldehydowych, ketonowych, acylowych)



EC 3. Hydrolazy - katalizują hydrolizę różnych wiązań np. peptydowych, estrowych, amidowych



EC 4. Liazy - katalizują reakcje addycji i eliminacji



EC 5. Izomerazy - katalizują racemizację, przenoszenie wiązań wielokrotnych, przekształcanie grup funkcyjnych



EC 6. Ligazy (Syntetazy) - katalizują tworzenie wiązań C-C, C-heteroatom



międzynarodowy kod enzyma tyczny

międzynarodowy kod enzymatyczny składa się z dwu liter i czterech liczb oddzielonych kropkami. Jego schemat wygląda następująco: **EC a.b.c.d.** Symbol **EC** (enzyme code) oznacza, że liczby po nim dotyczą międzynarodowego kodu genetycznego:

Liczba **a** określa numer klasy enzymu;

Liczba **b** określa numer podklasy w obrębie tej klasy;

Liczba **c** określa numer podpodklasy w obrębie podpodklasy;

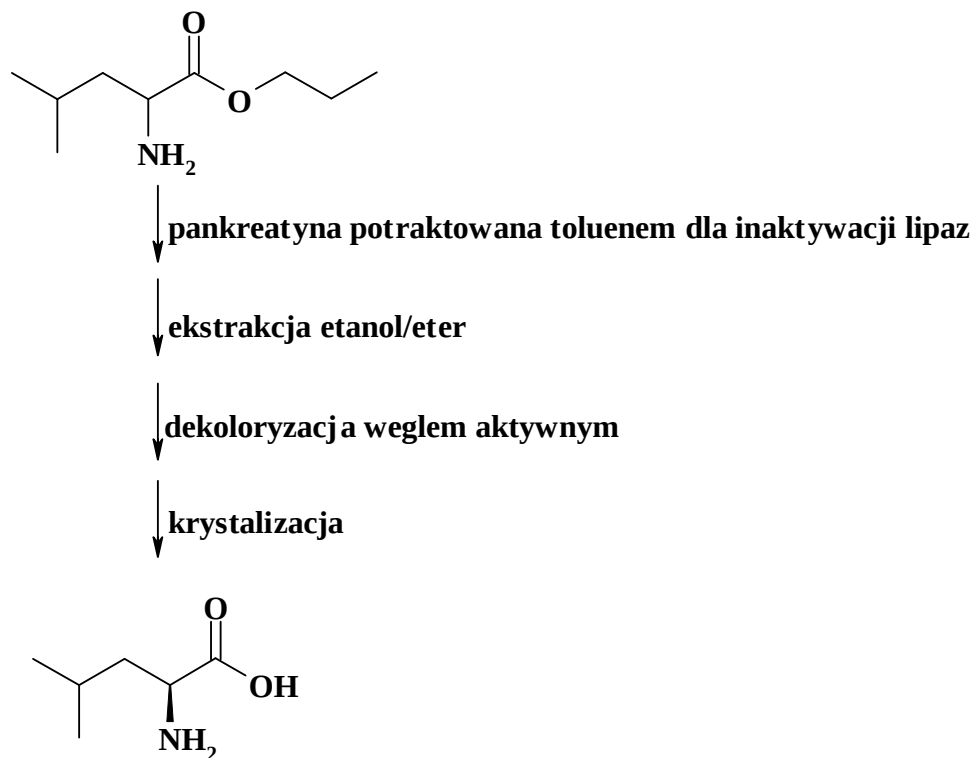
Liczba **d** określa numer enzymu w obrębie wymienionej wcześniej podpodklasy.

Każdemu dobrze poznanemu enzymowi, przypisano jego niepowtarzalny numer identyfikacyjny np.: **dehydrogenaza mleczanowa** ma numer kodowy **EC 1.1.1.27**. Pierwsza liczba (**1**) oznacza, że enzym należy do klasy 1, jest więc **oksydoreduktazą**. Druga liczba (**1**) oznacza, że enzym należy do podklasy 1, obejmującej wszystkie oksydoreduktazy, które odłączają parę atomów wodoru od grupy **H-C-OH**. Trzecia liczba (**1**) oznacza, że enzym ten należy do podpodklasy 1, obejmującej wszystkie enzymy, które przekazują **wodory** odłączone z grupy **H-C-OH** na **NAD⁺**. Czwarta liczba (**27**), to numer przyporządkowany temu enzymowi w obrębie podpodklasy **EC.1.1.1**.

Używanie enzymów w syntezie organicznej

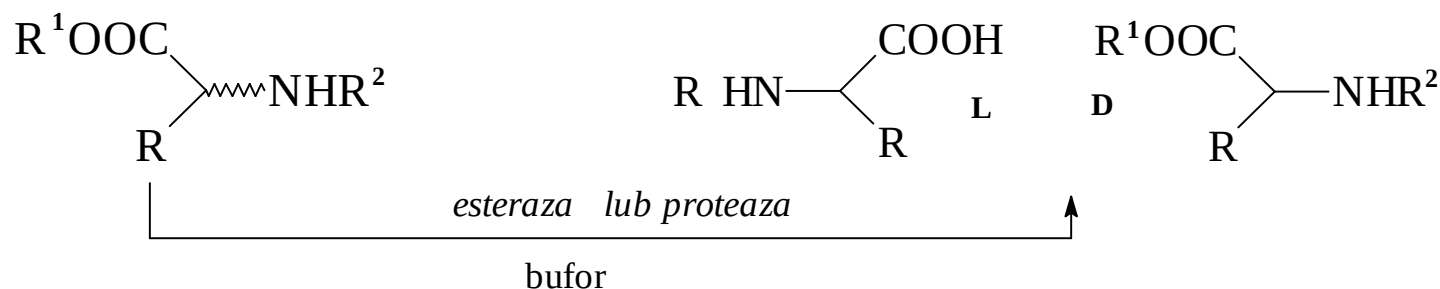
Rozdzielanie mieszanin racemicznych.

1906 rok i O. H. Warburg uzyskał 85% wydajności L-leucynę z mieszaniny racemicznej jej estru propylowego poddanej działaniu ekstraktu z trzustki (pankreatyny).



Enzymy w syntezie organicznej cd

Enzymatyczny rozdział racemicznych estrów aminokwasowych przy użyciu esterazy lub proteazy.

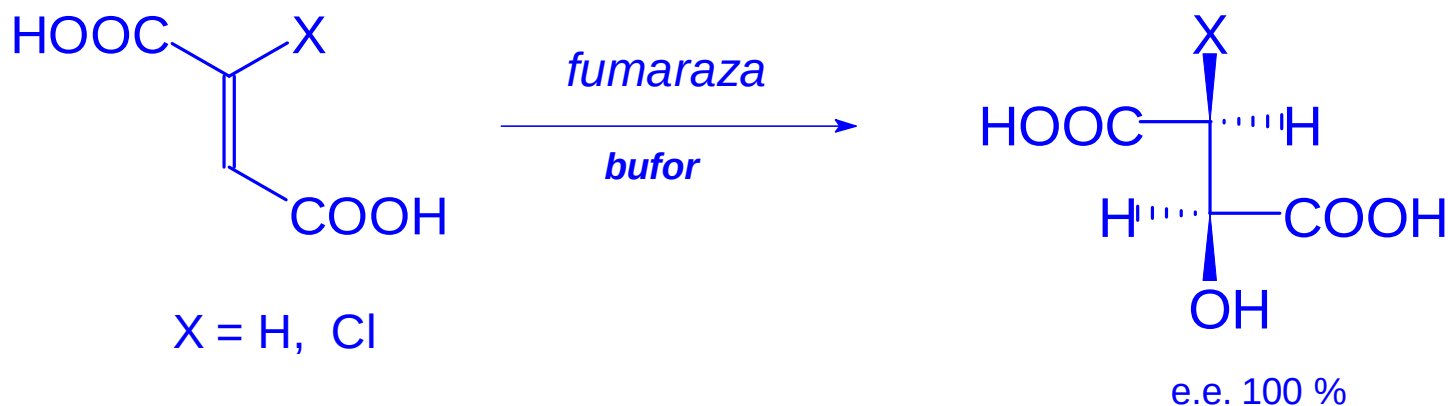


R = grupa alkilowa, grupa arylowy,
R¹ = CH₃-, C₂H₅-,
R² = H-, grupa acylowa.

Enzymy w syntezie organicznej cd.

Otrzymywanie związków optycznie czynnych.

Addycja wody do kwasu (chloro)fumarowego katalizowana przez fumarazę.



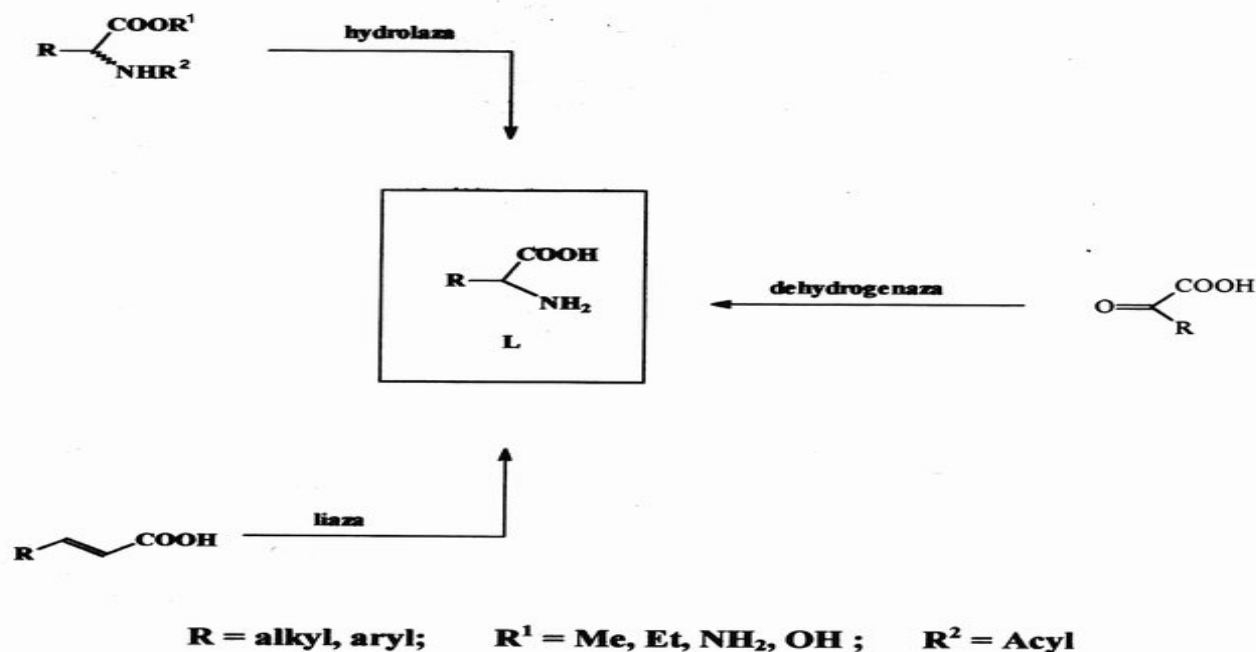
kwas (chloro)fumarowy
(kwas *trans*(chloro)butanodiowy)

kwas hydroksy(chloro)butanodiowy

Enzymy w syntezie organicznej cd.

Synteza związków użytecznych biologicznie lub chemicznie (np. alkoholi, amidów, aminokwasów).

ENZYMATYCZNE OTRZYMYWANIE α -AMINOKWASÓW



Enzymy mów w syntezie organicznej cd.

Synteza zwińzków niemoŹliwych do otrzymania na drodze klasycznej syntezy organicznej.

Enzymatyczne gńczenie czństeczek DNA.

5'-AGTCTGATCTGACT-3' 5'-pGATGCGTATGCTAGTGCT-3'

3'-TCAGACTAGACTGACTACGp-5' 3'-CATACGATCACGA-5'

powstaje

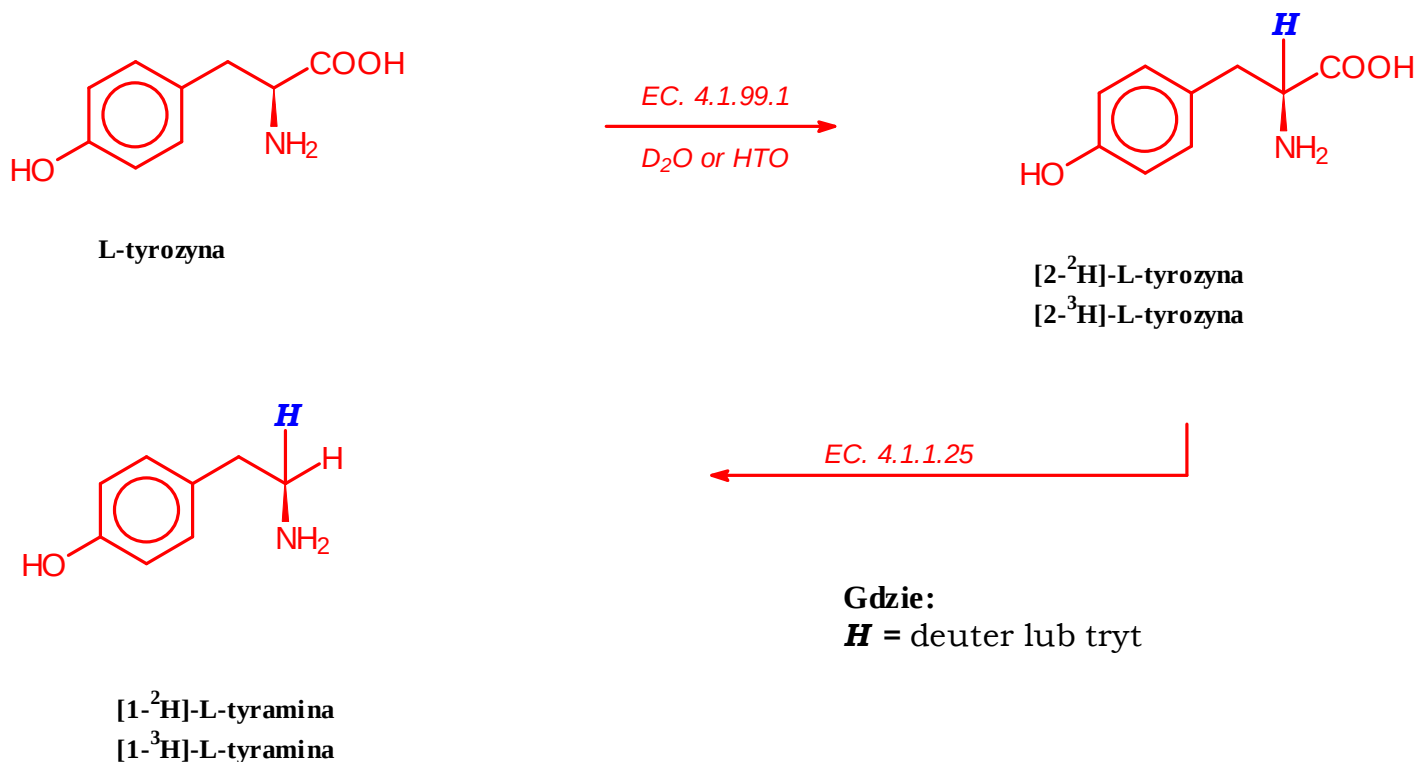
5'-AGTCTGATCTGACTGATGCGTATGCTAGTGCT-3'

3'-TCAGACTAGACTGACTACGCATACGATCACGA-5'

Użycie enzymów w syntezie organicznej cd.

Możliwość otrzymania związków selektywnie znakowanych izotopami stabilnymi lub promieniotwórczymi :

izotopami wodoru (stabilnym ^2H i promieniotwórczym ^3H) np.: enzymatyczna synteza tyraminy znakowanej w izotopami wodoru,

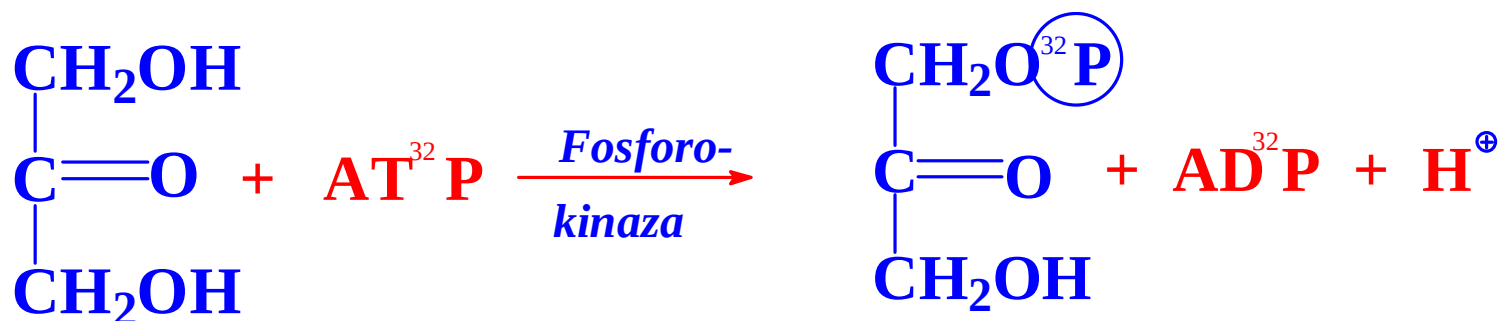


Gdzie:

H = deuter lub tryt

Użycie enzy mów w syntezie organicznej cd.

promieniotwórczym izotopem ^{32}P np.: synteza dihydroksyacetonu
znakowanego ^{32}P ,

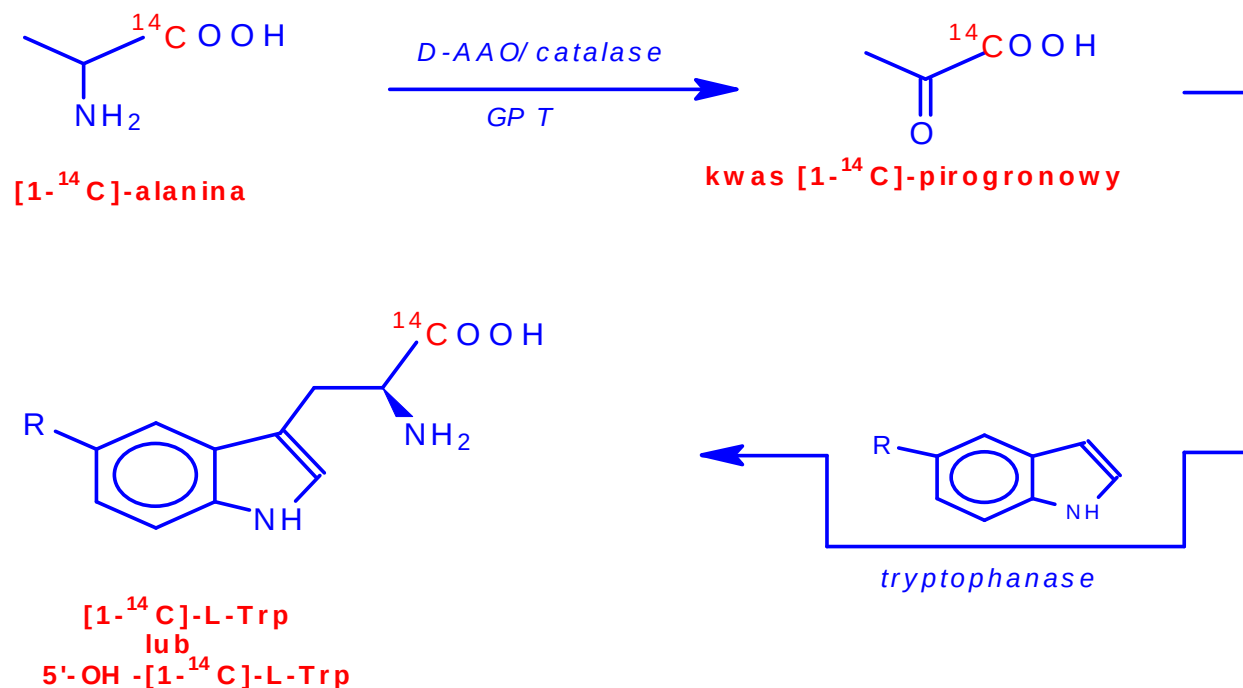


Użycie enzy mów w syntezie organicznej cd.

promieniotwórczym izotopem ^{35}S ,

promieniotwórczym izotopem ^{131}I ,

izotopami węgla (stabilnym ^{13}C i promieniotwórczymi ^{14}C i ^{11}C) np.: synteza L-tryptofanu i 5-hydroksy-L-tryptofanu znakowanych ^{14}C w łańcuchu bocznym.



$\text{R} = \text{H}$ or OH

Stosowanie przez mysłowe enzymów

Enzymy sŃ stosowane w przemyśle chemicznym, spoŃywczym i farmaceutycznym, gŃwnie jako niezwykle specyficzne, bezpieczne w uŃciu katalizatory. Jakkolwiek ich wadŃ jest wraŃliwoŃ na skrajne warunki (np. temperatura, pH), niestabilnoŃ w Ńrodowiskach innych niŃ wodne (np. rozpuszczalników organicznych) oraz stopniowa degradacja podczas uŃtkowania. TakŃ wysoka specyficznoŃ, istotna z punktu biologicznego, w przemyśle jest ograniczeniem ich uniwersalnoŃci. Obecnie enzymy produkowane sŃ na skalŃ przemysłwŃ gŃwnie z zastosowaniem mikroorganizmów modyfikowanych genetycznie np: hydrolazy.

owanie prze mysłowe enzymów cd.

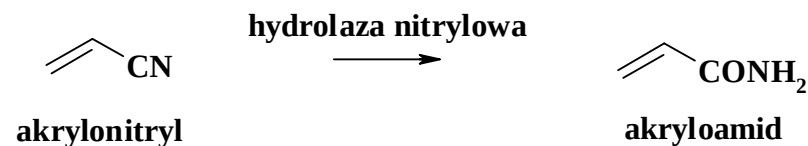
Enzym	Zastosowanie
proteazy	detergenty, produkcja Źywności i pasz, produkcja piwa, piekarnictwo
hydrolazy glukozylowe (amylazy, pulanazy, glukoamylazy, glikozydazy, celulazy)	przetwarzanie skrobi celulozy i chityny
chitynazy	modyfikacje chityny w produkcji Źywności i przemysle farmaceutycznym
ksylanazy	wybielanie papieru
lipazy, esterazy	detergenty, reakcje stereospecyficzne
polimerazy DNA	biologia molekularna np. reakcje PCR
dehydrogenazy	reakcje utleniania
proteazy	detergenty produkcja Źywności
amylazy	detergenty, piekarnictwo
celulazy	detergenty, pasze, tekstylia
dehydrogenazy	biosensory
lipazy	detergenty, produkcja paszy i kosmetyków
proteazy	synteza peptydów
dehydrogenazy	biokataliza w mediach organicznych
proteazy, celulazy	detergenty, produkcja Źywności i pasz
proteazy, celulazy	składniki paszowe
amylazy, glukoamylazy	przetwarzanie skrobi
oksydazy	odsiarczanie wngla
różne	produkcja Źywności i antybiotyków

Przemysłowe spożywcze

Omeryzacja glukozy do fruktozy w obecności enzymu izomerazy glukozowej i stała równowagi tej reakcji jest równa ok. 1, zatem uzyskuje się prawie równomolowe ilości glukozy i fruktozy. Taki słodki syrop glukozowo-fruktozowy (wysoko fruktozowy syrop kukurydziany, HFC) jest wykorzystywany powszechnie w przemyśle spożywczym jako alternatywa dla sacharozy i cukrów inwertowanych ze względu na lepszą rozpuszczalność od sacharozy i słodszy smak.

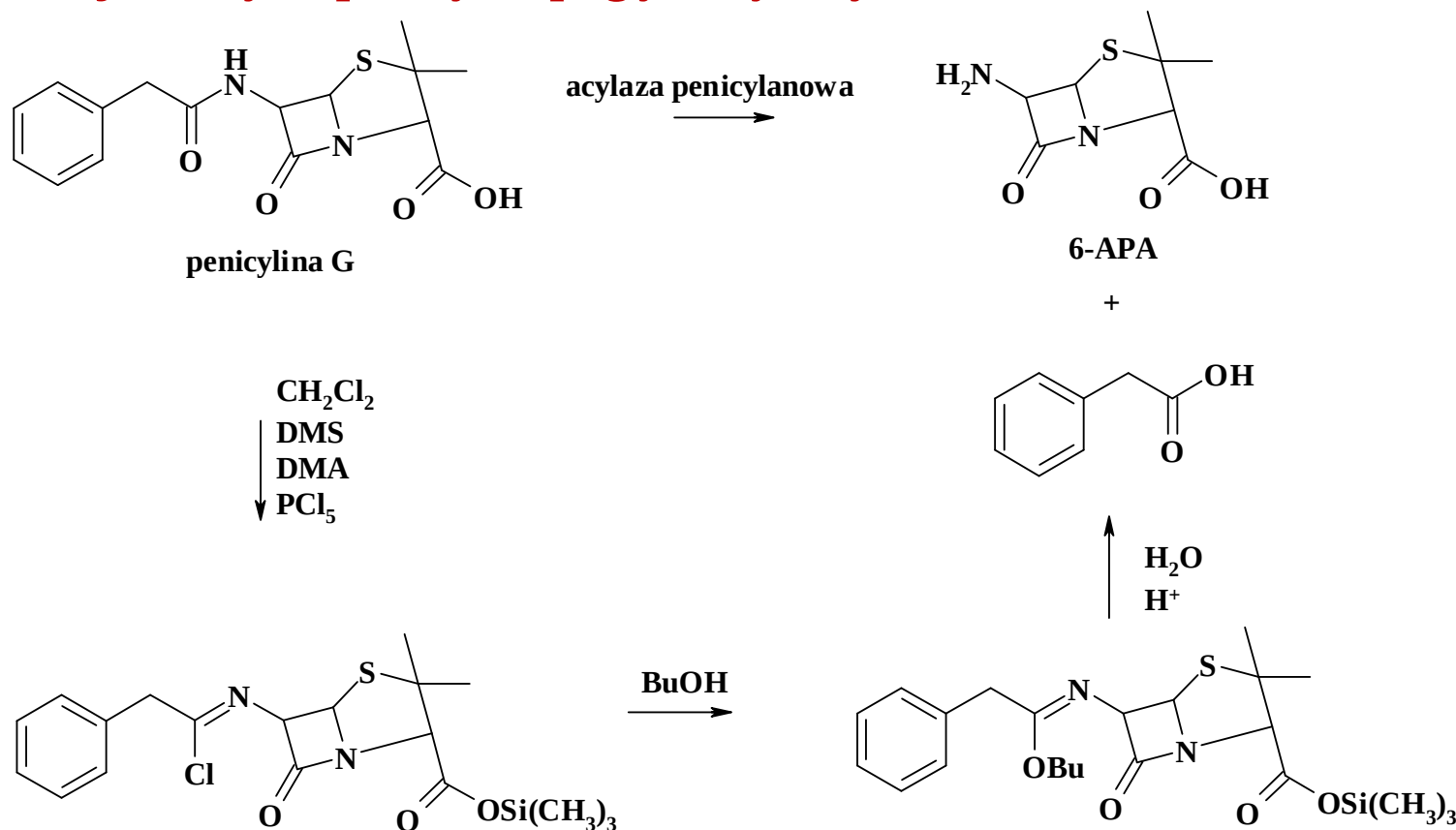
Enzymy w przemyśle chemicznym

Produkcja akryloamidu i związek ten jest substratem do syntezy poliakryloamidów stosowanych do produkcji tworzyw sztucznych, tkanin syntetycznych, barwników, papieru, kosmetyków oraz do oczyszczania ścieków. W tradycyjnej chemicznej technologii wytwarzania akryloamidu z akrylonitrylu stosuje się dwustopniową hydrolizę: wobec kwasu siarkowego i w obecności katalizatora miedziowego. Proces enzymatyczny przebiega jednoetapowo i otrzymuje się 100% wydajność biotransformacji oraz wysokie stężenie produktu w cieczy, dzięki czemu nie jest konieczne jej zatężanie.



enzymy w przemyśle farmaceutycznym

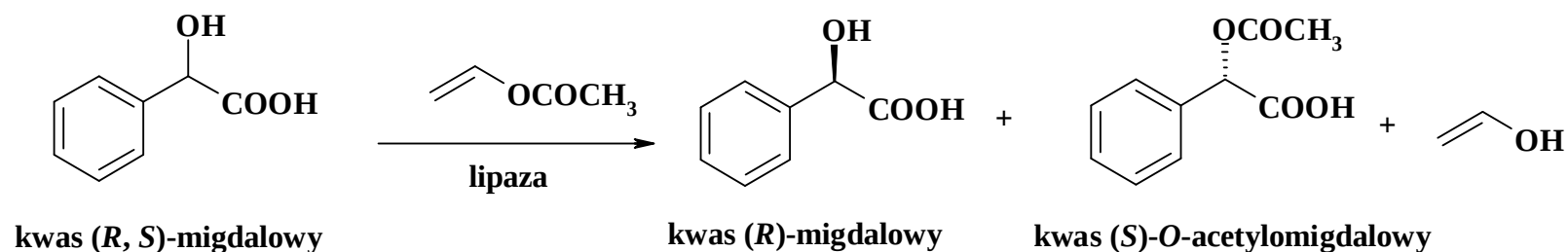
Hydroliza penicyliny G i antybiotyk ten jest wytwarzany przez szczepy grzybów strzępkowych *Penicillium chrysogenum*. Stanowi także substrat wyjściowy do produkcji licznych penicylin półsyntetycznych.



APA i kwas 6-amonopenicylanowy, DMS i dimetylochlorosilan, DMA i *N,N*-dimetyloalanina

Enzymy mów w przemyśle farmaceutycznym cd.

Rozdzielenie enancjomerów kwasu migdałowego i kwas migdałowy nie jest szczególnie wartościowym substratem w przemyśle farmaceutycznym, za to jego czyste enancjomery (*S* i *R*) mają szerokie zastosowanie w produkcji m.in. antybiotyków, leków przeciw otyłości czy leków onkologicznych. Rozdzielenie enancjomerów kwasu migdałowego polega na enzymatycznej transestryfikacji octanem winylu.



Stosowanie enzymów w praktyce medycznej

Enzymy znajdują liczne praktyczne zastosowania w diagnostyce laboratoryjnej wielu chorób; są odczynnikami laboratoryjnymi lub lekami.

1. Naprawa materiału genetycznego komórki w celu leczenia wrodzonych wad metabolicznych i chorób nowotworowych.

2. Enzymy jako markery chorób np.:

Aktywność **aminotransferaz** w osoczu krwi rośnie w przebiegu zawału mięśnia sercowego lub uszkodzenia wątroby,

Aktywność **amylazy** i enzymu rozkładającego skrobię i wzrasta u chorych na zapalenie trzustki.

3. Wzajemne relacje pomiędzy aktywnościami określonych izoenzymów (są to genetycznie uwarunkowane odmiany enzymów, występujące w organizmach tego samego gatunku, katalizujące tę samą reakcję, a różniące się składowym podjednostkowym lub sekwencją aminokwasów) np:

U ludzi zdrowych aktywność **LDH-1** w osoczu krwi jest niższa niż **LDH-2**,

U chorych z zawałem serca aktywność **LDH-1** przewyższa aktywność **LDH-2**.

Enzymy jako leki

Enzym	Efekt	Zastosowanie
acetylocholinoesteraza	wzrost stężenia acetylocholiny na niektórych zakończeniach nerwowych, wzmożone napięcie układu przywspółczulnego	lek pobudzający kurczliwość jelit
monoaminooksydaza	wzrost stężenia dopaminy w mózgu, wzmożone napięcie układu współczulnego	lek przeciw chorobie Parkinsona
fosfodiesteraza	wzrost stężenia cyklicznego 3',5'-AMP w komórce	lek rozszerzający oskrzela
anhydraza węglanowa	wzmożone wydalanie wodorowęglanu i fosforanów przez nerki	lek moczopędny
oksydaza moczanowa	zmniejszenie wytwarzania kwasu moczowego	lek przeciw dnie moczanowej
cyklooksygenaza	hamowanie biosyntezy prostoglandyn i tromboksanów	lek o działaniu przeciwzapalnym i przeciwzakrzepowym

jako odczynniki w analityce medycznej

1. Ureaza i stosowana do oznaczania mocznika.

2. Dehydrogenaza mleczanowa - stosowana do oznaczania kwasu mlekowego.

3. Peroksydaza chrzanowa i stosowana do wykrywania chorób zakaźnych, nowotworowych oraz badania zgodności tkankowej w przypadku doboru dawców i biorców przeszczepów.

Enzymy w biotechnologii i terapii genowej

1. Nukleaza - wycina wadliwie skonstruowane odcinki DNA, a powstałe ubytki wypełnia odpowiednimi fragmentami pochodzącymi z komórek zdrowych tego samego gatunku.

2. Ligaza DNA - zespala fragmenty DNA. Stwarza to możliwość naprawy uszkodzonego genu i otwiera perspektywę rozwoju nowej dziedziny medycyny, określanej mianem terapii genowej.

Defektem obniżeniem aktywności niektórych enzymów

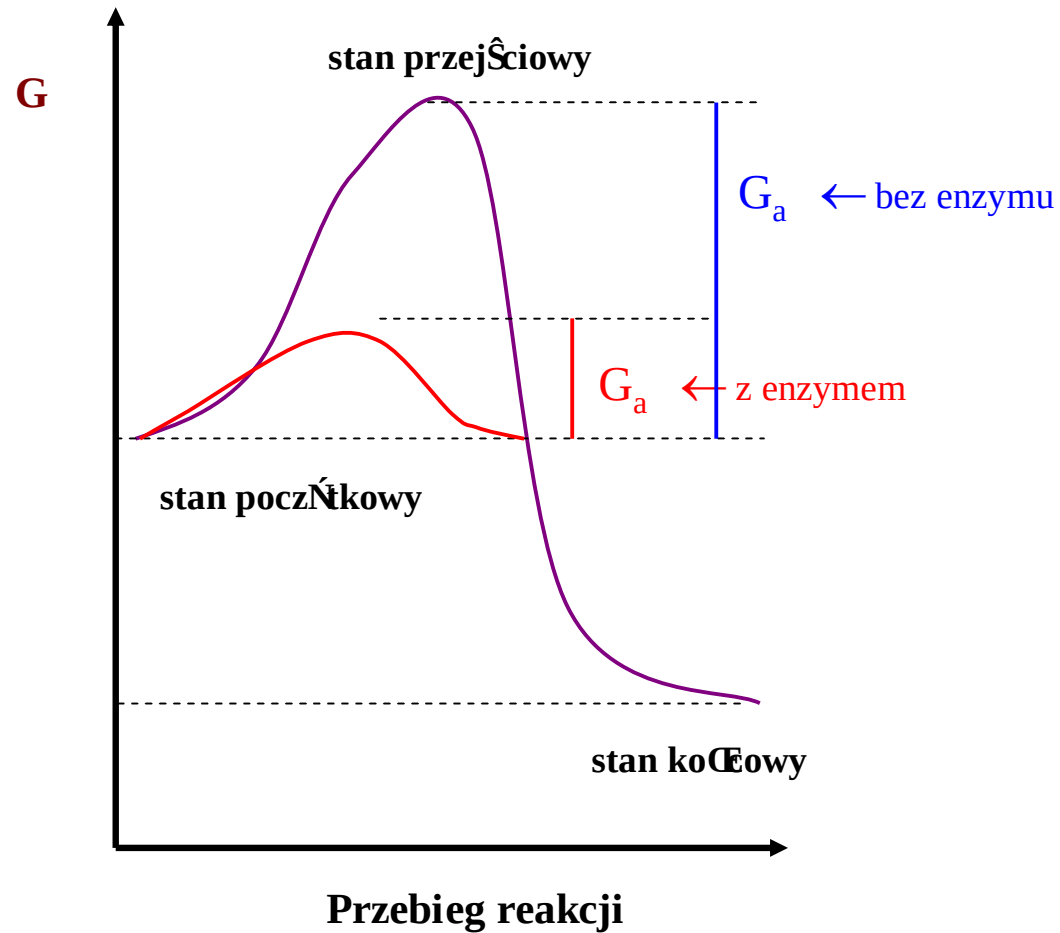
Bielactwo wrodzone, albinizm - wrodzone zaburzenie metabolizmu L-tyrozyny (brak tyrozynazy), powodujące zmniejszenie lub brak produkcji melanin w komórkach barwnikowych człowieka i zwierząt

Fenylketonuria - genetycznie uwarunkowany niedobór enzymu hydroksylazy fenyloalaninowej uniemożliwiający przemianę aminokwasu L-fenyloalaniny w L-tyrozynę i w następstwie nadmierne jego gromadzenie się w organizmie, co powoduje niedorozwój umysłowy i fizyczny.

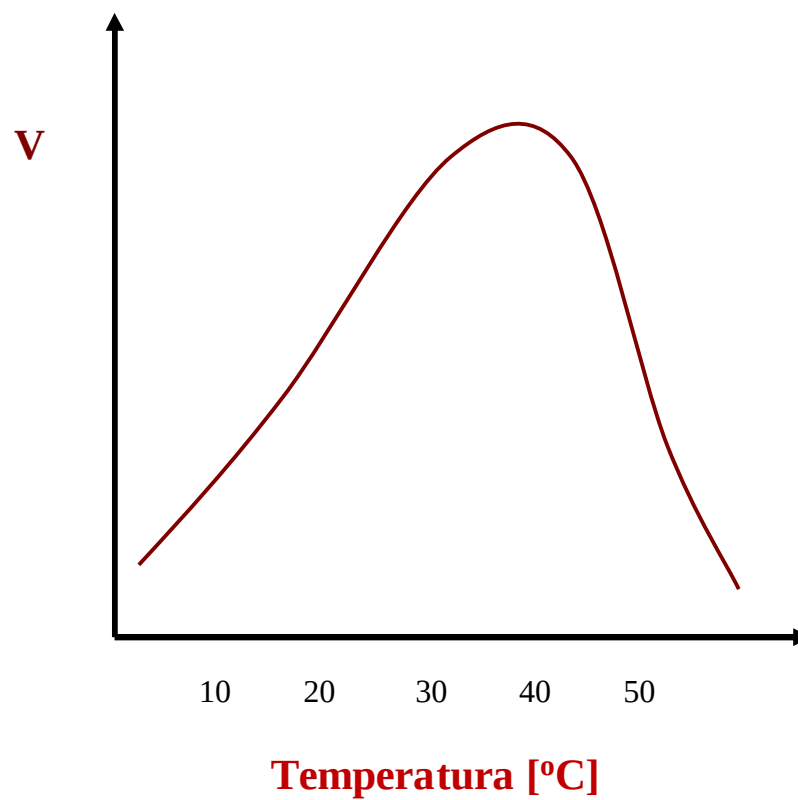
Galaktozemia - choroba wywołana mutacją punktową blokującą aktywność enzymu galaktozo-1-fosforanourydylo-transferazy rozkładającej galaktozę (pochodzącą najczęściej z rozpadu laktozy) do glukozy i w następstwie nadmierne jej gromadzenie się w organizmie, co powoduje niedorozwój fizyczny i umysłowy oraz utratę wzroku.

Methemoglobinemia - genetycznie uwarunkowany niedobór zależnej od NADH reduktazy methemoglobiny. Choroba polega na występowaniu we krwi znacznych ilości methemoglobiny zamiast hemoglobiny. W methemoglobinie hem zawiera żelazo na III stopniu utlenienia zamiast na II (jak w hemoglobinie), co skutkuje utratą zdolności do przyłączania i przenoszenia tlenu.

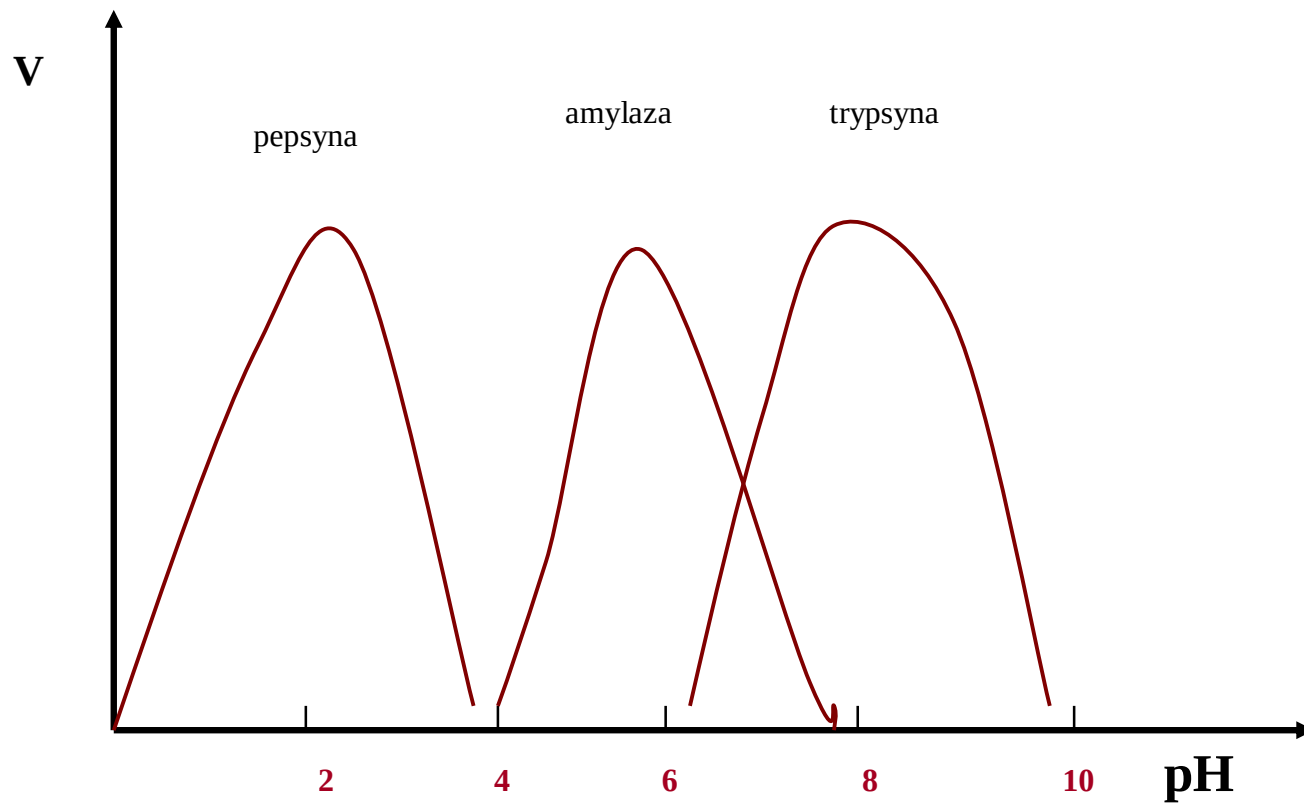
Przebieg reakcji z enzymem i bez udziału enzymu



reakcji enzymatycznej (V) od temperatury



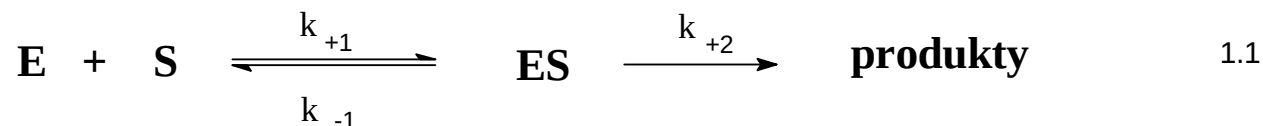
Wpływ pH na aktywność reakcji katalizowanych przez niektóre enzymy



kości reakcji katalizowanych przez enzymy od stężenia substratów

Typowy enzym przekształca ok. 1000 cząsteczek w ciągu 1 s, czyli musi zwińzać cząsteczkę substratu w czasie milisekundy. Enzymy są praktycznie nieruchome więc szybkość odnajdywania enzymu przez substrat zależy od przede wszystkim stężenia substratu. Wzrost stężenia substratu zwiększa szanse enzymu na zderzenie z substratem i wytworzenie kompleksu E-S, który utrzymuje się do chwili, gdy substrat zostanie przekształcony w produkt lub gdy przypadkowe ruchy cieplne spowodują zwrotną dysocjację kompleksu na enzym i nieprzekształcony substrat. Silniejsze zwińzanie enzymu z substratem spowalnia szybkość dysocjacji powstałego kompleksu i sprzyja przekształceniu substratu w produkt. Enzym ma ograniczoną zdolność wińzania i przekształcania substratu. Przy pewnym stężeniu wszystkie miejsca aktywne enzymu zostaną wysyczone substratem, a dalszy wzrost jego stężenia pozostanie bez wpływu na prędkość reakcji.

kinetyka reakcji katalizowanych przez enzymy



$$v(\text{szybkość}) = k_{+2} [ES] \quad 1.2$$

Jeżeli oznaczymy K_s jako stałą równowagi dysocjacji kompleksu ES na E i S, i jeżeli przez $[E]_0$ oznaczymy jako początkowe stężenie enzymu, wtedy stężenie wolnego enzymu wynosi $([E]_0 - [ES])$. Wówczas:

$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{([E]_0 - [ES])[S]}{[ES]} \quad 1.3$$

$$K_s = \frac{([E]_0[S] - [ES][S])}{[ES]} \quad 1.4$$

Z równania 1.2 otrzymujemy:

$$v = \frac{k_{+2}[E]}{1 + \frac{K_s}{[S]}} \quad 1.5$$

tyka reakcji katalizowanych przez enzy my cd.

Kiedy stężenie substratu jest bardzo duże, wtedy równanie (1.5) określa maksymalną szybkość reakcji V i zbliża się do wyrażenia:

$$V = k_{+2} [E']$$

Wstawiając to wyrażenie na V do równania (1.5) otrzymujemy:

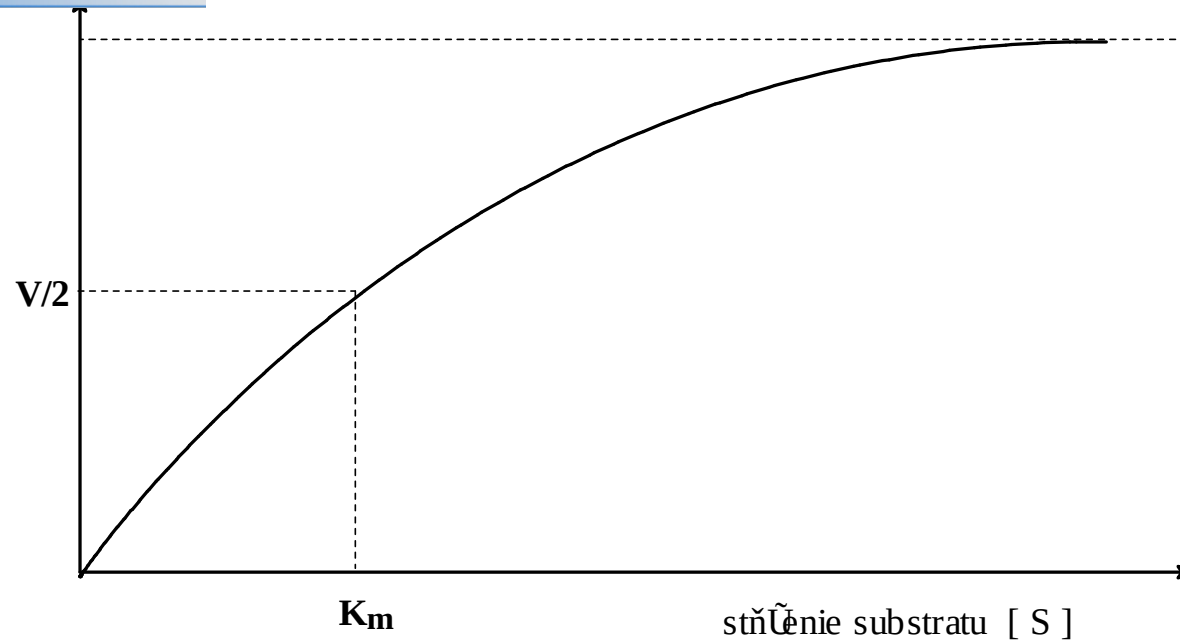
$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_s}{[S]}} \quad 1.6$$

Jest to równanie Michaelisa - Menten'a.

Stała Michaelisa (K_m) - jest to stężenie substratu $[S]$, przy którym szybkość reakcji osiąga połowę szybkości maksymalnej V . Wartość K_m można otrzymać eksperymentalnie z (1.6), chociaż jest możliwe wyznaczyć K_m z wykresu, lecz dokładność jest mała, ze względu na asymptotyczny charakter zależności. W praktyce preferuje się stosowanie równania (1.7) otrzymanego przez przekształcenie (1.6):

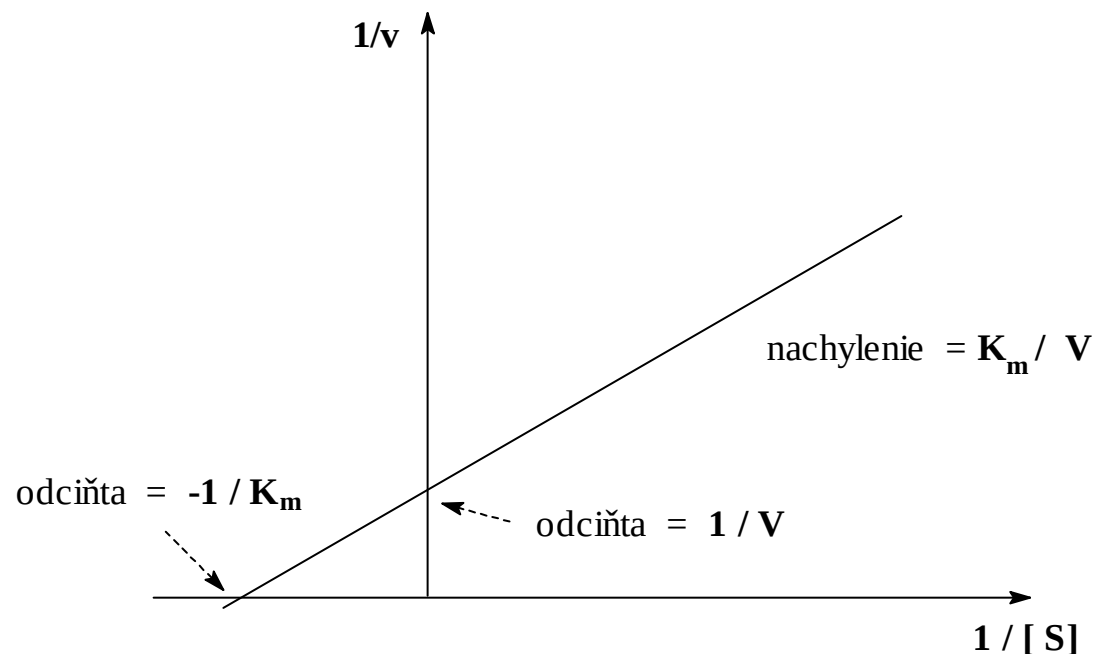
$$\frac{1}{v} = \frac{1}{[S]} \frac{K_m}{V} + \frac{1}{V} \quad 1.7$$

Wykres Michaelisa - Menten



Zależność szybkości reakcji v od stężenia substratu $[S]$ w warunkach stałego stężenia enzymu. Przy wysokich stężeniach substratu szybkość reakcji v osiąga wartość maksymalną V . K_m równa się stężeniu substratu przy wartości $v = 0.5 V$.

Linia Liniearna - Burkova (podwójne odwrótnośći)



Zależność $1/v$ od $1/[S]$ dla reakcji katalizowanej enzymatycznie opisanej równaniem Michaelis-Mentena

Zgodnie z kinetyką Michaelisa-Mentena, $K_m = K_s$. Wobec tego K_m jest bezpośrednim miarą wiązania między enzymem a substratem.

Powyższy wykres jest też bardzo użyteczny do badania inhibicji w reakcjach enzymatycznych.

Inhibicja enzymów

Inhibicja polega na blokowaniu przez **inhibitor** współdziałania składników uczestniczących w reakcji enzymatycznej:

- Enzymu,
- Substratu,
- Koenzymu.

Szybkość reakcji enzymatycznej zależy od czynników hamujących, które dzieli się na działające **specyficznie i niespecyficznie**.

Podział inhibicji:

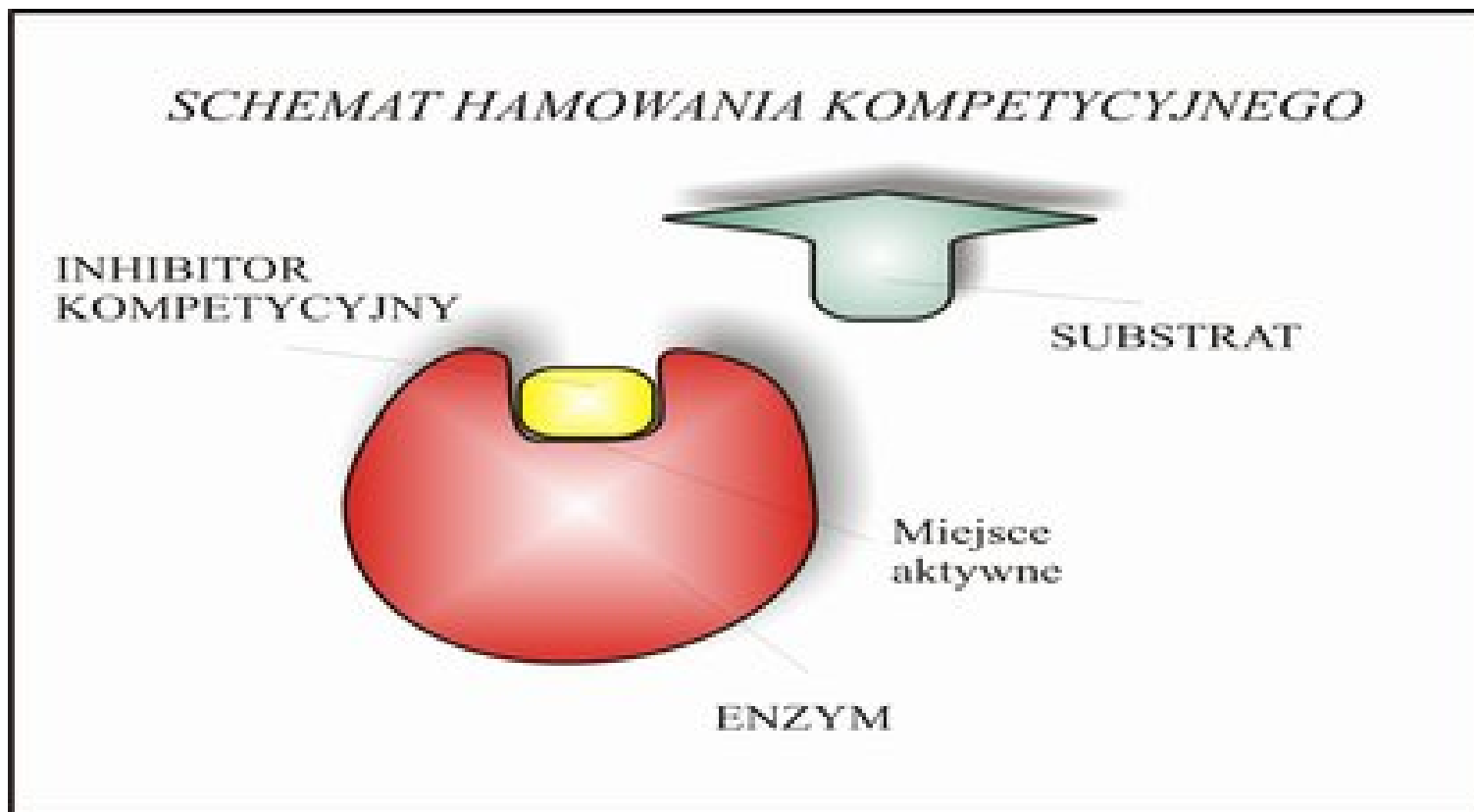
1. nieodwracalna – cząsteczki inhibitora wiążą się z enzymem trwale (np.; kowalencyjnie) co prowadzi do zablokowania aktywności enzymu na stałe;
2. odwracalna (kompetycyjna, niekompetycyjna, akompetycyjna, mieszana).

Inhibicja aktywności enzymów umożliwia:

- Identyfikację reszt istotnych dla aktywności enzymów,
- Poznanie mechanizmów działania enzymów,
- Poznanie mechanizmów działania leków i czynników toksycznych,
- Poznanie mechanizmów kontroli aktywności enzymów.

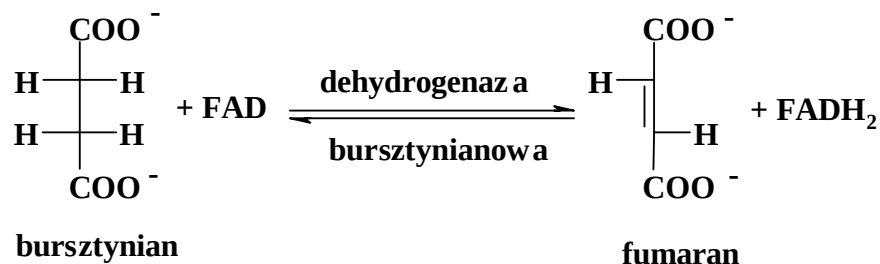
Inhibicja kompetycyjna (współzawodnicząca)

Inhibitor kompetycyjny jest strukturalnie podobny do substratu i konkuruje z nim o centrum katalityczne enzymu z powodu braku absolutnej specyficzności grup czynnych tego centrum. Wiąże się z enzymem w jego centrum aktywnym. Powoduje obniżenie powinowactwa enzymu do substratu. Inhibicja jest odwracalna przez zwiększenie stężenia substratu. $V_{\max}$ reakcji nie zmienia się, lecz jest osiągalna przy wyższym stężeniu. Zwiększa się wartość K_m .



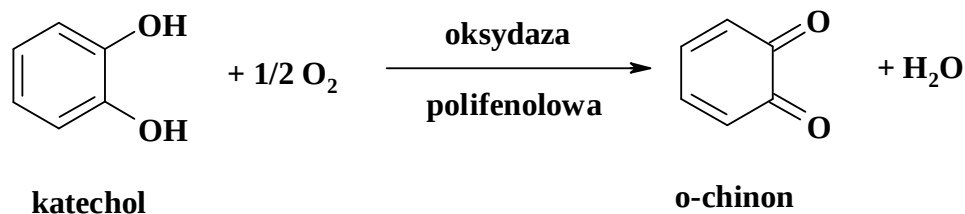
Przykłady inhibicji kompetycyjnej

Hamowanie aktywności dehydrogenazy bursztynianowej przez malonian.

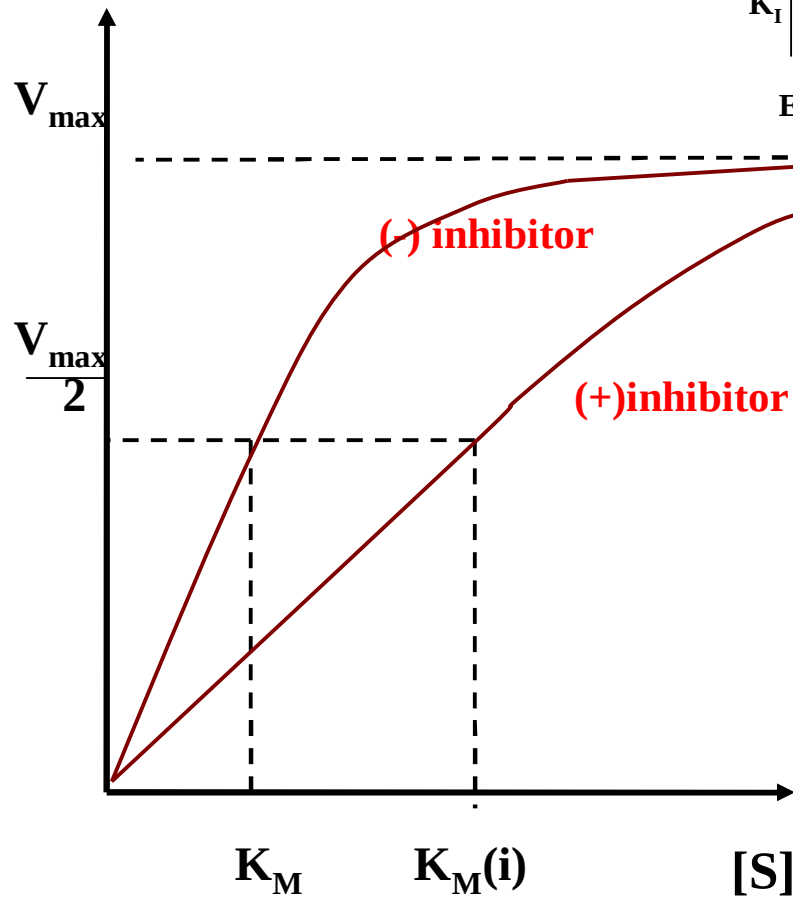
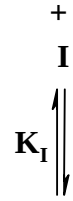


Hamowanie syntezy białka przez analogi aminokwasów białkowych i aminokwasy niebiałkowe np.: leki, pestycydy, antybiotyki.

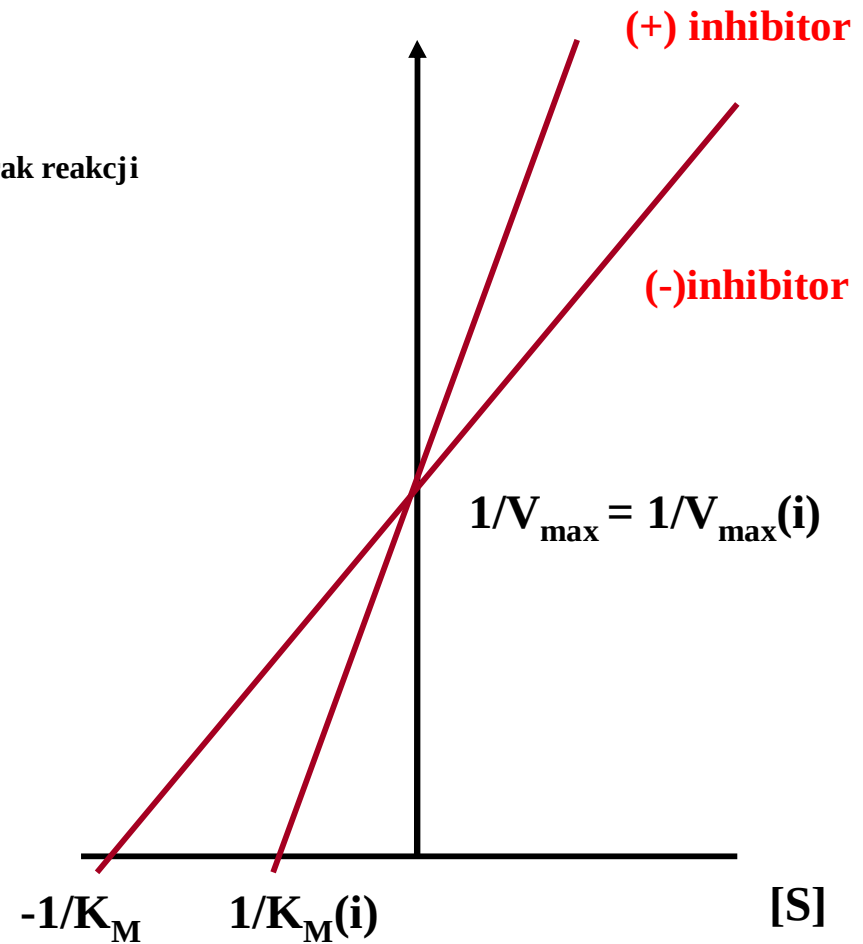
Hamowanie aktywności oksydazy polifenolowej przez kwas p-hydroksybenzoesowy.



Linia -Mentena (A) i Lineweavera-Burka (B) dla reakcji z udziałem inhibitora kompetycyjnego



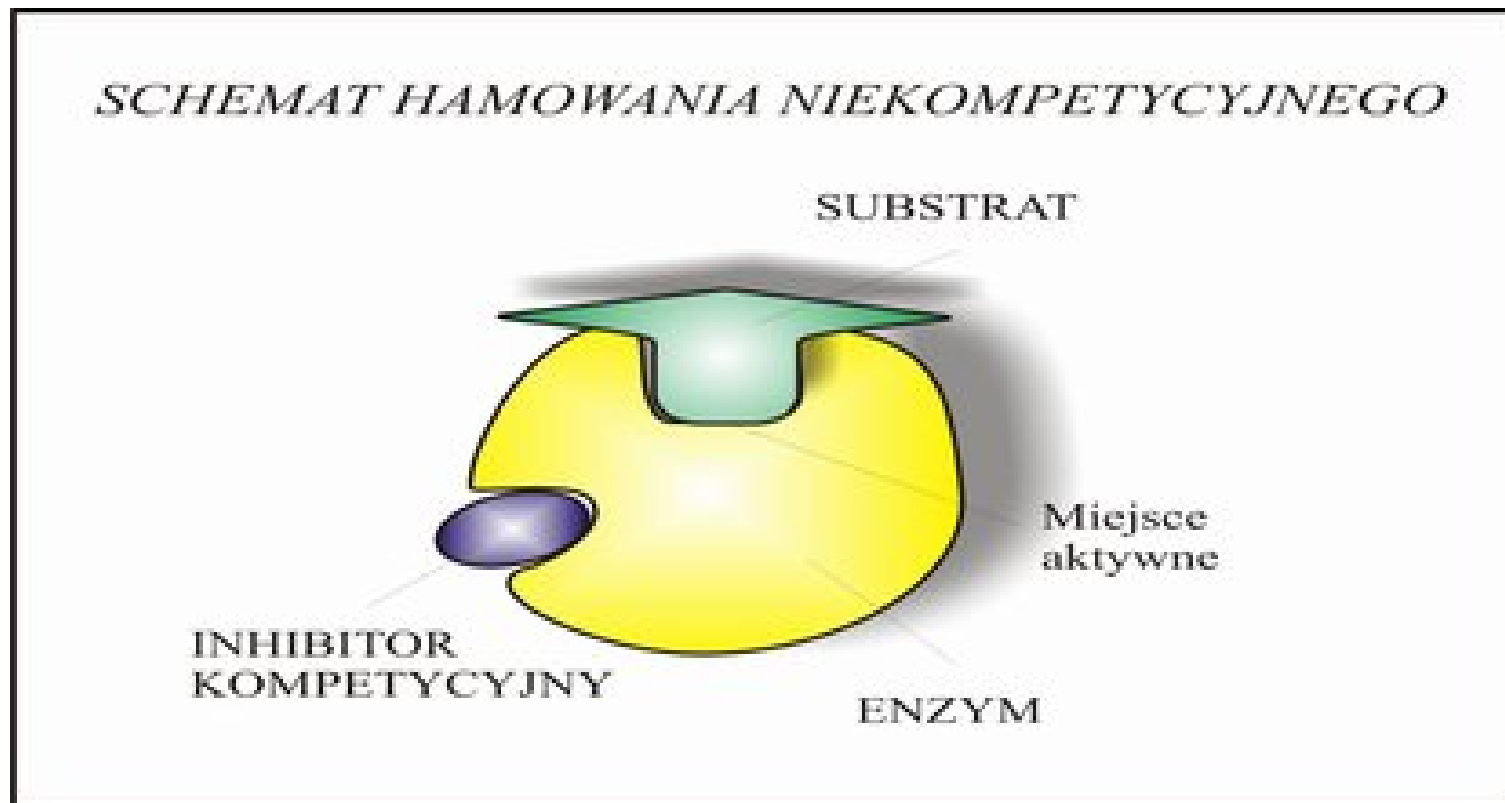
A



B

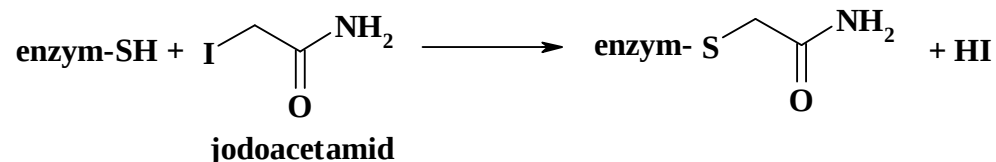
Inhibicja niekompetycyjna (niewspółzawodnicząca)

Inhibitor niekompetycyjny nie jest podobny do substratu. Wiąże się z enzymem poza jego centrum aktywnym. Zniekształca cząsteczkę białka enzymatycznego w sposób zmniejszający jego aktywność katalityczną. Nie zmienia powinowactwa enzymu do substratu. Inhibicji nie da się odwrócić poprzez zwiększenie stężenia substratu. K_m reakcji nie zmienia się. Zmniejsza się wartość V_{max} .

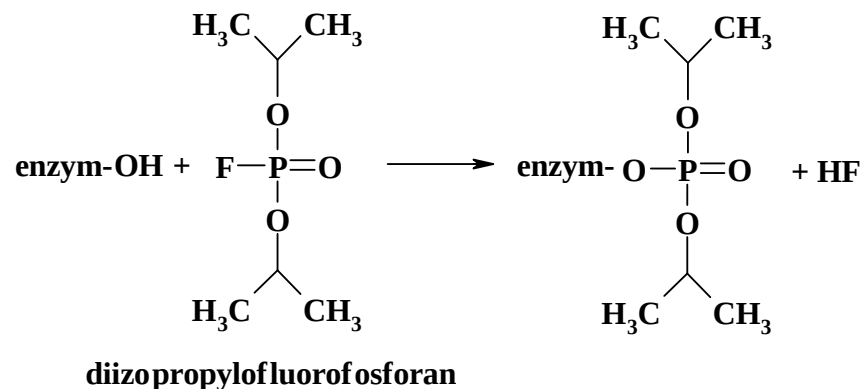


Wzrosty inhibicji niekompetytywnej

Wiązanie grupy -SH reszt cysteinyowych enzymu przez jodoacetamid.

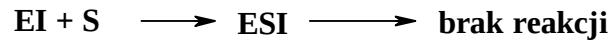
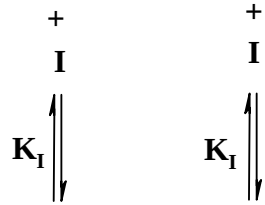


Wiązanie grupy -OH reszt serylowych enzymu przez diizopropylodifluorofosforan.



Hamowanie enzymów zależnych od Mg^{2+} i Ca^{2+} przez EDTA i tworzenie niedysocjujących kompleksów.

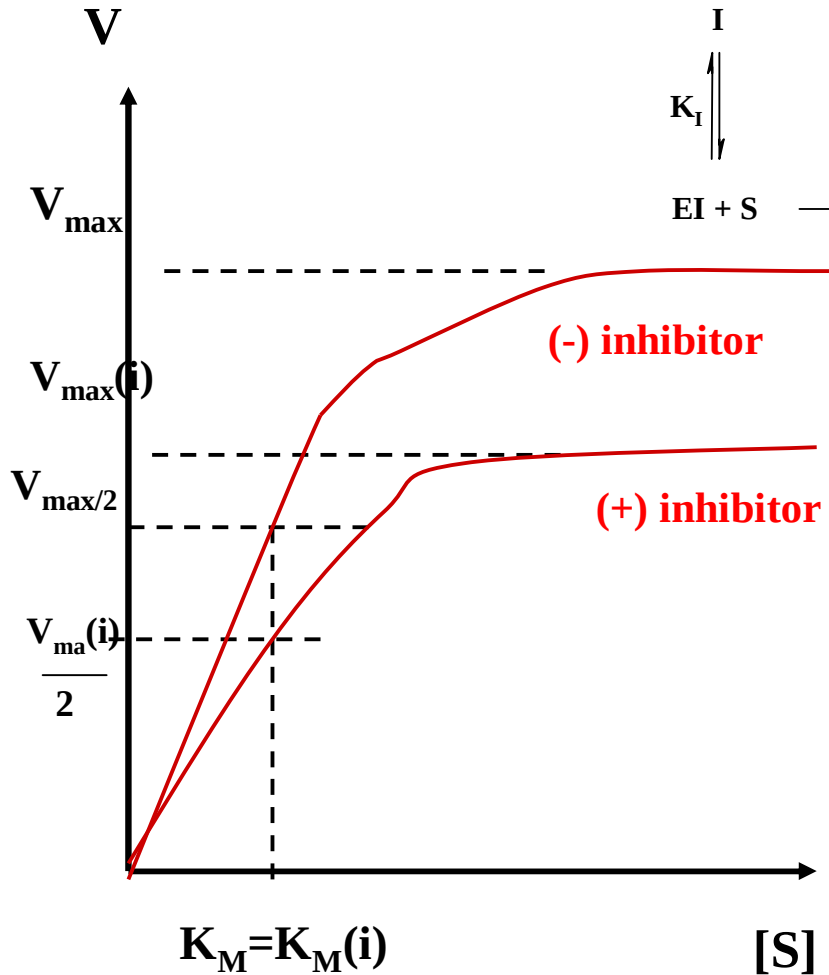
Linia -Mentena (A) i Lineweaver-Burka (B) dla niekompetycyjnego inhibitora



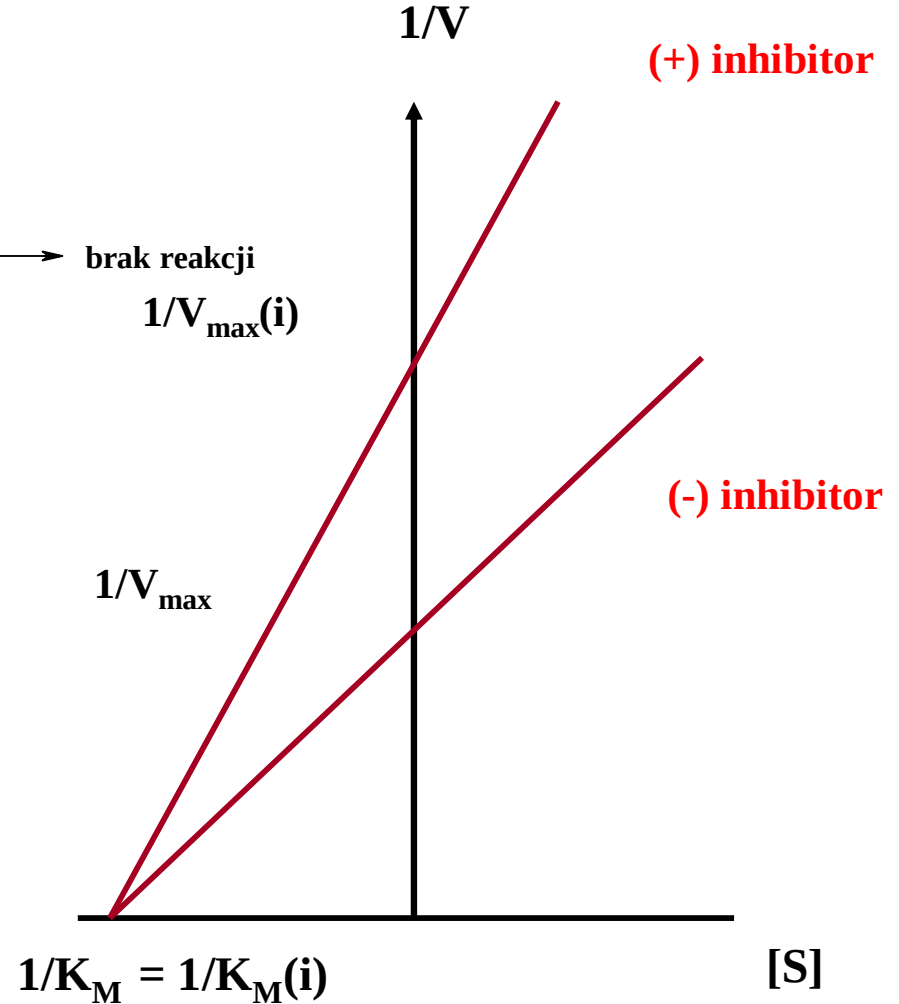
$1/V_{\max}(i)$

$1/V$

(+) inhibitor



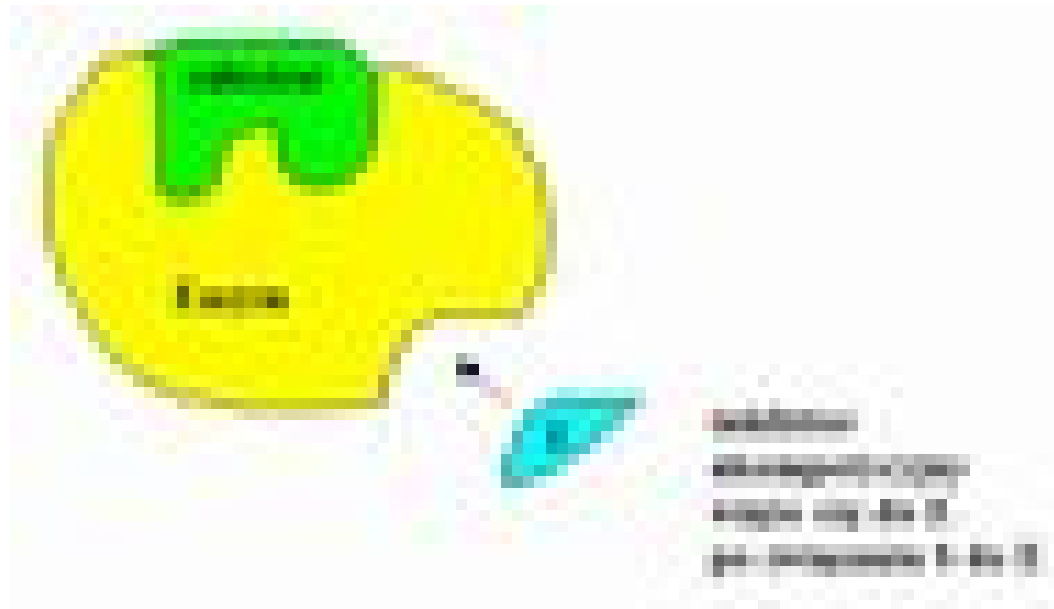
A



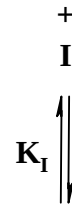
B

Inhibicja akompetycyjna

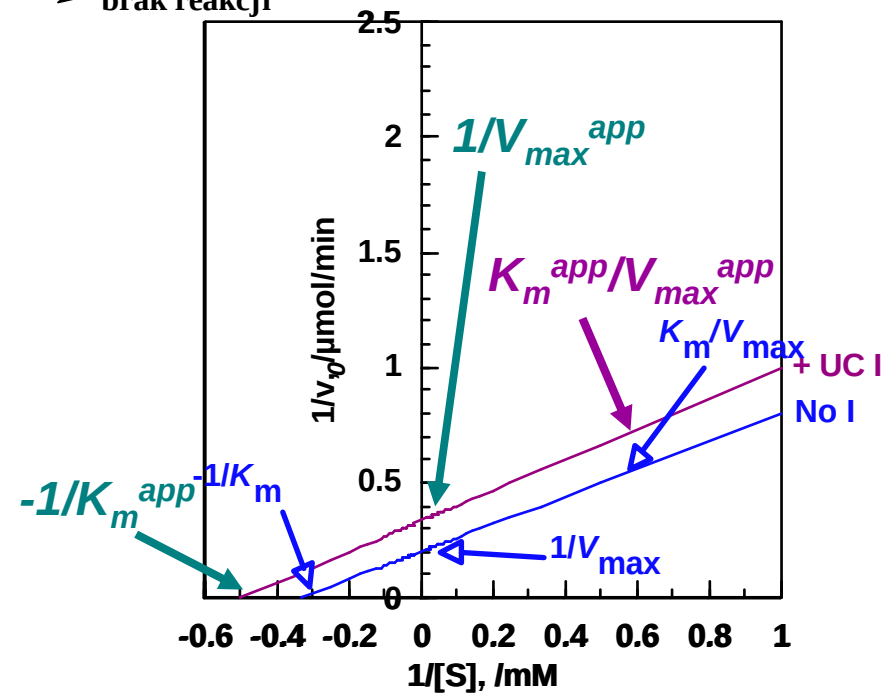
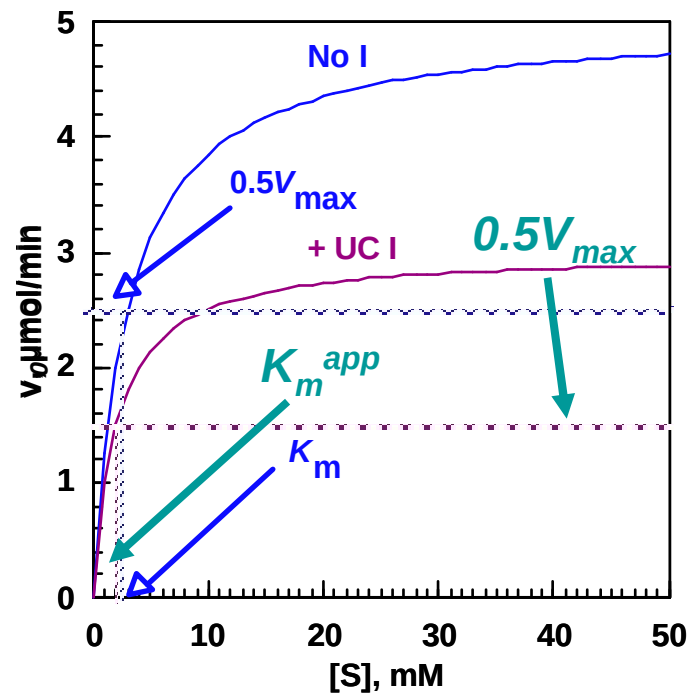
Inhibitor akompetycyjny wiąże się z enzymem w innym miejscu niż miejsce wiązania substratu. Nie wiąże się z wolnym enzymem ale z kompleksem ES tworząc nieaktywny katalitycznie kompleks ESI. Powoduje pozorne zmniejszenie powinowactwa enzymu do substratu. Inhibicji nie da się odwrócić poprzez zwiększenie stężenia substratu. K_m reakcji obniża się. Zmniejsza się wartość V_{max} .



Linia -Mentana i Lineweavera -Burka dla reakcji z ciągłym inhibitorem akompetycyjnym



ESI $\longrightarrow$ brak reakcji



UCI – inhibitor akompetycyjny; S – substrat; E – enzym; No I – brak inhibitora

Inhibicja mieszana

Inhibitor wiąże się z enzymem lub kompleksem ES w centrum aktywnym (w miejscu wiązania substratu lub miejscu katalitycznym) lub poza nim. Inhibitor wpływa jednocześnie na wiązanie substratu jak i liczbę obrotów enzymu. Obie wartości $V_{\max}$ i K_m zmieniają się ($V_{\max}$ zmniejsza się a K_m zwiększa się).

