

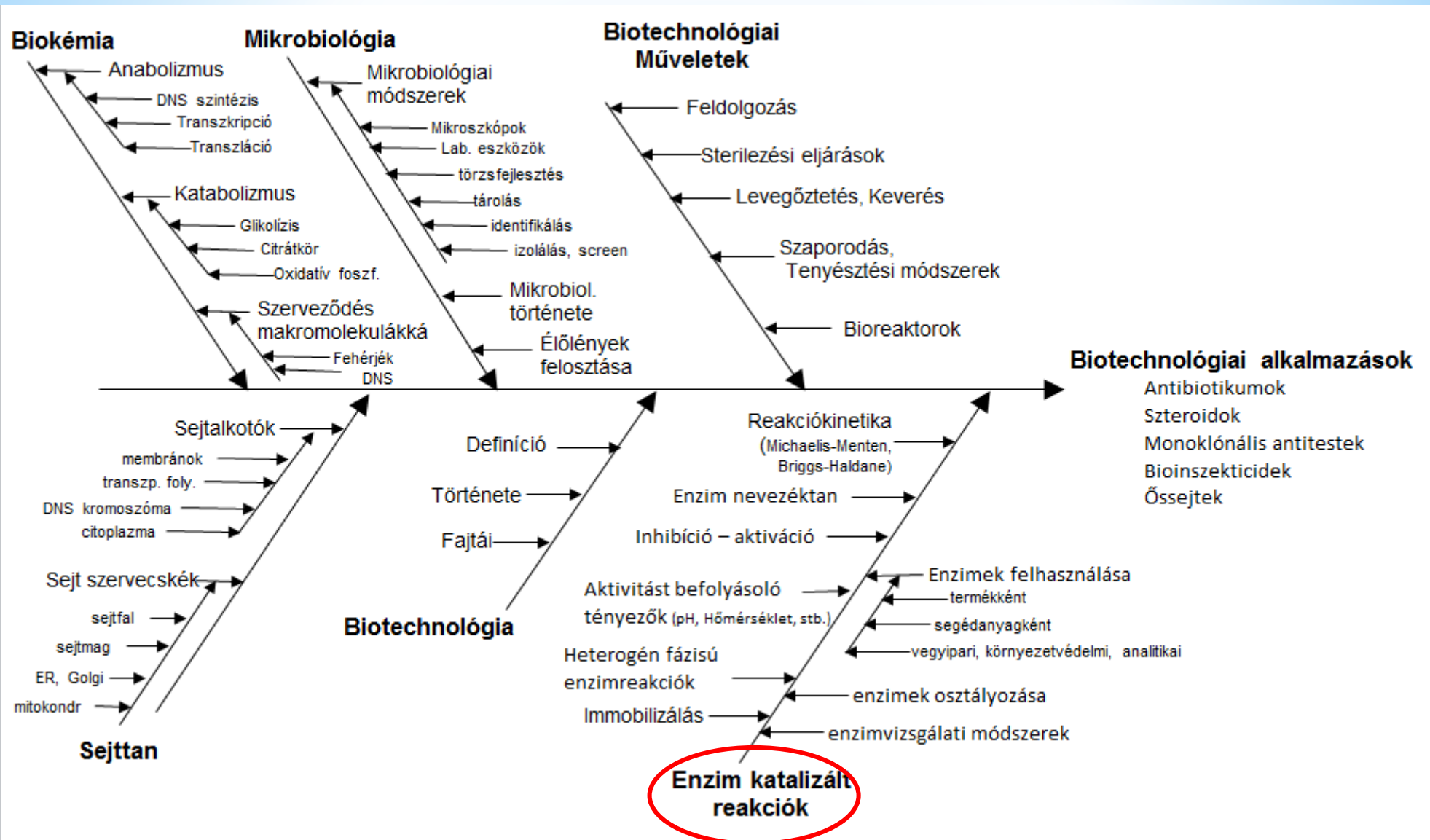
BIOLÓGIA és BIOTECHNOLÓGIA

BMEVEMBM 301

Előadó: Ballagi András - címzetes egyetemi tanár, BME
- Technológiai igazgató, Diagon Kft.

5/6. rész

Itt járunk:



Enzim mérnöki ismeretek

Zemplén Géza, 1915

Az enzimek és gyakorlati alkalmazásuk.

A kir.Magyar Term.Tud . Társulat kiadása

“Kevés fejezete van a chemiának, amely a legutolsó néhány év alatt olyan nagyot haladt volna, mint éppen az enzimeké. Éppen ezért a vegyész lépten-nyomon érzi, hogy megismerésük és a velük való bánásmód manapság már nélkülözhetetlen”

Enzimek tulajdonságai

Csak termodinamikailag lehetséges reakciók ($\Delta G < 0$)

Reverzibilis reakciók (de eltolás. elvétel...)

Denaturálhatóak (T, pH, ionerősség, oldószerek)

Specifikusak: S-specifitás, csoport-specifitás, sztereo-specifitás

Enyhébb reakciókörülmények

Nagyobb reakció specificitás

Regulálhatóság

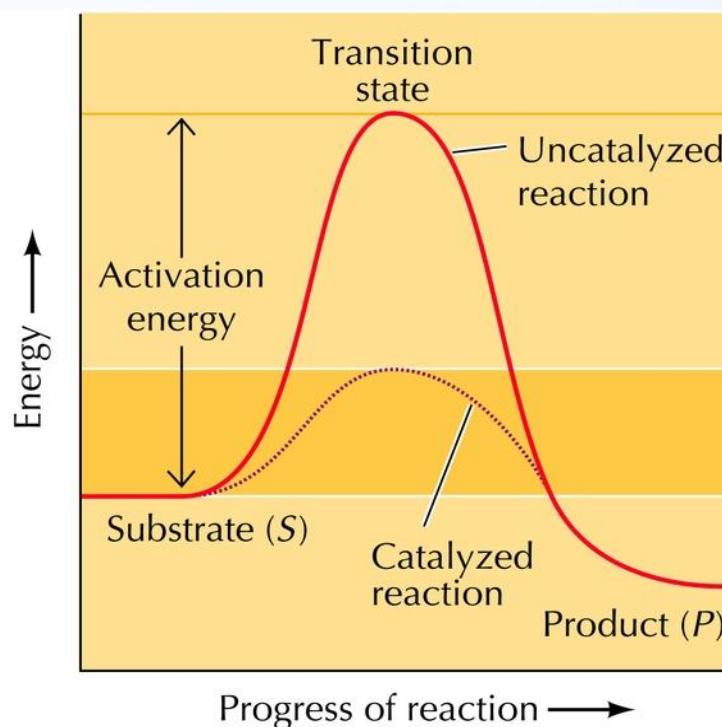
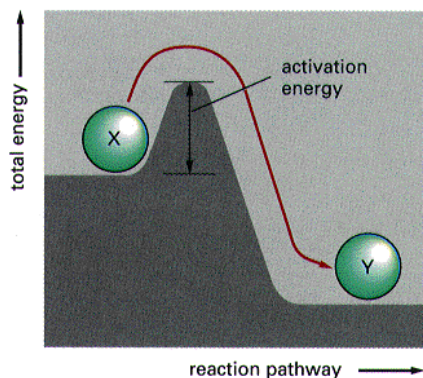
Enzimek tulajdonságai

Az enzimek NEM változtatják meg az egyensúlyi állandót.

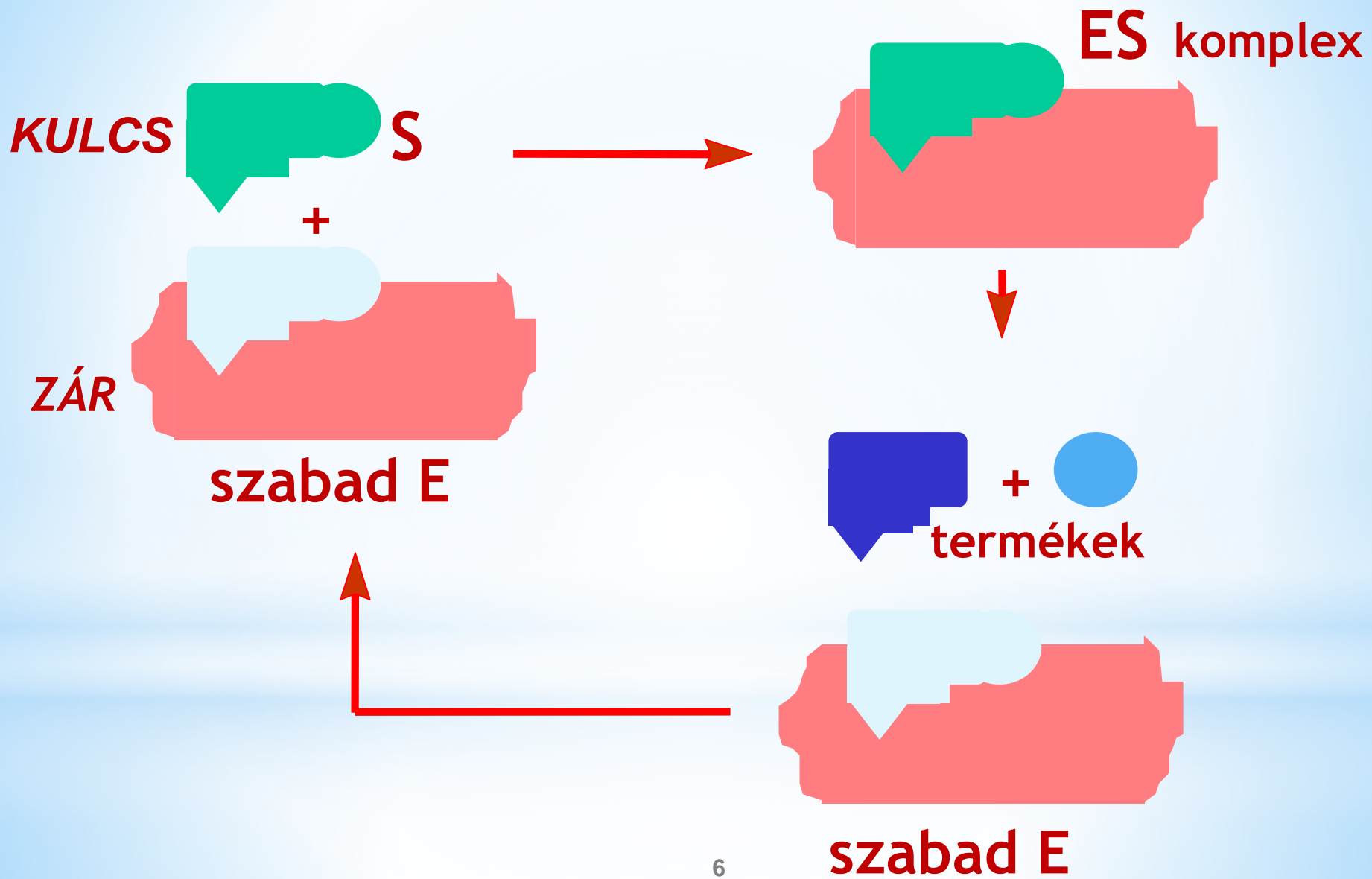
Az enzimek NEM befolyásolják a reakcióban felhasznált vagy felszabaduló energia mennyiségét (G)

Az enzimek csökkentik a reakciók aktivációs energiáját

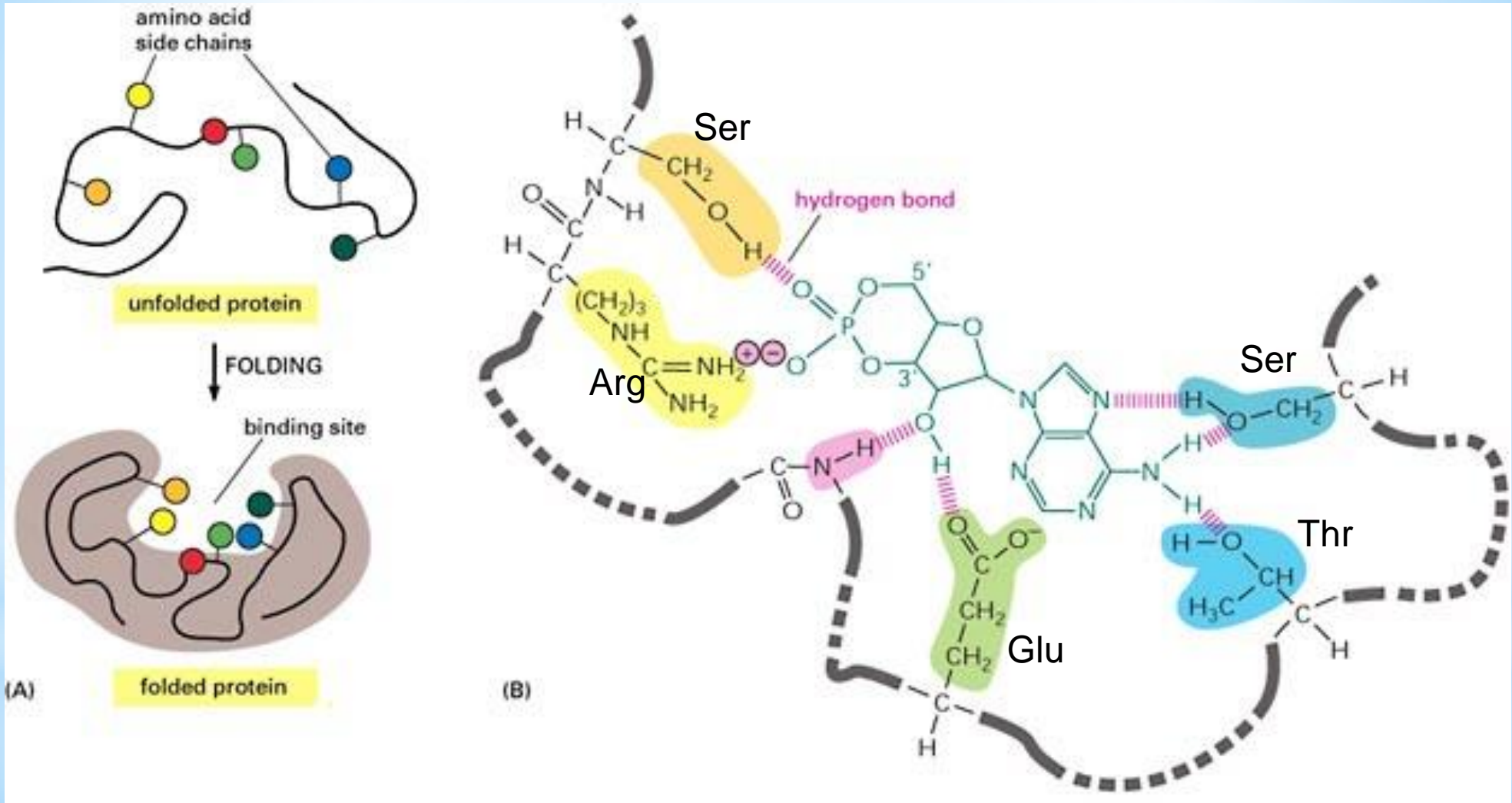
Az enzimek növelik az egyébként is lezajló reakciók sebességét



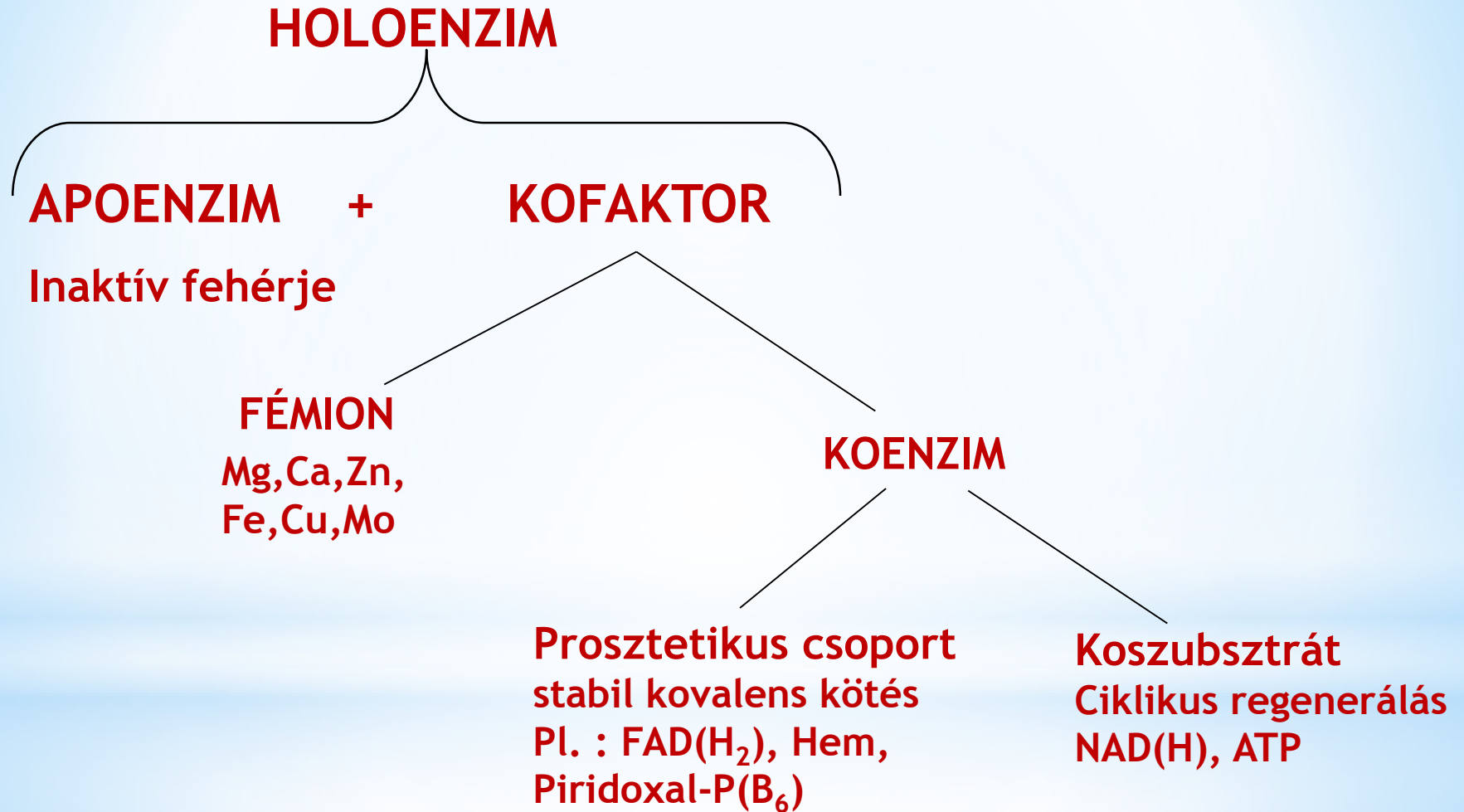
Kulcs – zár hasonlat



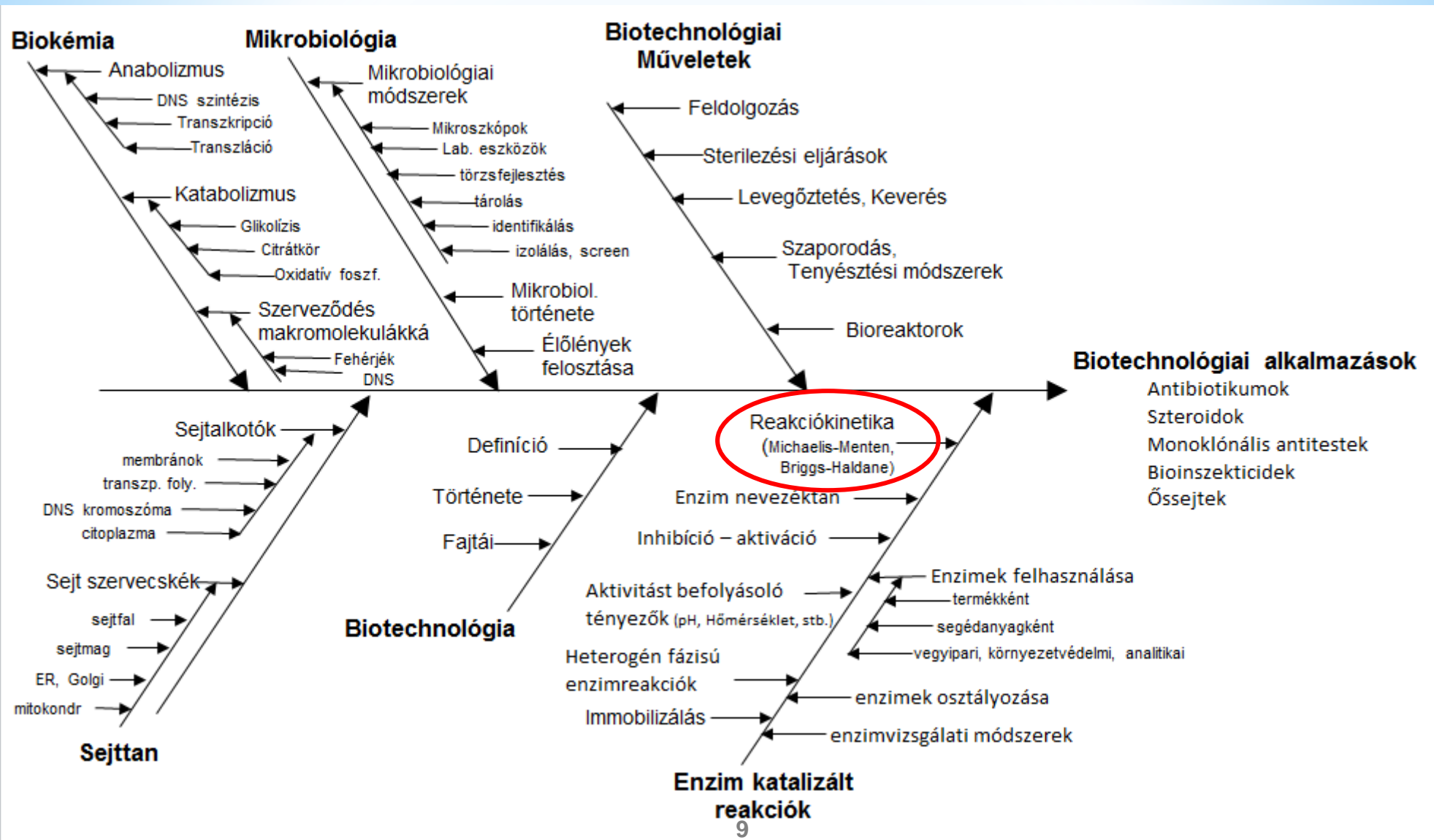
Az aktív centrum kialakulása



Enzimes alapfogalmak



Itt járunk:



Enzimkinetika



SI rendszerben: 1 Katal az az enzim aktivitás (mennyiség), amely 1 mol szubsztrátot alakít át 1 s alatt.
a hatalmas enzim mennyiség miatt nKat = 10^{-9} Kat használatos

A gyakorlatban: 1 egység (Unit, azaz U) az az enzim aktivitás (mennyiség), amely:
1 μmol szubsztrátot alakít át, (vagy 1 μmol terméket képez)
1 perc alatt *adott reakció körülmények között*.

$$1 \text{ Kat} = 6 \cdot 10^7 \text{ U}, \quad 1 \text{ U} = 1.6 \cdot 10^{-8} \text{ Kat}, \quad 1 \text{ U} = 1/60 \mu\text{Kat}$$

E/tf , E/mg \longrightarrow fajlagos aktivitások,
ha az enzim molekulásúlya és tisztasága
nem ismert

Enzimkinetika: Michaelis - Menten kinetika



feltételezések:

- $k_{-2} = 0$
- első lépés gyorsan egyensúlyra jut = Rapid ekv, azaz $K_s = K_m$
- stabil ES komplex, EP komplex elhanyagolható
- egy aktiv centrum, egy szubsztrát
- aktivitás helyett koncentráció használható
- $S \gg E_0$ vagyis $E_0 / S \ll 1$

$$k_1 S \cdot E = k_{-1} (ES)$$

$$K_s = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{S \cdot E}{(ES)}$$

az (ES) disszociációs
állandója

a teljes reakciósebesség:

$$V = \frac{dP}{dt} = k_2 (ES)$$

anyagmérleg:

$$E + (ES) = E_0$$

összük el ezt a
kettőt egymással

Michaelis - Menten kinetika

$$V = \frac{dP}{dt} = k_2(ES)$$

$$E + (ES) = E_o$$

$$\frac{V}{E_o} = \frac{k_2(ES)}{E + (ES)}$$

$$K_s = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{S \cdot E}{(ES)}$$

$$\frac{V}{E_o} = \frac{k_2 \frac{S}{K_s} E}{E + \frac{S}{K_s} E}$$

Rendezzük át!

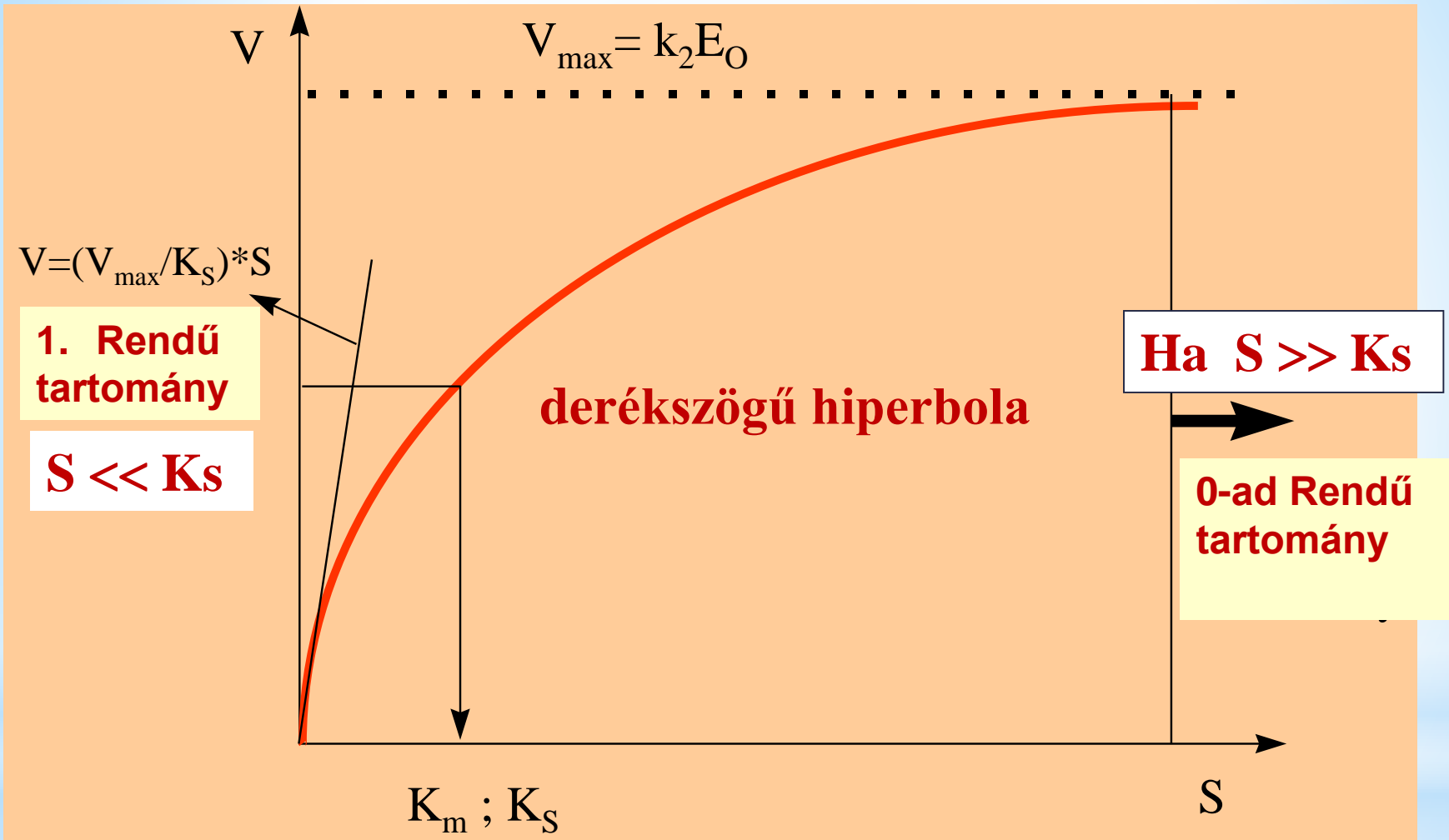
$$\frac{V}{k_2 E_o} = \frac{\frac{S}{K_s}}{1 + \frac{S}{K_s}} = \frac{S}{K_s + S}$$

$$V = V_{\max} \frac{S}{K_s + S}$$

$$V_{\max} = k_2 E_o$$



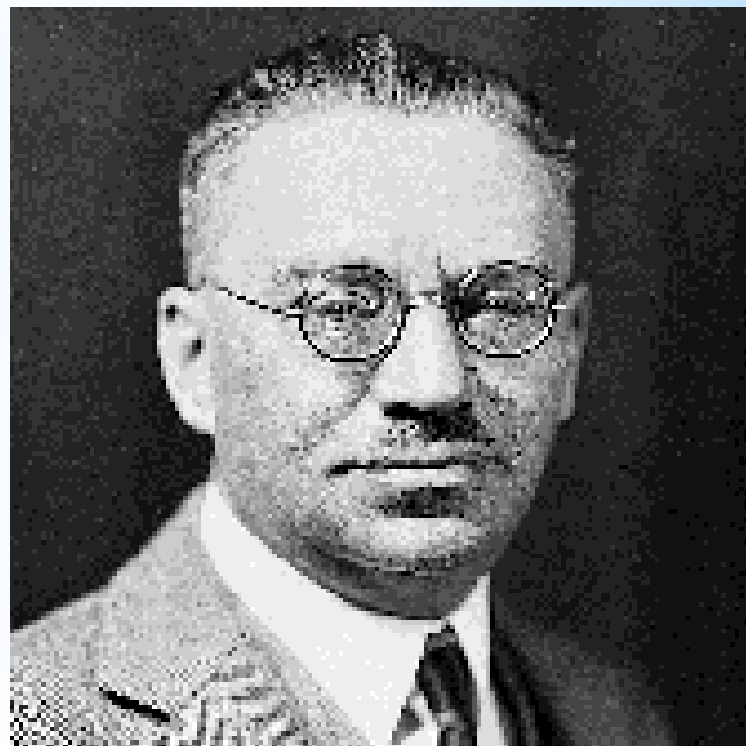
Diszkusszió



$$V = V_{\max} \frac{S}{K_m + S}$$



Maud Menten
1879-1960



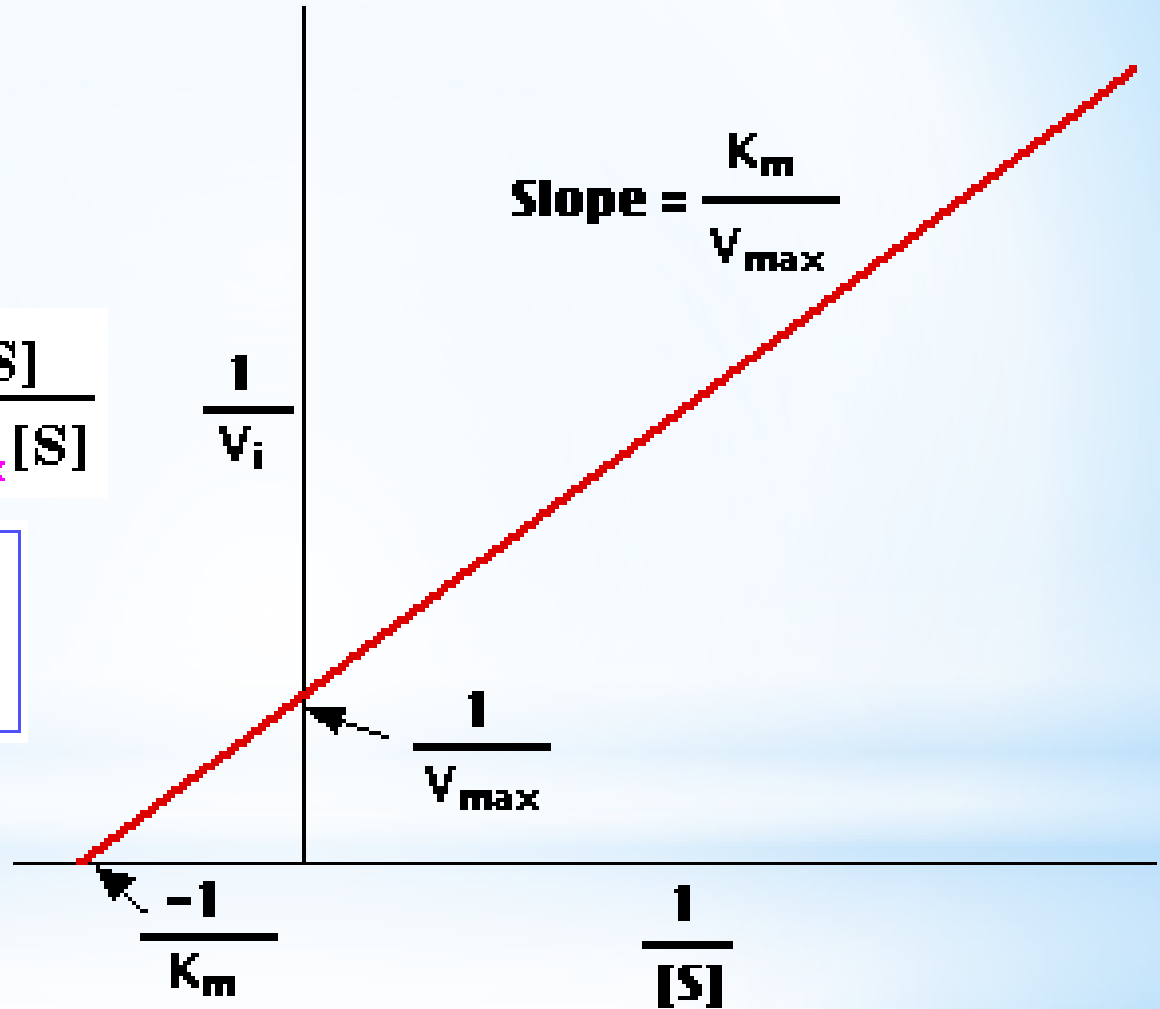
Leonor Michaelis
1875-1949

Linewaver - Burk ábrázolás

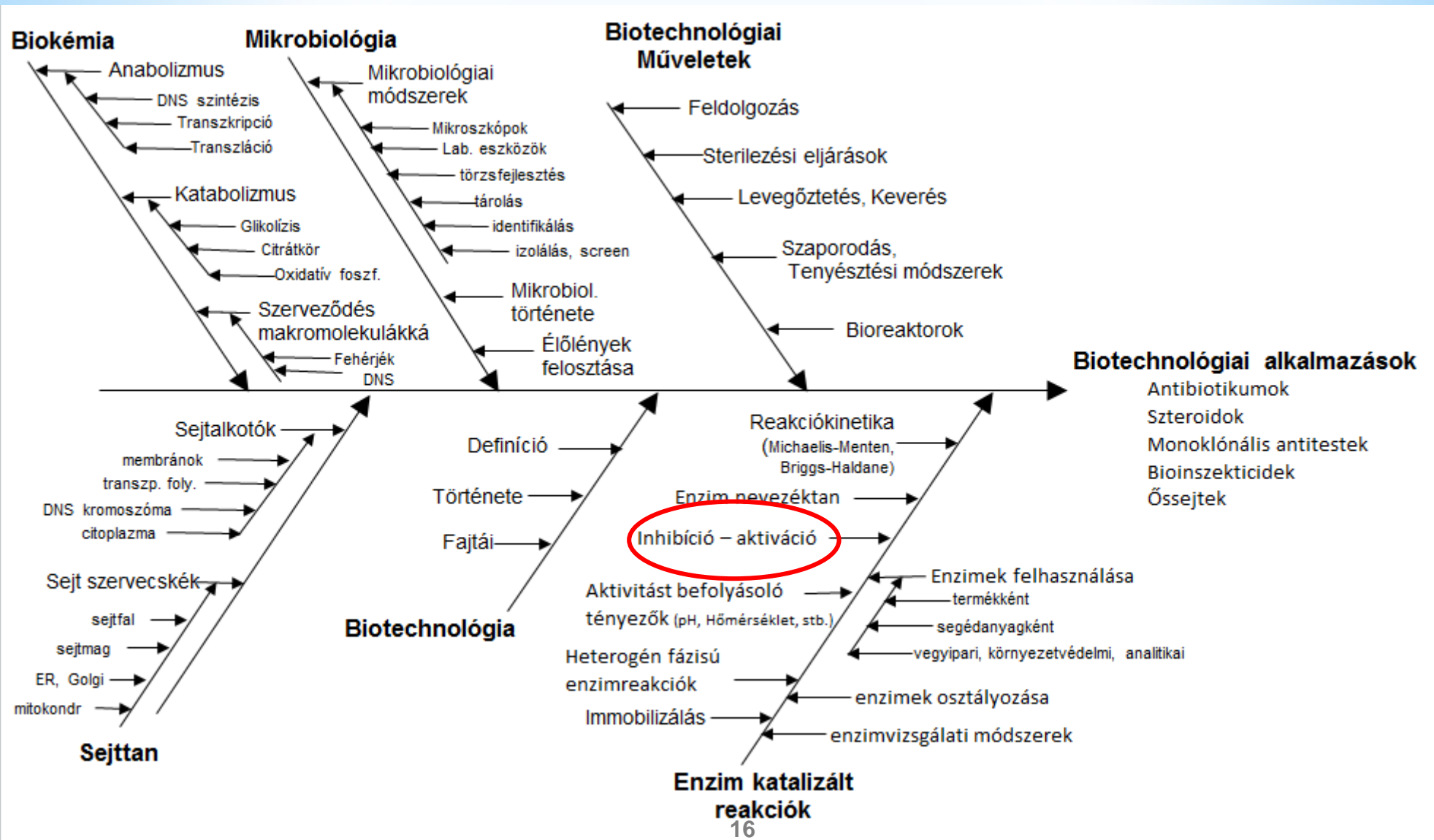
$$v_0 = \frac{v_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{v_{\max} [S]} + \frac{1}{v_{\max}}$$

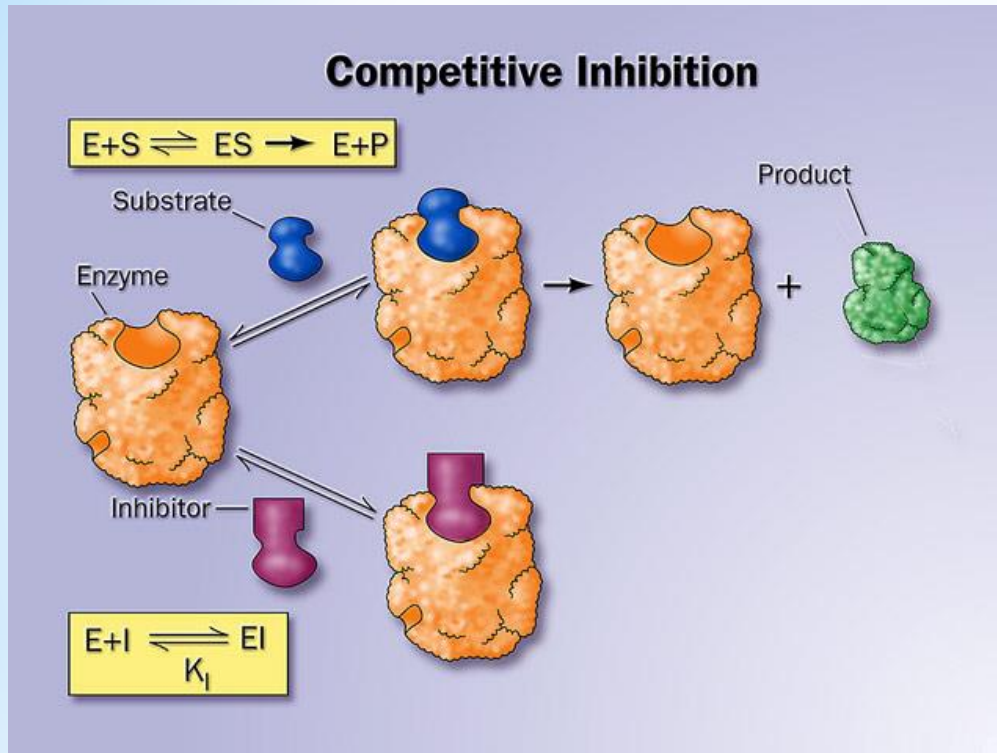
$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{v_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}}$$



Itt járunk:

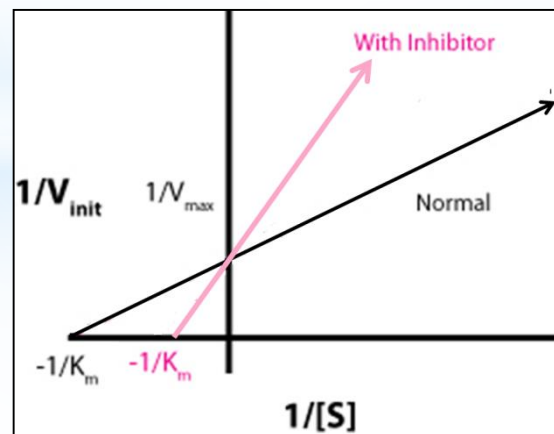
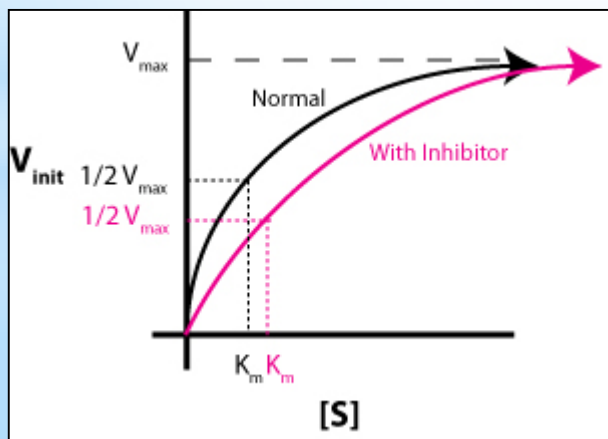


Kompetitív inhibíció

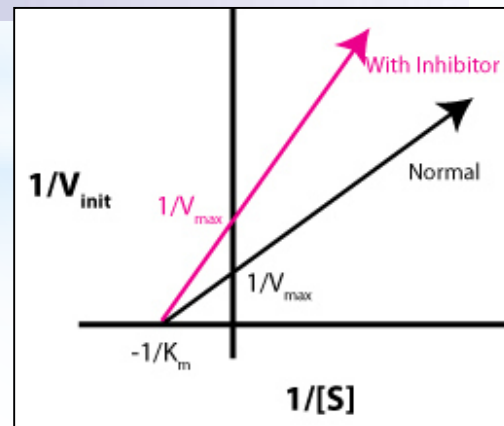
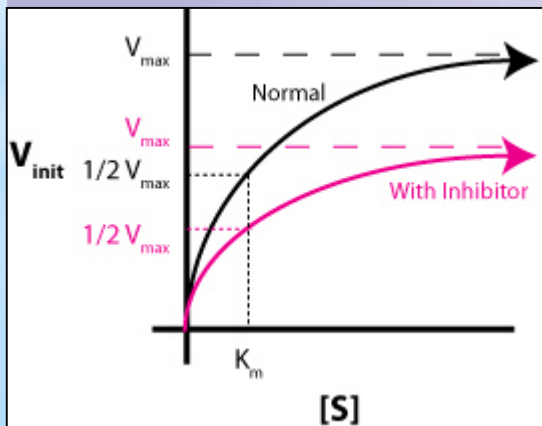
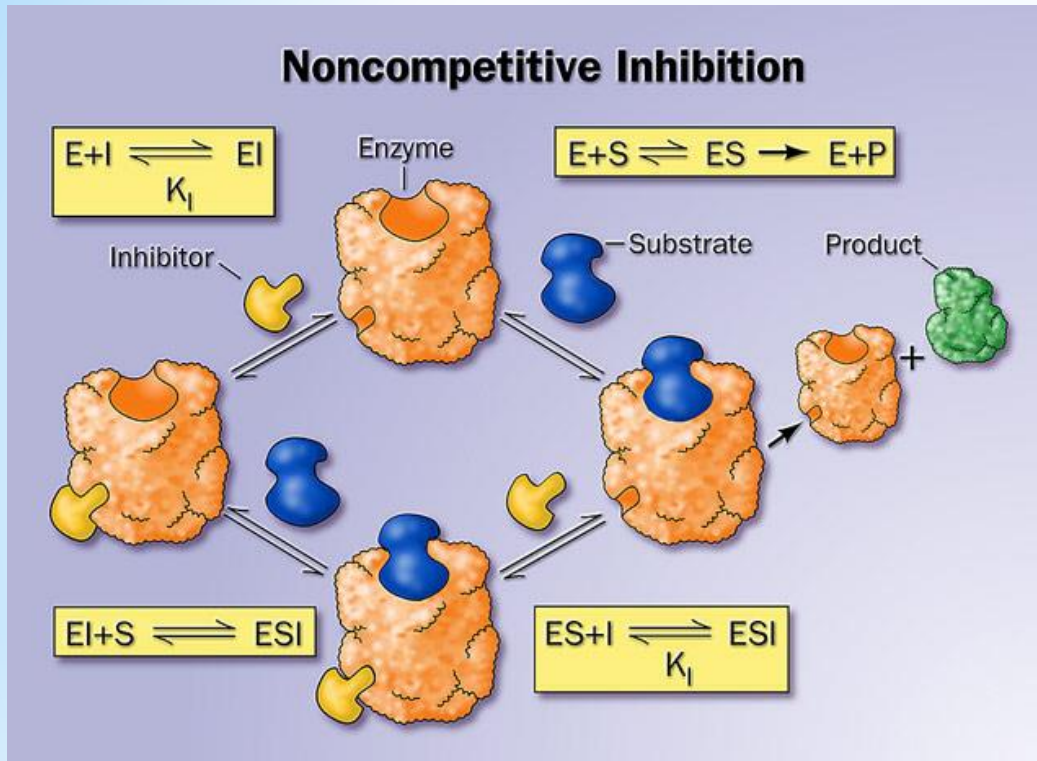


A kompetitív inhibíció egy olyan gátlás amelynél az inhibitor az aktív centrumba kötődik és megakadályozza a szubsztrát bekötődését (és viszont: a szubsztrát az inhibitor bekötődését.)

V_{max} változatlan, mert sok szubsztrát kiszorítja a kevés inhibitor, de a K_m nő, mert a szubsztrát enzimhez való kötődése csökken

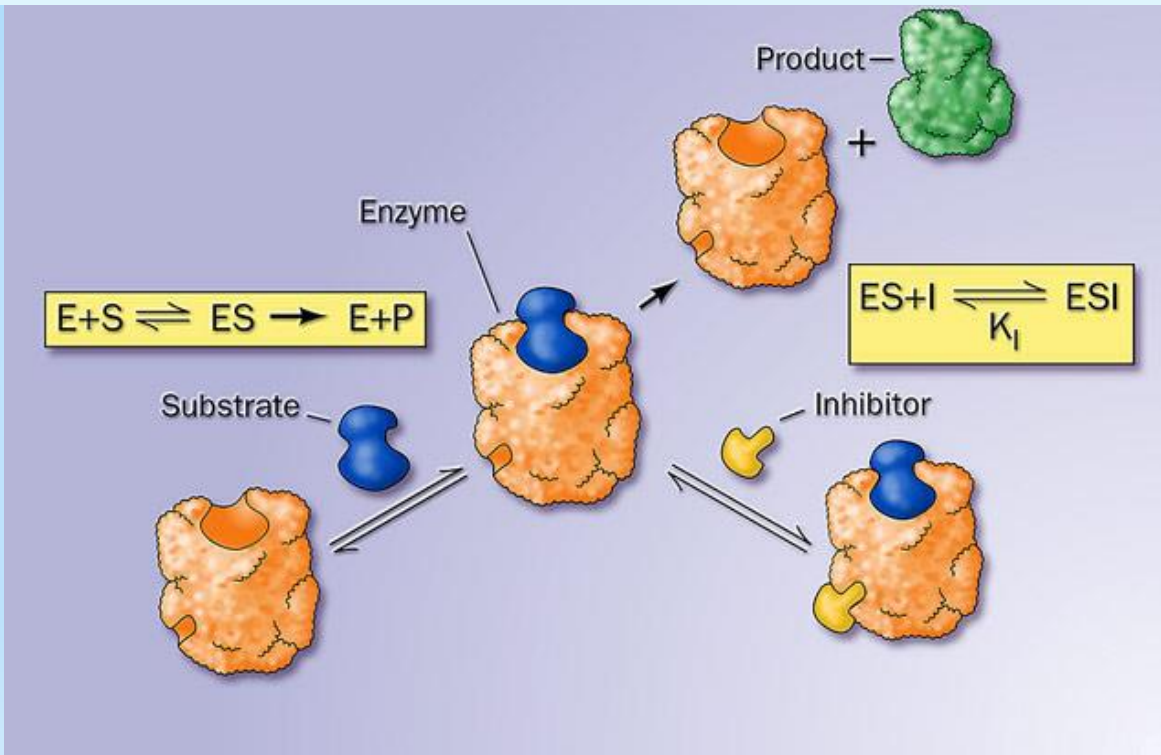


Nem-kompetitív inhibíció

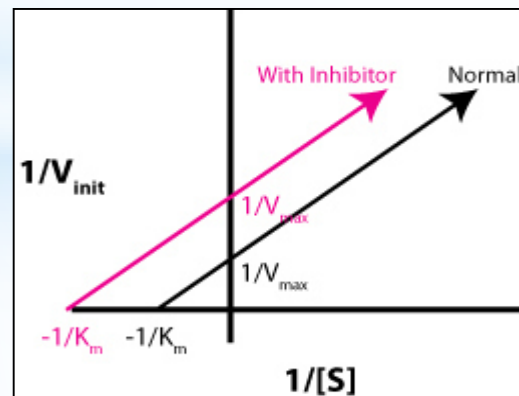
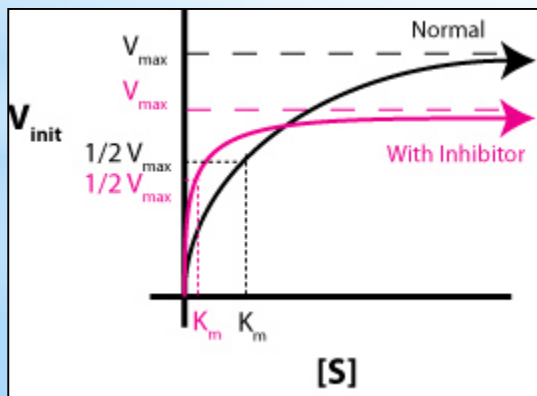


Nem-kompetitív inhibíciónál az inhibitor és a szubsztrát eltérő helyekre kötődik. További fontos tulajdonság, hogy az inhibitor ugyanolyan jól kapcsolódik az enzimhez, mint az enzim-szubsztrát komplexhez és mindkét esetben megakadályozza a termékképződést. Ezáltal csökkenti az enzimaktivitást, de a szubsztráthoz való affinitást nem, mert a szubsztrát zavartalanul be tud kötődni

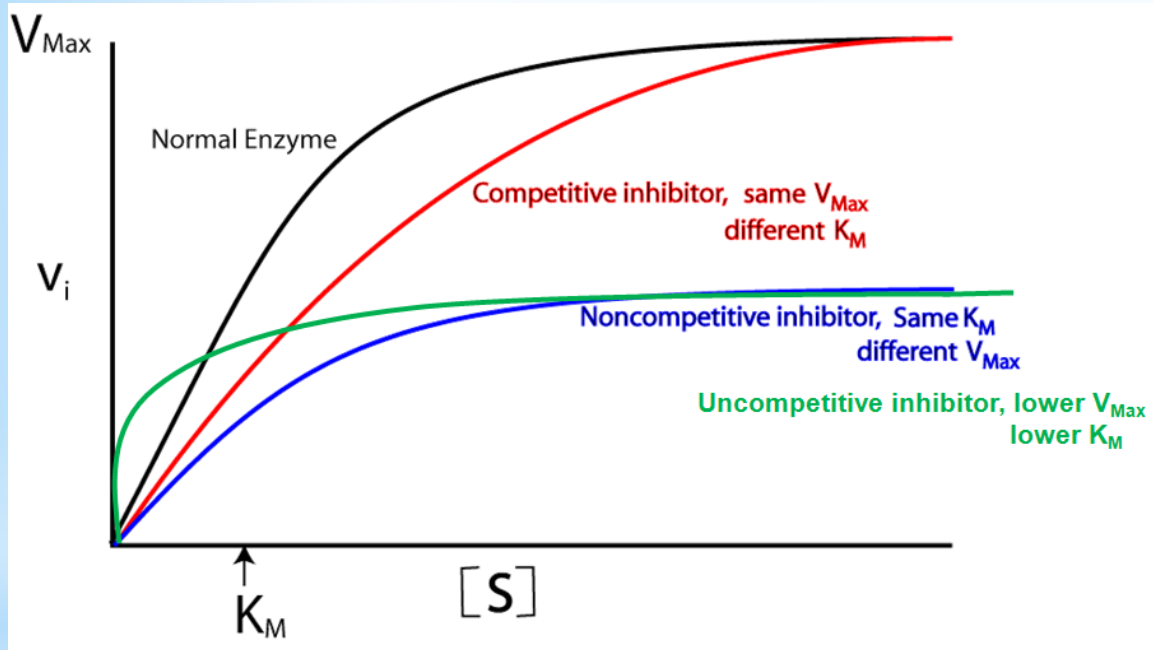
Unkompetitív inhibíció



Unkompetitív inhibíció, másnéven anti-kompetitív inhibíció az, amikor az inhibitor csak a már kialakult enzim-szubsztrát komplexhez tud kötődni, az egyedül álló enzimhez nem. A maximális enzimaktivitás (V_{max}) csökken, mert a termékképzés gátolt, de a szubsztráthoz való affinitás nő (K_m csökken), mert a reakció eltolódik ESI irányába, így a szabad ES komplex csökken. Látszólag tehát a k_1 nő, mert a szubsztrát koncentrációt nemcsak az ES fogyasztja, hanem az ESI is.



ANALÓGIÁK a M-M kinetikára



Kompetitív inhibíció

$$V = V_{\max} \frac{S}{K_s \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) + S}$$

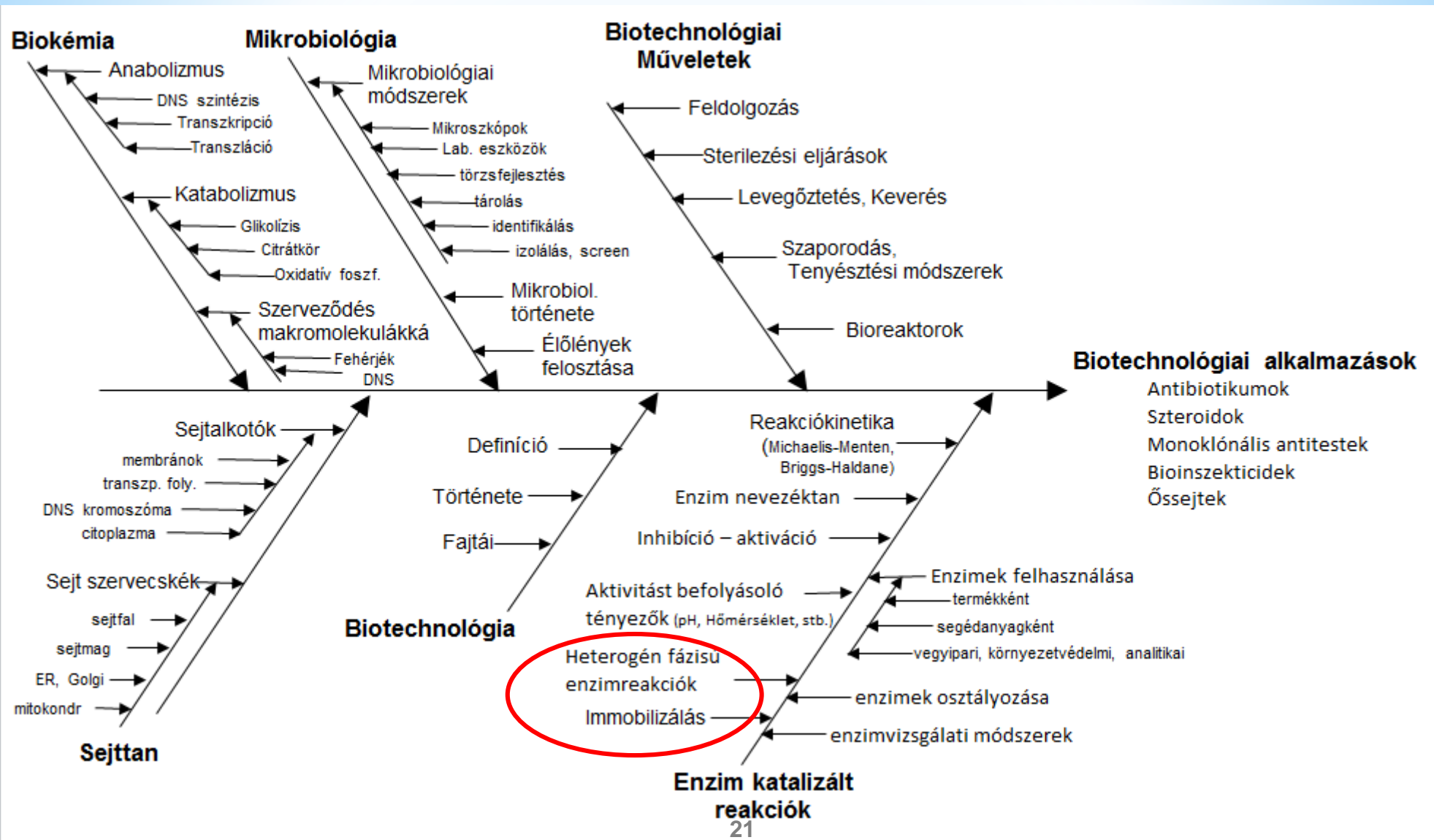
Non-kompetitív inhibíció

$$V = V_{\max} \frac{S}{K_s \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) + S \left(1 + \frac{I}{K_i} \right)}$$

Unkompetitív inhibíció

$$V = V_{\max} \frac{S}{K_s + S \left(1 + \frac{I}{K_i} \right)}$$

Itt járunk:



Heterogén fázisú enzimes reakciók

	Homogén fázisú Enzim reakció	Heterogén fázisú Enzim reakció
Homogenitási szempont	a rendszer homogén, az enzim az izolálásán kívül előkészítést nem igényel	Inhomogén rendszer, előkészítést (kémiai kapcsolást) igényel
Gazdasági szempont	Az enzimek drágák, 1-10 \$/mg Csak egyszer használhatók fel, a reakció után elvesznek, illetve kinyerésük a reakcióelegyből bonyolult és drága.	Az enzimek ugyan drágák, de többször felhasználhatóak így az egy reakcióra eső költség olcsóbb
Technológiai szempont	szennyezik a terméket, tisztítását nehezítik	Az enzim a reakcióelegyből könnyen eltávolítható

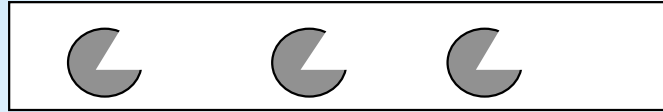
Enzim Immobilizáció története

Nelson és Griffin 1916-ban véletlenül fedezte fel, hogy élesztő invertáza aktívszéken adszorbeálódott de megőrizte az aktivitását a szacharóz hidrolízisében.

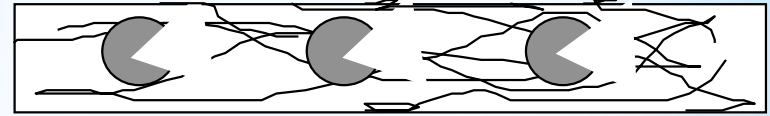
Ipari gyakorlattá illetve kereskedelmivé akkor vált, amikor Grubhofer és Schleith egy sor enzimet rögzítettek: karboxipeptidázt, diasztázt, pepszint és ribonukleázt. Ezeket diazotálással végezték poli-aminosztírol gyantára kovalens kötéssel.

Az első ipari alkalmazás Chibata nevéhez fűződik 1969-ben, aki aminoacilázt rögzített DEAE Sephadex-re ionosan és ezt N-acyl-D, L-aminosav rezolválására használták.

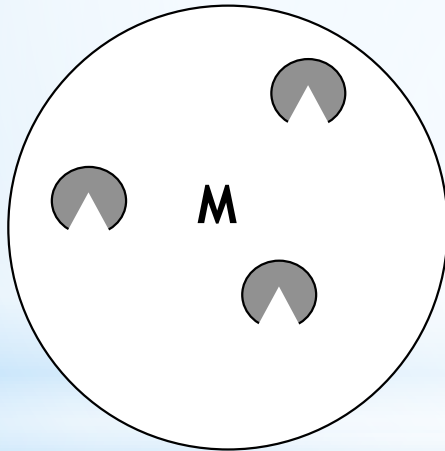
Az enzimrögzítés fizikai módszerei



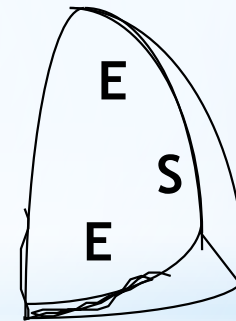
Enzim rögzítés üreges szálban
(Hollow fibre)



Enzim rögzítés fonott szálás anyagban



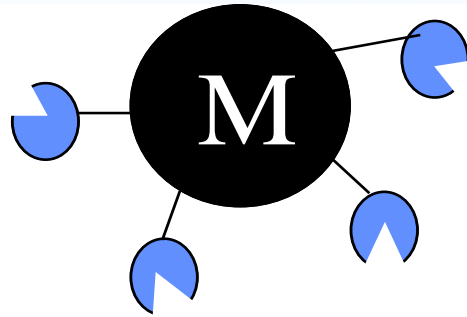
Enzimbezárás oldhatatlan
gél mátrixban



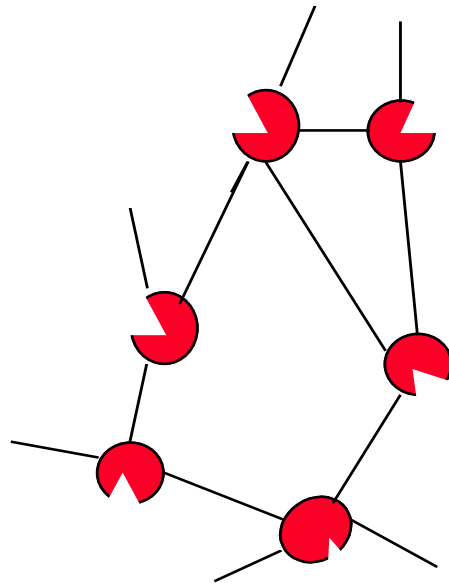
Mikrokapszulázás

Az enzimrögztés kémiai módszerei

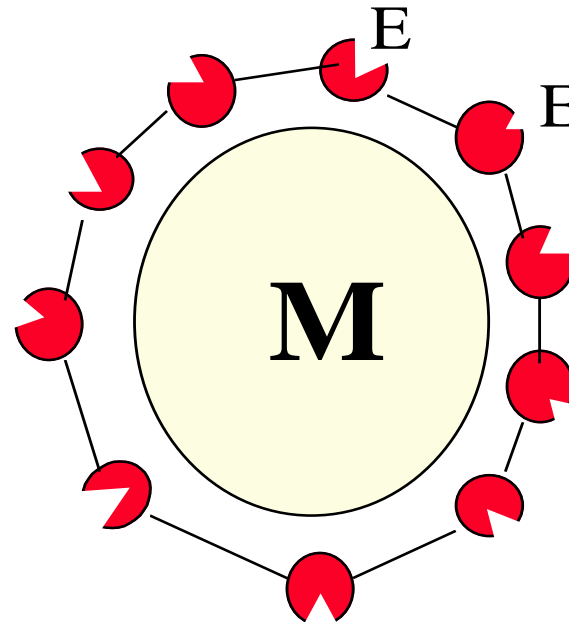
Enzimkötés
hordozóhoz
kovalens kötéssel



M=mátrix



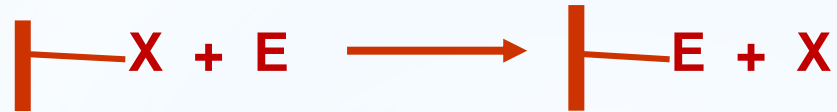
Keresztkötés



Enzim keresztkötés
multifunkciós reagenssel

Az enzimrögztítés kémiai módszerei

Kovalens kötés nem esszenciális aminosav-oldallánc(!) és vízben nem oldódó, funkciós csoporttal ellátott hordozó mátrix között



Hordozó: természetes polimer: *agar, agaróz, kitin, cellulóz, kollagén*
szintetikus polimer: *poliuretán, polisztirol, nylon*
szervetlen hordozók: *üveg, alumínium, szilikagél*

Kovalens kötés kialakítása:

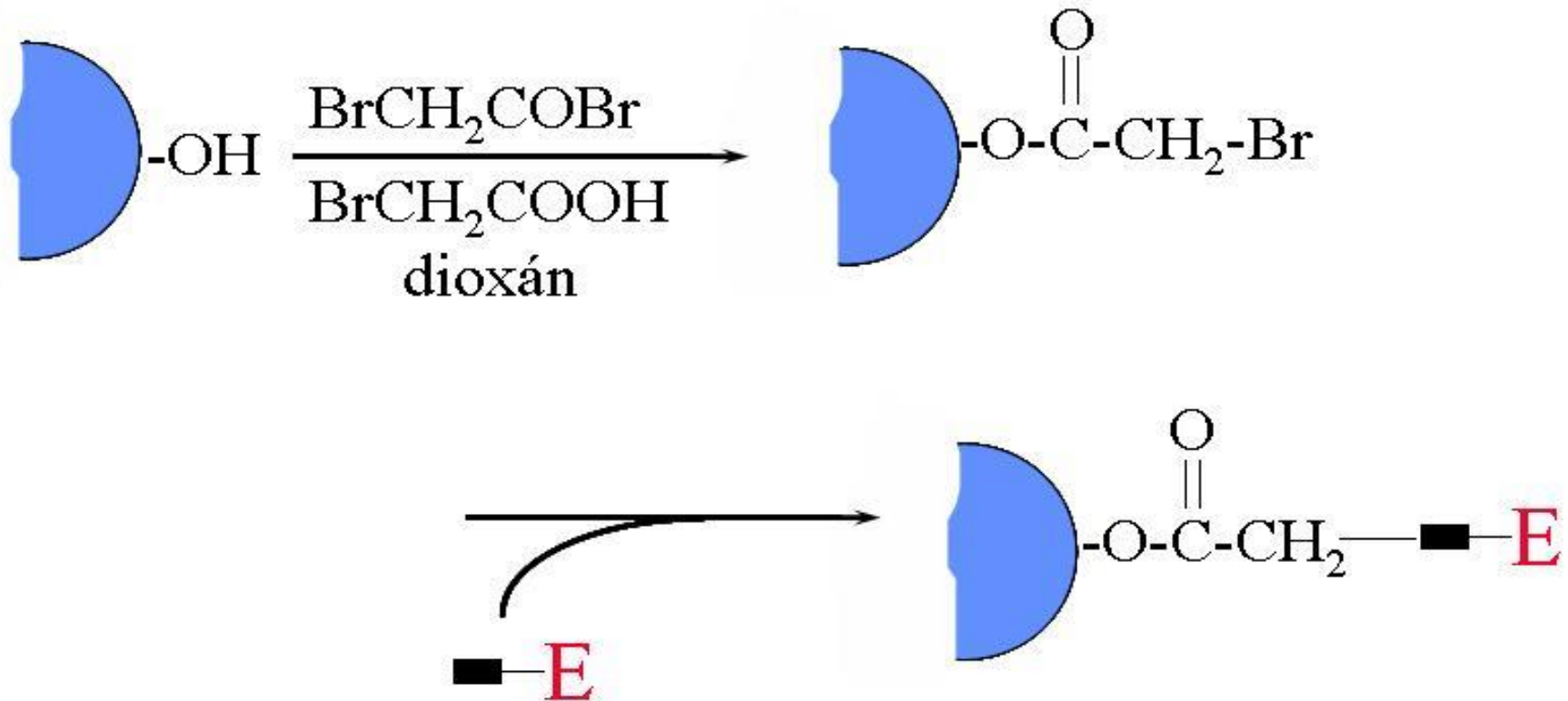
szabad α -, β - vagy γ -COOH, α -, β -NH₂ csoportok
fenil-, OH-, SH- vagy imidazol-csoportok

Lépések:

1. a hordozó aktiválása (a kar és az -X, reaktív csoport felvitele),
2. a kovalens kötés létrehozása az enzim és az aktivált hordozó között.
Közben aktív centrum védelme: S v. S-analóg jelenlétével

Az enzimrögztítés kémiai módszerei

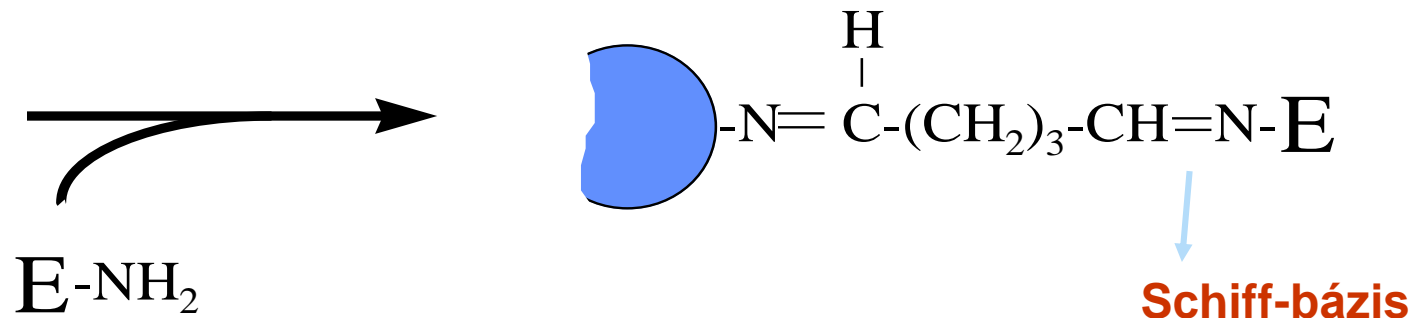
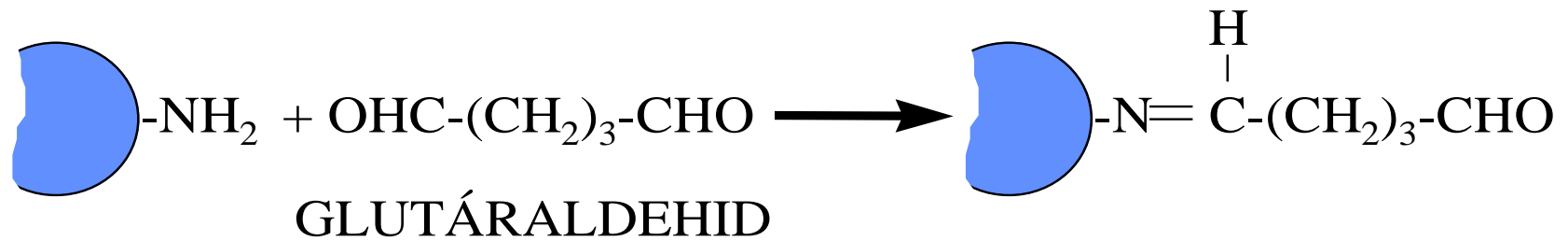
MÁTRIX: METAKRILÁT és CELLULÓZ származékok homo- és kopolimerjei



Az enzimrögztés kémiai módszerei

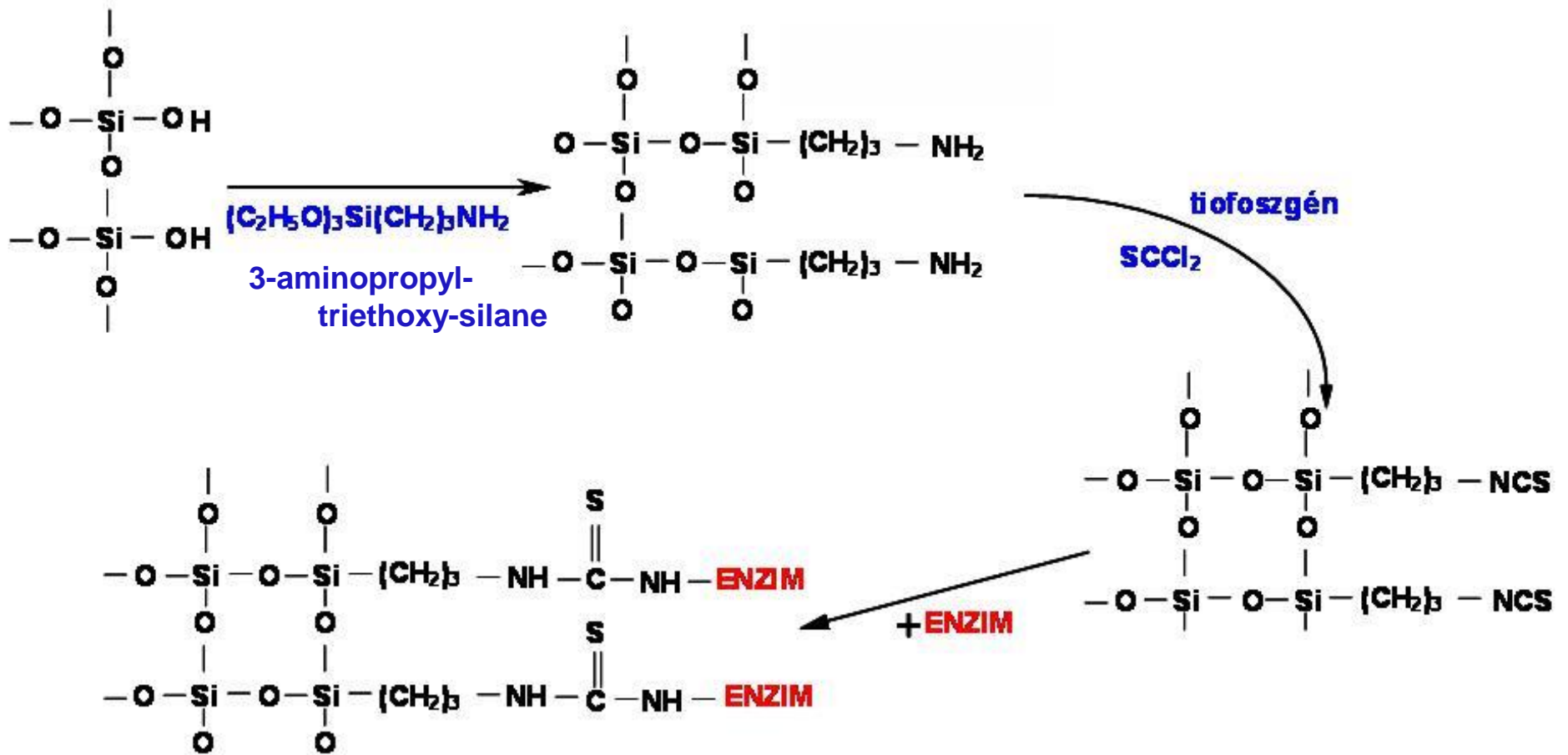
POLIFUNKCIÓS KÖTÉS

MÁTRIX: -NH₂ csoport : AE-CELLULÓZ, DEAE-CELLULÓZ,
KOLLAGÉN, KITIN, NYLON, stb



Az enzimrögztés kémiai módszerei

Üvegfelületre rögztés

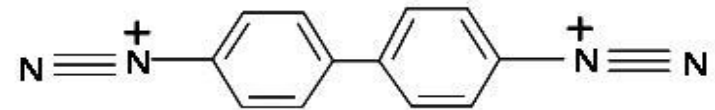


Az enzimrögztés kémiai módszerei

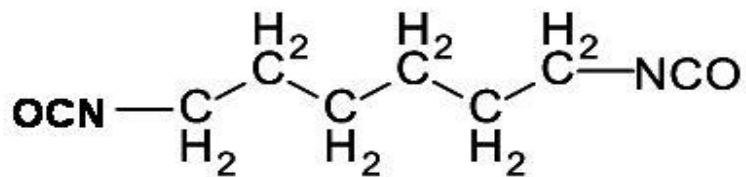
Keresztkötések létrehozása fehérjemolekulák között



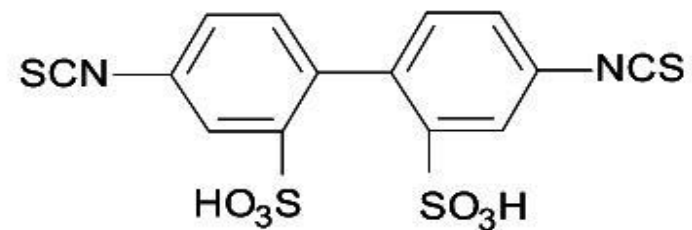
GLUTÁRALDEHID



DIAZOBENZIDIN

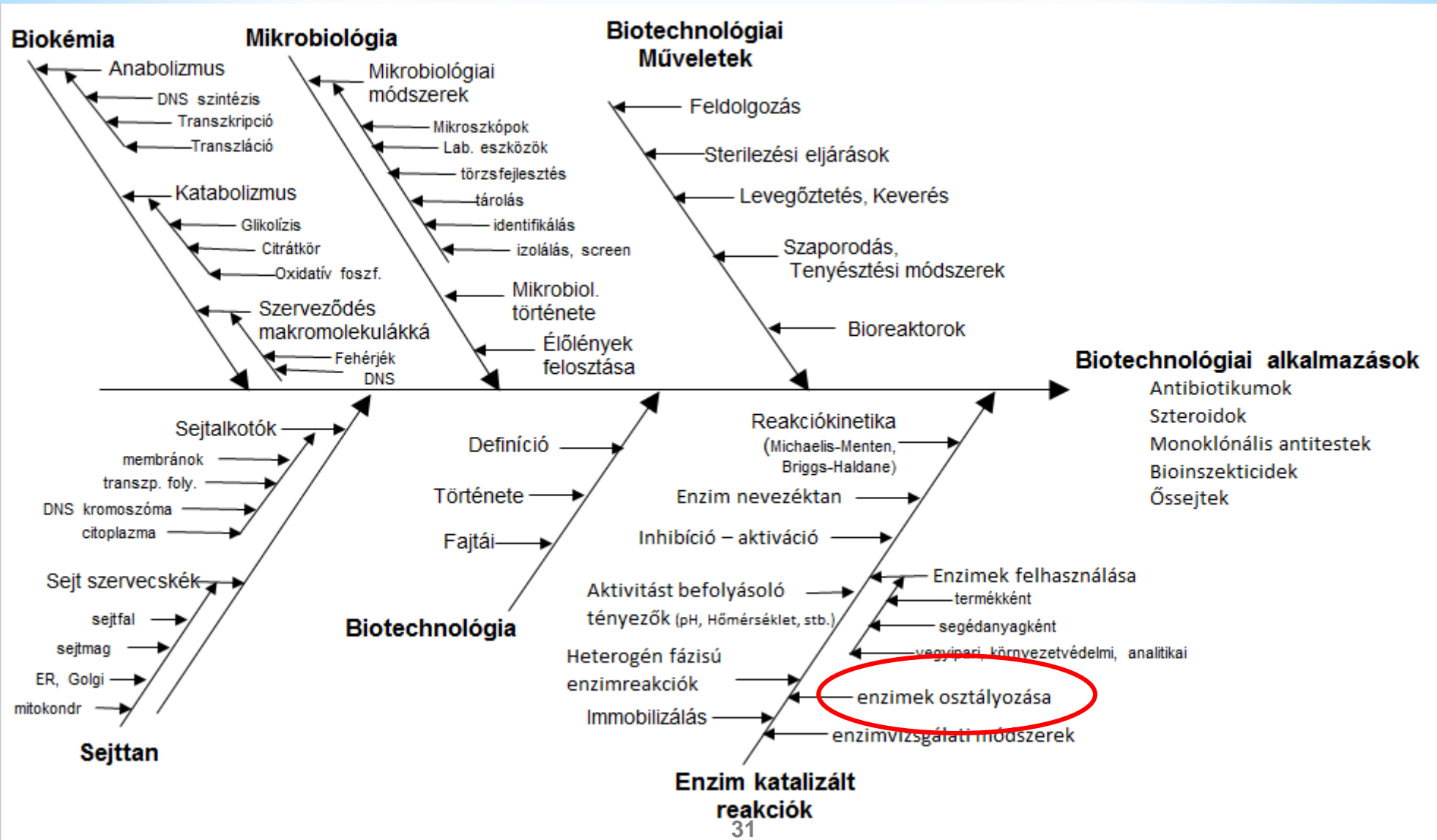


HEXAMETILÉN-DIIZOCIANÁT



4,4'-DIIZOCIANÁTO-BIFENIL-
-2,2'-DISZULFONSAV

Itt járunk:



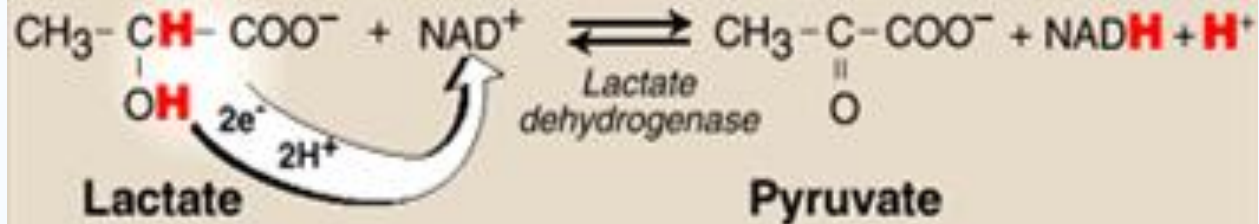
Az enzimek osztályozása aktivitásuk alapján

Osztály	Reakciótípus	Példa
1. oxidoreduktázok	redoxi elektronok, H atomok, H ⁻ -ionok átvitele	tejsav dehidrogenáz
2. transzferázok	csoportátvitel pl. foszforil csoport	szerin hidroximetil transzferáz
3. hidrolázok	hidrolízis, funkciós csoport átvitele vízre	ureáz
4. liázok	csoportátvitel kettős-kötésre, vagy kettőskötés kialakítása csoportelvonással	piruvát dekarboxiláz
5. izomerázok	intramolekuláris csoport-átvitel	metil-malonil CoA liáz
6. ligázok	C-C, C-S, C-O és C-N kötés kialakítása ATP hasadással kapcsolt kondenzációs reakcióban	piruvát karboxiláz

Az enzimek osztályozása aktivitásuk alapján

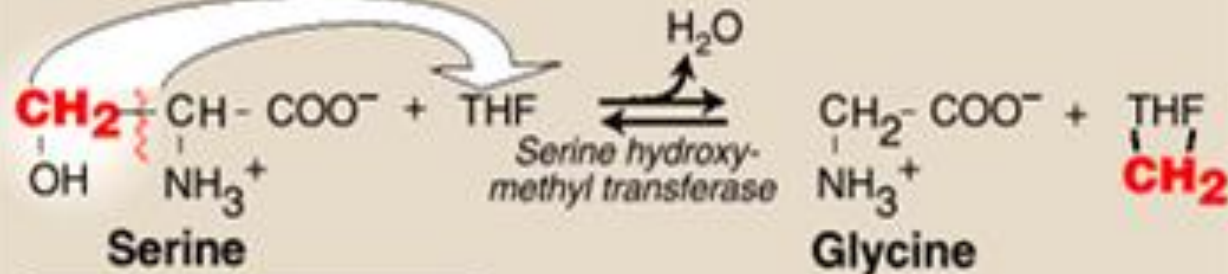
1. Oxidoreductases

Catalyze oxidation-reduction reactions, such as:



2. Transferases

Catalyze transfer of C-, N-, or P-containing groups, such as:



3. Hydrolases

Catalyze cleavage of bonds by addition of water, such as:



Az enzimek osztályozása aktivitásuk alapján

4. Lyases

Catalyze cleavage of C-C, C-O, C-S and certain C-N bonds:

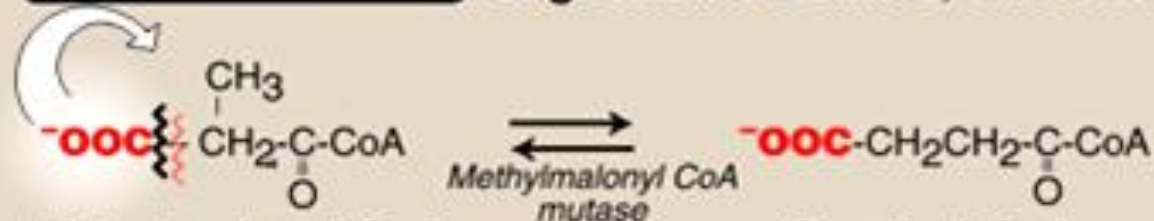


Pyruvate

Acetaldehyde

5. Isomerases

Catalyze racemization of optical or geometric isomers, such as:

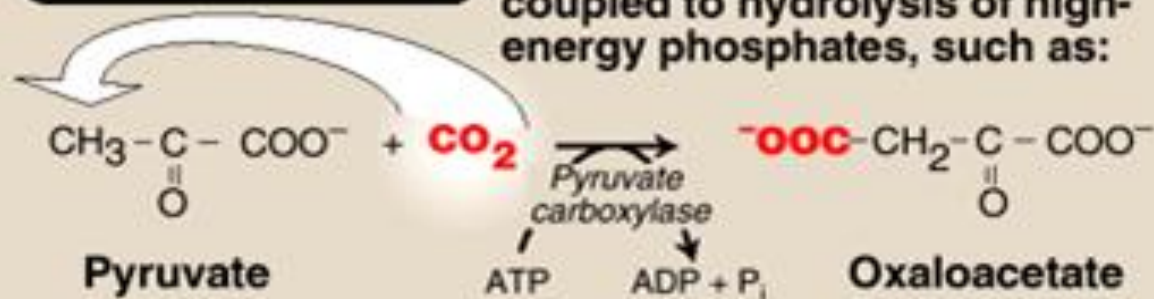


Methylmalonyl CoA

Succinyl CoA

6. Ligases

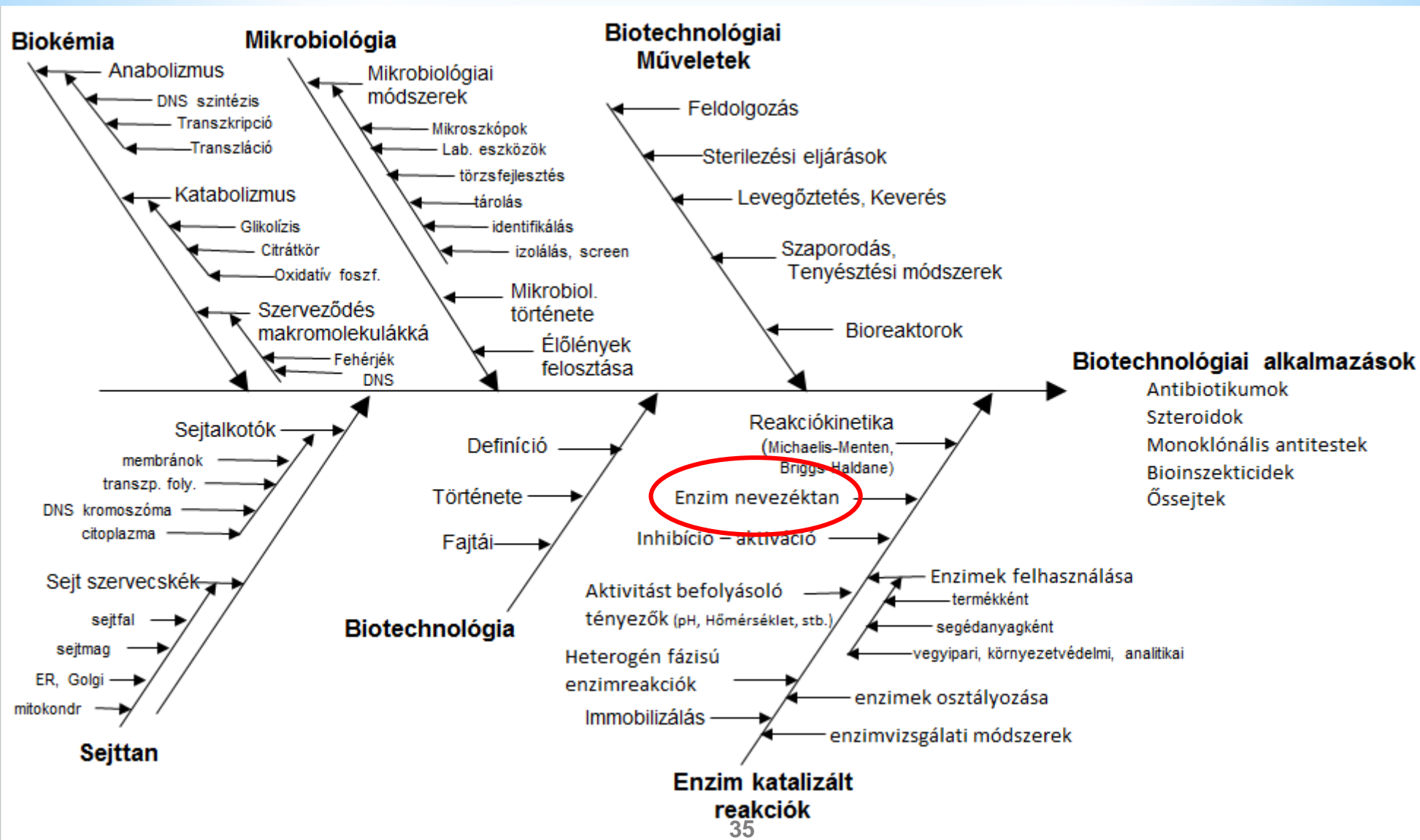
Catalyze formation of bonds between carbon and O, S, N coupled to hydrolysis of high-energy phosphates, such as:



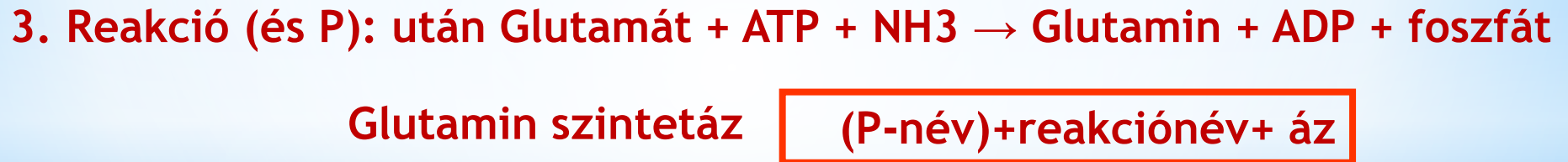
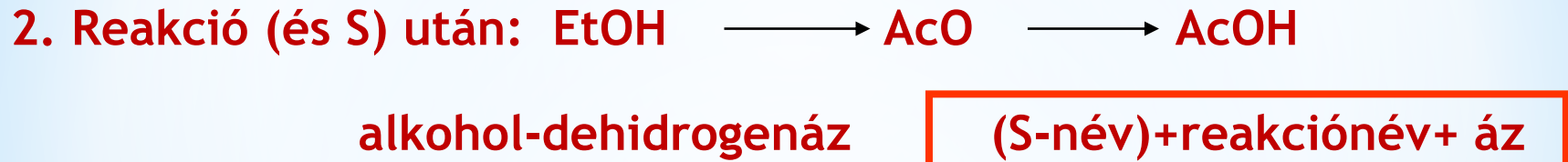
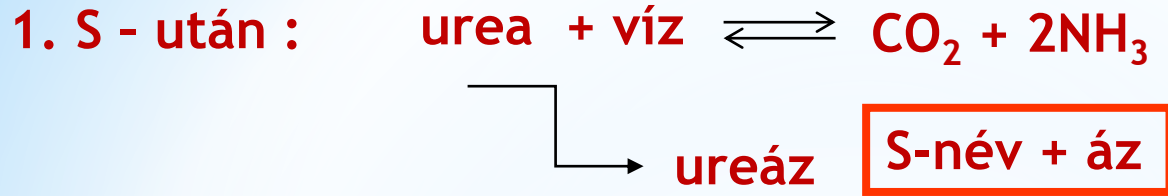
Pyruvate

Oxaloacetate

Itt járunk:



Enzimek elnevezése



4. Triviális nevek: alapnév + -in

pepszin, tripszin, rennin

fehérjebontók

Enzimek elnevezése

katalógusszám

koszubsztrát

E.C.1.1.1.49. D-glucose-6P: NADP 1-oxydoreductase

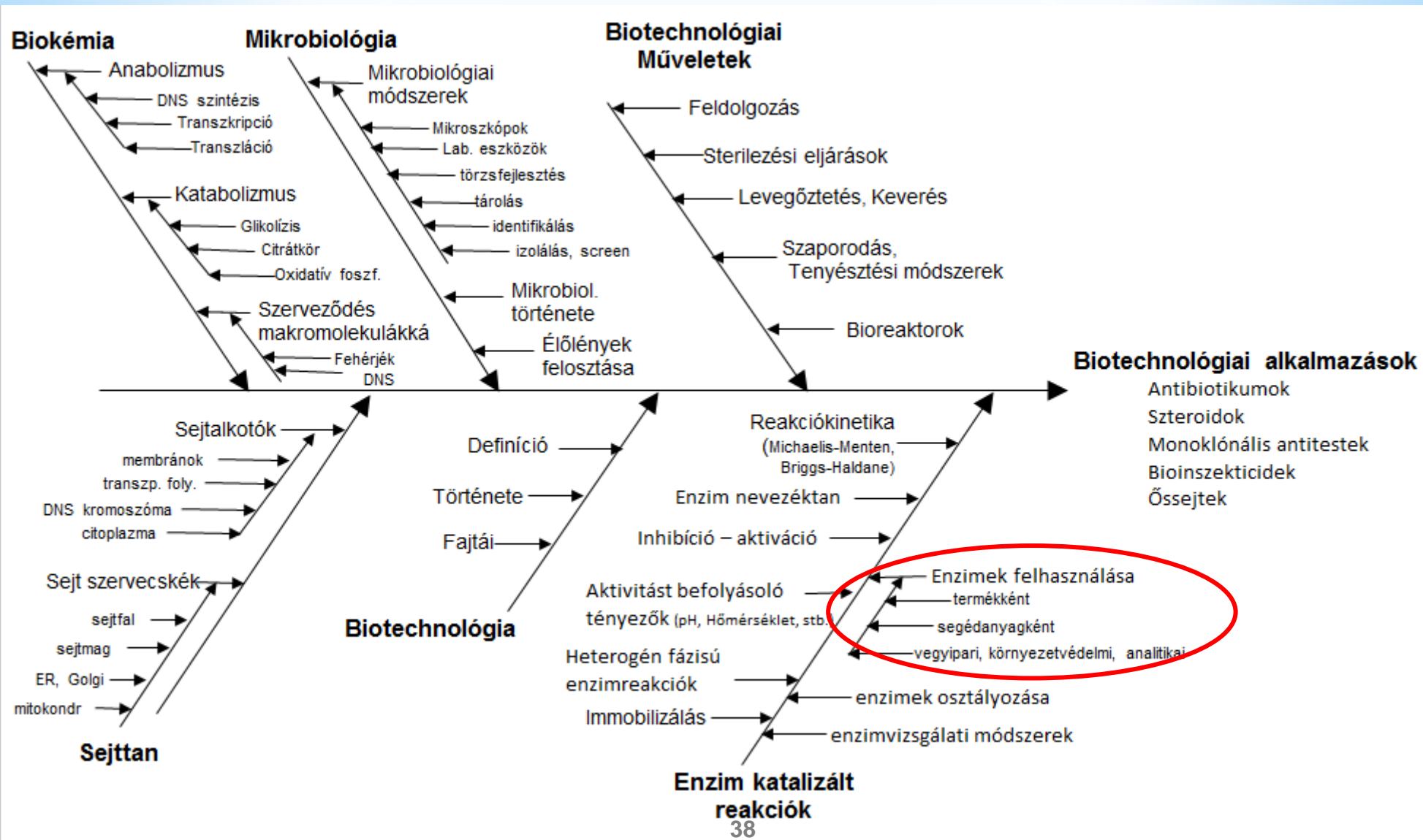
szubsztrát

a támadás helye az
1 C-atomon van

a reakció mibenléte

A glükóoxidáz szisztematikus neve

Itt járunk:



Enzimek mint termékek

Felhasználási terület	Enzim
Mosószerek	proteázok, lipázok, cellulázok
Takarmányok	β -glükánáz, celluláz, fitáz, xylanáz, lipáz
Orvosi alkalmazások/gyógyszerek	proteázok, lipázok, amilázok, penicillin-aciláz, L-aszparagináz, hyaluronidáz, lizozim, kollagenáz, sztreptokináz
Analitika és diagnosztika	urát oxidáz, L-aminosav oxidáz, β -laktamázok

Enzimek mint segédanyagok

Felhasználási terület	Enzim
Textilipar	amilázok, hemicelluláz, pektinázok
Bőripar	proteázok
Papíripar	hemicelluláz, amilázok, lakkáz
Cukoripar, keményítőipar	α -galaktozidáz, (izo)amilázok, amiloglukozidáz, glukóz izomeráz, ciklodextrin-glikozil-transzferáz, xilanáz.

Az élelmiszeripar enzimei

Felhasználási terület	Enzim
Tejipar	proteázok, β -galaktozidáz, lizozim, lipázok, észterázok, papain, rennin, glukóoxidáz, kataláz.
Söripar	amilázok, tannáz, β -glukanáz, proteáz, xilanáz
Borászat, gyümöcsléipar	pektinázok, naringináz, celluláz, amiláz
Húsipar, halfeldolgozás	proteázok, papain, glukóoxidáz
Zsír- és olajipar	foszfolipáz, észtrázok
Kávé, tea, kakaó	pektináz, proteáz, glukanáz, tannáz

Néhány, terápiás célra alkalmazott enzim és enzimkészítmény

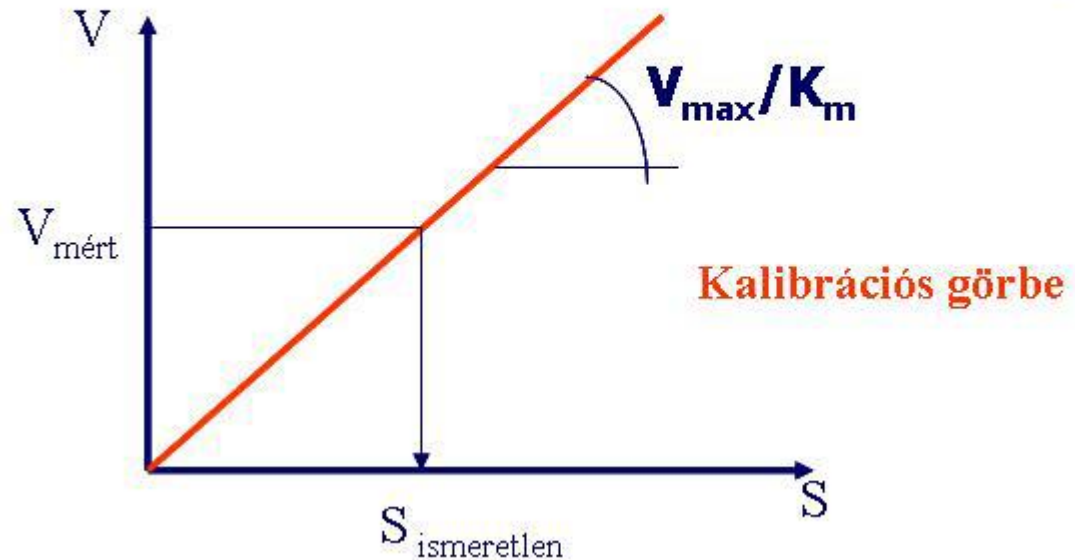
Enzim	Enzimforrás	Gyógyszernév	Mi ellen? Mire?
urokináz	humán vizelet vagy humán vese- sejttenyészet	Abbokinase, Actosolv, Alphakinase, Rheothromb	vérrögoldás (akut szívizom- infarktus, akut tüdőembólia, stroke)
szöveti plazminogén aktivátor	rekombináns CHO sejttenyészet	Activase, Actilyse	vérrögoldás (akut szívizom- infarktus, akut tüdőembólia, stroke)
VIII véralvadás faktor	rekombináns CHO sejtek	Recombinate, Bioclata	hemofilia A
dezoxi- ribonukleáz	rekombináns CHO sejttenyészet	Pulmozyme	krónikus obstruktív tüdőbaj

Enzimreakciók az analitikában

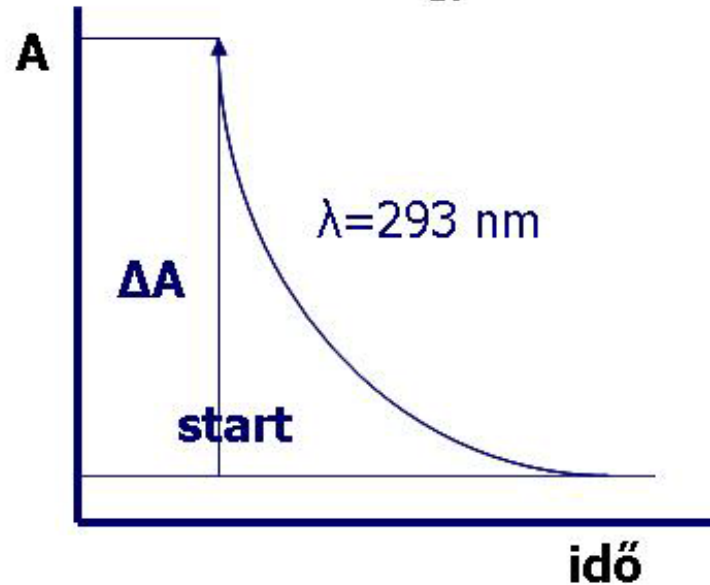
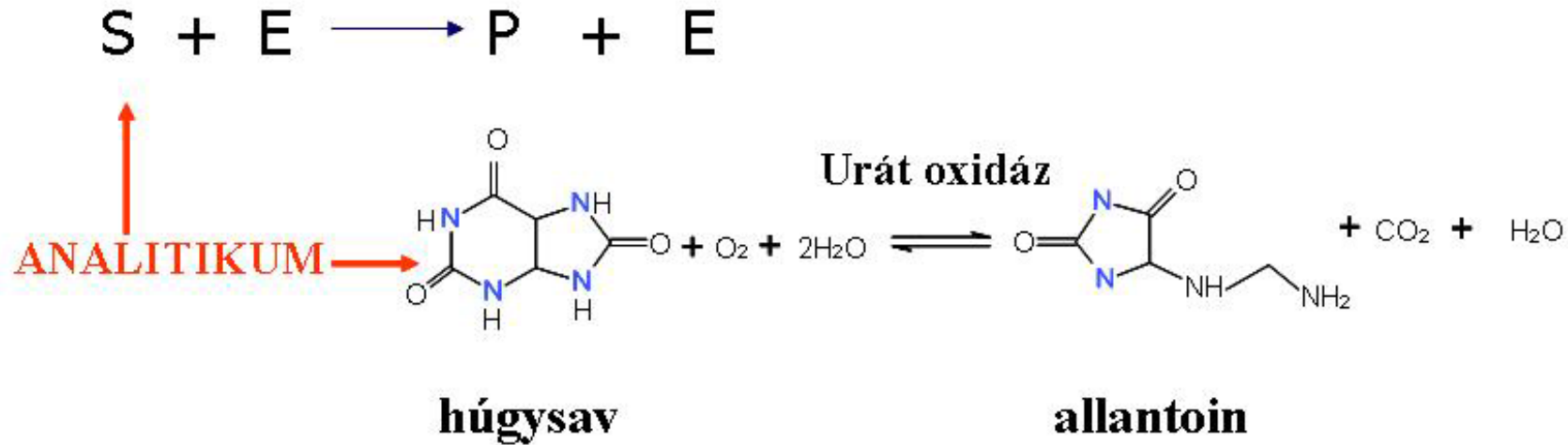
Az elfogyó szubsztrát vagy a keletkező termék valamilyen mérhető változást okoz (például színváltozást, spektrumváltozást, pH-változást stb.)

$$V = V_{\max} \frac{S}{K_m + S} \rightarrow \text{Ha } S \ll K_m \rightarrow V_{\text{mért}} \sim V_{\max}/K_m \cdot S$$

$\begin{cases} \rightarrow -dS/dt \\ \rightarrow dP/dt \end{cases}$

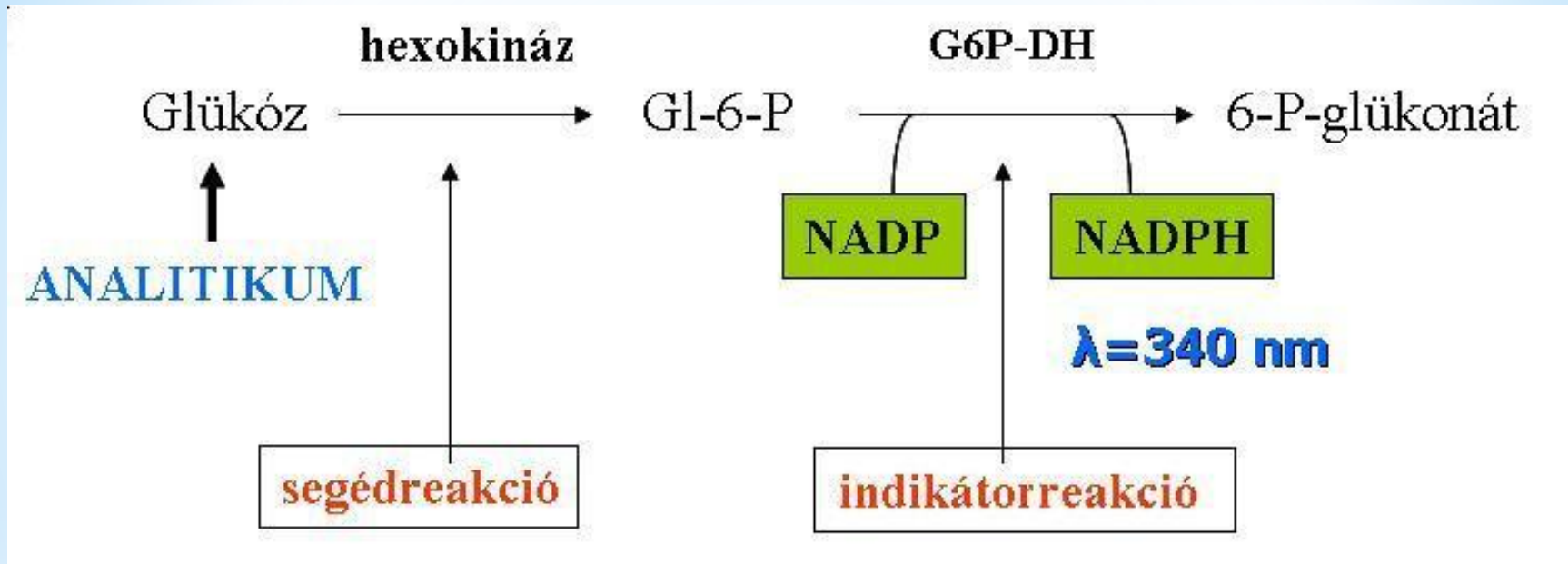


Húgysavmeghatározás enzimreakcióval



A képződő allantoin nem nyel el 293 nm-en, így a mérés során jelentkező abszorbancia-csökkenésből az S, azaz a húgysav koncentrációja kiszámítható.

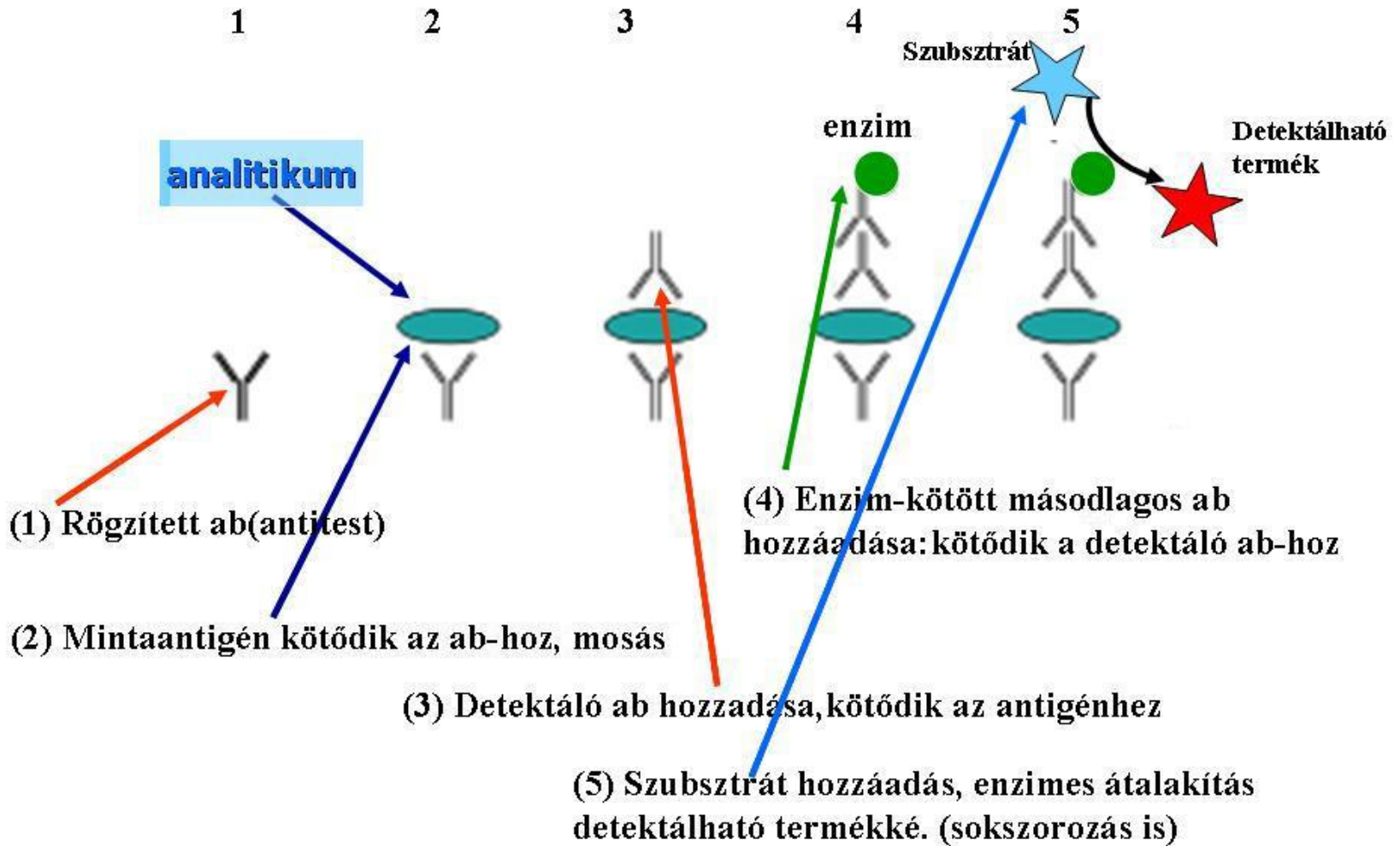
Szubsztrátmeghatározás indikátorreakció segítségével



A glükózzal való reakció nem jár mérhető változással, ezért a képződött G6P-ot egy további reakcióban egy további enzimmal, a foszfoglükonát-dehidrogenázzal 6-P-glükonáttá oxidáljuk. Eközben a NADP koszubsztrát redukálódik NADPH-vá, aminek elnyelési maximuma van 340 nm-en. (Ez a jellemző mérési módszer minden NADH képződéses reakció esetén).

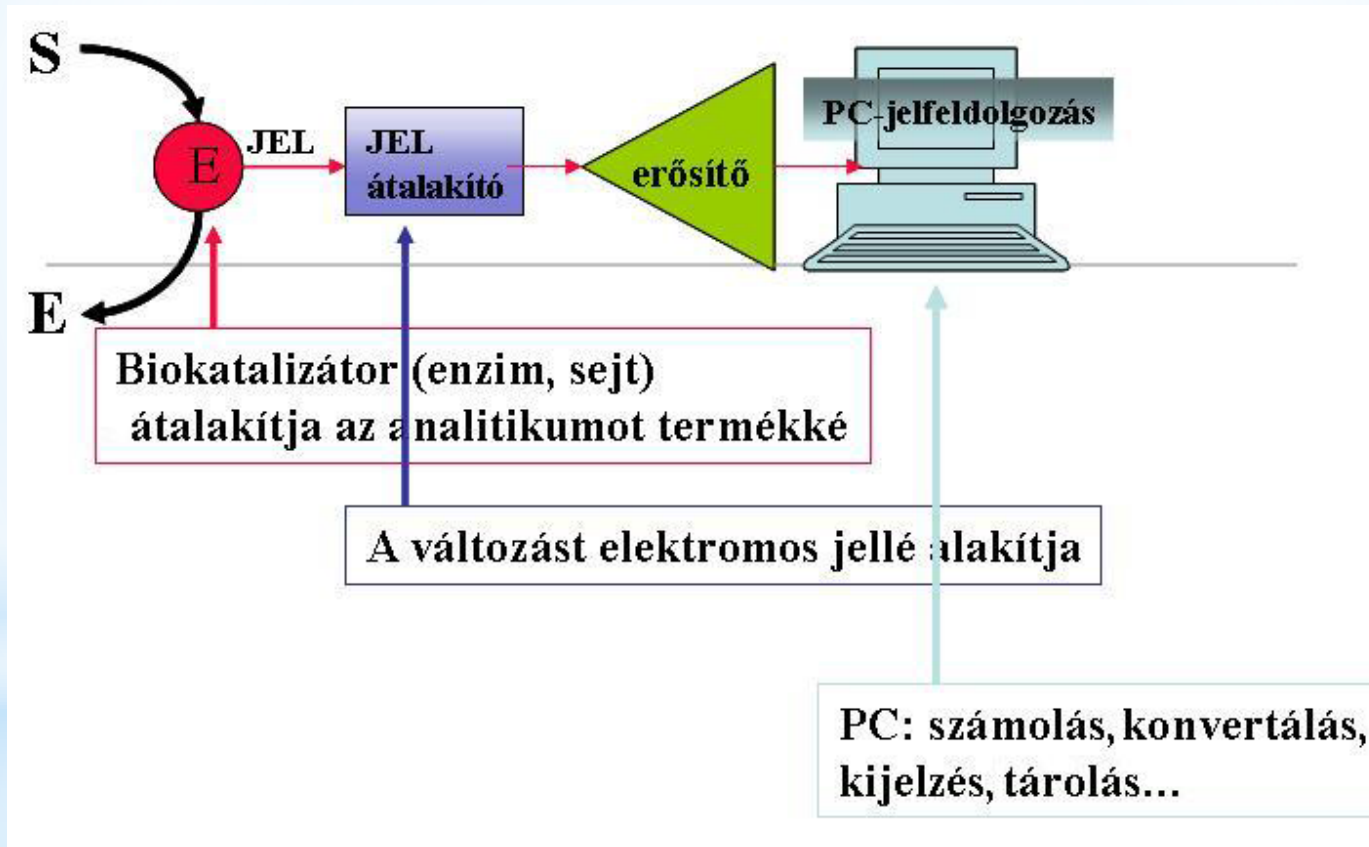
Enzimes indikátorreakció fehérjemeghatározásban

Enzyme Linked Immunosorbent Assay: Sandwich *ELISA*



Enzim elektródok, bioszenzorok

Az enzimelektrodokban, bioszenzorokban rögzített enzimeket vagy teljes sejteket alkalmaznak. Az enzimelektrodok amperometriás vagy potenciometriás elven működnek. A bioszenzorok általános felépítése:



A potenciometriás elektródok felépítése

