

BIOLÓGIA és BIOTECHNOLÓGIA

5. rész

Előadó: Ballagi András, c. egyetemi tanár
Richter Gedeon NyRt. - BME

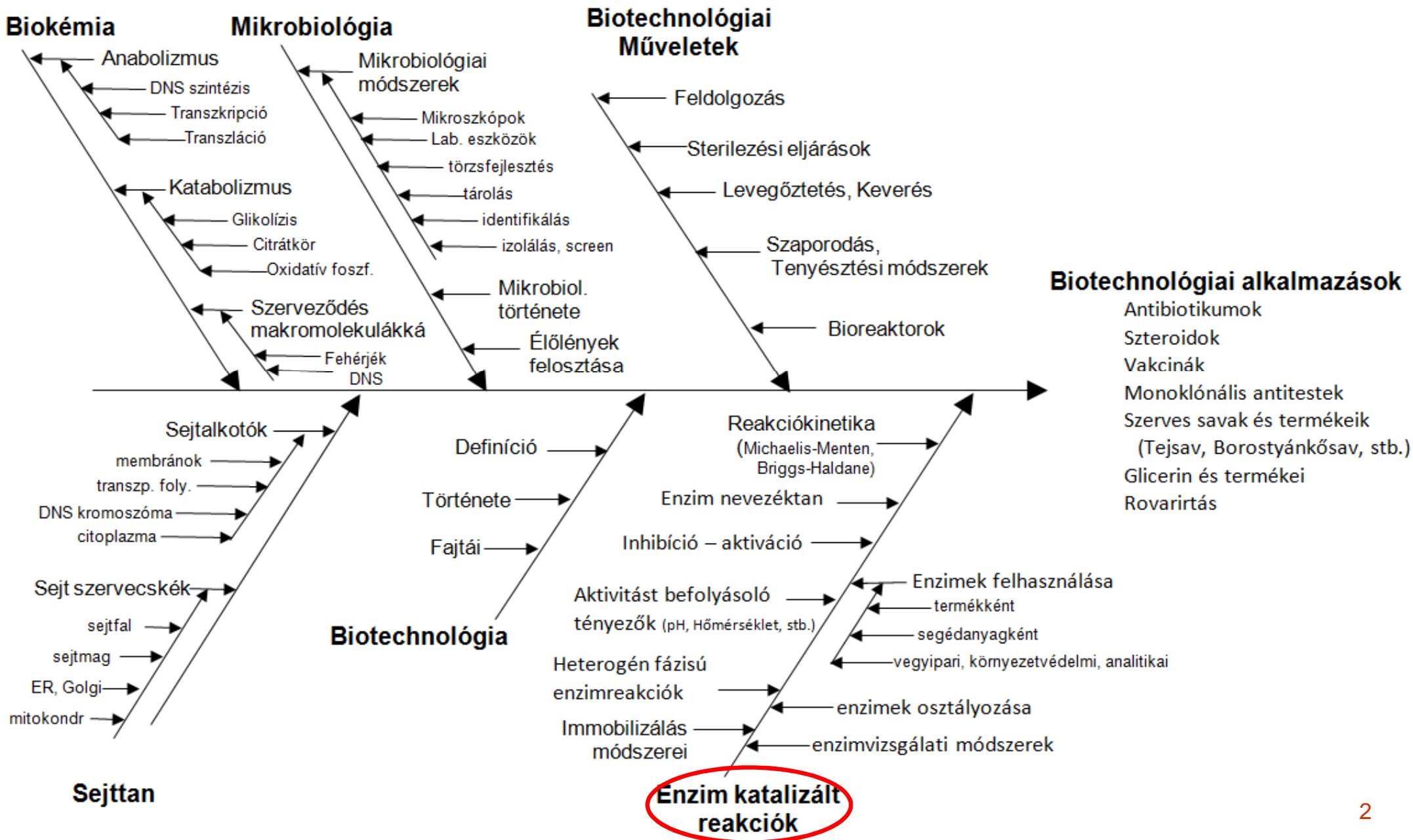
Írásos segédanyag található a:

**<http://oktatas.ch.bme.hu>
**/oktatas /konyvek /mezgaz
/Biol-biotech-vegyszer-MSc****

címen



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, oldószer)

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

Nagyobb reakcióképeség

Enyhébb reakciókörülmények

Nagyobb reakció specificitás

Regulálhatóság



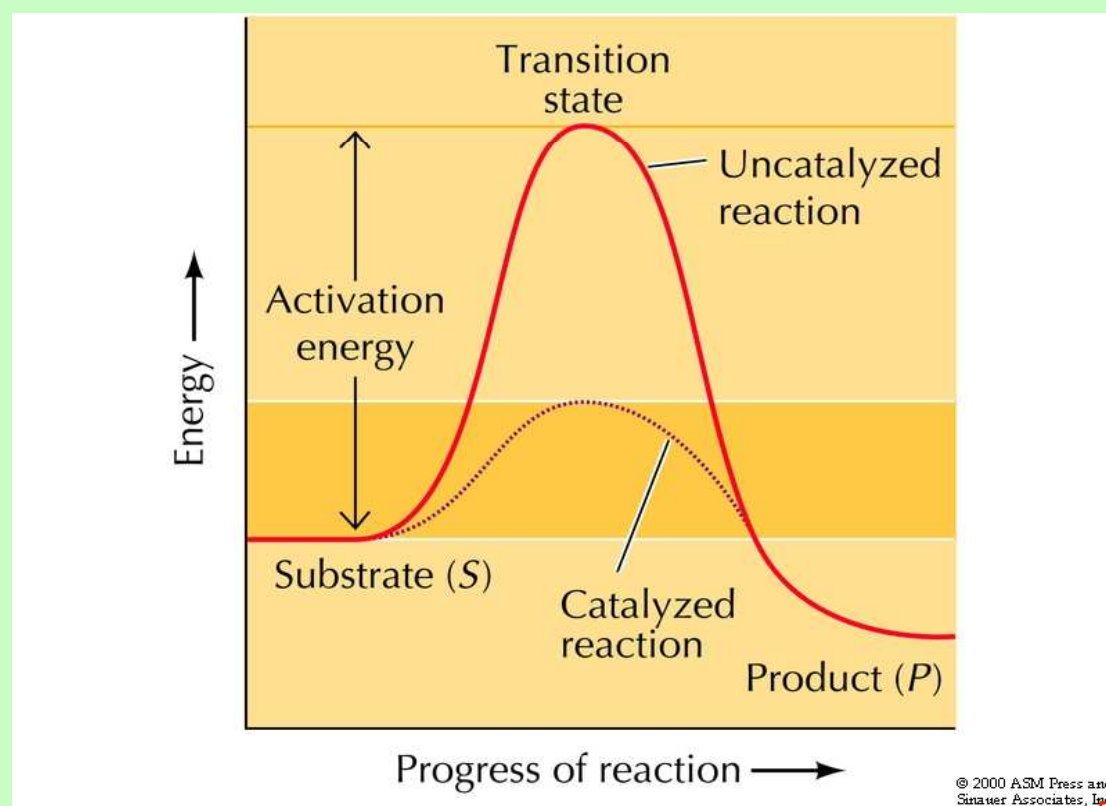
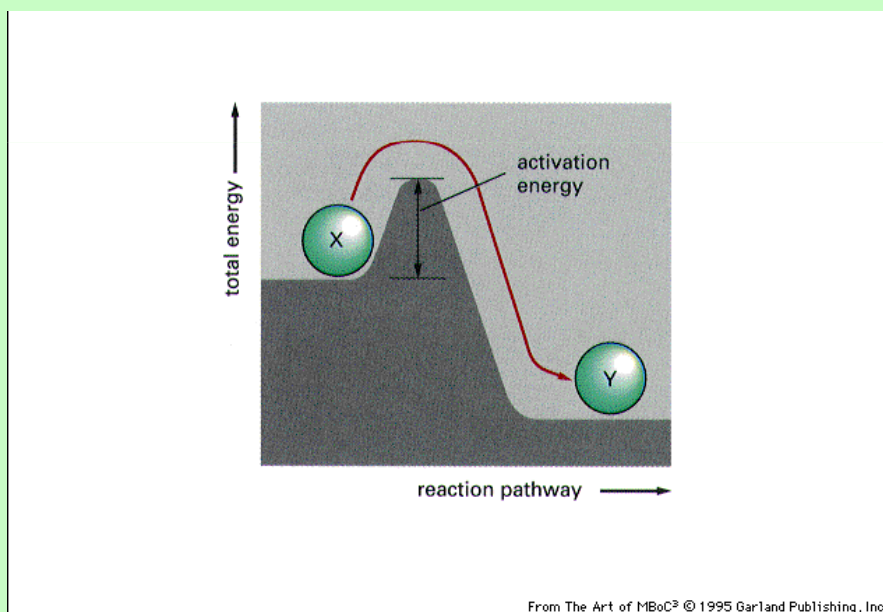
Enzimek tulajdonságai

Az enzimek NEM változtatják meg az egyensúlyi állandót.

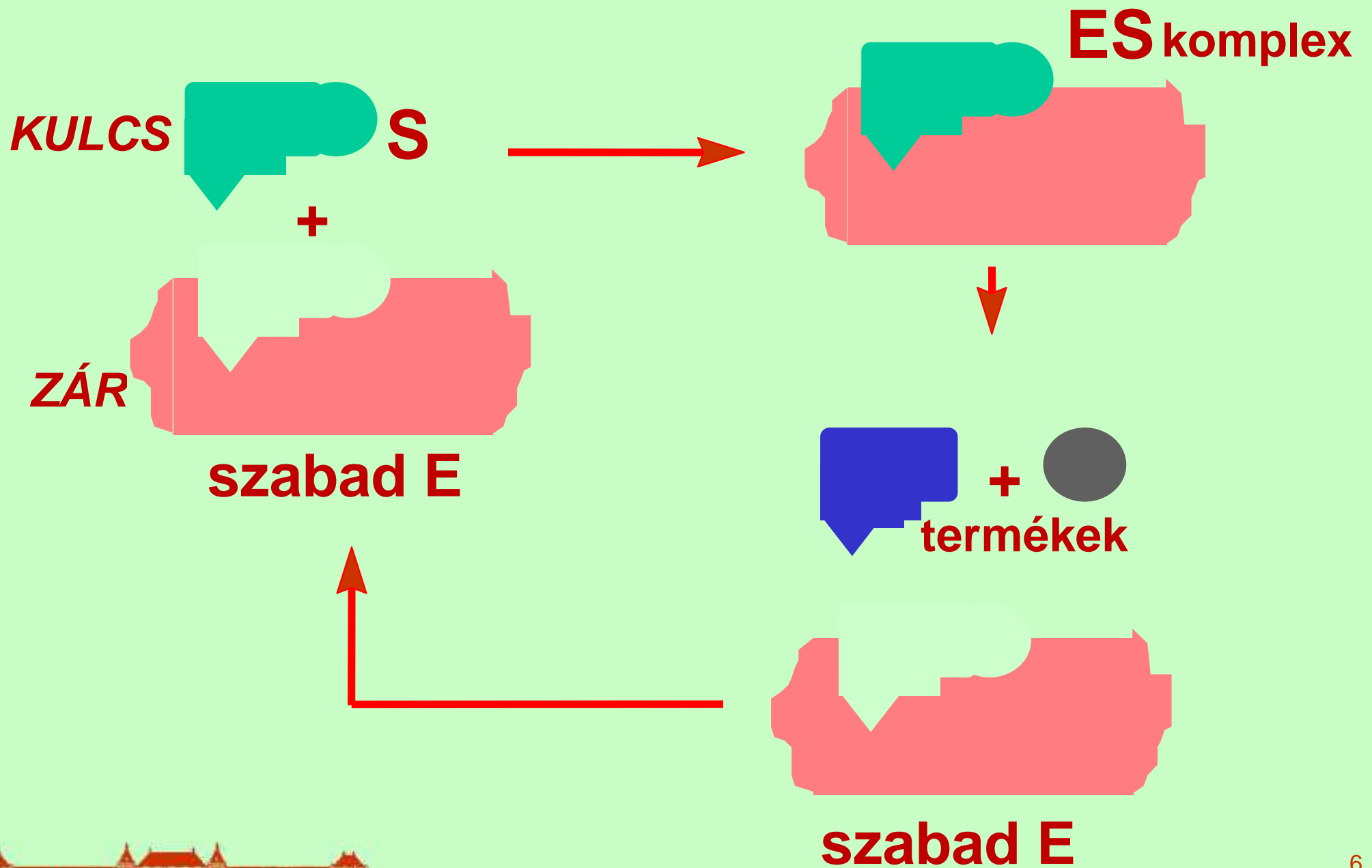
Az enzimek NEM befolyásolják a reakcióban felhasznált vagy felszabaduló energia mennyiségét (G)

Az enzimek csökkentik a reakciók aktivációs energiáját

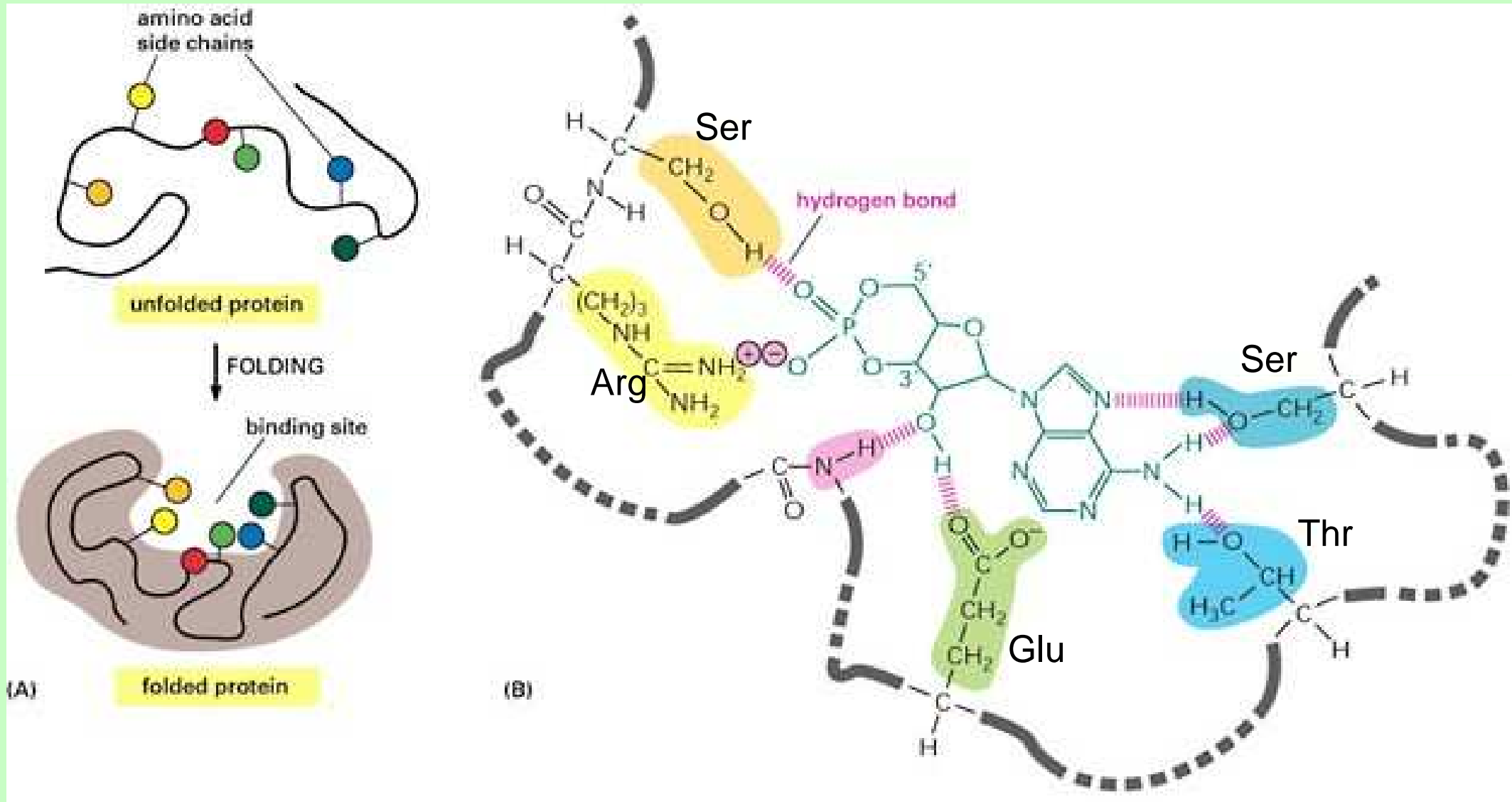
Az enzimek növelik az egyébként is lezajló reakciók sebességét



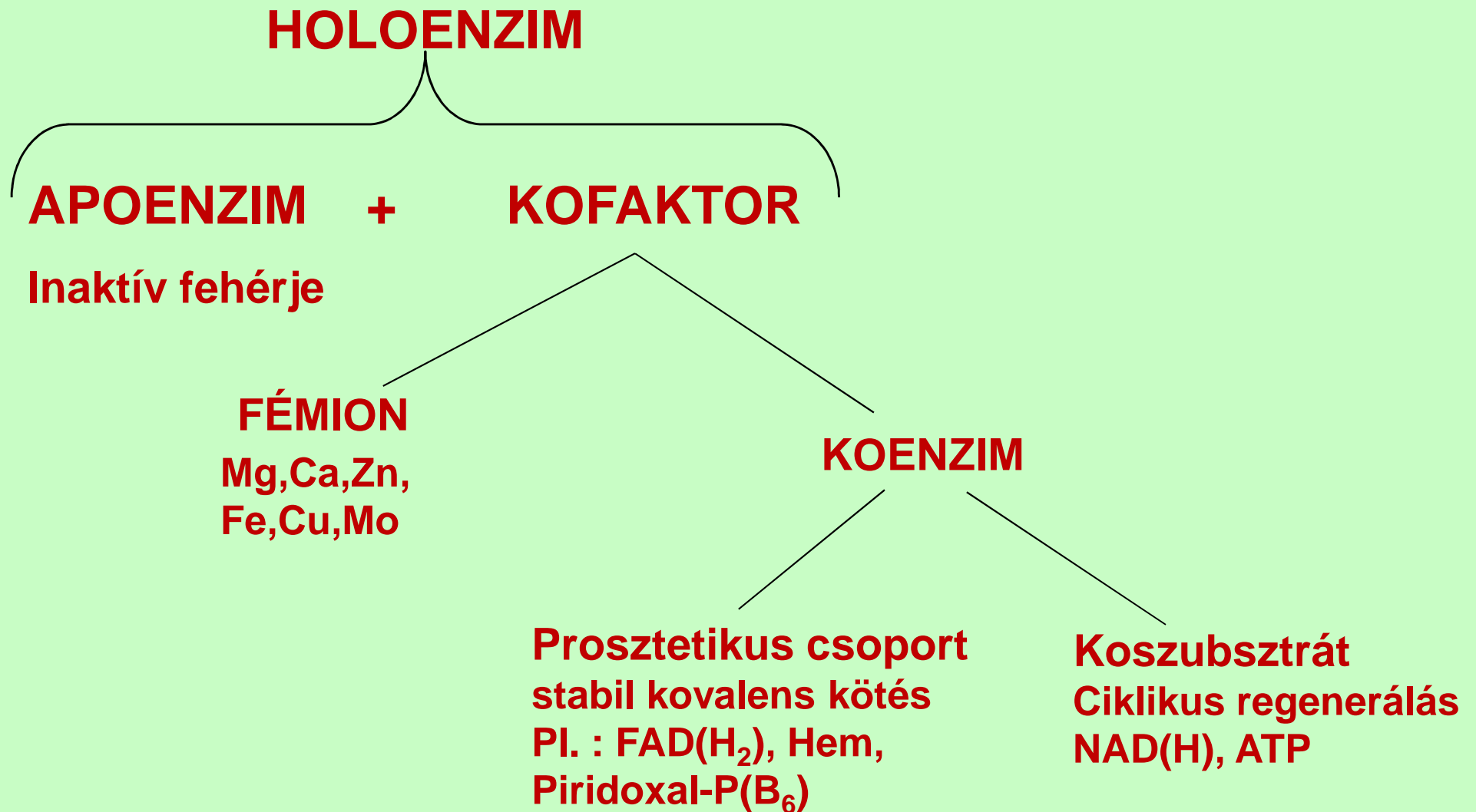
Kulcs – zár hasonlat



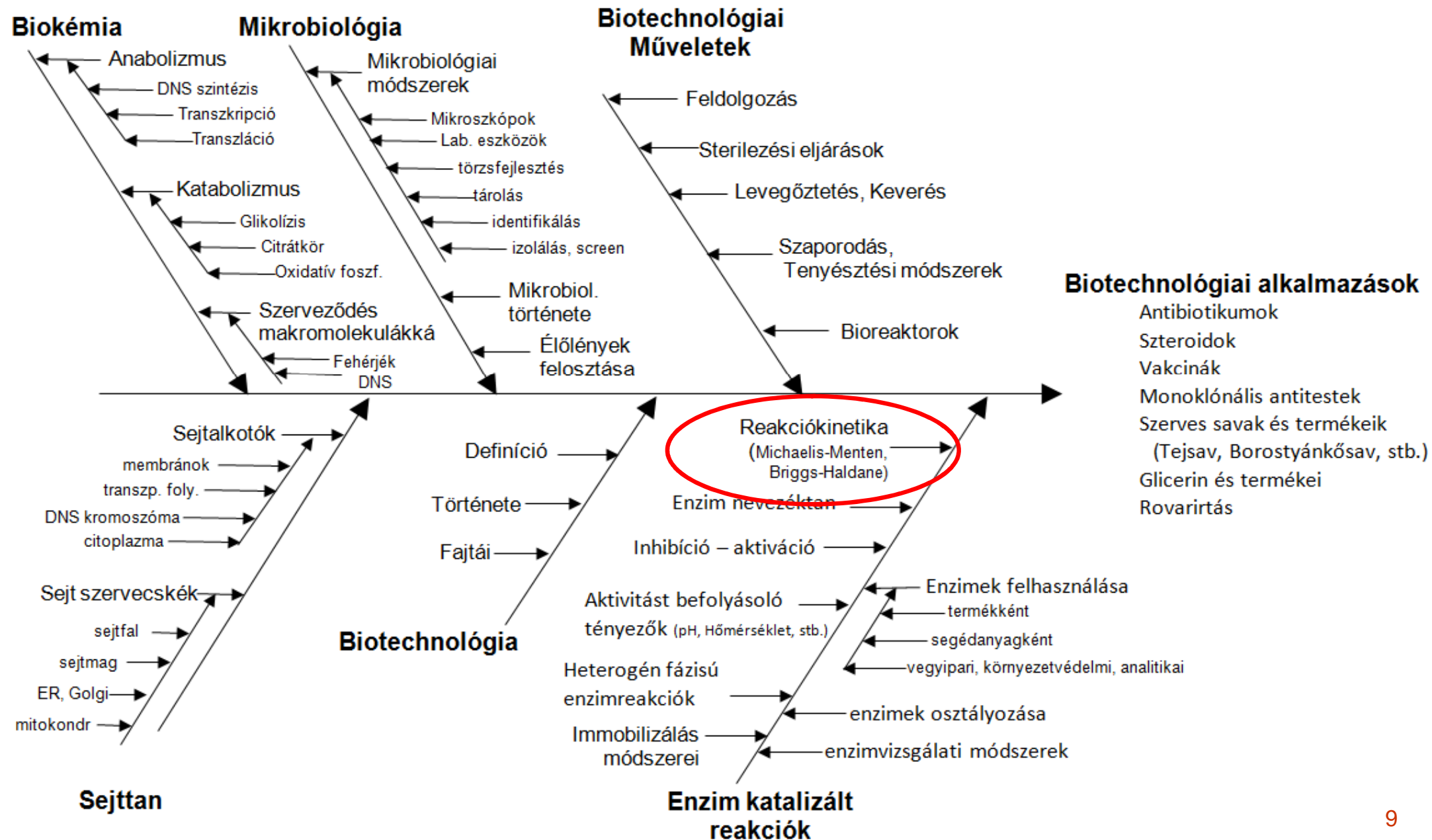
Az aktív centrum kialakulása



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:

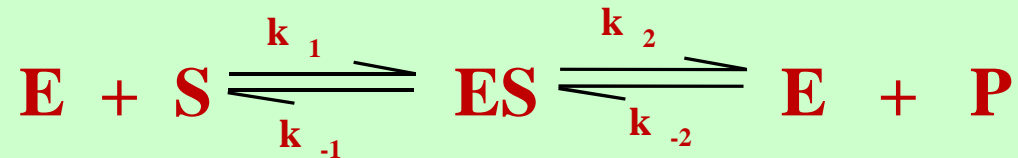
1 μmol szubsztrátot alakít át, (vagy 1 μmol terméket képez)
1 perc alatt *adott reakció körülmények között.*

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

E/t_f , E/mg \longrightarrow fajlagos aktivitások,
ha az enzim molekulásúlya nem ismert



Enzimkinetika: Michaelis – Menten kinetika



feltételezések:

- $k_{-2} = 0$
- első lépés gyorsan egyensúlyra jut = Rapid ekv.
- stabil ES komplex, EP komplex elhanyagolható
- egy aktiv centrum, egy szubsztrát
- aktivitás helyett cc. 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

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

$$E + (ES) = E_o$$

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

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

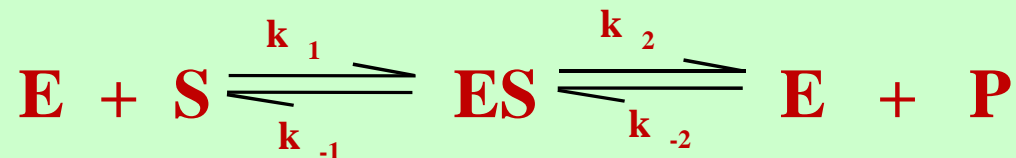
$$\frac{V}{E_o} = \frac{k_2 \frac{S}{K_s} E}{E + \frac{S}{K_s} E}$$

Rendezzük át!

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

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

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





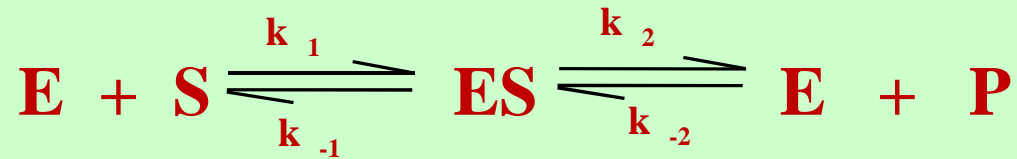
Maud Menten
1879-1960



Leonor Michaelis
1875-1949



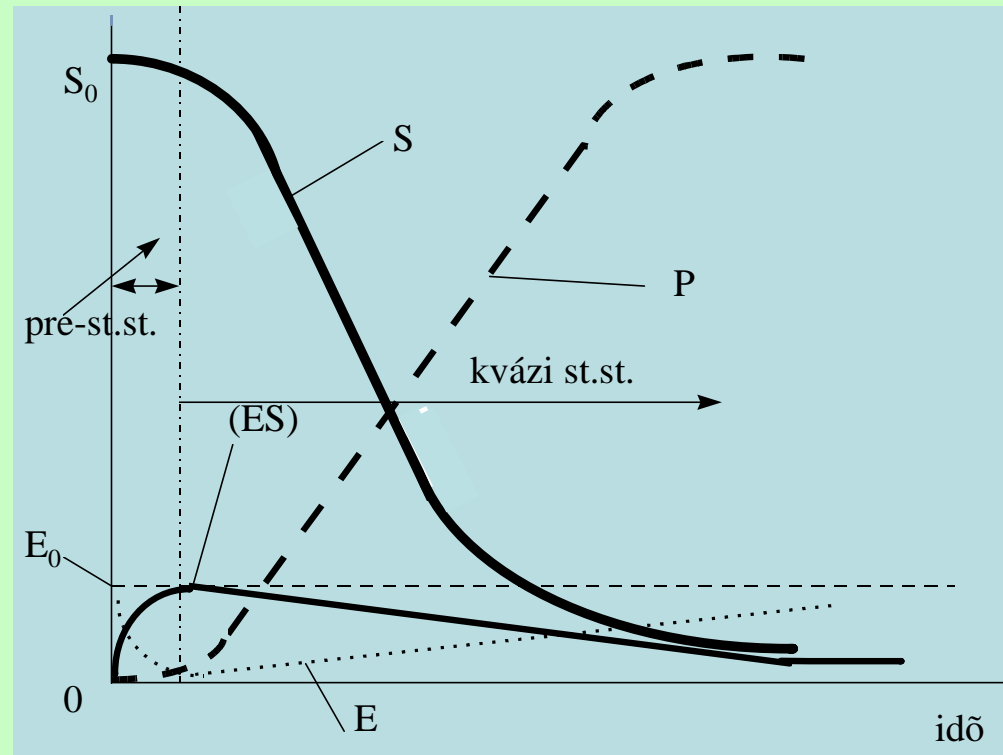
Briggs - Haldane kinetika



$$\frac{dS}{dt} = -k_1ES + k_{-1}(ES)$$

$$\frac{d(ES)}{dt} = k_1ES - k_{-1}(ES) - k_2(ES)$$

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



steady state:

$$d(ES)/dt = 0$$

**$S \gg E_0$ vagy $E_0 / S \ll 1$ és
 $(k_1ES > k_{-1}(ES)$ ill. $k_1ES > k_2(ES))$**



Briggs - Haldane kinetika

$$E + (ES) = E_0$$

$$E = E_0 - (ES)$$

$$\frac{d(ES)}{dt} = k_1 E \cdot S - k_{-1}(ES) - k_2(ES) = 0$$

$$k_1(E_0 - ES)S - k_{-1}(ES) - k_2(ES) = 0$$

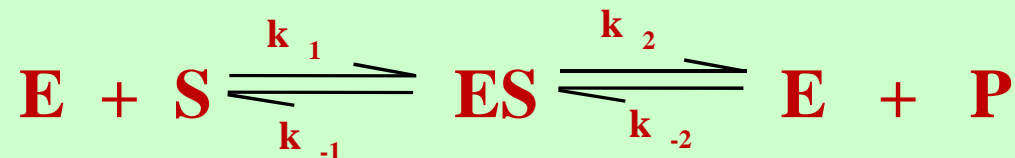
$$k_1 E_0 S = (k_{-1} + k_2)(ES) + k_1(ES)S = 0$$

$$k_2(ES) = \frac{k_2 E_0 S}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + S}$$

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

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Michaelis állandó



Az M-M és B-H kinetika diszkussziója

Michaelis –Menten

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

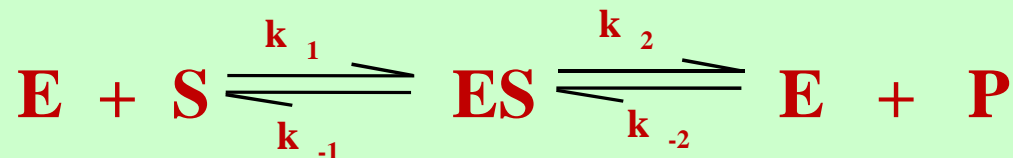
Briggs-Haldane

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

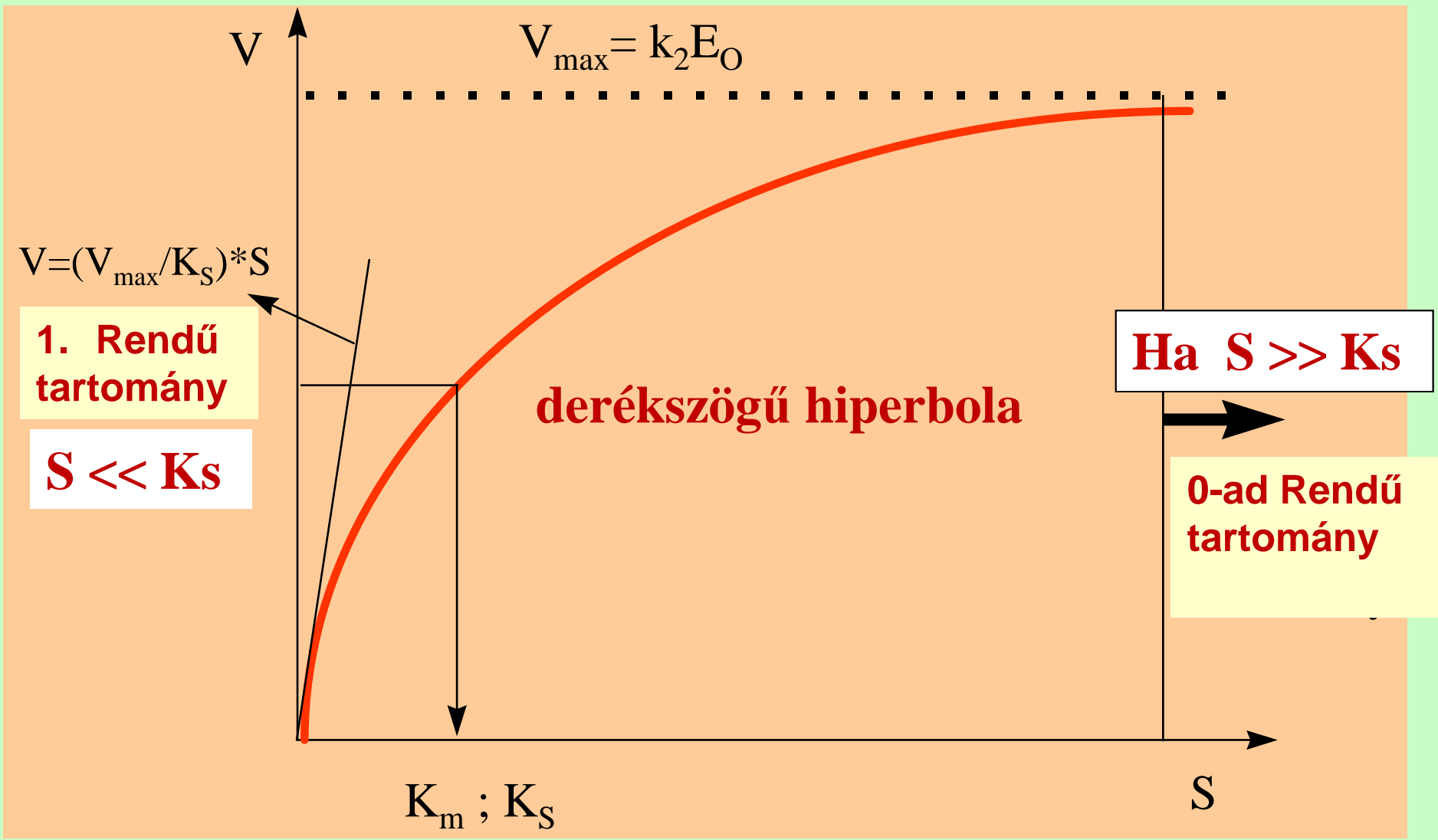
$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = \frac{k_{-1}}{k_1} + \frac{k_2}{k_1} = K_s + \frac{k_2}{k_1}$$

ha $\text{num}(k_1) \gg \text{num}(k_2) \rightarrow$ a két konst. azonos!

$$K_m = K_s$$



Diszkusszió



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

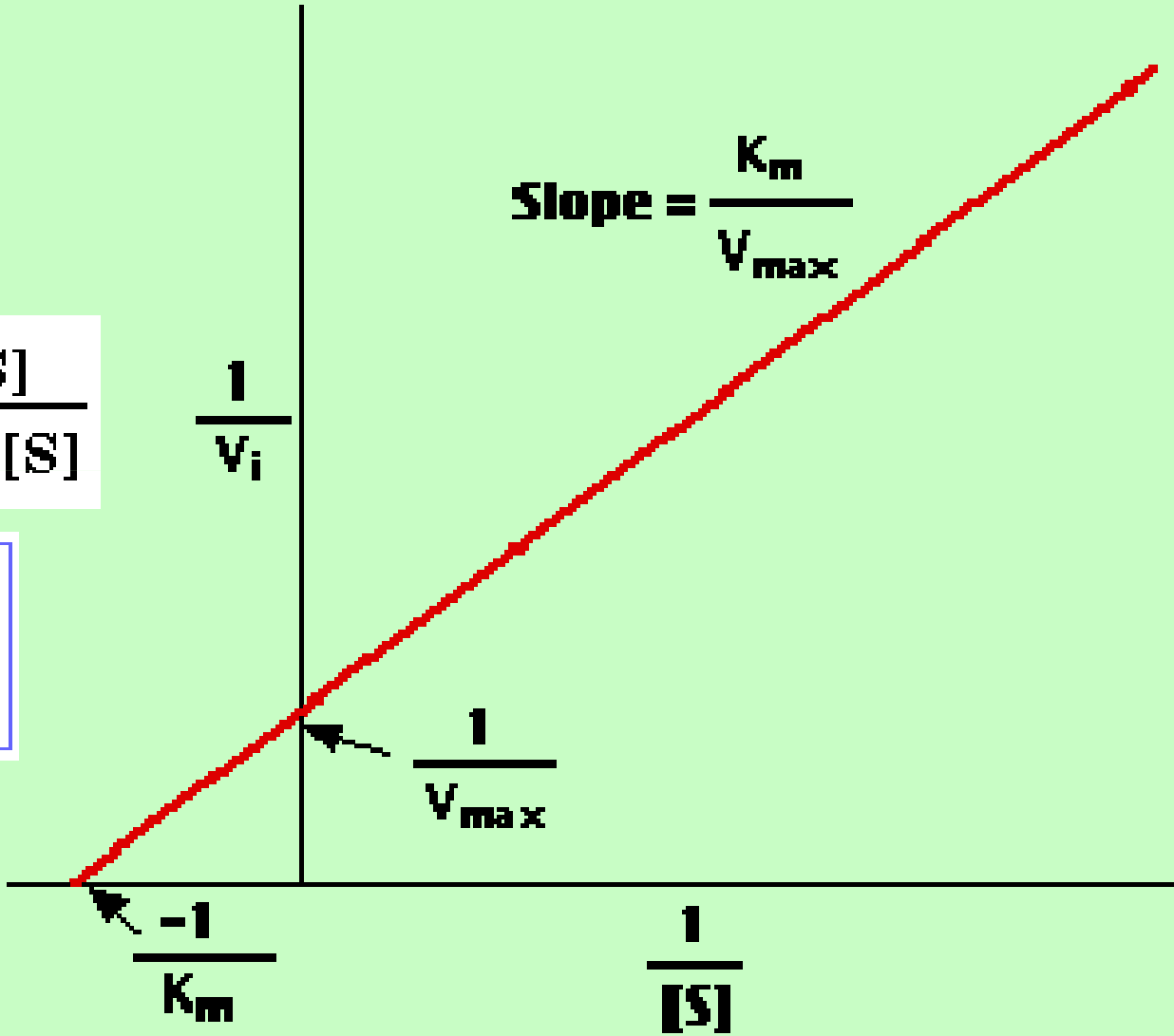


Linewaver – Burk ábrázolás

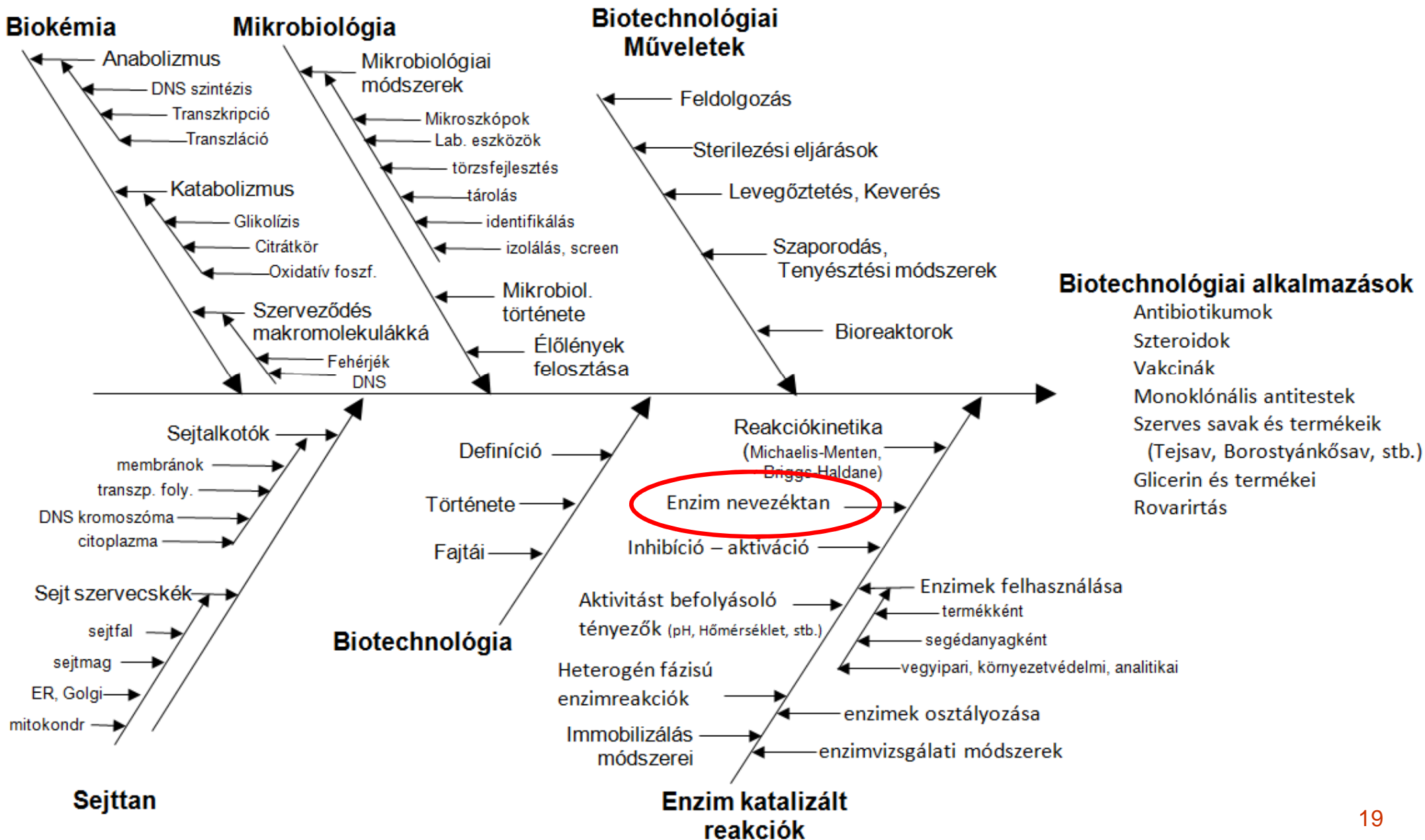
$$v_0 = \frac{v_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

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

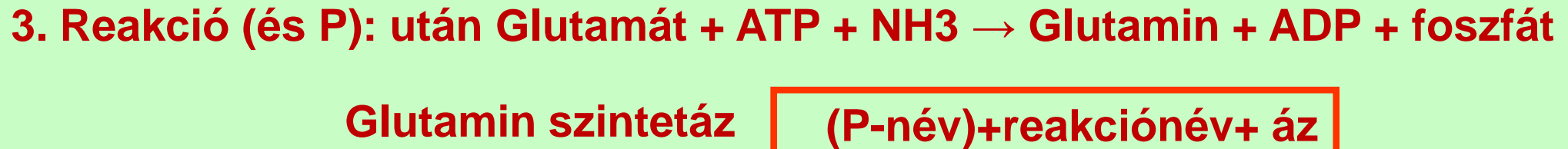
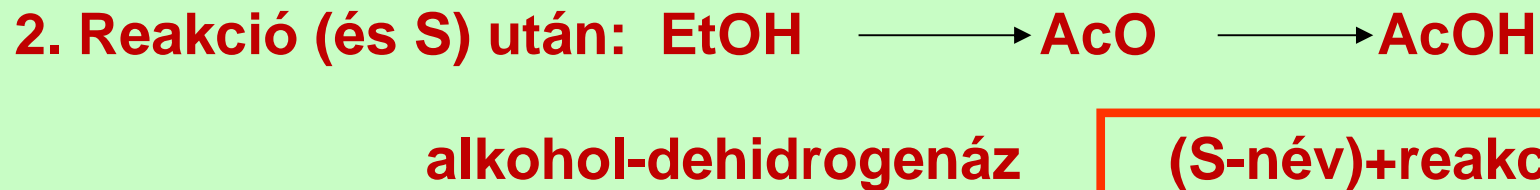
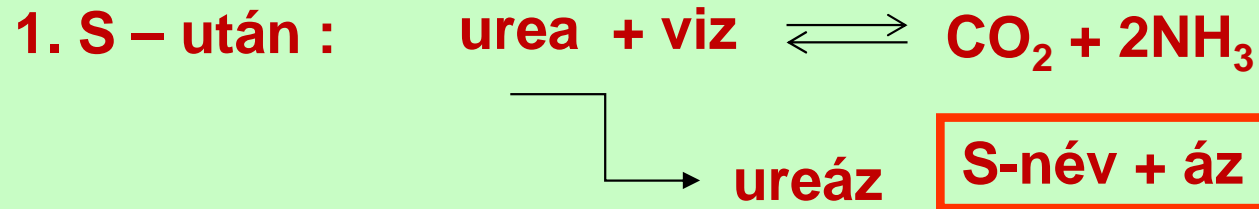
$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{v_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}}$$



Itt járunk:



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

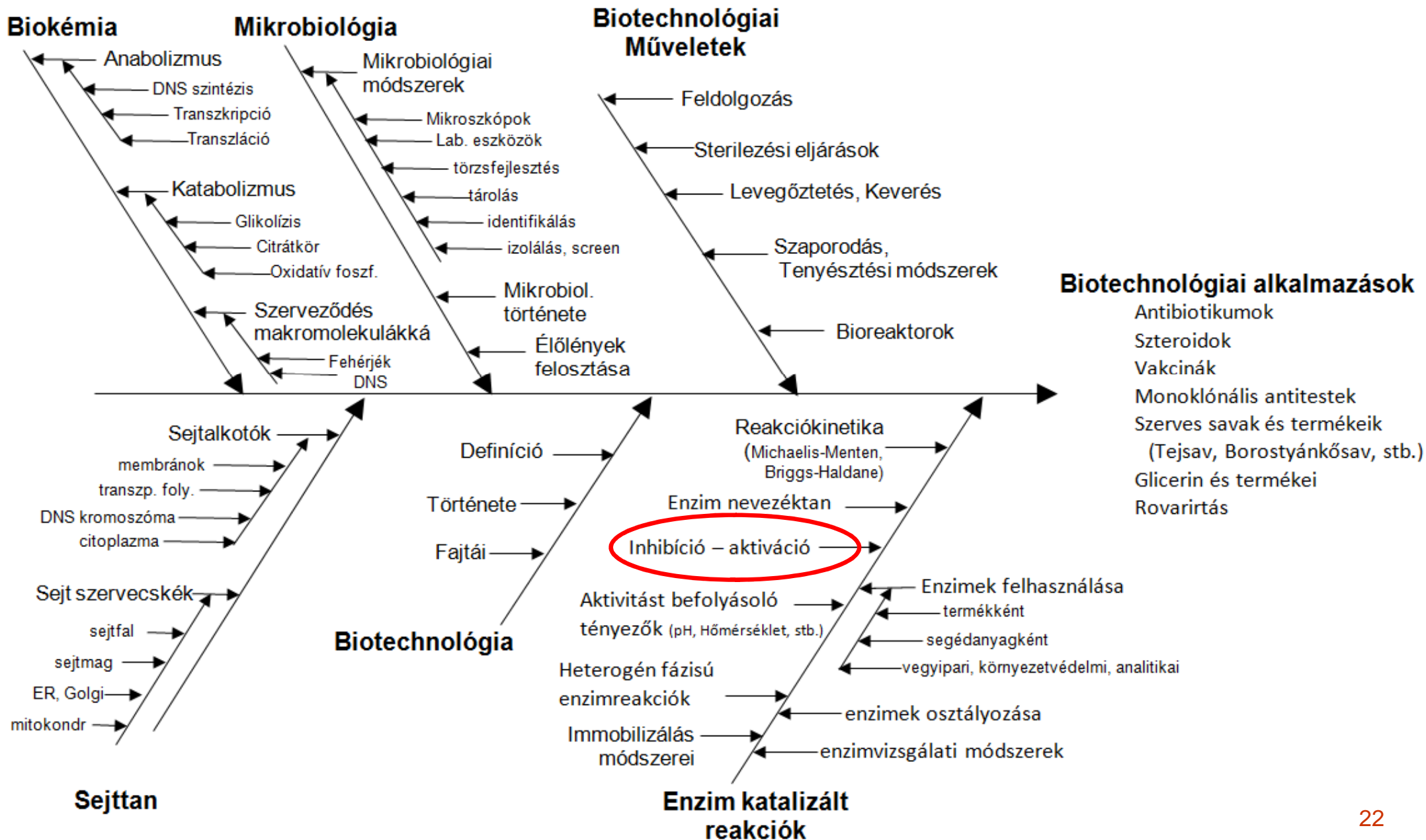
a támadás helye az
1 C-atomon van

a reakció mibenléte

A glükóoxidáz szisztematikus neve

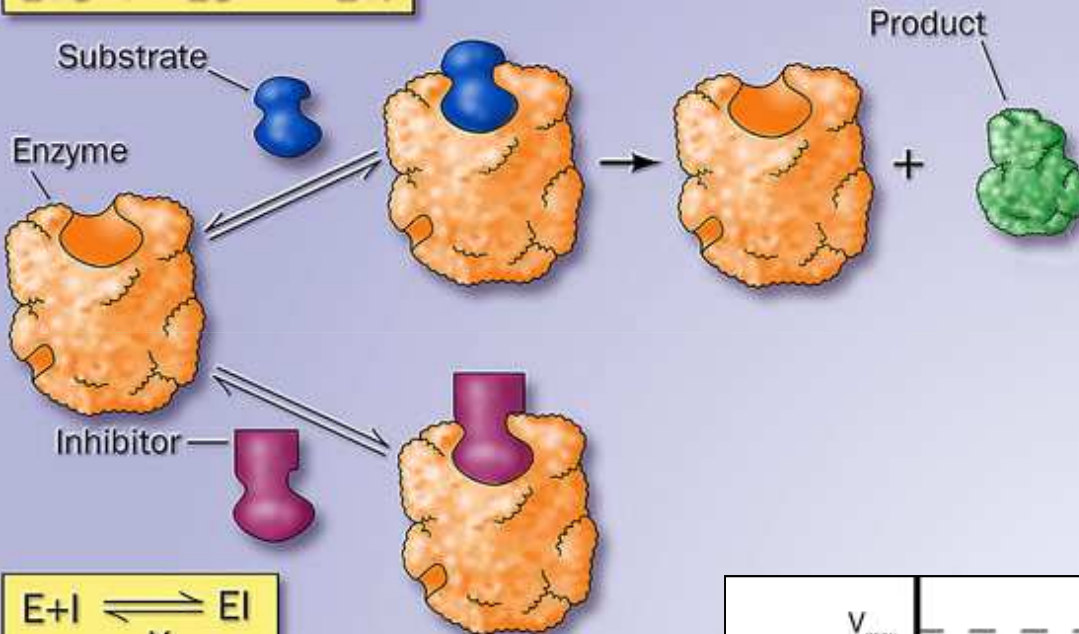
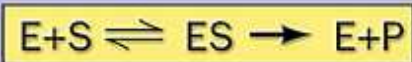


Itt járunk:

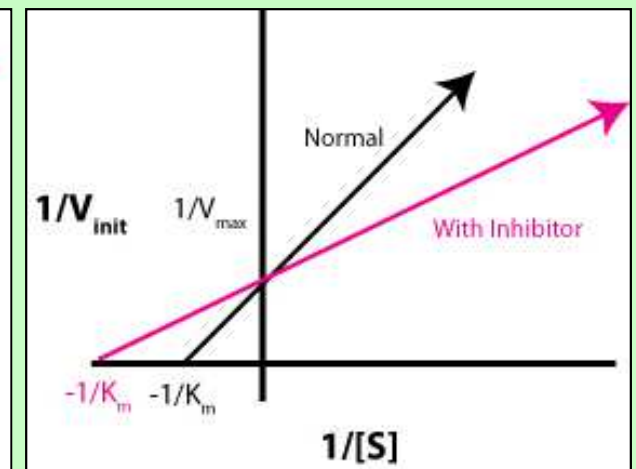
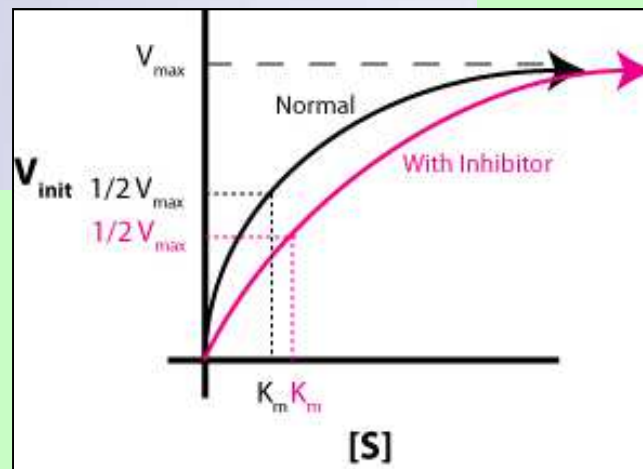


Kompetitív inhibíció

Competitive Inhibition

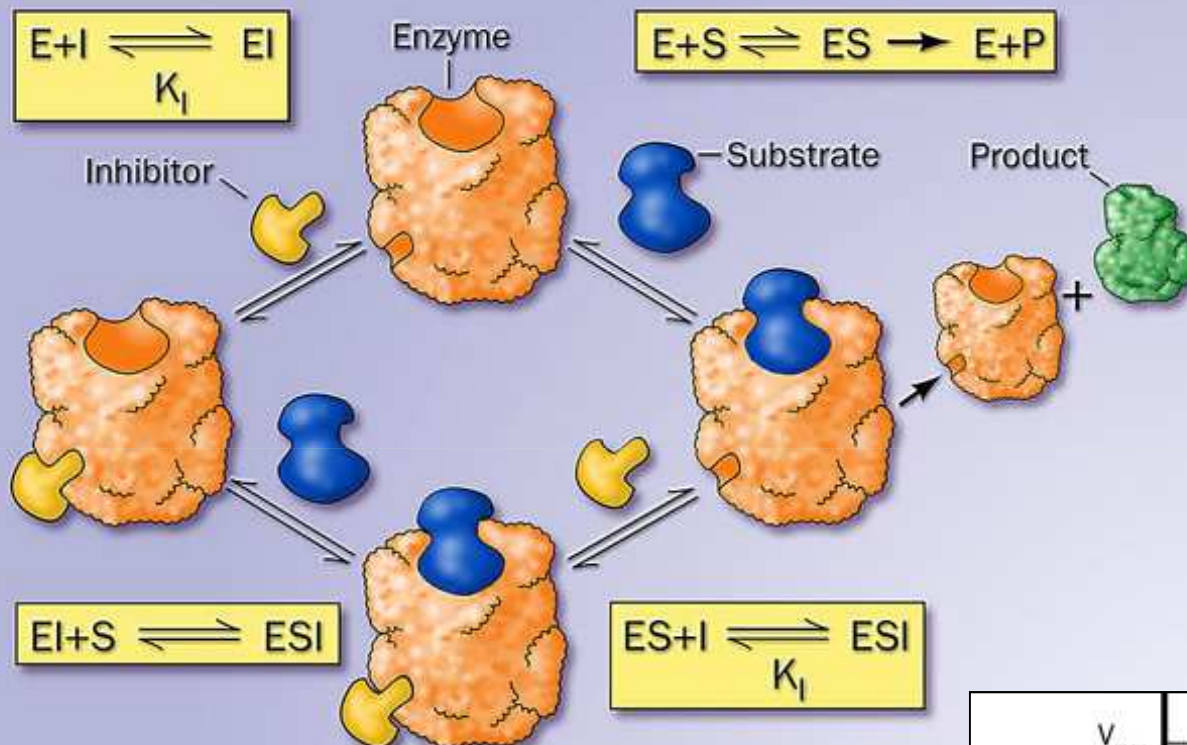


A kompetitív inhibíció egy olyan gátlás amelynél az inhibitor az aktív centrumba kötődik és megakadályozza a szubsztrát bekötődését (és viszont: a szubsztrát az inhibitor bekötődését.) V_{max} változatlan, mert sok szubsztrát legyőzi a kevés inhibitor, de a K_m nő, mert a szubsztrát enzimhez való kötődése csökken

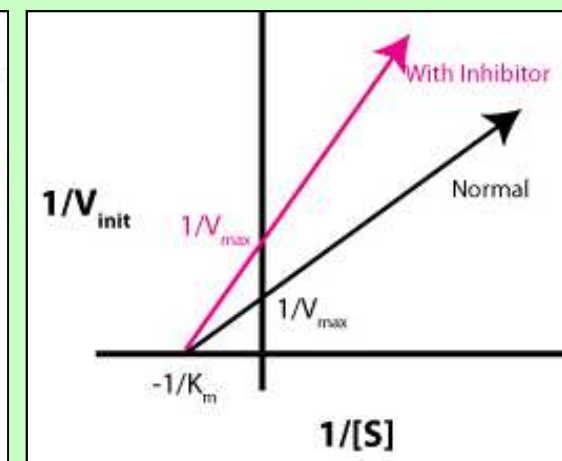
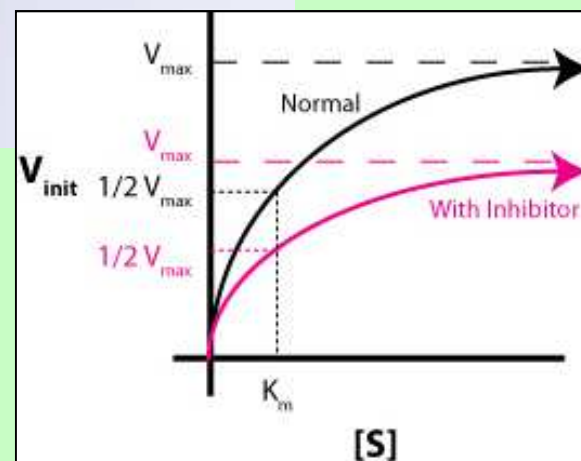


Nem-kompetitív inhibíció

Noncompetitive Inhibition

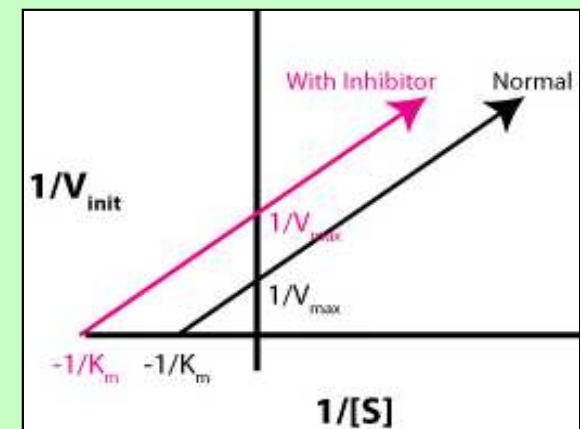
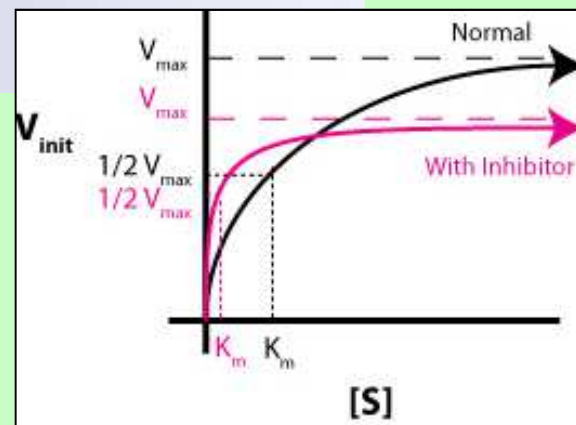
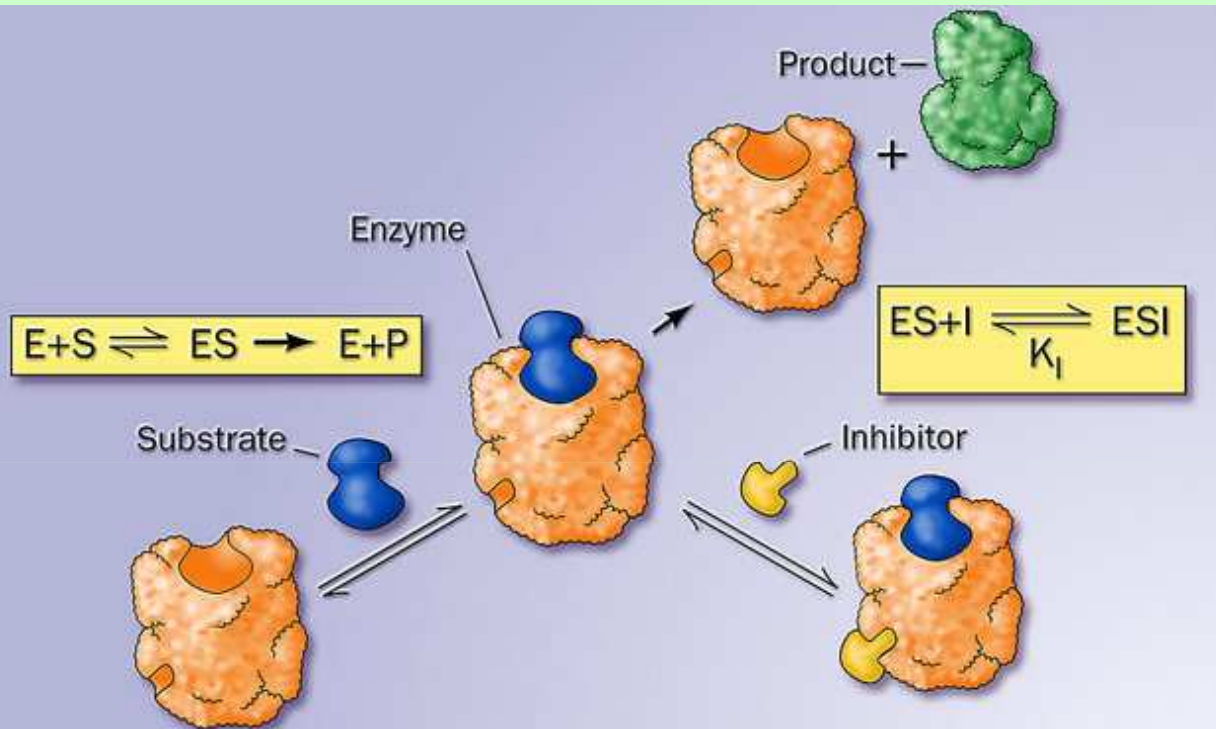


Nem-kompetitív inhibíció akkor lép fel, ha az inhibitor ugyanolyan jól kapcsolódik az enzimhez, mint az enzim-szubsztrát komplexhez és megakadályozza a termékképződést. Ezáltal csökkenti az enzimaktivitást, de a szubsztráthoz való affinitást nem, mert a szubsztrát zavartalanul be tud kötődni

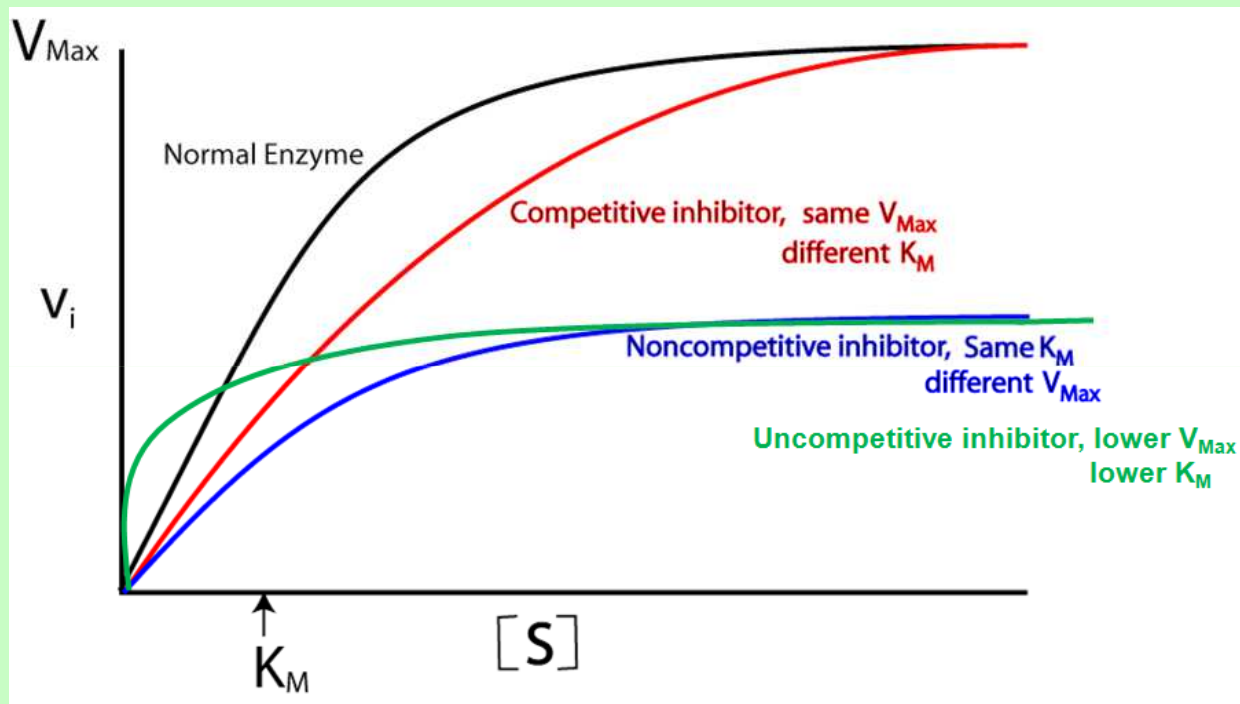


Unkompetitív inhibíció

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.



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

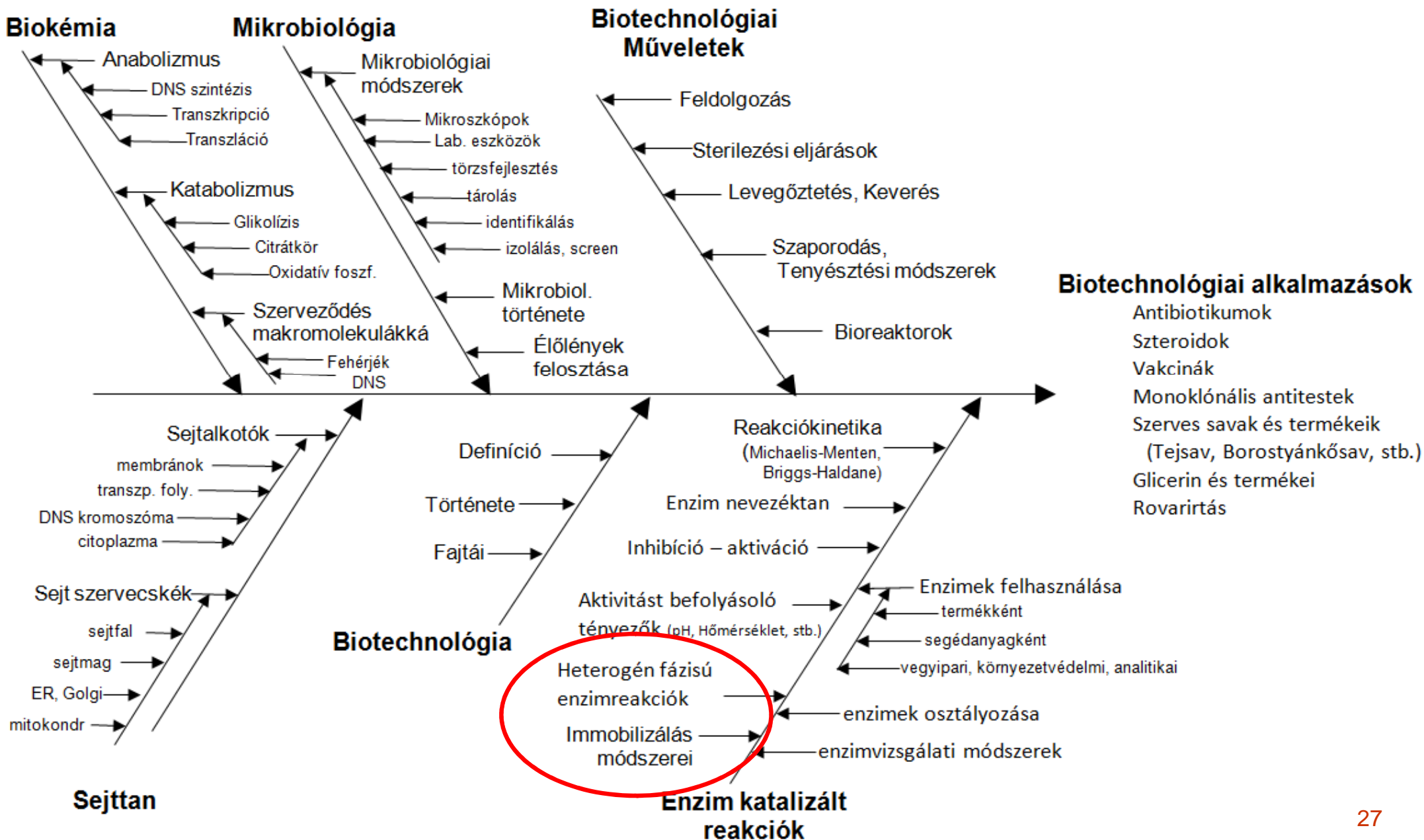
$$V = V_{max} \frac{S}{K_s \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) + S \left(1 + \frac{I}{K_i} \right)}$$

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

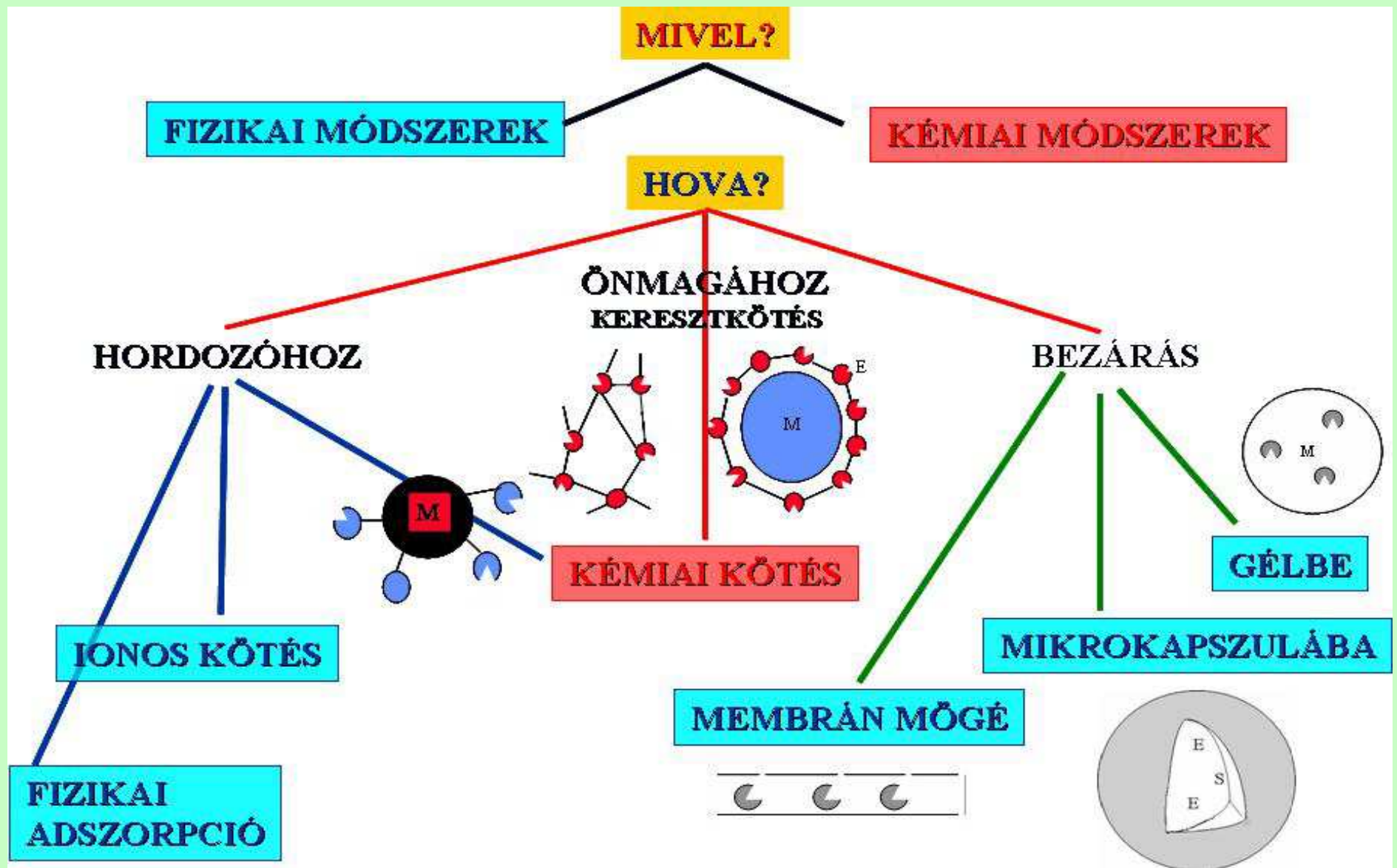
Nelson és Griffin 1916 ban véletlenül fedezte fel, hogy élesztő invertáza aktívszáron adszorbeálódott de megőrizte az aktivitását a szaharóz hidrolízisében.

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.

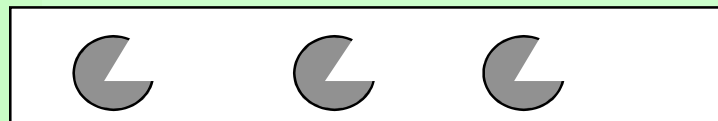
Az első ipari alkalmazás Chibata nevéhez fűződik 1969-ben, aki aminoacilázt rögzített DEAE Sephadex-re ionosan és ezt N-acyl-D, L-aminosav rezolválására használták.



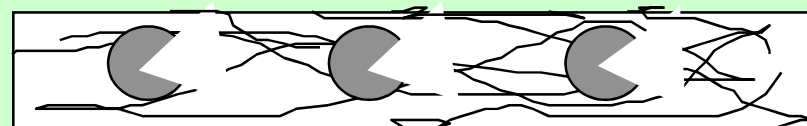
Enzim Immobilizáció



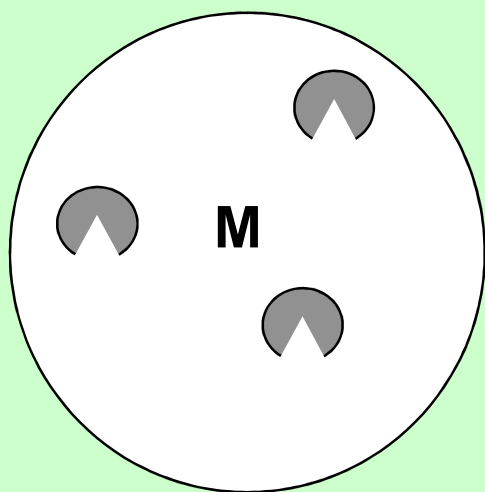
Az enzimrögztés fizikai módszerei



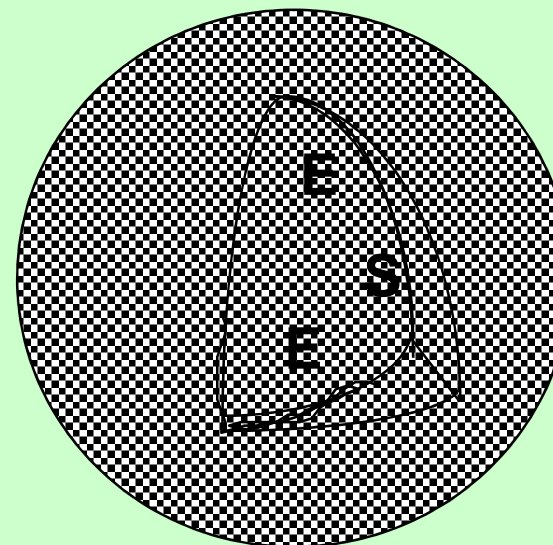
Enzim rögzítés üreges szálban
(Hollow fibre)



Enzim rögzítés fonott szálak anyagban



Enzimbezárás oldhatatlan
gél mátrixban

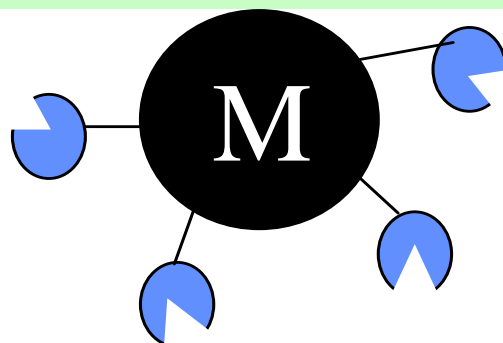


Mikrokapszulázás

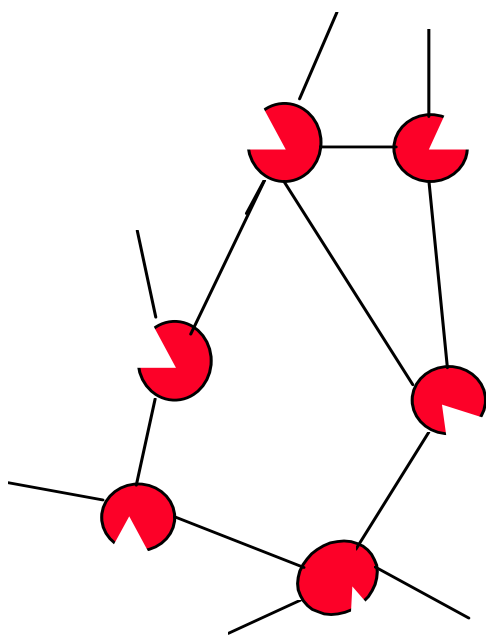


Az enzimrögztés kémiai módszerei

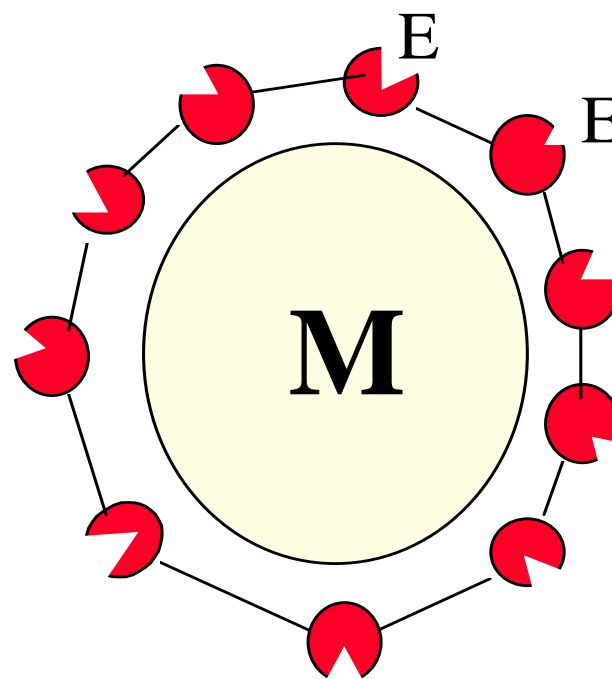
Enzimkötés
hordozóhoz
kovalens kötéssel



M=mátrix



Keresztkötés



Enzim keresztkötés
multifunkciós reagenssel



Az enzimrögzítés 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

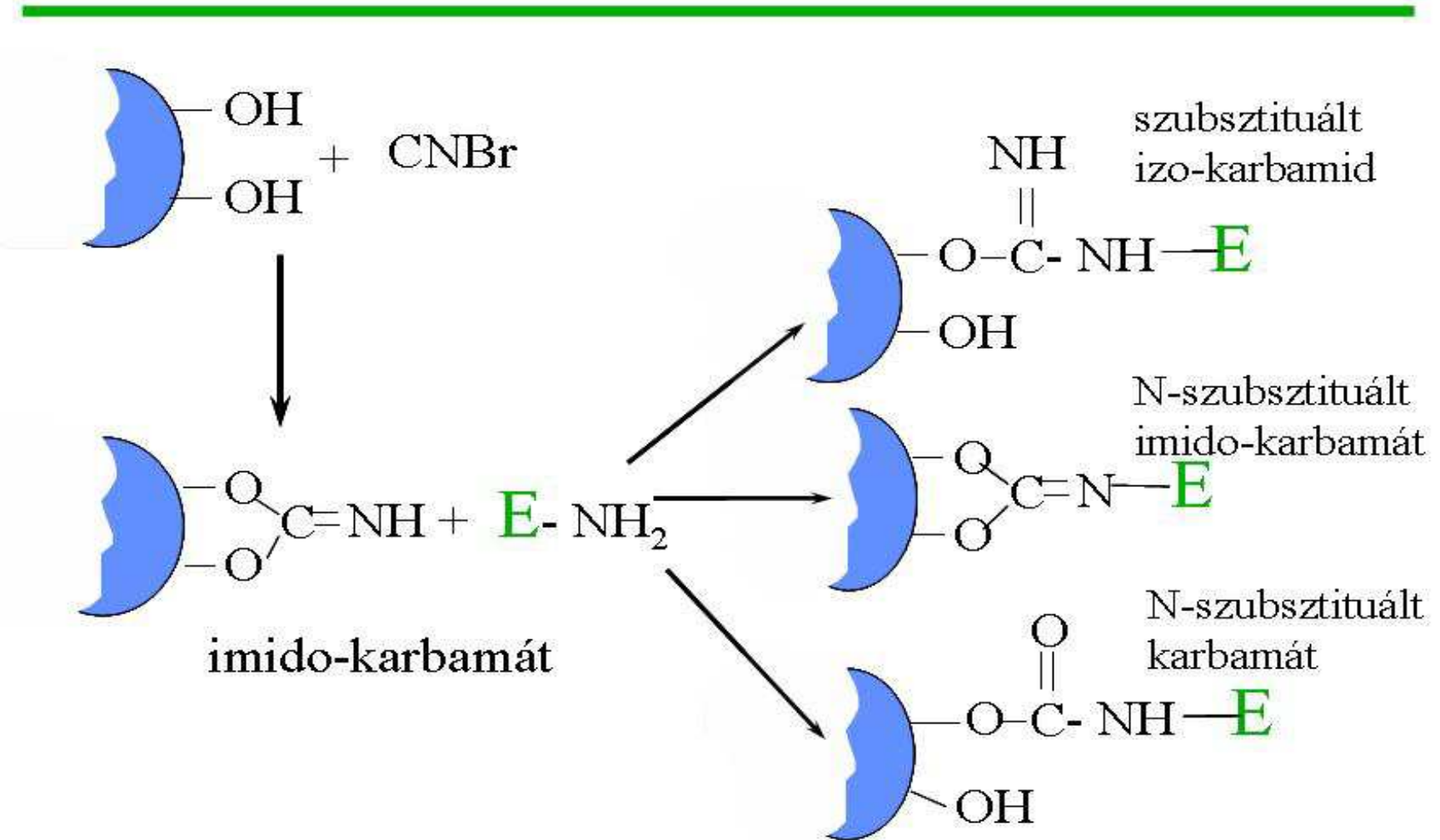
Lépések:

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



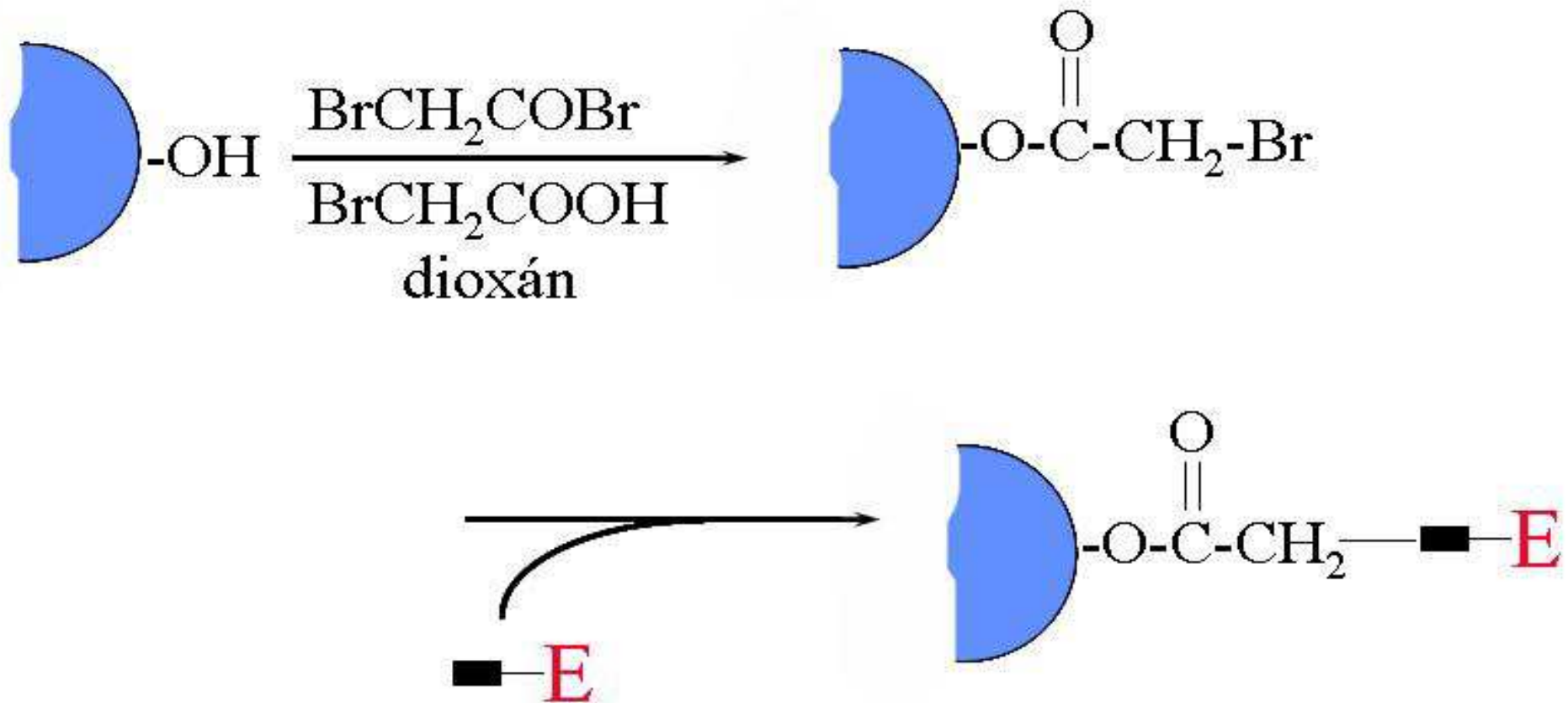
Az enzimrögztés kémiai módszerei

MÁTRIX: **vicinális -OH :** cellulóz, sephadex
sepharose



Az enzimrögztés kémiai módszerei

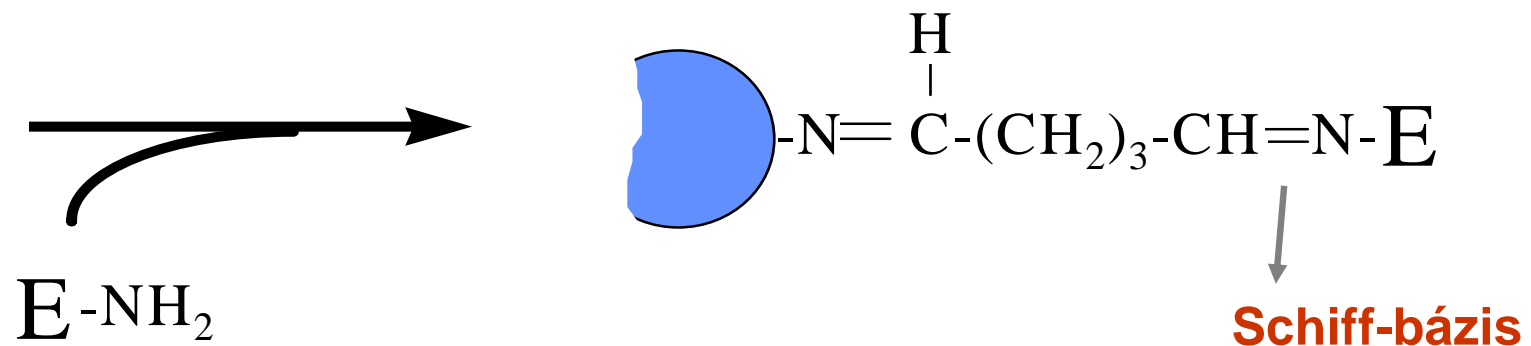
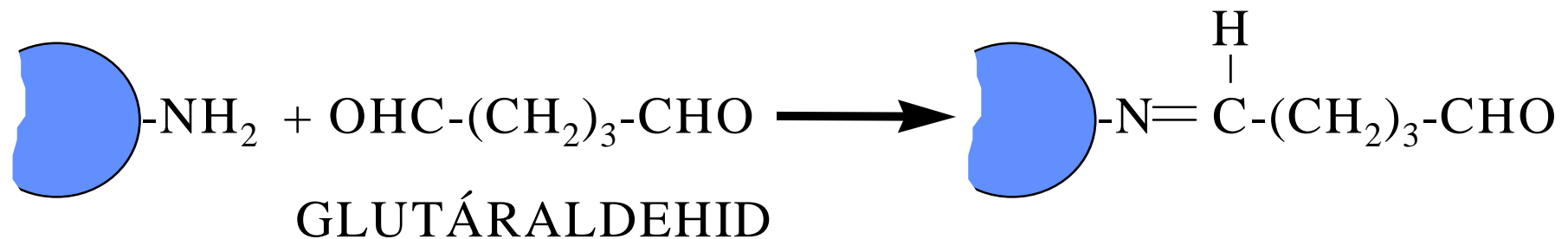
MÁTRIX: METAKRILÁT és CELLULÓZ származékok homo- és kopolimerjei



Az enzimrögztés kémiai módszerei

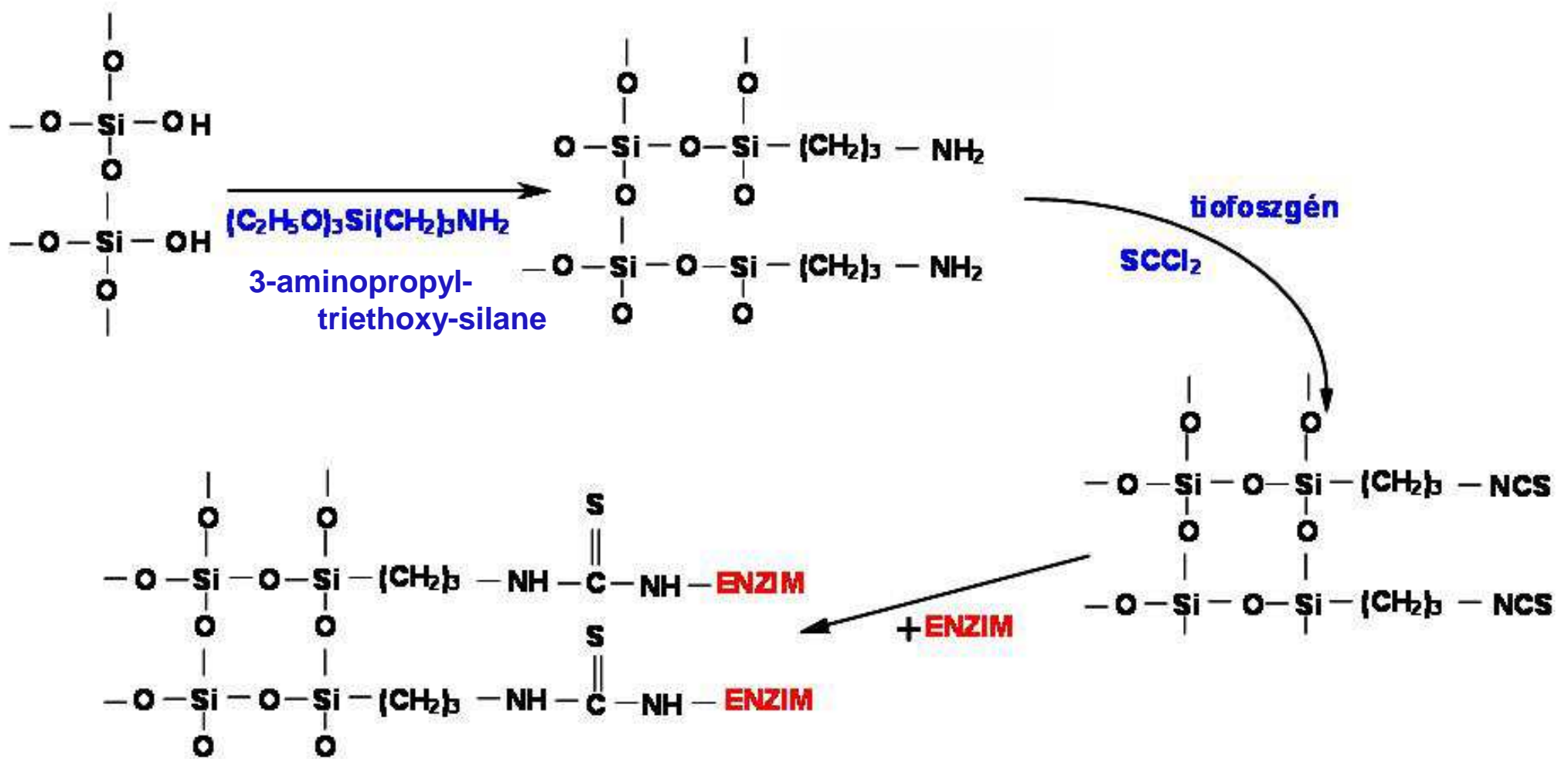
POLIFUNKCIÓS KÖTÉS

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



Az enzimrögztés kémiai módszerei

Üvegfelületre rögztés

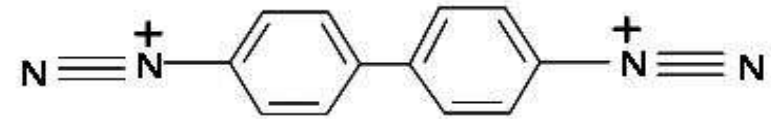


Az enzimrögztés kémiai módszerei

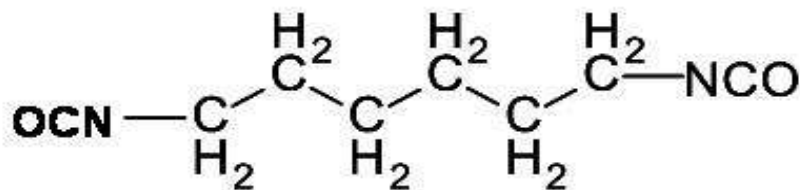
Keresztkötések létrehozása fehérjemolekulák között



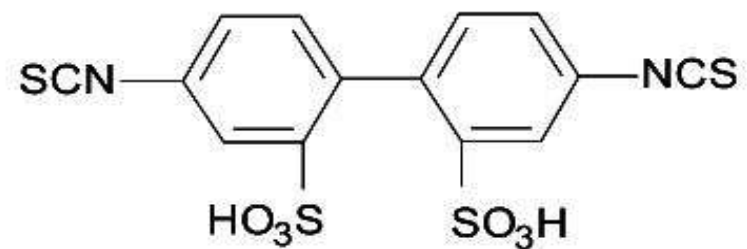
GLUTÁRALDEHID



DIAZOBENZIDIN



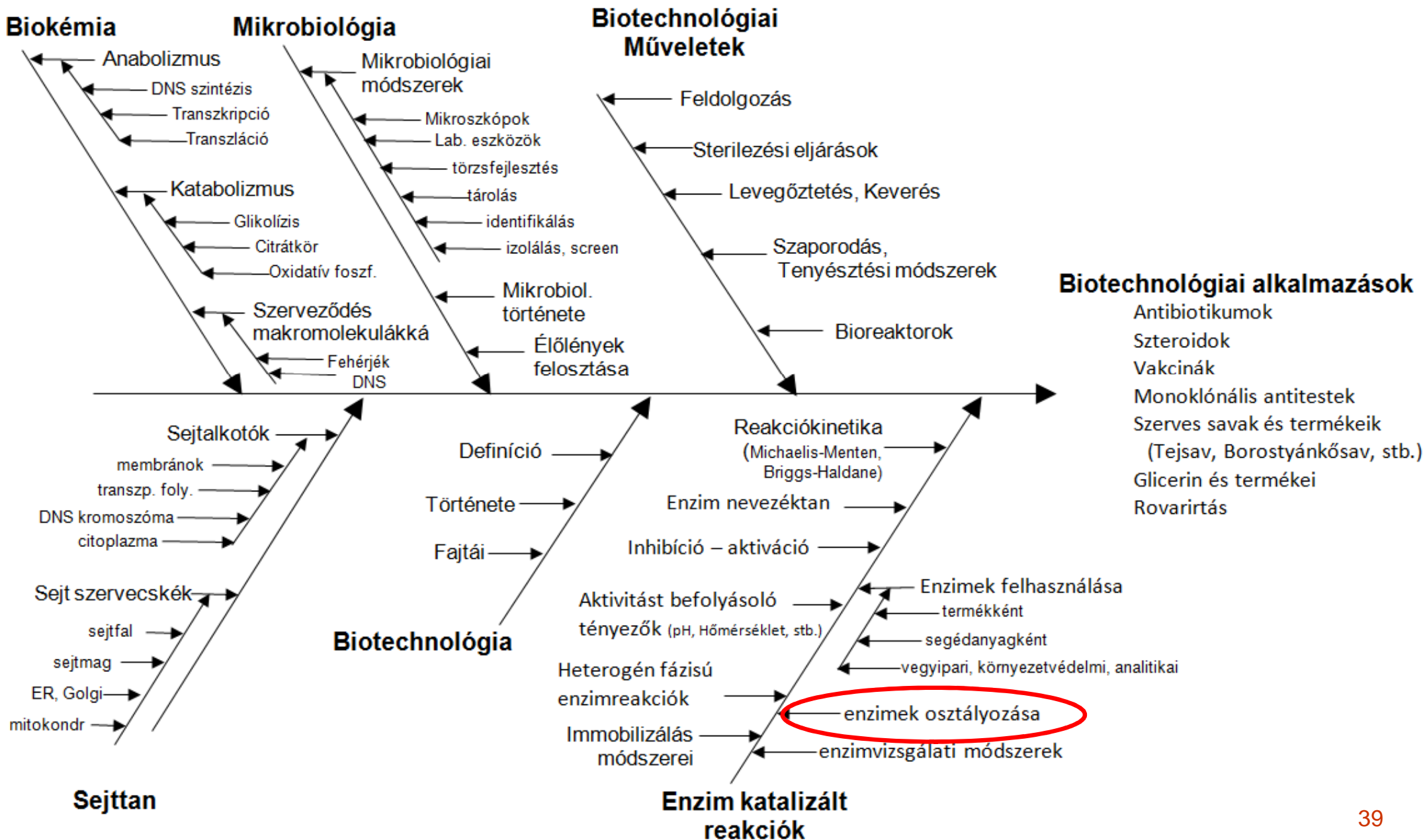
HEXAMETILÉN-DIIZOCIANÁT



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



Itt járunk:



Az enzimek osztályozása aktivitásuk alapján

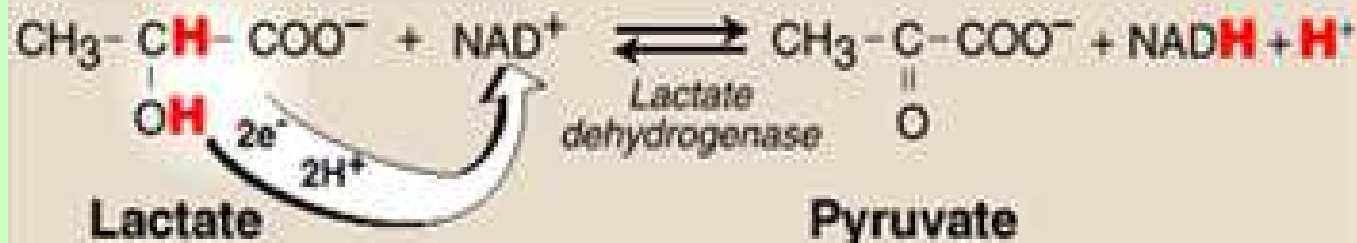
Osztály	Reakciótípus	Példa
1. oxidoreduktázok	redoxi elektronok, H atomok, H ⁻ ionok átvitele	tejsav dehidrogenáz
2. transzferázok	csoportátvitel pl. foszforil csoport	szerin hidroximetil transzferáz
3. hidrolázok	hidrolízis, funkciós csoport átvitele vízre	ureáz
4. liázok	csoportátvitel kettős-kötésre, 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

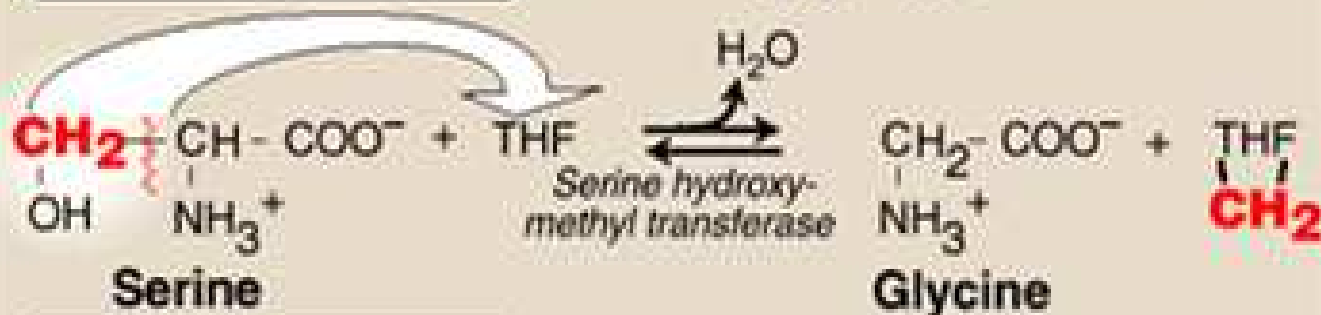
1. Oxidoreductases

Catalyze oxidation-reduction reactions, such as:



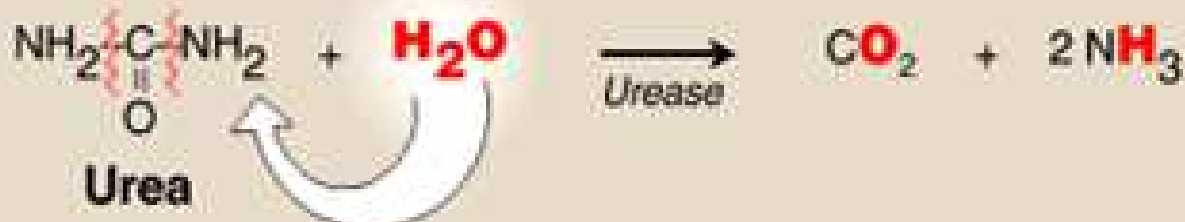
2. Transferases

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

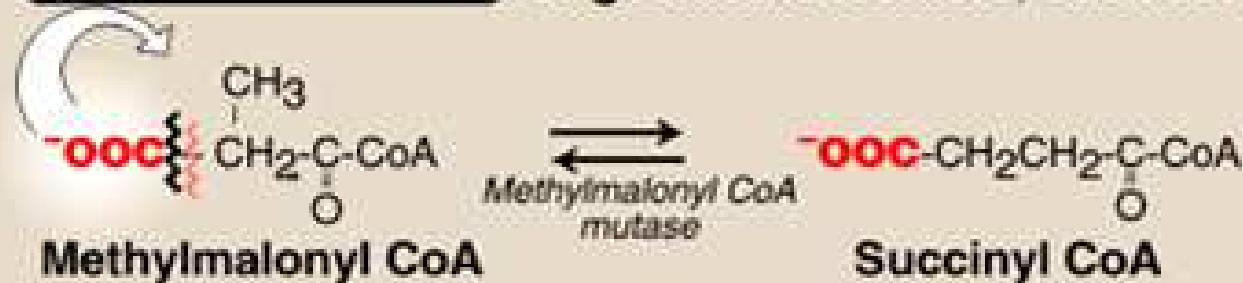
4. Lyases

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



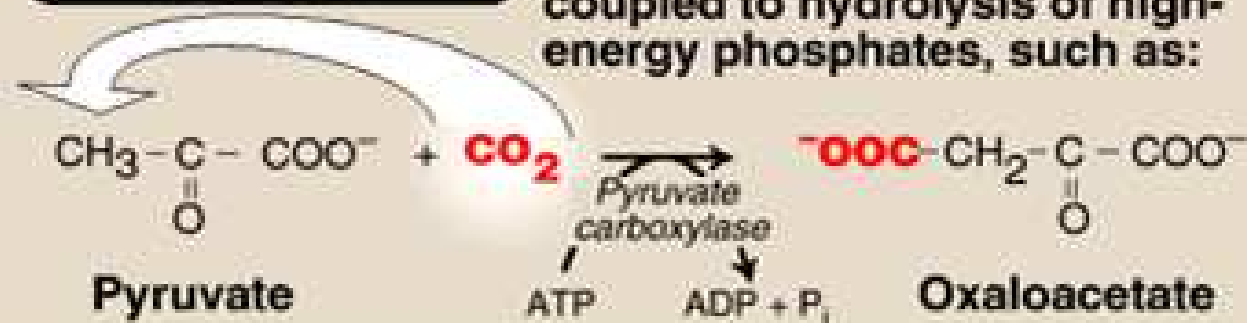
5. Isomerases

Catalyze racemization of optical or geometric isomers, such as:

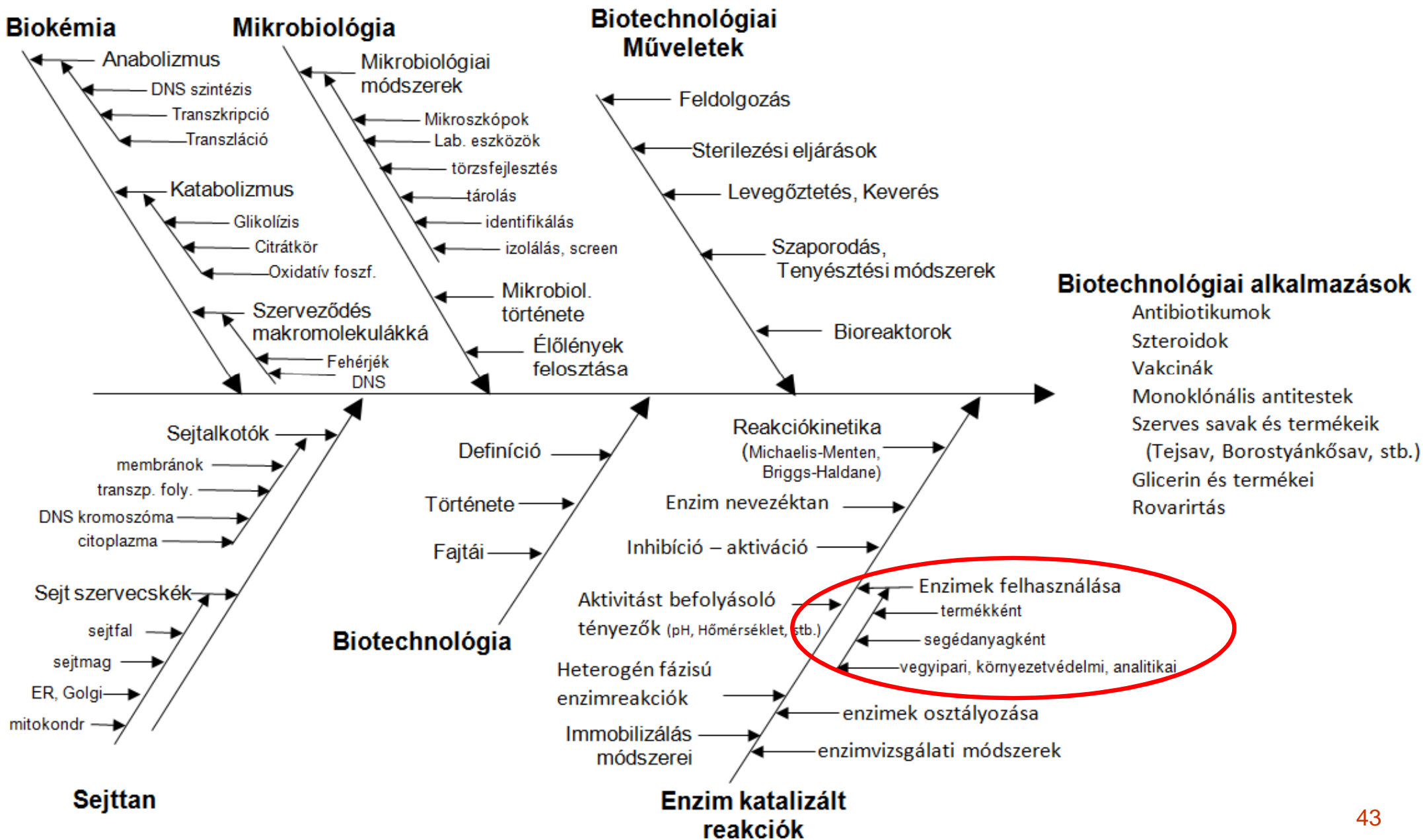


6. Ligases

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



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, β -laktamázok, L-aszparagináz, hyaluronidáz, lizozim, kollagenáz, sztreptokináz
Analitika és diagnosztika	urát oxidáz, L-aminosav oxidáz, penicillináz



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-glukano-transzferáz, xilanáz.



Az élelmiszeripar enzimei

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



A környezetvédelem enzimei

Enzim	Katalitikus lépés	Az enzimet termelő mikroorganizmus
Baktériumokból		
dehalogenáz	diklórmétán lebontása	<i>Pseudomonas sp</i>
benzol-di-oxigenáz	benzol és egyéb aromások lebontása	<i>Pseudomonas putida</i>
kollagenáz	kollagén hidrolízise .	<i>Streptomyces sp.</i>
Gombákból		
cianid-hidratáz	cianid detoxifikálás	<i>Stemphylium loti</i>
celluláz, xilanáz	cellulóz hidrolízise/degradációja	<i>Hypocrea sp., Aspergillus sp.</i>
hemicelluláz, pectináz	szalma, egyéb növényi maradvány, papír	<i>Chaetomium sp., Humicola sp.</i>



Néhány vegyiparban alkalmazott enzim

Enzim	Katalitikus lépés	Termék
Nitril-hidratáz	hidrolízis	akrilamid
Penicillin-aciláz	hidrolízis	6-amino-penicillánsav
Hidantoináz	reszolválás	4-hidroxi-D-fenil-glicin
D-szorbit-dehidrogenáz	oxidáció	L-szorbóz
niacin hidroxiláz	hidroxilezés	6-hidroxi-nikotinsav
β -Ketoreduktáz	redukció	(R)-karnitin
piruvát dekarboxiláz	C–C-kötés létrehozása	(R)-fenil-acetil-karbinol



Néhány terápiás célra alkalmazott enzim és enzimkészítmény

Enzim	Enzimforrás	Gyógyszernév	Mi ellen? Mire?
urát oxidáz	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Uricozyme</i>	köszvény, hiperurikémia
lipáz	<i>Rhizopus arrhizus</i>		emésztést elősegítő készítmények
Pankreatin: pankreász enzimek keveréke: tripszin, kimotripszin, lipáz, α -amiláz)	Sertés pankreász	Cotazym, Kreon, Nutrizym, Pankreon, Panzytrat	emésztést elősegítő készítmények
β -galaktozidáz (Lactase)	<i>Kluyveromyces fragilis</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A.niger</i>	<i>Lactaid</i> , <i>Lactrase</i> , <i>SureLac</i>	laktóz intolerancia
hialuronidáz	Borjú here, rDNS termék	Hylase, Vitrase	szívinfarktus

Folytatás: néhány, terápiás célra alkalmazott enzim és enzimkészítmény

Enzim	Enzimforrás	Gyógyszernév	Mi ellen? Mire?
urokináz	humán vizelet vagy humán vese- sejttenyészet	Abbokinase, Actosolv, Alphakinase, Rheothromb	akut szívizom- infarktus
VIII véralvadás faktor	rekombináns CHO sejtek	Recombinante, Bioclata	hemofilia A
szöveti plazminogén aktivátor	rekombináns CHO sejttenyészet	Activase, Actilyse	akut szívizom- infarktus; akut tüdőembólia; iszkémiás sztrók
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.)

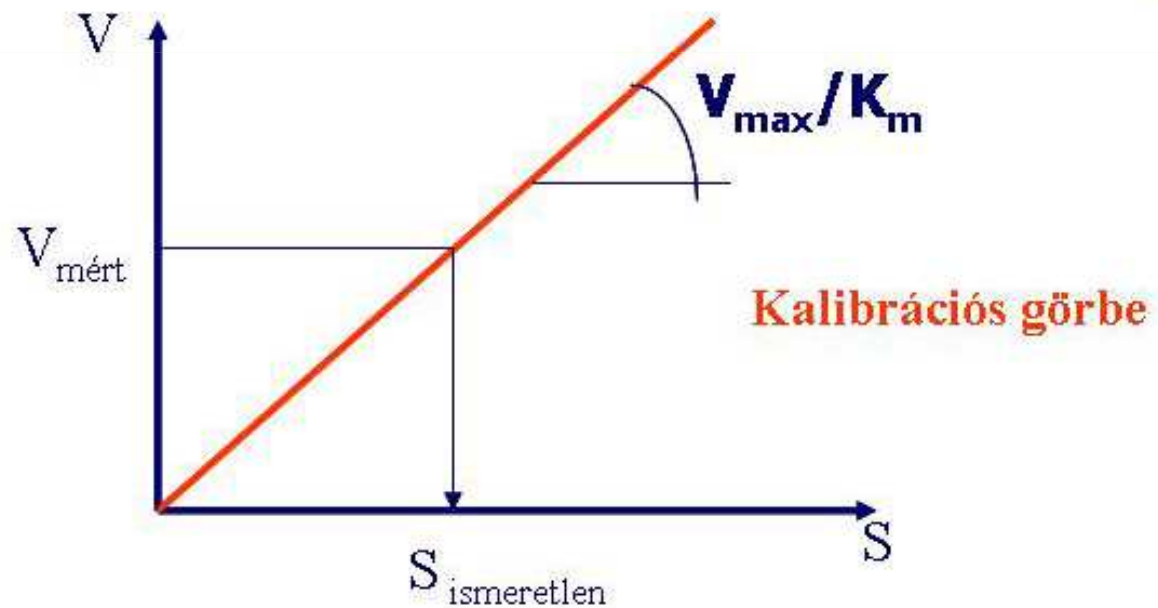
$$V = V_{\max} \frac{S}{K_m + S}$$

Ha $S \ll K_m$

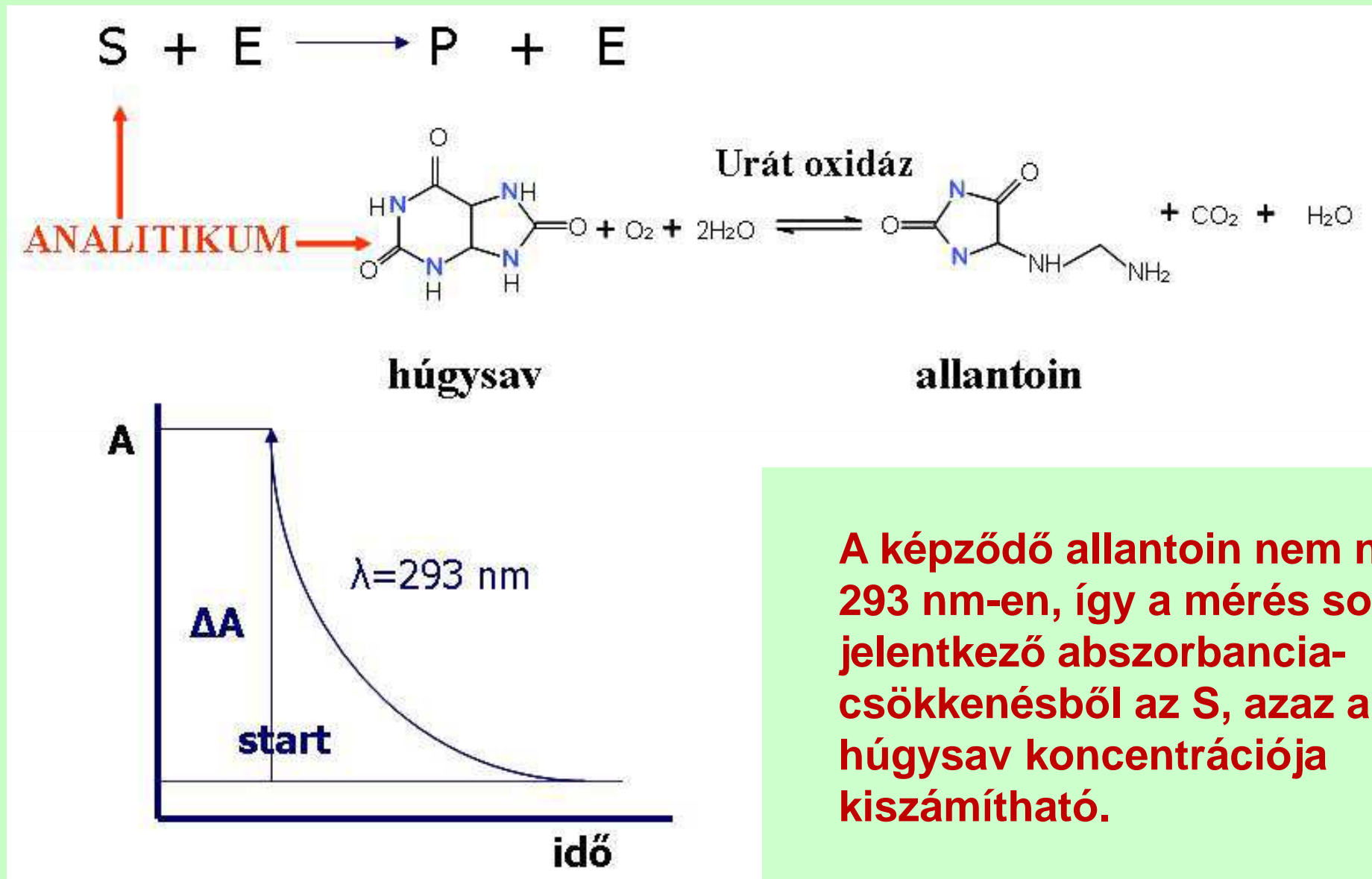
$$V_{\text{mért}} \sim V_{\max} / K_m \cdot S$$

$-dS/dt$

dP/dt



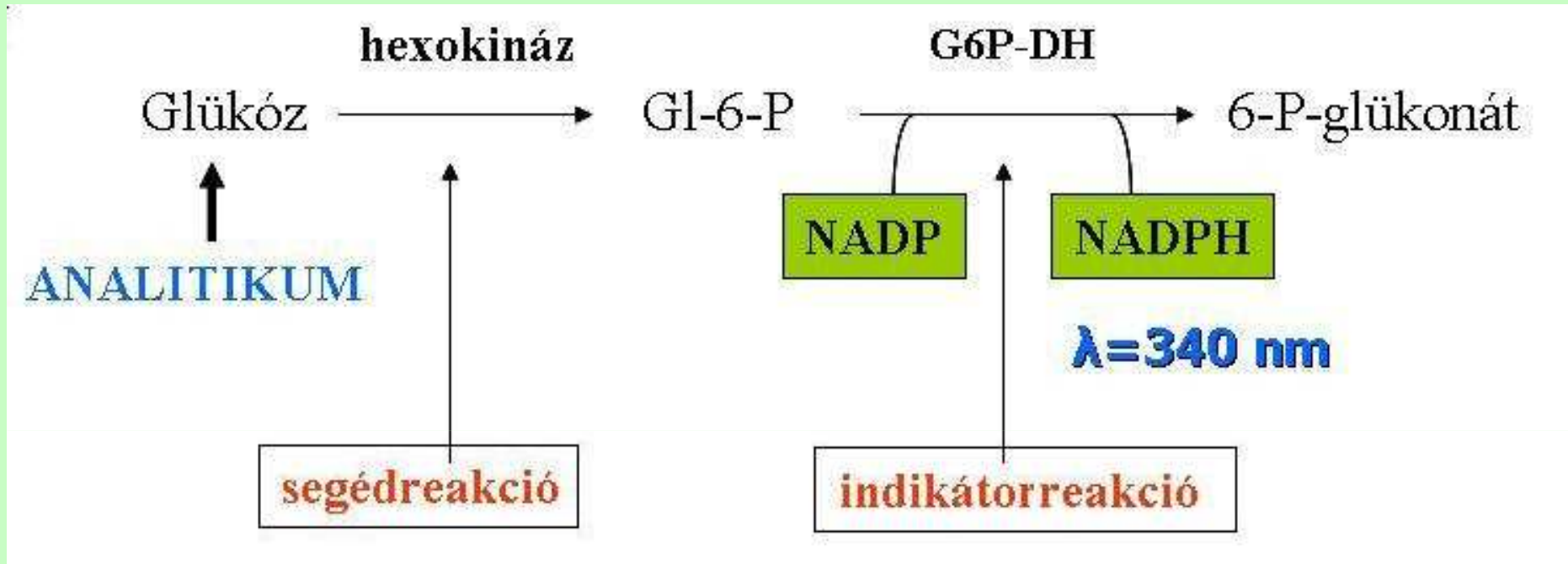
Húgysavmeghatározás enzimreakcióval



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



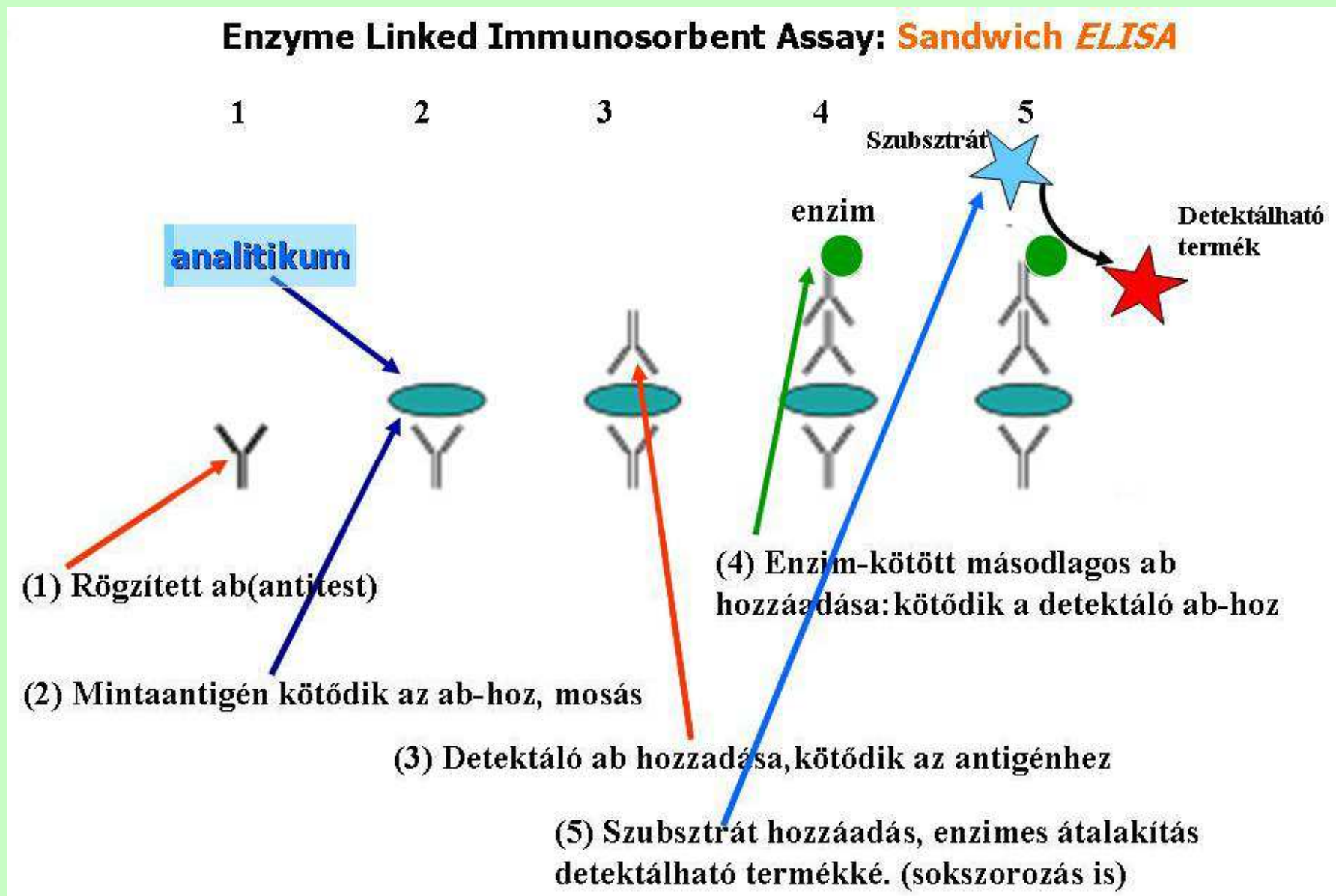
Szubsztrátmeghatározás indikátorreakció segítségével



A glükózzal való reakció nem jár mérhető változással, ezért a képződött G6P-ot egy további reakcióban egy további enzimmel, 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).

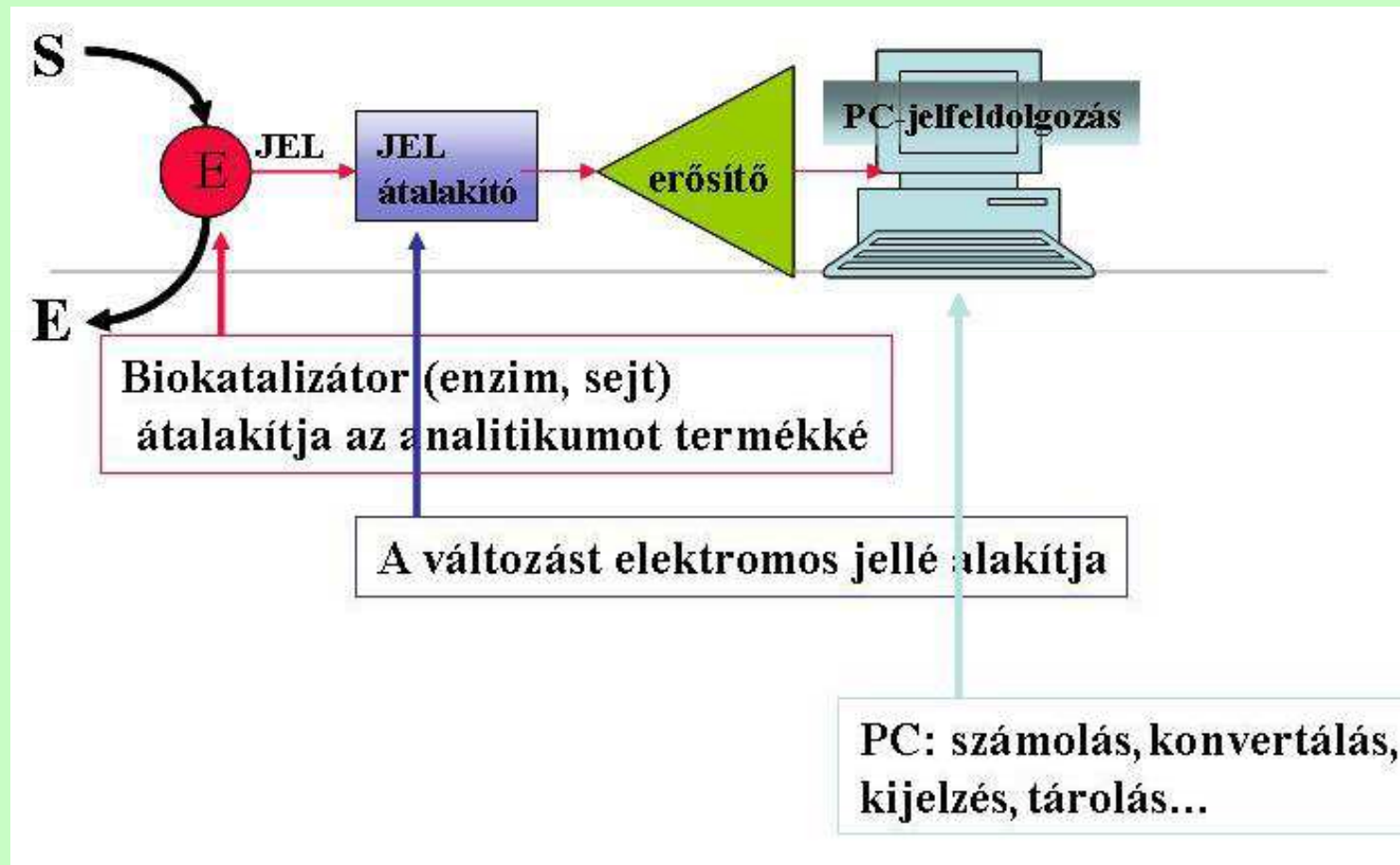


Enzimes indikátorreakció fehérjemeghatározásban



Enzim elektródok, bioszenzorok

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

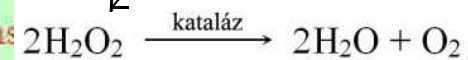
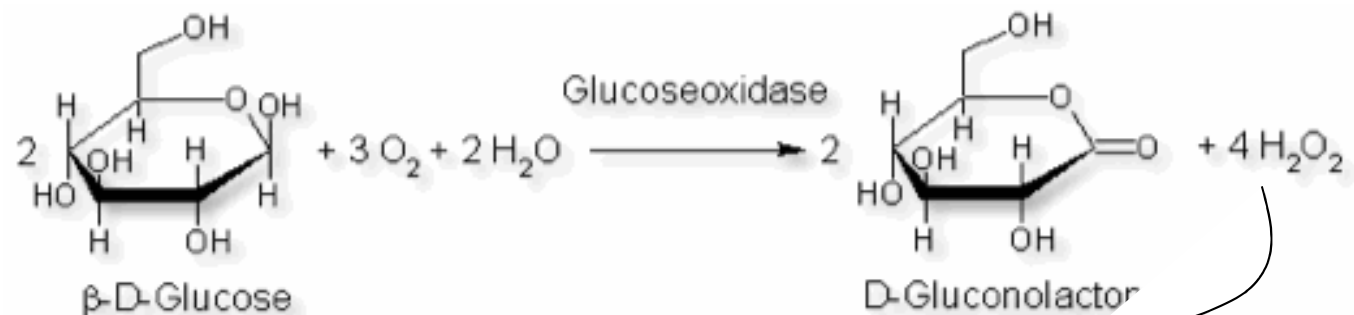
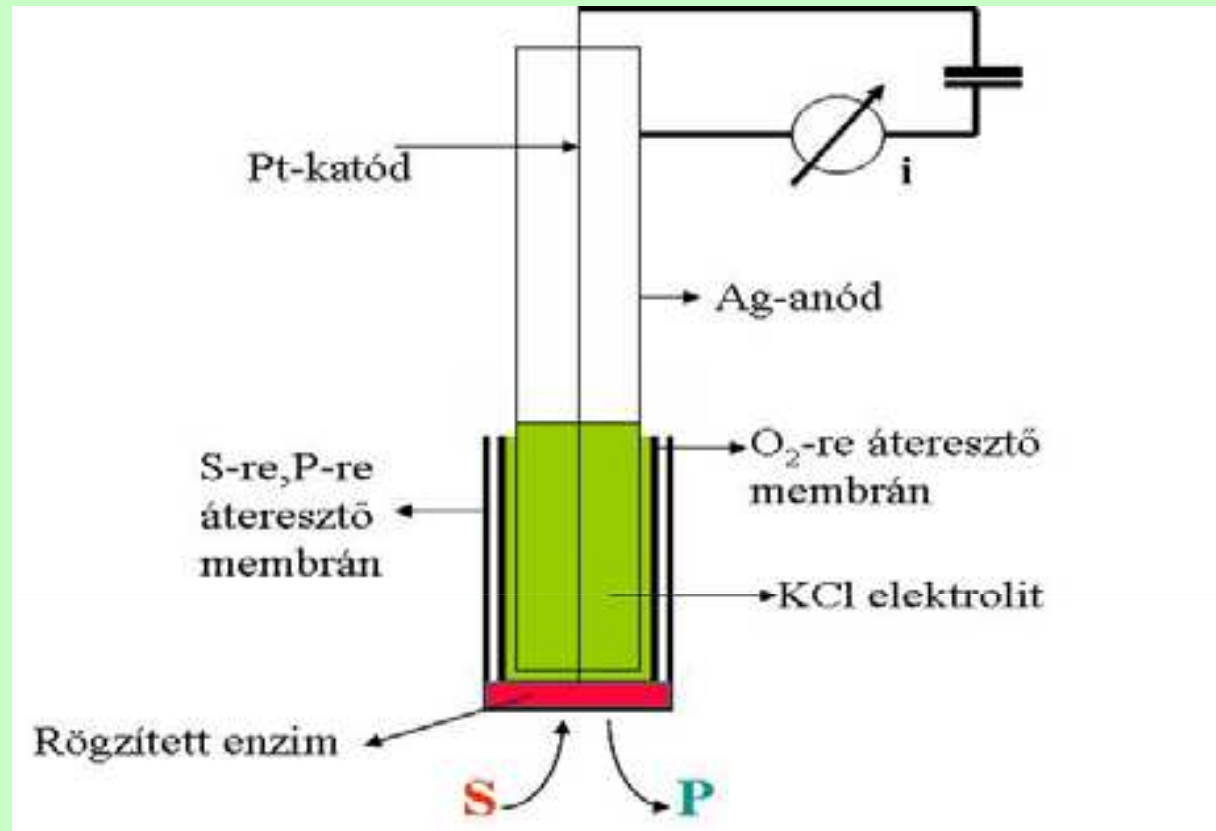


Amperometriás glükózelektród

Egy oldott oxigént mérő elektód membránjának felületére van felhordva egy gélben rögzített glükózoxidáz enzim (és kataláz!).

Ezt a rögzített enzimet is egy membrán határolja, amely a meghatározandó szubsztrátra, a glükózra és a termék glükonsavra is áteresztő.

A reakció során csökken a gélben az oldott oxigén koncentrációja, és ezt a csökkenést detektálja az oxigénelektród



A potenciometriás elektródok felépítése

