

#### OSOBY PROWADZĄCE:

dr Elżbieta Megiel (pok.134, konsultacje: czwartki 13<sup>00</sup>-14<sup>00</sup>)  
dr hab. Grzegorz Litwinienko (pok. 132, konsultacje: czwartki 13<sup>00</sup>-14<sup>00</sup>)

---

#### LITERATURA:

1. Atkins, P. W. Równowaga chemiczna. W: *Chemia fizyczna*. PWN 2007, 201-227.
2. Atkins, P. W. Szybkość reakcji chemicznych. W: *Chemia fizyczna*. PWN 2007, 735-763.
3. Berg, J. M., Tymoczko, J. L. i L. Stryer. Enzymy. Podstawowe pojęcia i kinetyka. W: *Biochemia*. PWN 2007, 189-228.
4. Ishikawa, T., Karnkowska, A., Lilpop, J. i J. Urbański. Słodki świat enzymów. *Szkoła Festiwalu Nauki* (materiały dostępne na stronie: [www.sfn.edu.pl](http://www.sfn.edu.pl)).
5. Walory, J., Pilarek, M., Kalinowska, M. i H. Jaworowska-Deptuch. Kinetyka reakcji enzymatycznej. W: *Biochemia. Ćwiczenia laboratoryjne*. Oficyna Wydawnicza PW 2003, 44-60.
6. Adamczak, M. Biokataliza i jej zastosowanie. W: *Podstawy biotechnologii przemysłowej*. Red. W. Bednarski i J. Fiedurek. WNT 2007, 317-378.
7. Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., i V. Rodwell. rozdz. I.8-I.11 w: *Biochemia Harpera*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL Warszawa 1995, str. 82-118
8. Malepszy, S. Zabiegi technologiczne zwiększające produkcję metabolitów wtórnych. W: *Biotechnologia roślin*. PWN 2001, 331-334.

### **Wymagania do ćwiczeń:**

1. Definicje: szybkość / rzędowość / cząsteczkowość / stała równowagi reakcji chemicznej, równanie Arrheniusa, reguła van't Hoffa, energia aktywacji, kataliza homogeniczna i heterogeniczna (przykłady), opis oddziaływań katalizatora z substratem, biokataliza, biokatalizator, enzym, rybozym, kofaktor, enzymy allosteryczne, teoria kompleksu aktywnego.
2. Właściwości enzymów / biokatalizatorów: aktywność, wydajność syntezy produktu, liczba obrotów enzymu, selektywność substratowa i typu reakcji.
3. Mechanizm działania enzymów: modele opisujące działanie enzymów, klasyfikacja enzymów.
4. Kinetyka Michaelisa-Menten – założenia i wyprowadzenie równania, sens fizyczny stałych obecnych w równaniu, możliwe uproszczenia, sposób wyznaczania parametrów charakteryzujących enzym.
5. Regulacja reakcji enzymatycznych: inhibicja kompetywna i niekompetywna, wpływ parametrów intensywnych na szybkość reakcji enzymatycznej.
6. Techniki instrumentalnej analizy ilościowej (spektroskopia UV-Vis, prawo Lamberta-Beera, sporządzanie krzywej wzorcowej, przeliczanie stężeń).
7. Dodatkowo studenci są proszeni o wybranie dowolnego enzymu i samodzielne (pisemne!) opracowanie jego charakterystyki w oparciu o dostępne bazy literaturowe. Opracowanie to powinno obejmować – numer wg klasyfikacji E.C., typ katalizowanej reakcji, znaczenie katalizowanego procesu w organizmie, struktura centrum aktywnego (wraz z kofaktorem, jeżeli występuje), ewentualne inhibitory i mechanizm ich działania. Postuluje się, żeby studenci z jednej grupy wybierali różne enzymy do scharakteryzowania.

*Poniższy wstęp zakłada znajomość podstawowych definicji i pojęć kinetyki chemicznej, z którymi student zapoznał się podczas kursu chemii fizycznej. Ponadto, studenci są proszeni o zapoznanie się z materiałem dotyczącym enzymów prezentowanym na wykładzie Elementy Biotechnologii (Wykłady nr 3-5).*

*autorzy części teoretycznej: Katarzyna Jodko, Grzegorz Litwinienko*

## **I. BIOKATALIZA**

Procesy biochemiczne, przebiegające w organizmach żywych, są kontrolowane przez biokatalizatory – naturalnie występujące cząsteczki przyspieszające bądź hamujące przebieg reakcji, do których zaliczamy enzymy, hormony i witaminy (często pełniące funkcję koenzymów). W analogii do procesów przebiegających *in vivo*, podejmowane są próby przemysłowego wykorzystania materiału biologicznego do wydajnego prowadzenia reakcji chemicznych. Zabieg taki określa się mianem **biokatalizy**, a zachodzącą pod wpływem materiału biologicznego reakcję – **biotransformacją** lub **biokonwersją**.

Rolę biokatalizatora w procesach przemysłowych mogą pełnić całe komórki (w formie zawiesiny lub immobilizowane), ekstrakt komórkowy lub enzymy o różnym stopniu oczyszczenia, wolne lub immobilizowane. Zastosowanie hormonów (zaliczanych do naturalnych biokatalizatorów) do przemysłowego prowadzenia reakcji chemicznych nie jest możliwe, gdyż regulują one procesy zachodzące w komórce tylko za pośrednictwem specyficznych receptorów, obecnych we wnętrzu komórek lub umieszczonych śródbłonowo.

Biokatalizatory stosowane są w przemyśle na coraz większą skalę - obecnie już około 130 procesów z użyciem enzymów lub komórek mikroorganizmów zostało opracowanych dla skali produkcji przewyższającej 100 kg. Enzymy znajdują zastosowanie głównie w przemyśle spożywczym (przemysł piekarniczy, browarnictwo, gorzelnictwo, mleczarstwo, przemysł mięsny), przy produkcji detergentów (biodetergentów), w przemyśle papierniczym oraz w medycynie (w tym w diagnostyce genetycznej).

## **II. ENZYMY**

**Enzymy** to związki wielkocząsteczkowe wykazujące właściwości katalityczne, umożliwiające prawidłowe tempo przemian metabolicznych w organizmach żywych i wirusach. Wykazano wpływ enzymów na przebieg wszystkich szlaków anabolicznych

i katabolicznych w komórce. Przykładowo, fundamentalna w procesach oddychania komórkowego i oddychania płucnego reakcja:



przebiega  $10^7$  – razy szybciej w obecności enzymu anhidrazy węglanowej. Działanie enzymu umożliwia więc wydajne usunięcie dwutlenku węgla, który powstaje w procesach metabolicznych poprzez rozpuszczenie go we krwi, a następnie uwolnienie go z krwi do wnętrza pęcherzyków płucnych. Śmiało możemy więc powiedzieć, że aktywność katalityczna anhidrazy węglanowej warunkuje efektywną wymianę gazową.

## II.1. Budowa enzymów

### II.1.1. Rybozomy jako pozostałość „świata RNA”

Niemal wszystkie enzymy są białkami. Jednak w „świecie RNA” (hipotetycznym, wczesnym etapie rozwoju życia na Ziemi) rolę katalizatorów prawdopodobnie pełniły cząsteczki kwasu rybonukleinowego (RNA). W latach 80., Thomas Cech i Sidney Altman niezależnie odkryli cząsteczki RNA wykazujące aktywność katalityczną - **rybozomy** (za co w 1989 roku otrzymali Nagrodę Nobla w dziedzinie chemii). Cech udowodnił, że proces splicingu RNA u jednokomórkowego orzęska *Tetrahymena thermophila* polega na autokatalitycznym wycinaniu intronów. Katalityczne właściwości RNA wynikają ze zdolności przyjmowania przez te cząsteczki skomplikowanych struktur, umożliwiających idealne przestrzenne dopasowanie do siebie enzymu i substratu katalizowanej reakcji. Obecnie wiemy, że rybozomy występują w komórkach wszystkich organizmów i uczestniczą przede wszystkim w mechanizmach syntezy białek (na przykład rRNA, wchodzący w skład rybosomów, katalizuje reakcję tworzenia wiązań peptydowych między aminokwasami). Odkrycie cząsteczek RNA o właściwościach katalitycznych potwierdza przedstawioną wyżej hipotezę „świata RNA”. Należy w tym miejscu podkreślić, że w „świecie RNA” kwas rybonukleinowy obok funkcji katalitycznej, pełnił też rolę nośnika informacji genetycznej, czego pozostałością we współczesnym świecie są retrowirusy (w tym wirus HIV). Postuluje się, że cząsteczkę, która jest jednocześnie nośnikiem informacji i katalizuje swoje własne przemiany, można uznać za pierwszą, niekomórkową formę życia na Ziemi.

### II.1.2. Enzymy białkowe

Jak już wspomniano, podstawową rolą enzymów w organizmie jest katalizowanie przebiegu ściśle określonych reakcji metabolicznych. Wobec tego, najbardziej istotnymi właściwościami enzymów, warunkującymi prawidłowe pełnienie przez te cząsteczki swojej funkcji, będą **siła katalityczna (aktywność)** i **selektywność (specyficzność)**. Porównywanie

aktywności różnych enzymów stało się możliwe po wprowadzeniu przez Międzynarodową Unię Biochemiczną **międzynarodowej jednostki standardowej U**. Jest to ilość enzymu, która katalizuje przemianę 1 μmola substratu w czasie 1 minuty w temperaturze 30°C, w odpowiednim dla danego enzymu pH i przy optymalnym stężeniu substratu. Wyrażana jest w μmol/min. Inne jednostki aktywności, które wciąż używane są w analizach biochemicznych to: aktywność właściwa, aktywność molekularna (inaczej liczba obrotów enzymu) i katal. Selektowność enzymu dotyczy zarówno katalizowanej reakcji (selektowność typu reakcji) jak i substratów biorących w niej udział (selektowność substratowa). **Selektowność substratowa** enzymu polega na wybraniu spośród wielu podobnych substancji tylko tej właściwej, która będzie podlegała procesowi enzymatycznemu. Ten typ selektowności jest efektem precyzyjnego dopasowania trójwymiarowej struktury enzymu do cząsteczki substratu. Łańcuch polipeptydowy zbudowany z dwudziestu różnych aminokwasów zapewnia większą selektowność niż cząsteczka kwasu nukleinowego, która jest kombinacją tylko czterech typów nukleotydów. Z powodu większej różnorodności białek, to właśnie te białeczki stanowią główny materiał z którego zbudowana jest większość znanych enzymów. **Selektowność typu reakcji** oznacza, że spośród wielu możliwych reakcji, jakim ulegać może substrat, enzym katalizuje tylko jeden, ściśle określony proces. Efektem selektowności enzymu jest właściwie brak zachodzenia reakcji ubocznych.

Wiele enzymów jest aktywnych (albo wykazuje podwyższoną aktywność) tylko w obecności niebiałkowych cząsteczek – **kofaktorów**. W przypadku tych enzymów, ich białkową część określamy mianem apoenzymu, a tworzony aktywny kompleks (apoenzym + kofaktor) – holoenzymem. W roli kofaktorów mogą występować cząsteczki nieorganiczne, jony metali, lub małowcząsteczkowe związki organiczne. W oparciu o chemiczny charakter kofaktora i moc wiązania, które tworzy z białkową częścią enzymu, w niektórych opracowaniach kofaktory podzielono na dwie grupy:

- **koenzymy**, małe cząsteczki organiczne, które w sposób specyficzny łączą się z apoenzymem; często są wiązane tylko na czas reakcji i uwalniane wraz z jej produktami.
- **grupy prostetyczne** są silnie (często kowalencyjnie) związane z apoenzymem; w tej roli mogą występować jony metali, małe cząsteczki nieorganiczne bądź organiczne.

Reakcja katalityczna zachodzi w **miejscu aktywnym** enzymu, czyli w obszarze wiązania substratu i ewentualnych kofaktorów. W enzymach białkowych miejsce aktywne składa się z reszt aminokwasowych, zwanych grupami katalitycznymi enzymu, które biorą bezpośredni udział w zachodzącej reakcji. Miejsce aktywne enzymu jest często opisywane

jako „szczelina” w strukturze enzymu, w którą wpasowują się substraty biorące udział w reakcji. Pełni ono dwojaką funkcję: selekcjonuje cząsteczki, które mogą brać udział w reakcji, a ponadto umożliwia właściwe ułożenie reagenta / reagentów względem siebie. Miejsce aktywne często jest tworzone przez reszty aminokwasowe oddalone od siebie w sekwencji aminokwasowej – dopiero przybranie przez białko odpowiednio „zwiniętej” trzeciorzędowej struktury powoduje zbliżenie tych reszt do siebie i utworzenie miejsca aktywnego. Ponadto, miejsce aktywne przeważnie zajmuje jedynie małą część w strukturze cząsteczki enzymu – gdy jednak weźmiemy pod uwagę, jak odległe aminokwasy biorą udział w jego tworzeniu, jasne stanie się, że reszta cząsteczki jest niezbędna do przyjęcia przez enzym właściwej struktury, pełniąc rolę rusztowania dla miejsca aktywnego. Za wiązanie substratu w miejscu aktywnym, w zależności od chemicznego charakteru substratu i reszt aminokwasowych tworzących miejsce aktywne, odpowiedzialne mogą być: oddziaływania elektrostatyczne i hydrofobowe, wiązania wodorowe oraz siły van der Waalsa.

## II.2. Modele ilustrujące działanie enzymów

Enzymy w sposób wysoce specyficzny wiążą substraty reakcji i ustawiają je w odpowiedniej konformacji przestrzennej, sprzyjającej zajściu katalizowanego procesu. W 1890 roku Hermann Emil Fischer podjął próbę opisanie zjawiska specyficzności substratowej enzymów przy użyciu modelu „**zamka i klucza**”. Zgodnie z założeniami modelu, enzym (a dokładniej jego miejsce aktywne) i substrat doskonale odpowiadają sobie przestrzennie. To dopasowanie jest warunkiem, po pierwsze, wzajemnego rozpoznania substratu i enzymu, a następnie - zajścia katalizowanej reakcji. Według modelu „zamka i klucza” (ang. *lock and key model* – Rysunek 1a), specyficzność substratowa enzymu zależy od precyzyjnego ułożenia atomów w miejscu aktywnym, które oddziałują z przylegającą do nich cząsteczką substratu. Obecnie wiemy, że postulowany przez Fischera<sup>1</sup> model nie tłumaczy w sposób właściwy zachodzącego procesu. Dopasowanie przestrzenne, zgodne z modelem „zamka i klucza” uniemożliwiłoby bowiem efektywne obniżenie energii aktywacji zachodzącej reakcji (czyli w zasadzie blokowałoby działanie enzymu, patrz rozdział II.3).

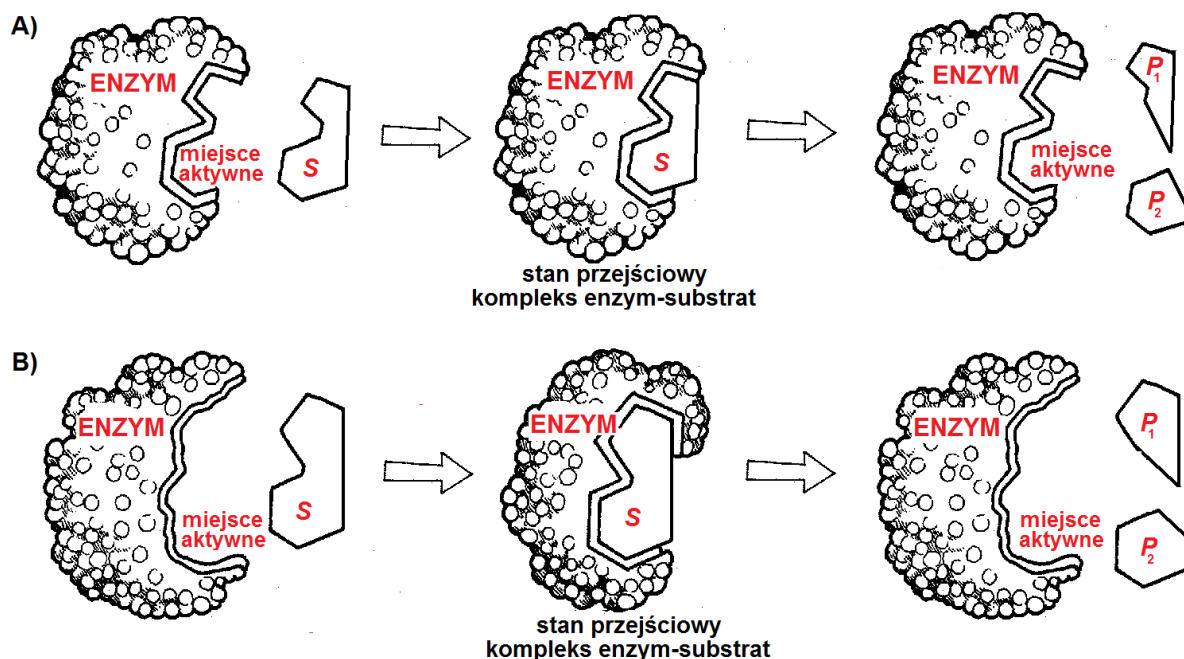
Zgodnie z kolejnym modelem, zaproponowanym w 1958 przez Daniela E. Koshlanda Juniora<sup>2</sup>, struktury przestrzenne miejsca aktywnego i substratu wykazują względem siebie powinowactwo (umożliwiające ich wzajemne rozpoznanie), ale dopiero podczas wiązania substratu, kształt miejsca aktywnego nieznacznie zmienia się i idealnie dopasowuje

---

<sup>1</sup> H. E. Fisher ostatecznie został laureatem Nagrody Nobla w dziedzinie chemii, ale za prace dotyczące syntezy cukrów i puryn, a nie za prace nad mechanizmem działania enzymów.

<sup>2</sup> Daniel E. Koshland Jr. był dziedzicem fortuny Levi Straussa

przestrzennie do substratu. Nieznaczne zmiany konformacyjne w strukturze miejsca aktywnego są źródłem naprężeń wiązań w strukturze enzymu, co obniża energię aktywacji katalizowanej reakcji chemicznej. W modelu zaproponowanym przez Koshlanda, określanym mianem „indukowanego dopasowania” (ang. *induced fit model* – Rysunek 1b), enzymy traktowane są jako dynamiczne struktury przestrzenne, które mogą zmieniać swoją konformację w obecności substratu.



**Rysunek 1. Mechanizm wiązania substratu (substratów) przez enzym.** Na rysunku przedstawiono schematycznie reakcję rozpadu substratu  $S$  do produktów  $P_1$  i  $P_2$ , zachodzącą w obecności enzymu. Proces przedstawiono za pomocą modelu „zamka i klucza” (A), zgodnie z którym miejsce aktywne enzymu jest komplementarne do kształtu substratu i modelu „indukowanego dopasowania” (B), według którego wiązanie substratu pociąga za sobą zmiany konformacyjne w obrębie enzymu.

### II.3. Mechanizm działania enzymów

Żeby zrozumieć mechanizm działania enzymów, rozważmy hipotetyczną reakcję przemiany substratu  $S$  w produkt  $P$ , katalizowaną przez enzym  $E$ :



Enzym  $E$  w tym samym stopniu obniża barierę aktywacyjną reakcji tworzenia produktu  $P$ , co reakcji ponownej przemiany produktu  $P$  w substrat  $S$ , a zatem równocześnie przyspiesza reakcje zachodzące w obydwu kierunkach. Wobec tego obecność enzymu nie zmienia stanu równowagi zachodzącej reakcji chemicznej, opisanego przez stałą równowagi  $K$ , a jedynie

przyspiesza jego osiągnięcie. Stała równowagi  $K$  zależy od standardowej entalpii swobodnej reakcji zgodnie z zależnością:

$$K = \exp\left(-\frac{\Delta G^0}{RT}\right) \quad (3)$$

Standardowa entalpia swobodna reakcji  $\Delta G^0$  jest z kolei różnicą pomiędzy standardową entalpią swobodną produktu  $G_p^0$  i standardową entalpią swobodną substratu  $G_s^0$ . Ponieważ obecność enzymu nie wpływa na wartość standardowych entalpii swobodnych związków biorących udział w reakcji ( $G_p^0$  i  $G_s^0$ ), nie może też zmienić wartości  $\Delta G^0$ , a co za tym idzie – nie może wpłynąć na położenie stanu równowagi określonego przez stałą równowagi  $K$ .

Przebieg zachodzącej reakcji można jednak opisać za pomocą innego parametru – entalpii swobodnej aktywacji  $\Delta G^\ddagger$  (w literaturze częściej określanej mianem energii aktywacji Gibbsa, lub po prostu energii aktywacji). Parametr ten to różnica pomiędzy entalpią swobodną stanu przejściowego reakcji  $G_{TS^\ddagger}$  a standardową entalpią swobodną substratu  $G_s^0$ . Stanem przejściowym reakcji  $TS^\ddagger$  (ang. *transition state*) będzie najrzadziej występujący stan, w którym mogą się znaleźć związki uczestniczące w reakcji, charakteryzujący się najwyższą wartością entalpii swobodnej. Stan ten należy sobie wyobrazić jako jeden z etapów na drodze przemian prowadzących od substratu  $S$  do powstania produktu  $P$ , zatem równanie (2) przyjmuje postać:



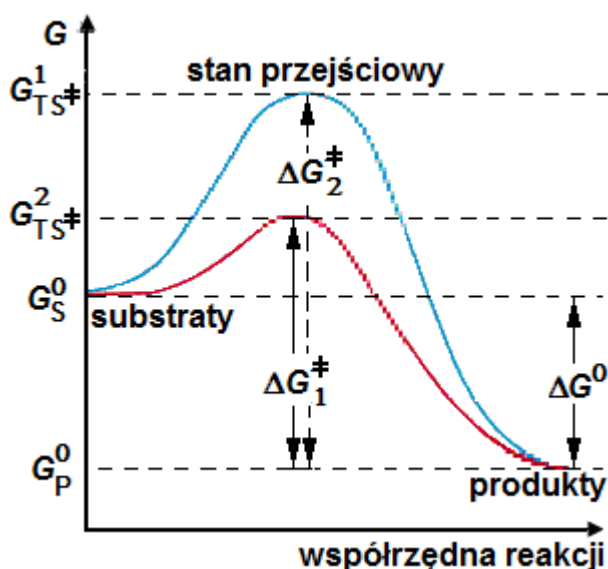
Osiągnięcie stanu przejściowego  $TS^\ddagger$ , czyli najmniej korzystnego etapu przemiany, wymaga dostarczenia do układu energii niezbędnej do pokonania bariery energetycznej pomiędzy substratem a stanem przejściowym. Po osiągnięciu stanu przejściowego następuje jego samorzutne przekształcenie w produkt reakcji<sup>3</sup>. Działanie enzymów polega na obniżaniu energii aktywacji dla katalizowanej reakcji poprzez stabilizację stanu przejściowego (czyli obniżenie entalpii swobodnej i zwiększenie prawdopodobieństwa jego wystąpienia – Rysunek 2). Stabilizacja stanu przejściowego reakcji jest możliwa np. poprzez zmianę środowiska reakcji (substrat reakcji zostaje ukryty w „szczelinie” miejsca aktywnego, która stabilizuje stan przejściowy reakcji). Warto tu podkreślić, że centrum aktywne często utworzone jest

---

<sup>3</sup> Omawiany tu model jest bardzo uproszczony i zakłada istnienie tylko jednego stanu przejściowego. W rzeczywistości na współrzędnej reakcji można czasem wyodrębnić kilka stanów przejściowych a przejście jednego w drugi jest możliwe po pokonaniu dodatkowych barier energetycznych. Można wtedy powiedzieć, że metastabilne struktury  $(TS_1)^\ddagger$ ,  $(TS_2)^\ddagger$ ,  $(TS_3)^\ddagger$  są pewnymi lokalnymi maksimumami energetycznymi.



przez hydrofobowe reszty aminokwasowe. Wobec tego, w przypadku reakcji zachodzących w cytoplazmie (będącej złożonym koloidem wodnym), wejście substratu w „szczelinę” miejsca aktywnego wiąże się ze zmianą środowiska z hydrofilowego na hydrofobowe, co może sprzyjać tworzeniu stanu przejściowego.



**Rysunek 2. Mechanizm działania enzymów.** Na rysunku przedstawiono jak zmienia się entalpia swobodna  $G$  podczas przemiany substratów  $S$  w produkty  $P$ , zachodzącej przez stan przejściowy  $TS^\ddagger(2)$ , charakteryzujący się najwyższą wartością entalpii swobodnej. Enzymy ułatwiają tworzenie stanu przejściowego – w ich obecności reakcja zachodzi przez stan przejściowy  $TS^\ddagger(1)$ .

## II.4. Kinetyka reakcji enzymatycznych

Najprostszy model matematyczny opisujący kinetykę reakcji enzymatycznej zaproponowali w 1913 roku: niemiecki biochemik, Leonor Michaelis i Maud Leonora Menten<sup>4</sup>. Forma matematyczna zaproponowanego przez nich równania kinetycznego, znanego jako **równanie Michaelisa-Menten**, okazała się na tyle uniwersalna, że została potem wykorzystana do opisu kinetyki wzrostu mikroorganizmów<sup>5</sup>.

Model Michaelisa-Menten zakłada, że etapem pośrednim w procesie przekształcenia substratu  $S$  w produkt  $P$  jest utworzenie kompleksu aktywnego enzym-substrat  $E-S$ . Na istnienie stanu przejściowego w postaci kompleksu  $E-S$  wskazuje fakt „wysycania” enzymu w obecności wysokiego stężenia substratu. Oznacza to, że jeżeli prowadzimy eksperyment przy stałym stężeniu enzymu, to na początku zwiększanie stężenia substratu powoduje wzrost

<sup>4</sup> M. L. Menten (1876-1960) jako jedna z pierwszych kobiet w Kanadzie zdobyła stopień doktora medycyny. Ponieważ nie mogła pracować naukowo w swoim kraju (tytuł lekarza otrzymała na Uniwersytecie w Toronto w 1911 roku na podstawie wyników badań prowadzonych w Chicago), zdecydowała się na emigrację do Niemiec, gdzie w 1916 roku obroniła pracę doktorską właśnie pod kierunkiem Michaelisa. Potem pracowała naukowo w Stanach Zjednoczonych a dopiero od 1950 roku w Kanadzie.

<sup>5</sup> Równanie Monoda (Monod, J. The growth of bacterial cultures. *A. Rev. Microbiol.* 3, 371-394, 1949).

szybkości reakcji. Jednak po przekroczeniu pewnego stężenia granicznego, dalsze zwiększanie stężenia substratu nie przyspiesza już zachodzącej reakcji. Jest to efektem wykorzystania wszystkich miejsc aktywnych w strukturze enzymu. Wówczas, kolejne kompleksy  $E-S$  mogą być tworzone tylko po rozpadzie już istniejących kompleksów, prowadzącym do uwolnienia cząsteczek enzymu. Ponadto, istnienie stanu przejściowego  $E-S$  zostało wykazane metodami krystalograficznymi i spektroskopowymi.

Enzym po związaniu substratu (substratów) ustawia je w optymalnej orientacji przestrzennej do zajścia katalizowanej reakcji. Zgodnie z założeniami modelu Michaelisa-Menten, po odwracalnej reakcji tworzenia kompleksu aktywnego  $E-S$ , następuje jego nieodwracalny rozpad do produktu  $P$  i enzymu  $E$ :



Szybkości reakcji cząstkowych tego procesu wynoszą:

$$\begin{aligned} v_{+1} &= k_{+1}[E] \cdot [S] \\ v_{-1} &= k_{-1}[E-S] \\ v_2 &= k_2[E-S] \end{aligned} \quad (6)$$

Szybkość zużywania substratu  $S$  przedstawia równanie:

$$-\frac{d[S]}{dt} = v_{+1} - v_{-1} = k_{+1}[E] \cdot [S] - k_{-1}[E-S] \quad (7)$$

podczas gdy szybkość tworzenia produktu  $P$  jest równa:

$$\frac{d[P]}{dt} = v_2 = k_2[E-S] \quad (8)$$

Zmiany stężenia kompleksu  $E-S$  w czasie przedstawia zależność:

$$\frac{d[E-S]}{dt} = v_{+1} - v_{-1} - v_2 = k_{+1}[E] \cdot [S] - k_{-1}[E-S] - k_2[E-S] \quad (9)$$

Gdy szybkość tworzenia kompleksu  $E-S$  (równa  $v_{+1}$ ) jest równa szybkości jego rozpadu w obydwu kierunkach ( $v_{-1}+v_2$ ), to stężenie kompleksu aktywnego  $E-S$  nie zmienia się:

$$\frac{d[E-S]}{dt} = 0 \quad (10)$$

W tak zdefiniowanym stanie ustalonym (stacjonarnym) możliwe jest rozwiązanie równań (7) i (8). Zauważmy, że w rozpatrywanym układzie enzym występuje w formie wolnej  $E$  i w formie kompleksu aktywnego  $E-S$ . Wobec tego, całkowite stężenie enzymu w układzie:

$$[E_0] = [E] + [E-S] \quad (11)$$

Z równań (9-11) otrzymujemy wyrażenie na stężenie kompleksu aktywnego  $E-S$ :

$$[E - S] = \frac{k_{+1}[S]}{k_2 + k_{-1} + k_{+1}[S]} [E_0] \quad (12)$$

Po wstawieniu tej zależności do równania (7) lub (8), otrzymujemy wyrażenie na szybkość prowadzonej reakcji enzymatycznej (wyrażoną jako szybkość zużywania substratu  $S$  lub szybkość powstawania produktu  $P$ ). Zgodnie z założeniem o stanie ustalonym, szybkość zużywania substratu jest równa szybkości powstawania produktu - patrz równania (9) i (10):

$$V = \frac{k_{+1}k_2[S]}{k_2 + k_{-1} + k_{+1}[S]} [E_0] \quad (13)$$

Kolejne założenia, o stałości stężenia  $E_0$  w trakcie procesu i znacznym nadmiarze substratu  $S$  w stosunku do ilości enzymu<sup>6</sup> pozwalają nam uprościć równanie (13) do formy zaproponowanej przez Michaelisa i Menten:

$$V = k_2[E_0] \times \frac{k_{+1}[S]}{k_2 + k_{-1} + k_{+1}[S]} = k_2[E_0] \times \frac{k_{+1}[S]}{k_{+1} \left( \frac{k_2 + k_{-1}}{k_{+1}} + [S] \right)} = V_{\max} \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (14)$$

gdzie  $K_M = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_{+1}}$  stała Michaelisa

$V_{\max} = k_2[E_0]$  maksymalna szybkość reakcji, kiedy  $[E-S]=[E_0]$ , czyli gdy cały enzym jest zaangażowany w tworzenie kompleksu - proszę porównać z równaniem (8)

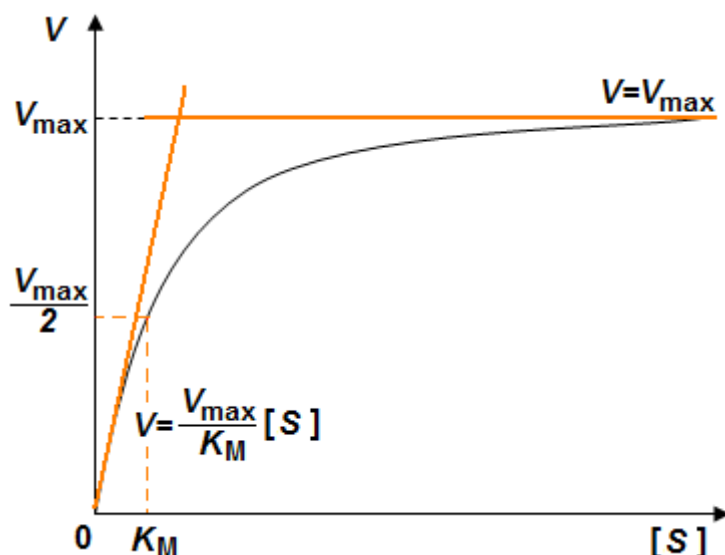
Stała Michaelisa ma wymiar stężenia i z równania (14) wynika, że dla  $[S] = K_M$ , szybkość katalizowanej reakcji osiąga połowę szybkości maksymalnej:

$$[S] = K_M \quad \Leftrightarrow \quad V = \frac{1}{2} V_{\max} \quad (15)$$

Wobec tego, prowadząc serię pomiarów szybkości procesu enzymatycznego dla różnych stężeń substratu można wyznaczyć stałą Michaelisa, która jest takim stężeniem substratu, przy którym szybkość katalizowanej reakcji osiąga połowę wartości maksymalnej (Rysunek 3)<sup>7</sup>.

<sup>6</sup>  $[S] \gg [E_0]$  – proszę się zastanowić, w którym momencie wykorzystano to założenie?

<sup>7</sup> Dokładniejsze wyznaczenie parametrów równania Michaelisa-Menten jest możliwe po przekształceniu tego równania do postaci Lineweavera-Burke'a, Hanesa lub Eadie-Hofstee'a (po dobraniu odpowiedniego układu współrzędnych otrzymujemy wykresy liniowe).



**Rysunek 3.** Szybkość reakcji enzymatycznej  $V$  w funkcji stężenia substratu  $S$  dla procesu przebiegającego zgodnie z modelem Michaelisa-Menten. Na wykresie przedstawiono sposób wyznaczenia wartości stałej  $K_M$  oraz uproszczone formy równania Michaelisa-Menten właściwe dla skrajnych stężeń substratu  $S$ .

Stała  $K_M$  jest odwrotnie proporcjonalna do powinowactwa enzymu do substratu - jej małe wartości świadczą o dużym powinowactwie. Na Rysunku 3 przedstawiono jak szybkość reakcji  $V$  zależy od stężenia substratu  $S$ . Na krzywej możemy wyróżnić dwa obszary kinetyczne. Dla bardzo niskich stężeń substratu, równanie (14) można uprościć do postaci:

$$[S] \ll K_M \quad \Leftrightarrow \quad V = \frac{V_{\max}}{K_M} [S] \quad (16)$$

Przy niskich stężeniach substratu proces przebiega zatem zgodnie z mechanizmem reakcji I-rzędowej. Z kolei, przy wysokich stężeniach substratu, następuje całkowite „wysycenie” enzymu i reakcja zachodzi z szybkością maksymalną dla danego stężenia enzymu:

$$[S] \gg K_M \quad \Leftrightarrow \quad V = V_{\max} \quad (17)$$

Należy zaznaczyć że równanie Michaelisa-Menten nie jest właściwe do opisu enzymów allosterycznych, czyli enzymów wielojednostkowych, zawierających kilka miejsc aktywnych w obrębie jednej cząsteczki. W przypadku tego typu enzymów, cząsteczki substratu wiązane są kolejno do miejsc aktywnych, przy czym związanie substratu z jednym miejscem może za sobą pociągać zmiany konformacyjne w obrębie enzymu, które ułatwiają wiązanie substratów do następnych miejsc aktywnych.

## II.5. Regulacja procesów enzymatycznych

Szybkość reakcji enzymatycznej zależy od ilości substratu (zgodnie z równaniem Michaelisa-Menten, jeżeli stężenie enzymu jest stałe). Przy nadmiarze substratu, enzym ulega

„wysyceniu” i szybkość reakcji można zwiększyć przez dodanie nowej porcji enzymu. W obszarze maksymalnej szybkości reakcji, jej postęp zależy bowiem liniowo od stężenia enzymu:

$$V = V_{\max} = k_2[E_0] \quad (18)$$

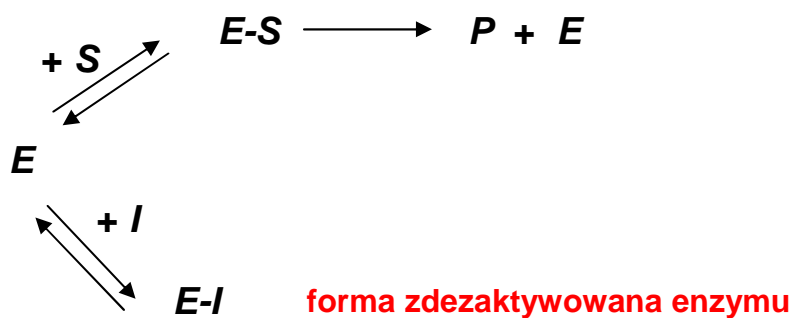
Zależność ta wykorzystywana jest przy oznaczaniu stężenia enzymów w próbkach biologicznych, w celach diagnostycznych.

Ponadto, enzymy podlegają regulacji za pomocą wysoce specyficznych mechanizmów kontroli (z wykorzystaniem tak zwanego **centrum allosterycznego**) oraz niespecyficznie, w efekcie zmieniających się parametrów układu takich jak odczyn pH, temperatura, siła jonowa i innych.

Centrum allosteryczne jest miejscem w strukturze białeczki, do którego wiązane są inhibitory bądź aktywatory danego enzymu. Istnienie tego miejsca warunkuje szybką odpowiedź enzymu na zmieniające się warunki środowiska. Jest to szczególnie ważne w przypadku enzymów regulujących kluczowe dla organizmu procesy, gdyż czyni z enzymu precyzyjną maszynę, przyspieszającą dany cykl biochemiczny dokładnie wtedy, gdy jest to potrzebne. Zapobiega to niepożądanemu wzrostowi stężenia metabolitów (co, w myśl zasady *Dosis facit venenum* może być zabójcze dla organizmu) a przede wszystkim zapobiega marnotrawieniu energii na prowadzenie procesów, które są zbędne. I tak, w przypadku szlaków metabolicznych, rolę inhibitorów często pełnią ich końcowe produkty, które na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego hamują enzym katalizujący pierwszą reakcję danego szlaku (w czym znowu przejawia się oszczędność natury).

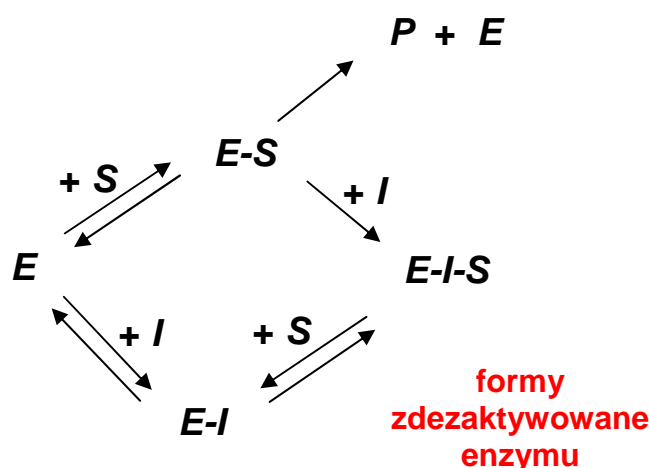
Inhibicja może być nieodwracalna - polegać na trwałym związaniu cząsteczki inhibitora (*I*) z enzymem, bądź może mieć charakter odwracalny, kiedy utworzony kompleks enzym-inhibitor (*E-I*) szybko dysocjuje. Zjawisko **inhibicji nieodwracalnej** jest wykorzystywane w działaniu niektórych antybiotyków – na przykład penicylina blokuje transpeptydazę – enzym niezbędny do syntezy bakteryjnych ścian komórkowych.

Podczas **inhibicji odwracalnej** cząsteczka inhibitora jest czasowo wiązana z miejscem aktywnym enzymu bądź z innym centrum allosterycznym. W inhibicji o charakterze **kompetytywnym**, inhibitor, charakteryzujący się podobną strukturą do substratu, rywalizuje z nim o miejsce w centrum aktywnym:



W zależności od stosunku stężeń substratu i inhibitora, jeden z tych związków wygrywa rywalizację o miejsce aktywne. Przy dużym nadmiarze substratu wpływ inhibicji kompetencyjnej może być całkowicie zniesiony.

W **inhibicji niekompetytywnej** w strukturze enzymu istnieją oddzielne miejsca wiązania substratu i inhibitora, jednak cząsteczka ze związanym inhibitorem zmienia swoją konformację tak, że niemożliwe jest już wiązanie substratu, lub związany substrat nie może być przekształcony w produkt reakcji:



W inhibicji niekompetytywnej tworzone są dwa typy kompleksów enzym - inhibitor: kompleks  $E-I$ , w którego skład wchodzi cząsteczka enzymu i inhibitor, oraz kompleks  $E-I-S$  powstający, gdy z cząsteczką enzymu jest równocześnie związany inhibitor i substrat.

Aktywność enzymów zależy również od **intensywnych parametrów środowiska**. I tak, przebieg reakcji enzymatycznych, podobnie jak wszystkich reakcji chemicznych, silnie zależy od temperatury, co jest efektem zmiany aktywności biorących w niej udział cząsteczek. Wpływ temperatury  $T$  na szybkość reakcji chemicznej  $k$  opisuje równanie sformułowane przez Svante Arrheniusa, szwedzkiego chemika, w 1889 roku<sup>8</sup>:

<sup>8</sup> Oprócz ww. równania, na cześć Arrheniusa zostały też nazwane: laboratorium na Uniwersytecie Sztokholmskim i ... krater na księżycu. Wynika to z wszechstronnych zainteresowań naukowca, który zajmował się również toksykologią, geologią, astronomią i astrofizyką. Należałoby tu również wspomnieć o czynnym zaangażowaniu Arrheniusa w tworzenie Narodowego Instytutu Biologii Ras w Uppsali (*Statens Institut för*

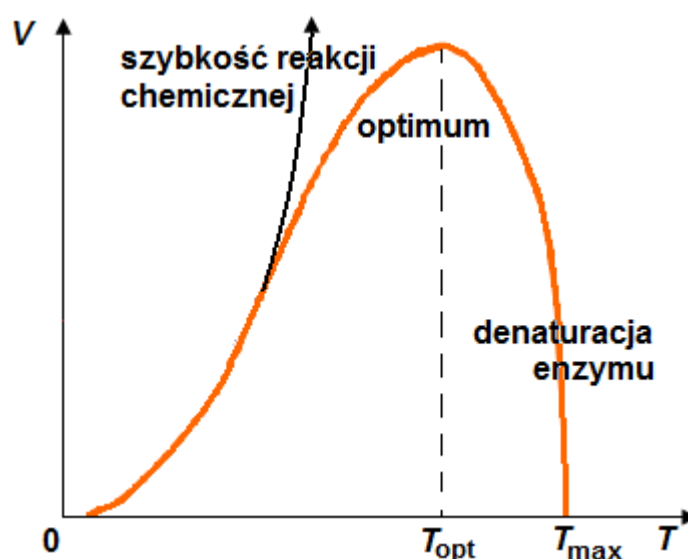
$$k = A \cdot \exp(-E_a / RT) \quad (19)$$

Gdzie  $A$  – stała (czynnik przedwykładniczy)

$E_a$  – energia aktywacji

$R$  – stała gazowa

Zgodnie z regułą van't Hoffa, wzrost temperatury o każde 10°C powoduje 2-4-krotny wzrost szybkości reakcji. Oczywiście, w przypadku reakcji enzymatycznych nie jest możliwe nieograniczone zwiększanie temperatury, gdyż prowadziłoby to do dezaktywacji enzymu<sup>9</sup>. Enzymy białkowe są szczególnie wrażliwe na denaturację termiczną, która prowadzi do zniszczenia ich trzeciorzędowej struktury, kluczowej dla działania miejsca aktywnego.



**Rysunek 4. Wpływ temperatury na aktywność enzymu.** Na wykresie przedstawiono jak szybkość reakcji enzymatycznej zmienia się wraz ze wzrostem temperatury, zaznaczono temperaturę optymalną  $T_{opt}$  dla przebiegu reakcji enzymatycznej oraz temperaturę maksymalną  $T_{max}$ , po przekroczeniu której następuje denaturacja enzymu.

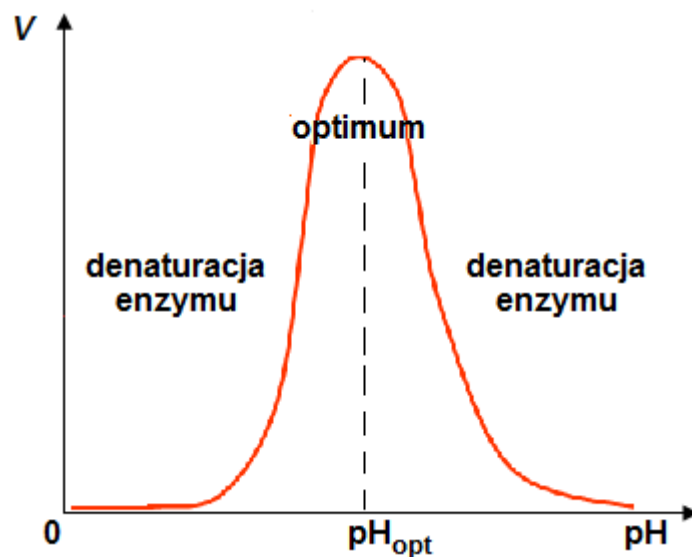
W przypadku enzymów wykorzystywanych przemysłowo, kiedy regulacja szybkości reakcji przy pomocy temperatury wydaje się być kuszącym rozwiązaniem, postuluje się stosowanie

*Rasbiologi*). Badania prowadzone w Instytucie wywarły duży wpływ na rozwój nazistowskiej eugeniki i stanowiły „naukowe” uzasadnienie dla programu sterylizacyjnego, realizowanego w Szwecji w latach 1936-1976 (21 tysięcy przymusowych sterylizacji!)

<sup>9</sup> Nawet niewielkie zmiany temperatury mogą powodować dramatyczny wzrost lub spadek aktywności enzymów, odczuwalny wyraźnie przez organizm – długotrwałe stany gorączkowe lub stany osłabienia organizmu wynikają ze zmiany temperatury ciała tylko o  $\pm 2^\circ\text{C}$ ! Już tak niewielkie zmiany w temperaturze znacząco wpływają na funkcjonowanie organizmu jako całości. Dalsze obniżanie temperatury ciała prowadzi do hipotermii, czyli przechłodzenia. Ostre objawy hipotermii, w tym sztywność mięśni i utrata świadomości, pojawiają się, gdy temperatura ciała spadnie do  $30^\circ\text{C}$ . Dalsze wychłodzenie, poniżej  $28^\circ\text{C}$  prowadzi do śmierci, której bezpośrednią przyczyną jest zbyt niska temperatura serca i mózgu. Wychłodzenie organizmu zachodzi znacznie (ok. 20-razy) szybciej w wodzie, ze względu na jej większe przewodnictwo cieplne. Szacuje się, że czas przeżycia człowieka w wodzie o temperaturze poniżej  $10^\circ\text{C}$  wynosi tyle minut ile temperatura wody! Doskonale tłumaczy to zasięg jednej z największych tragedii morskich – na pokładzie zatopionego transatlantyku Titanic zginęło ponad 1500 osób. W nocy 14/15.04.1912, kiedy doszło do tragedii, temperatura wody spadła bowiem do  $0^\circ\text{C}$ , co znacząco obniżyło szanse przeżycia pasażerów statku.

enzymów wyizolowanych z organizmów termofilnych. Cały metabolizm termofili jest dostosowany do wysokich temperatur i ich białka są stabilne w temperaturach sięgających 80°C (a nawet 105°C dla hipertermofili!).

Czynnikiem istotnym dla szybkości reakcji enzymatycznej jest też stężenie jonów wodorowych w mieszaninie reakcyjnej. W zależności od odczynu środowiska różny jest bowiem stopień dysocjacji reszt aminokwasowych, co bezpośrednio wpływa na oddziaływanie enzymu z substratem (poprzez zmianę konformacji całego enzymu lub zmianę właściwości jego miejsca aktywnego). Skrajne wartości pH mogą nawet doprowadzić do denaturacji enzymu.



**Rysunek 5. Wpływ pH na aktywność enzymu.** Na wykresie przedstawiono jak zmiany pH wpływają na szybkość reakcji enzymatycznej. Zaznaczono optymalną wartość pH – pH<sub>opt</sub>, przy której reakcja przebiega najszybciej oraz zakresy pH, w których zachodzi denaturacja enzymu.

Enzymy działają więc najefektywniej w ściśle określonym przedziale pH, zależnie od ich struktury i charakteru oddziaływań enzym-substrat. Umożliwia to na przykład regulację aktywności enzymów działających w przewodzie pokarmowym (enzymy aktywne w silnie kwaśnym pH żołądka, jak pepsyna czy lipaza żołądkowa, są dezaktywowane w dwunastnicy, która zawdzięcza swoje alkaliczne środowisko sokowi trzustkowemu).

### III. Immobilizacja enzymów

#### III.1. Zalety i wady procesu immobilizacji

Jak już wspomniano, enzymy mogą być stosowane w przemyśle w formie zawiesiny (o różnym stopniu czystości) lub w postaci immobilizowanej. **Immobilizacja** jest procesem polegającym na uwięzieniu enzymu w pewnej określonej przestrzeni. Enzym immobilizowany powinien charakteryzować się aktywnością katalityczną i być przeznaczony do wielokrotnego stosowania.



Termin **enzym immobilizowany** został precyzyjnie zdefiniowany dopiero w 1971 roku, w wiele lat po pierwszym praktycznym wykorzystaniu procesu immobilizacji. Już w XVII wieku do produkcji kwasu octowego z etanolu używano bowiem bakterii *Acetobacter* umieszczonych na wiórach bukowych. Z kolei enzymu immobilizowanego użyto po raz pierwszy podczas I wojny światowej – wobec deficytu kwasu siarkowego przeprowadzono reakcję inwersji sacharozy w obecności inwertazy immobilizowanej na węglu aktywnym (otrzymanym poprzez zwęglenie kości).

Immobilizacja enzymów umożliwia zwiększenie wydajności procesów biotechnologicznych<sup>10</sup>. Wydajność procesu możemy zdefiniować poprzez wydajność syntezy produktu, czyli stosunek masy otrzymanego produktu w stosunku do masy substratu. Wzrost wydajności procesu jest możliwy, ponieważ immobilizacja zwiększa trwałość enzymów i ułatwia ich odzyskiwanie z mieszaniny reakcyjnej, co z kolei umożliwia ich wielokrotne używanie w procesach prowadzonych w układach okresowych lub ciągłych. Enzymy immobilizowane charakteryzują się zwiększoną stabilnością w zmieniających się warunkach pH i temperatury oraz w środowisku rozpuszczalników organicznych.

Z drugiej strony, w trakcie procesu immobilizacji może nastąpić częściowa dezaktywacja enzymu. Enzym immobilizowany często charakteryzuje się niższą aktywnością niż enzym „wolny” pracujący w tych samych warunkach<sup>11</sup> (aktywności enzymu nie należy mylić z ostateczną wydajnością prowadzonego procesu). Może to wynikać ze sterycznego zablokowania centrum aktywnego, niewłaściwych naprężeń w obrębie cząsteczki enzymu a także mechanicznych uszkodzeń enzymu. Nie do pominięcia są też opory dyfuzyjne, które zmniejszają efektywne stężenie substratu docierającego do katalizatora, i tym samym ograniczają szybkość zachodzącej reakcji. Należy też pamiętać o kosztach samej immobilizacji, które muszą być uwzględnione w analizie ekonomicznej całego procesu.

---

<sup>10</sup> Immobilizacja może też wpływać na wzrost wydajności procesów prowadzonych w obecności homogenatów komórkowych i całych komórek. Na przykład wydajność reakcji redukcji kodeinonu do kodeiny pod wpływem wyciągu z maku lekarskiego (*Papaver somniferum*) rośnie z 60% (reakcja w zawiesinie) do 70% (biokatalizator unieruchomiony w żelu alginianowym) a nawet do ponad 80% wskutek immobilizacji biokatalizatora w piance poliuretanowej. Kodeina (metylmorfina) jest substancją czynną o działaniu przeciwbólowym i przeciwkaszlowym. Podczas II wojny światowej była używana jako substytut morfiny. Immobilizacja komórek na nośnikach jest z kolei wskazana w produkcji metabolitów wtórnych. Zagęszczenie komórek wywołane immobilizacją imituje warunki panujące w tkankach roślinnych (gradient pożywki i metabolitów, zwiększona odporność na uszkodzenia mechaniczne). I tak, wzrost produkcji alkaloidów purynowych zaobserwowano po immobilizacji komórek *Coffea arabica* w alginianie wapnia.

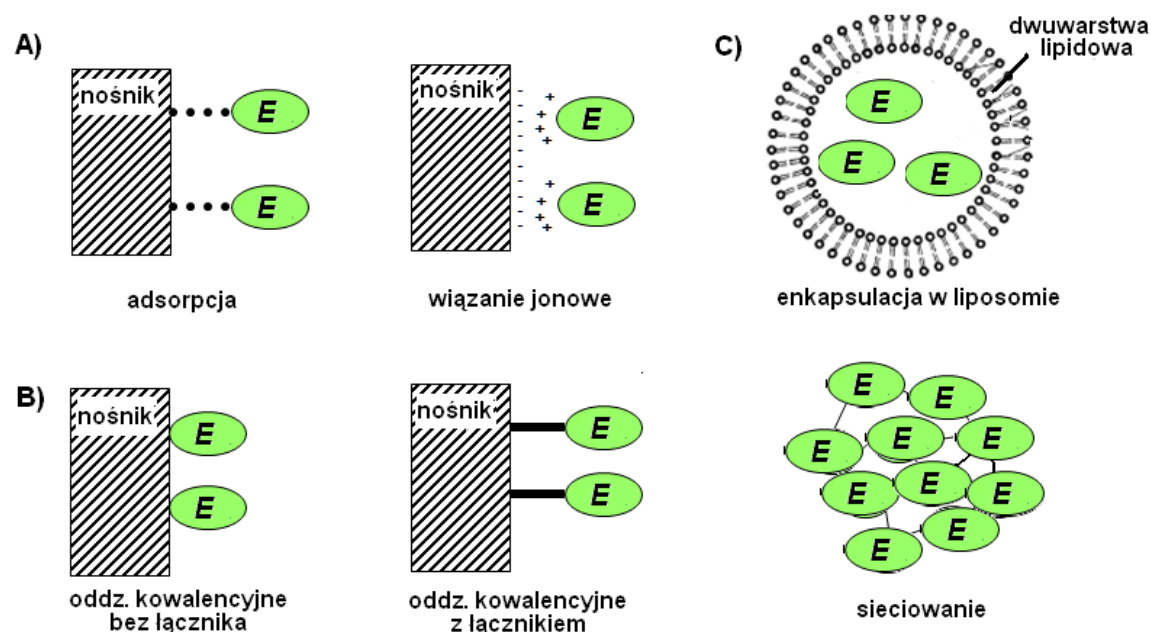
<sup>11</sup> Immobilizacja może też wpływać na wzrost aktywności enzymów – taki efekt zaobserwowano w przypadku enzymów katalizujących reakcje stereoselektywnej estryfikacji i transestryfikacji, po ich unieruchomieniu metodą sieciowania kryształów enzymu.

Alternatywną w stosunku do immobilizacji metodą unieruchomienia enzymów, może być prowadzenie procesu w reaktorze membranowym, gdzie przestrzeń zajęta przez enzym jest ograniczona przez półprzepuszczalną membranę.

### III.2. Metody immobilizacji enzymów

Metoda immobilizacji i właściwy dobór nośnika determinują właściwości katalityczne związanego enzymu. Decydując się na określony typ nośnika należy zwrócić uwagę zarówno na właściwości biochemiczne samego enzymu (w tym jego wielkość, charakter grup funkcyjnych, aktywność oraz pH- i termostabilność), typ katalizowanej reakcji, jak i charakterystykę fizykochemiczną nośnika (jego stabilność chemiczną i wytrzymałość mechaniczną, dostępne grupy funkcyjne, porowatość, stopień rozwinięcia powierzchni).

W zależności od wybranej metody immobilizacji, enzym może być zaadsorbowany na nośniku lub związany z nim wskutek oddziaływań elektrostatycznych. Jest to immobilizacja fizyczna. Enzym może również być immobilizowany chemicznie: tworzyć z nośnikiem wiązanie kowalencyjne lub być uwięziony w sieci tworzonej przez czynniki sieciujące. Trzeci rodzaj immobilizacji, immobilizacja mechaniczna, polega na unieruchomieniu enzymu w matrycy lub jego okapsułkowaniu. Podstawowe metody immobilizacji zostały przedstawione na Rysunku 6.



**Rysunek 6. Główne metody immobilizacji enzymów:** A) immobilizacja fizyczna; B) immobilizacja chemiczna; C) immobilizacja mechaniczna.

Immobilizacja fizyczna jest efektem niespecyficznych oddziaływań pomiędzy enzymem a nośnikiem, które są efektem sił van der Waalsa, oddziaływań elektrostatycznych,

oddziaływań hydrofobowych i powstawania wiązań wodorowych. Siła tych oddziaływań jest w ewidentny sposób zależna od środowiska (siły jonowej medium, odczynu pH, stopnia rozwinięcia powierzchni nośnika). Pociąga to za sobą łatwość desorpcji enzymu i ograniczoną trwałość wobec zmieniających się warunków środowiska.

Zdecydowaną zaletą immobilizacji chemicznej nad immobilizacją opartą na oddziaływaniach niespecyficznych jest jej większa trwałość. Wiązanie kowalencyjne może być tworzone bezpośrednio pomiędzy grupami funkcyjnymi enzymu i nośnikiem albo powstawać z udziałem łącznika. Cząsteczki łącznika są niezbędne w procesie sieciowania (określane są wówczas mianem czynników sieciujących). Spośród metod immobilizacji mechanicznej na szczególną uwagę zasługuje kapsułkowanie enzymów w sztucznych liposomach, czyli pęcherzykach lipidowych, co umożliwia łatwą inkorporację enzymu w błony biologiczne.

#### **IV. Podstawowe informacje o inwertazie**

Inwertaza (właściwie  $\beta$ -fruktofuranazydaza, E.C. 3.2.1.26) jest enzymem z klasy hydrolaz (podklasa: glikozydazy), który katalizuje reakcję rozkładu sacharozy do glukozy i fruktozy - łatwo przyswajalnych cukrów prostych. U człowieka, na wewnętrznej powierzchni komórek nabłonkowych wyściełających jelito cienkie, występują dwa typy enzymów umożliwiających przeprowadzenie dwucukrów do łatwo wchłanianych cukrów prostych – oprócz inwertazy, stwierdzono obecność laktazy – enzymu, który katalizuje reakcję hydrolizy laktozy do glukozy i galaktozy. Z kolei inwertaza obecna w ślinie pszczoł, umożliwia im przeprowadzenie cukrów złożonych obecnych w nektarze kwiatowym do postaci monocukrów, warunkując tym samym proces wytwarzania miodu.

Inwertaza jest wykorzystywana do celów komercyjnych głównie w przemyśle spożywczym (w cukiernictwie). Przykładem może być produkcja czekoladek z nadzieniem. Nadzienie w formie stałej, o dużej zawartości sacharozy i z dodatkiem inwertazy, jest pokrywane warstwą czekolady. W trakcie kilkudniowego (a czasami nawet kilkutygodniowego) procesu „dojrzewania” następuje hydroliza sacharozy, prowadząca do uwolnienia cukrów prostych - w efekcie tego procesu nadzienie zostaje upłynnione.

Do celów przemysłowych, inwertaza jest otrzymywana z komórek drożdży. Najwyższą aktywność tego enzymu stwierdzono w pH 4.5 i w temperaturze 60°C.