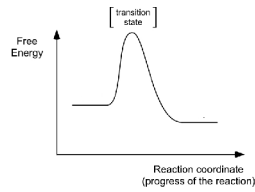
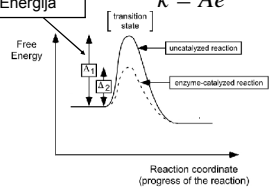


Encimi so katalizatorji reakcij v bioloških sistemih

Pri vsaki kemijski reakciji je za nastanek nove vezi potrebno pretrgati stare vezi



$$k = Ae^{-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}}$$



Encimi:

- Stabilizirajo prehodno stanje kemijske reakcije, kar zniža aktivacijsko energijo
- Omogočajo, da potekajo kemijske (biokemijske) reakcije relativno hitro že pri nizki temperaturi

Definiranje pojmov, ki nastopajo v povezavi z encimsko kataliziranimi reakcijami

- **Encim:** Katalizator (protein), ki pospeši reakcijo
- **Substrat:** Molekula, katere pretvorbo v produkt pospeši encim. Kaj je substrat in kaj produkt je odvisno od koncentracije obeh spojin!!!
- **Kofaktor:** Nепroteinski del v encimu. Organska molekula ali ion (največkrat kation), ki je ključna za aktivnost encima
- **Koencim:** Organska molekula, ki je kofaktor
- **Prosteična skupina:** Kovalentno vezan kofaktor (koencim)
- **Apoencim:** proteinski del encima brez kofaktorja (če je to encim, ki ga potrebuje)
- **Holoencim:** Aktiven encim sestavljen iz proteinskega dela in kofaktorja
- **Inhibitor:** zaviralec encimske aktivnosti (lahko je protein, manjša organska ali anorganska molekula ali kovinski ion)
- **Aktivator:** Nekateri ioni, ki pospešijo delovanje encima, a niso popolnoma esencialni (nadomesti jih lahko drug strukturno podoben ion)
- **Cimogen:** Neaktiven encim, ki po aktivaciji (odcepu dela polipeptidne verige) postane aktiven
- **Izoencimi:** Encimi, ki se le malo razlikujejo v AK zaporedju in imajo enako katlitično funkcijo

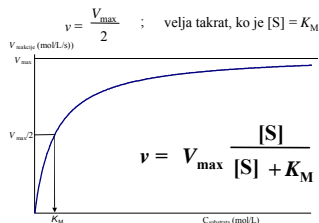
Klasifikacija encimov glede na tip reakcije, ki jo katalizirajo

Klasifikacijsko število	razred encimov	vrsta reakcije, ki jo katalizirajo
1	oksidoreduktaze	prenos elektronov, navadno v obliki hidratnih ionov ali vodikovih atomov
2	transferaze	prenos funkcionalnih skupin z ene molekule na drugo
3	hidrolaze	razcep vezi s hidrolizo
4	liaza	nastanek dvojnih vezi z odvzemanjem skupin ali adicija skupin na dvojne vezi
5	izomeraze	pretvorba enega izomera v drugega s prenosom skupin znotraj molekule
6	ligaze	z razgradnjo ATP sklopljena tvorba vezi C-C, C-S, C-O in C-N

Poimenovanje encimov:

- Končnica AZA
- Ime v povezavi s tipom reakcije in substratom/produktom, kofaktorjem npr. (polifenol-oksidadza)
- Klasifikacija v šest razredov (+3 hierarhični podrazredi)
- Encim polno okarakteriziramo s 4 zaporednimi števili

Hitrost encimskih reakcija ne narašča linearno s koncentracijo substrata (Michaelis-Mentenova kinetika)



- K_M je merilo za afiniteto encima in substrata. Čim nižji je K_M (koncentracija substrata pri kateri je dosežena polovica maksimalne hitrosti), večja je afiniteta (privlak) obeh molekul
- V_{max} je maksimalna hitrost, ki jo doseže encim pri popolni nasičenosti s substratom. Je merilo katalitske učinkovitosti encima za pretvorbo substrata (ko je ta že vezan na encim).

Katalitska učinkovitost encimov (pospešitev hitrosti glede na neencimsko katalizirano reakcijo) je zelo velika

Reaction	Catalyst	Free Energy of Activation (kcal mol ⁻¹)	Relative Reaction Rate ^a
H ₂ O ₂ → 1/2 O ₂ + H ₂ O	None (apocoin)	18.0	1.0
	Iodide	13.5	2.1 × 10 ³
	Platinum	11.7	4.2 × 10 ⁶
	Catalase (1.1.1.6)	5.5	1.5 × 10 ⁹
p-Nitrophenyl acetate hydrolysis	None (apocoin)	21.9	1.0
	H ⁺	18.0	7.2 × 10 ³
	OH ⁻	16.2	1.8 × 10 ⁴
	Iridazole	15.9	2.5 × 10 ⁴
	Serine protease ^b	13.1	6.9 × 10 ⁶
Sucrose hydrolysis	Lipopterin lipase	11.4	5.0 × 10 ⁷
	H ⁺	25.6	1.0
Urea → H ₂ O + CO ₂ → 2NH ₃	Invertase (3.2.1.26)	11.0	5.1 × 10 ¹⁰
	H ⁺	24.5	1.0
Casein hydrolysis	Urease (3.5.1.5)	8.7	4.2 × 10 ¹²
	H ⁺	20.6	1.0
Olefin hydrolysis	Trypsin (3.4.4.4)	12.0	15.0 × 10 ⁶
	H ⁺	13.2	1.0
Olefin hydrolysis	Lipase (3.1.1.3)	4.2	4.0 × 10 ⁸
	H ⁺	13.2	1.0

- Enote za merjenje encimske aktivnosti ("aktivna" količina encima)
- 1 kat (katal): količina encima, ki pretvori 1 mol substrata v 1 sekundi
 - 1 U: količina encima, ki pretvori 1 μmol substrata v 1 minuti

Na kakšen način (s katerimi mehanizmi) encimi katalizirajo pretvorbo substrata/ov v produkt/e

- **Približevanje:** V aktivnem mestu se izjemno poveča lokalna koncentracija dveh substratov in tudi čas, ko sta blizu skupaj (verjetnost, da bo prislo do reakcije se zelo poveča)
- **Kovalentna kataliza:** Pride do kovalentnega intermedata med encimom (funkcionalna skupina na stranski verigi ali kofaktor) in substratom. Nastali intermedat se pretvori v produkt.
- **Kislinsko-bazična kataliza:** Stranske verige aminokislin s kislinsko baznimi lastnostmi, lahko substratu donirajo ali odvzamejo proton. pH v aktivnem mestu je lahko drugače od pH-ja v raztopini, kar omogoča, da se hitrost določenih reakcij zelo poveča.
- **Redukcijsko-oksidacijska kataliza:** Pogostokrat so v aktivnem mestu redoks aktivni ioni (baker, železo), ki substratu donirajo ali odvzamejo elektron (analogija s kislinsko-bazno katalizo)
- **"Ukrivljanje in napenjanje" vezi v substratu:** Vezava substrata v aktivno mesto encima je energetsko ugodna, vendar pri tej vezavi pride tudi do manjših strukturnih sprememb v molekuli substrata. Posledično se določene vezi lažje razcepijo.

Effect of Point Mutations on Catalytic Constants of Subtilisin Protease

Enzyme	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (μM)	k_{cat}/K_M (s ⁻¹ M ⁻¹)
Wild-type	6.2×10^3	40	6.2×10^5
SFR221 → ALA	5.4×10^{-5}	630	8.4×10^{-2}
HIS4 → ALA	1.9×10^{-2}	1300	1.5×10^{-1}
ASP32 → ALA	1.8×10^{-2}	1400	1.3×10^1
All three mutations	7.8×10^{-1}	730	1.1×10^{-1}

Kateri dejavniki vplivajo na aktivnost encimov

- Koncentracija substrata
- Koncentracija encima
- Temperatura
- pH
- Vodna aktivnost
- Ionska jakost
- Polarnost medija
- Viskoznost medija (vpliva na difuzijo)
- Pristotnost specifičnih zaviralcev reakcije
- Pristotnost specifičnih aktivatorjev reakcije

Med procesiranjem živil prihaja predvsem do sprememb temperature, pH in vodne aktivnosti

Začetna hitrost kemijske reakcije najprej narašča

potem pa prične pri določeni temperaturi strmo padati $k = Ae^{-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}}$

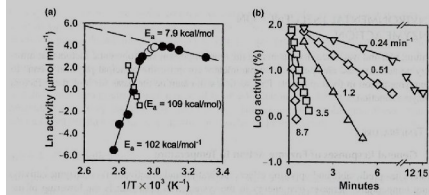
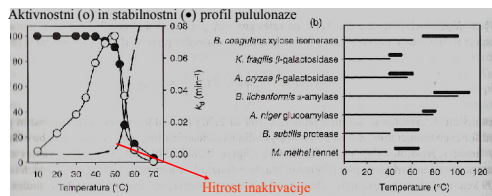


FIGURE 6.28 Thermal sensitivity of tomato fruit pectin methyl esterase. (a) Arrhenius plot (Redrawn from Laratta, B., et al. (1995). *Proc. Biochem.*, 30:251–259), where original data appears as circles and only closed circles were used to construct linear approximations. Open square plot is from data derived from panel (b). (b) First-order deactivation plots (Redrawn from Anthon, G.E., et al. (2002). *J. Agric. Food Chem.*, 50:6153–6159.), where increasing slopes of plots correspond to incubation temperatures of 69.8°C, 71.8°C, 73.8°C, 75.8°C, and 77.8°C.

Hitrost encimske katalize: $\ln(k) = \text{konstanta} - E_a/(R \cdot T)$; E_a ali ΔG^\ddagger
Hitrost denaturacije encima: logaritem (%aktivnosti_{ostane}) **oc** časom
 Dejanska izmerjena aktivnost v reakcijski mešanici je vsota teh dveh procesov

Optimalna temperatura za delovanja encima



- Optimalna temperatura za delovanje nekega encima je pri temperaturah, kjer postaja hitrost denaturacije relativno pomembna in začne prispevati k zmanjševanju koncentracije aktivnega encima.
- Optimalna temperatura za uporabo nekega encima ni neka fiksna temperatura, ampak je odvisna tudi od tega, koliko časa želimo, da je encim aktiven.
- Encime največkrat uporabljamo pri temperaturah, ki so od 5 °C do 20 °C nižje od njihovega temperaturnega optimuma. Na ta način jim podaljšamo "življensko dobo".
- Pri termični obdelavi živil pogostokrat želimo, da encimi čim manj vplivajo na živilo, zato je smiselno čim hitreje preskočiti "kritično" temperaturno območje HTSP

Ostali s temperaturo povezani dejavniki, ki vplivajo na hitrost encimsko kataliziranih reakcij

- Slabša topnost plinov pri višjih temperaturah. Če je npr. kisik reaktant, bo lahko prišlo (v primeru velike K_M) do zmanjševanja aktivnosti, čeprav encim ne bo denaturiran.
- Denaturacija pri nizkih temperaturah. Nekateri polimerni encim se lahko denaturirajo pri nizkih temperaturah (oslabijo hidrofobne interakcije, ki držijo poudenote skupaj).
- Temperatura vpliva na interakcije encima in substrata (različen vpliv na hidrofobne, vodikove in elektrostatske interakcije) torej se lahko s temperaturo spreminja K_M
- Prisotnost substratov in tudi inhibitorjev termično stabilizira encime (struktura aktivnega mesta se kasneje poruši)
- Manjši encimi, vodotopni encimi, encimi z večjim številom disulfidnih vezi, encimi v "naravnem okolju", ektarcelularni encimi so največkrat bolj termostabilni
- Določeni deleži denaturiranih encimov se po ohladitvi na temperaturo, ki je nižja od T_d lahko ponovno renaturira (odvisno od encima in od fizikalno kemijskega okolja)

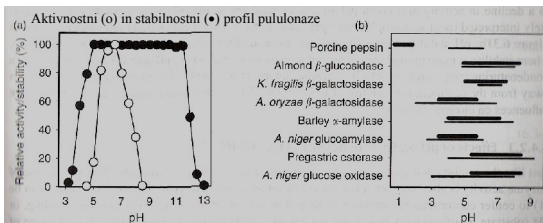
pH vpliva na hitrost encimskih reakcij, saj encim in tudi substrat (včasih) vsebujeta funkcionalne skupine, ki spreminjajo naboj v odvisnosti od pH

Ionization Properties of Amino Acid Ionizable Groups in Enzymes

Ionizable Group	pK _a (25°C)	ΔH_{ion} (kcal mol ⁻¹)	Ionizable Group	pK _a (25°C)	ΔH_{ion} (kcal mol ⁻¹)
Carboxyl			Ammonium		
C-Terminal (α)	3.0-3.2	$\sim 0 \pm 1.5$	N-Terminal (α)	7.5-8.5	10-13
β/γ -Carboxyl (ASP, GLU)	3.0-5.0		ϵ -Amino (LYS)	9.4-10.6	
Imidazolium (HIS)	5.5-7.0	6.9-7.5	Phenolic (TYR)	9.8-10.4	5.0-8.6
Sulfhydryl (CYS)	8.0-8.5	6.5-7.0	Guanidinium (ARG)	11.6-12.6	12

- pH vpliva na stabilnost (denaturacija) in katalitično aktivnost (interakcije+kataliza)
- pH lahko vpliva tudi na selektivnost encima, ki pretvarja več različnih substratov (enkrat bolje eni, drugič drugi)

Aktivnost in stabilnost encimov kot funkcija pH



- pH območje stabilnosti je največkrat širše od območja pH aktivnosti, saj denaturacija (vezana na stabilnost) pomeni tudi izgubo strukture aktivnega mesta (aktivnost)
- Nekateri encimi so najbolj stabilni pri razmerah, kjer niso aktivni (velja za proteinaze-lahko razgrajujejo same sebe)
- Prisotnost inhibitorjev, substratov, aktivatorjev lahko razširi območje pH stabilnosti
- Temperatura in pH sta komplementarna dejavnika pri vplivu na stabilnost encimov. Encim, ki ni pri popolnoma optimalnem pH-ju glede stabilnosti se bo denaturiral pri nižjih temperaturah kot, če so zagotovljeni optimalni pogoji glede pH-ja.

Encimsko katalizirane reakcije pri nizki vodni aktivnosti (a_w) praktično ne potekajo

Voda:

- Medij za difuzijo encimov in substratov
- Reaktant v primeru hidrolitičnih reakcij in produkt v reakcijah kondenzacije

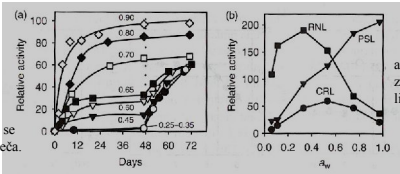
- Pri zelo nizkih a_w (0-0,1) je voda vezana le na najbolj polarne skupine encimov. Proste vode v kateri bi potekal prenos snovi z difuzijo praktično ni, zato je aktivnost zelo majna
- Pri malo višjih a_w (0,1-do 0,4) pride do hidratacije celotnega proteina, še vedno je zelo malo proste vode in posledično nizka encimska aktivnost.
- Večina encimov kaže določeno aktivnost šele pri $a_w \geq 0,4$

TABLE 6.10
 a_w Requirements for Activity of Selected Enzymes

Enzyme	Matrix/Substrate	Minimum a_w	Enzyme	Matrix/Substrate	Minimum a_w
Amylases	Rye flour	0.75	Amylases	Starch	0.40-0.76
	Bread	0.36			
Phospholipases	Pasta	0.45	Phospholipases	Lecithin	0.45
Phytases	Wheat flour	0.96	Lipases	Oil, tributyrin	0.025
Phytase	Grains	0.90	Phenol oxidase	Catechol	0.25
Glucose oxidase	Glucose	0.40	Lipoygenase	Linoleic acid	0.50-0.70

Vpliv a_w na aktivnost encimov

- Po povečanju vodne aktivnosti se encimi reaktivirajo (pri nizki a_w ne izgubijo aktivnosti)
- Čeprav je aktivnost encimov nizka lahko določene spremembe vseeno potekajo (čas)
- Sprememba a_w lahko vpliva na potek reakcije. Pri α -amilazah so favorizirani krajši oligosaharidi, saj zaradi počasnejše difuzije prihaja do večkratne ceptive oligosaharidov
- a_w lahko vpliva na pH optimum (npr. pri PPO se poviša za 0,5, če $a_w = 1 \rightarrow a_w = 0,85$)
- a_w lahko vpliva na K_M (npr. lipaza-najmanjši K_M ima pri $a_w = 0,4$)
- Nizka a_w stabilizira encime, saj so zaradi pomanjkanja vode, strukturne spremembe samega encima počasnejše (mobilnost)
- a_w raztopin lahko zmanjšujemo s snovmi kot so polioli (npr. glicerol). Ti stabilizirajo strukturo proteinov, zaradi večje viskoznosti pa močno upočasnijo reakcije, kar je izjemno primerno za shranjevanje encimov

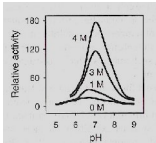


Vpliv a_w na aktivnost fosfolipaze iz ječmena. Po rehidraciji se aktivnost poveča.

a_w optimumi za nekatere lipaze

Vpliv osmolarnosti, ionske jakosti in sušenja na encimsko aktivnost

- Posledica sušenja je povečevanje osmolarnosti in ionske jakosti
- Različni ioni imajo različen vpliv na strukturo proteinov (stabilizacija ali denaturacija)
- Encime lahko v pomanjkanju vode stabiliziramo z osmoprotektanti (polioli, sladkorji, aminokisliline), ki tvorijo z encimi vodikove vezi in elektrostatske interakcije in jih tako stabilizirajo
- Z zmanjšanjem vsebnosti vode lahko obrnemo smer reakcije (npr. proteaze bodo katalizirale sintezo peptidne vezi in ne hidrolize)
- Nekateri** encimi so evolucijsko prilagojeni na okolje z veliko osmolarnostjo ali ionsko jakostjo (npr. halofili). Njihova aktivnost se lahko s povečevanjem ionske jakosti zelo poveča. Ker je pri visoki ionski jakosti zelo malo proste vode, so takšni encimi uporabni za reakcije kondenzacije (npr. proteaza termolizin se v zelo slanah raztopinah uporablja za sintezo dipeptida aspartama (sladilo))



Aktivnost proteaze termolizin kot funkcija koncentracije NaCl

Vpliv zmrzovanja na encimsko aktivnost

Tudi na zmrzovanje lahko gledamo kot na neke vrste dehidracijo, saj nevezana voda kristalizira. Ostale spojine so bolj koncentrirane. Zmrzovanje ima kompleksen vpliv na encimsko aktivnost.

Dejavniki, ki lahko pospešijo encimske reakcije

- Povečevanje koncentracije encimov in substratov
- Povečana ionska jakost in osmolarnost-pospeši aktivnost nekaterih encimov
- Porušenje strukture celice s kristali vode (substrati in encimi pridejo v stik)

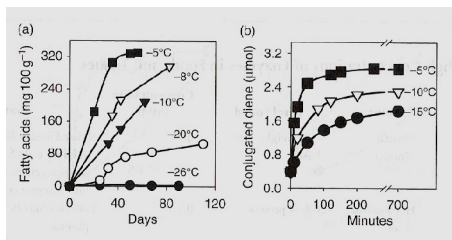
Dejavniki ki zmanjšujejo hitrost encimsko kataliziranih reakcij (največkrat prevlada)

- Nižja temperatura
- Zaradi povečane viskoznosti je manjša difuzija encimov in substratov
- Povečana ionska jakost in osmolarnost-zmanjša aktivnost večine encimov

Zmrzovanje in stabilnost encimov

- Majhni kristali pospešijo površinsko denaturacijo encimov (hitro zmrzovanje (takrat se tvorijo majhni kristali) ni nujno dobro z vidika ohranjanja encimske aktivnosti)
- Pri odtajevanju lahko pride do velikih izgub v encimski aktivnosti (pri počasnem odtajevanju se verjetnost za denaturacijo nekaterih encimov poveča)

Reakcije v živilih dobro potekajo tudi pri temperaturah manjših od 0 °C



Povečevanje vsebnosti prostih MK kot posledica delovanja lipaze v zamrznjenem grašku

Oksidacija linolenske kisline v modelnih raztopinah z lipooksigenazo
