

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

FAKULTA PEDAGOGICKÁ

KATEDRA CHEMIE

Enzymy ve výuce na vyšším stupni gymnázia

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Jakub Král

Učitelství pro střední školy, obor Ch - Ge

Vedoucí práce: Mgr. Milan Klečka, Ph.D.

Plzeň, 2017

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a zdrojů informací.

Plzeň, 12. dubna 2017

.....
vlastnoruční podpis

Rád bych poděkoval vedoucímu mé bakalářské práce Mgr. Milanu Klečkovi, Ph.D. za ochotu, konzultace a odborné vedení při psaní této bakalářské práce.

Dále bych rád poděkoval kolegovi Mgr. Michaelu Vaníkovi za poskytnutí pomoc při tvorbě animací, ředitelce Ing. Drahomíře Rancové a Mgr. Blance Ježkové za možnost zrealizovat praktickou část diplomové práce na Gymnáziu v Rokycanech.

Obsah

1	ÚVOD.....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1	Katalýza.....	8
2.1.1	Katalyzátory a inhibitory.....	9
2.2	Co to jsou enzymy.....	10
2.3	Jaká byla historie.....	11
2.4	Názvosloví a klasifikace.....	12
2.5	Struktura enzymů.....	17
2.5.1	Kofaktory oxidoreduktas.....	19
2.5.2	Kofaktory transferas.....	20
2.6	Jak se enzymy izolují.....	20
2.7	Měření enzymatické aktivity.....	21
2.8	Jednotka enzymové aktivity.....	22
2.9	Enzymová kinetika.....	23
2.9.1	Reakce jednosubstrátové.....	24
2.9.2	Reakce dvousubstrátové.....	25
2.9.3	Reakce třísubstrátové.....	25
2.9.4	Rovnice Michaelise a Mentenové.....	25
2.10	Fyzikální a chemické vlastnosti ovlivňující rychlost enzymatické reakce.....	29
2.10.1	Vliv teploty.....	29
2.10.2	Vliv pH.....	31
2.10.3	Další faktory ovlivňující aktivitu enzymů.....	32
2.11	Aktivace a inhibice enzymů.....	33
2.11.1	Vliv aktivátorů.....	33
2.11.2	Inhibice.....	34
2.12	Využití enzymů v praxi.....	39
2.12.1	Enzymy při analýze a v medicíně.....	40
2.12.2	Enzymy v průmyslu.....	41
3	PRAKTICKÁ ČÁST.....	43
3.1	Pracovní list – bílkoviny.....	44

3.2	Výklad.....	46
3.2.1	Katalýza.....	46
3.2.2	Co jsou to enzymy.....	47
3.2.3	Historie enzymů.....	49
3.2.4	Názvosloví a klasifikace	51
3.2.5	Struktura enzymů	57
3.2.6	Izolace enzymů	59
3.2.7	Měření aktivity enzymů	60
3.2.8	Jednotka enzymové aktivity	61
3.2.9	Enzymová kinetika	61
3.2.10	Faktory ovlivňující aktivitu.....	64
3.2.11	Aktivace a inhibice	66
3.2.12	Využití v praxi.....	71
3.3	Pracovní list – enzymy.....	73
3.4	Test.....	80
3.4.1	Hodnocení testu	88
3.4.2	Klasifikace	88
3.4.3	Vyhodnocení testu.....	89
3.5	Laboratorní cvičení	90
3.5.1	Závislost rychlosti štěpení škrobu α -amylasou na pH ¹²	90
3.5.2	Aktivace a inhibice štěpení škrobu α -amylasou ¹²	91
3.5.3	Štěpení sacharózy β -D-fruktofuranosidasou, závislost rychlosti reakce na koncentraci enzymu ¹²	93
3.5.4	Substrátová specifita α -amylasy a sacharasy ¹⁸	94
3.5.5	Závislost aktivity α -amylasy na pH ¹⁹	95
4	ZÁVĚR	97
5	RESUMÉ	98
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	99
7	Přílohy.....	101

1 ÚVOD

Diplomová práce na téma Enzymy navazuje na bakalářskou práci Enzymy a jejich reakce obhájenou autorem v roce 2014.

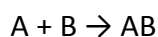
V teoretické části je shrnuta teorie týkající se enzymů, což je relativně obsáhlé téma. Tato část diplomové práce pojímá téma obecně od katalýzy až po využití enzymů v praxi.

Cílem diplomové práce je vytvořit ucelený soubor na téma Enzymy, který lze aplikovat při výuce chemie na vyšším stupni gymnázia. Praktická část didakticky transformuje teoretickou část do výkladu, který je doplněn powerpointovou prezentací a názornými animacemi. Cílem zapojení animací do výuky je zefektivnit a prodloužit osvojení dané problematiky studenty. Práce nabízí také pracovní listy. První z nich je vytvořen pro opakování předešlé látky, což jsou bílkoviny a druhý pro opakování nově probrané látky na téma Enzymy. Praktická část rovněž obsahuje test po probrání celé látky a několik laboratorních cvičení s přihlédnutím na časovou a materiálovou náročnost tak, aby se práce daly provést v prostředí školní laboratoře. V kapitole přílohy nalezneme několik zajímavých odkazů, které mohou sloužit také jako inspirace při výuce. Tato diplomová práce bude ověřena v praxi na Gymnáziu v Rokycanech.

2 TEORETICKÁ ČÁST

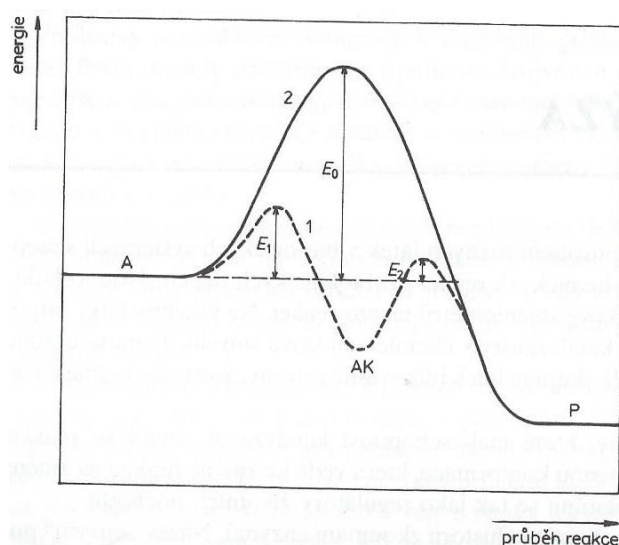
2.1 Katalýza

Katalýzou rozumíme urychlování reakce přidáním katalyzátoru. Rychlost chemických přeměn je závislá na různých faktorech. Nejvíce pak na koncentraci reagujících látek, jejich povaze, na stavu prostředí, ve kterém látky reagují (teplota, tlak), a na vlivu katalyzátorů. Katalyzátor je látka zvyšující rychlost celé chemické reakce, avšak sám se při reakci nemění. Dle charakteru katalyzátorů reakce mohou vznikat dokonce ze stejných reaktantů různé produkty. Katalyzátory a reagující látky se slučují v labilní, ale velmi účinné adukty, které se po reakci znovu rozpadají na produkty a katalyzátor, jenž může znovu vstupovat do další reakce. Katalyzátory působí v relativně nízké koncentraci. Jejich cíl spočívá ve snížení aktivační energie reakci, jenž tvoří myšlenou bariéru bránící reakci reaktantů. Pokud bychom uvažovali teoretickou bimolekulární reakci: ¹



Katalyzátor K se slučuje s jedním ze dvou reaktantů, např. s A, meziprodukt AK, reaguje s reaktantem B a katalyzátor se opět uvolňuje. ¹

Aktivační energie obou reakcí je výrazně nižší, než kdyby reakce nebyla katalyzována. ¹



Obrázek 1: Energetický diagram katalyzované (1) a nekatalyzované (2) reakce ²

Opak katalytické reakce je reakce, která je zpomalována. Tato zpomalení se nazývá inhibice. ¹

Další důkazy o urychlení chemických reakcí jsou uvedeny v tabulce 1. Z níž je patrná změna aktivační energie uvedených rozkladných reakcí s měnícím se katalyzátorem. ²

Tabulka 1: Příklady změn aktivační energie se změnou katalyzátoru pro některé rozkladné reakce ²

Substrát	Katalyzátor	E _a
		kJ . mol ⁻¹
peroxid vodíku	žádný	75,36
peroxid vodíku	jodidové ionty	54,43
peroxid vodíku	koloidní platina	48,57
peroxid vodíku	katalasa	23,03
kyselina uhličitá	žádný	85,83
kyselina uhličitá	karbonátdehydratasa	48,99
sachatosa	vodíkové ionty	107,18
sachatosa	β -fruktofuranosidasa	46,05

2.1.1 Katalyzátory a inhibitory

2.1.1.1 Homogenní a heterogenní katalýza

Jedny z nejčastějších homogenních katalyzátorů jsou kyseliny a zásady. Redoxní reakce bývají často urychlovány (katalyzovány) přítomností iontů. Pokud je reakce urychlována jedním z produktů reakce, označuje se jako autokatalytická. Nejprve probíhá reakce pomalu, protože se nevytvořilo dostatečné množství katalyzujícího produktu. Avšak později se rychlost reakce značně zrychluje. ³

Katalyzátory mohou být selektivní. Jako příklad velmi selektivních katalyzátorů jsou právě enzymy (viz. kapitola 2.2). Selektivita enzymů je dána tím, že vazebné místo na molekule enzymu je specifickým způsobem tvarováno na navázání substrátu. ³

Pokud je katalyzátor při heterogenní katalýze v pevné fázi, mívá obvykle velký specifický povrch. Reaktanty pak bývají kapaliny či plyny. Reakce se uskutečňuje na povrchu katalyzátoru. ³

2.1.1.2 Inhibice

Opakem katalyzátorů, tedy látek urychlující chemickou reakci, jsou inhibitory, látky zpomalující rychlost reakce. Dělíme je na stabilizátory a katalytické jedy.³ Stabilizátory tak zastavují řetězovou reakci. Katalytické jedy zabraňují katalyzátorům urychlovat reakci.³

2.2 Co to jsou enzymy

Enzymy, neboli biokatalyzátory, katalyzují chemické reakce v živých organismech. Chemicky řadíme enzymy mezi jednoduché nebo složené bílkoviny. Jsou velmi různorodé, neboť urychlují velkou škálu chemických reakcí. Podle typu reakce, kterou urychlují (katalyzují), jsou rozděleny do šesti hlavních tříd. Enzymy se vyskytují ve všech živých organismech a jejich počet se odhaduje na miliardy. Předpokládá se, že i v nejjednodušších buňkách je obsaženo přes 3 000 enzymů, které katalyzují veškeré reakce probíhající v buňce.⁴

Biokatalyzátory urychlují chemickou reakci v živých organismech tím, že snižují aktivační energii, energii potřebnou k uskutečnění reakce. Aktivační energie je využívána k zeslabení vazeb reagujících molekul a k jejich vzájemnému přiblížení.⁵ Katalyzátory u zvratných reakcí neovlivňují složení rovnovážné směsi, pouze urychlují dosažení chemické rovnováhy. Enzymy urychlují reakce při metabolismu, kde je vysoký nárok na kvalitu katalyzátorů, neboť reakce probíhají cíleně dle daného plánu. Enzymy tak musí vést reakci specificky, bez vzniku vedlejších produktů a v návaznosti na průběhu metabolických drah. Jejich aktivita proto musí být snadno regulovatelná dle potřeb organismu. Enzymy byly vytvořeny přírodou za miliardy let, a proto jsou efektivnější než umělé katalyzátory.⁴

Přednosti enzymů oproti chemickým katalyzátorům:

1. Reakce probíhá za mírnějších podmínek. Při teplotách mezi 20 – 40 °C, neutrálních hodnotách pH a za atmosférického tlaku. Posun pH do kyselých, či zásaditých hodnot je typický pro činnost enzymů trávicí soustavy (pepsin, trypsin). Umělé katalyzátory vyžadují často velmi náročné podmínky (teplota, tlak, pH).

2. Enzymy jsou účinnější. Rychlost chemických přeměn je mnohem vyšší než rychlost přeměny nekatalyzované reakce a o několik řádů vyšší než reakce s umělým katalyzátorem.
3. Enzymatické reakce se dají snadno regulovat. Jejich katalytické schopnosti neovlivňuje substrát, ale přítomnost jiných sloučenin.
4. Enzymy jeví značnou substrátovou specifitu a tvoří specifičtější produkty. Urychlují přeměnu pouze určitého substrátu (substrátová specifita) a reakce probíhá pouze určitým způsobem (specifita účinku). Ne všechny enzymy mají stejný stupeň specifity. Některé reagují pouze s určitým substrátem. Kdežto jiné enzymy vstupují do reakcí s látkami obsahující určité strukturní znaky. ⁶ Reakce málokdy tvoří vedlejší produkty. ⁷

2.3 Jaká byla historie

Vědu zkoumající enzymy nazýváme Enzymologie. První zmínky o existenci enzymů pocházejí již z 18. století, kdy byl popsán účinek trávicích šťáv. J. Berzelius popisoval výskyt urychlovaných (katalyzovaných) reakcí v rostlinách a živočiších roku 1834. ⁴ Popisoval katalytickou schopnost sladu štěpit škrob. ² Dříve se biokatalyzátory nazývaly fermenty, jelikož se odhadovala jejich účast v rozkladných fermentačních dějích v přírodě a při výrobě potravin a nápojů. Pojmenování „enzym“ (tedy biologické látky s katalytickou schopností) ² známe až od roku 1878, kdy jej tak nazval W. Kühneho (z řeckého en zýme – v kvasnicích). ⁴

Bílkovinná povaha enzymů byla doložena až roku 1926 J. Sumnerem, jenž vykryštoval enzym ureasu. Ureasa katalyzuje hydrolýzu močoviny na oxid uhličitý a amoniak. ⁷ Mezi léty 1930 – 1936 vykryštoval Northrop pepsin, chymotrypsin a trypsin. ² Tento jev, tedy bílkovinnou povahu enzymů, tušil již roku 1840 J. von Liebig i téměř o 40 let později M. Traube. Studium enzymů započalo ovšem ještě dříve. První popsaná byla amylasa obsažena ve sladu a to roku 1814. Dále pak amylasa ve slinách a žaludeční proteasa pepsin v letech 1830 - 1840. Ke konci 19. století byla postupně odkrývána tajemství ohledně katalytického mechanismu enzymů. Dalším důležitým objevem enzymologie byla teorie komplementarity, se kterou přišel roku 1894 E. Fischer. Tvrdil, že enzymatická reakce probíhá v malé oblasti molekuly enzymu, zámek a klíč.

Obdobnou představu měl i V. Henry, který tvrdil, že se během enzymatické reakce tvoří komplex enzym – substrát, jakožto meziproduct. Kinetika jednosubstrátových reakcí byla zpracována v roce 1913 E. Michaelisem a M. Mentenovou.⁴

Jak již bylo uvedeno, bílkovinná struktura enzymů byla prokázána roku 1926. Od tohoto objevu jsou enzymy zkoumány společně s chemií bílkovin. Rozmach tohoto odvětví chemie umožnil hlubší studii i v poznávání enzymů. V dnešní době je detailně popsáno přes 3 000 enzymů a velké množství z nich již bylo vykrystalizováno nebo izolováno v čisté formě. Těmto objevům a výsledkům šla ruku v ruce technika, tedy velký rozvoj instrumentálních metod. Pochopení a objevy chemie bílkovin napomohla popsání prostorové struktury a mechanismu působení enzymů. Počet enzymů se známým mechanismem jejich katalýzy a prostorovým uspořádáním neustále roste.⁴

2.4 Názvosloví a klasifikace

Nejstarší enzymy byly označovány triviálně, podle jejich funkce v organismu a výskytu. Nejčastěji byly zakončovány koncovkou – in (např. trypsin, pepsin, chymosin apod.). Postupem času se začala přidávat koncovka – asa (J. Duclaux, 1883). Názvy enzymů tak byly tvořeny dle substrátu, který enzym katalyzoval (proteasa, lipasa, amylasa) anebo dle charakteru reakce (hydrolasa, oxidasa, transaminasa,...).⁴

S rostoucím počtem nově objevených enzymů bylo potřeba stanovit systém, dle kterého se budou enzymy pojmenovávat. Neboť se občas stávalo, že pro jeden enzym existovaly dva názvy a naopak. Proto Mezinárodní unie biochemie (IUB) roku 1961 zavedla jednotnou nomenklaturu. K doporučeným triviálním názvům enzymů zavedla systémové rozdělení a z něho vyplývající systémové názvy, ve kterých je obsažen substrát a typ enzymem katalyzované reakce.⁴

Názvosloví a klasifikace enzymů podléhá třem základním zásadám:

1. Název a zařazení enzymu se stanovuje dle reakce, kterou enzym katalyzuje.
2. Názvy enzymů jsou použity pouze pro jednotlivé enzymy, nikoli pro pojmenování systému s více enzymy.
3. Enzymy jsou rozděleny dle typu reakce a názvu substrátu do skupin.²

Systémové názvy enzymů zahrnují tedy substrát (příp. substráty) a typ katalyzované reakce. Enzymy se dle typu katalyzované reakce řadí do šesti hlavních tříd (Tabulka 2). Třídy se dále dělí na jednotlivé podtřídy a další kategorie. ⁷

Tabulka 2: **Klasifikace enzymů, dle typu katalyzované reakce** ⁷

Klasifikace	Typ katalyzované reakce
1. Oxidoreduktasy	oxidačně-redukční reakce
2. Transferasy	přenos funkčních skupin
3. Hydrolasy	hydrolýza
4. Lyasy	eliminace skupin za vzniku dvojných vazeb
5. Izomerasy	izomerace
6. Ligasy	tvorba vazeb spojená s hydrolýzou ATP

1. Oxidoreduktasy

- katalyzují oxidačně redukční procesy
- jedná se o jednu z nejpočetnějších tříd
- povahou jde o složené bílkoviny
- substrátem je donor vodíku nebo elektronů ²
- oxidoredukční děj je uskutečněn přenosem atomu vodíku (transhydrogenasa, či dehydrogenasa), nebo elektronů (transelektronasa)
- dělení na podtřídy dle funkčních skupin donorů, na které působí⁴
- klasifikace na principu „donor : akceptor – oxidoreduktasa (dehydrogenasa, oxidasa)“ ²
- zjednodušený princip: $A_{red} + B_{ox} \leftrightarrow A_{ox} + B_{red}$
- příklad reakce: $ethanol + NAD^+ \rightarrow acetaldehyd + NADH + H^+$ ⁶

2. Transferasy

- přenos funkčních skupin (-CH₃, -NH₂, atd.) v aktivované formě z jedné sloučeniny (donoru) na jinou sloučeninu (akceptor)
- účastní se biosynthetických dějů
- opět početná skupina enzymů
- chemickou povahou se jedná o složené bílkoviny

- dělení do podtříd dle charakteru přenášených skupin ⁴
- klasifikace na principu „donor : akceptor – přenášená skupina transferasa“ ²
- zjednodušený princip: $A-B + C \rightarrow A + C-B$
- příklad reakce: hexosa + ATP \rightarrow hexosa- P + ADP ⁶

3. Hydrolasy

- katalyzují hydrolytické štěpení vazeb (např. amidové, glykosidové, peptidové, esterové)
- početná skupina enzymů
- povahy jednoduchých bílkovin
- dělení do podtříd podle typu štěpených vazeb ⁴
- systémový název tvořen „substrát-odštěpená skupina hydrolasa“ ²
- zjednodušený princip: $A-B + H_2O \rightarrow A-H + B-OH$
- příklad reakce: glycerol-tristearát + 3H₂O \rightarrow glycerol + kyselina stearová

4. Lyasy

- štěpí vazby C-C, C-O, C-N a dalšími způsoby než oxidací a hydrolýzou ²
- v jednom směru působí na dva enzymy, avšak v opačném pouze na jeden ²
- přinášejí, nebo odštěpují malé molekuly do substrátu (H₂O, NH₃, atd.)
- málo početná skupina enzymů
- povahy složených bílkovin
- dělení do podtříd dle typu štěpených vazeb ⁴
- systémový název ze dvou slov „substrát-skupina lyasa“ ²
- zjednodušený princip: $A-B \leftrightarrow A + B$
- příklad reakce: (COOH)₂ \rightarrow HCOOH + CO₂ ⁶

5. Izomerasy

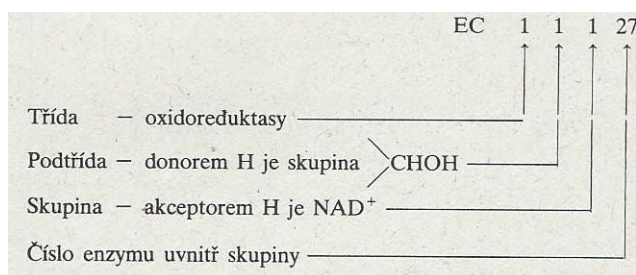
- přesuny atomů a jejich skupin v jedné molekule
- nejméně početná skupina enzymů
- většinou povahy jednoduchých bílkovin
- dělení do podtříd dle typu vytvářené izomerie ⁴
- klasifikace na principu „substrát-děj-izomerasa“, kdy děj charakterizuje reakci ²
- zjednodušený princip: $A-B-C \leftrightarrow A-C-B$
- příklad reakce: fumarát \rightarrow maleát

6. Ligasy

- katalyzují sloučení dvou molekul za současného hydrolytického štěpení difosfátu v ATP²
- málo početná skupina povahy složených bílkovin
- v triviálních názvech se často označují jako synthetasy
- dělení do podtříd dle typu vznikajících vazeb⁴
- systémový název tvořen „X-Y-ligasa tvořící ADP“, kdy X a Y zastupuje spojované molekuly²
- příklad reakce: $X + Y + ATP \rightarrow X-Y + ADP + P_i$

Jednotlivý enzym je označen dvěma názvy a čtyřmi čísly. Doporučený název většinou odpovídá dřívějšímu triviálnímu názvu a je tedy praktický pro běžnou praxi. Systematický název se používá k přesnému označení enzymu, aby nedošlo k možné záměně. Jak již bylo uvedeno, je tvořen názvem substrátu s příponou -asa označující katalyzovanou reakci dle hlavní klasifikační třídy (Tabulka 2).⁷ Čtyřmístný kód umožňuje rozdělení enzymů do šesti hlavních tříd a následně do podtříd a skupin. Systémové číslo je totožné se zařazením enzymu v klasifikaci EC (Enzyme Commission).⁴

Příkladem může být enzym karboxypeptidasa A (doporučený název), jehož systematický název je peptidyl-L-aminocidhydrolasa se systémovým číslem: EC 3.4.17.1. První číslo udává hlavní třídu enzymu (Hydrolasa, viz. Tabulka 2), druhé číslo podtřídu (peptidová vazba), třetí číslo v pořadí číslo jeho skupiny (metalokarboxypeptidasy) a čtvrté číslo je pořadové číslo enzymu v podskupině.⁷



Obrázek 2: Čtyřmístný kód (S)-laktátu:NAD⁺-oxidoreduktasa⁴

Pro běžné užívání nejsou systémové názvy nikterak praktické. Proto se se systémovým číslem využívají, pokud není zapotřebí jinak, pouze při „představení“ enzymu a dále je upřednostňován název doporučený.⁴

Tabulka 3: Doporučené, systémové názvy a číselný kód některých enzymů ⁴

Číslo	Doporučený název	Reakce	Systémový název
1	Oxidoreduktasy		
1.1.1.1	alkoholdehydrogenasa	alkohol + NAD ⁺ = acetaldehyd + NADH	ethanol: NAD ⁺ - oxidoreduktasa
1.1.1.27	laktátdehydrogenasa	L-laktát + NAD ⁺ = pyruvát + NADH	(S)-laktát: NAD ⁺ -oxidoreduktasa
1.11.1.7	peroxidasa	donor + H ₂ O ₂ = oxid.donor + 2 H ₂ O ₂	donor: H ₂ O ₂ -oxidoreduktasa
2	Transferasy		
2.3.1.9	acetyl-CoA-acetyltransferasa	acetyl-CoA + acetyl-CoA = CoA + acetoacetyl-CoA	acetyl-CoA: acetyl-CoA-C-acetyl-transferasa
2.7.7.7	DNA-řízená DNA-polymerasa	_n deoxynukleosidtrifosfát + DNA _n = 2DNA _n + nPP _i	deoxynukleosidtrifosfát: DNA - deoxynukleotidyltransferasa
3	Hydrolasy		
3.1.3.9	glukosa-6-fosfatasa	D-glukosa-6-fosfát + H ₂ O = D-glukosa + monofosfát	D-glukosa-6-fosfát-fosfohydrolasa
3.6.1.3	adenosintrifosfatasa	ATP + H ₂ O = ADP + P _i	ATP-fosfohydrolasa
4	Lyasy		
4.2.1.1	karbonátdehydratasa	H ⁺ + HCO ₃ ⁻ = CO ₂ + H ₂ O	karbonáthydrolyasa
5	Isomerasy		
5.3.1.1	triosafosfátisomerasa	D-glyceraldehyd-3-fosfát = dihydroxyacetonfosfát	D-glyceraldehyd-3-fosfát-ketolisomerasa
6	Ligasy		
6.1.1.7	alanyl-tRNA-synthetasa	ATP + L-alanin + tRNA ^{Ala} = AMP + difosfát + L-alanin + tRNA	L-alanin:tRNA ^{Ala} -ligasa

2.5 Struktura enzymů

Enzymy jsou povahou jednoduché i složené (cca 70%) globulární proteiny (bílkoviny). Některé molekuly jsou pouze z jednoduchých bílkovin. Na stavbě enzymů povahy složených bílkovin se podílí nízkomolekulární, nebílkovinná složka kofaktor. ² Tato složka přenáší skupiny, elektrony, nebo atomy při biochemických reakcích katalyzovaných enzymy a určuje specifitu účinku. ⁴ Kofaktorem mohou být buď ionty některých kovů, např. K^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , nebo složitější organické molekuly – koenzymy. ² Pokud je kofaktor pevně, kovalentně navázan na bílkovinnou složku enzymu (apoenzym), můžeme ho považovat za prosthetickou skupinu. Stejně tak jako je tomu u složených bílkovin. Apoenzym jeví substrátovou specifitu. ⁴

Katalytickou funkci umožňují na enzym pevně vázané prostetické skupiny, které se během katalytického cyklu enzymu obnovují. ⁸ Pokud je kofaktor navázan na bílkovinnou složku (apoenzym) jen slabě a může lehce disociovat (oddělit se), nazýváme ho koenzymem. ⁴ Koenzym je přítomen při chemických přeměnách katalyzovaných enzymem. ³ Kofaktory jsou esenciální látky a většinou strukturně souvisí s vitamíny (viz. Tabulka 4). ⁹ Důležité jsou pak vitamíny rozpustné ve vodě. ³

Tabulka 4: **Vztah koenzymů a vitamínů** ³

Vitamín	Koenzym	Reakce
thiamin (B1)	thiaminpyrofosfát (TPP)	přenos aldehydu
riboflavin (B2)	flavinadenindinukleotid (FAD)	přenos H
kyselina nikotinová	nikotinamidadenindinukleotid (NAD ⁺)	přenos H
pyridoxin (B6)	pyridoxalfosfát	přenos –NH ₂
biotin (B6)	biocytin	přenos –COOH
kyselina panthotenová	koenzym A (CoA)	přenos acylu
kyselina listová	kyselina tetrahydrolistová	přenos C1

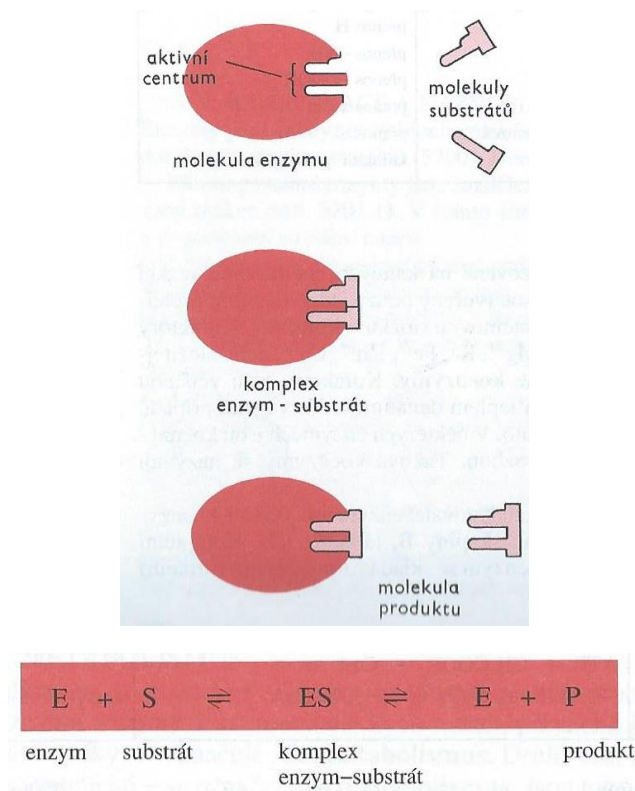
kyselina askorbová (C)	-	kofaktor hydroxylace
------------------------	---	----------------------

Komplex koenzymu s apoenzymem (protein) tvoří holoenzym, kompletní fungující enzym.⁴

Zkoumáním vnitřního uspořádání molekuly enzymů se potvrdila teorie E. Fischera z konce 19. století (viz. kapitola 2.3).⁴

Oblast, ve které se enzymová reakce uskutečňuje, se nazývá aktivní místo nebo aktivní centrum. Tato část molekuly byla zkoumána pozorováním aktivity enzymů se stejnou funkcí, avšak z jiných organismů a za různých použitých substituentů a chemických modifikací skupin molekuly. Teprve až rentgenostrukturní analýza komplexů enzymů se substráty a kompetitivními inhibitory objasnila strukturu aktivních míst. V aktivním centru se vyskytují přesně prostorově rozmístěné funkční skupiny, které jsou součástí postranních řetězců aminokyselinových zbytků.⁴ Ty jsou v polypeptidovém řetězci daleko od sebe, ale jeho svinutím se dostávají do patřičné blízkosti, při terciálním zřasení. Funkční skupiny vzájemně interagují se specifickými substráty. U některých enzymů je více aktivních míst.¹ Prostorové uspořádání bylo nejvíce studováno u hydrolas a byly zjištěny 3 základní typy uspořádání aktivního centra:⁴

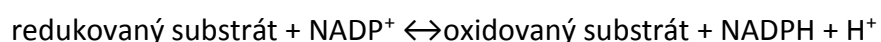
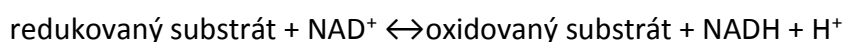
1. Tvar štěrbin (polysacharidové, polynukleotidové a polypeptidované řetězce)
2. Tvar mělké povrchové prohlubně (trypsin, elastasa, atd.)
3. Tvar jamky (karboxypeptidasa)⁴



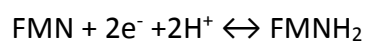
Obrázek 3: Schéma enzymové reakce ³

2.5.1 Kofaktory oxidoreduktas

Kofaktory oxidoreduktas se účastní redukčních dějů, během kterých se podílejí na přenosu vodíku nebo elektronů. Mezi ty nejznámější patří nikotinamidadeninukleotid (NAD⁺) a nikotinamidadeninukletidfosfát (NADP⁺). Funkce těchto kofaktorů spočívá v reverzibilní vazbě vodíku, který je předán substrátu nebo odebrán:



K další kofaktorům patří také flavinmononuklid (FMN) nebo flavinadeninuklid (FAD). Ty mají funkci reverzibilního redoxního systému:

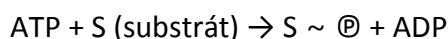


Další skupinou jsou cytochromy, které tvoří redoxní systémy v mitochondriích a chloroplastech. ¹⁰

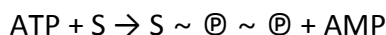
2.5.2 Kofaktory transferas

Kofaktory transferas se účastní přenosu celých molekul i skupin z donoru na akceptor. Jde o početnou skupinu. Fosfátové skupiny přenášejí enzymy, obecně známe jako kinasy. Jako kofaktor obsahují adenosintrifosfát (ATP), jenž reaguje několika způsoby:

1. přenos fosfátového zbytku P za odštěpení adenosinmonofosfátu (AMP)



2. přenos difosfátového zbytku za odštěpení adenosinmonofosfátu (AMP)



Funkci podobné jako ATP mohou mít i jiné nukleotidy – guansintrifosfát (GTP), uridintrifosfát (UTP), cytidintrifosfát (CTP) – kde je adenin nahrazen guaninem, uracilem, cytosinem.

Koenzym A (CoA) přenáší acyly, ze kterých je nejvýznamnější zbytek kyseliny octové. Tzv. aktivní kyselina octová, nazývaná acetylkoenzym A (acetyl-CoA), má neodmyslitelné místo v průběhu řady metabolických přeměn.¹⁰

2.6 Jak se enzymy izolují

Při čištění a izolaci enzymů je nutnost vycházet z toho, že enzymy mají bílkovinou povahu. Izolace a čištění enzymů tudíž probíhá běžnými metodami, jakými jsou metody používané při izolaci bílkovin. Postup izolace bílkovin můžeme pozorovat při měření jejich aktivit, což je výhoda enzymů oproti inaktivním bílkovinám. Enzymy se musí nejdříve rozrušit, abychom je mohli izolovat. Rozrušení tkáně se provádí nejčastěji homogenizací a mletím (převážně u živočišných), autolýzou (převážně u mikroorganismů) a zmrazováním. Následně se enzymy extrahují alkoholem (butanolem), tlumivým roztokem, či vodou.¹¹ Zbytky, které se nerozpustily, se nejčastěji od vzorku oddělují centrifugací nebo filtrací, což je lepší postup. K nejjemnějšímu oddělení se využívá tepelná denaturace, tedy temperací na 50 až 60°C po dobu 5 až 15 minut. Další způsob je frakční vysolování síranem amonným, jenž je velmi dobře rozpustný a nedenaturuje bílkoviny. Vysrážené bílkoviny se snadno rozpouští ve vodě. Před dalším postupem je nutné odstranit síran dialýzou či odsolením gelovou chromatografií.

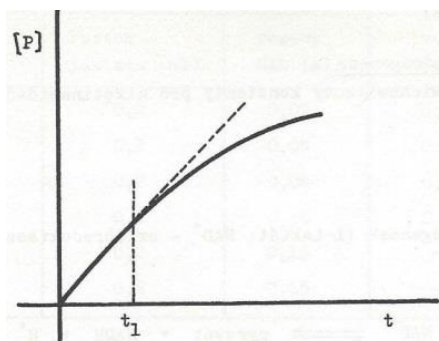
Účinné je i srážení organickými rozpouštědly (např. ethanolem nebo acetonem), avšak je nutné pracovat při teplotách nižších než -5°C . Při vyšších teplotách by bílkoviny denaturovali nevratně. ¹¹

Další možné způsoby čištění částečně vyčištěných preparátů jsou ionexová, afinitní chromatografie, gelová chromatografie, nebo elektroforéza. ¹²

2.7 Měření enzymatické aktivity

Stanovit množství enzymu v živých objektech se poněkud složité, a proto se tento pojem nahrazuje pojmem aktivita enzymu. ⁹ Aktivitu enzymu chápeme jako jeho schopnost katalyzovat přeměnu substrátu v produkt. ¹³ Aktivitu měříme spotřebou substrátu nebo měřením množství vznikajícího produktu enzymatické reakce za jednotku času. ¹ Enzymy se vyskytují v živých organismech jako vázané (např. v membránách) nebo jako volné (např. v cytoplazmě). Vázané enzymy vykazují vyšší aktivitu než enzymy volné. Počáteční rychlost reakce je tedy charakterizována tvorbou produktu, či úbytkem substrátu v čase. Počáteční rychlost, řídící se dle rovnice Michealise a Mentenové (kapitola 2.9.4), je definována jako rychlost v čase nula, tedy dříve než vznikl jakýkoli produkt.

Stanovit rychlost reakce experimentálně je však z několika důvodů složité. Neboť čas, který je potřeba k promíchání jednotlivých reakčních složek a změření jejich koncentrace, není nikdy nulový. Rychlost enzymatické reakce se tak stanovuje jako množství přeměněného substrátu za jednotku času. Ovšem pouze v čase, kdy je změna koncentrace lineární s časem (viz. Obrázek 4). Rychlost enzymem katalyzované reakce je tak možné měřit v časovém intervalu od 0 do t_1 . ¹²



Obrázek 4: Stanovení počáteční rychlosti enzymatické reakce ¹²

Důležitou podmínkou měření je snížení rušivých jevů na co nejmenší míru.¹¹ Neodmyslitelnou součástí měření aktivity enzymů je teplota (cca 30°C), 5 až 10 minut, všech reakčních složek ve směsi. Rozdílné teploty jednotlivých složek by totiž stanovení aktivity mohly ovlivnit. Dalším důležitým krokem je přesné zahájení pokusu, pokud je inkubace během krátkého časového intervalu. Pipety se proto při přidávání enzymu do směsi vyfukují. Je zde riziko, že vlivem vyfouknutí dojde ke zvětšení objemu, nicméně tato možná chyba je menší, než chyba vzniklá dlouhou dobou inkubace při pomalém přidávání enzymu k reakční směsi.¹²

Ukončení nebo zastavení enzymem katalyzované reakce se nejčastěji provádí denaturací bílkovinné části enzymu. Zpravidla se tak děje výraznou změnou pH či přidáním inhibitoru, jak bude uvedeno v následujících kapitolách. Další možností zastavení reakce je několikanásobným zředěním směsi. Enzymatickou reakci není vhodné zastavovat denaturací způsobenou povařením směsi. Reakce probíhá nekontrolovatelnou rychlostí při rychlé tepelné denaturaci. Je tedy kladen důraz i na zahřívání tepelně denaturovaného enzymu bez substrátů při jednotlivých pokusech.¹²

Aktivitu enzymu, koncentraci substrátu resp. produktu, lze v dnešní době pochopitelně stanovit analytickými instrumentálními metodami. Může se jednat o metody optické, elektrochemické či titrační. Z metod optických to mohou být kolorimetrie nebo spektrální fotometrie. Z metod elektrochemických polarografie a konduktometrie. A z metod titračních pak acidimetrie, či alkalimetrie.¹

2.8 Jednotka enzymové aktivity

Katalytická aktivita enzymu je využívána ke kvantitativnímu stanovení množství (aktivity) enzymu v daném roztoku. Dříve, než bude stanovována aktivita enzymu, je nutností znát tyto zákonitosti:¹²

1. stechiometrii a chemickou podstatu enzymatické reakce,
2. K_m pro dvojici E – S (enzym – substrát), eventuálně E – K (enzym – koenzym),
3. pH optimum enzymu,
4. vliv teploty na aktivitu a stabilitu daného enzymu,
5. důležitost kofaktoru pro funkci enzymu,
6. analytickou metodu pro pozorování úbytku substrátu, či vzniku produktu.¹²

Stanovení aktivity enzymu probíhá za tzv. při pH optima (viz. dále) a při vysoké koncentraci substrátu na počátku reakce.¹² Koncentrace zůstává po určitý časový interval stejná, a reakce tudíž probíhá kinetikou nultého řádu.¹⁴ Jsou-li tyto podmínky zachovány, je aktivita enzymu, rychlost enzymatické reakce, úměrná pouze koncentraci enzymu.¹²

Původně byla aktivita enzymu vyjadřována nejrůzněji smluvenými jednotkami. Nejčastěji se odvíjející od způsobu měření. Přesné sjednocení ve vyjadřování enzymové aktivity přinesla roku 1961 IUB (Mezinárodní unie biochemie). Tato unie zavedla standardní jednotku aktivity, a to 1 U (z anglického unit). Tato jednotka byla definována jako aktivita enzymu, která za optimálních podmínek (pH optimum, 30°C) urychluje (katalyzuje) při nasycení substrátem přeměnu 1 μmol substrátu za 1 minutu. Roku 1972, v souvislosti se zavedenou soustavou jednotek SI, byla zavedena nová jednotka pro katalytickou aktivitu – katal. 1 kat udává aktivitu, která přemění za optimálních podmínek (pH optimum, 30°C) 1 mol substrátu za 1 sekundu. Pro praxi je však tato jednotka příliš velká, a proto se častěji používají její zlomky – mikrokatal ($\mu\text{kat} = 10^{-6}$ kat), nanokatal (nkat = 10^{-9} kat), piko katal (pkat = 10^{-12} kat). Převod mezi starší (U) a moderní jednotkou (katal) je roven: 1 U = 16,67 nkat.⁴

IUPAC (Mezinárodní unie pro čistou a použitou chemii) roku 1981 přišla s názvem pro katalytickou aktivitu vyjádřenou v katalích - rychlost přeměny substrátu. V praxi se můžeme setkat s dalšími veličinami, jako jsou: specifická katalytická aktivita (vztažená na 1 kg enzymu, kat/kg), molární katalytická aktivita (kat/mol) a koncentrace katalytické aktivity (kat/dm³).⁴ Nebo s číslem přeměny (TN, z anglického turnover number) stanovující počet molekul substrátu přeměněných jednou molekulou enzymu, resp. jedním aktivním místem za 1 minutu.¹²

2.9 Enzymová kinetika

Jak již bylo řečeno, enzymy zprostředkovávají chemické reakce v živých organismech. Znovu stojí za připomenutí, že enzymy urychlují dosažení rovnováhy mezi substráty a produkty i snižují aktivační energii, nikterak však neovlivňují rovnovážné složení směsi.¹² Každý z těchto biokatalyzátorů je specifický pro určité typy reakcí. Enzymy jsou tedy velmi různorodé. Jako příklady z nejběžnějších typů reakcí, tedy alespoň

ty z nejběžnějších tříd, uvedeme následující: oxidace a redukce, izomerie, hydrolýza, přenos funkčních skupin či dehydratace.

Enzymy jsou složitě pracující stroje. Například některé působí pouze na jedinou molekulu substrátu a jiné působí na dvě i více různých molekul substrátu. Některé enzymy tvoří kovalentně vázané intermediární komplexy s příslušnými substráty, kdežto jiné nikoli.⁷

Studium enzymové kinetiky má v biochemii neodmyslitelnou důležitost, neboť:

1. Pochopení důležitosti, role a funkce enzymů při metabolismu, došlo v souvislosti se studiem kinetiky enzymatických reakcí.
2. Studiem kinetiky enzymových reakcí se podílelo na tom, že může být určena vazebná afinita substrátů a inhibitorů k enzymu a maximální katalytická rychlost enzymu.
3. Katalytický mechanismus enzymů byl vysvětlen pozorováním změny rychlosti enzymatické reakce s reakčními podmínkami.
4. Podstatná část studia kinetiky enzymů je základem mnoha enzymatických testů.⁷

Enzymová kinetika přispívá k lepšímu pochopení mechanismu účinku enzymů, neboť studuje časový průběh reakcí za různých podmínek.⁴ Pro reakce katalyzované enzymy platí obecné zákonitosti kinetiky chemických reakcí. Specifitou těchto reakcí je však tzv. saturace substrátem.

Enzymatické reakce neprobíhají vždy stejnou rychlostí. Ta závisí na faktorech, jako jsou:⁴

1. fyzikálních a chemických vlastností prostředí,
2. koncentrace substrátu,
3. množství enzymu,
4. přítomnost modifikátorů.⁴

2.9.1 Reakce jednosubstrátové

Jednosubstrátové reakce patří mezi ty nejjednodušší enzymatické reakce. Při těchto reakcích se přeměňuje jediný substrát přítomný ve směsi na jediný produkt. Tento princip uplatňují například izomerasy, které se vzájemně přeměňují na své izomery.

Nicméně se jednosubstrátové reakce nevyskytují tak často. Jiné enzymové reakce rozkládají jediný substrát na dva produkty, což je reakce typická pro procesy katalyzované lyasami. Do jednosubstrátových reakcí řadíme i reakce hydrolytické, přesto že se reakce účastní dva reaktanty. Jedním z reaktantů podléhající reakci je však voda. Její koncentrace při enzymatické reakci nemění, a proto ji nepovažujeme za substrát. ⁴

2.9.2 Reakce dvousubstrátové

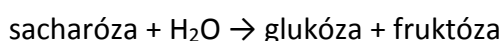
Dvousubstrátové reakce jsou jedny z nejčastějších enzymatických reakcí, při nichž dochází k přeměně dvou substrátů nejčastěji na dva produkty. Jedná se především o procesy katalyzované transferasami a oxidorektasami. Jako syntetizující enzymy fungují lyasy, které způsobují vznik pouze jednoho produktu. ⁴

2.9.3 Reakce třísubstrátové

Procesy, do kterých vstupují tři substráty, jsou katalyzovány především ligasami. Při tomto ději dochází ke sloučení dvou substrátů v jeden produkt a zároveň ke štěpení jednoho substrátu na dva produkty. Stýkáme se i s případy vícesubstrátových reakcí. ⁴

2.9.4 Rovnice Michaelise a Mentenové

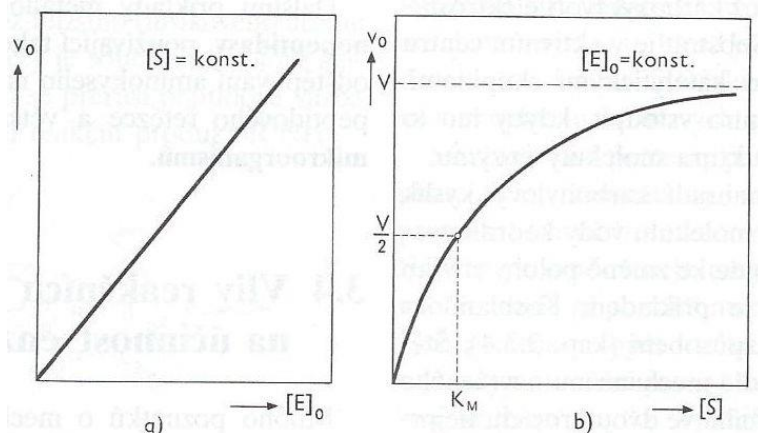
Kinetika enzymů započala již na začátku 20. století. Přesněji roku 1902 publikoval Adrian Brown zprávu, ve které popisoval rychlost hydrolytického štěpení sacharózy katalyzované β -fruktofuranosidasou (dříve známá jako invertasa) na glukózu a fruktózu za různých experimentálních podmínek. ⁷



Odhalily se tak dvě skutečnosti popisující povahu enzymatických reakcí.

1. Závislost koncentrace katalyzátoru na počáteční rychlosti je lineární. Pokud byla původní koncentrace sacharózy konstantní a měnilo se pouze složení enzymu, jak je patrné z obrázku 5a, kde v_0 je rychlost reakce a $[E_0]$ je koncentrace enzymu.
2. Závislost koncentrace sacharózy na počáteční rychlosti je hyperbolická. Pokud byla neměnná koncentrace enzymu a měnilo se pouze množství substrátu, což je patrné z obrázku 5b, kde v_0 je rychlost reakce a $[S]$ značí koncentraci substrátů. Symbol K_M značí Michaelisovu konstantu a V meznou rychlost. ⁴

O několik let později se prokázala platnost těchto tvrzení pro enzymatické reakce, kterým podléhá pouze jediný substrát a je přeměněn na jediný produkt. ⁴



Obrázek 5: Závislost počáteční rychlosti reakce V_0 na koncentraci enzymu ⁴

Brown předložil tvrzení, že reakční rychlost se stává nezávislou na koncentraci sacharózy, pokud je její koncentrace několikrát vyšší, než je koncentrace enzymu. Jde tedy o reakci nultého řádu. A. Brown tedy myslel, že se reakce skládá ze dvou reakcí elementárních. Jako první reaguje enzym (E) se substrátem (S) a vytváří jakýsi meziprodukt komplex enzym – substrát (ES). Následně se komplex při druhé reakci rozkládá na produkt (P) a enzym (E). Touto problematikou se dříve zabýval rovněž V. Henry. ⁷



Obrázek 6: Obecné schéma enzymové reakce ¹⁵

V roce 1913 vychází L. Michaelis a M. Mentenová z teorií Henryho a Browna. ⁷ Michaelis a Mentonová stanovují matematické vyjádření saturační křivky, jenž umožňuje kinetické zpracování mechanismu enzymové reakce (viz. Obrázek 6).

Saturační křivka podle vyjádření Michaelise a Mentenové znázorňuje syčení enzymu substrátem a tedy závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu. ⁴

Rovnice Michaelise a Mentonové:

$$v = \frac{V [S]}{K_M + [S]}$$

kde V značí limitní rychlost enzymové reakce a K_M Michaelisovu konstantu.

Michaelisova konstanta je koncentrace substrátu, při které enzymová reakce probíhá na poloviční maximální rychlost V. ¹ Pro konstantu platí, že:

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

Grafem rovnice Michaelise a Mentonové je rovnoosá hyperbola s posunutým počátkem. ¹ Tato hyperbola je vhodná pro stanovení mnoha enzymů. ⁴ Asymptoty rovnice jsou s osami rovnoběžné. Na ose x je vynesena koncentrace substrátu [S] na ose y reakční rychlost v. ¹ Jedná se o základní rovnici enzymové kinetiky. ⁷

2.9.4.1 Michaelisova konstanta

Důležité matematické vyjádření vzniká, pokud je rychlost reakce rovná polovině limitní rychlosti. ¹²

$$v = \frac{V}{2}$$

$$\frac{V}{2} = \frac{V [S]}{K_M + [S]}$$

Z této rovnice je patrné, jak je možné vidět i na obrázku 4, že Michaelisova konstanta K_M se rovná koncentraci substrátu [S], při níž je dosaženo poloviny limitní (mezní) rychlosti V. ⁴ Tudiž že při polovičním nasycení substrátu se Michaelisova konstanta rovná koncentraci substrátu [S]. Její rozměr je tedy koncentrace, mol/l. ¹²

Konstanta K_M je nezávislá na koncentraci enzymu. Závisí však na podmínkách prostředí, jako jsou: teplota, pH, přítomnost efektorů aj. Proto se k hodnotě konstanty vždy uvádí výčet podmínek, za kterých byla stanovena. Konstanta charakterizuje katalytické vlastnosti příslušného enzymu k danému substrátu. S klesající hodnotou Michaelisovy konstanty roste afinita enzymu vůči substrátu. Pokud enzym působí na více substrátů, považuje za hlavní enzym ten, jenž dosahuje nejnižších hodnot K_M . Stanovení

Michaelisovy konstanty nám dovoluje odhadnout koncentraci substrátu potřebnou pro dosažení limitní rychlosti. Pomocí rovnice poté vypočítat počáteční rychlost enzymatické reakce pro danou koncentraci substrátu či naopak koncentraci substrátu, která je potřeba pro dosažení stanovované rychlosti. ⁴

2.9.4.2 Mezní rychlost

Mezní, nebo-li limitní rychlost, se dříve označovala jako V_{\max} , tedy rychlost maximální. Význam mezní rychlosti spočívá ve vztahu k rychlostní konstantě k_2 . V oblasti saturace substrátem, kde reakční rychlost dosahuje mezních hodnot a reakce je vzhledem k substrátu nultého řádu nastává, že mezní (limitní) rychlost je faktorem limitující rychlost enzymatické reakce. Proto platí, že:

$$v = V = k_2 [E]_0$$

Pokud je známa molární koncentrace enzymu $[E]_0$, je možné z naměřených hodnot limitní rychlosti V určit rychlostní konstantu k_2 . Konstanta k_2 vyjadřuje molekulovou (molární) aktivitu enzymu, ve starší literatuře označovanou jako číslo přeměny. Molekulová aktivita enzymu udává počet molekul (molů) substrátu, přeměněných za optimálních podmínek, za jednu sekundu jednou molekulou (jedním molem) enzymu.

Ze vzorce pro výpočet limitní rychlosti můžeme nepřímo stanovit koncentraci enzymu. V praxi se s takovým stanovením množství enzymů setkáváme velmi často. Naopak přímé stanovení koncentrace enzymů je kvůli přítomnosti interferujících proteinů složité, až by se dalo říci nemožné. Výjimkou je případ, kde je využita výrazná fyzikální vlastnost enzymu (např. barevnost kofaktoru). Kinetickým určením aktivity enzymu se jeho koncentrace (množství) stanoví tak, že se za známých podmínek (teplota, pH, složení směsi apod.) přidá k enzymu vhodný substrát. Analytickými metodami se určí úbytek vzniklého produktu za jednotku času, tudíž počáteční rychlost přeměny substrátu. Pokud je dostačující koncentrace substrátu a enzym je substrátem zcela nasycen, pak reakce běží meznou rychlostí V . Limitní rychlost reakce je poté přímo úměrná koncentraci enzymu. Tato závislost je patrná z matematického vyjádření pro výpočet mezní rychlosti. ⁴

2.9.4.3 Jaký má vliv koncentrace substrátu na rovnici Michaelise a Mentenové

Pokud se koncentrace substrátu vyskytuje v nízkých hodnotách, platí tedy $[S] \ll K_M$. Platí, že se časový průběh reakce řídí rovnicí 1. řádu a dochází k redukci rovnice Michaelise a Mentenové: ¹²

$$v = \frac{V [S]}{K_M} = konst. [S]$$

Pokud se však koncentrace substrátu vyskytuje ve vysokých hodnotách, platí, že $[S] \gg K_M$. Reakce se řídí kinetikou 0. řádu a rovnice nabývá tvaru: ¹²

$$v = \frac{V [S]}{[S]} = V = konst.$$

Pohybuje-li se koncentrace substrátu mezi hodnotami $0,01 K_M < [S] < 100 K_M$ platí, že se rovnice Michaelise a Mentenové řídí smíšenou kinetikou nultého a prvního řádu. ¹²

2.9.4.4 Nedostatky rovnice Michaelise a Mentenové

Rovnice Michaelise a Mentenové však obsahuje několik nedostatků. Rovnice se zakládá na představě, že meziproduct (komplex ES) se rozpadá přímo na produkt (P) a enzym (E). Objevy však dokázali, že jde o vícestupňovou přeměnu obsahující několik komplexních meziproductů. Mechanismus takovýchto dějů je však obtížně kineticky popsat. Rovnice bere v potaz pouze počáteční rychlost reakce a kinetiku nejjednodušších a méně se vyskytujících reakcí jednosubstrátových. Rovnice nebere do úvahy zpětný rozpad produktu. I přes tyto nedostatky se rovnice Michaelise a Mentenové používá jako nejlepší kinetický vztah v enzymologii. ⁴

2.10 Fyzikální a chemické vlastnosti ovlivňující rychlost enzymatické reakce

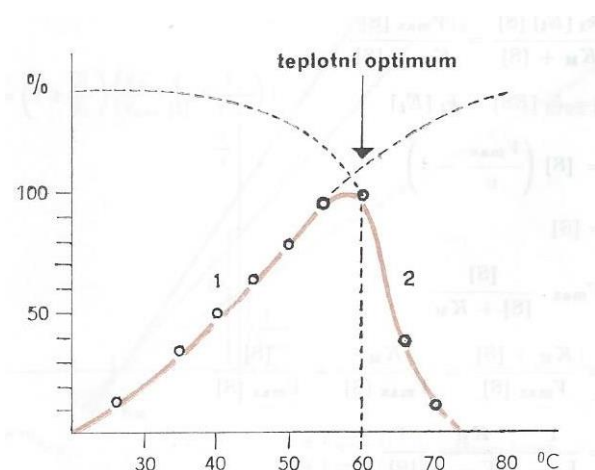
Na rychlosti enzymatických reakcí se podílí celá řada faktorů. ²

2.10.1 Vliv teploty

Obecně platí, že se vzrůstající teplotou stoupá i kinetická energie molekul, dochází k vyššímu počtu jejich srážek a chemická reakce se tím urychluje. Nejinak je tomu i u enzymů, avšak u nich se uplatňují i jiné vlivy. Teplota, za níž enzymová reakce probíhá, má

vliv na afinitu enzymu k substrátu, rychlost štěpení komplexu enzym-substrát (E-S), stabilitu enzymu, pH pufrů, ionizaci funkčních skupin. ²

S rostoucí teplotou tedy vzrůstá i rychlost reakce. Při nárůstu teploty o 10°C se dvakrát až čtyřikrát urychlí celá reakce. Tuto zákonitost nazýváme van't Hoffovo pravidlo. Jelikož jsou enzymy bílkovinné povahy, s rostoucí teplotou dochází k inaktivaci enzymu. Van't Hoffovo pravidlo platí pro větší část enzymů při teplotách od 10 °C do 40°C. Aktivita enzymů razantně klesá při vyšších, či nižších teplotách. ¹⁰ Bílkovinná část totiž následně denaturuje a někdy může dojít i k odštěpení kofaktoru. Působení těchto protichůdných jevů vzniká křivka s maximem tzv. optimální teplotou enzymu. Na poloze maxima má vliv postup při měření (doba, po kterou reakce probíhá při jednotlivých teplotách) a jeho termostabilita. S kratší dobou inkubace vzrůstá optimální teplota, neboť se tolik neuplatňuje proces tepelné inaktivace. ⁴ Kratší doba inkubace může mít vliv na jednotlivé složky, protože se vlivem nedokonalé vodivosti skla úplně neprohřejí. Enzymy se liší v citlivosti za změny teploty. Tento jev se využívá při analýze směsi enzymů. ¹¹



Obrázek 7: **Optimální teplota vybraného enzymu** ¹¹

Optimální teplotu enzymů lze snadno porovnat s optimální teplotou buněk. Existují však určité výjimky. Například u teplomilných mikrobů žijících v termálních pramenech. U nich jsou enzymy nejspíše tepelně izolovány specificky vybavenou buněčnou membránou. I u stejných enzymů ve stejném organismu nalézáme rozdíly v hodnotách jejich optimální teploty. Laktátodehydrogenasa přítomná v játrech savců jeví vyšší náchylnost na změnu teploty na rozdíl od téhož enzymu v srdečním svalu. Závislost chování enzymů za určitých teplot omezuje oblast existence určitých organismů. Valná

část buněk nemůže existovat při teplotách vyšších než 45°C, rovněž jako při nízkých teplotách. Rychlost enzymatických reakcí, tedy i metabolismu, se mění dle změn teploty i dalších činitelů v okolí. Například v zimě se metabolismus některých organismů zpomaluje až k hodnotám, kdy nastává hibernace. Člověk, stejně tak jako další živočichové s řízenou teplotou těla si udržují rovnoměrnou teplotu. Teplota těchto živočichů může být ovlivněna chorobami, látkami způsobující horečku – např. pyrogeny. ¹

2.10.2 Vliv pH

Aktivita enzymů velmi závisí na pH prostředí. ⁷ Enzymy jsou přeci bílkovinné povahy a pro bílkoviny je typický amfoterní charakter. ¹ Terciální struktura bílkoviny je do značné míry založena na iontových a vodíkových vazbách. ²

Aktivitu enzymu v závislosti na koncentraci H⁺ řídí protonovatelné skupiny. Jedná se o skupiny, které jsou obsaženy v aktivních centrech a rovněž o molekuly celé řady substrátů. Stupeň protonace skupiny ovlivňuje reakci enzymu se substrátem. ⁴

Aktivita enzymu je nejvyšší pouze v určitém intervalu pH. Mimo tento interval aktivita enzymu výrazně klesá. Aktivitu enzymu lze regulovat změnou jeho pH, stejně tak jako k tomu nejspíše dochází v buňkách. ⁴ Interval, při kterém je aktivita enzymů nejvyšší, je převážně mezi pH 5 – 7. Nicméně některé enzymy mají tento interval výrazně posunutý. U pepsinu, enzymu trávicí soustavy, je to pH 2, naopak u arginasy 9 – 10. ¹

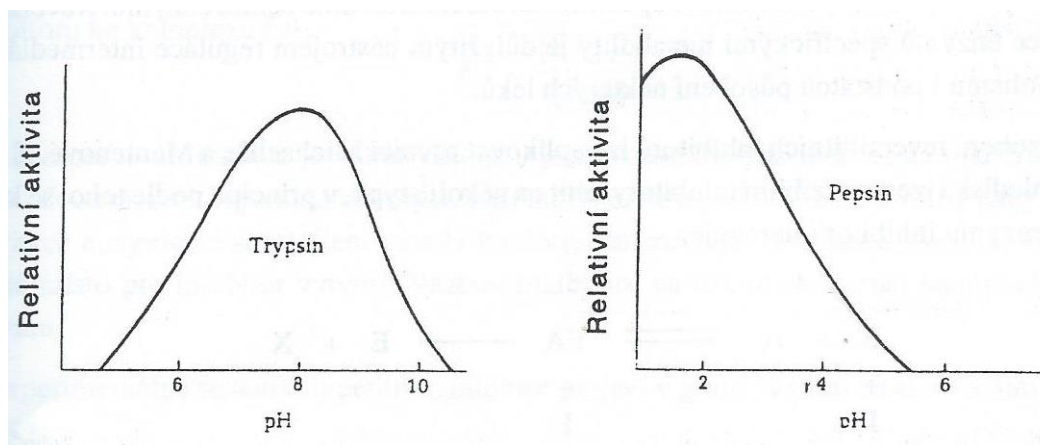
Tabulka 5: pH optima vybraných enzymů ¹⁰

název enzymu	pH optimum
pepsin	1,5 – 2,5
sacharasa	3,5 – 5,5
většina enzymů	6,0 – 7,0
trypsin	7,5 – 10
pankreatická šťáva	8,0

Na tom, že aktivita enzymu je výrazná pouze v úzkém intervalu pH, mají vliv tyto faktory:

1. extrémní hodnoty pH – dochází k iverzibilním změnám bílkovinné struktury v enzymu
2. ionizace substrátu
3. disociace vazebných skupin ²

Při vynesení aktivit enzymu do grafu za různých hodnot pH je výsledkem zvonkovitý křivka s maximem. Hodnota, kdy je pH v maximu křivky se označuje jako pH optimum, event. optimální pH. ²



Obrázek 8: Závislost aktivity enzymu na pH ⁶

K analýze závislosti aktivity enzymu na pH je jako další metoda možné použít určení aminokyselin, které napomáhají katalytickému působení enzymů v aktivním místě. ²

2.10.3 Další faktory ovlivňující aktivitu enzymů

1. množství substrátu

S rostoucím množstvím substrátu roste i rychlost enzymy katalyzovaných reakcí. Reakce se zrychluje do té doby, než se obsadí všechna aktivní místa.

2. množství enzymu

S rostoucím množstvím enzymu přímo úměrně roste i rychlost enzymatické reakce, pokud je dostatečné množství substrátu. ⁵

3. iontová síla
4. přítomnost jednotlivých efektorů (inhibitory, aktivátory), - viz. další kapitola
5. relativní permitivita ⁴

2.11 Aktivace a inhibice enzymů

Enzymatická reakce může být ovlivňována i působením nízkomolekulárních sloučenin, či iontů v buněčném prostředí. ⁵ Tyto látky se nazývají efekty. ⁴ Působí-li látky na rychlost reakce pozitivně, tedy zvyšují katalytický účinek, jedná se o aktivátory způsobující aktivaci. Je-li tomu naopak a látky snižují katalytický účinek, jedná se o inhibitory způsobující inhibici. ⁵ Efekty se dělí na přirozené a nepřirozené. Přirozené jsou běžnými složkami buněk a podílejících se na metabolismu. Nepřirozené efekty jsou obsaženy v léčivech, kde převážně inhibují určitý enzym. ⁴

2.11.1 Vliv aktivátorů

Jako aktivaci enzymu chápeme obecně proces, jenž napomáhá ke zvýšení katalytické aktivity enzymu, aktivaci neaktivního enzymu (proenzymu). Aktivace může být způsobena odstraněním inhibitoru (opak aktivátoru) či připojením koenzymu. Tyto efekty se využívají při izolacích enzymů z biologického materiálu. ²

Aktivátory jsou látky, zvyšující katalytické účinky enzymu, aniž by se účastnily reakce. Aktivátory působí především alostericky. Snadnější formace aktivního centra nebo jeho katalytické funkce je zapříčiněna specifickou konformační změnou způsobenou aktivátorem. Aktivátory působí na kooperaci podjednotek enzymu, který má kvartérní strukturu. Jako aktivátory chápeme hlavně kationty kovů s protonovým číslem 11 – 30. Kationty kovů s vyšším protonovým číslem fungují jako inhibitory (iverzibilní). Působení kationtů je zmapováno více než aniontů, kvůli technickým potížím. Mezi organické aktivátory řadíme organické fosfáty a nukleotidy. ² Znamé aktivátory amylas jsou ionty Cl⁻, enzymů přeměňujících ATP jsou ionty Mg²⁺ a peptidasy ionty Mn²⁺, Zn²⁺ a Co²⁺. ¹⁶

Všechny tyto látky se váží reverzibilně. Jsou možné i aktivace enzymového proteinu upravením její kovalentní struktury. ²

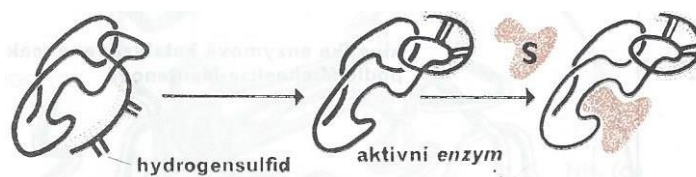
Aktivace může probíhat různými způsoby:

1. Rozštěpením peptidového řetězce proenzymu nebo odštěpením peptidu.



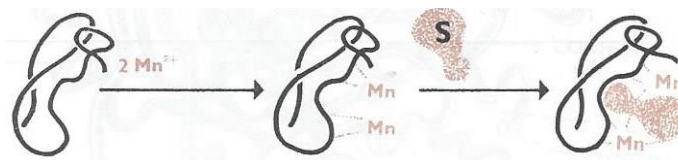
Obrázek 9⁹

2. Tvorbou S-S vazeb mezi postranními řetězci Cys se odkrývá aktivní centrum a může se tak vázat se substrátem.



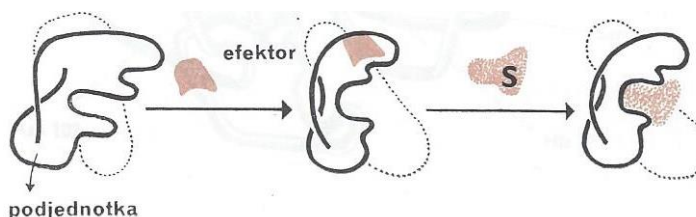
Obrázek 10⁹

3. Vytvoření komplexu s kovovými ionty. Ion usnadňuje vazbu enzymu se substrátem, eventuálně vytváří aktivní místo.



Obrázek 11⁹

4. Alosterickým účinkem efektoru.



Obrázek 12⁹

2.11.2 Inhibice

Jak samotný řecký původ slova napovídá (inhibeo – brzdím), tak inhibitory jsou látky zpomalující enzymatické reakce. Tento typ efektorů je velmi častý a z chemického

složení se vyskytuje v různých podobách. Jedná se o ionty, anorganické i organické látky. Tyto látky se shodují v afinitě k některé z enzymatických reakcí. ²

Inhibitory mění strukturu molekuly, což snižuje katalytický účinek enzymů, nebo působením na aktivní centrum se substrátem snižují rychlost enzymatické reakce. Další možností jak snížit rychlost reakce je, že inhibitor nepůsobí přímo na enzym, ale inaktivuje komplex enzym – substrát (E-S). ⁴

Inhibitory mají však i pozitivní účinek. Svůj význam mají v medicíně při léčbě rakoviny a při transplantacích, v enzymologii při diagnostických metodách, hygieně nebo v zahradnictví a zemědělství. ⁴

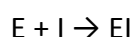
Enzymatické reakce ovlivněné inhibitory mohou udávat tzv. „stupeň inhibice“ (i) :

$$i = \frac{v - v_i}{v}$$

Kde v označuje rychlost neinhibované reakce a v_i rychlost reakce inhibované.

V různých zdrojích najdeme další dělení inhibice. A to na klasický nekompetitivní, akompetitivní, kompetitivní a smíšený nekompetitivní typ inhibice. ⁴

Vztah mezi inhibitorem a enzymem je charakterizován inhibiční konstantou K_i . Je to disociační konstanta komplexu enzym – inhibitor (EI).



$$K_i = \frac{[E] \cdot [I]}{[EI]}$$

O jaký typ inhibice se jedná, lze posoudit dle závislosti $\frac{1}{v_i}$ na $\frac{1}{[S]}$ o různých koncentracích inhibitoru. ¹²

Z pevnosti vazby mezi inhibitorem a enzymem, tedy zda jde inhibici lehce rušit například dialýzou, vytěsněním inhibitoru kofaktorem nebo substrátem, dělíme inhibici na ireverzibilní a reverzibilní. ²

2.11.2.1 Ireverzibilní inhibice

Pokud inhibitory vytváří s enzymem komplex enzym – inhibitor (E-I) a aktivitu enzymu tak nevratně blokuje, nazývají se ireverzibilní, tedy nevratné inhibitory. Nejčastěji se na enzym váží kovalentně a upravují (modifikují) funkční skupiny. ⁶

Disociační konstanta nevratné reakce, při které vzniká komplex enzym – inhibitor, je prakticky rovna nule. Kineticky jde o jednoduchou situaci, neboť se každým dalším přidáním inhibitoru snižuje i aktivita enzymu v důsledku snižující se ho aktivního enzymu. Reakce s ireverzibilními inhibitory se využívá při identifikaci skupin v aktivním místě. ² Ireverzibilní inhibice se využívá u bojových látek, kde dochází k inhibici enzymů z nervových tkání. Jelikož se mění koncentrace enzymu, neřídí se tato reakce rovnicí Michealise a Mentenové. ⁶

2.11.2.2 Reverzibilní inhibice

Inhibitor je vázán k enzymu slabými interakcemi. Vratné inhibitory vypovídají o struktuře aktivního místa i o substrátové specifitě enzymu. Uplatňují se při regulaci metabolismu a jejich podstata je využívána i v medikamentech. Inhibice lze popsat rovnicí Michaelise a Mentenové. ⁶

Existují 3 hlavní druhy reverzibilní, tedy vratné inhibice. Jedná se o:

- kompetitivní
- nekompetitivní
- akompetitivní inhibici.

Musí však být zachována podmínka, že se inhibitor váže rychle a vratně na enzym či na komplex enzym – substrát. ²

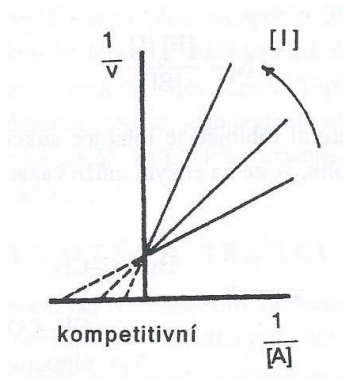
2.11.2.2.1 Kompetitivní typ inhibice

Kompetitivní inhibitory se natolik podobají svojí strukturou struktuře substrátu, že enzym nerozezná, o jakou látku se jedná. Enzym tak vytváří komplex s kompetitivním inhibitorem, namísto tvorby komplexu enzym – substrát (E-S). Komplex s inhibitorem je inaktivní a nepřeměňuje se tak na produkty. Enzym je inhibován. ⁴

Komplex enzymu s inhibitorem je však reverzibilní. Pokud je ve směsi přítomen substrát, soutěží s inhibitorem o aktivní místo na enzymu. Následně je děj závislý na

koncentraci látek ve směsi a jejich afinitě k enzymu. ⁴ Vliv inhibitoru na enzym lze zcela vytěsnit zvýšením koncentrace substrátu. ¹⁶ Inhibitor neovlivňuje meznou rychlost ($V = V'$), ale zvyšuje K_M ($K'_M > K_M$). ⁴

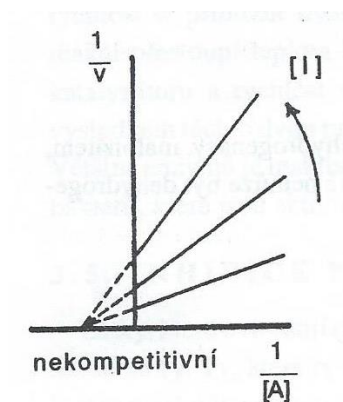
Kompetitivní inhibice nastává i v případě, že inhibitor soutěží s koenzymem o příslušné vazebné místo na povrchu molekuly. ⁴



Obrázek 13: Kompetitivní inhibice ⁶

2.11.2.2 Nekompetitivní typ inhibice

Při nekompetitivní inhibici se inhibitor váže na místa, která nejsou vazebná pro substrát. Neovlivňuje tak vazbu enzym – substrát, ale snižuje rychlost reakce, tedy rychlost tvorby produktů. Inhibitor se může vázat na funkční skupiny nebo mění konformaci enzymu, jež není ovlivněna vazbou enzymu se substrátem, a inaktivují tak enzym. ² Michaelisova konstanta ($K'_M = K_M$) se vlivem inhibitoru nemění, avšak snižuje se mezná rychlost enzymatické reakce ($V' < V$). Obdobně funguje mnoho přirozených inhibitorů a vykonávají tak důležité regulační funkce při metabolických přeměnách. ⁴

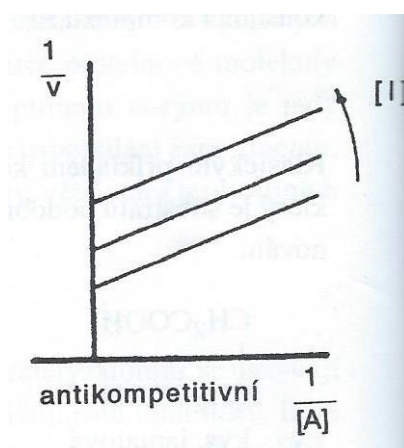


Obrázek 14: Nekompetitivní inhibice ⁶

2.11.2.2.3 Akompetitivní typ inhibice

Akompetitivní inhibitory se neváží na volné enzymy, avšak na komplex enzym – substrát (E-S) a inaktivují tak enzym. Substrát mění konformaci a nedochází ke vzniku produktu. Tento případ inhibice je typický pro vícesubstrátové reakce. Inhibitor reaguje s jinou formou enzymu, než se kterým reaguje substrát. ² Na rozdíl od kompetitivní a nekompetitivní inhibice zůstává zachován poměr mezi Michaelisovou konstantou a meznou rychlostí, neboť dochází k rovnoměrnému snížení obou veličin ($K'_M/K_M = V'/V$). ⁴

Jako další typy možné inhibice literatura uvádí inhibici substrátem a inhibici produktem. Při velkém nadbytku substrátu může dojít k situaci, kdy se na aktivní místo enzymu naváží dvě a více molekul substrátu. Reakce se tak zpomaluje, nebo dokonce i zastavuje. Pokud se při enzymatické reakci hromadí produkty, které nejsou využívány do dalších reakcí, dosahuje reakce rovnovážného stavu. Reakce se znovu rozbíhá až poté co poklesne koncentrace produktů. ¹⁰



Obrázek 15: Akompetitivní inhibice ⁶

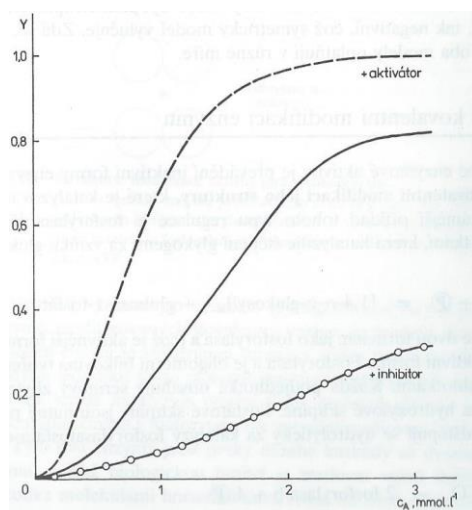
2.11.2.2.4 Alosterické enzymy

Alosterické enzymy jsou oligomery složené minimálně ze dvou totožných podjednotek. Mohou existovat ve dvou extrémních reverzibilních stavech. Nazýváme je aktivní a inaktivní. Oba stavy mají od sebe odlišnou konformaci. Jakýkoli efektor nebo substrát schopný tvořit s bílkovinou komplex se může vázat na jakoukoli podjednotku enzymu. Efektor se váže na vazebné místo pro efektor (alosterické místo) a substrát na aktivní místo. ⁹

Při vzniku komplexu enzym – alosterický efektor, dochází k reverzibilním, konformačním změnám enzymu. Se změnou konformace se mění i aktivita enzymu (resp. aktivního místa). Vztah mezi alosterickým a aktivním místem je rozhodujícím faktorem při alosterické inhibici. Alosterický přechod mění konformaci kvartérní struktury apoenzymu.¹

Alosterické enzymy napomáhají k regulaci metabolismu. Regulace probíhá na základě negativní nebo pozitivní zpětní vazby.

1. dva krajní stavy
2. alosterická aktivace – vazba s alosterickým aktivátorem
3. alosterická inhibice – vazba s alosterickým inhibítoem⁹



Obrázek 16: Vliv alosterické aktivace a inhibice na aktivitu enzymu²

2.12 Využití enzymů v praxi

Jak již bylo řečeno, enzymy byly využívány po tisíciletí. Při prvních výrobách nápojů či potravin a dlouhá staletí v průmyslových technologiích bez znalosti jejich existence a funkce.⁴

Narůstající znalosti o enzymech umožnily i jejich rozvoj v běžné praxi. Celá řada vědců a techniků spolupracovala na pochopení problematiky enzymů, až umožnili vznik nového oboru enzymového inženýrství. Rychle se rozvíjející obor umožnil vznik procesům velkoobjemové kultivace mikroorganismů, jakožto základnu pro enzymy potřebné v průmyslu.²

Průmyslová výroba a čištění spolu se stabilizací enzymů z rostlinných, živočišných a mikrobiálních zdrojů jsou výsledkem bádání. Znalosti si osvojila obrovská škála průmyslových výroby, například potravinářské, textilní, papírenské nebo lékařské. Preparáty enzymů jsou dnes používány v pekárenství, sýrařství, pivovarnictví, při úpravě masa, dále pak v textilním a papírenském průmyslu. Stanovování diagnóz v medicíně je snazší se znalostí enzymů.²

Budoucnost využití enzymů je obrovská. Mluví se o nových druzích potravin, čištění odpadních vod či dalších postupech léčby chorob.² Již dnes, se můžeme v domácnostech setkat s enzymovými pracími prostředky. Prací prostředky obsahují lipasy a proteasy, které štěpí „špínu“. Ta je nejčastěji způsobena tuky a bílkovinami. Tyto prostředky však nejsou určeny k ručnímu praní, neboť štěpí bílkoviny!¹⁷

2.12.1 Enzymy při analýze a v medicíně

Svojí specifitou účinku se enzymy často využívají jako analytická činidla. Vysoká citlivost a rychlost jsou přednosti analytických metod založených na práci s enzymy. Jsou proto využívány při stanovování látky ve směsi obsahující velké množství sloučenin bez předešlé izolace.⁴ Používají se pro určení množství substrátů nebo určení enzymové aktivity.²

U enzymatických reakcí se měří počáteční rychlost za současné kontroly teploty, pH, iontové síly a další faktorů ovlivňující účinnost enzymu, jak je patrné v předešlých kapitolách.² Tato metoda se jmenuje kinetická. Méně častou metodou je metoda konečného bodu spočívající ve stanovování množství produktu po ukončení reakce.⁴

Využití enzymů při analýze lze dělit na:

1. stanovení látek, jež jsou efekty enzymů
2. stanovení látek, jež jsou enzymu substrátem
3. využití enzymů pro stanovení látkové struktury
4. příprava vzorků pro analýzu
5. využití enzymů pro nepřímá stanovení⁴

V medicíně má při moderních klinicko-biochemických metodách analýza pomocí enzymů nezastupitelné místo. Používá se především pro dva účely. Jako analytické činidlo

při stanovování diagnosticky významných látek a při stanovování enzymů jakožto indikátorů stavu lidského organismu. ⁴

2.12.2 Enzymy v průmyslu

Největší využití enzymů v průmyslové praxi je jednoznačně při výrobě pracích prostředků a dále pak v kožedělném, textilním a potravinářském průmyslu. ⁴

Tabulka 6: Přehled některých průmyslově vyráběných enzymů a jejich využití ^{4,2}

Enzym	Obvyklý zdroj	Účinek	Oblast použití
α -amylasa	Bacillus subtilis	hydrolýza škrobu	výroba celulosy, v lihovarnictví, odstraňování škrobu, textilní průmysl
laktasa	Saccharomyces fragilis	rozklad laktózy	mlékárenství
lysozym	vaječný bílek	degradace buněčných stěn bakterií	oční terapie
papain	lodyhy ananasů	hydrolýza proteinů	potravinářství a konzervářství
penicilinacylasa	Escherichia coli	oddělení bočního řetězce penicilinů	výroba penicilinů
glukosaoxidas	hovězí játra	oxidace glukózy na glukonovou kys., rozklad H_2O_2	potravinářství (proti žluknutí tuků)
alkoholdehydrogenasa	kvasinky	$ethanol + NAD^+ \leftrightarrow acetaldehyd + NADH + H^+$	stanovení alkoholu

Mimo rozpustné enzymy se v průmyslových technologiích používají také enzymy imobilizované. Enzym je levnější a jeví nižší specifitu vůči aminokyselinám. ²

3 PRAKTICKÁ ČÁST

Praktická část této práce se věnuje didaktické transformaci teoretické části. Poskytuje ucelený soubor příprav pro výuku enzymů. Téma je konstruované na 3 vyučovací hodiny. Téma bylo uvedeno v praxi na Gymnáziu v Rokycanech v měsíci únoru ve třídě 3. B. Do této třídy chodí 28 žáků, z toho 13 chlapců.

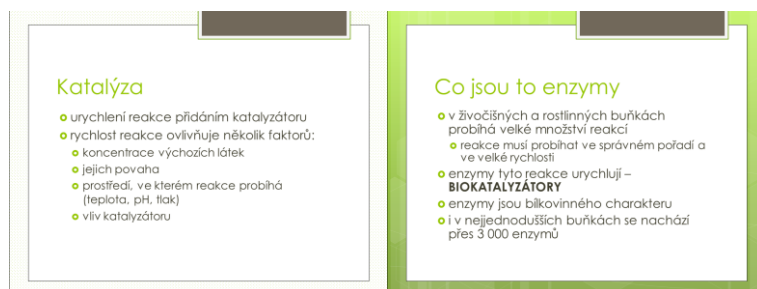
Na začátku a na konci každé hodiny probíhá opakování v podobě ústních otázek a před testem byla látka zopakována prostřednictvím pracovního listu.

Nejprve je nabízen, pro úvod do problematiky pracovní list na vyučovací látku, která nejčastěji předchází výuce enzymů, a to bílkovinám. Následně práce obsahuje pro výkladovou část tématu „Enzymy“ powerpointovou prezentaci o enzymech doplněnou výkladem a popsányi videi. Videi by měla prodloužit dobu, po kterou si žáci danou problematiku zapamatují, a zvýšit míru pochopení dané problematiky.

Práce obsahuje pracovní list, test na odučenou látku a laboratorní cvičení. Testy jsou zpracovány a graficky vyhodnoceny. Body za jednotlivá cvičení v testu a celkové hodnocení jsou uvedeny v kapitole 3.4.1 a 3.4.2.

Slidy v prezentaci jsou rozděleny na pouze **informativní** a slidy **stěžejní**, ze kterých si žáci musí dělat poznámky a dané téma ovládat. Slidy „informativní“ slouží k zajímavému rozšíření znalostí o enzymech a v prezentaci jsou označeny bílými okraji. Obdobně je odlišen i text v kapitole 3. 2. **Žlutě podbarvený text náleží k informativním slidům**, případně k rozšiřujícím, nepovinným informacím ze slidu stěžejního. Záleží tak na rozhodnutí učitele, jak velkou důležitost bude těmto informacím přikládat. Nepodbarvený text náleží ke slidům stěžejním.

Na následujícím příkladu je znázorněn rozdíl mezi slidem „informativním“ a slidem „stěžejním“



3.1 Pracovní list – bílkoviny

Tento pracovní list je možno použít jako spojovací článek mezi probíranou kapitolou „Enzymy“ a předcházející kapitolu „Bílkoviny“.

1. Co jsou to aminokyseliny?

2. Vysvětli pojem „esenciální aminokyseliny“.

3. Jaké jsou vlastnosti bílkovin? (5)

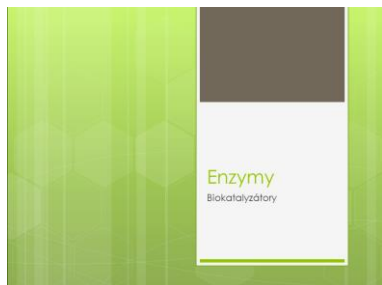
-
-
-
-
-

4. Co je to izoelektrický bod?

3.2 Výklad

Slide 1, 2

Slide 1



Slide 2

Název:	Enzymy ve výuce na vyšším stupni gymnázia
Autor:	Bc. Jakub Král
Vedoucí práce:	Mgr. Milan Klečka, Ph.D.
Vzdělávací oblast / obor:	Člověk a příroda / Chemie
Kvalifikační práce:	Diplomová práce

3.2.1 Katalýza

Slide 3

Katalýza je jeden ze způsobů urychlení chemické reakce. Mezi další faktory urychlující reakce patří teplota, tlak, pH, koncentrace výchozích látek atd.

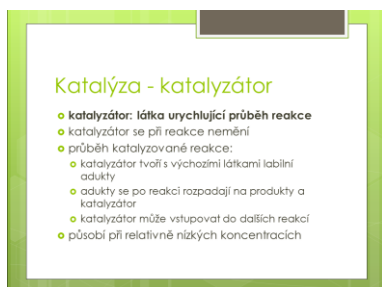
Slide 3



Slide 4

Katalyzátor tvoří s výchozími látkami komplex (adukt), který se poté rozpadá zpět na katalyzátor a nově vzniklé produkty. Katalyzátor pak může vstupovat do další reakce. Práce katalyzátorů probíhá při nízkých koncentracích.

Slide 4



Slide 5, 6

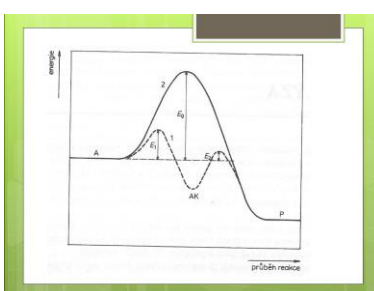
Úkolem katalyzátoru je snížení aktivační energie značenou A_E . Jde o jakousi bariéru bránící reaktantům v reakci. Katalyzátor vstupuje do reakce a reaguje s jednou z výchozích látek za vzniku komplexu, který následně reaguje s druhou výchozí látkou za vzniku produktů a uvolnění katalyzátoru. Aktivační energie u katalyzované reakce je tak nižší, než u reakcí nekatalyzovaných, jak je patrné z obrázku na slidu číslo 6. Opak pozitivního urychlení chemické reakce je proces zvaný inhibice. Inhibitor (negativní katalyzátor) aktivační energii komplexu naopak zvyšuje a vznik produktů tím tedy brzdí.

Slide 5

Katalýza - katalyzátor

- katalyzátor snižuje **aktivační energii (A_E)**
- teoretická bimolekulární reakce
 - $A + B \rightarrow AB$
 - katalyzátor K reaguje s jedním z reaktantů
 - $A + K \rightarrow AK + B \rightarrow ABK \rightarrow AB + K$
- aktivační energie katalyzované reakce je nižší, než u nekatalyzované
- opakem katalyzované reakce je tzv. **Inhibice**

Slide 6



Slide 7

Katalýza se dělí na homogenní a heterogenní. K homogenní katalýze dochází zpravidla u reakcí kyselin a zásad a jsou často urychlovány přítomností iontů. Je-li katalyzátorem jeden z produktů, jde o tzv. autokatalýzu. Při homogenní katalýze jsou reaktanty i katalyzátor ve stejné fázi. Naopak při heterogenní katalýze je katalyzátor v pevné fázi s velkým povrchem a reaktanty jsou plynné nebo kapalné. Jde o tzv. kontaktní katalýzu. Jak bylo uvedeno výše, opakem katalýzy je inhibice. Jedná se o zpomalování chemické reakce nejčastěji katalytickými jedy či stabilizátory.

Slide 7

Katalýza


- **Homogenní**
 - kyseliny, zásady, ionty
 - katalyzátory a reaktanty jsou ve stejné fázi
- **Heterogenní**
 - katalyzátor v pevné fázi s velkým povrchem
 - reaktanty jsou kapaliny, či plyny
- **Inhibice**
 - zpomalení reakce
 - stabilizátory a katalytické jedy

3.2.2 Co jsou to enzymy

Slide 8

Ve všech buňkách se uskutečňuje obrovské množství reakcí za krátkou dobu a reakce na sebe navazují. Reakce proto musí být urychlovány, neboli katalyzovány. Tuto činnost vykonávají právě enzymy. Jelikož katalyzují reakce v živých organismech, nazýváme je biokatalyzátory. Enzymy jsou buďto jednoduché nebo složené proteiny, bílkoviny. Jejich počet se odhaduje na miliardy a vědci tvrdí, že i v nejjednodušších buňkách se vyskytuje až 3 000 neúnavně pracujících enzymů.

Slide 8



Co jsou to enzymy

- v živočišných a rostlinných buňkách probíhá velké množství reakcí
- reakce musí probíhat ve správném pořadí a ve velké rychlosti
- enzymy tyto reakce urychlují – **BIOKATALYZÁTORY**
- enzymy jsou bílkovinného charakteru
- i v nejjednodušších buňkách se nachází přes 3 000 enzymů

Slide 9

Enzymy, rovněž jako chemické katalyzátory snižují aktivační energii A_E . Dochází k zeslabení vazeb mezi reagujícími molekulami a k jejich vzájemnému přiblížení. Enzymy také neovlivňují rovnovážné složení, neboť urychlují reakci v obou směrech. Jak již bylo uvedeno, enzymy katalyzují reakce v organismech při metabolismu, kde je vysoký nárok na kvalitu. Nesmějí vznikat žádné vedlejší produkty. Jelikož se enzymy v organismech tvořily, zdokonalovaly a formovaly několik miliard let, jsou efektivnější než chemické katalyzátory.

Slide 9



Co jsou to enzymy

- enzymy snižují A_E
- dochází k zeslabení vazeb a přiblížení molekul
- enzymy neovlivňují složení rovnovážné směsi
- pouze urychlují reakci oběma směry
- enzymy byly tvořeny miliardy let, proto jsou účinnější, než umělé katalyzátory

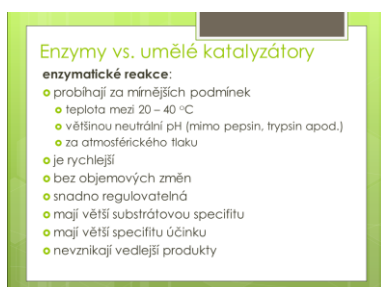
Slide 10

1. Reakce probíhá za mírnějších podmínek. Při teplotách mezi 20 – 40 °C, neutrálních hodnotách pH a za atmosférického tlaku. Posun pH do kyselých či

zásaditých hodnot je typický pro činnost enzymů trávicí soustavy (pepsin, trypsin). Umělé katalyzátory vyžadují často velmi náročné podmínky (teplota, tlak, pH).

2. Enzymy jsou účinnější. Rychlost chemických přeměn je mnohem vyšší než rychlost přeměny nekatalyzované reakce a o několik řádů vyšší než reakce s umělým katalyzátorem. Při enzymatických reakcích nedochází k objemovým změnám.
3. Enzymatické reakce se dají snadno regulovat. Jejich katalytické schopnosti neovlivňuje substrát, ale přítomnost jiných sloučenin.
4. Enzymy jeví značnou substrátovou specifitu a tvoří specifitější produkty. Urychlují přeměnu pouze určitého substrátu (substrátová specifita) a reakce probíhá pouze určitým způsobem (specifita účinku). Ne všechny enzymy mají stejný stupeň specifity. Některé reagují pouze s určitým substrátem, kdežto jiné enzymy vstupují do reakcí s látkami obsahující určité strukturní znaky. Reakce málokdy tvoří vedlejší produkty.

Slide 10



3.2.3 Historie enzymů

Slide 11

Jak je z tabulky patrné, první zmínky o enzymech pochází z 18. století, kdy byl popsán účinek trávicích šťáv. Prvním popsaným enzymem byla amylasa obsažená ve sladu, a to roku 1814. Dále pak amylasa ve slinách a žaludeční proteasa pepsin v letech 1830 - 1840. J. Berzelius popisoval výskyt katalyzovaných reakcí v rostlinách a živočiších roku 1834. Popisoval katalytickou schopnost sladu štěpit škrob. Dříve byly biokatalyzátory nazývány fermenty, jelikož se odhadovala jejich účast v rozkladných fermentačních dějích v přírodě a při výrobě potravin a nápojů. Název „enzym“ je používán až od roku 1878, kdy jej tak pojmenoval W. Kühneho (z řeckého en zýme – v kvasnicích).

Významným objevem enzymologie byla teorie komplementarity, se kterou přišel roku 1894 E. Fischer. Podle něj probíhá enzymatická reakce v malé oblasti molekuly enzymu. Enzym dle Fischera fungoval jako zámek a klíč. S podobnou představou přišel i V. Henry, který tvrdil, že se při enzymové reakci tvoří jako meziprodukt komplex enzym – substrát. Kinetiku jednosubstrátových reakcí popsali v roce 1913 E. Michaelisem a M. Mentenovou.

Bílkovinnou povahu enzymů dokázal až roku 1926 J. Sumner tím, že vykryštoval enzym ureasu. Ureasa katalyzuje hydrolýzu močoviny na oxid uhličitý a amoniak. Další enzymy vykryštoval Northrop mezi léty 1930 – 1936. Jednalo se o pepsin, chymotrypsin a trypsin. Že mají enzymy bílkovinnou povahu, předpokládal již roku 1840 J. von Liebig, i téměř o 40 let později M. Traube.

Slide 11

Rok	Autor	Úděllost
18. století		popsání účinku trávicích šťáv
1814		popsání prvního enzymu (amylasa ve sladu)
1830-40		popsána amylasa ve slinách a žaludeční proteasa pepsin
1834	Berzelius	popsal katalyzovaných dějů v rostlinách a živočích
1878	W. Kühne	název „Enzym“; dříve se nazývaly fermenty
1894	E. Fischer	teorie komplementarity – teorie zámku a klíče (tužil i V. Henry)
1913	E. Michaelis a M. Mentenová	popsání kinetiky jednosubstrátových reakcí
1926	J. Sumner	důkaz bílkovinné povahy enzymů (tužil již J. von Liebig a M. Traube)
1930-36	Northrop	vykryštoval pepsin, chymotrypsin a trypsin

Slide 12

Od objevení bílkovinné struktury enzymů začaly být zkoumány společně s chemií bílkovin. Dnes je detailně popsáno přes 3 000 enzymů. Velká část z nich byla vykryštována nebo izolována v čisté formě i díky pokroku techniky. Poznatky získané ze studia chemie bílkovin pomohly popsat prostorovou strukturu a mechanismus působení enzymů.

Slide 12

Historie enzymů

- od objevení bílkovinné struktury jsou enzymy zkoumány společně s chemií bílkovin
- dnes je důkladně popsáno více než 3 000 enzymů
- mnoho jich bylo vykryštováno nebo izolováno v čisté formě
- znalosti z chemie bílkovin napomohly popsat:
 - prostorovou strukturu enzymů
 - mechanismus působení enzymů

3.2.4 Názvosloví a klasifikace

Slide 13

Dříve byly enzymy pojmenovávány triviálně, dle funkce, kterou zastávaly v organismu, s koncovkou – in (např. trypsin, pepsin, chymosin apod.). J. Duclaux na konci 19. století začal přidávat koncovku – asa. Názvy enzymů se tvořily podle substrátu, který enzym katalyzoval (proteasa, lipasa, amylasa), nebo dle charakteru reakce (hydrolasa, oxidasa, transaminasa,...).

Slide 13



Názvosloví a klasifikace

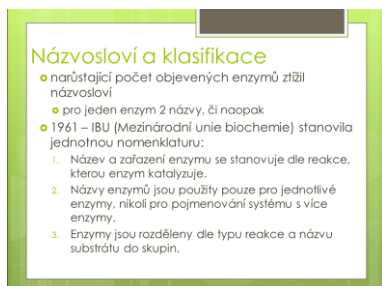
- dříve byly používány triviální názvy
- koncovka – in (např. trypsin, pepsin)
- od roku 1883 používána koncovka – asa (J. Duclaux)
- názvosloví se tvořilo dle:
 - katalyzovaného substrátu (proteasa, lipasa, amylasa)
 - nebo dle charakteru katalyzované reakce (hydrolasa, oxidasa, transaminasa)

Slide 14

Jelikož narůstal počet objevených enzymů, komplikovalo se jejich pojmenovávání. Stávalo se, že pro jeden enzym existovaly dva názvy a k jednomu názvu byly přiřazovány dva enzymy. Roku 1961 zavedla Mezinárodní unie biochemie (IUB) jednotnou nomenklaturu. K již zavedeným triviálním názvům zavedla systémové názvosloví. Názvosloví se tvořilo dle zásad:

1. Název a zařazení enzymu se stanovuje dle reakce, kterou enzym katalyzuje.
2. Názvy enzymů jsou použity pouze pro jednotlivé enzymy, nikoli pro pojmenování systému s více enzymy.
3. Enzymy jsou rozděleny dle typu reakce a názvu substrátu do skupin.

Slide 14



Názvosloví a klasifikace

- narůstající počet objevených enzymů ztěžil názvosloví
- pro jeden enzym 2 názvy, či naopak
- 1961 – IUB (Mezinárodní unie biochemie) stanovila jednotnou nomenklaturu:
 1. Název a zařazení enzymu se stanovuje dle reakce, kterou enzym katalyzuje.
 2. Názvy enzymů jsou použity pouze pro jednotlivé enzymy, nikoli pro pojmenování systému s více enzymy.
 3. Enzymy jsou rozděleny dle typu reakce a názvu substrátu do skupin.

Slide 15

Enzymy se podle typu katalyzované reakce dělí do šesti hlavních tříd, které se dále dělí.

Klasifikace	Typ katalyzované reakce
1. Oxidoreduktasy	oxidačně-redukční reakce
2. Transferasy	přenos funkčních skupin
3. Hydrolasy	hydrolýza
4. Lyasy	eliminace skupin za vzniku dvojných vazeb
5. Izomerasy	izomerace
6. Ligasy	tvorba vazeb spojená s hydrolýzou ATP

Slide 15

Názvosloví a klasifikace

dle typu katalyzované reakce se enzymy dělí do 6 hlavních skupin:

Třída	Druh katalyzované chemické reakce
Oxidoreduktasy	oxidačně-redukční děje
Transferasy	přenos funkčních skupin
Hydrolasy	hydrolytické štěpení
Lyasy	eliminace skupin za vzniku dvojných vazeb
Izomerasy	izomerace
Ligasy	tvorba vazeb spojená s hydrolýzou ATP

Slide 16

1. Oxidoreduktasy

- katalyzují oxidačně redukční procesy
- jedná se o jednu z nejpočetnějších tříd
- povahou jde o složené bílkoviny
- substrátem je donor vodíku nebo elektronů
- oxidoredukční děj je uskutečněn přenosem atomu vodíku (transhydrogenasa, či dehydrogenasa), nebo elektronů (transelektronasa)
- dělení na podtřídy dle funkčních skupin donorů, na které působí
- klasifikace na principu „donor : akceptor – oxidoreduktasa (dehydrogenasa, oxidasa)“
- zjednodušený princip: $A_{red} + B_{ox} \leftrightarrow A_{ox} + B_{red}$

- příklad reakce: ethanol + NAD⁺ → acetaldehyd + NADH + H⁺

Slide 16

Klasifikace a názvosloví

Oxidorektasy

- o katalyzují oxidačně redukční děje
- o jedna z nejpočetnějších tříd
- o složené bílkoviny
- o substrátem je donor vodíku nebo elektronů
- o oxidoredukční děj je uskutečněn přenosem atomu vodíku, nebo elektronů
- o klasifikace na principu „donor : akceptor – oxidoreduktasa (dehydrogenasa, oxidasa)“
- o zjednodušený princip: A_{red} + B_{ox} ↔ A_{ox} + B_{red}
- o příklad reakce: ethanol + NAD⁺ → acetaldehyd + NADH + H⁺

Slide 17

2. Transferasy

- přenos funkčních skupin (-CH₃, -NH₂, atd.) v aktivované formě z jedné sloučeniny (donoru) na jinou sloučeninu (akceptor)
- účastní se biosynthetických dějů
- opět početná skupina enzymů
- chemickou povahou se jedná o složené bílkoviny
- dělení do podtříd dle charakteru přenášených skupin
- klasifikace na principu „ donor : akceptor – přenášená skupina transferasa“
- zjednodušený princip: A-B + C → A + C-B
- příklad reakce: hexosa + ATP → hexosa-@ + ADP

Slide 17

Klasifikace a názvosloví

Transferasy

- o přenos funkčních skupin (-CH₃, -NH₂, atd.) v aktivované formě z donoru na akceptor
- o účastní se biosynthetických dějů
- o početná skupina enzymů
- o složené bílkoviny
- o klasifikace na principu „ donor : akceptor – přenášená skupina transferasa“
- o zjednodušený princip: A-B + C → A + C-B
- o příklad reakce: hexosa + ATP → hexosa-@ + ADP

Slide 18

3. Hydrolasy

- katalyzují hydrolytické štěpení vazeb (např. amidové, glykosidové, peptidové, esterové)
- početná skupina enzymů

- povahy jednoduchých bílkovin
- dělení do podtříd podle typu štěpených vazeb
- systémový název tvořen „substrát-odštěpená skupina hydrolasa“
- zjednodušený princip: $A-B + H_2O \rightarrow A-H + B-OH$
- příklad reakce: glycerol-tristearát + $3H_2O \rightarrow$ glycerol + kyselina stearová

Slide 18

Klasifikace a názvosloví

Hydrolasy

- katalyzují hydrolytické štěpení vazeb (např. amidové, glykosidové, peptidové, esterové)
- početná skupina enzymů
- jednoduché bílkoviny
- dělení do podtříd podle typu štěpených vazeb
- systémový název tvořen „substrát-odštěpená skupina hydrolasa“
- zjednodušený princip: $A-B + H_2O \rightarrow A-H + B-OH$
- příklad reakce: glycerol-tristearát + $3H_2O \rightarrow$ glycerol + kyselina stearová

Slide 19

4. Lyasy

- štěpí vazby C-C, C-O, C-N a dalšími způsoby než oxidací a hydrolyzou
- v jednom směru působí na dva enzymy, avšak v opačném pouze na jeden
- přinášejí, nebo odštěpují malé molekuly do substrátu (H_2O , NH_3 , atd.)
- málo početná skupina enzymů
- povahy složených bílkovin
- dělení do podtříd dle typu štěpených vazeb
- systémový název ze dvou slov „substrát-skupina lyasa“
- zjednodušený princip: $A-B \leftrightarrow A + B$
- příklad reakce: $(COOH)_2 \rightarrow HCOOH + CO_2$

Slide 19

Klasifikace a názvosloví

Lyasy

- štěpí vazby C-C, C-O, C-N
- přinášejí, nebo odštěpují malé molekuly do substrátu (H_2O , NH_3 , atd.)
- málo početná skupina enzymů
- složené bílkoviny
- systémový název ze dvou slov „substrát-skupina lyasa“
- zjednodušený princip: $A-B \leftrightarrow A + B$
- příklad reakce: $(COOH)_2 \rightarrow HCOOH + CO_2$

Slide 20

5. Izomerasy

- přesuny atomů a jejich skupin v jedné molekule
- nejméně početná skupina enzymů
- většinou povahy jednoduchých bílkovin
- dělení do podtříd dle typu vytvářené izomerie
- klasifikace na principu „substrát-děj-izomerasa“, kdy děj charakterizuje reakci
- zjednodušený princip: $A-B-C \leftrightarrow A-C-B$
- příklad reakce: fumarát \rightarrow maleát

Slide 20

Klasifikace a názvosloví

Izomerasy

- přesuny atomů a jejich skupin v jedné molekule
- nejméně početná skupina enzymů
- jednoduché bílkoviny
- klasifikace na principu „substrát-děj-izomerasa“, kdy děj charakterizuje reakci
- zjednodušený princip: $A-B-C \leftrightarrow A-C-B$
- příklad reakce: fumarát \rightarrow maleát

Slide 21

6. Ligasy

- katalyzují sloučení dvou molekul za současného hydrolytického štěpení difosfátu v ATP
- málo početná skupina povahy složených bílkovin
- v triviálních názvech se často označují jako synthetasy
- dělení do podtříd dle typu vznikajících vazeb
- systémový název tvořen „X-Y-ligasa tvořící ADP“, kdy X a Y zastupuje spojované molekuly
- příklad reakce: $X + Y + ATP \rightarrow X-Y + ADP + P_i$

Slide 21

Klasifikace a názvosloví

Ligasy

- katalyzují sloučení dvou molekul za současného hydrolytického štěpení dříšťátu v ATP
- málo početná skupina povahy složených bílkovin
- v triviálních názve se často označují jako syntetasy
- systémový název tvořen „X-Y-ligasa tvořící ADP“, kdy X, Y zastupuje spojované molekuly
- příklad reakce: $X + Y + \text{ATP} \rightarrow X\text{-}Y + \text{ADP} + \text{P}_i$

Slide 22

Enzymy jsou dnes označovány dvěma názvy a čtyřmístným kódem. **Doporučený** název se nejčastěji shoduje s triviálním názvem a je nejhojněji využíván v běžné praxi. **Systematický** název se tvoří dle dříve stanovených zásad a čtyřmístný kód popisuje zařazení enzymu do jedné ze šesti hlavních tříd, následujících podtříd, skupin a podskupin. **Číslo** odpovídá zařazení enzymu v klasifikaci EC (Enzyme Commission).

Názvosloví je patrné z následujících příkladů.

Slide 22

Názvosloví a klasifikace

- enzymy jsou označovány **dvěma názvy a čtyřmi čísly**
- doporučený název (často triviální, pro běžnou praxi)
- systematický název (k přesnému pojmenování enzymu)
- čtyřmístný kód – zařazení enzymu v hlavní třídě, podtřídě, skupině a podskupině
- číslo kódu odpovídá zařazení enzymu v klasifikaci EC (Enzyme Commission)

Slide 23, 24

Slide 23

Názvosloví a klasifikace

Příklad:

- doporučený název
- karboxypeptidasa A
- systematický název
- peptidyl-L-aminocihydrólasa

kód

- EC: 3.4.17.1
- 3 – hlavní třída – hydrolasy
- 4 – podtřída – peptidová vazba
- 17. skupina – metalokarboxypeptidasy
- 1. podskupina

Slide 24

Názvosloví a klasifikace

(S)-laktát:NAD⁺-oxidoreduktasa

EC 1 1 1 27

Třída – oxidoreduktasy

Podtřída – donorem H je skupina CHOH

Skupina – akceptorem H je NAD⁺

Číslo enzymu uvnitř skupiny

3.2.5 Struktura enzymů

Slide 25, 26

Jak již bylo řečeno, enzymy jsou jednoduché i složené bílkoviny, s častějším výskytem složených. Jednoduché bílkoviny jsou samozřejmě pouze bílkoviny, jde o jednu složku, kdežto složené bílkoviny jsou dvousložkové.

Dvousložkové enzymy jsou tvořeny bílkovinnou a nebílkovinnou složkou. Ta bílkovinná složka se nazývá apoenzym a určuje substrátovou specifitu. Tedy charakteristiku enzymu, protože katalyzuje reakce s právě určenými substráty. Nebílkovinná složka enzymu se nazývá kofaktor. Kofaktor určuje, jaké produkty budou přeměnou vznikat. Má tedy specifitu účinku a přenáší skupiny, elektrony nebo celé atomy. Nejčastější kofaktory jsou ionty kovů K^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , případně složitější organické molekuly. Jde o esenciální látky a člověk je tedy přijímá v potravě. Svoji strukturou úzce souvisí s vitamíny, jak je patrné z tabulky na slidu číslo 26.

Jsou-li kofaktor s apoenzymem navázány slabě, jedná se o koenzym. Ten je přítomen při chemických dějích katalyzovaných enzymem. Pokud jsou vázány pevnou kovalentní vazbou, jedná se o prosthetickou skupinu. Prosthetické skupiny umožňují katalytickou funkci enzymu. Koenzym s apoenzymem tvoří komplex holoenzym, kompletní fungující enzym.

Slide 25

Struktura enzymů

- o jednoduché i složené (cca 70%) globulární bílkoviny (proteiny)
- o dvousložkové enzymy
 - o nebílkovinná složka **KOFAKTOR** (specifita účinku)
 - o je-li slabě navázán na apoenzym nazývá se **KOENZYM**
 - o je-li pevně navázán kovalentní vazbou na apoenzym nazývá se **PROSTHETICKÁ SKUPINA**
 - o esenciální látky se strukturou podobnou vitamínům
 - o přenáší skupiny, elektrony, nebo atomy
 - o bílkovinná složka **APOENZYM** (substrátová specifita)
- o **APOENZYM + KOENZYM = HOLOENZYM**

Slide 26

Vitamín	Koenzym	Reakce
riboflavin (B2)	flavinoprotein (FMN)	přenos adénu
riboflavin (B2)	flavinadeninucleotid (FAD)	přenos H
kyselela nádobní (B3)	nikotinamidadeninucleotid (NADH)	přenos H
kyselela nádobní (B3)	pyridoxalofosfat	přenos -NH ₂
niacin (B3)	biočtyřin	přenos -COOH
kyselela panthotemová (B5)	koenzym A (CoA)	přenos acylu
kyselela listová (B9)	kyselela tetrahydrofolová	přenos C ₁
kyselela asparaginová (C)	-	kofaktor hydroxylace

Slide 27

Část enzymu kde probíhá enzymová reakce, se nazývá aktivní místo. Vyskytují se zde přesně prostorově rozmístěné funkční skupiny, jež jsou postranními řetězci aminokyselinových zbytků. Skupiny se při terciálním zřasení polypeptidických řetězců dostávají blízko k sobě a interagují se substráty. Jeden enzym může mít více aktivních míst.

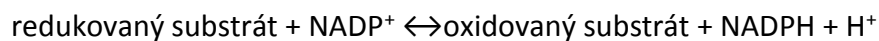
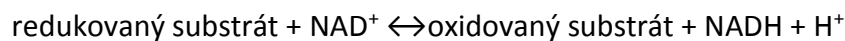
Slide 27

Struktura enzymů

- o oblast, kde se uskutečňuje enzymatická reakce se nazývá **AKTIVNÍ MÍSTO**
- o přesně prostorově rozmístěné funkční skupiny postranních řetězců aminokyselinových zbytků
- o ty se při terciálním ztavení dostávají blíže k sobě
- o funkční skupiny interagují se substráty

Slide 28

Kofaktory oxidoreduktas jsou přítomny při redukčních dějích, během kterých se podílejí na přenosu elektronů nebo vodíku. Nejznámější jsou nikotinamidadeninukleotid (NAD^+) a nikotinamidadeninukletidfosfát (NADP^+). Funkce těchto kofaktorů spočívá v reverzibilní vazbě vodíku, který je předán nebo odebrán substrátu:



K dalším kofaktorům patří také flavinmononuklid (FMN) nebo flavinadeninuklid (FAD).

Slide 28

Struktura enzymů

Kofaktory oxidoreduktas

- o při redukčních dějích se podílejí na přenosu vodíku nebo elektronů
- o nikotinamidadeninukleotid (NAD^+)
- o nikotinamidadeninukletidfosfát (NADP^+)

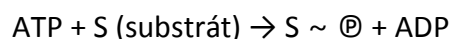
redukovaný substrát + NAD^+ \leftrightarrow oxidovaný substrát + $\text{NADH} + \text{H}^+$

redukovaný substrát + NADP^+ \leftrightarrow oxidovaný substrát + $\text{NADPH} + \text{H}^+$

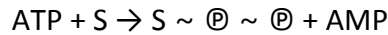
Slide 29

Kofaktory transferas jsou přítomny při přenosu celých molekul i skupin z donoru na akceptor. Jedná se o poměrně početnou skupinu. Fosfátové skupiny přenášejí enzymy, obecně známé jako kinasy. Obsahují ATP, který reaguje několika způsoby:

1. přenos fosfátového zbytku P za odštěpení adenosinmonofosfátu (AMP)



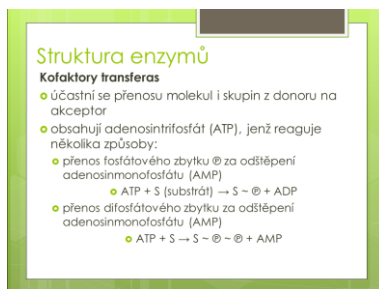
2. přenos difosfátového zbytku za odštěpení adenosinmonofosfátu (AMP)



Funkce podobné jako ATP mohou mít i jiné nukleotidy – guansintrifosfát (GTP), uridintrifosfát (UTP), cytidintrifosfát (CTP) – kde je adenin nahrazen guaninem, uracilem, cytosinem.

Koenzym A (CoA) přenáší acyly, ze kterých je nejvýznamnější zbytek kyseliny octové. Tzv. aktivní kyselina octová, nazývaná acetylkoenzym A (acetyl-CoA), má neodmyslitelné místo v průběhu řady metabolických přeměn.

Slide 29



Struktura enzymů

Kofaktory transferas

- Účastní se přenosu molekul i skupin z donoru na akceptor
- obsahují adenosintrifosfát (ATP), jenž reaguje několika způsoby:
 - přenos fosfátového zbytku P za odstěpení adenosinmonofosfátu (AMP)
 - $\text{ATP} + \text{S} (\text{substrát}) \rightarrow \text{S} \sim \text{P} + \text{ADP}$
 - přenos di-fosfátového zbytku za odstěpení adenosinmonofosfátu (AMP)
 - $\text{ATP} + \text{S} \rightarrow \text{S} \sim \text{P} \sim \text{P} + \text{AMP}$

3.2.6 Izolace enzymů

Slide 30

Pro izolaci a čištění enzymů je důležité mít na paměti, že enzymy mají bílkovinnou povahu. A jak bylo řečeno v minulých hodinách, práce s nimi je obtížná ve smyslu udržení vhodné teploty a dalších faktorů.

Využívá se metod obdobných jako u izolace bílkovin. Postup izolace je sledován na měření aktivity. Enzymy se nejdříve rozruší, nejčastěji se tak děje homogenizací a mletím. Extrakce probíhá nejčastěji alkoholem (butanolem). Dále lze využít tlumivých roztoků nebo vody. Nerozpuštěné zbytky můžeme oddělit centrifugací, nebo lépe filtrací. Oddělení nejmenších frakcí probíhá tepelnou denaturací, tedy temperací na 50 až 60°C po dobu 5 až 15 minut. Dalším způsobem je frakční vysolování síranem amonným, jenž je velmi dobře rozpustný a nedenaturuje bílkoviny.

Slide 30

Izolace enzymů

- o **bílkovinná povaha!**
- o postup izolace se pozoruje měřením aktivity enzymu
- o **rozušení enzymů:**
 - o homogenizace, mletí, nebo zmrazování
- o **extrakce:**
 - o alkoholem, tlumivých roztokem, nebo vodou
- o nerozpustitelné zbytky se oddělují:
 - o filtrací, nebo centrifugací
 - o k jemnějšímu oddělení se využívá tepelná denaturace nebo frakční vysolování sítanem amonným
- o další způsoby čištění jsou ionexová, afinitní chromatografie, gelová chromatografie, nebo elektroforéza

3.2.7 Měření aktivity enzymů

Slide 31

Aktivita enzymu je schopnost enzymu katalyzovat přeměnu substrátu v produkt. Určuje se měřením spotřeby substrátu, nebo množství vznikajícího produktu za jednotku času. Enzymy se vyskytují volně i vázaně, přičemž vázané vykazují vyšší aktivitu. Počáteční rychlost se řídí rovnicí Michaelise a Mentenové. Rychlost enzymatické reakce se stanovuje jako množství přeměněného substrátu za čas, protože čas, který je potřebný k promíchání složek, není nikdy nulový. Takto se však určuje pouze v oblasti, kdy je rychlost lineární s časem, jak je patrné z obrázku na slidu 31.

Důležitou součástí měření aktivity enzymů je teplota (cca 30°C) 5 až 10 minut, všech reakčních složek ve směsi, neboť rozdílné teploty složek směsi by ovlivnily měření. Pipety s jednotlivými složkami se při zahájení reakce vyfukují, aby byl čas co nejkratší. Reakce se ukončuje nejčastěji denaturací apoenzymu, vlivem pH, inhibitoru, nebo zředěním.

Stanovení aktivity enzymů zjednodušují instrumentální analytické metody (optické, elektrochemické, titrační).

Slide 31

Měření aktivity enzymu

- o **aktivita enzymu** = schopnost katalyzovat přeměnu substrátu v produkt
- o měří se:
 - o sledováním spotřeby substrátu
 - o nebo sledováním množství vzniklého produktu za jednotku času



Slide 31

Měření aktivity enzymu

- o **aktivita enzymu** = schopnost katalyzovat přeměnu substrátu v produkt
- o měří se:
 - o sledováním spotřeby substrátu
 - o nebo sledováním množství vzniklého produktu za jednotku času
- o před měřením aktivity se všechny složky teplotují (cca 30°C) 5 až 10 minut
- o ukončení reakce se provádí denaturací bílkovinné složky (pH, inhibitor)

3.2.8 Jednotka enzymové aktivity


Slide 32

Dříve se aktivita enzymu vyjadřovala nejrůznějšími smluvenými jednotkami, často vycházejícími ze způsobu měření. Až roku 1961 přišla Mezinárodní unie biochemie (IUB) se sjednocením jednotek.

Jako jednotka enzymové aktivity byl zaveden 1U (unit). Unit je aktivita enzymu, která za optimálních podmínek (pH optimum, 30°C) urychluje (katalyzuje) při nasycení substrátem přeměnu 1 μmol substrátu za 1 minutu.

Nicméně od roku 1972, v souvislosti zavedení soustavy SI, se začala používat nová jednotka - 1kat (katal). Katal je aktivita, která přemění, za optimálních podmínek (pH optimum, 30°C) 1 mol substrátu za 1 sekundu. V praxi se však využívají jeho zlomky. Převod mezi starou a novou jednotkou je: 1 U = 16,67 nkat.

Slide 32



Jednotka enzymové aktivity

- sjednocení jednotek v roce 1961 Mezinárodní unie biochemie (IUB)
- **1 U** (z anglického unit) - aktivita enzymu, která za optimálních podmínek katalyzuje při nasycení substrátem přeměnu 1 μmol substrátu za 1 minutu
- od roku 1972 nová jednotka: **1 kat** (katal) - aktivita, která přemění, za optimálních podmínek 1 mol substrátu za 1 sekundu
- v praxi se využívají zlomky katalu
- **1 U = 16,67 nkat**

3.2.9 Enzymová kinetika

Slide 33

Enzymatické reakce můžeme dělit dle počtu substrátů:

Reakce jednosubstrátové jsou nejjednoduššími enzymovými reakcemi - jediný substrát se přeměňuje na jediný produkt. Tento jev je běžný pro izomerasy, avšak obecně nejsou jednosubstrátové reakce příliš časté. Dalším případem může být rozklad jednoho substrátu na dva produkty, což je typické pro lyasy.

Reakce dvousubstrátové jsou nejčastějším typem enzymatické reakce - dva substráty se nejběžněji mění na dva produkty. Reakce jsou typické pro transferasy, oxidoreduktasy nebo lyasy. Ty ale tvoří pouze jeden produkt.

Do třísubstrátových reakcí vstupují tři substráty. Dva substráty se slučují v jeden produkt a zbývající substrát se štěpí na dva produkty. Tyto reakce jsou typické pro ligasy.

Slide 33

Enzymová kinetika

reakce jednosubstrátové

- nejjednodušší
- jediný substrát se mění na jediný produkt
- izomerasy, lyasy, hydrolasy

reakce dvousubstrátové

- nejčastější
- dva substráty se přeměňují na dva produkty
- transferasy, oxidoreduktasy, lyasy

reakce třísubstrátové

- tři substráty se mění na tři produkty
- ligasy

Slide 34, 35

Znovu bychom si měli připomenout, že enzymy urychlují chemické reakce a snižují aktivační energii, což je opět patrné z obrázku na slidu číslo 35.

Studium enzymové kinetiky má v biochemii neodmyslitelnou důležitost, neboť:

1. K pochopení důležitosti, role a funkce enzymů při metabolismu došlo v souvislosti se studiem kinetiky enzymatických reakcí.
2. Studium kinetiky enzymových reakcí se podílelo na tom, že může být určena vazebná afinita substrátů a inhibitorů k enzymu a maximální katalytická rychlost enzymu.
3. Katalytický mechanismus enzymů byl vysvětlen pozorováním změny rychlosti enzymatické reakce s reakčními podmínkami.
4. Podstatná část studia kinetiky enzymů je základem mnoha enzymatických testů.

Enzymatické reakce neprobíhají vždy stejnou rychlostí, protože záleží na podmínkách, za kterých reakce probíhá, ale touto látkou se budeme zabývat později.

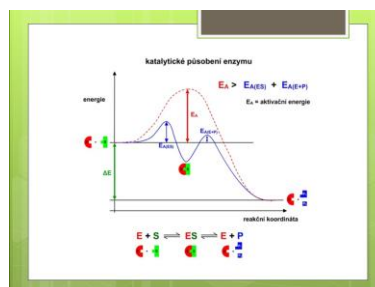
Slide 34

Enzymová kinetika

enzymy:

- urychlují dosažení rovnováhy mezi substráty a produkty
- snižují aktivační energii
- neovlivňují rovnovážné složení směsi

Slide 35



3.2.9.1 Průběh enzymatické reakce

Slide 36, 37

Brown přišel s tvrzením, že enzymatická reakce se skládá ze dvou elementárních reakcí.

Nejprve reaguje enzym (E) se substrátem (S), který se váže na aktivní místo. Vzniká komplex enzym-substrát (E-S), ze kterého vznikají příslušné produkty a původní enzym.

Slide 36

Enzymová kinetika

- enzym (E) reaguje se substrátem (S)
- tvoří se komplex enzym-substrát (ES)
- komplex se rozpadá na produkt (P) a enzym (E)
- reakce probíhá v **AKTIVNÍM MÍSTĚ**
- substrát a aktivní místo = klíč a zámek

Rovnice Michaelise a Mentonové

- $v = \frac{V[S]}{K_M + [S]}$
- $K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$

Slide 37

Slide 37

Slide 37

Rovnice Michaelise a Mentonové matematicky vyjadřuje saturační křivku, která napomáhá kinetickému zpracování mechanismu enzymatické reakce. Saturační křivka popisuje rychlost chemické reakce, neboť znázorňuje sycení enzymu substrátem.

Rovnice Michaelise a Mentonové:

$$v = \frac{V[S]}{K_M + [S]}$$

- V = limitní rychlost

- K_M = Michaelisova konstanta

Michaelisova konstanta je koncentrace substrátu, při které probíhá enzymová reakce za poloviční maximální rychlosti V .

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

Slide 38

Koncentrace enzymu je v závislosti na počáteční rychlosti lineární, je-li koncentrace substrátu konstantní a mění se složení enzymu.

Slide 38



Koncentrace substrátu je v závislosti na počáteční rychlosti hyperbolická, je-li konstantní koncentrace enzymu a mění se množství substrátu.

Slide 38



3.2.10 Faktory ovlivňující aktivitu

Slide 39

Rychlost enzymatických reakcí je ovlivňována celou řadou faktorů. Teplotou, pH, množstvím substrátu a enzymu, aktivací a inhibicí.

Slide 39

Faktory ovlivňující aktivitu

- teplota
- pH
- množství substrátu
- množství enzymu
- aktivace
- inhibice

3.2.10.1 Teplota

Slide 40, 41

Se vzrůstající teplotou prostředí, ve kterém reakce probíhá, dochází k vyššímu počtu molekulových srážek a rychlost reakce se zvyšuje. U enzymů se teplota podílí na celé řadě dalších jevů: vliv na afinitu enzymu k substrátu, rychlost štěpení komplexu enzym-substrát (E-S), stabilitu enzymu, pH tlumících roztoků a ionizaci funkčních skupin.

Pokud se teplota, při které reakce probíhá, zvýší o 10°C, celá reakce se dvakrát až čtyřikrát urychlí. Tento jev se označuje jako tzv. van't Hoffovo pravidlo. Jelikož jsou enzymy bílkovinné povahy, může dojít až k denaturaci apoenzymu. Enzymy jeví nejvyšší aktivitu při teplotách 10 - 40°C a v důsledku následné denaturace jejich aktivita klesá. Graficky znázorněnou závislostí aktivity enzymu na teplotě vzniká zvonkovitá křivka s vrcholem. Teplota, při níž křivka dosahuje maxima, nazýváme „optimální teplota“.

Snížení aktivity enzymů nalezneme v přírodě u celé řady organismů. Například metabolismus medvědů se v zimním období snižuje až do fáze hibernace.

Slide 40

Faktory ovlivňující aktivitu

Teplota

- se vzrůstající teplotou dochází k urychlení reakce
- +10°C se 2x až 4x urychlí celá reakce (van't Hoffovo pravidlo)
- od 10 do 40°C – nejvyšší aktivita, poté klesá
- optimální teplota
- denaturace bílkovinné části
- hibernace – důkaz v přírodě

Slide 41



3.2.10.2 pH

Slide 42, 43

Obdobně jako na teplotě je aktivita enzymů závislá i na pH prostředí. Aktivita enzymu je nejvyšší při určitém pH a mimo něj klesá. Proto se změnou pH může regulovat

aktivita jednotlivých enzymů, stejně tak, jak k tomu nejspíše dochází v buňkách organismů. Enzymy jeví nejvyšší aktivitu nejčastěji při pH 5 až 7, nicméně toto neplatí pro všechny enzymy. Jako příklad nám může posloužit pepsin - enzym trávicí soustavy.

Pokud je závislost pH na aktivitě enzymu znázorněna graficky, lze určit tzv. pH optimum, tedy hodnotu pH, při níž je aktivita enzymu nejvyšší.

Slide 42

Faktory ovlivňující aktivitu

pH

- aktivita nejvyšší při určitém pH
- pH optimum
- mimo aktivita klesá
- změnou pH regulace enzymu
- u většiny enzymů pH optimum 5 – 7
- pepsin 2, arginasa 9

Slide 43



3.2.10.3 Množství substrátu a enzymu

Slide 44

Při rostoucím množství substrátu se zvyšuje i rychlost enzymatické reakce. Reakce se zrychluje do doby obsazení všech aktivních míst.

Při rostoucím množství enzymu se přímo úměrně zvyšuje i rychlost enzymatické reakce. Avšak pouze do doby, kdy je přítomno dostatečné množství substrátu.

Slide 44

Faktory ovlivňující aktivitu

Množství substrátu

- s rostoucím množstvím substrátu roste i rychlost enzymy katalyzované reakce

Množství enzymu

- s rostoucím množstvím enzymu roste i rychlost enzymatické reakce

3.2.11 Aktivace a inhibice

Slide 45, 46

Látky ovlivňující aktivitu enzymů nazýváme efektory. Působí-li efekторы na rychlost chemické reakce pozitivně, jde o aktivátory. V případě, že působí na reakci negativně, jde o inhibitory.

3.2.11.1 Aktivace

Aktivace je proces, při kterém dochází ke zvýšení katalytické aktivity a aktivaci inaktivního enzymu.

Aktivátory zrychlují chemickou reakci alosterickým způsobem. Dochází tedy ke konformační změně aktivního místa nebo katalytické funkce vlivem aktivátoru. Jako aktivátory často působí kationty kovů, které mají protonové číslo 11 – 30. Jako organické aktivátory často fungují nukleotidy a organické fosfáty.

Při alosterické aktivaci se váže aktivátor na specifickou část molekuly zvanou „alosterické místo“ a modifikuje tvar aktivního místa. To před působením aktivátoru mělo odlišný tvar od substrátu, a tudíž byl enzym vůči němu inaktivní. Po modifikaci aktivního místa se stal enzym aktivním pro určitý substrát.

Slide 45

Faktory ovlivňující aktivitu

Aktivace

- aktivátory
- zvýšuje aktivitu enzymu, nebo aktivuje neaktivní enzym
- působí alostericky
- kationty kovů s protonovým číslem 11 – 30
- organické fosfáty a nukleotidy

Alosterická aktivace

- aktivátor se váže na alosterické místo
- modifikuje aktivní místo a aktivuje tak enzym

Slide 46

Alosterická aktivace

Diagram illustrating allosteric activation. A blue house-shaped substrate is shown near a green enzyme. The enzyme has a specific active site (aktivní místo) and an allosteric site (alosterické místo). A red activator (aktivátor) is shown binding to the allosteric site, which causes a conformational change in the active site, making it compatible with the substrate.

Slide 46

Alosterická aktivace

Diagram illustrating allosteric activation. A blue house-shaped substrate is shown near a green enzyme. The enzyme has a specific active site (aktivní místo) and an allosteric site (alosterické místo). A red activator (aktivátor) is shown binding to the allosteric site, which causes a conformational change in the active site, making it compatible with the substrate.

Slide 46

Alosterická aktivace

Diagram illustrating allosteric activation. A blue house-shaped substrate is shown near a green enzyme. The enzyme has a specific active site (aktivní místo) and an allosteric site (alosterické místo). A red activator (aktivátor) is shown binding to the allosteric site, which causes a conformational change in the active site, making it compatible with the substrate.

3.2.11.2 Inhibice

Slide 47

Negativní efekty jsou nazývány inhibitory. Jde o látky zpomalující rychlost chemické reakce. Inhibitory se vyskytují v různých podobách od iontů, přes anorganické látky, až po látky organické. Ačkoli by se mohlo zdát, že inhibitory jsou negativní látky, tak mají i pozitivní účinky. Nejvíce se jich využívá v medicíně.

Slide 47

Faktory ovlivňující aktivitu

Inhibice

- **inhibitory**
- látky zpomalující enzymatické reakce
- různými způsoby
- využití: medicína, hygiena, enzymologie

dělení:

- Ireverzibilní
- Reverzibilní

Inhibice se dělí na ireverzibilní a reverzibilní.

Slide 48

Ireverzibilní inhibice jsou nevratné. Vytvářejí s enzymem komplex enzym - inhibitor a blokují tak aktivitu enzymu. Využívají se například u bojových látek ochromující nervové tkáň.

Slide 48

Faktory ovlivňující aktivitu

Ireverzibilní inhibice

- vytváří s enzymem komplex enzym - inhibitor (E-I)
- nevratná inhibice
- kovalentní vazba a modifikace aktivního místa
- využití: enzymologie, bojové látky

Reverzibilní inhibice je inhibice vratná a není tedy definitivní. Je součástí metabolických procesů a hojně se využívá v medikamentech. Vratná inhibice se dělí na 3 základní typy. Inhibice kompetitivní, nekompetitivní a akompetitivní. Dalšími typy vratné inhibice jsou alosterická a inhibice substrátem či enzymem.

Slide 49

Slide 49

Faktory ovlivňující aktivitu

Reverzibilní inhibice

- vratná inhibice
- inhibitor se váže k enzymu slabými interakcemi
- využití v léčivech

dělení:

- kompetitivní
- nekompetitivní
- akompetitivní
- alosterická
- inhibice substrátem, či produktem

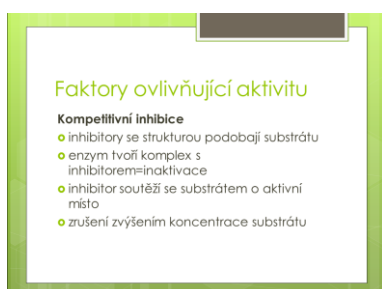
3.2.11.2.1 Kompetitivní inhibice

Slide 50, 51

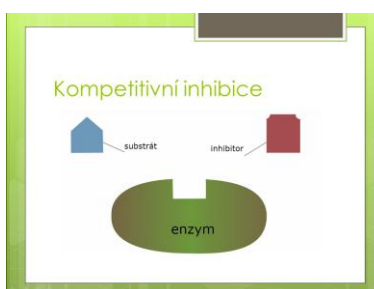
Jak již název napovídá, dochází k soutěži. K soutěži mezi substrátem a inhibitorem o aktivní místo. Inhibitor se svojí strukturou natolik podobá struktuře substrátu, že s ním enzym vytváří komplex. Substrát tak soutěží s inhibitorem, který z nich dříve zapadne do aktivního místa enzymu. Pokud substrát prohraje a do aktivního místa zapadne inhibitor, enzym se stává inaktivním.

Inhibici lze odvrátit zvýšením koncentrace substrátu.

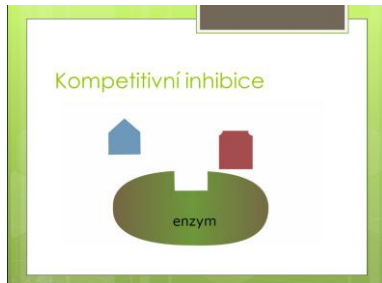
Slide 50



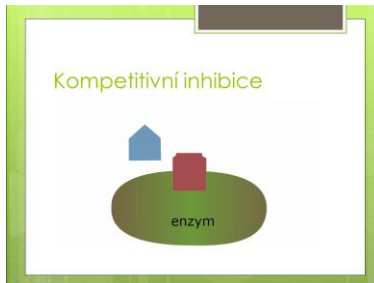
Slide 51



Slide 51



Slide 51



3.2.11.2.2 Nekompetitivní inhibice

Slide 52

Inhibitor se při nekompetitivním způsobu inhibice váže na jiná místa, než se váže substrát. Nemá tedy vliv na vazbu enzym – substrát, avšak snižuje celkovou rychlost reakce. Inhibitor se váže na funkční skupiny, případně mění konformaci enzymu, čímž jej inaktivuje.

Slide 52

Faktory ovlivňující aktivitu

Nekompetitivní inhibice

- inhibitor se váže místo nevazebné pro substrát
- neovlivňuje vazbu enzym-substrát, ale zpomaluje tvorbu produktů
- inhibitor může měnit konformaci enzymu=inaktivace

3.2.11.2.3 Akompetitivní inhibice

Slide 53, 54

Inhibitory nenapadají volné enzymy, kdežto napadají až komplex enzym – substrát a inaktivují ho. Substrát v důsledku působení inhibitoru mění konformaci a nevznikají žádné produkty.

Slide 53

Faktory ovlivňující aktivitu

Akompetitivní inhibice

- inhibitory se neváží na volné enzymy, ale na komplex enzym-substrát = inaktivace
- substrát mění konformaci a nevznikají produkty

3.2.11.2.4 Alosterická inhibice

Efektor, v tomto případě alosterický inhibitor, se váže na alosterické místo v molekule enzymu, za vzniku komplexu enzym – inhibitor, a modifikuje tak tvar aktivního místa. Původně bylo aktivní místo strukturně přizpůsobené pro zapadnutí substrátu a vzniku patřičného komplexu E - S. To je však po modifikaci aktivního místa neproveditelné a enzym se stává inaktivním.

Slide 53

Faktory ovlivňující aktivitu

Akompetitivní inhibice

- inhibitory se neváží na volné enzymy, ale na komplex enzym-substrát = inaktivace
- substrát mění konformaci a nevznikají produkty

Alosterická inhibice

- inhibitor se váže na alosterické místo
- vzniká komplex enzym-alosterický inhibitor
- mění se konformace aktivního místa
- substrát nezapadá do aktivního místa

Slide 54

Alosterická inhibice

substrát

aktivní místo

alosterické místo

inhibitor

Slide 54



Slide 54



3.2.11.2.5 Inhibice substrátem a enzymem

Slide 55

Dalšími typy inhibice je inhibice substrátem a inhibice produktem.

Je-li substrát ve velkém nadbytku, může nastat situace, že se na aktivní místo enzymu naváží dvě a více molekul substrátu. Reakce se zpomaluje, případně úplně zastavuje.

Hromadí-li se při enzymatické reakci produkty bez dalšího využití dalšími reakcemi, dosahuje reakce rovnovážného stavu a neběží tedy ani na jednu stranu. Znovu se rozbíhá až poté, co poklesne koncentrace produktů.

Slide 55



3.2.12 Využití v praxi

Slide 56

Enzymy se využívaly již při prvních výrobcích nápojů či potravin a dlouhá staletí v průmyslových technologiích, i když nebyla známa jejich existence a funkce.

Rychle se rozvíjející obor enzymologie umožnil vznik procesům velkoobjemové kultivace mikroorganismů, jakožto základnu pro enzymy potřebné v průmyslu.

Objevy enzymologie si osvojilo mnoho průmyslových výrobců: potravinářské, textilní, papírenské nebo lékařské, pekárenství, sýrašství, pivovarnictví. Dále se využívají

při čištění odpadních vod či léčbě chorob. Dnes se v domácnostech setkáváme s enzymovými pracími prostředky, které obsahují lipasy a proteasy štěpící „špínu“. Ta je nejčastěji způsobena tuky a bílkovinami. Tyto prostředky však nejsou určeny k ručnímu praní, neboť štěpí bílkoviny!

Slide 56



Využití v praxi

- Využití celých buněk
- příprava potravin (sýry, kynutá těsta...)
- nápojů (alkoholické)
- čištění odpadních vod
- antibiotika, steroidy, aminokyseliny, kyselina octová
- Využití izolovaných enzymů
- potravinářské, textilní a kožedělné technologie
- enzymové prací prášky
- analytická chemie
- klinicko – biomedicínská praxe
- veterinární a lidská medicína

3.3 Pracovní list – enzymy

1. Zapiš katalýzu teoretické bimolekulární reakce $A + B$ katalyzátorem K.

2. Homogenní katalýza je

- a) zpomalení reakce.
- b) katalyzátor a reaktant jsou v jiné fázi.
- c) katalyzátor a reaktanty jsou ve stejné fázi.
- d) koncentrace výchozích látek.

3. Charakterizuj enzymy minimálně pěti fakty.

-
-
-
-
-

4. Enzymy jsou méně X více efektivnější, než chemické katalyzátory (nehodící škrtni).
Své tvrzení zdůvodni.

5. Spoj správné dvojice

Sumner	popis katalytických dějů v rostlinách a živočiších
Michaelis a Mentenová	teorie zámku a klíče
Fischer	název „Enzym“
Berzelius	popsání kinetiky jednosubstrátových reakcí
Kühne	důkaz bílkovinné povahy enzymů

6. Vyber a popiš jednu ze šesti hlavních skupin enzymů + zapiš reakci.

7. Doplň tabulku.

kofaktor	
apoenzym	
	pevně navázaný kofaktor na apoenzym
koenzym	
	apoenzym + koenzym
	místo kde se váže substrát na enzym
katal	
	snižují AE, urychlují dosažení rovnováhy, neovlivňují rovnovážné složení směsi
aktivátory	
	vratný typ inhibice
	nevratný typ inhibice

8. Jak následující faktory ovlivňují aktivitu enzymů?

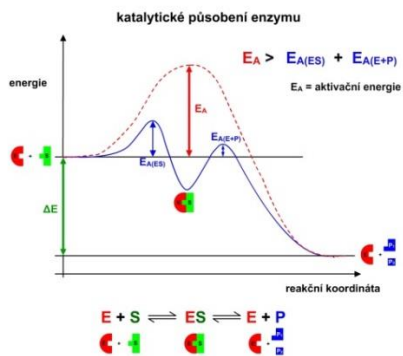
teplota -

pH -

množství substrátu -

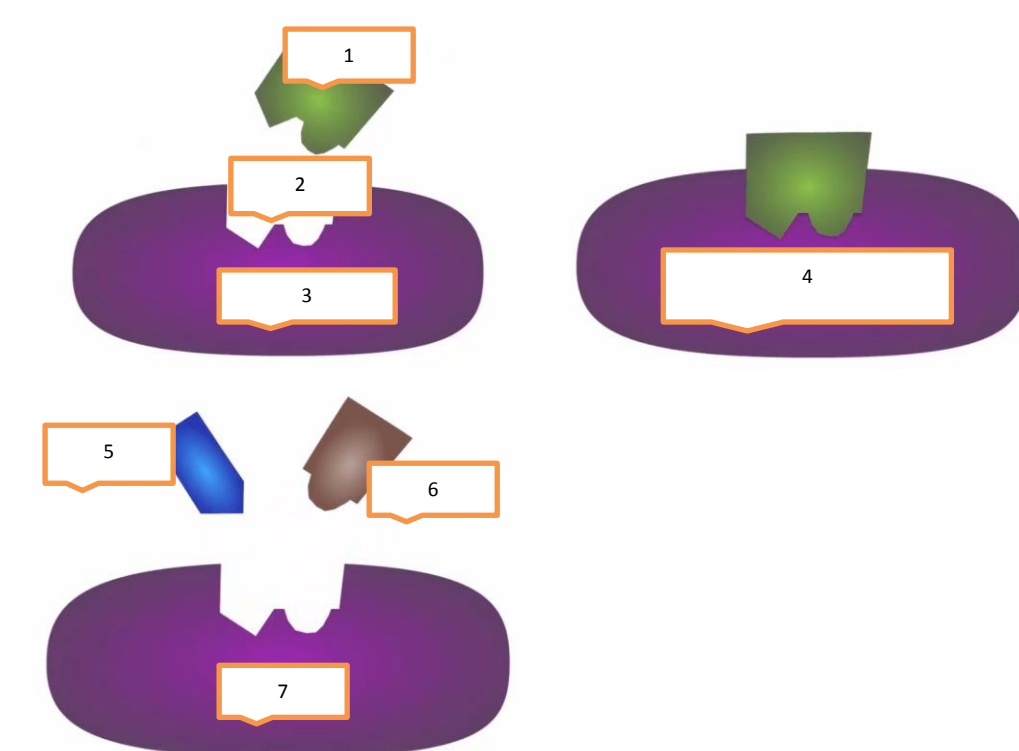
množství enzymu -

9. Co můžeme z následujícího grafu vyčíst ve spojitosti s reakční energií?



10. Následující schéma naznačuje.

- alosterickou aktivaci
- alosterickou inhibici
- kompetitivní inhibici
- průběh enzymatické reakce

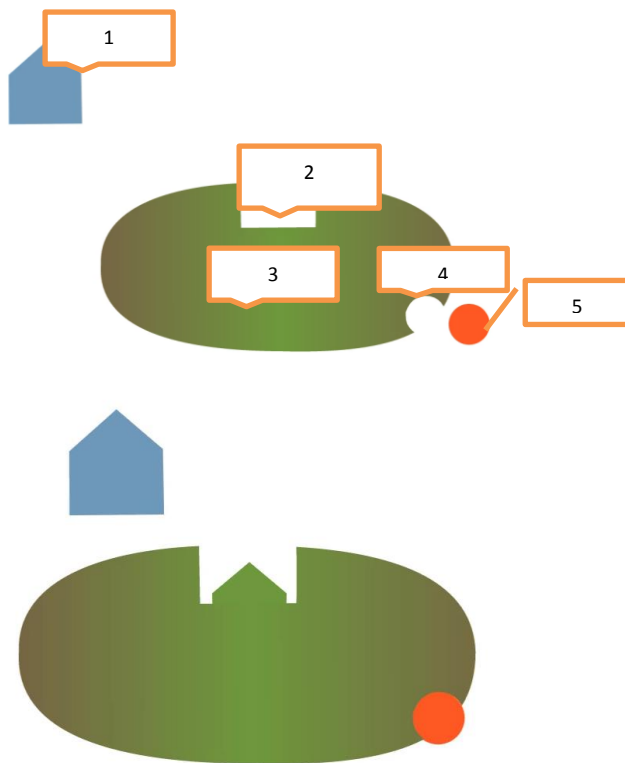


Do rámečků s čísly přiřaď správnou dvojici.

- a) aktivní místo
- b) komplex enzym-substrát
- c) enzym 2x
- d) produkt 2x
- e) substrát

11. Následující schéma naznačuje.

- a) alosterickou aktivaci
- b) alosterickou inhibici
- c) kompetitivní inhibici
- d) průběh enzymatické reakce

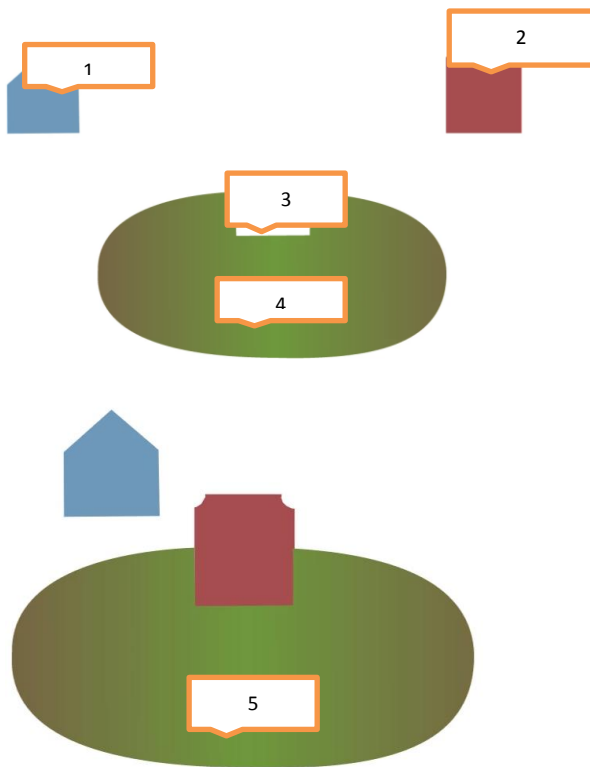


Do rámečků s čísly přiřaď správnou dvojici.

- a) aktivní místo
- b) substrát
- c) enzym
- d) alosterické místo
- e) inhibitor

12. Následující schéma naznačuje.

- a) alosterickou aktivaci
- b) alosterickou inhibici
- c) kompetitivní inhibici
- d) průběh enzymatické reakce

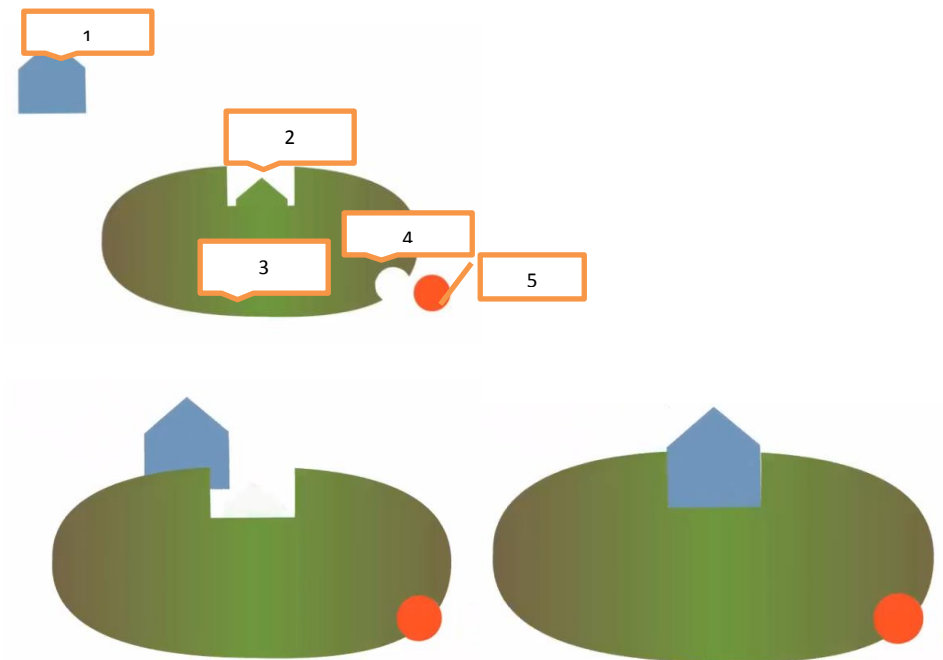


Do rámečků s čísly přiřaď správnou dvojici.

- a) aktivní místo
- b) substrát
- c) enzym 2x
- d) inhibitor

13. Následující schéma naznačuje.

- a) alosterickou aktivaci
- b) alosterickou inhibici
- c) kompetitivní inhibici
- d) průběh enzymatické reakce



Do rámečků s čísly přiřaď správnou dvojici.

- a) aktivní místo
- b) substrát
- c) enzym
- d) alosterické místo
- e) aktivátor

14. V jakých odvětví průmyslu se využívají enzymy?

3.4 Test

-A-

Enzymy – závěrečný test

jméno:

třída:

1. Enzymy urychlují chemické reakce v živých organismech, proto jsou označovány jako.
 - a) kyseliny
 - b) biokatalyzátory
 - c) zásady
 - d) sacharidy

2. Mezi přednosti enzymatické katalýzy oproti chemickým katalyzátorům patří.
 - a) nevznikají vedlejší produkty, jsou pomalejší, probíhají za vysokých teplot
 - b) vznikají vedlejší produkty, jsou rychlejší, probíhají za mírnějších teplot
 - c) nevznikají vedlejší produkty, jsou rychlejší, probíhají za mírnějších teplot
 - d) nevznikají vedlejší produkty, jsou pomalejší, probíhají za mírnějších teplot

3. Spoj správné dvojice.

1) Transferasy	a) hydrolýza
2) Izomerasy	b) tvorba vazeb spojená s hydrolýzou ATP
3) Hydrolasy	c) oxidačně – redukční reakce
4) Lyasy	d) eliminace skupin za vzniku dvojných vazeb
5) Oxidoreduktasy	e) izomerace
6) Ligasy	f) přenos funkčních skupin

4. Transferasy charakterizuje.

- a) přenáší atom vodíku
- b) štěpí vazby C-C
- c) přesunují atomy a skupiny uvnitř molekuly
- d) přenos funkčních skupin

5. Složka dvousložkového enzymu nesoucí specifitu účinku je.

- a) kofaktor, bílkovinná složka enzymu
- b) kofaktor, nebílkovinná složka enzymu
- c) apoenzym, bílkovinná složka enzymu
- d) apoenzym, nebílkovinná složka enzymu

6. Prosthetickou skupinu chápeme jako.

- a) kofaktor pevně navázán na apoenzym
- b) kofaktor pevně navázán na aktivní místo
- c) kofaktor slabě navázán na apoenzym
- d) kofaktor slabě navázán na aktivní místo

7. Látky aktivující inaktivní enzymy a urychlují tak reakci nazýváme.

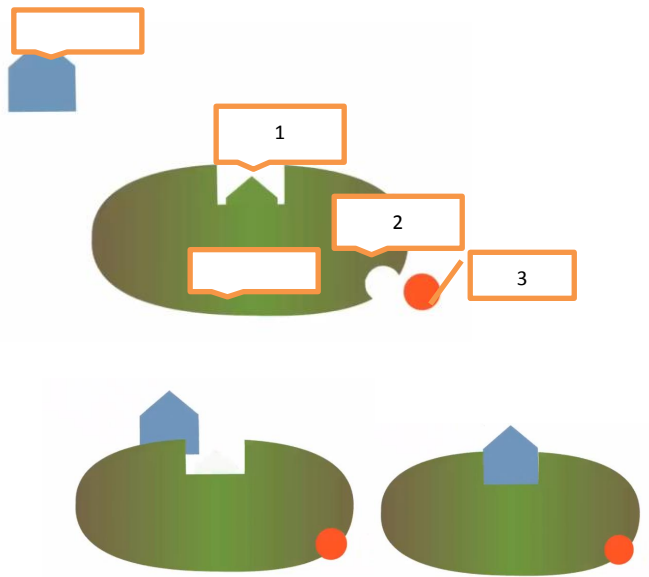
- a) inhibitory
- b) aktivátory
- c) koenzymy
- d) holoenzymy

8. Enzymy se v praxi využívají.

- a) pivovarnictví, automobilní průmysl, mlékárenství
- b) textilní průmysl, enzymové prací prášky, železární
- c) medicína, enzymové prací prášky, textilní průmysl
- d) automobilový průmysl, textilní průmysl, medicína

9. Následující schéma naznačuje.

- a) alosterickou aktivaci
- b) alosterickou inhibici
- c) kompetitivní inhibici
- d) průběh enzymatické reakce

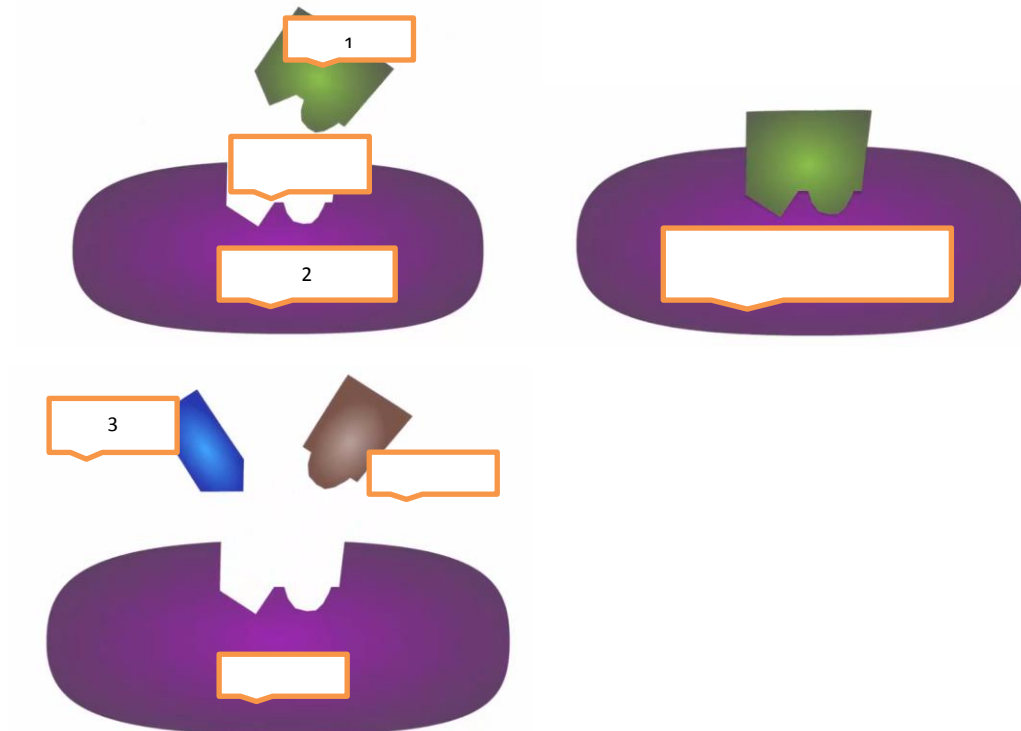


Číslo ve schématu značí.

- a) 1 – aktivní místo, 2 – enzym, 3 – aktivátor
- b) 1 – enzym, 2 – produkt, 3 – aktivátor
- c) 1 – aktivní místo, 2 – alosterické místo, 3 – aktivátor
- d) 1 – aktivní místo, 2 – enzym, 3 – inhibitor

10. Následující schéma naznačuje.

- a) alosterickou aktivaci
- b) alosterickou inhibici
- c) kompetitivní inhibici
- d) průběh enzymatické reakce



Číslo ve schématu značí.

- a) 1 – aktivní místo, 2 – enzym, 3 – substrát
- b) 1 – enzym, 2 – produkt, 3 – aktivátor
- c) 1 – aktivní místo, 2 – alosterické místo, 3 – aktivátor
- d) 1 – substrát, 2 – enzym, 3 – produkt

-B-

Enzymy – závěrečný test

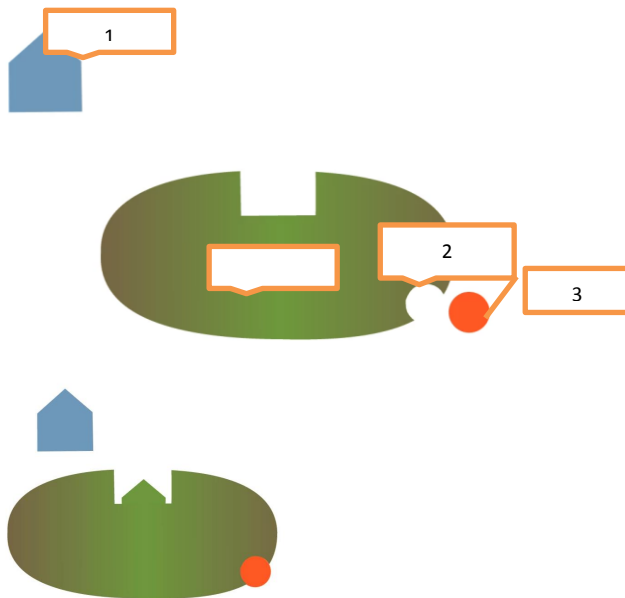
jméno:

třída:

1. Enzymy urychlují chemické reakce v živých organismech, proto jsou označovány jako.
 - a) kyseliny
 - b) sacharidy
 - c) zásady
 - d) biokatalyzátory

2. Mezi faktory ovlivňující aktivitu enzymu patří.
 - a) teplota, koncentrace substrátu, čas
 - b) pH, teplota, množství vodíkových můstků
 - c) koncentrace substrátu, pH, inhibitor
 - d) aktivátor, inhibitor, čas

3. Následující schéma naznačuje.
 - a) alosterickou aktivaci
 - b) alosterickou inhibici
 - c) kompetitivní inhibici
 - d) průběh enzymatické reakce



Číslo ve schématu značí.

- a) 1 – aktivní místo, 2 – enzym, 3 – substrát
- b) 1 – enzym, 2 – inhibitor, 3 – aktivátor
- c) 1 – substrát, 2 – alosterické místo, 3 – aktivátor
- d) 1 – substrát, 2 – alosterické místo, 3 – inhibitor

4. Hydrolasy charakterizuje.

- a) hydrolytické štěpení vazeb
- b) štěpí vazby C-C
- c) přesunují atomy a skupiny uvnitř molekuly
- d) přenos funkčních skupin

5. Složka dvousložkového enzymu nesoucí substrátovou specifitu je.

- a) kofaktor, bílkovinná složka enzymu
- b) kofaktor, nebílkovinná složka enzymu
- c) apoenzym, bílkovinná složka enzymu
- d) apoenzym, nebílkovinná složka enzymu

6. Koenzym chápeme jako.

- a) kofaktor pevně navázán na apoenzym
- b) kofaktor pevně navázán na aktivní místo
- c) kofaktor slabě navázán na apoenzym
- d) kofaktor slabě navázán na aktivní místo

7. Látky zpomalující aktivitu enzymu jsou.

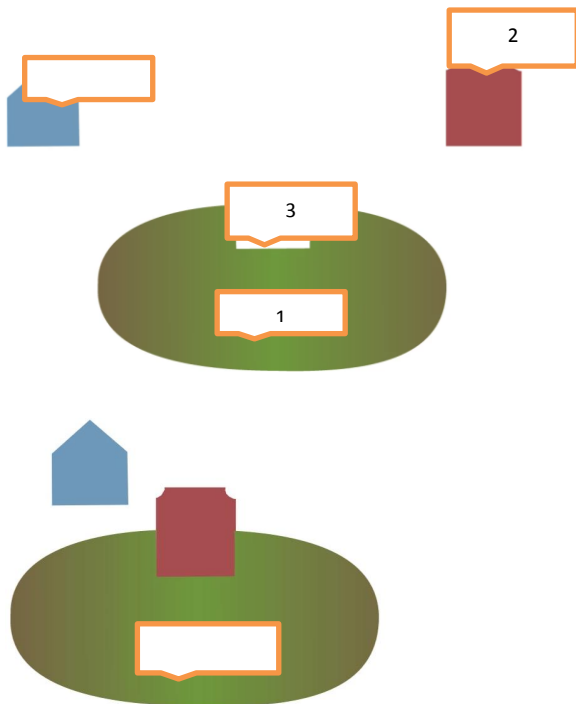
- a) inhibitory
- b) aktivátory
- c) koenzymy
- d) holoenzymy

8. Spoj správné dvojice.

- | | |
|-------------------|--|
| 1) Hydrolasy | a) eliminace skupin za vzniku dvojných vazeb |
| 2) Oxidoreduktasy | b) izomerace |
| 3) Transferasy | c) oxidačně – redukční reakce |
| 4) Ligasy | d) hydrolýza |
| 5) Izomerazy | e) tvorba vazeb spojená s hydrolýzou ATP |
| 6) Lyasy | f) přenos funkčních skupin |

9. Následující schéma naznačuje.

- a) alosterickou aktivaci
- b) alosterickou inhibici
- c) kompetitivní inhibici
- d) průběh enzymatické reakce



Čísla ve schématu značí.

- a) 1 – aktivní místo, 2 – enzym, 3 – inhibitor
- b) 1 – enzym, 2 – inhibitor, 3 – aktivní místo
- c) 1 – substrát, 2 – alosterické místo, 3 – aktivátor
- d) 1 – substrát, 2 – aktivátor, 3 – inhibitor

10. Enzymy se v praxi nevyužívají.

- a) pivovarnictví, medicína, mlékárenství
- b) textilní průmysl, enzymové prací prášky, železářny
- c) medicína, enzymové prací prášky, textilní průmysl
- d) pivovarnictví, textilní průmysl, medicína

3.4.1 Hodnocení testu

3.4.1.1 Oddělení –A-

Tabulka 7: Správné odpovědi a počet bodů, oddělení A

Číslo cvičení	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Správná odpověď	b	c	1-f, 2-e, 3-a, 4-d, 5-c, 6-b	d	b	a	b	c	a, c	d, d
Počet bodů	1	1	3 (půl bodu za každé správné)	1	1	1	1	1	2	2

3.4.1.2 Oddělení –B-

Tabulka 8: Správné odpovědi a počet bodů, oddělení B

Číslo cvičení	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Správná odpověď	d	c	b, d	a	c	c	a	1-d, 2-c, 3-f, 4-e, 5-b, 6-a	c, b	b
Počet bodů	1	1	2	1	1	1	1	3 (půl bodu za každé správné)	2	1

3.4.2 Klasifikace

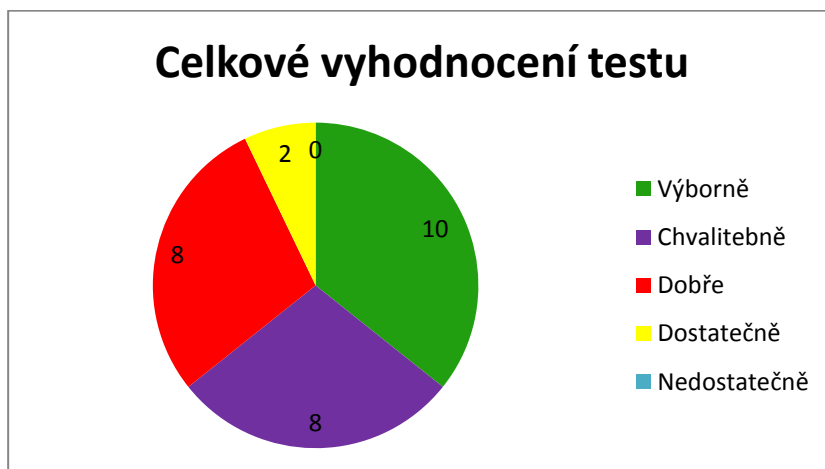
Pro stupeň známky „výborně“ musel žák dosáhnout minimálního počtu 90%, „chvalitebně“ 75%, „dobře“ 50%, „dostatečně“ 33% a pro stupeň „nedostatečně“ méně než 33%. Procenta jsou přepočtena na body, které jsou uvedeny v následující tabulce. Maximální možný počet bodů byl 14. Závěrečného testu se zúčastnilo všech 28 žáků (z toho 13 chlapců a 15 dívek).

Tabulka 9: Klasifikační škála

Stupeň známky	výborně	chvalitebně	dobře	dostatečně	nedostatečně
Počet bodů	14 - 13	12 - 11	10 - 7	6 - 5	4 - 0

3.4.3 Vyhodnocení testu

Graf 1: Celkové vyhodnocení testu



Závěrečný test absolvovali všichni žáci 3. B (28 žáků) s relativně úspěšným výsledkem. 10 žáků napsalo test s výslednou známkou „výborně“. 8 žáků dostalo výslednou známkou „chvalitebně“ a stejný počet žáků známku „dobře“. Pouze 2 žáci dostali z testu známku „dostatečně“ a žádný žák, tedy nedosáhl tak nízkého počtu bodů, aby byl klasifikován známkou „nedostatečně“.

3.5 Laboratorní cvičení

3.5.1 Závislost rychlosti štěpení škrobu α -amylasou na pH ¹²

Princip: α -amylasa hydrolyticky rozkládá 1, 4- α -D-glukosidové vazby škrobu za vzniku maltózy. Aktivitu enzymu lze sledovat pomocí reakce s jodem, která dává se substrátem charakteristické zbarvení a produkty nikoliv. Reciproké (převrácené) hodnoty doby potřebné k rozštěpení škrobu, může sloužit jako míra aktivity enzymu. Aktivita enzymu závisí na hodnotě pH. Při provedení reakce v tlumivých roztocích o různých hodnotách pH lze určit pH optimum.

Chemikálie: 1% roztok škrobu, 0,2 M roztok chloridu sodného, 0,1 M fosfátové tlumivé roztoky pH – 6,0; 6,4; 6,8; 7,2; 7,6; 8,0, 0,02 N roztoku jodu (0,25g jodu se rozpustí v 5g jodidu draselného v 6-10 ml vody a doplní se na 100 ml), roztok amylasy ve vodě (ze slin, případně ze sladu)

Postup:

Příprava roztoku amylasy ze slin

- vypláchněte si ústa 10 ml destilované vody po dobu 2 minut
- sliny vypusťte do kádinky a její obsah zfiltrujte za běžného tlaku
- filtrát zřed'te destilovanou vodou v poměru 1 : 5.

Určení aktivity α -amylasy při různých pH

- nařed'te roztok destilovanou vodou v poměrech 1 : 1, 1 : 2, 1 : 3
- do 3 zkumavek napipetujte 2 ml roztoku chloridu sodného, 5 ml roztoku škrobu a 2 ml fosfátového pufru pH 7,2
- zkumavky vložte do lázně vyhřáté na 37°C společně se zkumavkami obsahující zředěné roztoky amylasy a temperujte 10 minut
- po vytemperování do zkumavek přidejte 2 ml zředěného roztoku enzymu a složky důkladně promíchejte
- po 3 – 4 minutách kapátkem odeberte několik kapek vzorku do zkumavek obsahující roztok jodu (2 kapky roztoku jodu ve 2 ml vody)

- při vzniku méně tmavého roztoku škrobu s jodem zkracujte dobu přidávání
- měří se čas, za který vymizí pozitivní reakce na škrob ve zkumavce
- ideální zředění je takové, při kterém je reakce ukončena do 10 minut

Vyhodnocení:

- po určení ideálního zředění se obdobně určí pH optimum, avšak do zkumavek pipetujte 6 tlumivých roztoků a zředěný roztok amylasy
- obrácené hodnoty času vynesené do grafu v závislosti na hodnotě pH tlumivého roztoku vznikla křivka, ze které bylo odečteno pH optimum

Závěr:

3.5.2 Aktivace a inhibice štěpení škrobu α -amylasou ¹²

Princip: Aktivita α -amylasy štěpí 1, 4- α -D-glukosidové vazby škrobu za vzniku maltózy závisí na přítomnosti různých iontů v roztoku. Aktivita je sledována při reakci s jodem, neboť s ním substrát vykazuje charakteristické zbarvení, na rozdíl od produktů.

Chemikálie: 1% roztok škrobu, 0,2 M roztok chloridu sodného, 0,2 M roztok chloridu draselného, 0,1 M fosfátový tlumivý roztok 7,0, 0,2 M roztok bromidu draselného, 0,2 M roztok rhodanidu draselného, nasycený roztok chloridu rtuťnatého, 0,02 N roztoku jodu (0,25g jodu se rozpustí v 5g jodidu draselného v 6-10 ml vody a doplní se na 100 ml), roztok amylasy ve vodě (ze slin, případně ze sladu)

Postup:

Příprava roztoku amylasy ze slin

- vypláchněte si ústa 10 ml destilované vody po dobu 2 minut
- sliny vypusťte do kádinky a její obsah zfiltrujte za běžného tlaku
- filtrát zředte destilovanou vodou v poměru 1 : 5.

Určení optimálního zředění enzymu

- naředte roztok destilovanou vodou v poměrech 1 : 1, 1 : 2, 1 : 3
- do 3 zkumavek napipetujte 2 ml roztoku chloridu sodného, 5 ml roztoku škrobu a 2 ml fosfátového pufru pH 7,0

- zkumavky vložte do lázně vyhřáté na 37°C společně se zkumavkami obsahující zředěné roztoky amylasy a temperujte 10 minut
- po vytemperování do zkumavek přidejte 2 ml zředěného roztoku enzymu a složky důkladně promíchejte
- po 3 – 4 minutách kapátkem odeberte několik kapek vzorku do zkumavek obsahující roztok jodu (2 kapky roztoku jodu ve 2 ml vody)
- při vzniku méně tmavého roztoku škrobu s jodem zkracujte dobu přidávání
- měří se čas, za který vymizí pozitivní reakce na škrob ve zkumavce
- ideální zředění je takové, při kterém je reakce ukončena do 10 minut

Sledování aktivace a inhibice

- obdobně se pokračuje při sledování aktivity a inhibice
- do šesti zkumavek napipetujte 5 ml roztoku škrobu, 2 ml tlumivého roztoku a do jednotlivých zkumavek 2 ml:

Tabulka 10: Rozdělení jednotlivých složek do zkumavek

Zkumavka	A	B	C	D	E	F
	voda	NaCl	KCl	KCNS	KBr	HgCl ₂

- vložte zkumavky a nádobku s enzymem do lázně vyhříváné na 37°C
- po 10 minutách přidejte do všech zkumavek 2 ml enzymu rychle po sobě a směs promíchejte trubičkou
- nyní začněte měřit čas
- po 3 – 4 minutách kapátkem odeberte několik kapek vzorku do zkumavek obsahující roztok jodu (2 kapky roztoku jodu ve 2 ml vody)

Vyhodnocení:

- měří se čas, za který vymizí pozitivní reakce na škrob v jednotlivých zkumavkách

- porovnáním převrácených hodnot časů se stanoví stupeň aktivace příslušným iontem

Závěr:

3.5.3 Štěpení sacharózy β -D-fruktofuranosidasou, závislost rychlosti reakce na koncentraci enzymu ¹²

Princip: β -D-fruktofuranosidasa urychluje hydrolytické štěpení sacharózy na glukózu a fruktózu (invertní cukr). Tyto cukry mají na rozdíl od substrátu redukční vlastnosti, proto je možné použít ke sledování působení enzymu stanovení, které se zakládá na redukčních vlastnostech cukrů. Pro přípravu enzymu je vhodné použít pekařské nebo pivovarské droždí.

Chemikálie: 10% roztok sacharózy, 0,1 M acetátový tlumivý roztok pH 4,5, 1% hydroxid sodný, činidla pro stanovení redukujících cukrů dle Schoorla, roztok enzymu (20 g droždí se rozetře v třecí misce společně s 15 g skelného prachu, po částech se přidá 10 ml vody a 5 minut se směs roztírá. Následně se v několika dávkách přidá postupně 35 ml vody, promíchá se a 30 minut se nechá odstát při pokojové teplotě. Směs se následně zfiltruje.)

Postup:

- do 5 zkumavek napipetujte roztoky mimo enzymu, dle následující tabulky:

Tabulka 11: Návod pro přípravu roztoků

Zkumavka	A	B	C	D	E
sacharóza (ml)	5	5	5	5	5
tlumivý roztok (ml)	3	3	3	3	3
voda (ml)	2	1,5	1	0,5	0
Roztok enzymu (ml)	0	0,5	1	1,5	2

- zkumavky a nádobku s enzymem temperujte 5 minut při teplotě 37°C
- do zkumavky B vyfoukněte z pipety roztok enzymu, zamíchejte a nechte inkubovat

- reakci po 15 minutách zastavte přidáním 2 ml hydroxidu
- inkubace ve zkumavkách C – E začíná v minutových intervalech po sobě a 15 minutách reakce končí
- pro kontrolu nakonec do zkumavky A přidejte 2 ml hydroxidu
- obsah zkumavek promíchejte a z každé odeberte 2 vzorky po 1 ml

Vyhodnocení:

- ve vzorkách se stanoví redukující cukry dle Schoorla
- průměry získaných hodnot naneste do grafu v závislosti na množství enzymu

Závěr:

3.5.4 Substrátová specifita α -amylasy a sacharasy ¹⁸

Chemikálie: škrob, sacharóza, kvasnice, 0,1 mol/l fosfátového tlumivého roztoku pH 7,2, Lugolův roztok

Fehlingovo činidlo:

- roztok I: 40 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ rozpustíte v 500 ml vody a doplňte do 1l
- roztok II: 200 g Seignettovy soli (vinan sodnodraselný) a 150 g NaOH rozpustíte v malém množství vody a doplňte na 1l

Postup:

příprava substrátů

- rozpustíte 1 g sacharózy v 50 ml destilované vody
- 0,5g škrobu rozsuspendujete v tlumivém roztoku
- 5 minut povařte

příprava enzymů

- a) 1ml vlastních slin zředíte 2 ml destilované vody
- b) 0,1g pekařských kvasnic suspendujete ve 20 ml vody

vlastní pokus

- dle následující tabulky napipetujte do 6 zkumavek 0,5 ml α -amylasy a sacharasy

Tabulka 12: **Návod pro přípravu roztoků**

Zkumavka	1	2	3	4	5	6
amylasa (ml)	0,5	0,5	-	-	-	0,5
sacharasa (ml)	-	-	0,5	0,5	0,5	-
povařit	-	ano	-	-	ano	-
škrob (ml)	2	2	2	-	-	-
sacharasa	-	-	-	2	2	2

- zkumavky 2 a 5 povařte 5 minut a následně přidejte 2 ml substrátu (škrob, nebo sacharózu dle tabulky)
- veškeré zkumavky temperujte 30 minut při teplotě 38°C
- po inkubaci rozdělte obsah zkumavek na 2 poloviny
- s první polovinou proveďte Fehlingovu reakci (Ve zkumavce smíchejte 1 ml Fehlingova činidla I a II s 1 ml vzorku a opatrně povařte.)
- s druhou polovinou proveďte důkaz na přítomnost glukózy indikátorovým papírkem „Glukophan“, následně roztoky naředte 15 ml destilované vody a přidejte kapku Lugolova roztoku

Závěr:

3.5.5 Závislost aktivity α -amylasy na pH ¹⁹

Princip: α -amylasa hydrolyticky rozkládá 1, 4- α -D-glukosidové vazby škrobu za vzniku maltózy. Aktivitu enzymu lze sledovat pomocí reakce s jodem, která dává se substrátem charakteristické zbarvení a produkty nikoliv. Reciproké (převrácené) hodnoty doby potřebné k rozštěpení škrobu, může sloužit jako míra aktivity enzymu. Aktivita enzymu závisí na hodnotě pH. Při provedení reakce v tlumivých roztocích o různých hodnotách pH lze určit pH optimum. ¹² Při pH 4 je α -amylasa inaktivována. ¹⁹

Chemikálie: 1% roztok škrobu, roztok jodu, 0,2 mol/l Na_2HPO_4 , 0,1 mol/l kyselina citronová

Postup:

- dle následující tabulky si připravte sadu 7 zkumavek, abyste získali sadu tlumivých roztoků v rozmezí pH 5,6 – 7,8

Tabulka 13: **Návod pro přípravu roztoků**

Zkumavka	Na_2HPO_4 (ml)	kys. citronová (ml)	pH
1	2,9	2,1	5,6
2	3,1	1,9	6,0
3	3,5	1,5	6,4
4	3,8	1,2	6,8
5	4,3	0,7	7,2
6	4,7	0,3	7,6
7	4,9	0,1	7,8

- přidejte do každé zkumavky 1 ml 1% roztoku škrobu
- připravte enzymová preparát (0,5 ml slin zředte 5 ml vody)
- do každé zkumavky napipetujte 0,5 ml zředěných slin a vytemperujte v lázni vyhřáté na 37°C po dobu 15 minut
- po 5 minutách inkubace z každé zkumavky odeberte 1 ml roztoku do čisté zkumavky
- k odebraným vzorkům přidejte 5 ml vody a kapku roztoku jodu
- zaznamenejte zbarvení v jednotlivých zkumavkách a vyhodnoťte

Závěr:

4 ZÁVĚR

Cílem práce bylo prostudovat dostupnou literaturu na zadané téma, které bylo následně didakticky transformováno pro výuku enzymů na vyšším stupni gymnázia.

Prostudováním a přehledným rozdělením tématu do kapitol se věnuje teoretická část. Tato část nabízí obsáhlejší informace, které však nebyly využity v praktické části. Nicméně jsou nabízeny pro rozšíření poznatků o daném tématu.

Výsledkem práce je příprava pro výuku enzymů na vyšším stupni gymnázia formou prezentace. Prezentace je obohacena o animace znázorňující průběh enzymatické reakce, kompetitivní inhibici, alosterickou inhibici i alosterickou aktivaci, vytvořené autorem práce. Pro opakování látky jsou připraveny pracovní listy, které jsou aplikovány po probrání jednotlivých částí tématu v průběhu vyučování, případně jako domácí příprava žáků. Pro uvedení teorie v praxi slouží laboratorní cvičení. Ta jsou vybrána tak, aby svou náročností byla použitelná pro školní laboratoře. Hloubku a množství informací měří závěrečný test, ke kterému jsou vypracovány i správné odpovědi a hodnocení.

Praktická část byla testována při výuce na gymnáziu v Rokycanech. Závěrečný test, jenž měřil znalosti 28 žáků (13 chlapců a 15 dívek), byl vyhodnocen a výsledky byly následující: 10 žáků bylo hodnoceno stupněm známky „výborně“, 8 žáků „chvalitebně“, dalších 8 žáků „dobře“ a dva žáci byli hodnoceni známkou „dostatečně“.

Diplomová práce navíc může sloužit jako studijní a rozšiřující materiál pro studenty středních nebo vysokých škol.

5 RESUMÉ

This diploma thesis provides a comprehensive set on the topic of enzymes. The theoretical part deals with the summary of the topic with the crucial information obtained from the literature. The practical part is focused on the didactic transformation of the theoretical part into the praxis, specifically on the higher level of grammar schools. The thesis contains revision worksheets, an interpretation supported by PPP with my own animations, test and lab exercise. The goal of the thesis was to compile the teaching material for teachers of the higher level of grammar school.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Doubrava J., Košťíř J., a Pospíšil J.: *Základy biochemie*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1984.
2. Šípál Z., Anzenbacher P., Peč P., Pospíšil J., Růžička I.: *Biochemie*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1992. ISBN 80-04-21736-2.
3. Vacík J.: *Přehled středoškolské chemie*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1999. ISBN 80-7235-108-7.
4. Vodrážka Z.: *Biochemie 1*. Praha: Československá akademie věd, 1992. ISBN 80-200-0438-6.
5. Čarský J., Kopřiva J., Křištofová V., Pecháň I.: *Chemie: Pro III. ročník gymnázií*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1986.
6. Sofrová D.: *Biochemie: základní kurz*. Praha: Karolinum, 1999. ISBN 80-7184-936-7.
7. Voet D., Voetová J. G.: *Biochemie*. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 80-85605-44-9.
8. Enzymologie: Kofaktory. *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze: Enzymologie* [online]. [cit. 2017-03-22]. Dostupné z: <http://web.vscht.cz/~spiwokv/enzymologie/kofaktory.pdf>
9. Musil J., Nováková O.: *Biochemie v obrazech a schématech*. Praha: Avicenum, 1989.
10. Mareček A., Honza J.: *Chemie pro čtyřletá gymnázia*. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2000. ISBN 80-7182-057-1.
11. Kocourek J., Leblová S., Šípál Z.: *Biochemické praktikum*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1967.
12. Barthová J., Sofrová D., Tichá M.: *Základní praktikum z biochemie*. Praha: Univerzita Karlova, 1980.
13. Fukal L.: *Laboratorní cvičení z biochemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1996. ISBN 8070802618.
14. Pešová M.: *Enzymatické reakce ve cvičení z biochemie (Výběr a ověření prací pro laboratorní cvičení na PF ZČU)*. Plzeň, 1992. Diplomová práce. Západočeská univerzita v Plzni.

15. Modeling: Enzyme Kinetics. *IGEM* [online]. [cit. 2017-03-22]. Dostupné z: <http://2012.igem.org/Team:Leicester/Modeling>
16. Kocourek J., Leblová S., Macholán L., Skurský L.: *Základy biochemie*. Praha: Academia, 1981.
17. Kolář K., Pospíšil J., Kodíček M.: *Chemie II (organická a biochemie) pro gymnázia*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1997. ISBN 80-85937-49-2.
18. Peč P.: *Laboratorní cvičení z biochemie*. Olomouc: Vydavatelství Univerzity Palackého, 2000. ISBN 80-244-0069-3.
19. Kotyza J.: *Praktikum z klinické biochemie a enzymologie: teoretické a metodologické základy pro studující lékařství*. Praha: Karolinum, 1999. ISBN 80-7184-843-3.

7 Přílohy

Tato kapitola je věnována zajímavým odkazům, na kterých lze nalézt užitečné obrázky, informace, prezentace či pracovní listy, které mohou být zařazeny do výuky.

<http://dumy.cz/material/82956-enzymy>

<http://dumy.cz/material/89757-enzymy-a-vitaminy>

<http://dumy.cz/material/89186-bilkoviny-a-enzymy>

<http://dumy.cz/material/5225-biokatalyzatory-enzymy>

http://www.studiumbiochemie.cz/prirodni_latky_enzymy.html

<http://e-chembook.eu/enzymy>