

Enzýmy

katalyzátory
biochemických procesov

Enzýmy (prečo by nás mali zaujímať)

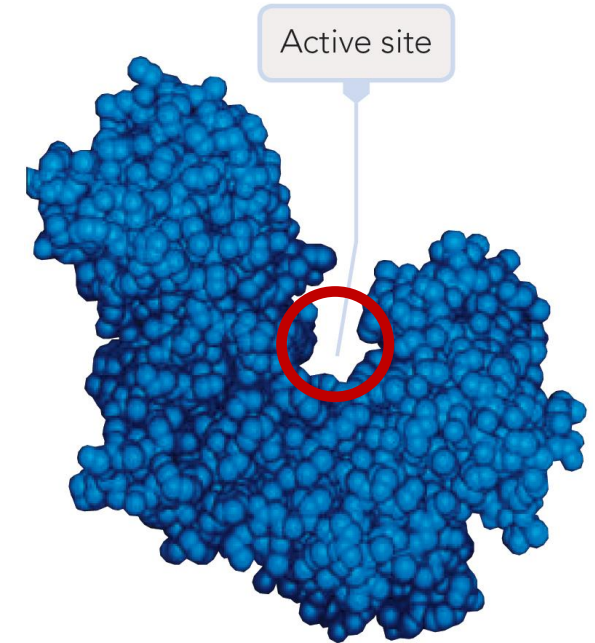
- Sú najefektívnejšie katalyzátory – vo všeobecnosti oveľa účinnejšie a špecifickejšie ako anorganické, keďže môžu zvýšiť reakčnú rýchlosť až $\geq 10^6$ násobne
- Zatiaľ čo anorganické katalyzátory (napr. Pt, Ni, a ďalšie) často pôsobia pri vysokej teplote a tlaku, enzýmy fungujú optimálne za miernych podmienok (neutrálne pH, “izbová” / telesná teplota, atmosférický tlak).
- V živých systémoch je žiaduce udržiavať fyzikálno-chemické parametre v relatívne úzkom intervale → podmienky a prípadná katalýza reakcií tomu musia byť prispôsobené
- Význam a aplikácie: biológia (trávenie, metabolizmus, replikácia DNA, funkcie pečene), medicína (diagnostika, liečba, farmácia), priemysel (textil, výroba papiera, materiálové inžinierstvo, výroba biopalív), potravinárstvo (mliečne a alkoholové kvasenie), environmentálne procesy (čistenie odpadových vôd, degradácia a transformácia rizikových látok, kolobehy prvkov v prírode, biogeochemické procesy, dostupnosť živín v pôde)

Enzýmy (čo sú zač)

- Prevažná / dominantná časť enzýmov sú bielkoviny
- Slovo enzým → grécky pôvod „en“, čo znamená „v“, a „zými“, čo znamená „kvasinky“
- Väčšina patrí medzi globulárne proteíny. Ich molekuly majú peptidové reťazce “poskladané” do sférických (globulárnych) tvarov. Usporiadanie štruktúry týchto proteínov je také, že väčšina aminokyselín s hydrofóbnymi bočnými reťazcami (nepolárne skupiny) je vo vnútri molekuly, zatiaľ čo hydrofilné reťazce (polárne skupiny) sú orientované „smerom von“. Aj preto sú globulárne proteíny väčšinou rozpustné vo vode.
- Enzýmy sa od nebiochemických katalyzátorov líšia nielen veľkosťou (sú oveľa väčšie), ale aj tým, že ich aktivitu zvyčajne regulujú iné látky prítomné v bunke. Typické “laboratórne” katalyzátorov je potrebné odstrániť z reakčnej zmesi, aby sa zastavil ich katalytický účinok; u enzýmov to tak nie je.
- Napr., ak je v bunke potrebná určitá chemikália, enzým zodpovedný za jej produkciu je aktivovaný inými zložkami. Keď sa vyprodukuje dostatočné množstvo, enzým sa deaktivuje. V iných situáciách môže bunka produkovať viac alebo menej enzýmu podľa potreby.

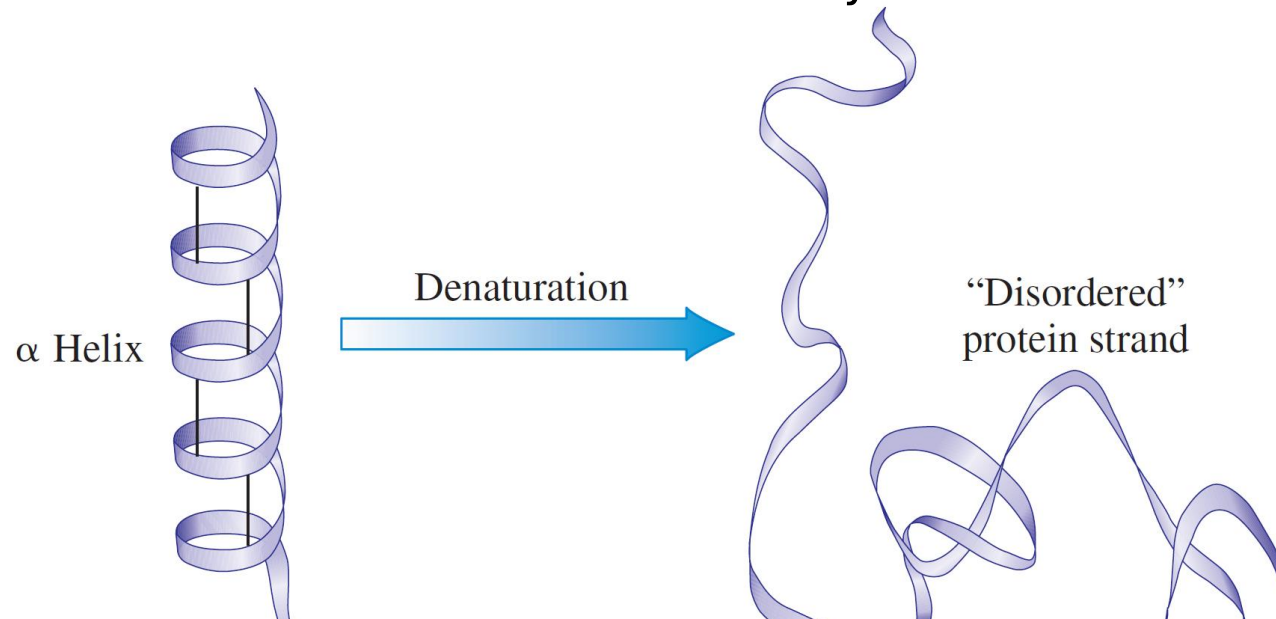
Enzýmy (čo sú zač)

- veľkosť enzymatických bielkovín sa pohybuje od cca. 62-och aminokyselín až po 2500
- väčšina enzýmov je oveľa väčšia ako substráty na ktoré chemicky pôsobia
- napriek tomu, že ide o dlhé (“zdanlivo”) lineárne reťazce aminokyselín, trojrozmernosť ich štruktúr spočíva v tom, že sú rôznymi spôsobmi “poohýbané” resp. “zvlnené” do komplikovaných tvarov
- len malá tzv. aktívna časť enzýmu (napr. 3-4 aminokyseliny) sa priamo podieľa na katalýze
- môžu tiež obsahovať miesta na ktoré sa viažu tzv. kofaktory → tie sú potrebné pre katalýzu
- niektoré enzýmy majú väzbové miesta pre malé molekuly, ktoré sú často či už priamymi alebo nepriamymi produktmi, alebo aj substrátmi katalyzovaných reakcií

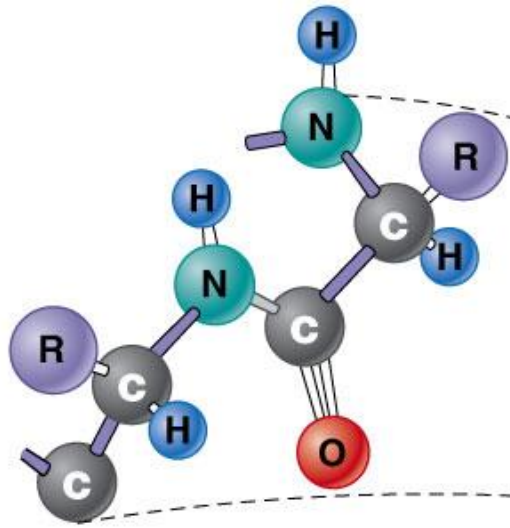


E. patria medzi bielkoviny (multifunkčné makromolekuly / polyméry)

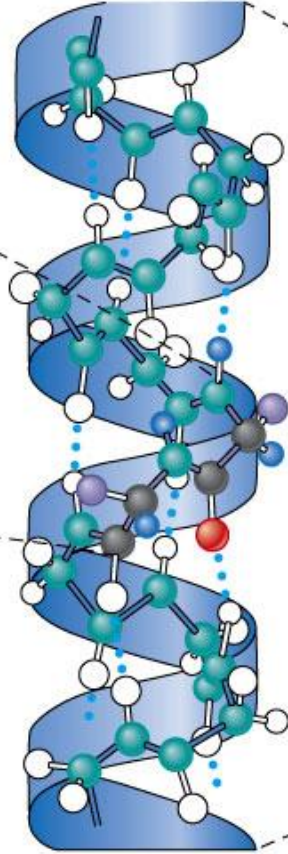
- bielkoviny plnia v organizmoch rôzne funkcie: katalytické (enzýmy), obranné (protilátky), transportné (hemoglobín), signalizačné (inzulín), kontrakčné (myozín), štruktúrne (kolagén), (trans)membránové, akumulačné (myoglobín), regulačné (inzulín), nutričné (kazeín), pufračné (hemoglobín), udržiujúce rovnováhu (globulín)
- štruktúra bielkovín je komplexná → primárna, sekundárna, terciárna a kvartérna úroveň
- denaturácia proteínu: čiastočné alebo trvalé narušenie charakteristického trojrozmerného usporiadania makromolekuly – sekundárnych, terciárnych a kvartérnych štruktúrnych interakcií; toto narušenie má za následok stratu / výrazné zníženie funkcionality danej bielkoviny.



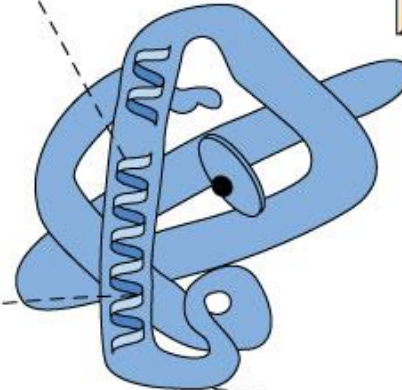
(a) Primárna štruktúra proteínu je daná sekvenciou aminokyselín spojených peptidovými väzbami, ktoré tvoria polypeptid.



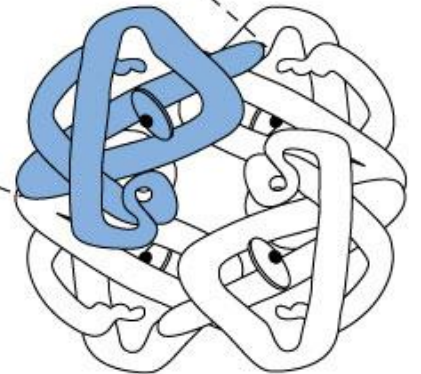
(b) Sekundárna štruktúra: vybrané oblasti polypeptidu môžu byť napr. stočené do špirály (helixu), jednej z foriem sekundárnej štruktúry.



(c) Terciárna štruktúra: Jednotky sekundárnej štruktúry sa navzájom spájajú špecifickým spôsobom a vytvárajú terciárnu štruktúru, ktorá opisuje 3D usporiadanie polypeptidu.

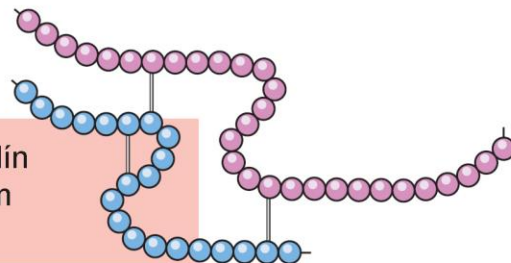


(d) V prípade multimérnych proteínov **kvarterná štruktúra** opisuje asociáciu dvoch alebo viacerých polypeptidov, ktoré interagujú a vytvárajú finálny funkčný proteín.



Primárna štruktúra

Sekvencia aminokyselín prítomná v peptidovom reťazci / reťazcoch



Sekundárna štruktúra

Pravidelne sa opakujúce usporiadanie aminokyselín vo vzájomnej blízkosti v proteínovom reťazci, čo má za následok tvorbu vodíkových väzieb medzi O karbonylových skupín a H amino skupín

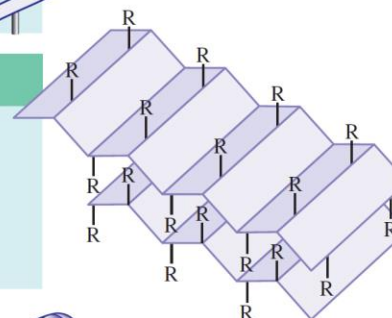
Alfa-helix

vodíkové väzby medzi každou štvrtou aminokyselinou



Beta-skladaný list

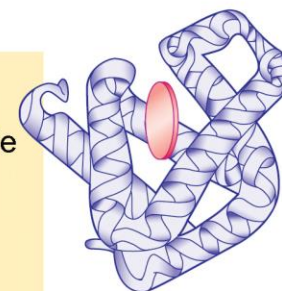
Vodíkové väzby medzi dvoma susednými reťazcami, alebo medzi skupinami toho istého reťazca, ktorý je poskladaný



Terciárna štruktúra

Celková trojrozmerná štruktúra podmienená príťažlivými silami medzi aminokyselinami (R skupiny), ktoré v rámci proteínového reťazca niesú vo vzájomnej blízkosti

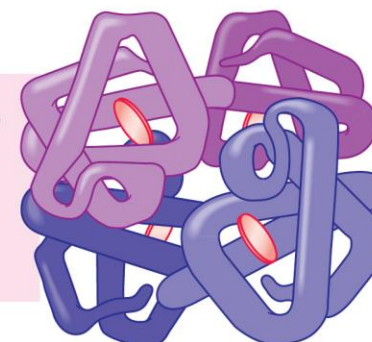
- väzby disulfidov
- elektrostatické interakcie
- vodíkové väzby
- hydrofóbne interakcie



Kvartérna štruktúra

Trojrozmerný tvar proteínu pozostávajúci z dvoch alebo viacerých nezávislých peptidových podjednotiek, ktorý je daný nekovaletnými interakciami medzi R skupinami

- elektrostatické interakcie
- vodíkové väzby
- hydrofóbne interakcie



Enzýmy (základné rozdelenie)

Dve všeobecné skupiny: jednoduché a konjugované enzýmy.

- Jednoduchý enzým je enzým zložený iba z bielkovín (aminokyselinové reťazce).
- Konjugovaný enzým má okrem bielkovinovej časti aj neproteínovú časť. Samotná bielkovinová, ani neproteínová časť konjugovaného enzýmu nemajú katalytické vlastnosti.
- Apoenzým je proteínová časť konjugovaného enzýmu.
- Kofaktor je neproteínová časť konjugovaného enzýmu.
- Termín holoenzým sa používa na označenie biologicky aktívnej kombinovanej entity apoenzýmu a kofaktora. Holoenzým je biochemicky aktívny konjugovaný enzým produkovaný z apoenzýmu a kofaktora.

Apoenzým + kofaktor = holoenzým

- Prečo apoenzýmy potrebujú kofaktory? Kofaktory poskytujú ďalšie chemicky reaktívne funkčné skupiny okrem tých, ktoré sú prítomné v bočných reťazcoch aminokyselín apoenzýmov.

Enzýmy (konjugované)

- Existujú dve kategórie kofaktorov: jednoduché kovové ióny a malé organické molekuly. Medzi kovové kofaktory patria Zn^{2+} , Mg^{2+} , Fe (Fe^{2+} , Fe^{3+}) a Cu (Cu^+ , Cu^{2+}). Všetky kovové ióny musia byť do organizmu dodané z externého prostredia (v potrave).
- Malé organické molekuly (druhá kategória kofaktorov) sa nazývajú koenzýmy. Napr. v ľudskom tele sa koenzýmy syntetizujú zo stavebných blokov získaných zo stravy. Často je jedným z týchto stavebných blokov vitamín skupiny B, alebo jeho derivát B.
- Mnohé kofaktory sú trvalo viazané kovalentnými väzbami na aminokyselinovú časť enzýmu. Prerušenie kovalentných väzieb deaktivuje enzým. Tak je to v prípade kovových iónov a mnohých (ale nie všetky) koenzýmov. Koenzým FAD, ktorého súčasťou je riboflavín (vitamín skupiny B), je príkladom trvalo viazaného koenzýmu. Kofaktor FAD zohráva dôležitú úlohu v mnohých biochemických redoxných reakciách.
- Trvalé pripojenie nie je absolútnou požiadavkou na to, aby bol koenzým aktívnou súčasťou enzýmu. Niekedy sa koenzým dočasne viaže na aminokyselinovú časť enzýmu v čase, keď je to potrebné, a potom sa uvoľní po reakcii. Koenzým NAD^+ je príkladom takéhoto správania. Kofaktor NAD^+ , ktorého súčasťou je niacín (vitamín skupiny B), je tiež mimoriadne dôležitou látkou v biochemických redoxných reakciách.

Názvoslovie enzýmov

- Pomenúvajú sa pomocou systému, ktorý sa snaží poskytnúť informácie o funkcii (skôr než o štruktúre). Typ katalyzovanej reakcie a identita substrátu sú ústrednými bodmi nomenklatúry. Substrát je reaktant v enzýmom katalyzovanej reakcii, čiže látka, na ktorú enzým pôsobí.
- Kritériá pomenovania enzýmov:
 1. Prípona -áza identifikuje látku ako enzým. Ureáza, sacharáza a lipáza sú teda označenia enzýmov. Prípona -in sa nachádza v názvoch niektorých z prvých študovaných enzýmov, z ktorých mnohé sú tráviace enzýmy. Medzi takéto patria trypsín, chymotrypsín a pepsín.
 2. Typ reakcie katalyzovanej enzýmom sa často uvádza s predponou. Oxidáza katalyzuje oxidačnú reakciu a hydroláza katalyzuje hydrolytickú reakciu.
 3. Okrem typu reakcie sa často uvádza aj identita substrátu. Medzi názvy enzýmov tohto typu patria glukózooxidáza, pyruvátkarboxyláza a sukcinátdehydrogenáza. Zriedkavo sa uvádza substrát, ale nie typ reakcie, ako napríklad v názvoch ureáza a laktáza. V týchto názvoch je reakciou hydrolýza; ureáza katalyzuje hydrolýzu močoviny, laktáza hydrolýzu laktózy.

Triedy enzýmov podľa charakteru katalyzovaných reakcií

environmentálny význam



1. Oxidoreduktázy (oxidačno-redukčné reakcie).

Keďže v živých systémoch sú oxidácia a redukcia navzájom prepojené procesy, ktoré musia prebiehať spoločne, oxidoreduktáza si vyžaduje koenzým, ktorý sa oxiduje alebo redukuje v závislosti od toho čo sa deje so substrátom.

2. Transferázy

Prenos funkčnej skupiny z jednej molekuly na druhú. Dva hlavné podtypy transferáz sú transaminázy a kinázy. Transamináza katalyzuje prenos aminoskupiny z jednej molekuly na druhú. Kinázy, ktoré hrajú hlavnú úlohu pri energetických metabolických reakciách, katalyzujú prenos fosfátovej skupiny z adenosíntrifosfátu (ATP) za vzniku adenosíndifosfátu (ADP) a fosforylovaného produktu (produktu obsahujúceho ďalšiu fosfátovú skupinu).



3. Hydrolázy (štiepenie väzieb v prítomnosti vody)

Hydrolýzy: reakcie, pri ktorých pridanie molekuly vody k väzbe spôsobí jej prerušenie. Hydrolýza je ústredným prvkom procesu trávenia. Sacharidy ovplyvňujú prerušenie glykozidických väzieb v oligo- a polysacharidoch, proteázy ovplyvňujú prerušenie peptidových väzieb v proteínoch a lipázy ovplyvňujú prerušenie esterových väzieb v triacylglyceroloch.

Triedy enzýmov podľa charakteru katalyzovaných reakcií

4. Lyázy

Adícia skupiny na dvojitú väzbu alebo jej odstránenie za vzniku dvojitej väzby spôsobom, ktorý nezahŕňa hydrolýzu ani oxidáciu. Dehydratáza vykonáva odstránenie zložiek vody z dvojitej väzby a hydratáza vykonáva adíciu zložiek vody na dvojitú väzbu.

5. Izomerázy

Reakcie, pri ktorých dochádza k preskupeniu atómov v rámci substrátu. Dochádza k vzájomnej premene izomérov. V reakciách, kde pôsobia izomerázy, existuje iba jeden reaktant a jeden produkt.

6. Ligázy

Spojenie dvoch molekúl do jednej za účasti ATP. Zapojenie ATP je potrebné, pretože takéto reakcie sú vo všeobecnosti energeticky nevýhodné a vyžadujú si súčasný prísun energie získanej hydrolýznou reakciou, pri ktorej sa ATP premieňa na ADP.

7. Translokačné enzýmy

Katalyzujú pohyb molekúl a iónov naprieč membránami.

Kódové označenia enzýmov

- každý enzým má svoj kód, napr. alkohol dehydrogenáza: EC 1.1.1.1. Kódová nomenklatúra tiež odkazuje na reakciu, ktorú enzým katalyzuje,
- Prvé číslo znamená hlavnú skupinu,
- Druhé podskupinu – vyjadruje ktorá skupina je pri reakcii oxidovaná (napr. 1. znamená CHOH),
- Tretie číslo vyjadruje ďalšiu hierarchickú úroveň (odkazuje na elektrónový akceptor, napr. koenzým)
- <https://www.enzyme-database.org>

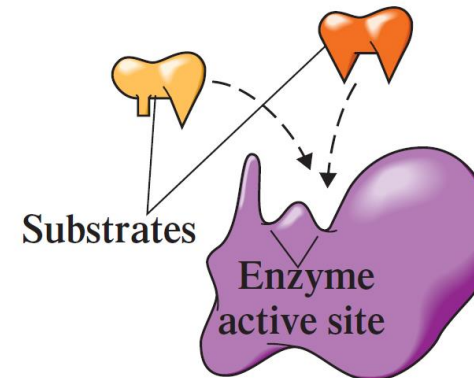
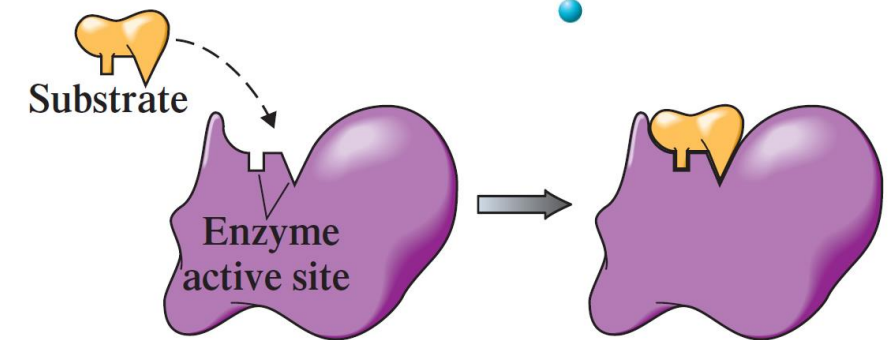
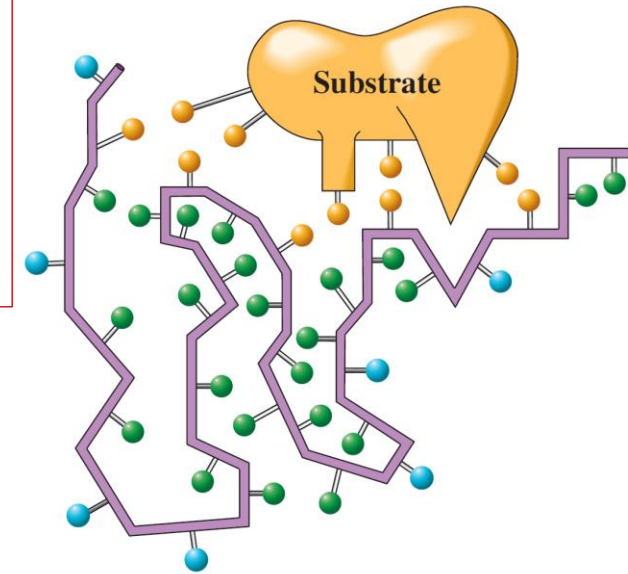
Mechanizmus enzymatickej katalýzy

Pre enzymatickú katalýzu je kľúčové vytvorenie komplexu enzým – substrát. Ide o medziprodukt vďaka, ktorého vznik je východiskom pre alternatívnu “dráhu” reakcie s nižšou aktivačnou energiou.

V súvislosti mechanizmom tvorby ES komplexu sa používajú rôzne termíny / modely:

1. “Lock-and-Key” model: viac špecifický pre konkrétny substrát: aktívne miesto má “pevný” geometrický tvar → tvar molekuly substrátu tomu musí zodpovedať
2. Substrátom podmienený “Induced-Fit” model: nižšia miera selektivity: aktívne miesto má flexibilný tvar, ktorý sa môže meniť, aby akceptovalo rôzne súvisiace substráty

- interakcie ktoré umožňujú naviazanie substrátu k aktívnej časti enzýmu
- interakcie ktoré zabezpečujú trojrozmernú štruktúru enzýmu
- skupiny ktoré sú určujúce pre rozpustnosť enzýmov



Selektivita (špecifickosť) enzýmov

- Absolútna špecificita – enzým katalyzuje iba **jednu konkrétnu reakciu**. Kataláza je príklad enzýmu s absolútnou špecificitou. Katalyzuje premenu peroxidu vodíka (H_2O_2) na O_2 a H_2O . Peroxid vodíka je jediný substrát, ktorý akceptuje.
- Skupinová selektivita: enzým pôsobí iba na molekuly, ktoré majú **špecifickú funkčnú skupinu**, ako sú hydroxylové, amino alebo fosfátové skupiny. Karboxypeptidáza je skupinovo špecifická; štiepi aminokyseliny jednu po druhej z karboxylového konca peptidového reťazca.
- Selektivita podľa väzby: enzým pôsobí na **konkrétny typ chemickej väzby**, bez ohľadu na zvyšok štruktúry. Napr. fosfatázy hydrolyzujú fosfát-esterové väzby u všetkých fosfátových esterov. Špecificita podľa druhu chemickej väzby je najvšeobecnejšia zo zmienených selektívít.
- Stereochemická selektivita: enzým pôsobí na konkrétny **stereoizomér**. Chiralita je vlastná aktívnemu miestu enzýmu, pretože aminokyseliny sú chirálne zlúčeniny. Oxidáza l-aminokyseliny katalyzuje oxidáciu l-formy aminokyseliny, ale nie d-formy tej istej aminokyseliny.

Kinetika enzymatickej katalýzy

- Z kinetického hľadiska pôsobenie enzýmov je kombináciou reakcií prvého a nultého poriadku
- V tejto súvislosti sa používa najmä Michaelis-Mentenov model, kde reakčná rýchlosť závisí od koncentrácie substrátu charakteristickým spôsobom.

- Pri nízkych koncentráciách substrátu:

Rýchlosť vzniku produktu je približne prvého poriadku vzhľadom na koncentráciu substrátu [S].

To znamená, že rýchlosť sa kvázi lineárne zvyšuje s narastajúcou koncentráciou substrátu.

Aktívne miesta enzýmu nie sú nasýtené (obsadené), takže viac substrátu znamená viac komplexov enzým-substrát a rýchlejšiu reakciu.

- Pri vysokých koncentráciách substrátu:

Enzým sa nasýti substrátom; všetky aktívne miesta sú obsadené.

Rýchlosť dosiahne maximum ($V_{\max}$) a s pridaním substrátu sa ďalej nezvyšuje.

V tejto oblasti je reakčná rýchlosť nultého rádu vzhľadom na substrát, pretože koncentrácia substrátu už rýchlosť neovplyvňuje.

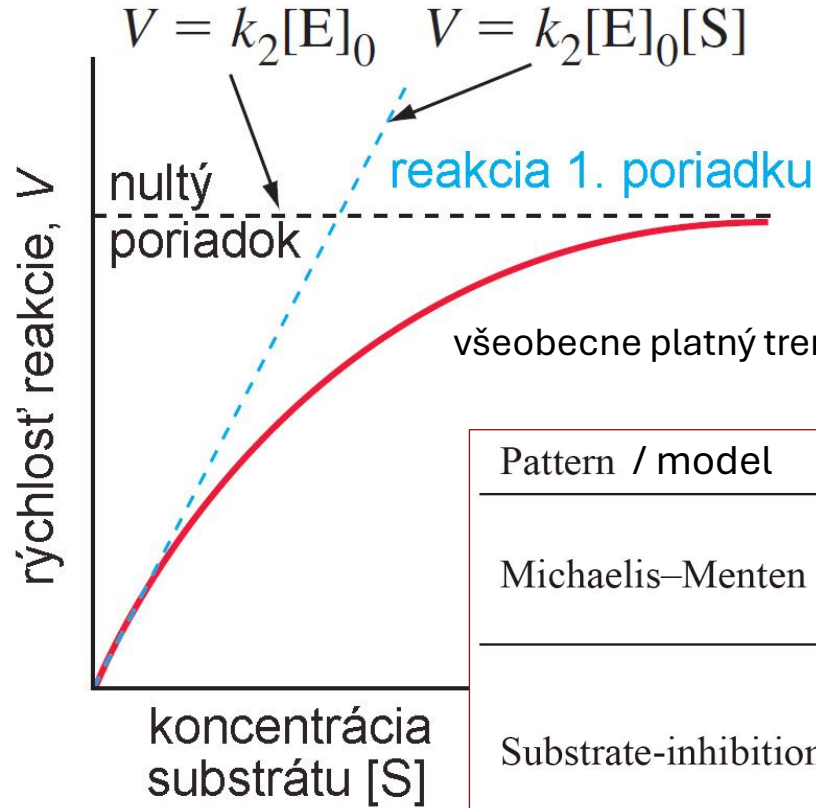
Kinetika enzymatickej katalýzy

v = rýchlosť reakcie

$V_{\max}$ = maximálna rýchlosť pri saturácii enzýmu

K_m = parameter vyjadrujúci afinitu e. k substrátu, zároveň pri MM modeli zodpovedá koncentrácii substrátu pri polovici $V_{\max}$

$[S]$ = koncentrácia substrátu



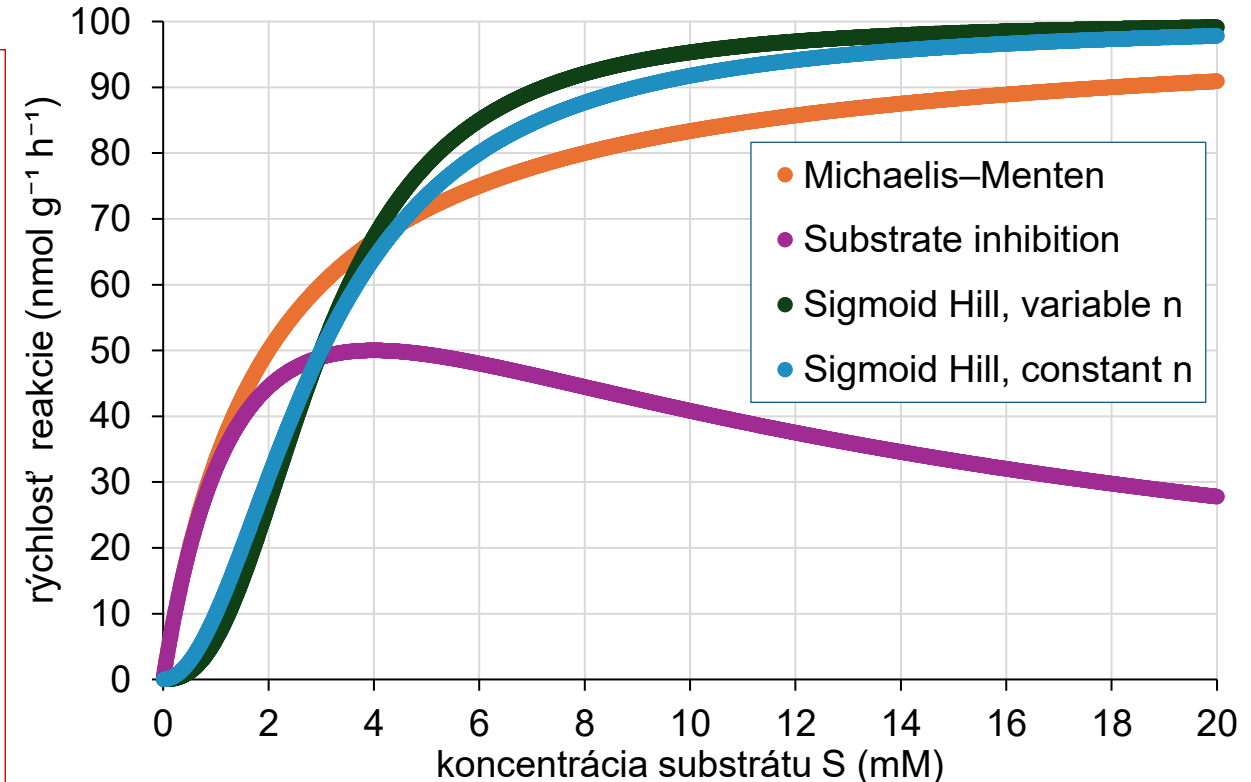
Michaelis-Menten model $\rightarrow$

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

všeobecne platný trend: pri nižšej konc. substrátu $\rightarrow$ kinetika 1. poriadku, pri vyššej konc. substrátu $\rightarrow$ nultý poriadok

Pattern / model	Kinetic equation
Michaelis–Menten	$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$
Substrate-inhibition	$v = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_m}{[S]} + \frac{[S]}{K_i}}$
Sigmoid (n is a variant)	$v = \frac{V_{\max}[S]^n}{K_m^n + [S]^n}$
Sigmoid (n is a constant)	$v = \frac{V_{\max}[S]^n}{K_m^n + [S]^n}$

rôzne modely



Enzymy (vplyv prostredia)

Faktory ovplyvňujúce enzymatickú aktivitu

Teplota

Rýchlosť reakcie narastá s teplotou až do úrovne pri ktorej dôjde k denaturácii proteínu čo sa prejaví prudkým poklesom aktivity

pH

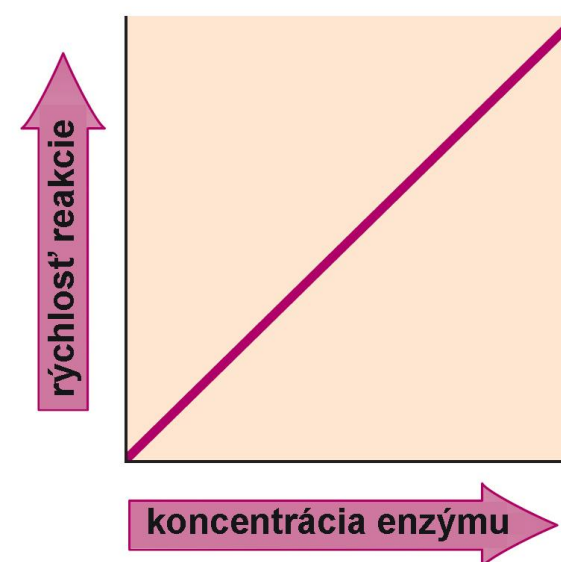
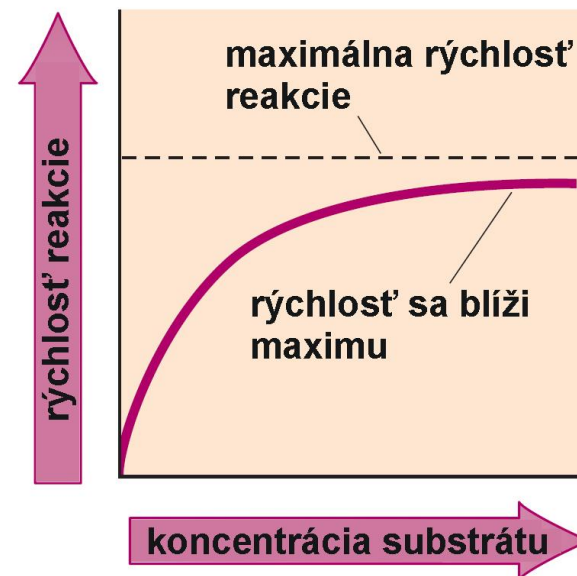
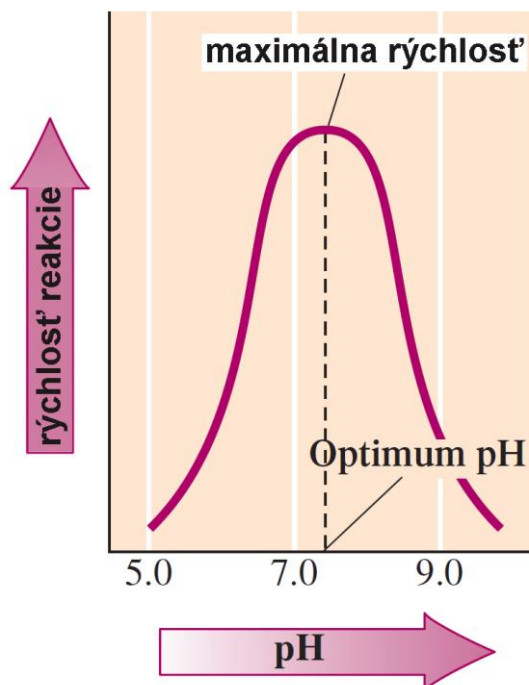
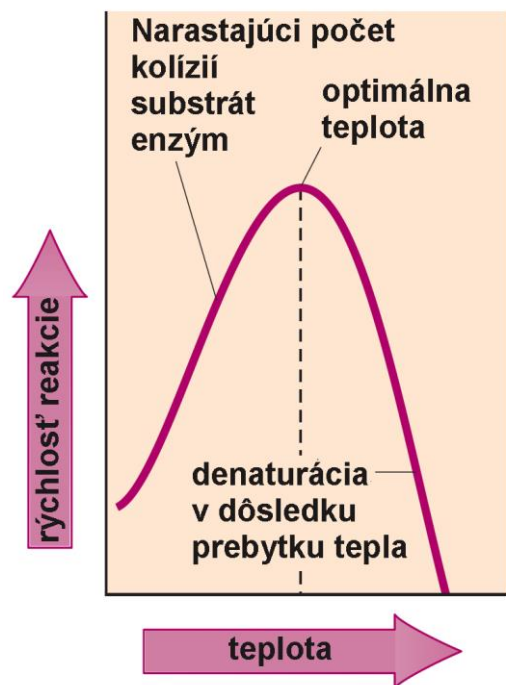
Enzymatická aktivita kulminuje v úzkom rozsahu pH; mimo tohto intervalu je dochádza k denaturácii proteínu a aktivita prudko klesá

Koncentrácia substrátu

Rýchlosť reakcie narastá s koncentráciou substrátu až do nasýtenia, po ktorom dochádza k poklesu rýchlosti

Koncentrácia enzýmu

Rýchlosť reakcie narastá so zvyšujúcou sa koncentráciou enzýmu, za predpokladu, že koncentrácia enzýmu je oveľa nižšia ako koncentrácia substrátu



Enzýmy (vplyv inhibítora)

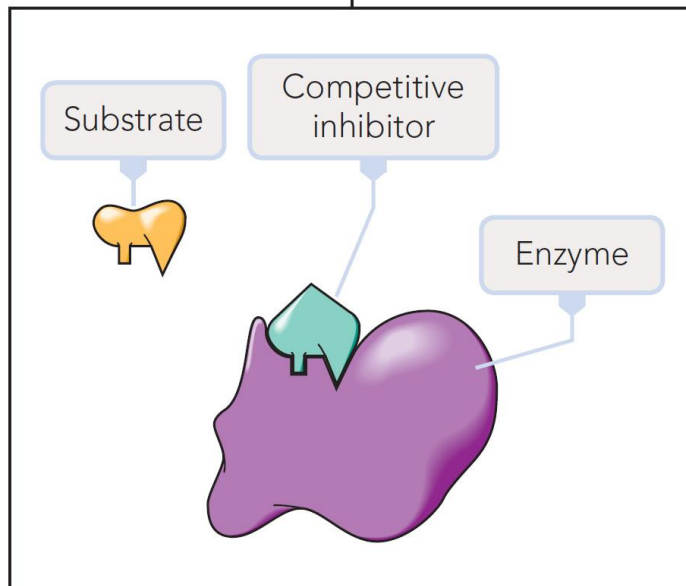
Inhibítory enzýmov

Látky, ktoré sa viažu na enzým, čo vedie k zastaveniu alebo spomaleniu jeho katalytickej účinnosti.

podobná situácia môže nastať aj keď je substrátu priveľa; okrem toho, že sa viaže na aktívne miesto e., reaguje aj s inou časťou enz. molekuly čo pôsobí inhibične

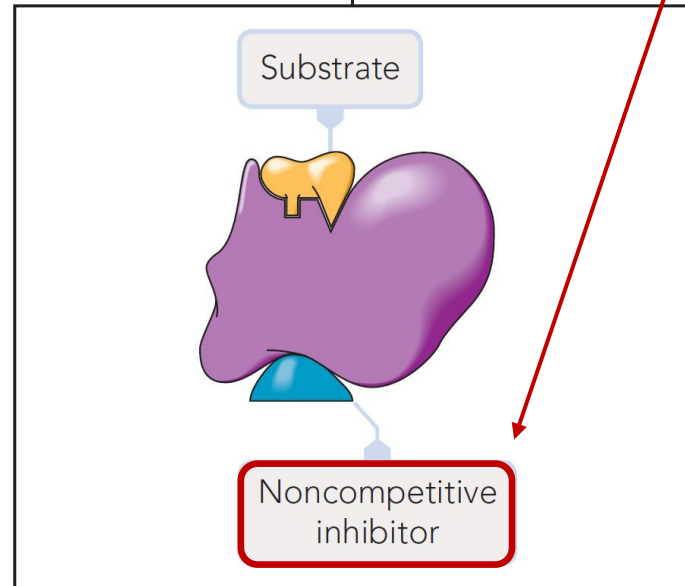
Kompetitívny inhibítor enzýmu

Molekula štruktúrne pripomínajúca substrát; viaže sa s aktívnou časťou enzýmu, čím dočasne bráni naviazaniu substrátu a priebehu reakcie.



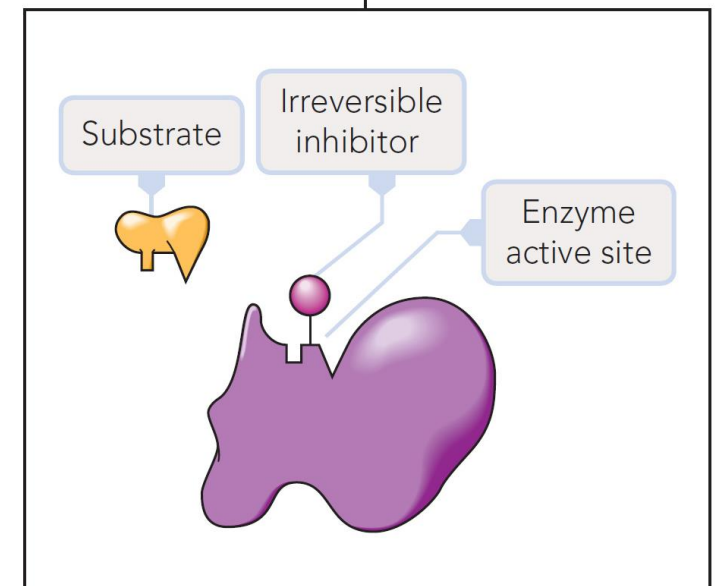
Nekompetitívny inhibítor enzýmu

Molekula, ktorá sa viaže na enzým, ale nie v aktívnom mieste. Substrát síce môže obsadiť aktívne miesto, katalytický účinok enzýmu je však znemožnený prítomnosťou inhibítora.



Ireverzibilná inhibícia enzýmu

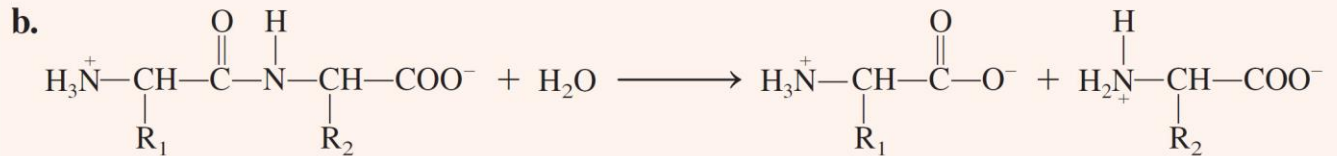
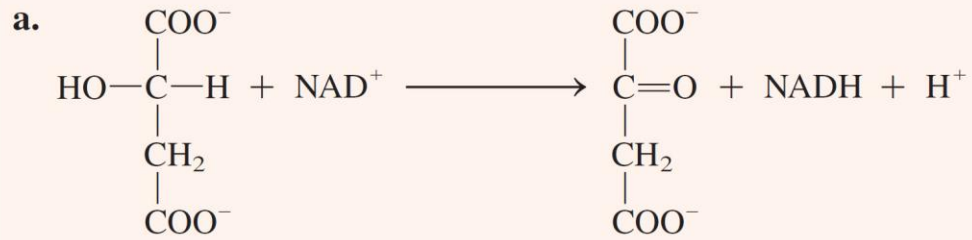
Molekula, ktorá tvorí kovalentné väzby s aktívnou časťou enzýmu, čo permanentne zamedzuje naviazaniu substrátu



NAD = Nikotínamidadenínindinukleotid
 dve formy:
 oxidovaná NAD^+
 redukovaná NADH

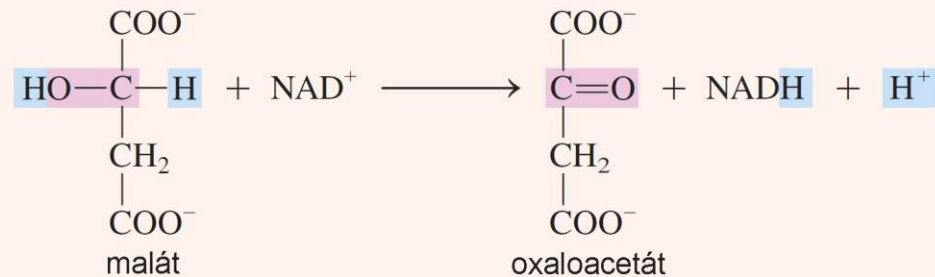
Klasifikácia enzýmov podľa typu katalyzovanej reakcie

Do akej skupiny patria enzýmy, ktoré katalyzujú nasledovné chemické reakcie?

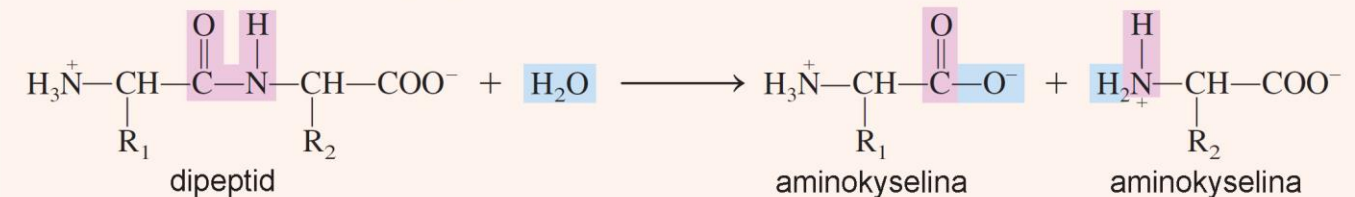


Riešenie

- a. V reakcii sú dva atómy H zo substrátu odstránené za vzniku dvojitej väzby uhlíka s kyslíkom. Strata dvoch atómov vodíka v molekule indikuje oxidáciu. Ide o oxidačno-redukčnú reakciu a enzým katalyzujúci reakciu bude z kategórie oxido-reduktáz.

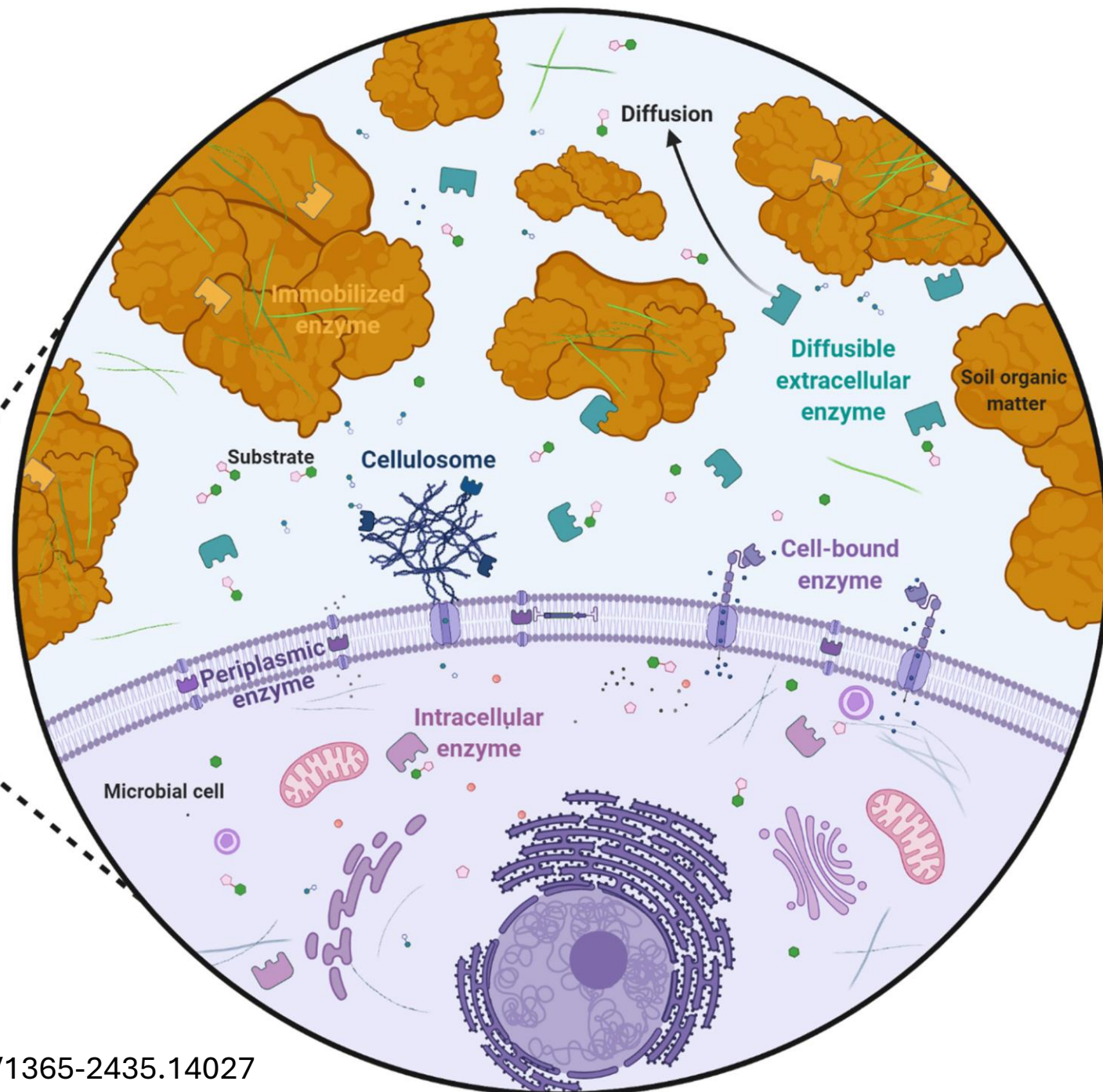
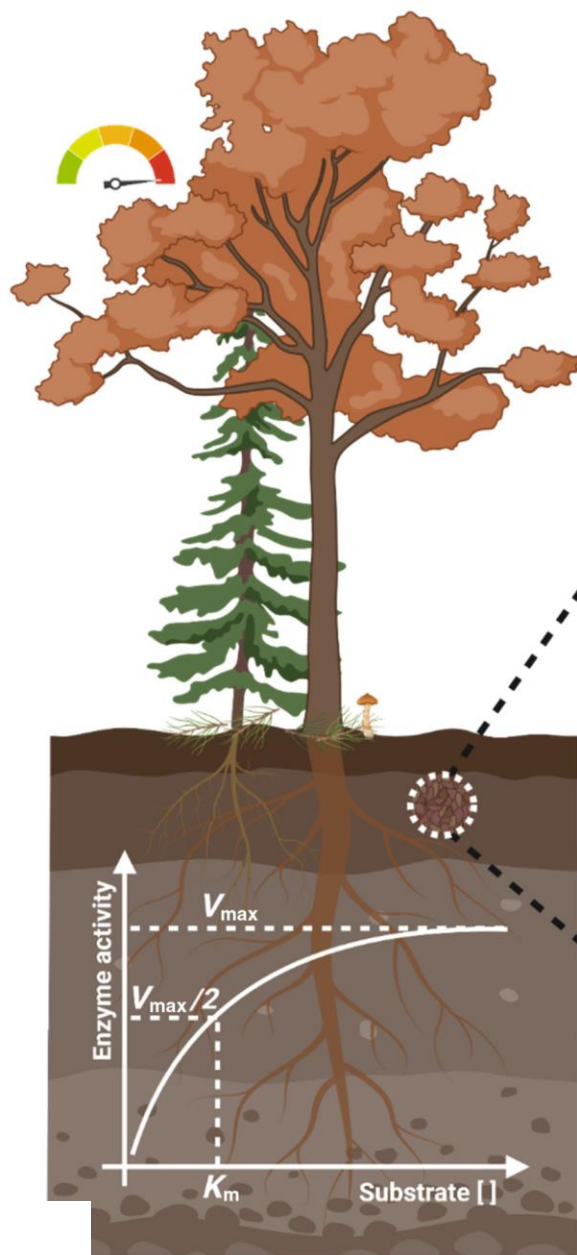


- b. V reakcii reaguje molekula H_2O so substrátom (dipeptid) čo narúša peptidovú väzbu a vedie k vzniku (dvoch) aminokyselín. Keďže ide o hydrolýzu, katalyzujúci enzým bude zo skupiny hydroláz.



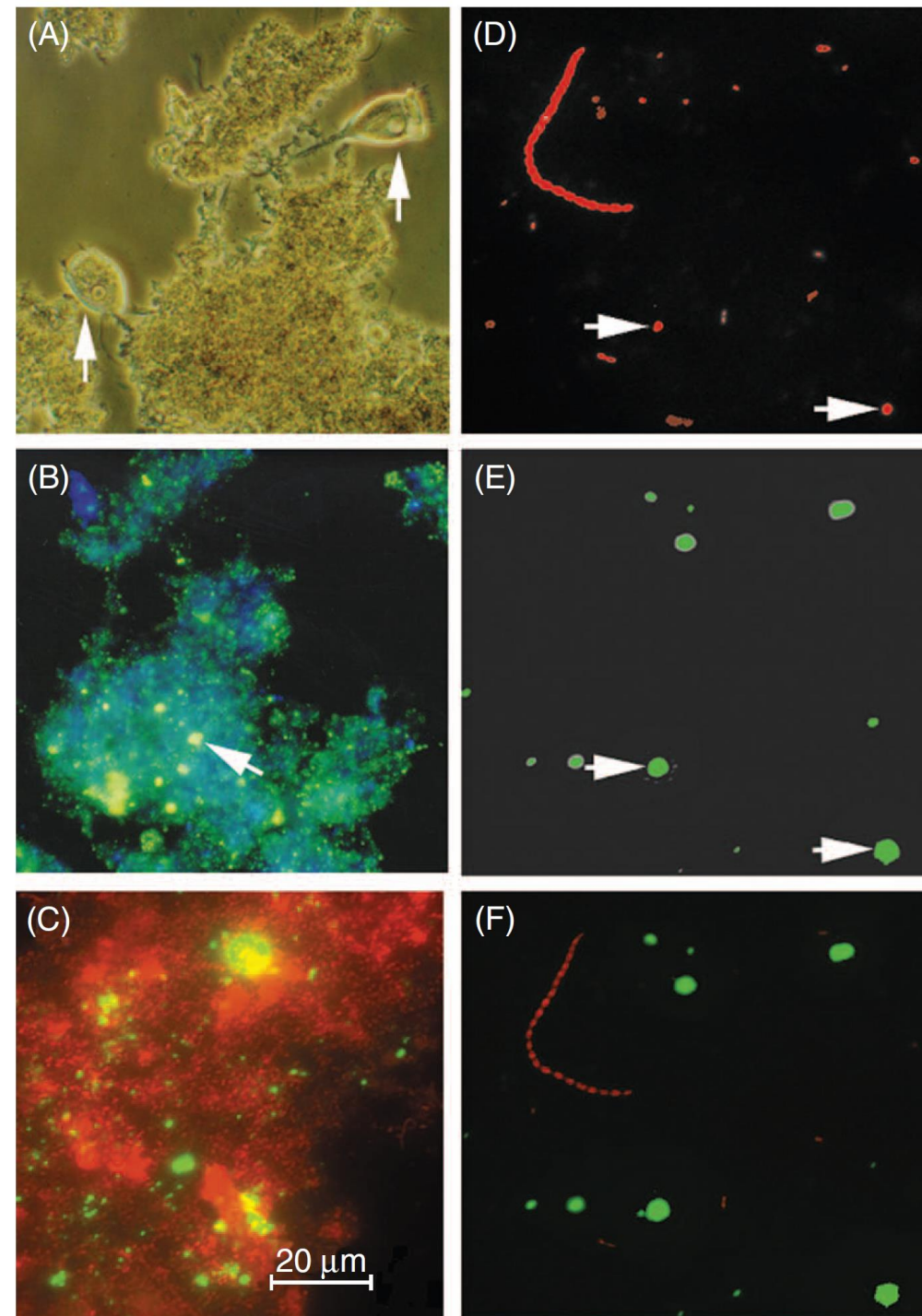
Obrázok pochádza z práce, v ktorej autori riešili možný vplyv klimatickej zmeny na enzymatickú aktivitu pôd. Je vhodné si uvedomiť že premenné ktoré sa v Michaelis–Menten vzťahu nachádzajú (t.j. ovplyvňujú rýchlosť reakcií) sú funkciou teploty (teplota ich ovplyvňuje).

$$V(T) = V_{max}(T) \frac{C_s}{K_m(T) + C_s}$$



Enzymy v aktivovanom kale (čistenie odpadových vôd)

A) Fotografia vločiek materiálu aktivovaného kalu a kolónií mikroorganizmov. Šípky označujú prvky požierajúce častice vločiek. (B) Epifluorescenčná mikrofotografia rovnakého zorného poľa ako (A) odhaľuje oblasti intenzívnej fosfatázovej aktivity. (C) Epifluorescenčná mikrofotografia tenkého rezu vločkovej častice zafarbenej na červenooranžovo, kde možno identifikovať oblasti vykazujúce fosfatázovú aktivitu (zelené škvrny). (D) Epifluorescenčná mikrofotografia homogenizovaného filtrátu aktivovaného kalu zobrazujúca baktérie zo skupiny Cytophaga–Flavobacteria s použitím kombinácie filtrov znázorňuje bunky reagujúce s oligonukleotidovou sondou CF319a (červená). (E) Epifluorescenčná mikrofotografia rovnakej situácie ako (D) s použitím kombinácie filtrov s rozlíšením kryštálov ELF (zelené škvrny), čo indikuje oblasti fosfatázovej aktivity. (F) Zlúčený obraz (D) a (E), odhaľuje subpopuláciu buniek, ktoré pozitívne reagujú s CF319a a tiež vykazujú fosfatázovú aktivitu



Virtuálny experiment s kinetikou enzýmov – aplikácia troch rôznych modelov : rovnice a jednotky

Symbol	Význam	Jednotky	Poznámka
v	rýchlosť reakcie	nmol g ⁻¹ h ⁻¹	nmol produktu vytvoreného na gram vzorky za hodinu; g zvyčajne = suchá vzorka pôdy, sedimentu, biomasy alebo tkaniva
V _{max}	maximálna rýchlosť	nmol g ⁻¹ h ⁻¹	parameter získaný odhadom z experimentálnych dát
[S]	koncentrácia substrátu	mM	premenná obvykle znázornená na horizontálnej osi
K _m	Michaelisova konštanta	mM	koncentrácia substrátu pri polovičnej hodnote V _{max} pre jednoduchý Michaelis-Menten model
K	konštanta polovičného nasýtenia (Hill)	mM	analogický parameter ako K _m pri Michaelis-Menten ale pre sigmoid model
K _i / K _{iC}	ihibičná konštanta	mM	nižšia hodnota K _i = silnejšia inhibícia
[I]	koncentrácia inhibítora	mM	použitie pri kompetitívnej inhibícii
Model	Matematické vyjadrenie	Interpretácia	
Michaelis–Menten	$v = V_{max}[S] / (K_m + [S])$	Zvýšenie V _{max} zvyšuje krivku; zníženie K _m zvyšuje rýchlosť pri nízkej [S].	
Inhibícia substrátom	$v = V_{max}[S] / (K_m + [S](1 + [S]/K_i))$	Pri vysokej hodnote [S] pôsobí aj substrát na enzým inhibične; nižšia hodnota K _i spôsobí, že k poklesu dôjde skôr.	
Kompetitívna inhibícia	$v = V_{max}[S] / (K_m(1 + [I]/K_{iC}) + [S])$	Inhibítor zvyšuje zdanlivý K _m ; V _{max} sa v ideálnom modeli nemení.	

Upozornenie: hodnoty parametrov v tomto pracovnom zošite slúžia ako didaktické príklady. V reálnych experimentoch sa V_{max}, K_m, K_i a n odhadujú prispôbením údajov o počiatočnej rýchlosti meraných pri niekoľkých koncentráciách substrátu.

Virtuálny experiment s kinetikou enzýmov – aplikácia troch rôznych modelov

- Majme tri modely enzymatickej kinetiky, každý s troma nastaveniami parametrov, vypočítané pre tri rôzne koncentráciách substrátu. V prípade všetkých troch predpokladajme maximálnou rýchlosťou reakcie: $V_{max} = 100 \text{ nmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$
- a vypočítame rýchlosť pre tri koncentrácie substrátu: $[S] = 0.5, 2, 10 \text{ mM}$
- **1. Michaelis–Menten: vplyv afinity enzýmu k substrátu** vyjadrený rôznymi hodnotami parametra K_m . Dostávame rôzne rýchlosti v závislosti od koncentrácie substrátu a K_m .

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

výpočet rýchlostí pre rôzne vstupné parametre



K_m	v 0.5mM	v 2mM	v 10mM
$K_m = 1$, vysoká afinita	33.3	66.7	90.9
$K_m = 3$, stredná afinita	14.3	40.0	76.9
$K_m = 8$, nízka afinita	5.9	20.0	55.6

- Interpretácia: nižšia hodnota K_m znamená, že enzým dosahuje vysokú rýchlosť už pri nízkej koncentrácii substrátu.

Virtuálny experiment s kinetikou enzýmov – aplikácia troch rôznych modelov

- **2. Model s inhibíciou substrátu:** vplyv parametra K_i (ostatné parametre zostávajú rovnaké, $K_m = 2$ mM, $V_{max} = 100$, koncentrácie substrátu $[S] = 0.5, 2, 10$ mM)

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S](1 + \frac{[S]}{K_i})}$$

výpočet rýchlostí pre rôzne vstupné parametre

K_i	v 0.5mM	v 2mM	v 10mM
$K_i = 5$, silná inhibícia	19.6	41.7	31.2
$K_i = 15$, mierna inhibícia	19.9	46.9	53.6
$K_i = 50$, slabá inhibícia	20.0	49.0	71.4

- Interpretácia: nízke K_i znamená silnú inhibíciu. Rýchlosť reakcie môže spočiatku rásť ale s narastajúcou koncentráciou substrátu bude mať klesajúcu tendenciu.

- **3. Model kompetitívnej inhibície:** vplyv koncentrácie inhibítora $[I]$ (ostatné parametre sú rovnaké)

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]}$$

výpočet rýchlostí pre rôzne vstupné parametre

Koncentrácia inhibítora	v 0.5mM	v 2mM	v 10mM
$[I] = 0$, bez inhibítora	20.0	50.0	83.3
$[I] = 2$, mierny inhibítor	11.1	33.3	71.4
$[I] = 8$, silný inhibítor	4.8	16.7	50.0

- Interpretácia: kompetitívny inhibítor znižuje rýchlosť reakcie najmä pri nízkych koncentráciách substrátu. Pri vyššej koncentrácii substrátu dôjde je miera inhibície nižšia.