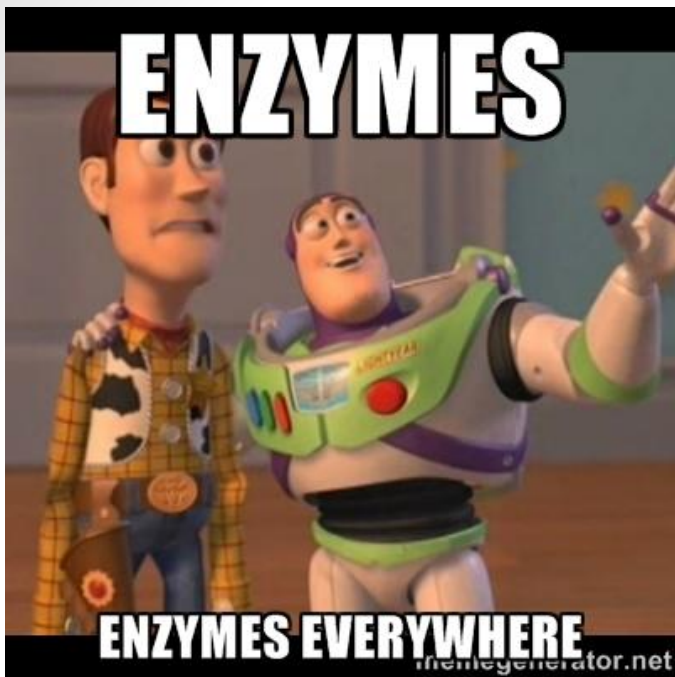




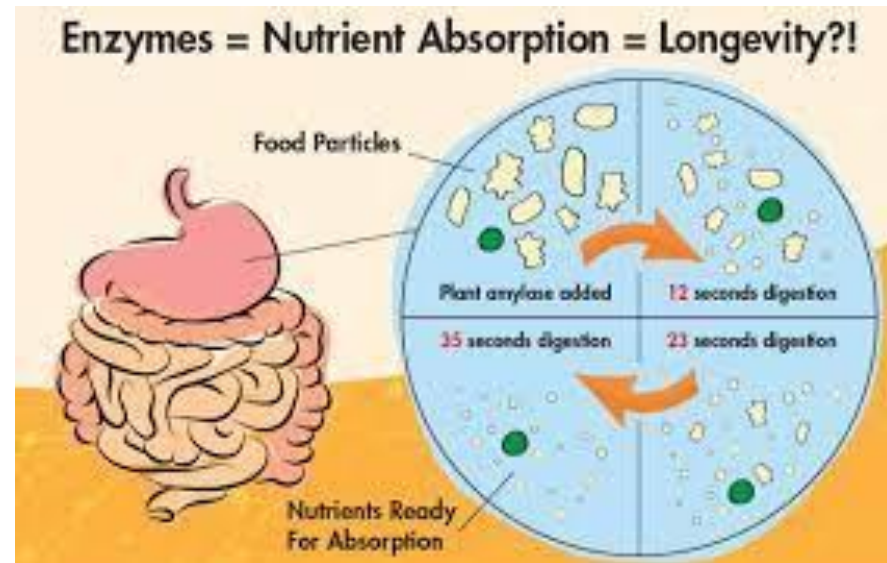
ENZIMOLOGIE

SUPORT DE CURS

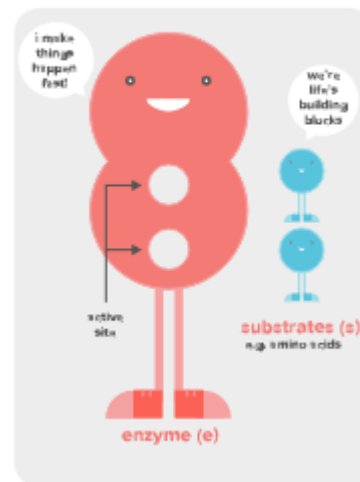
INGINERIE BIOCHIMICA

Enzime

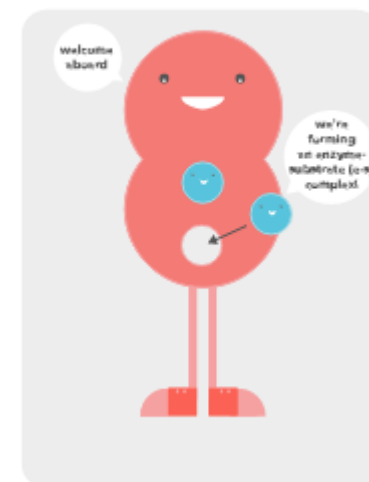
- Enzimele, numite și fermenți, intervin în numeroase reacții biochimice, îndeplinind rolul de biocatalizatori, imprimând o viteză mare de desfășurare proceselor biochimice (sinteze, degradări, oxidări, reduceri, hidrolize, hidratări, etc.); de activitatea lor depinzând mai toate funcțiile fiziologice



STEP 1
enzyme meets substrates!



STEP 2
substrates climb aboard enzyme!



SCURT ISTORIC:

- Reactiile enzimatice au fost folosite din timpurile cele mai vechi pentru fabricarea vinului, a otetului, a berii si a branzei.
- Lavoisier (1789) a facut un bilant de materiale al fermentatiei, aratand ca oxigenul, hidrogenul si carbonul din zahar se regasesc in alcoolul si dioxidul de carbon ce iau nastere.
- Payen si Persoz (1833) au izolat, prin precipitarea cu etanol, prima enzima: amilaza.
- Un moment istoric deosebit de important este recunoasterea clara, de catre Berzelius, in 1835, a caracterului catalitic al reactiilor enzimatice, precum si a rolului esential pentru viata animalelor si a plantelor jucat de aceste reactii.
- In anul 1940, cercetatorul american Edward Howell a facut, in acelasi domeniu, o si mai mare descoperire: cercetand substantele vitale propriu-zise si anume, ENZIMELE, a dovedit ca ele sunt purtatori vietii din orice organism viu, fiind deci si materia vie din alimentele noastre.



Premiul Nobel pentru Chimie 1907

«Pentru cercetările sale in
domeniul biochimiei și
descoperirea fermentatiei fara
microorganisme»



Eduard Buchner

Germania

Landwirtschaftliche Hochschule
(Agricultural College) Berlin,
Germania

n. 1860, d. 1917.

ENZIMOLOGIE - cuprins

1. Introducere
2. Nomenclatura
3. Structura
4. Obținere
5. Cinetica enzimatică
6. Imobilizarea enzimelor
7. Reactoare specifice

Enzime - definitie

- Enzimele sunt catalizatori biologici (*fermenti*)
- Enzimele sunt in general proteine cu rol biocatalitic
- >100 aminoacizi, >10kDa
- Au structura primara, secundara, terciara, cuaternara

Tehnici: cristalografie cu raze X, spectrometrie de masa, fluorescenta, tehnici imunochimice, etc

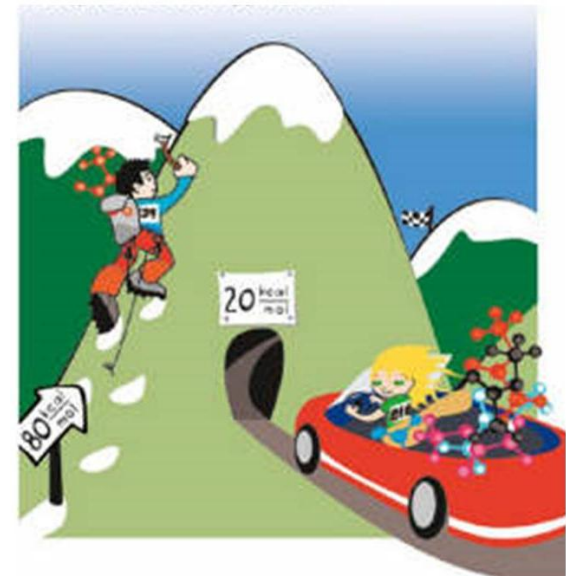
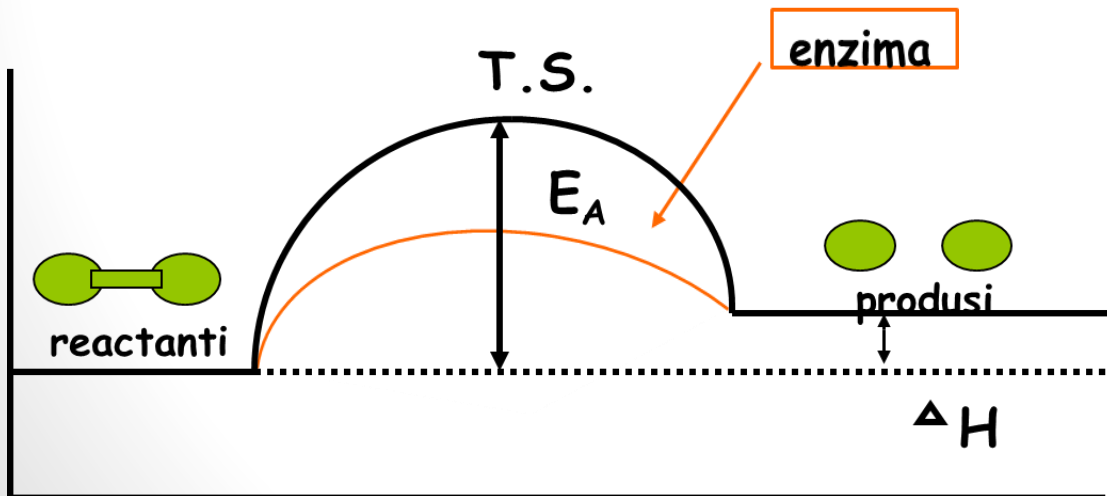
Enzime

- Enzimele sunt esențiale pentru fiecare proces biochimic

Hofmeister, 1901:

“life is short and thus has to be catalyzed”

"Viața este scurtă și, astfel, trebuie să fie catalizată"



Catalaza



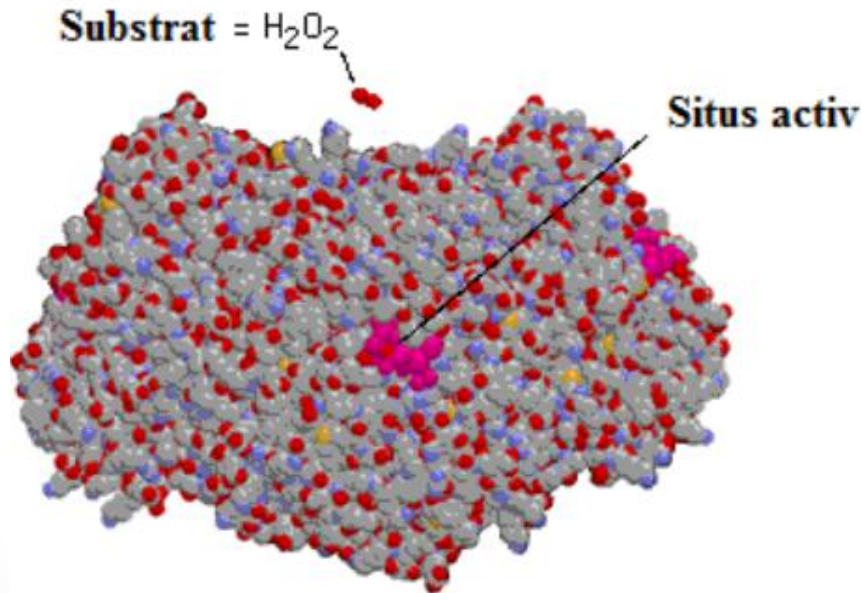
Mareste viteza reactiei de:

$\text{Fe}^{3+} \rightarrow 1000$

Hemoglobina $\rightarrow 1,000,000$

Catalaza $\rightarrow 1,000,000,000$

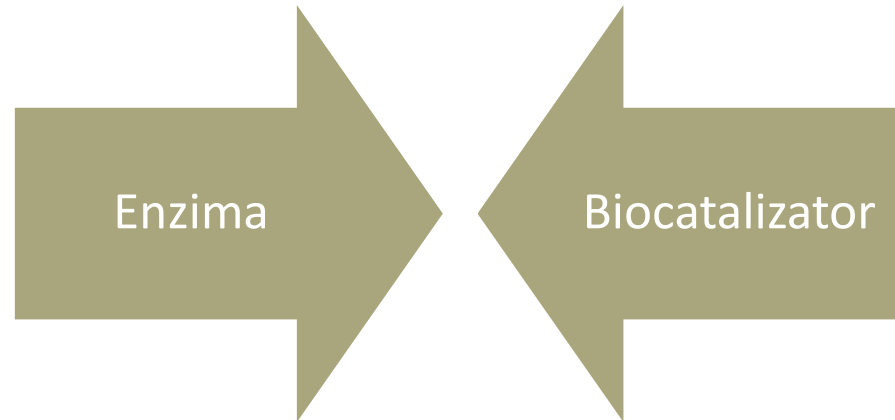
200000 evenimente catalitice / secunda/subunitate
(aproape de limita de difuzie controlata).



Model molecular al catalazei

**Reacția este
accelerata de un
miliard de ori!**

ENZIMOLOGIE

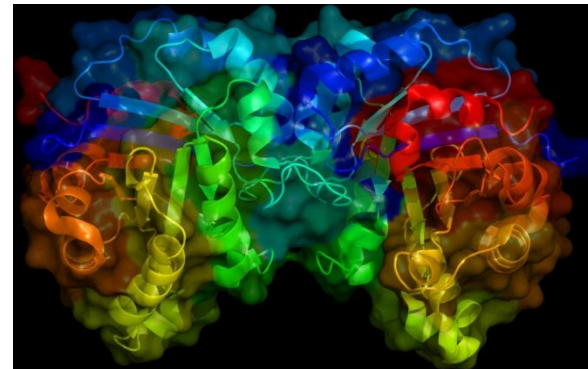


- medicină
- biologia moleculară
- industria farmaceutică
- ingineria genetică
- industria textilă
- microbiologia
- analize chimice
- biotehnologia

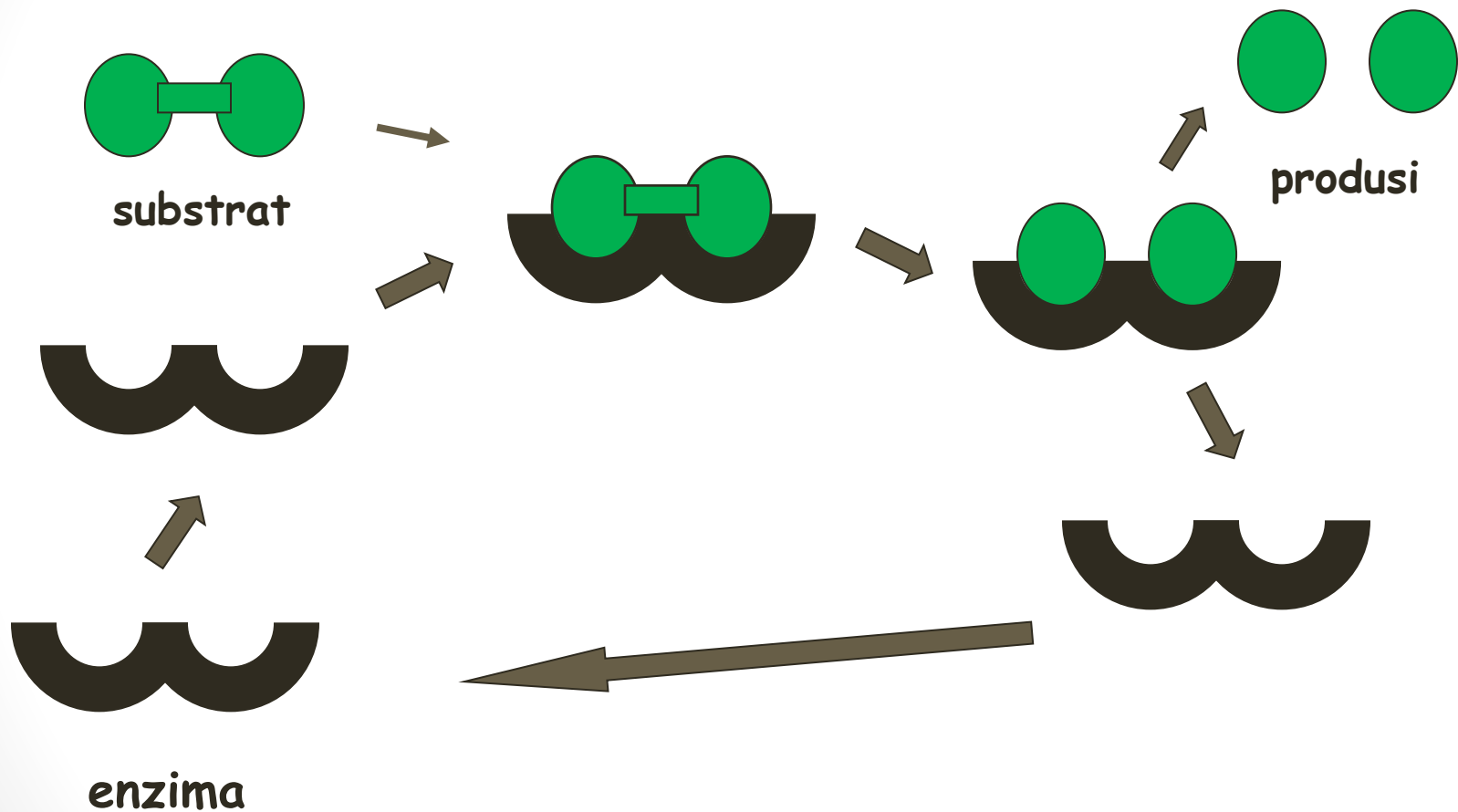


Enzimele

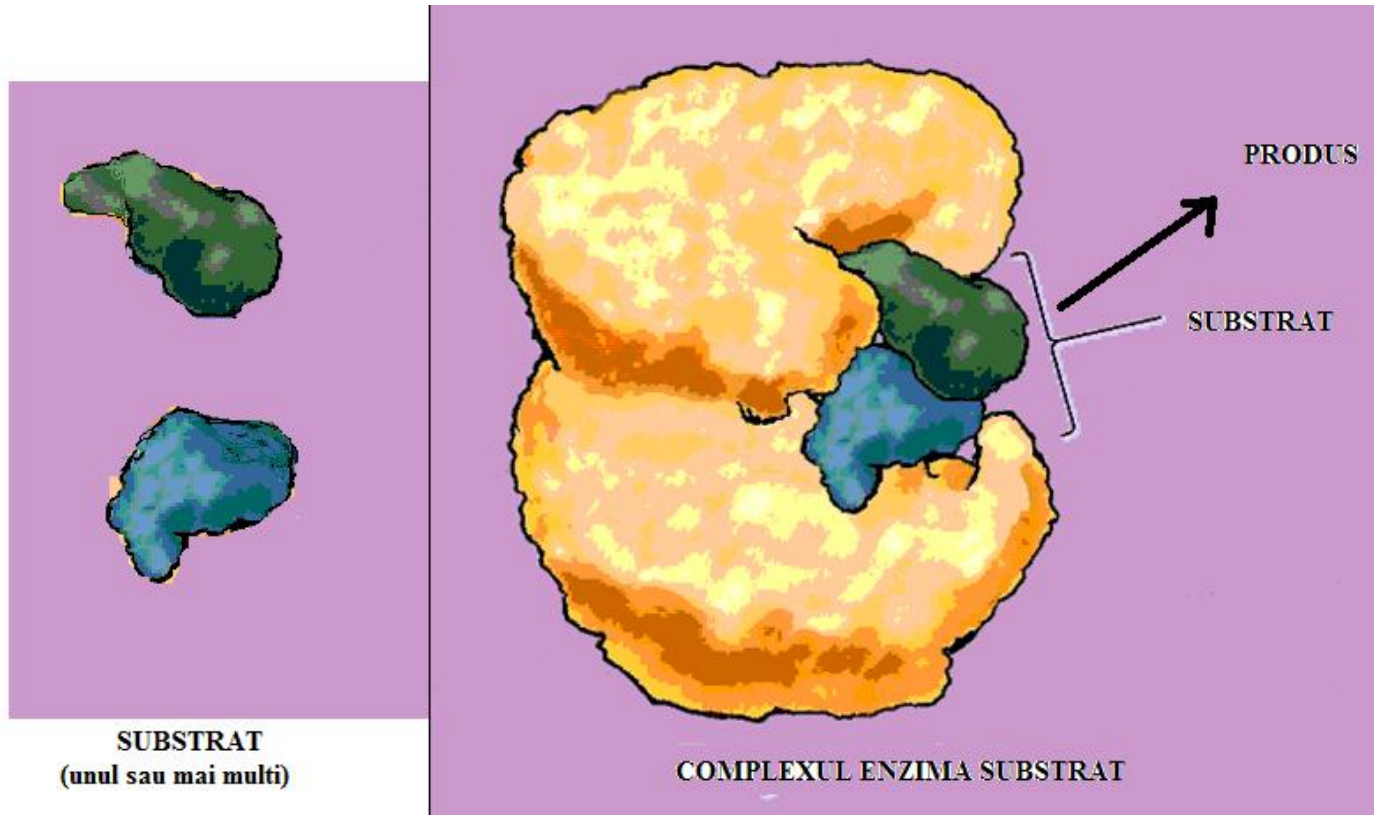
- măresc viteza reacțiilor chimice posibile din punct de vedere termodinamic prin scăderea energiei de activare și instalarea mai rapidă a stării de echilibru;
- activitatea catalitică se manifestă la concentrații mici, mediul de reacție conținând concentrații relativ mari de substrat;
- la sfârșitul transformării se regăsesc în mediu nemodificate din punct de vedere cantitativ și calitativ.



Actiunea enzimelor



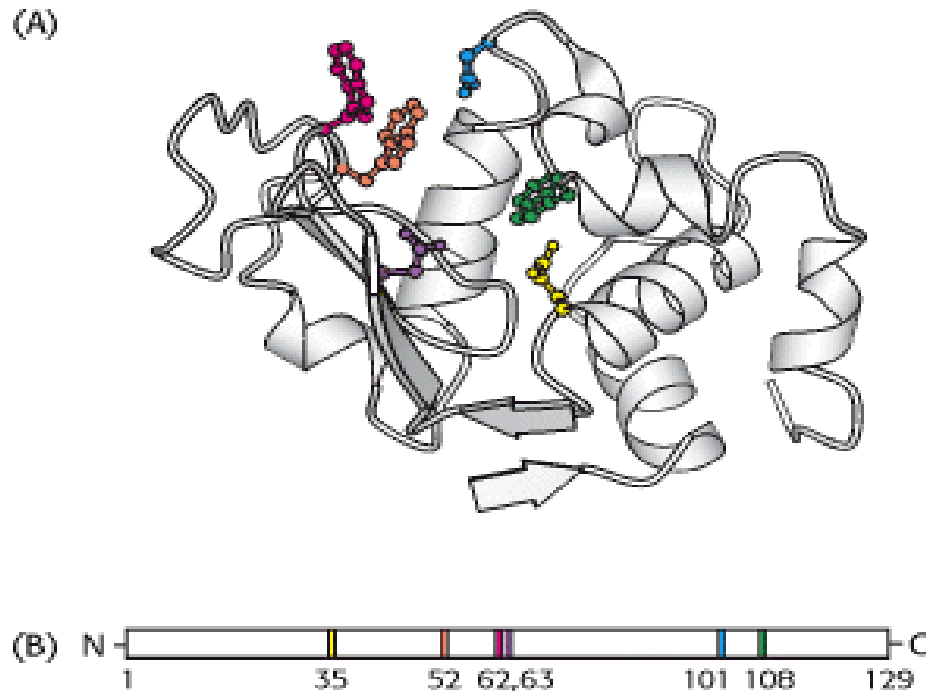
Cum functioneaza?



- Enzimele pun in contact substraturile in centrul activ marind viteza la care acestea reactioneaza

Centrul activ al enzimelor

- Centru activ= totalitatea grupurilor chimice din molecula enzimei care recunosc, leaga specific si transforma molecula de substrat
- Confera specificitate enzimelor pentru substrat



Nomenclatura

- În 1964, **Comisia de Enzimologie a Uniunii Internaționale de Biochimie (IUB)** elaborează normele ce stau la baza nomenclaturii și clasificării enzimelor. Conform acestor norme denumirea enzimelor trebuie să reflecte numele substratului supus transformării sau numele produsului de reacție și tipul de reacție catalizat de fiecare enzimă în parte, urmate de sufixul „**aza**”.
 - **catalaza** - **H_2O_2 -oxidoreductaza**
 - **celulaza** - ***b-1,4-glucan-glucanohidrolaza***, iar
 - **invertaza** sau **zaharaza** - ***b-fructofuranozid-fructohidrolaza***.
- Pentru unele enzime se pot utiliza și denumirile triviale atunci când acestea au intrat deja în uz, iar modificarea lor ar genera confuzii (***tripsina, pepsina, renina*** etc.).
- Denumirile uzuale se mai folosesc și atunci când denumirile sistemice sunt prea lungi, iar utilizarea repetată a acestora ar fi deranjantă din punct de vedere stilistic. În asemenea cazuri însă trebuie menționată cel puțin odată denumirea științifică însoțită de codul numeric al enzimei după care se poate folosi denumirea trivială.

ATP:D-gluco-6-fosfotransferaza

hexokinaza

Enzyme Commision

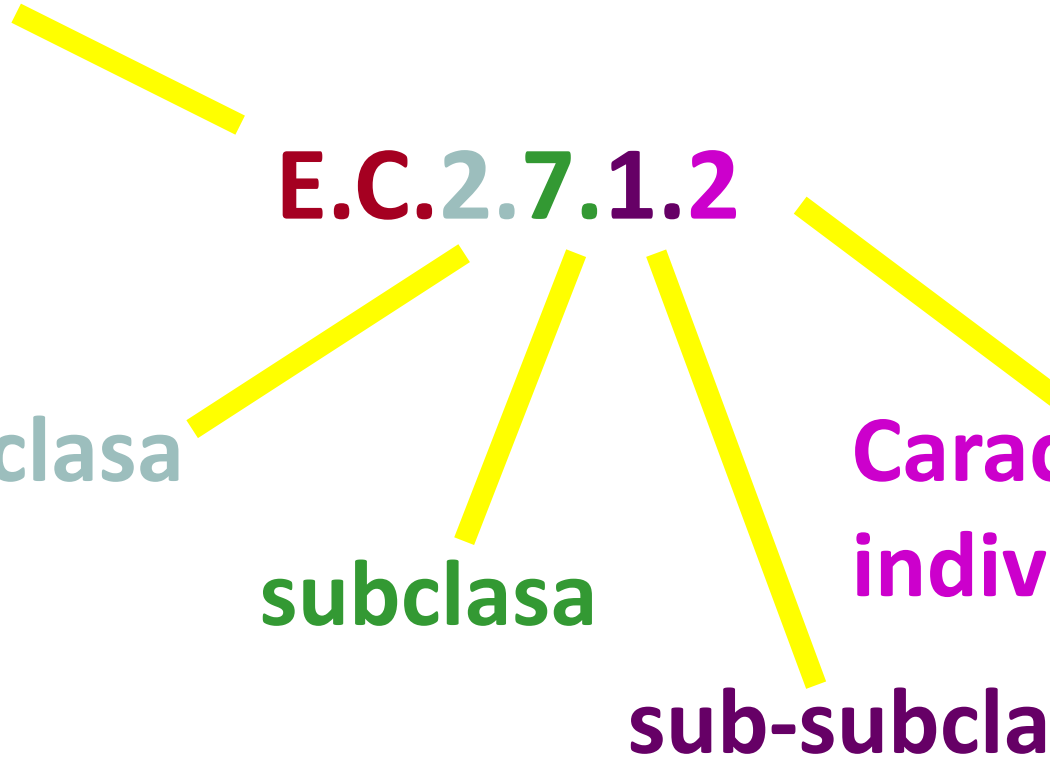
E.C.2.7.1.2

clasa

subclasa

sub-subclasa

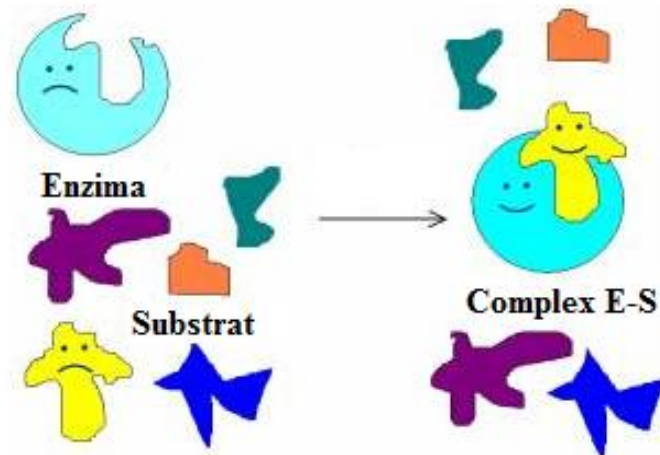
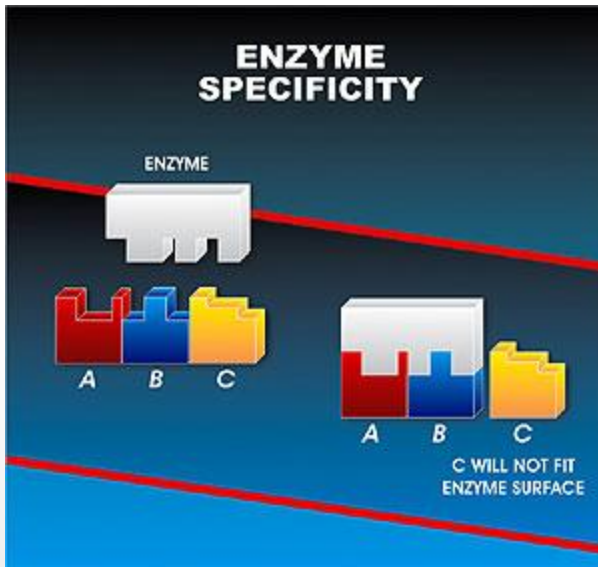
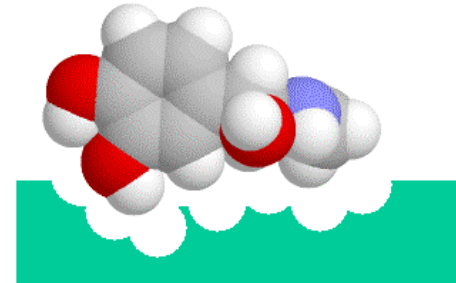
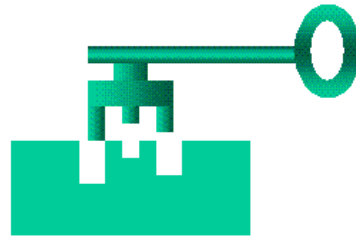
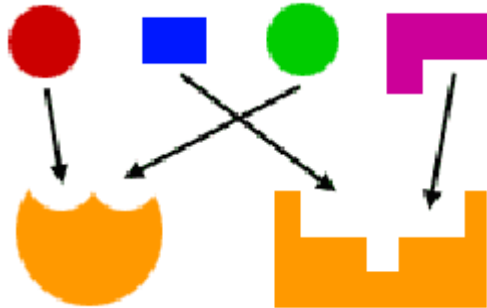
Caracteristica
individuala



Enzime- caracteristici

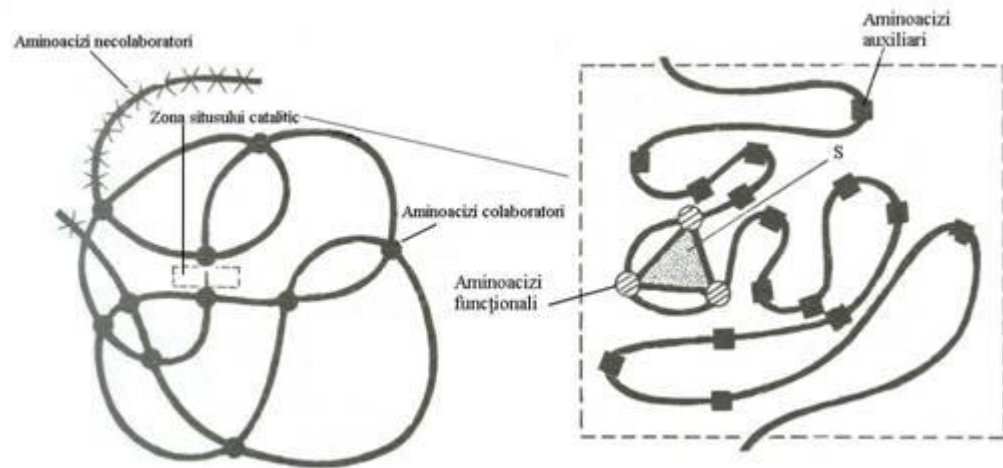
- Fiind proteine enzimele prezintă toate proprietățile fizico-chimice ale acestor macromolecule. Datorită faptului că acționează în celula vie, enzimele mai prezintă o serie de proprietăți ce diferențiază net cataliza enzimatică de cea chimică:
 - **eficiența catalitică** a enzimelor este cu mult mai mare comparativ cu cea a catalizatorilor chimici.
 - enzimele acționează în **condiții blânde** de temperatură, pH, presiune osmotică etc., spre deosebire de catalizatorii chimici care acționează în general, în condiții dure de reacție.
 - Au o $T^{\circ}\text{C}$ și pH optim de functionare
 - Nu sunt produse sau consumate în timpul unei reacții chimice
 - Nu declanșează o reacție chimică ci intensifică viteza reacției chimice
 - Enzimele modifică viteza reacției dar nu constanta de echilibru a reacției catalizate.

Specificitate



Specificitate

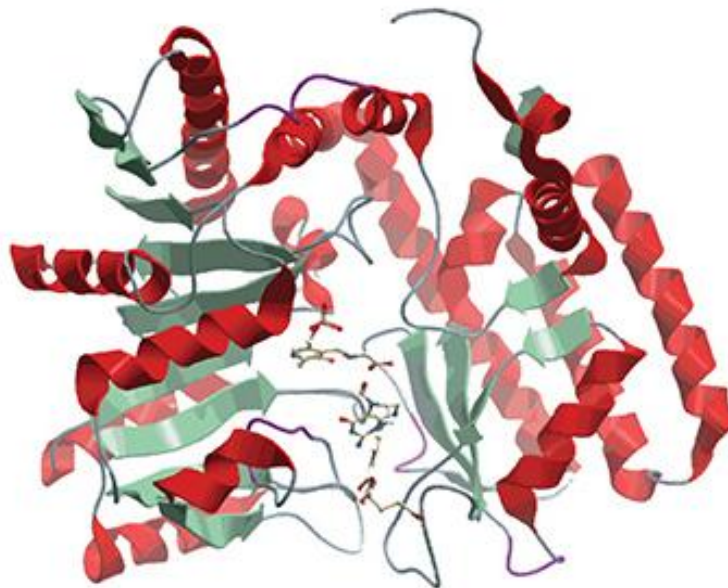
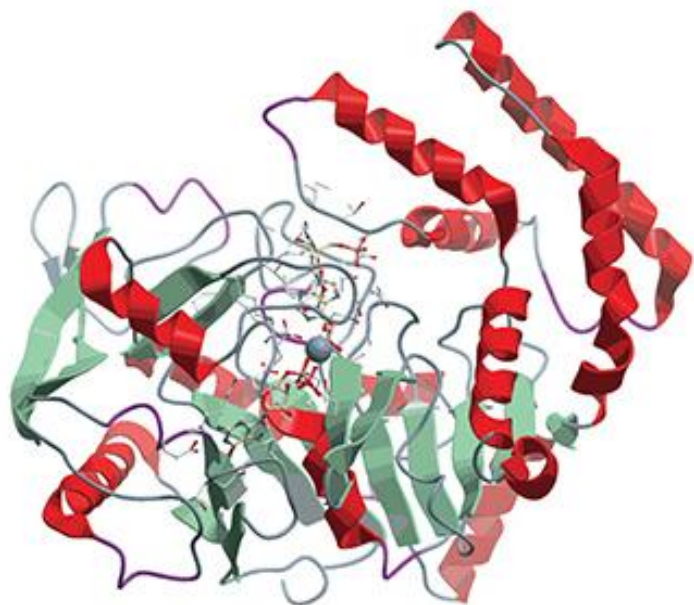
- este determinată de interacțiile **necovalente** (van der Waals, electrostatice, legături de hidrogen, forțe hidrofobe) între enzimă și substrat, pentru formarea produsului de reacție
- Complementaritatea geometrică și electronică, deci specificitatea de acțiune a enzimei, este dată de structura unei regiuni sau zone din moleculele acesteia (aminoacizi ai catenei peptidice apropiați spațial) și grupările funcționale prezentate pe substraturi.



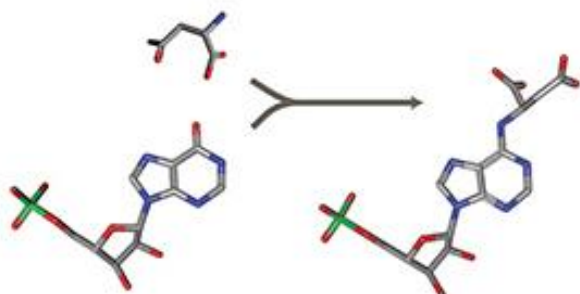
Specificitate

- Cea mai importantă proprietate a enzimelor, total neîntâlnită în cataliza chimică, o constituie înalta ***specificitate de acțiune*** a acestora, ceea ce înseamnă că o enzimă poate să catalizeze transformarea unui singur substrat sau a unui grup restrâns de substanțe înrudite structural. În funcție de modul de manifestare, specificitatea de acțiune a enzimelor poate fi de mai multe tipuri:
 - **specificitate de reacție,**
 - **specificitate de substrat,**
 - absolută,
 - relativă,
 - stereospecificitate etc.

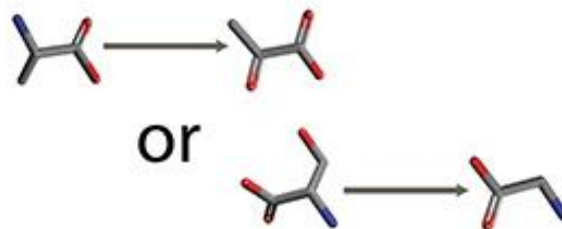
SPECIFICITATE



O SINGURA REACTIE



MAI MULTE REACTII

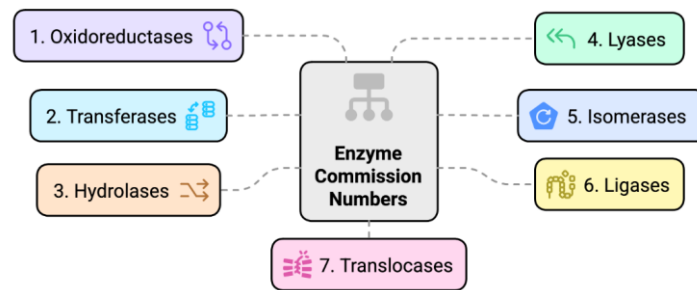
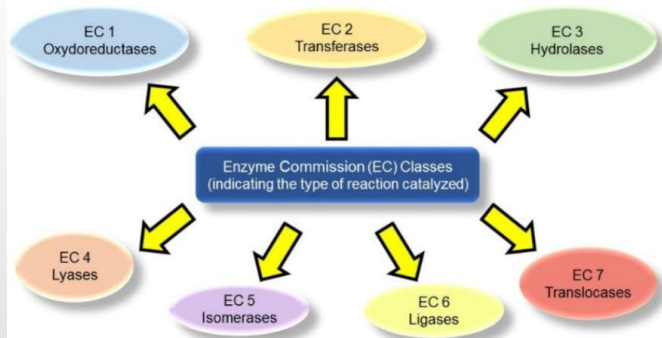


SPECIFICITATEA DE REACȚIE

- Specificitatea de reacție este tipul de specificitate cel mai des întâlnit și constă în capacitatea enzimelor de a cataliza un anumit tip de reacție biochimică. Această proprietate stă la baza clasificării enzimelor în șapte clase în funcție de tipul de reacție la care participă. Astfel,
- o *oxidoreductază* va cataliza un proces redox,
- o *hidrolază* va scinda hidrolitic substratul, iar
- o *ligaza* va participa la o reacție în care se formează o nouă legătură covalentă carbon – carbon sau carbon – heteroatom.

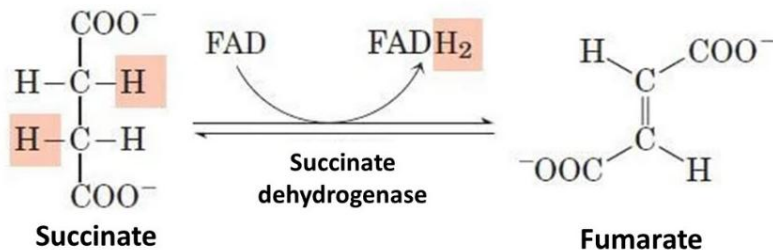
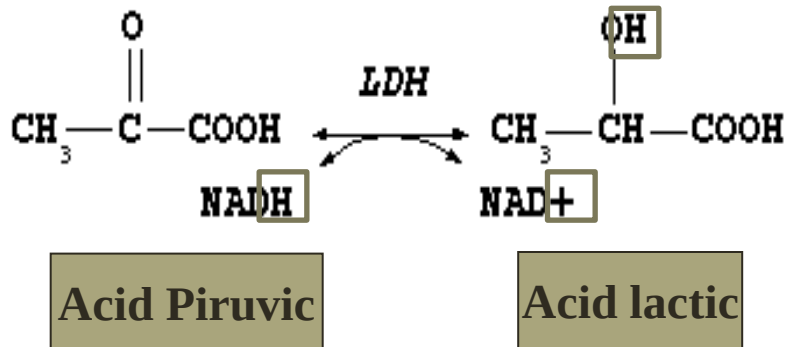
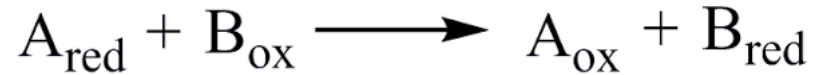
O situație aparte se întâlnește în cazul **proteazelor** care prezintă concomitent activitate peptidazică, amidazică și esterazică. Aceste enzime catalizează însă reacții de scindare hidrolitică a peptidelor, a polipeptidelor, amidelor și esterilor, aceste reacții diferite având loc în același centru activ, după același mecanism de acțiune.

Clasa EC (Enzyme class)	Tip de reacție (Reaction type)	Descriere (Description)	Exemplu de enzimă
EC 1	Oxidoreductaze	Catalizează reacții redox (oxidare-reducere) și pot fi împărțite în oxidaze și reductaze.	Lactat dehidrogenaza (LDH) – convertește lactatul în piruvat
EC 2	Transferaze	Catalizează transferul sau schimbul anumitor grupări între substraturi.	Aminotransferaza (ALT) – transferă grupări amino
EC 3	Hidrolaze	Accelerează reacțiile de hidroliză ale substraturilor.	Tripsina – descompune proteinele în peptide
EC 4	Liaze	Promovează eliminarea unui grup din substrat pentru a forma o legătură dublă sau catalizează reacția inversă.	Piruvat decarboxilaza – elimină CO ₂ din piruvat
EC 5	Izomeraze	Facilitează conversia între izomeri (izoizomeri, geometrici sau optici).	Fosfoglucoizomeraza – convertește glucozo-6-fosfat în fructozo-6-fosfat
EC 6	Ligaze	Catalizează unirea a două molecule substrat într-un compus molecular unic, cu consum de energie (ATP).	ADN ligaza – leagă fragmente de ADN
EC 7	Translocaze	Catalizează transportul ionilor sau moleculelor prin membrane sau redistribuirea acestora în interiorul membranei.	ATP sintaza – transportă protoni și sintetizează ATP



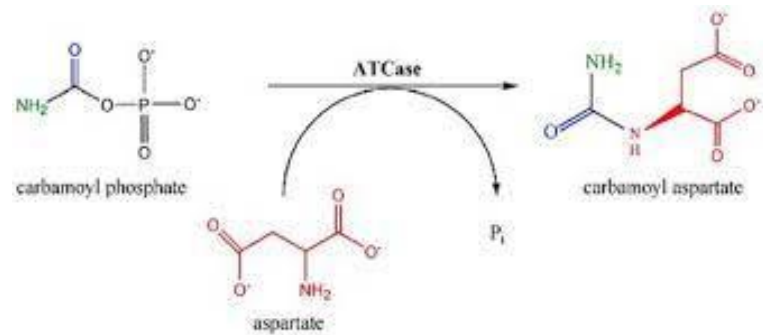
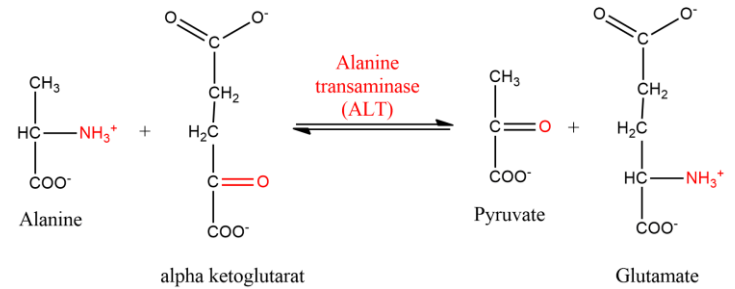
Enzime- clasificare

- 1) Oxidoreductazele
- - enzime ce catalizează reacțiile de oxidoreducere (transfer de electroni) ce au loc în organismele vii;
- Lactat dehidrogenaza



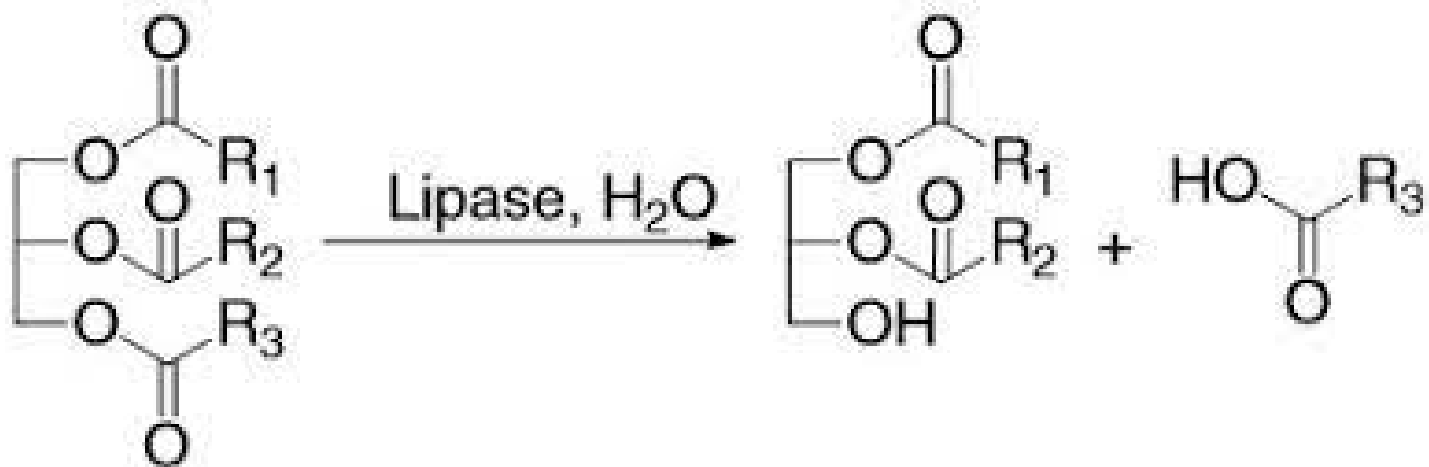
Enzime- clasificare

- 2) Transferazele
- - enzime ce catalizează reacții de transfer ale unor grupe de atomi (C-, N-, P-) ce pot fi și grupări funcționale de la un substrat la altul, fără ca aceste grupări să existe libere în timpul procesului;



Enzime- clasificare

- 3) Hidrolazele
- enzime ce catalizează scindarea diferitelor legături covalente din molecula substratului cu participarea moleculelor de apă;



Enzime- clasificare

- 4) Liazele
- catalizează clivarea legăturilor de tip C-C, C-S, C-N cu rearanjarea ulterioară a valențelor;

EC 4: Lyases

1° EC 4.1: Cleave carbon-carbon bonds

2° EC 4.2: Cleave carbon-oxygen bonds

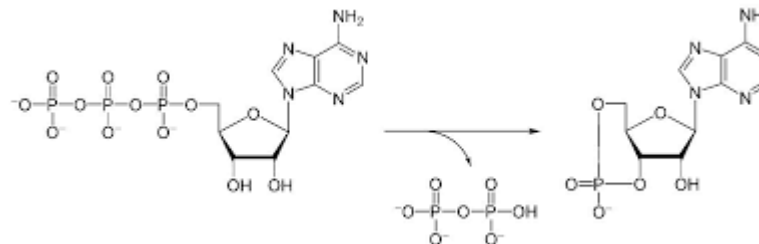
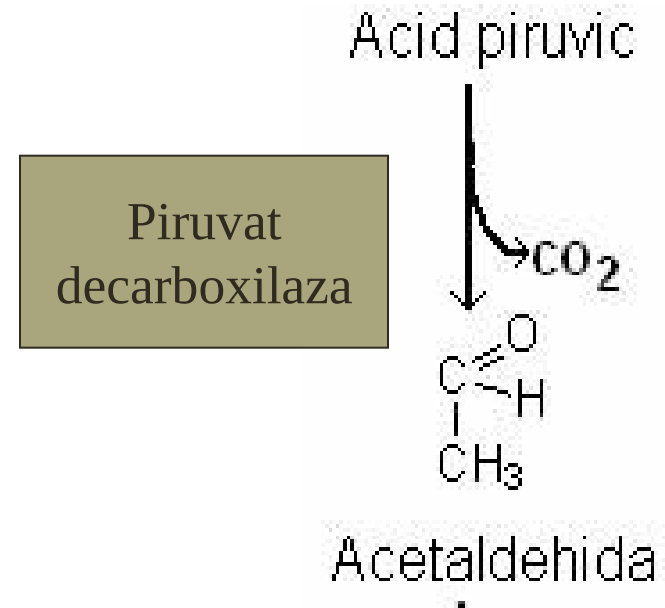
3° EC 4.3: Cleave carbon-nitrogen bonds

4° EC 4.4: Cleave carbon-sulfur bonds

5° EC 4.5: Cleave carbon-halide bonds

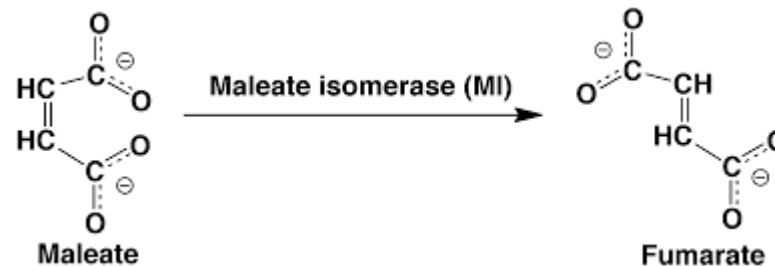
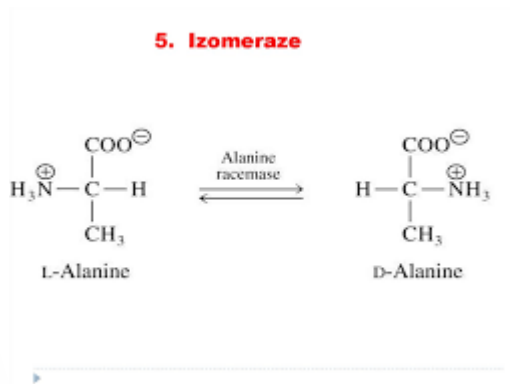
6° EC 4.6: Cleave phosphorus-oxygen bonds

7° EC 4.99: A group of other lyases

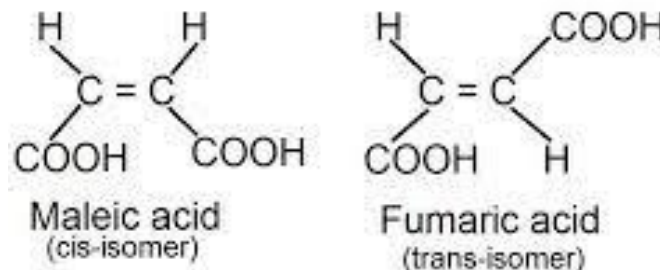


Enzime- clasificare

- 5) Izomerazele
- - enzime care catalizează diferite reacții de izomerizare a substratelor;

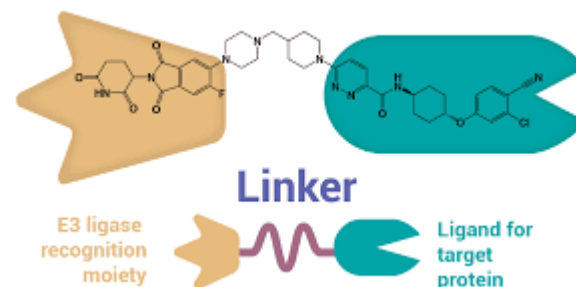
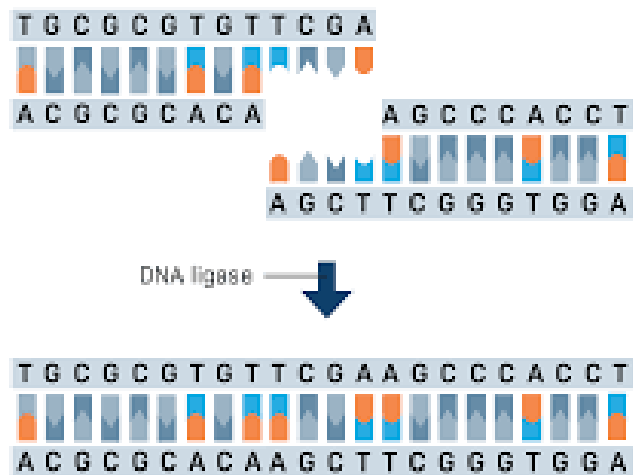


Structures of maleic and fumaric acid



Enzime- clasificare

- 6)Ligazele sau sintetazele
- - enzime ce catalizează formarea unor noi legături chimice C – C sau C– O, S, N în majoritatea cazurilor utilizându-se energia stocată în legăturile macroergice ale moleculelor de ATP.



Translocaze

În anul 2018, Comisia pentru Enzime (Enzyme Commission) a introdus **clasa EC 7: Translocaze**, o nouă categorie de enzime care facilitează mișcarea moleculelor, ionilor sau macromoleculelor prin membrane sau în compartimente celulare.

Spre deosebire de celelalte clase de enzime, translocazele **nu modifică chimic substraturile lor**. În schimb, ele catalizează translocarea (deplasarea), folosind adesea **surse de energie** precum **hidroliza ATP** sau **gradientul electrochimic de ioni** pentru a realiza transportul.

Principiile clasificării translocazelor, conform Comisiei pentru Enzime:

Doar entitățile catalitice individuale pot fi clasificate ca enzime. Sistemele enzimatic complexe care participă la transport trebuie să includă în denumire cuvântul „**sistem**” (ex: sistem pompă de protoni).

Translocazele nu trebuie confundate cu enzimele care modifică substraturile. Spre deosebire de oxidoreductaze (EC 1) sau transferaze (EC 2), translocazele **transportă substanțe fără a le altera structura chimică**.

Numele sistematice ar trebui să reflecte **molecula transportată și sursa de energie** utilizată pentru transport. Exemple: **pompe ionice dependente de ATP** sau **simporterii** care folosesc **gradienti electrochimici**.

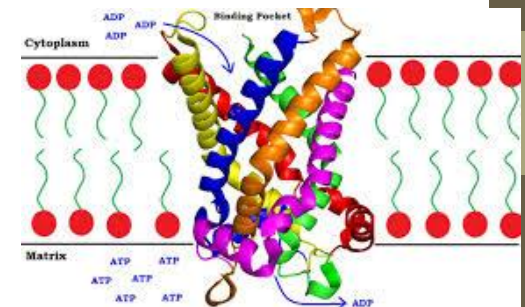
Pe măsură ce cercetările avansează, **noi translocaze continuă să fie descoperite și clasificate**. Baze de date enzimatic majore, inclusiv **Expasy**, recunosc în prezent translocazele EC 7 ca o **extindere oficială** a clasificării enzimelor.

Translocaze

O translocază este o enzimă sau un complex proteic care ajută la mișcarea altor molecule (cum ar fi proteine, ioni sau lipide) peste sau în interiorul unor membrane celulare sau al altor structuri. Termenul este general și se referă la procesul de translație, iar exemple specifice includ proteine care transportă precursorii proteici în mitocondrii (cum ar fi complexul TIM- *Translocase of the Inner Membrane* și TOM- *Translocase of the Outer Membrane*) sau enzime care ajută la mutarea fosfolipidelor în interiorul membranei celulare.

Roluri specifice ale translocazelor:

- Transportul proteinelor:** Proteinele translocatoare ajută la introducerea proteinelor în mitocondrii sau la exportul lor din celule (în bacterii).
- Mișcarea moleculelor:** Aceste enzime pot cataliza transferul ionilor sau moleculelor între diferite părți ale celulei, de exemplu, între "fața 1" și "fața 2" ale unei membrane.
- Reglarea distribuției lipidelor:** Unele translocaze ajută la mutarea fosfolipidelor în interiorul membranei celulare, influențând astfel distribuția acestora.
- Mecanisme de mișcare pe ADN:** Termenul poate desemna și proteine care se mișcă de-a lungul unei molecule de ADN, utilizând energie chimică.

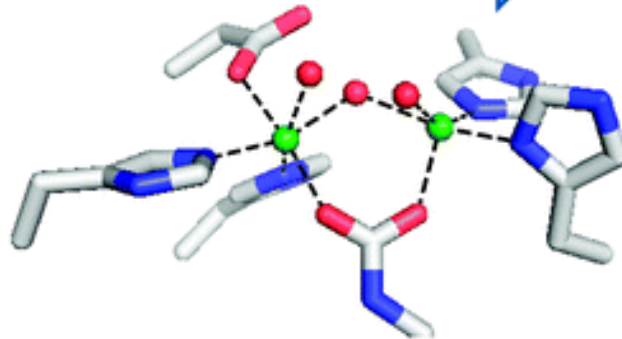
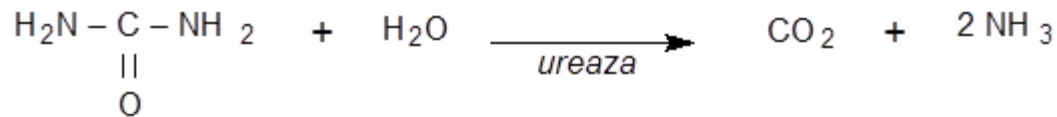


SPECIFICITATEA DE SUBSTRAT

- ***Specificitatea de substrat*** constă în capacitatea de a cataliza transformarea unui singur substrat, fiind total indiferente față de alte substanțe, chiar dacă sunt înrudite structural cu substratul. În procesul catalitic, la formarea complexului enzimă-substrat, enzima recunoaște conformația structurală a întregii molecule de substrat, a unei grupări funcționale din aceasta sau o anumită legătură chimică ce urmează a fi scindată. Acest tip de specificitate este condiționată de complementaritatea structurală (spațială și/sau electronică) dintre molecula substratului și a centrului activ al enzimei.
- În funcție de mecanismul de formare a complexului enzimă-substrat, acest tip de specificitate poate fi de mai multe feluri:
 - specificitate absolută de substrat,
 - specificitate relativă de substrat,
 - stereospecificitate etc.

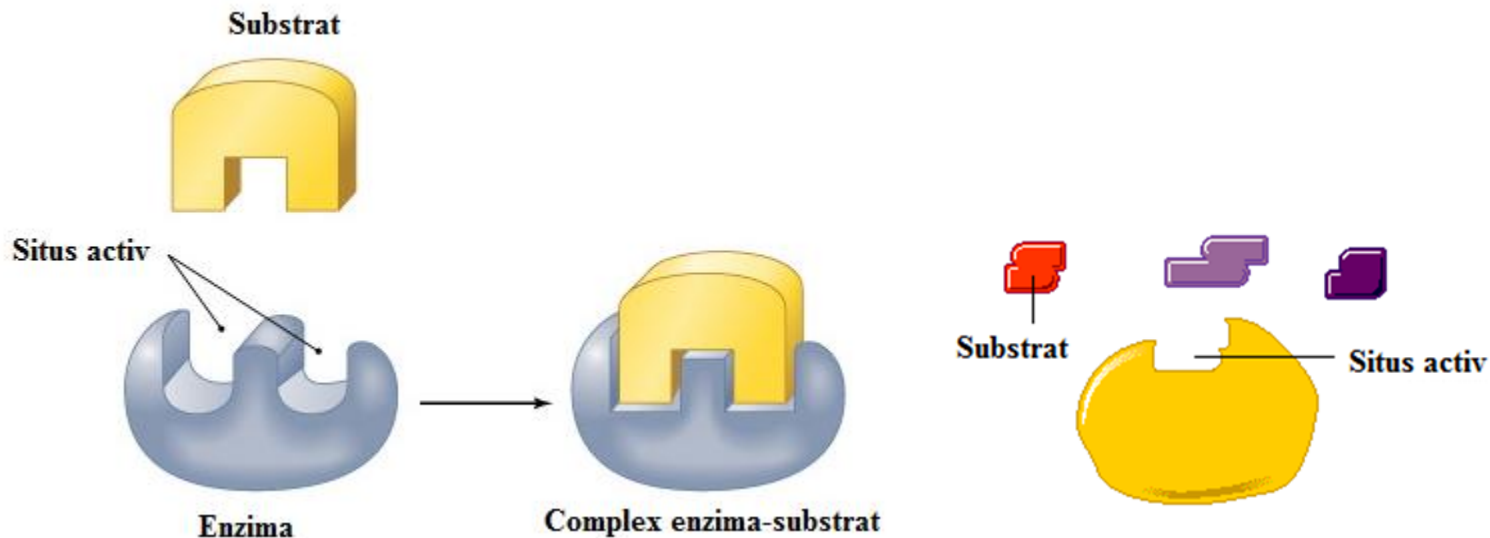
Specificitatea absolută de substrat

- este întâlnită la acele enzime ce sunt capabile să recunoască structura chimică a unei singure specii moleculare, aceasta reprezentând unicul substrat. De exemplu, **ureaza** prezintă o specificitate absolută de substrat, catalizând reacția de scindare a ureei:



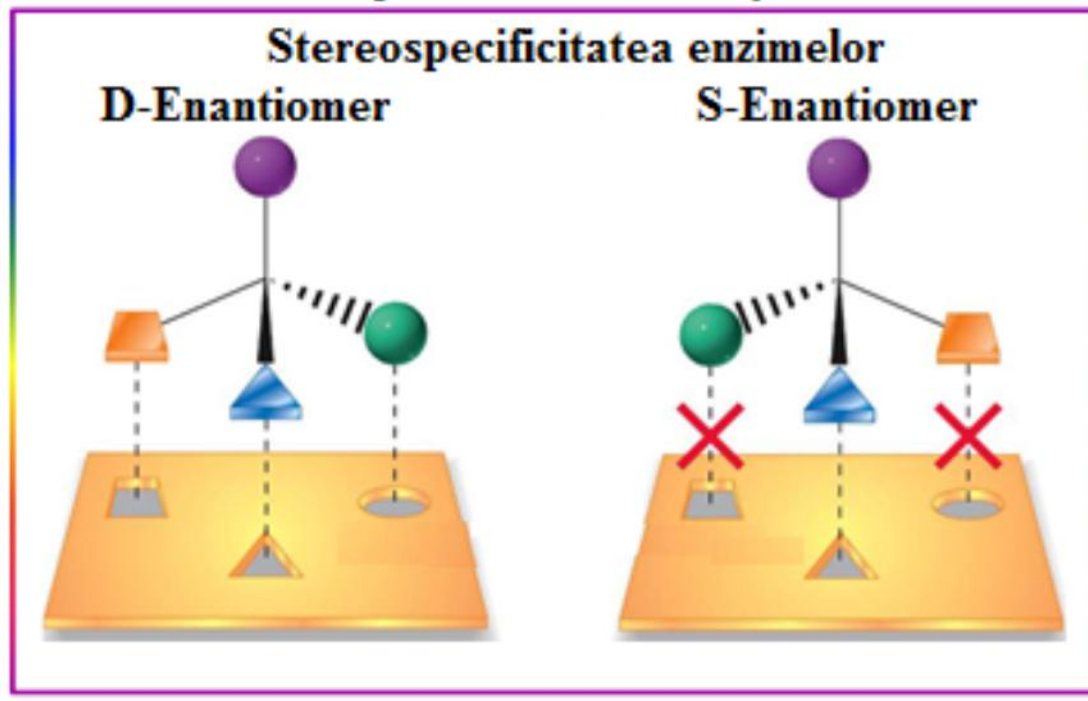
Specificitatea relativă de substrat

- se întâlnește atunci când enzima manifestă specificitate față de o anumită grupare funcțională din molecula substratului, sau față de anumite legături chimice din structura acestuia, fiind indiferentă față de restul moleculei.



Stereospecificitate

- se referă la capacitatea enzimelor de a recunoaște un anumit izomer geometric sau optic. Acest tip de specificitate este foarte des întâlnit, dat fiind faptul că majoritatea compușilor organici conțin atomi de carbon asimetrici, putând deci exista sub forma celor doi antipozi optici.

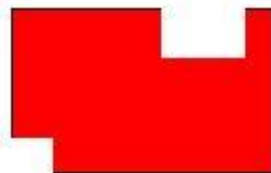


STRUCTURA ENZIMELOR

ENZIMA = Apoenzima + Cofactor

PROTEINA

**Coenzima
Grupare Prostetica/Ion metalic**

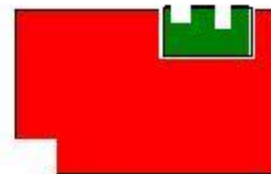


Apoenzyme

+



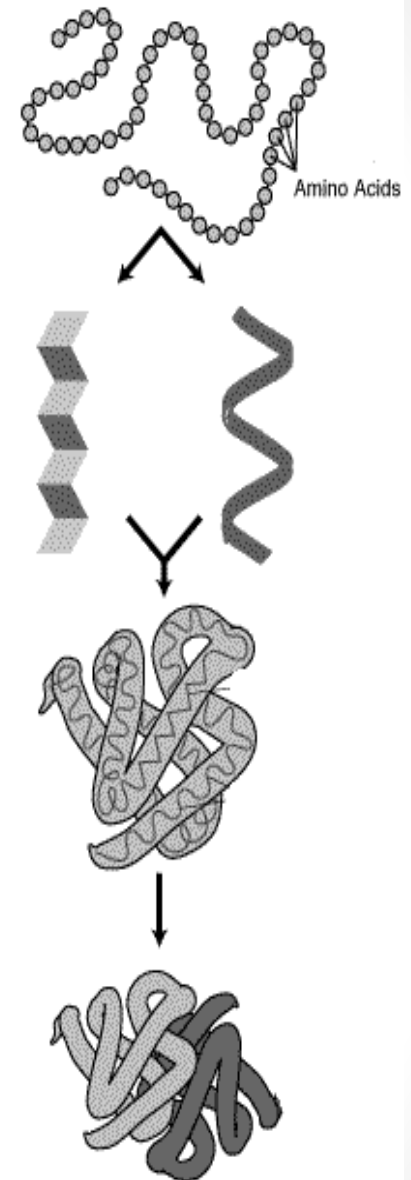
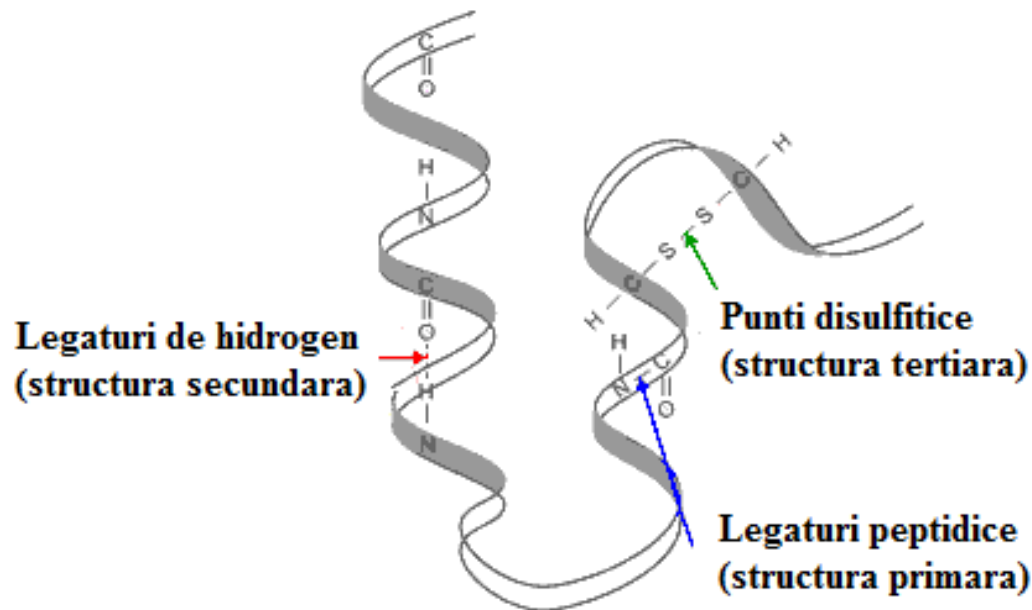
Cofactor



Holoenzyme

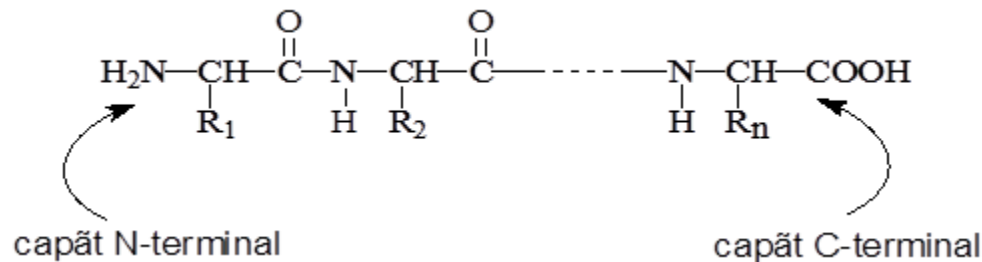
Structura partii proteice

- Fiind proteine, enzimele prezintă aceeași organizare structurală specifică tuturor proteinelor caracterizată prin structură primară, secundară, terțiară și cuaternară.

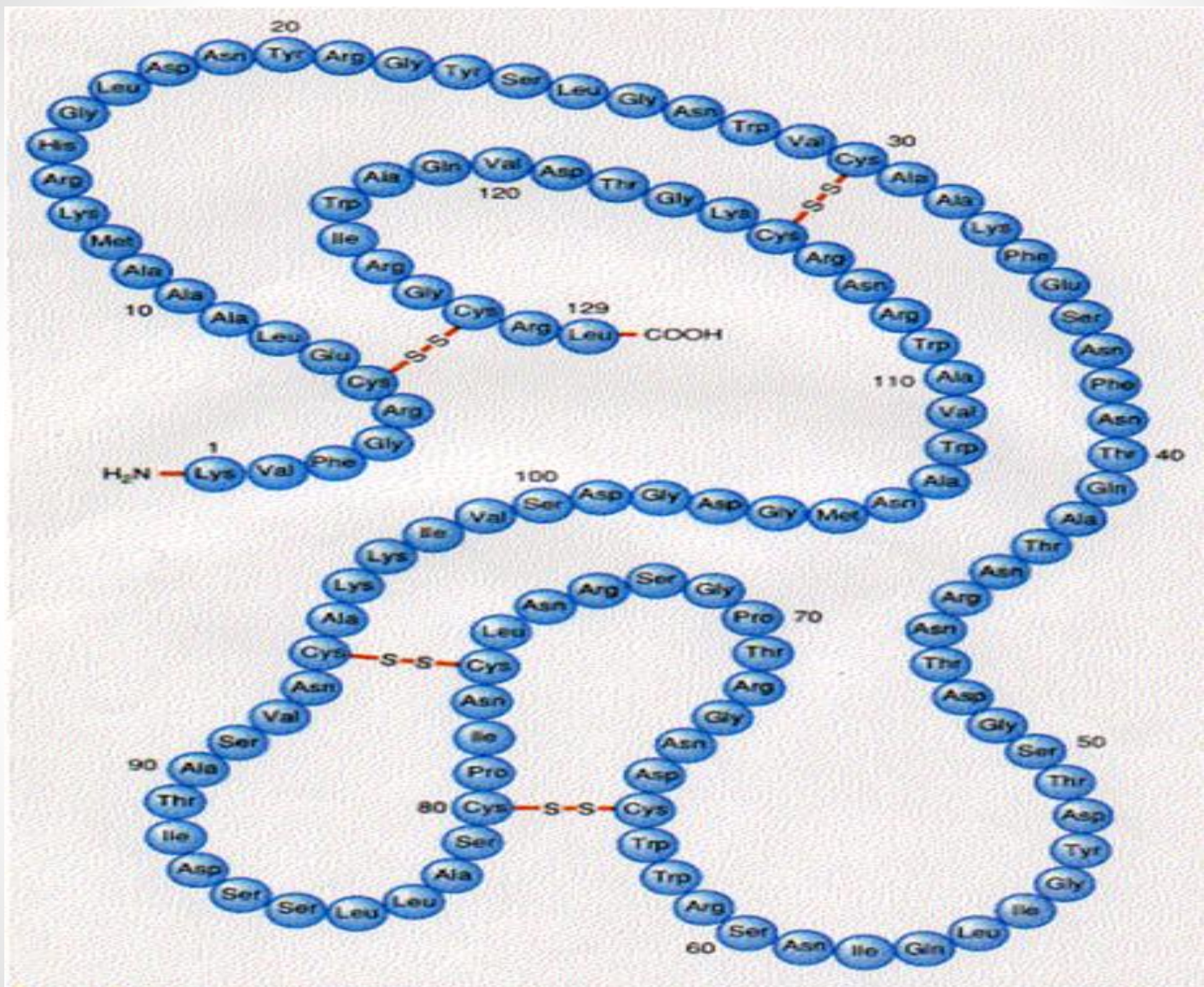


Structura primara

- **Structura primară** este dată de numărul, natura și succesiunea resturilor de aminoacizi din catena polipeptidică. Acest nivel de organizare structurală nu ține cont deci de aranjamentele spațiale ale catenei polipeptidice:

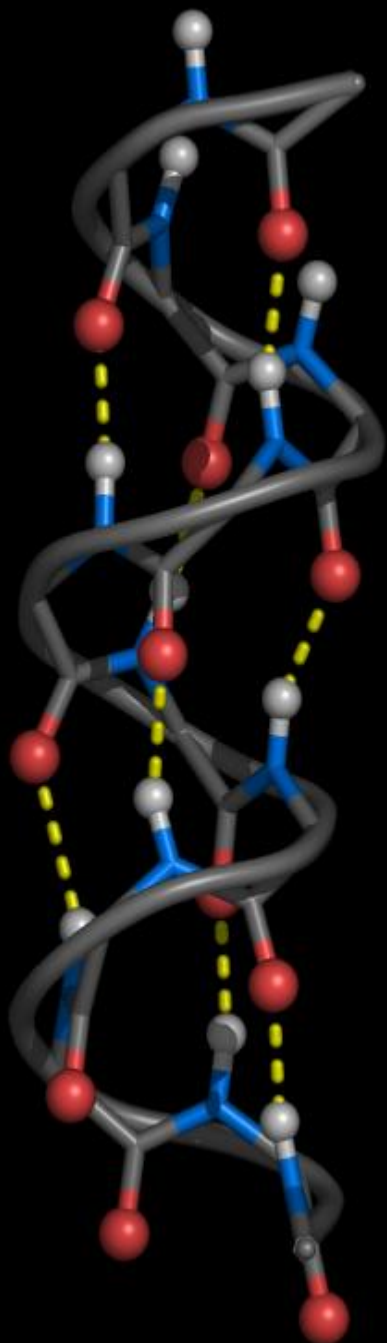


- În structura primară, resturile de aminoacizi sunt unite prin legături peptidice identice cu cele întâlnite în structura peptidelor.

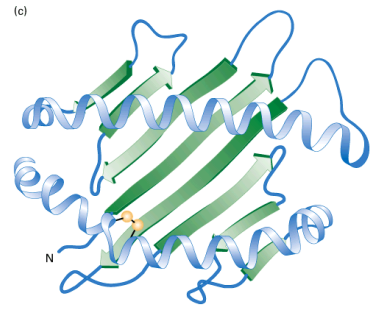


Structura secundara

- Moleculele polipeptidice nu sunt filiforme ci ocupă un aranjament spațial care determină **structura secundară**. Acest nivel de organizare structurală se poate materializa în două moduri:
 - **structura helicoidală (α -helix)** generată de formarea punților de hidrogen între oxigenul carbonilic al unui rest de aminoacid și hidrogenul iminic al altui rest de aminoacid din aceeași catenă polipeptidică și respectiv
 - **structura β -pliată** când legăturile de hidrogen se formează între atomi oxigenul carbonilic al unui rest de aminoacid și hidrogenul iminic al altui rest de aminoacid dar sunt intercatenare.

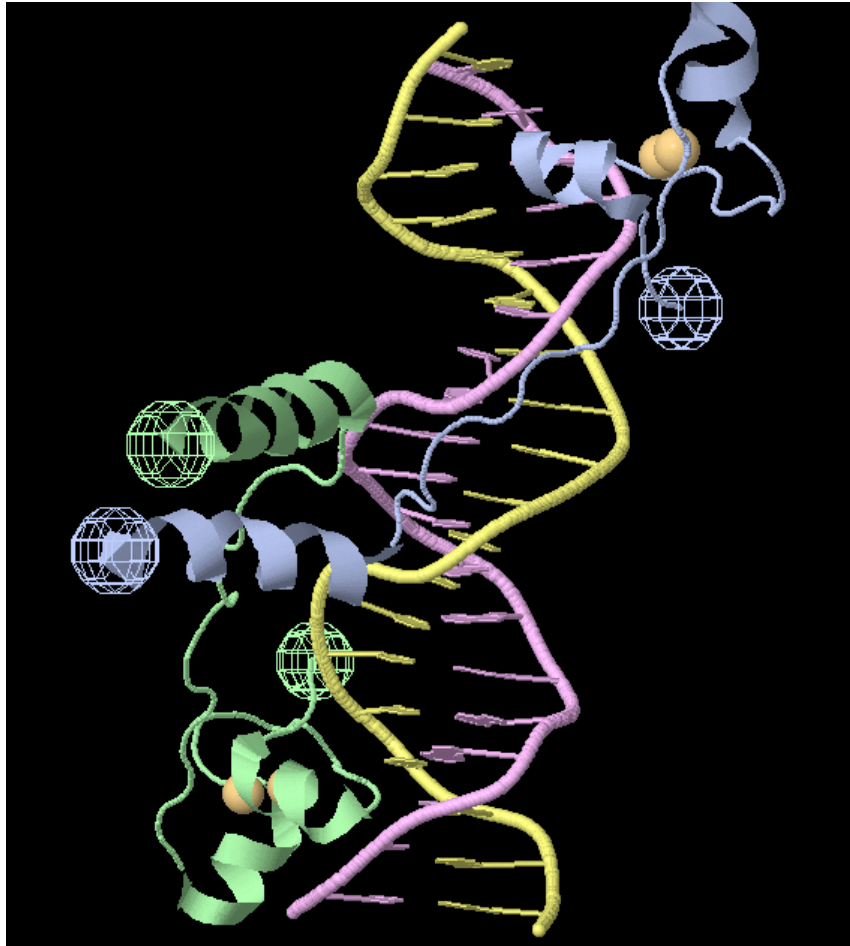


Structura terciara

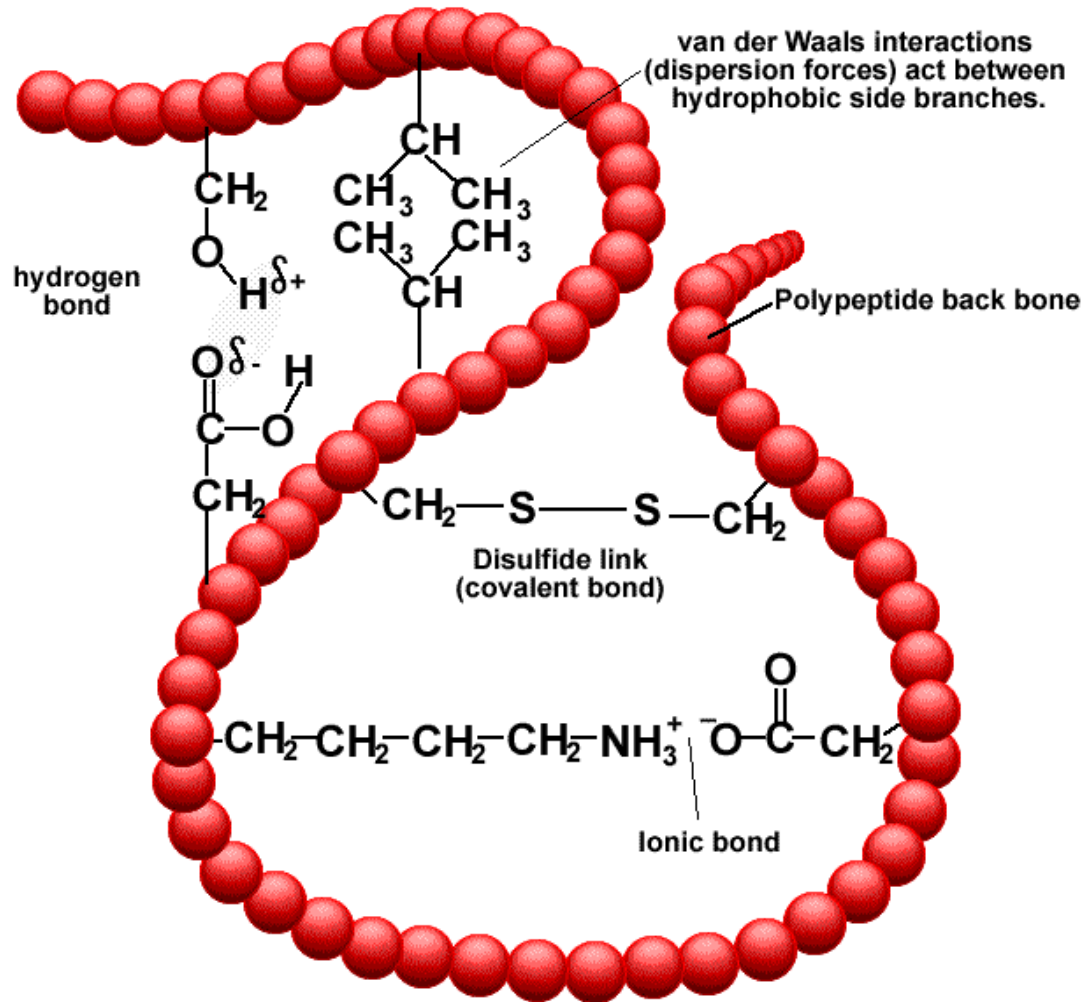


- Este dată de superspiralizarea catenei (catenelor) polipeptidice într-o structură spațială complexă sub formă de ghem (globulă). Superspiralizarea este generată de formarea punților disulfidice între resturi de cisteină aflate în locuri total diferite ale catenei polipeptidice. Majoritatea proteinelor native au o structură spațială compactă determinată de dimensiunile și polaritatea resturilor de aminoacizi precum și de succesiunea acestora în catenele polipeptidice componente.
- Acest nivel de organizare structurală reprezintă rezultatul interacțiunilor dintre resturile aminoacizilor din catenele polipeptidice. Structura terțiară este definită ca fiind forma structurală ce rezultă prin superspiralizarea a două sau mai multe catene polipeptidice ce conțin fragmente α -helicoidale și β -pliate într-o arhitectură spațială complexă sub formă de ghem sau globulă, fiind deci direct dependentă de nivelul primar și secundar de organizare structurală.

Structura terciara



Observație! Dezorganizarea structurii terțiare, care este foarte complexă și variată, determină pierderea proprietăților biologice ale proteinelor!

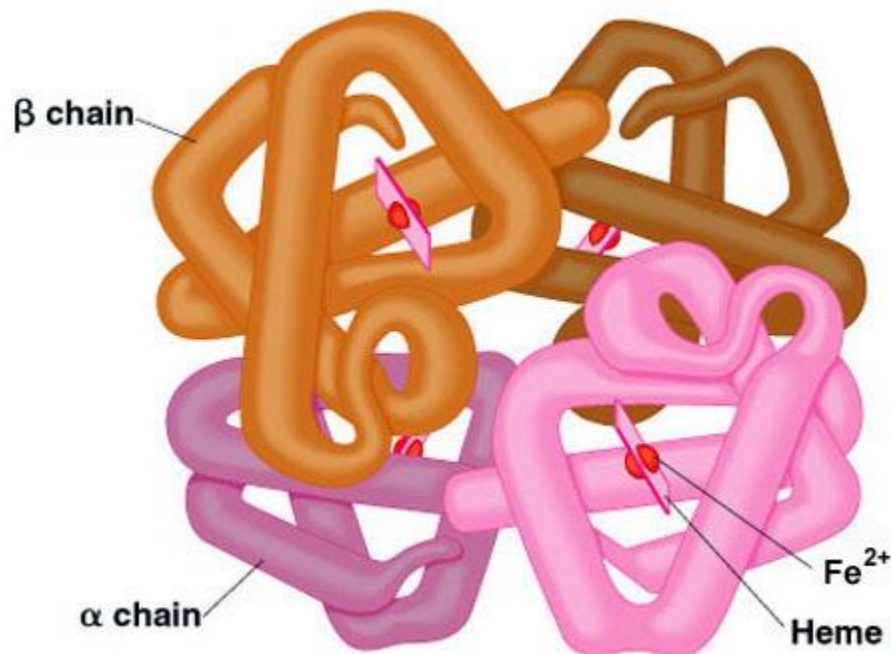


Structura cuaternara

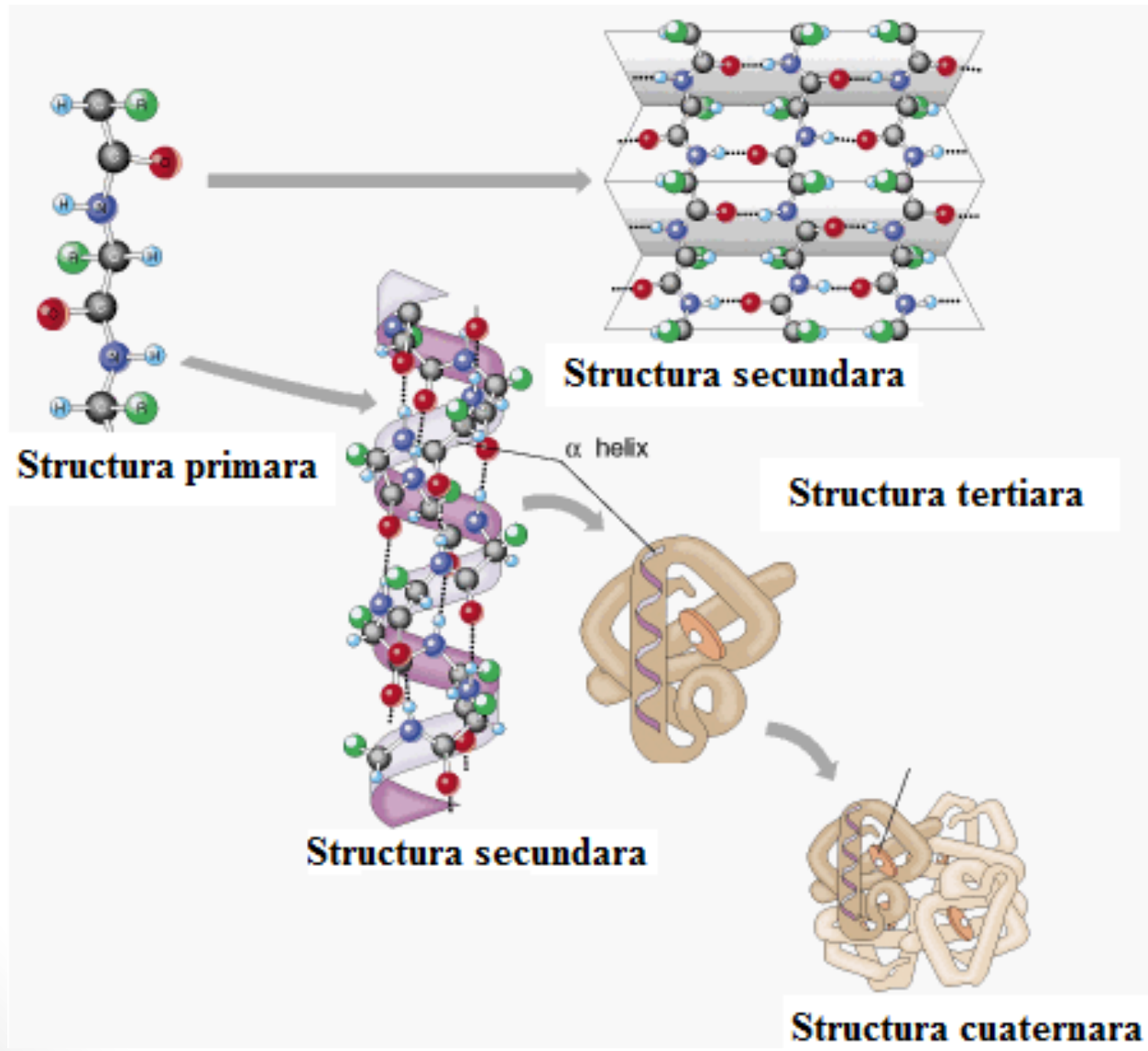


- **Structura cuaternară** este cel mai înalt nivel de organizare structurală. Prin structura cuaternară se înțelege asocierea a două sau mai multe catene polipeptidice (monomeri, protomeri), fiecare cu structura ei primară, secundară și terțiară, într-o arhitectură spațială complexă (oligomeri). Subunitățile componente ale unei macromolecule proteice cu structură cuaternară pot fi separate prin metode specifice, relativ blânde, fără ruperea vreunei legături covalente.
- Stabilizarea structurii cuaternare se realizează prin formarea de interacțiuni între subunități, pe seama grupelor funcționale libere ionizate, grupărilor hidrofobe, grupelor sulfhidrilice etc. Molecula tinde să formeze, atât în interiorul ei cât și cu moleculele solventului, un număr de legături cât mai mare posibil, deci tinde spre un nivel minim al energiei libere și o stabilitate maximă. Pentru majoritatea enzimelor, acest nivel minim de energie este atins spontan și corespunde conformației lor biologice active

Structura cuaternara

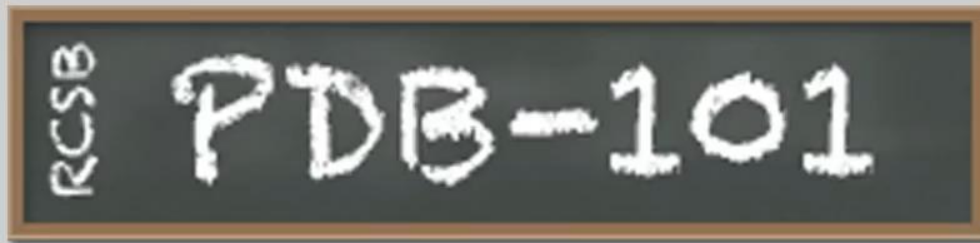


Structura enzimelor



Structura enzimelor

RCSB **PDB**
PROTEIN DATA BANK



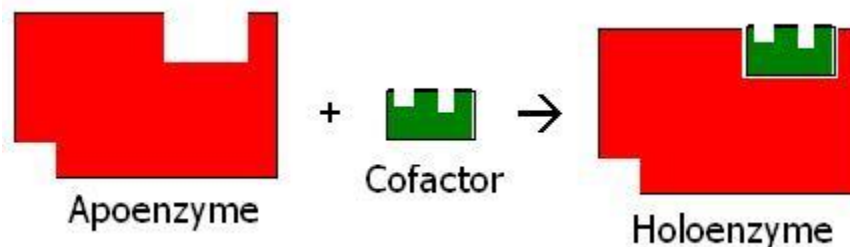
TIPURI DE ENZIME

Holoenzima = Apoenzima

Heteroenzima = Apoenzima + Cofactor

Coenzima
Grupare Prostetica/Ion metalic

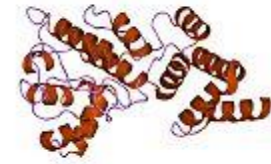
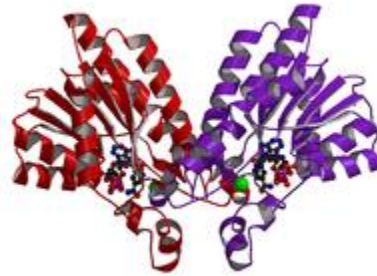
- *enzime monomere* - sunt formate dintr-un singur lanț polipeptidic
- *enzime oligomere* - sunt formate din două sau mai multe lanțuri polipeptidice asociate într-o macromoleculă compactă (structură cuaternară)
- Sisteme multienzimatice



Structura enzimelor

- Apoenzima-enzimă, care devine activă numai la unirea cu anumite substanțe de natură non-proteică;
- Coenzima-sau cofactor - substanță de natură non-proteică, ce-i conferă activitate enzimatică apoenzimei;
- Holoenzima-macromolecula rezultată în urma unirii coenzimei cu o apoenzima.

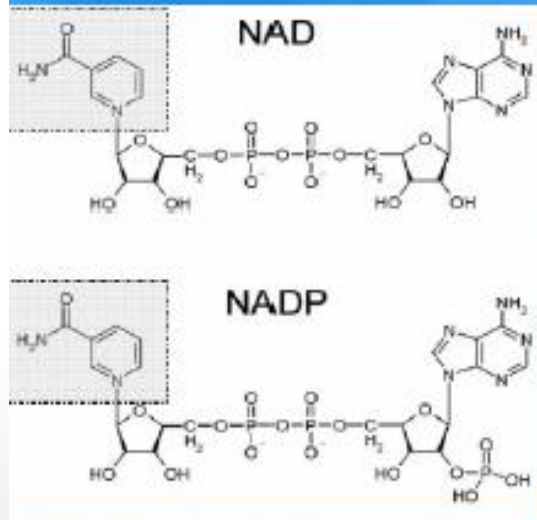
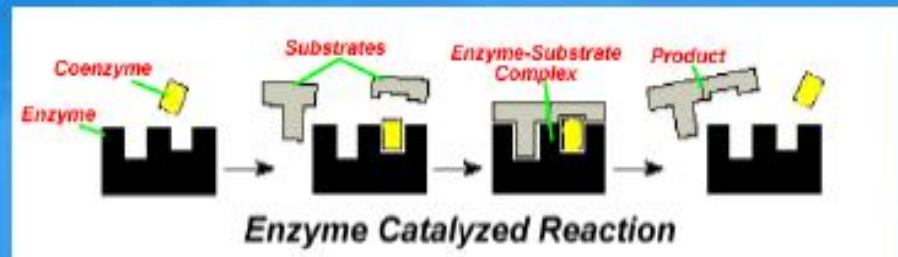
Cofactorul



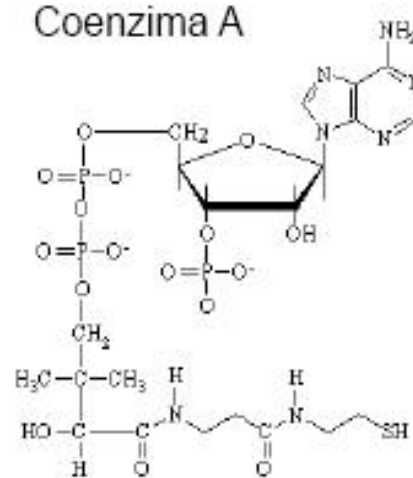
- Organizează spațial molecula enzimei astfel încât centrul activ să acționeze specific asupra substratului.
- Complexul catalitic enzimă-cofactor se numește **haloenzimă**. Cofactorii pot să fie de natură anorganică sau organică (coenzime=factori de creștere)
- Dacă din holoenzimă se îndepărtează cofactorul, proteina rămasă este inactivă din punct de vedere catalitic și se numește **apoenzimă**

Structura enzimelor

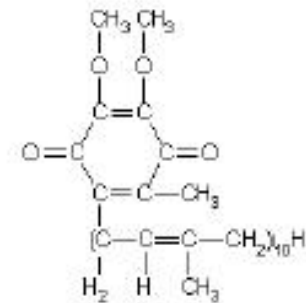
Coenzyme



Coenzima A

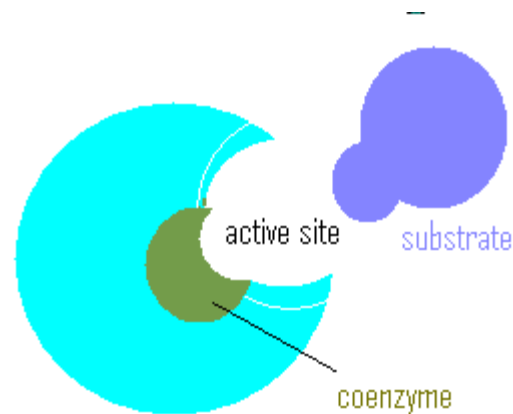


Coenzima Q



Coenzimele

- alcătuiesc o grupă de substanțe extrem de heterogenă structural.
- coenzimele se împart în patru clase principale:
 - coenzime de natură alifatică,
 - coenzime de natură aromatică,
 - coenzime heterociclice și
 - coenzime cu structură nucleozidică și nucleotidică.

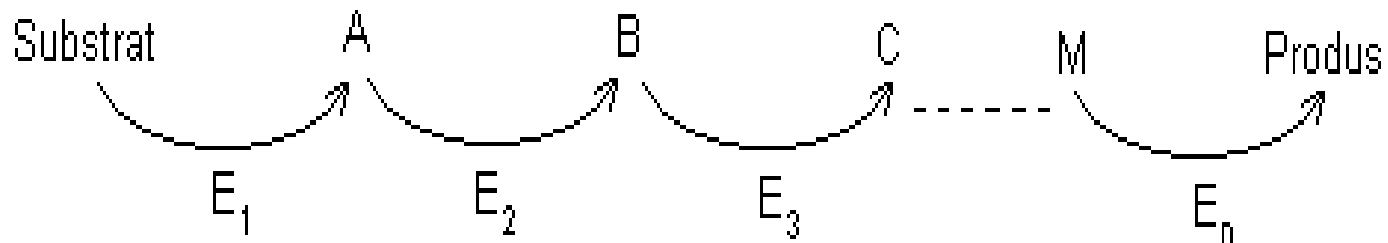


Izoenzime

- Sunt forme moleculare multiple ale unei enzime care catalizează aceeași reacție chimică (prezintă fenomenul de polimorfism). Au originea în aceeași celulă, țesut sau lichid biologic dintr-un organism.
- Chiar dacă izoenzimele manifestă specificitate față de același substrat și activitate catalitică identică, ele au configurații diferite și unele proprietăți fizico-chimice diferite: mobilitate electroforetică, cinetică de reacție, mod de inhibare, pH optim de acțiune, acțiunea asupra substraturilor secundare
- Exemple:
 - *lactat dehidrogenazele (LDH)* - 5 izoenzime
 - *creatinkinaza (CK)* - dimer

Sisteme (complexe) multienzimatice

- se obțin prin asocierea mai multor molecule de enzime prin intermediul legăturilor necovalente, în vederea participării la reacții enzimatic succesive sau cuplate,
- produsul primei reacții enzimatic devine substratul enzimei următoare și așa mai departe, până la obținerea produsului final



unde $E_1, E_2, \dots, E_n$ - enzime; $A, B, C, \dots, M$ - intermediari

Heteroenzima = Apoenzima + Cofactor

Apoenzima fiind proteina are toate nivelurile structurale.

Structura primara este stabila, determinata de secventa aminoacizilor din lantul polipeptidic.

Structura secundara reprezinta procentul de configuratie spatiala α -helix (in special) stabilizat prin legaturi de hidrogen.

Structura terciara se refera la asamblarea formelor elementare in spatiul tridimensional si plierea catenelor polipeptidice. Majoritatea aminoacizilor polari se dispun la exteriorul moleculei, iar aminoacizii nepolari la interior, formand o zona hidrofoaba interna.

Structura cuaternara apare la majoritatea enzimelor care sunt alcatuite din mai multe catene polipeptidice identice (**enzime homomultimerice**) sau diferite (**enzime heteromultimerice**), asocierea protomerilor facandu-se prin legaturi de hidrogen, interactiuni electrostatice, forte Van der Waals.

Ca orice proteina, enzimele **se pot denatura** ca urmare a unor modificari la nivelul structurilor secundara si terciara.

Componenta proteica a enzimelor se caracterizeaza prin urmatoarele:

- este nedializabila si termolabila;
- confera specificitatea de substrat pentru activitatea unei enzime;
- contine situsul catalitic si pe cel la care se leaga efectorii in cazul enzimelor allostेरice;
- determina legarea substratului la situsul catalitic si a efectorilor la alt situs.

Caracteristicile cofactorilor

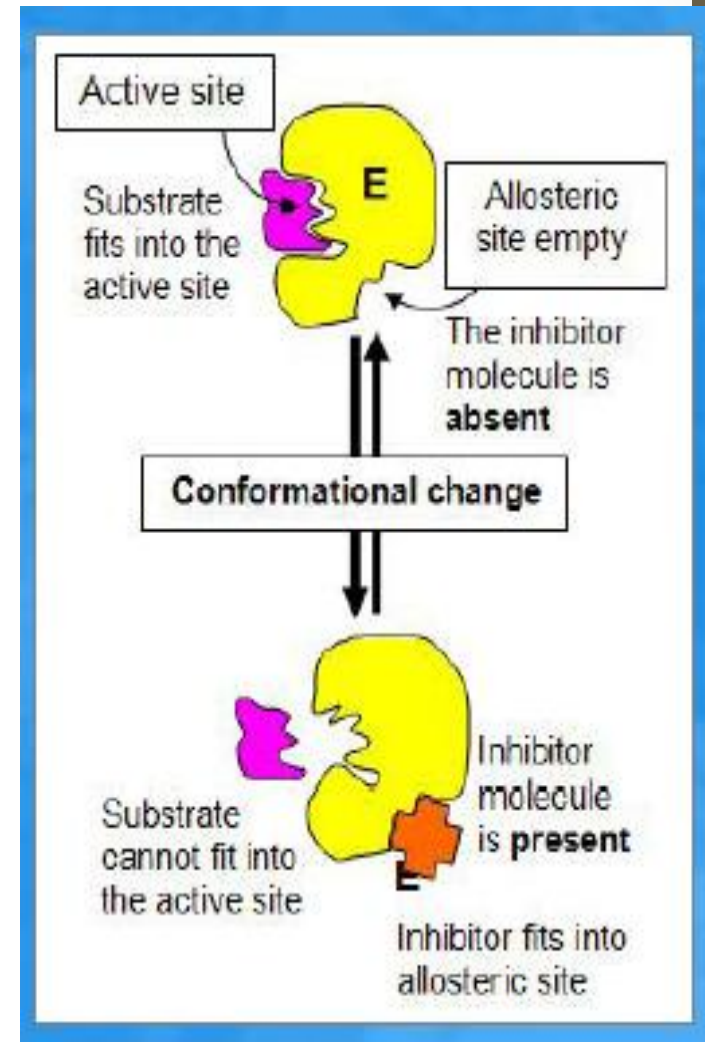
- Cofactorii sunt compusi cu structura chimica variata derivati de la vitamine sau ioni metalici, legati mai labil de partea proteica (**coenzime**) sau fiind intim asociati cu aceasta prin legaturi covalente (**grupe prostetice**). Acestia se caracterizeaza prin urmatoarele:
- sunt termostabili;
- sunt dializabili;
- sunt indispensabili pentru desfasurarea activitatii enzimei;
- confera specificitatea de reactie pentru o enzima;
- intervin in reactie inducand conformatia optima a enzimei, favorizand aranjamentul adecvat reactiei sau transferand electroni sau grupe chimice.

Centrul activ al enzimelor

- Apare sub forma unei despicăături în apoE căptușită cu AA hidrofobi , apa fiind exclusă în mare parte
- Conține și aa polari esențiali în procesul de cataliză
- Pe lângă resturile catalitice aflate în centru activ, care participă direct la transformarea S, apoE conține și așa-numitele resturi de specificitate, unde sunt prezenti aa cu rol în recunoașterea S
- Ex. ribonucleaza scindeaza ARN
- Centrul activ prezinta: resturi catalitice (His 12 si His 119) si resturi de specificitate: intre aa 31-41 exista 5 aa bazici care recunosc ARN cu caracter acid

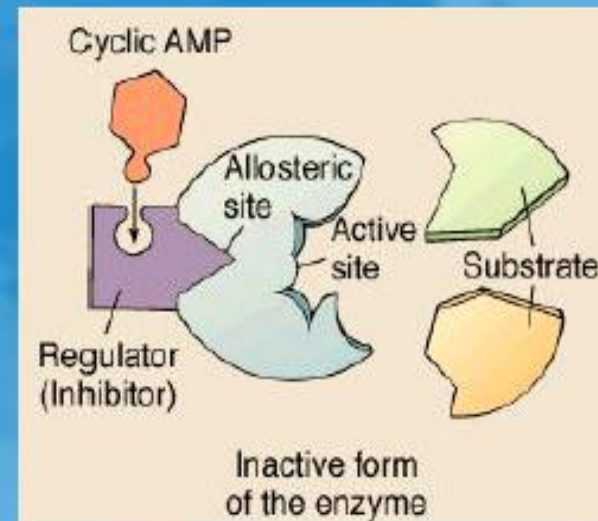
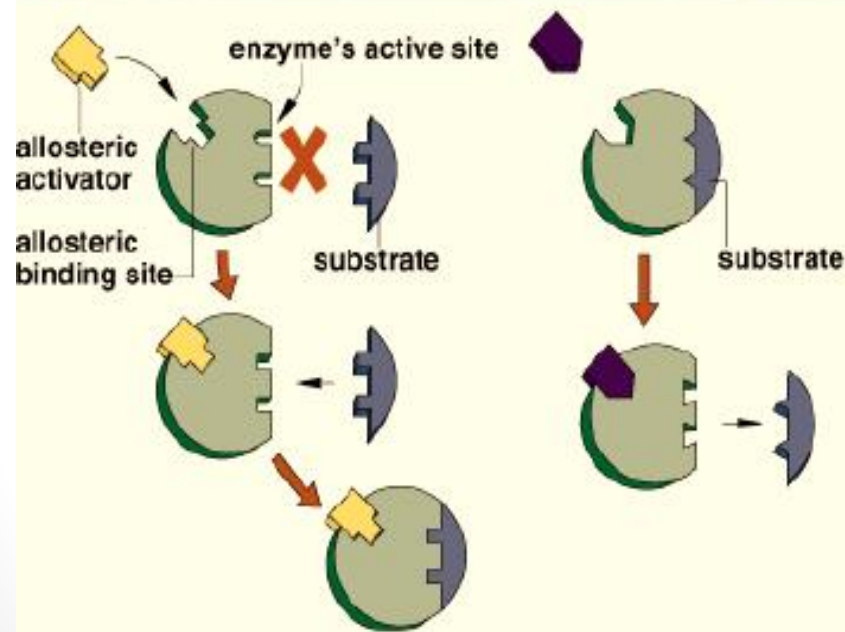
Centrul activ al enzimelor

- Contine: Ser, Cys, His, Tyr, Lys
- Enzimele alosterice contin pe langa centrul activ si centrul alosteric;
- Aici se fixeaza efectorii alosterici care nu intervin direct in cataliza, dar pot influenta procesul catalitic prin modificarea conformatiei spatiale a enzimei



Centrul activ al enzimelor

Situsuri alosterice



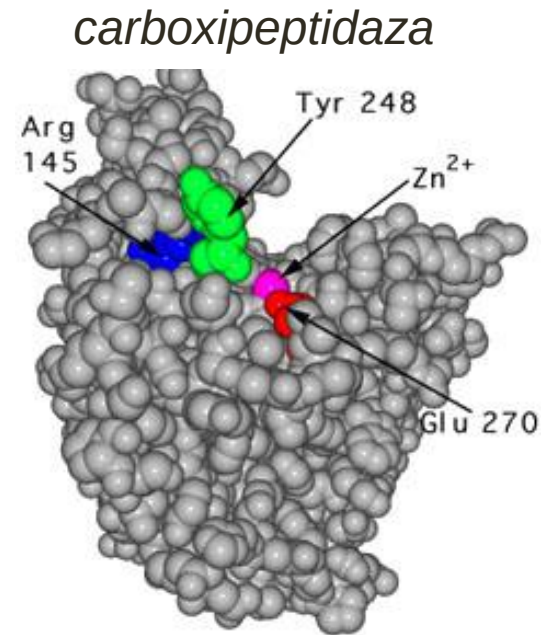
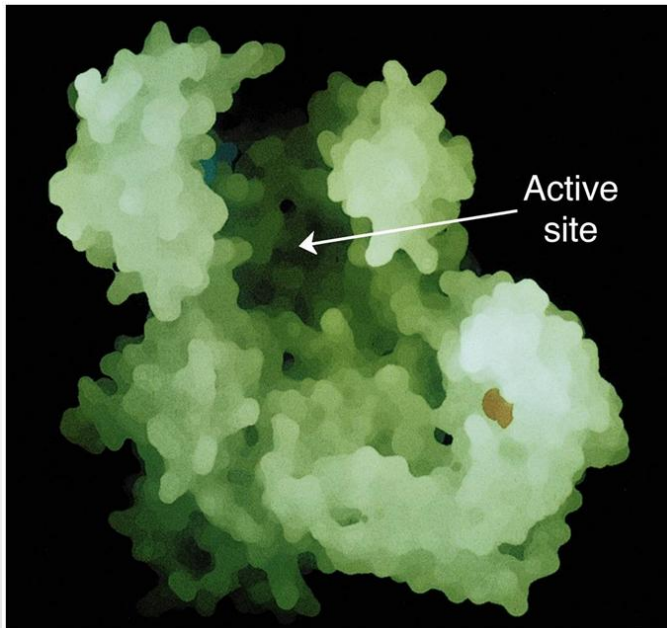
Centrul activ al enzimei

Regiunea care leaga efectiv substratul.

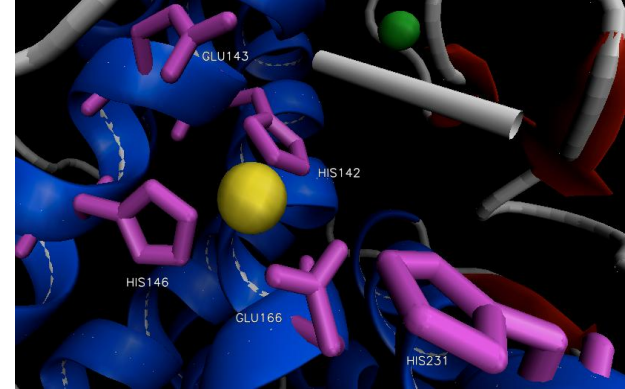
Reprezinta doar o mica parte din enzima.

Este format dintr-o secventa de aminoacizi apartinand unor regiuni diferite ale enzimei.

Formează, de obicei, o despicătură sau un buzunar. Substratul este legat prin multiple interacțiuni slabe.

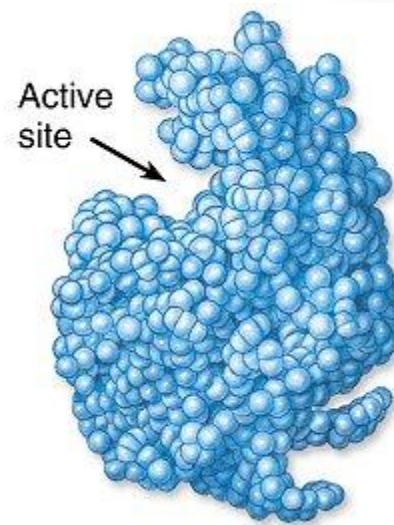
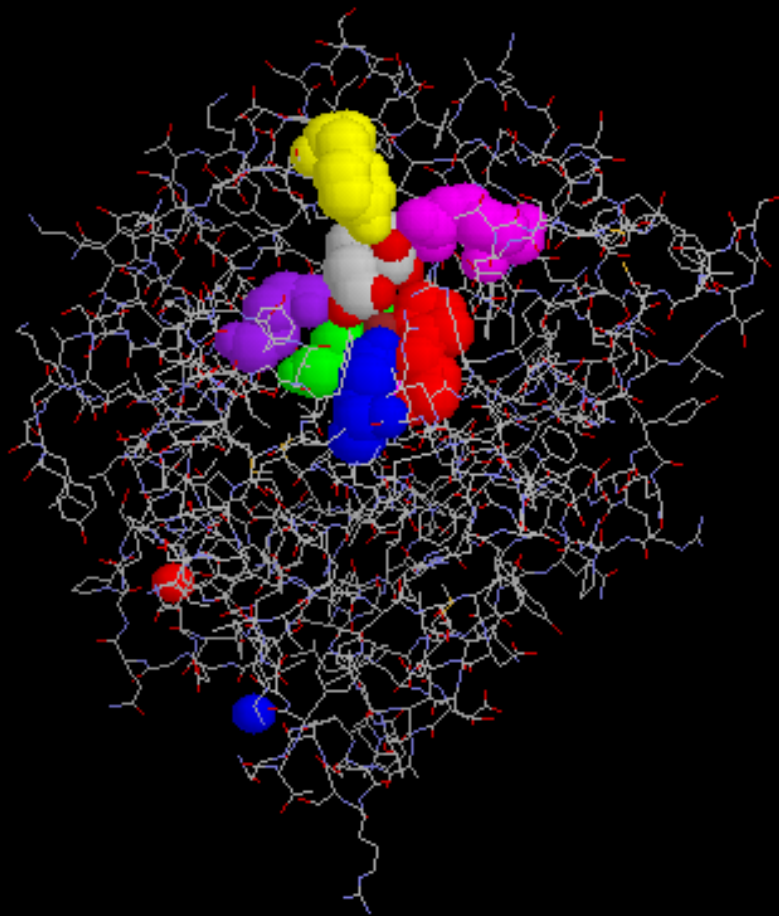


Centrul activ al enzimei

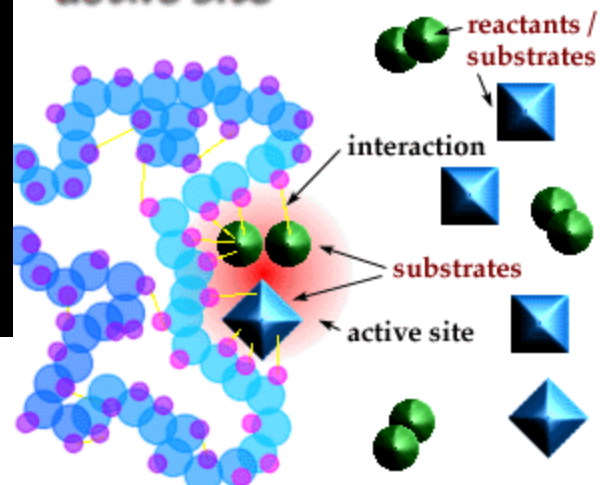


În funcție de rolul jucat în procesul catalitic, resturile de aminoacizi ce alcătuiesc catenele polipeptidice ale enzimelor monocomponente, precum și cele ale apoenzimelor enzimelor bicomponente pot fi clasificate în mai multe grupe astfel:

- **grupări de contact** reprezentate de acele resturi de aminoacizi implicate direct atât în fixarea substratului în vederea formării complexului enzimă-substrat (ES) cât și în realizarea actului catalitic. Aceste resturi sunt localizate în catenele polipeptidice în zone diferite dar, prin formarea structurilor de ordin superior, devin vecine;
- **grupări conformaționale**, adică acele resturi de aminoacizi care nu fac parte din centrul activ, nefiind deci implicate direct în procesul catalitic, dar care asigură o conformație spațială caracteristică fiecărei enzime, absolut necesară realizării procesului catalitic;
- **grupări auxiliare** sunt reprezentate de resturile de aminoacizi cu anumite proprietăți fizico-chimice (de exemplu hidrophile sau hidrofobe), proprietăți ce joacă un anumit rol în cataliză deși nu participă direct în legarea substratului;
- **grupări indiferente** reprezentate de ceilalți aminoacizi care nu participă în nici un fel la realizarea procesului catalitic, ele putând fi clivate sau înlocuite fără pierderea activității enzimatică. Deși se numesc indiferente, aceste grupări conferă totuși enzimelor anumite proprietăți (solubilitate, stabilitate etc.) care facilitează acțiunea enzimei asupra substratului, atât *in vivo* cât și *in vitro*.

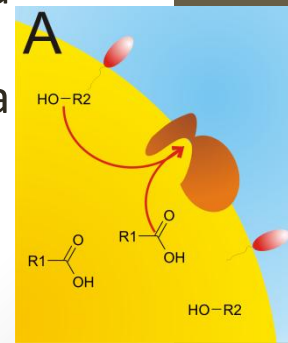


Enzymes active site



În vederea formării complexului Michaelis, între enzimă și substratul său pot lua naștere următoarele tipuri de legături:

- **legături coordinative** care apar în complexii metaloenzimelor. Ele se realizează prin punerea în comun a electronilor neparticipanți ai atomilor de oxigen și azot din apoenzimă și reprezintă cele mai puternice legături ce se pot forma între enzimă și substrat;
- **legături de hidrogen** care se formează între atomii de hidrogen și atomii cu caracter electronegativ, în special cei de oxigen și azot. În general, în timpul formării complexului Michaelis ia naștere un număr relativ mare de punți de hidrogen;
- **atracții electrostatice** care iau naștere datorită existenței unei grupe funcționale libere ce ionizează la pH fiziologic. Un rol important în realizarea acestor interacțiuni îl joacă, în primul rând, grupările aminice libere ale resturilor de lizină și arginină și grupările carboxilice ale resturilor acizilor aspartic și glutamic;
- **interacțiunile hidrofobe** au loc cu precădere în cazul substratelor cu caracter hidrofob, iar apoenzimele participă în formarea acestor interacțiuni prin resturile aminoacizilor aromatici sau alifatici cu catenă lungă;
- **transferul de sarcină** se realizează atunci când substratul și enzima posedă structuri bogate și respectiv sărace în electroni.

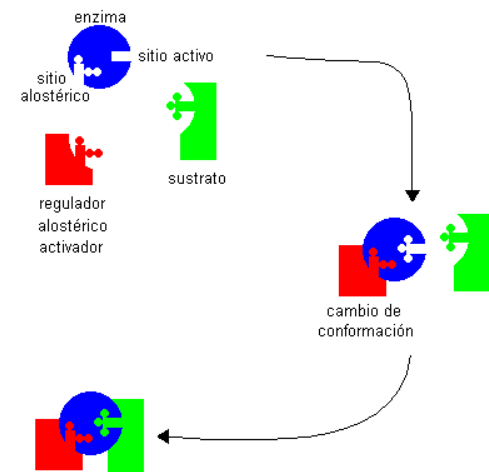
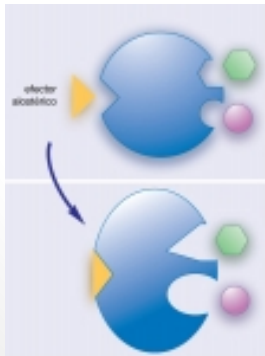


Suport video

- <https://www.youtube.com/watch?v=LKiXfqaWNHI>

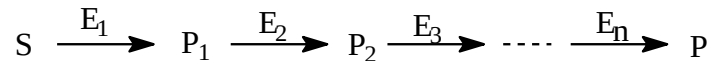
Centrul alosteric. Enzime alosterice

- Unele enzime posedă și un alt centru (sau alte centre) decat cel activ numit centru alosteric (allo stereos –alt loc)
- Centrul alosteric are o poziție spațială pentru fixarea metabolitului reglator, numit efector sau modulator
- Modulatorii se fixează necovalent și pot fi: activatori sau inhibitori
- Enzimele cu centrul alosteric se numesc enzime alosterice sau reglatoare
- La fixarea modulatorului, enzimele alosterice își modifică conformația. Modulatorii accelerează sau inhibă utilizarea substratului de enzima respectivă.

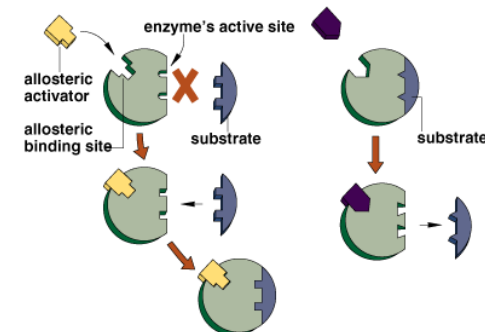


Efactorii alosterici

- Inițial, termenul de **alosterie** era atribuit fenomenului de modificare a conformației unei enzime ca urmare a interacțiunii sale cu o anumită substanță, legarea acesteia având loc într-o zonă diferită de situsul activ.
- Transformări le *in vivo* nu sunt de obicei formate dintr-o singură reacție enzimatică ci reprezintă succesiuni de reacții care alcătuiesc o așa-numită **cale** sau **secvență metabolică**:



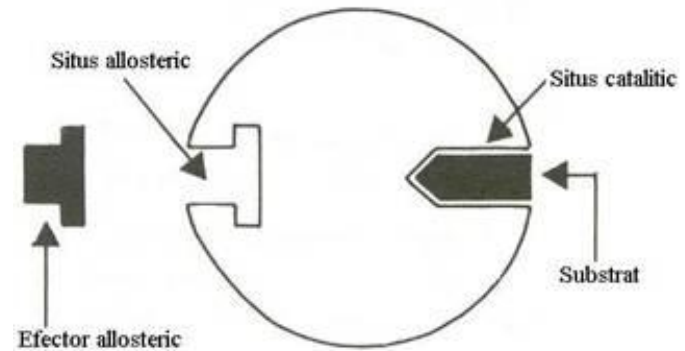
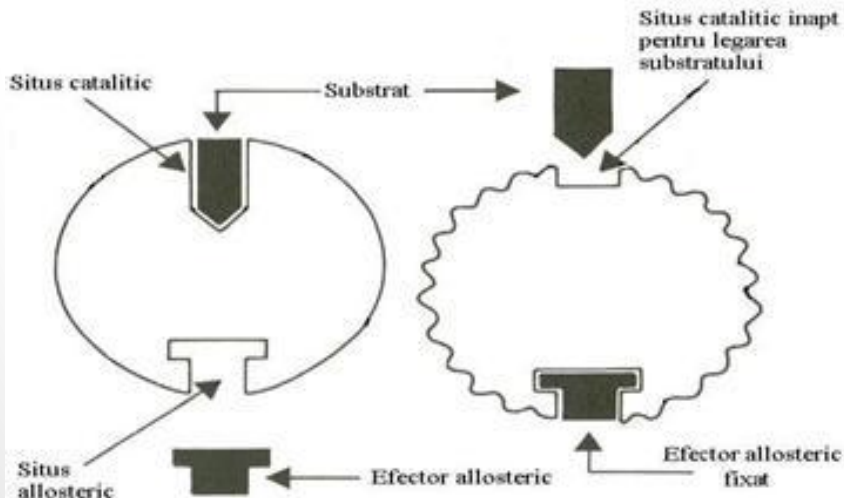
- În aceste secvențe, produsul reacției ce are loc sub acțiunea enzimei E_1 reprezintă substratul enzimei E_2 ș.a.m.d., iar produsul final P este considerat produsul căii metabolice date. În desfășurarea acestor transformări, dacă produsul final **P se acumulează într-o cantitate mai mare decât cea fiziologic normală, el inhibă activitatea enzimei E_1** care declanșează secvența metabolică respectivă, în așa fel încât întreaga cale este stopată.
- Acest tip de inhibiție diferă total de celelalte forme de inhibiție și poartă numele de **retroinhibiție** sau **inhibiție de tip feed back**. Ea are loc în urma interacțiunii produsului final P cu o anumită zonă din geometria enzimei E_1 distinctă de centrul activ, zonă numită **centru alosteric**. În urma acestor interacțiuni este modificată conformația moleculei de protein-enzimă, deci și a centrului său activ, cu repercusiuni asupra capacității catalitice.



Centrul alosteric. Enzime alosterice

- Studiul enzimelor alosterice a demonstrat că ele prezintă unele proprietăți comune:
 - prezintă structură cuaternară;
 - nu respectă, de regulă, cinetica Michaelis-Menten (sunt **enzime nemichaeliene**);
 - pot suferi modificări conformaționale fără pierderea activității catalitice, aceste modificări fiind detectabile prin măsurători fizice sau cinetice;
 - joacă, în general, un rol de reglare a metabolismului, în special în căile de biosinteză.

Enzimele alosterice prezintă două situsuri: **situsul catalitic** la care se leagă substratul și **situsul alosteric** la care se leagă efectorul alosteric, activator sau inhibitor



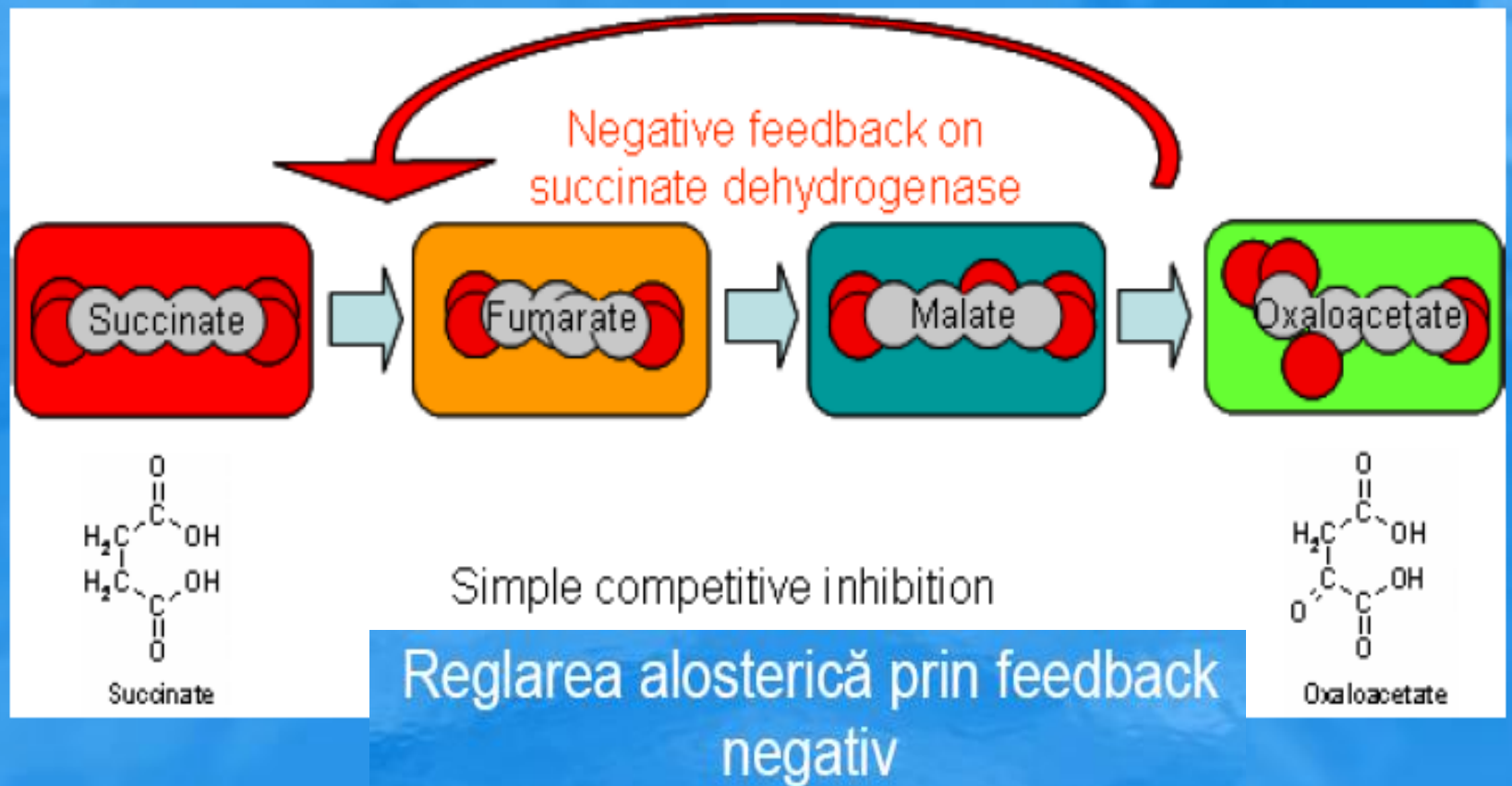
Enzime alosterice. Efectori alosterici

- Sunt proteine oligomere alcatuite din mai multe subunitati identice sau diferite, in numar par
- Reactiile catalizate sunt endergonice si ireversibile; imprima sensul unic al cailor metabolice din care fac parte
- Intervin in prima etapa a unui lant de reactii, asigurand controlul intensitatii procesului si ireversibilitatea lui
- Fiecare monomer poseda un centru activ; fixarea S pe una din subunitati influenteaza legarea lui pe celelalte prin fenomenul de cooperativitate

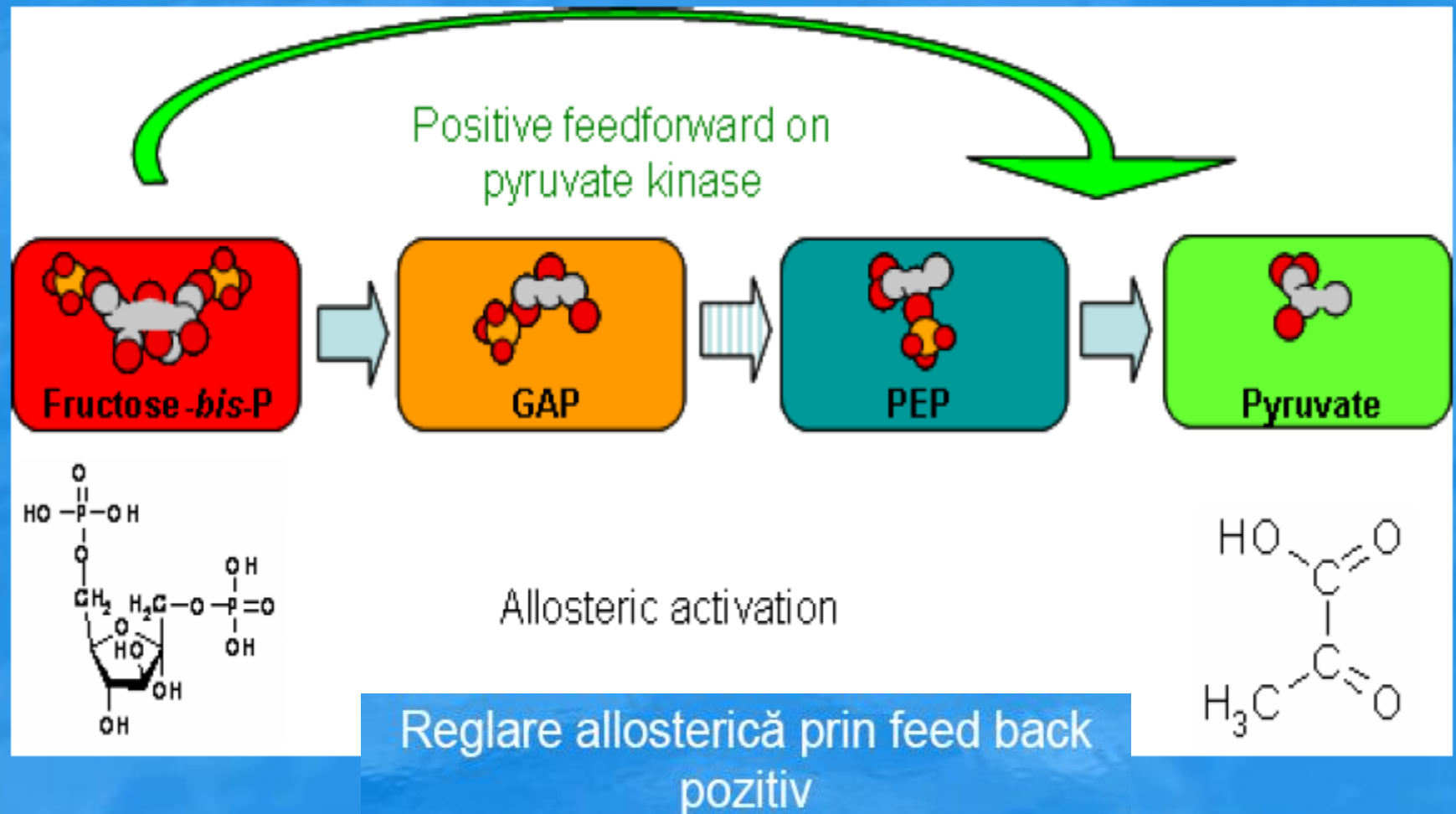
Enzime alosterice. Efectori alosterici

- Pe langa centri activi, monomerii prezinta si centri alosterici de care se vor lega efectorii alosterici
- Efectorii alosterici sunt compusi cu masa moleculara mica, fara analogie cu S si care activeaza reactiile enzimatice (efectori pozitivi) sau le inhiba (efectori negativi)
- Efectorii alosterici sunt prezenti la locul de actiune al E variind doar concentratia lor
- Enzimele alosterice sunt inhibate de produsul de reactie prin retroinhibitie sau inhibitie feedback

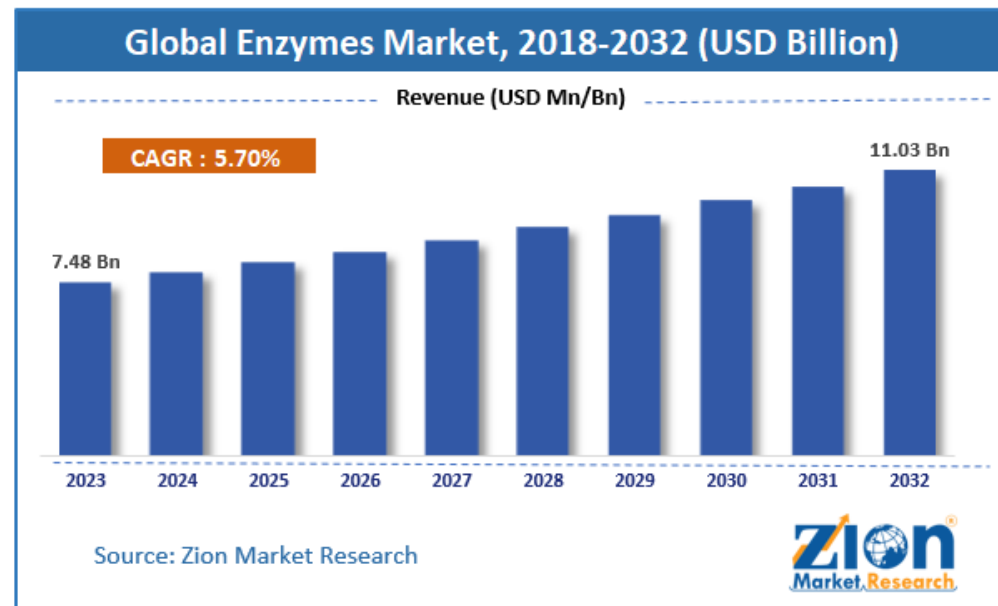
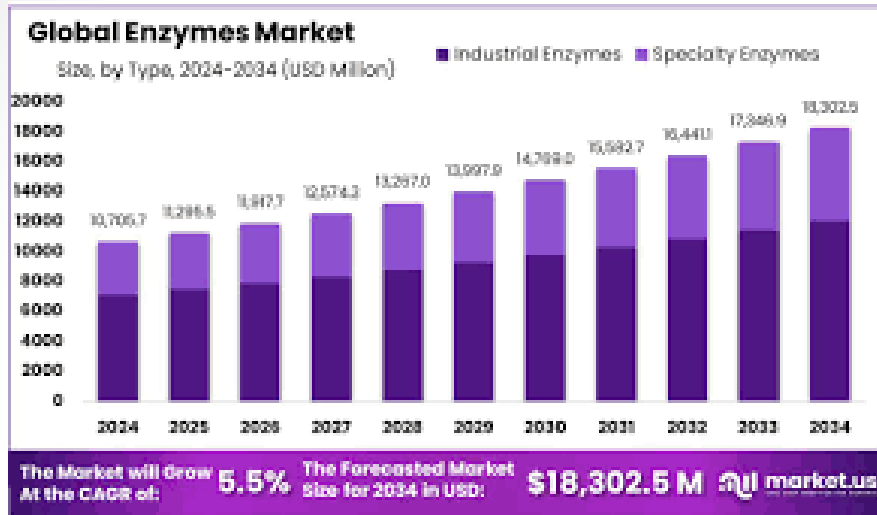
Reglarea activitatii enzimatice



Reglarea activitatii enzimaticе

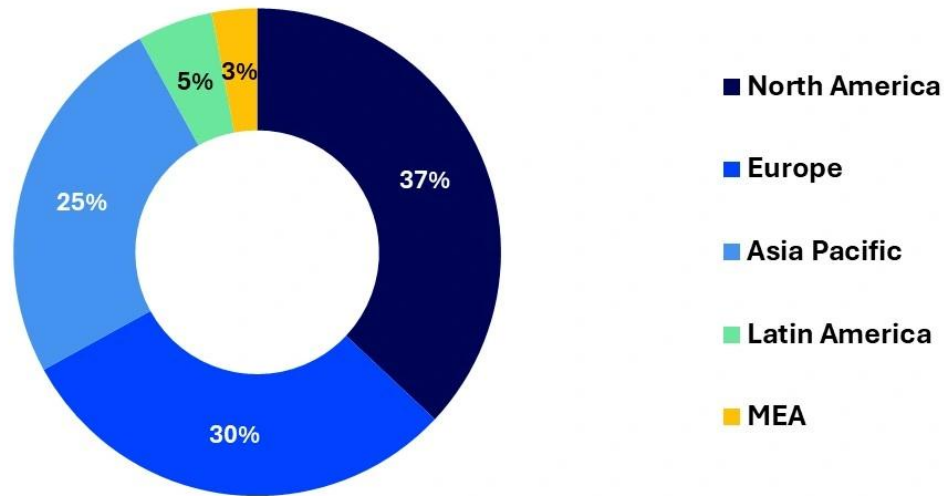


Piata de desfacere enzime



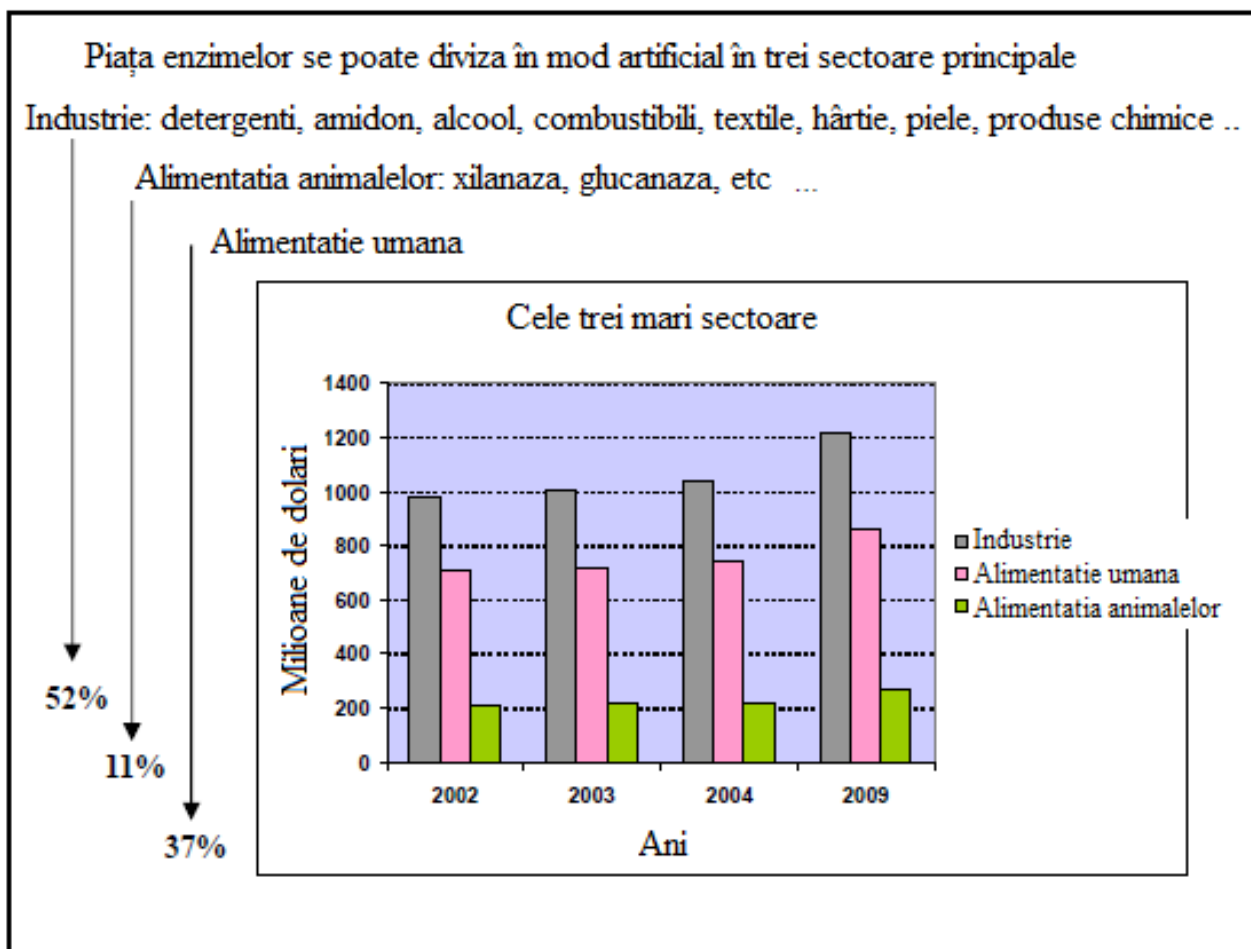
Comercializare enzyme

Industrial Enzymes Market Share, By Region, 2024 (%)



Source: <https://www.precedenceresearch.com/industrial-enzymes-market>

Utilizari pe domenii



Factori care influenteaza metodele utilizate la izolarea și purificarea enzimelor

- Metodele utilizate la izolarea și purificarea enzimelor sunt comune cu cele utilizate în studiul proteinelor în general.
- Spre deosebire însă de proteinele necatalitice, **în cazul enzimelor trebuie evitată nu numai denaturarea ci și inactivarea lor.**
- Principalii factori ce **inactivează enzimele în timpul acestor proceduri sunt:**
 - **temperatura și**
 - **pH-ul mediului.**

În afara temperaturilor ridicate și a valorilor extreme de pH, enzimele sunt puternic afectate și de **modificările bruște ale acestor factori.**

- **modificarea tăriei ionice a mediului are influență** asupra capacității catalitice a enzimelor prin afectarea structurii chimice a biocatalizatorului.
- prezența în mediu, chiar în concentrații mici, a **inhibitorilor și activatorilor influențează capacitatea catalitică a enzimelor.**
- Un factor extern ce poate influența puternic activitatea enzimelor îl reprezintă contaminarea microbiană, motiv pentru care operațiunile de separare și purificare trebuie efectuate cât mai repede posibil.

Obținerea enzimelor

Din punctul de vedere al localizării lor, enzimele se clasifică în două grupe principale:

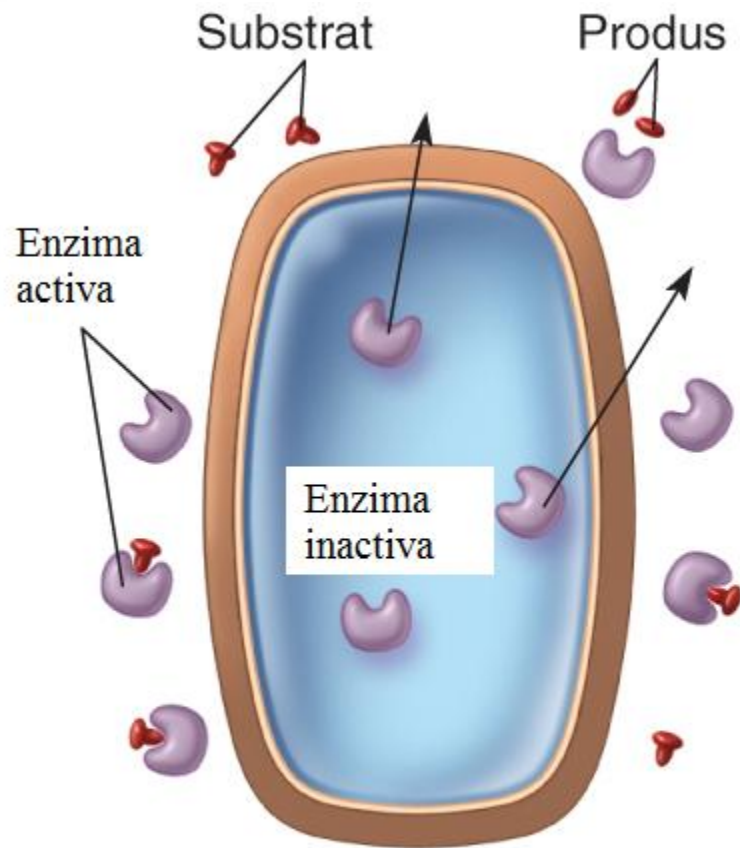
a) **enzime solubilizate** în diferite lichide biologice (sânge, lichid cerebrospinal, lichid interstițial, salivă, citoplasmă, mediu de cultură pentru microorganisme, sevă etc.);

b) **enzime fixate** pe diferite structuri tisulare și subcelulare. În acest din urmă caz, multe enzime sunt puternic legate de diferite componente ale membranelor biologice, făcând parte din structura lor.

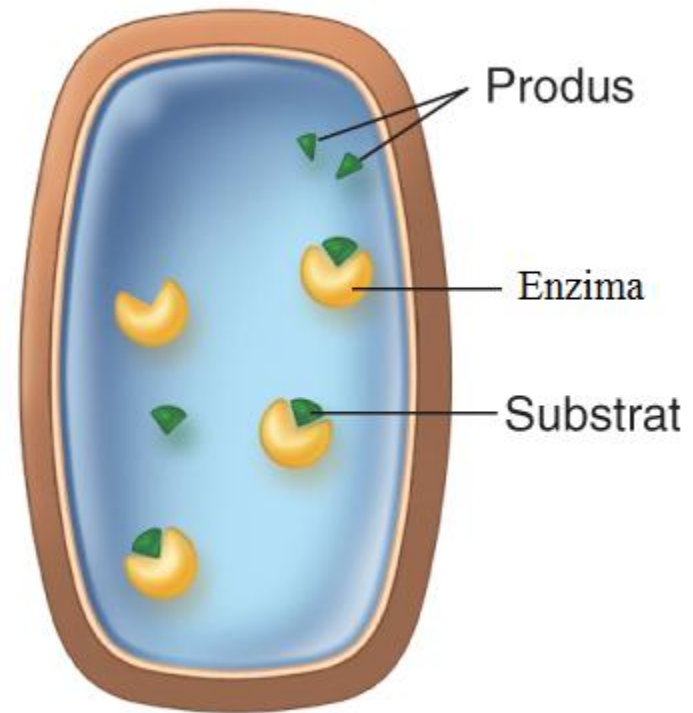
Alegerea sursei optime pentru izolarea și purificarea unei enzime date se face în funcție de mai multe criterii (Localizarea enzimelor în organe, sursa trebuie să conțină cantitatea maximă de enzimă).



Tipuri de enzime

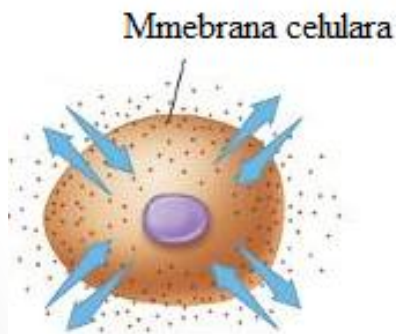
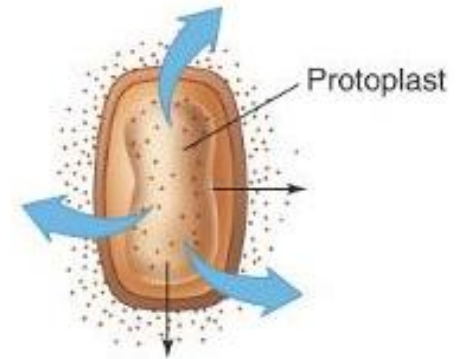
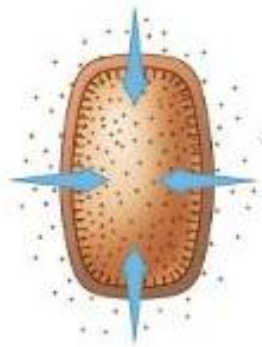
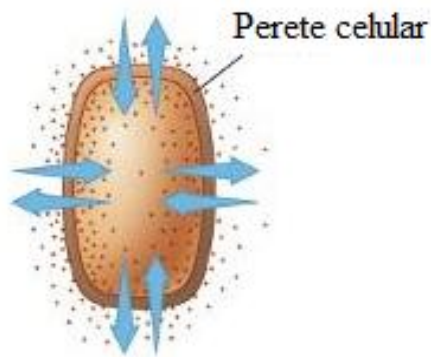


Enzyme solubilizate

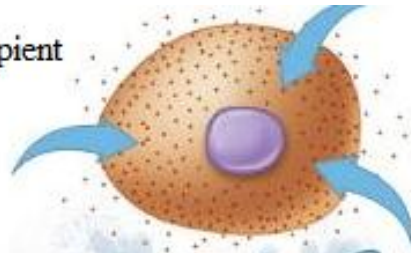


Enzyme fixate

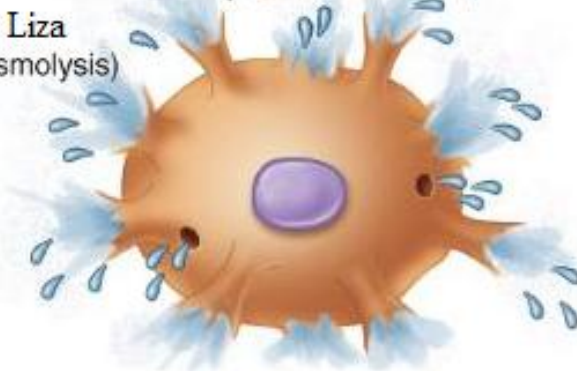
Liza celulara (celule integre si fara perete celular)



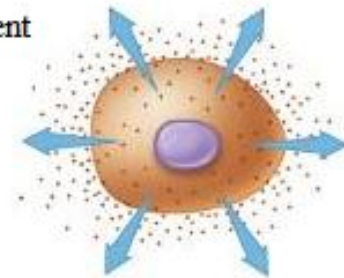
Stadiu incipient



Liza
(osmolysis)



Stadiu incipient



Liza



Enzime indicator

Intr-un țesut localizarea unor enzime este diferită, iar în fiecare celulă enzimele sunt localizate preponderent sau exclusiv în anumite organite celulare, prima operațiune a tehnicilor de izolare o constituie omogenizarea țesutului și separarea formațiunilor subcelulare respective prin centrifugare diferențiată. Deși majoritatea enzimelor se întâlnesc în mai multe organite subcelulare, țesuturi, organe și respectiv lichide biologice, există enzime localizate exclusiv într-o formațiune subcelulară fiind **enzime indicator** pentru fracțiunea subcelulară respectivă. Principalele enzime indicator sunt următoarele:

a) **nuclee:**

- ARN-polimeraza ADN-dependentă;
- ATP : NMN-adenoziltransferaza.

b) **mitocondrii:**

- monoamin-oxidaza;
- adenilat-kinaza;
- componentele catenei respiratorii.

c) **peroxisomi:**

- catalazele;
- D-aminoacid-oxidazele;
- peroxidazele.

d) **lisosomi:**

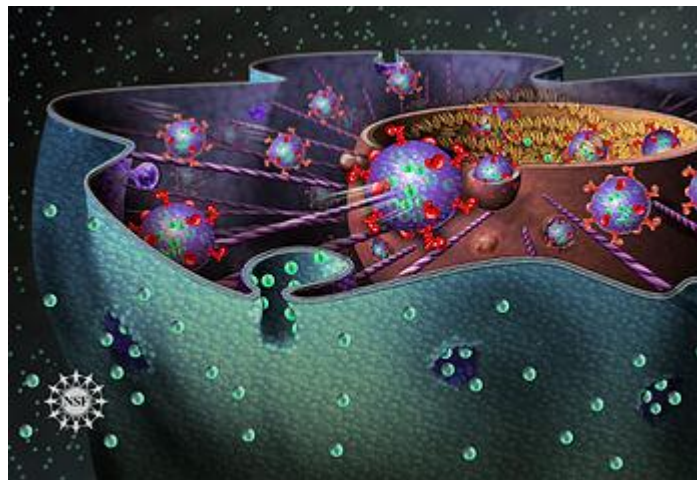
- fosfomonoesteraza acidă;
- catepsinele.

e) **microsomi:**

- oxidaze NADPH-dependente;
- citocrom b_3 -reductaza.

f) **citotosol:**

- aminoacil-ARN_t-sintetazele;
- acil-CoA-sintetazele;
- transcetolaza;
- fosfofructokinaza.

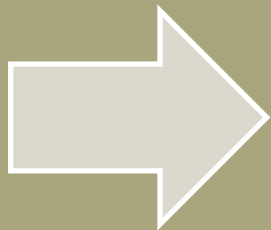


Criterii pentru alegerea sursei optime pentru izolarea și purificarea unei enzime

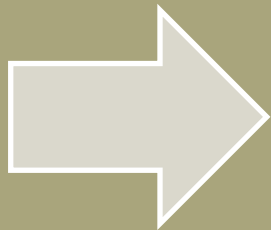
Strategia de alegere a unui material biologic pentru extragerea unei enzime utilizabile în diferite scopuri sau pentru studiul ei este necesar să se țină cont de o serie de factori cum sunt:

- abundența enzime;
- disponibilitatea și prețul de cost;
- localizarea enzimei;
- caracterizarea sursei.

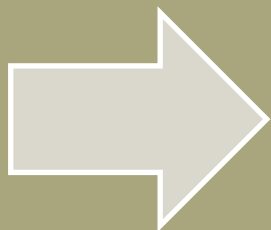
Pentru alegerea unei metode de obtinere a unei enzime trebuie aleasa sursa care raspunde cel mai bine cerintelor de izolare cu o



activitate catalitica maxima adica enzima prezenta sa nu fie degradata sau inactivata



puritate maxima posibila adica nu trebuie sa contina alte enzime sau molecule mari



randament maxim posibil rezultat din procentul de activitate recuperata comparativ cu activitatea extractului original.

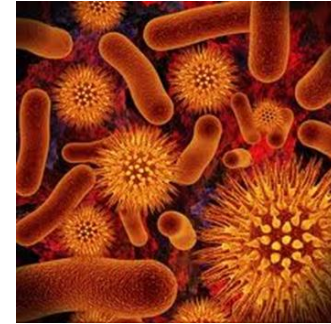
Metoda	Principiul de baza
Metode blande	
Liza celulara	Ruperea osmotica a membranei celulare
Liza enzimatica	Ruperea peretilor celulari; eliberarea continutului celular in mediu.
Omogenizator Potter- Elvehjem	Celulele sunt dezintegrate intr-un spatiu ingust existent intre piston si peretii de sticla; membranele celulare sunt rupte datorita fortelor care apar;
Metode moderate	
Omogenizator cu cutite (Warning blender)	Membranele sunt taiate cu ajutorul unor lame care se rotesc
Mojarare in prezenta de nisip, alumina sau perle de sticla	Membranele sunt indepartate prin actiunea abraziva a particulelor de nisip sau alumina
Metode severe	
Presare (French press)	Celulele sunt fortate sa treaca prin orificii mici la presiuni foarte mari astfel incat fortele de rupere afecteaza integritatea membranelor
Decompresiune exploziva	Celulele sunt echilibrate cu un gaz inert la presiune mare, ceea ce determina ruperea membranelor si eliberarea continutului celular
Macinare cu bile (bead mill)	Vibratiile rapide realizate cu ajutorul perlelor de sticla conduc la indepartarea peretilor celulari
Ultrasonicare	Tratarea suspensiilor celulare cu frecvente sonice determina ruperea membranelor
Inghet-dezghet repetat	Ruperea legaturilor de hidrogen si a celor hidrofobe realizate intre enzime si alte componente precum si a membranelor ca urmare a inghetarii apei.

Obtinere de enzime



Origine:

- animală,
- vegetală sau
- majoritar microbiana



- 80% din enzimele industriale sunt hidrolaze utilizate pentru depolimerizarea substanțelor naturale (amidon, glicogen, etc). Dintre acestea:

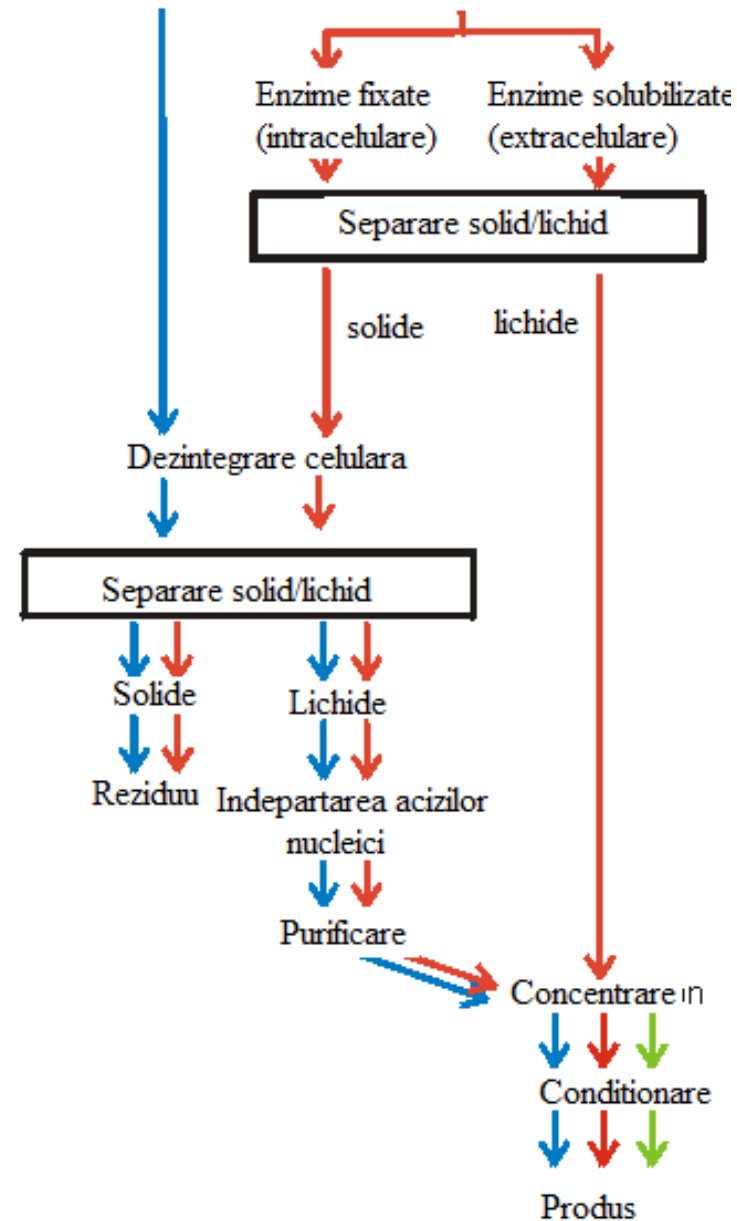
- 60% proteaze, utilizate pentru detergenți, produse lactate
- 30% carbohidrataze: panificație, alcool, amidon, textile ..
- 10% enzime utilizate în chimie analitică, farmacie, sinteză ...

În procesul de obținere al unei enzime dificultățile ridicate se datorează faptului că există cantități foarte mici de enzime disponibile: între 0.01 la 1%

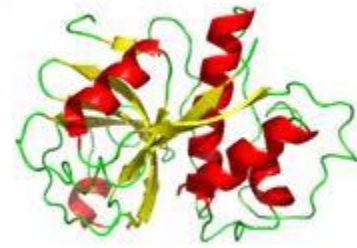
Enzimele industriale sunt slab purificate

Celule vegetale
Organe animale

Fermentatie
microbiana



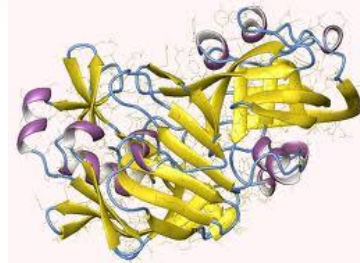
Obtinere de enzime vegetale



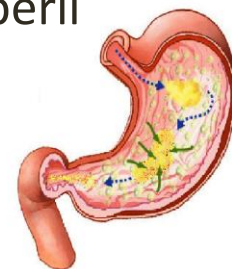
- Papaina
 - este sintetizată de o plantă din zonele tropicale (*Carica papaya*)
 - este o enzimă tiolică ce conține 211 resturi de aminoacizi și are o masă moleculară de 23 kD. Temperatura optimă de acțiune se situează între 55 – 60°C, enzima având o termostabilitate crescută (denaturarea termică se observă abia la 65 – 70°C), iar pH-ul optim se înscrie în domeniul de pH 5,0 – 7,0 ceea ce facilitează utilizarea sa în diferite procese biotehnologice.
 - pentru obținerea industrială a papainei pure se recoltează latex-ul care se depozitează la rece (+4°C). Pentru înlăturarea impurităților se diluează cu apă distilată, se agită și se centrifughează sau se filtrează pe kiesselguhr, după care se liofilizează sub vid la 50°C.
 - din cele aproximativ 300 de tone cât este consumul anual, aproximativ 75% reprezintă consumul în industria berii, 10% în industria cărnii, 5% în fabricarea hidrolizatorilor de pește și capuri de pasăre pentru nutriția animalelor, 2% în industria chimico-farmaceutică etc. Preparatele de papaină imobilizată se folosesc la hidroliza latex-ului de arahide, hidrolizatele obținute utilizându-se la stabilizarea fizico-chimică a sucurilor de struguri și mere.



Enzimele de origine animală



- în prezent, dintre enzimele de origine animală, cea mai mare importanță pentru industrie o prezintă **pepsina** porcină și bovină. Pepsina bovină este un constituent normal al cheagului, secreția sa fiind abundentă după înțărare.
- pentru obținerea sa se utilizează mucoasa gastrică de porc unde pepsina se găsește sub forma precursorului său inactiv numit **pepsinogen**. Pentru obținerea pepsinei se pot utiliza mai multe metode, cea mai des folosită fiind extracția, din mucoasa raclată, cu apă distilată acidulată cu acid clorhidric în prezență de cloroform. După filtrare se concentrează prin liofilizare, obținându-se o pulbere albă, solubilă în apă
- activitatea catalitică este considerabilă în intervalul de pH 1,0 – 4,0 cu un pH optim de acțiune de 1,8 dar care poate însă oscila în funcție de natura substratului. La temperaturi mai mari de 55°C pepsina aflată în soluție apoasă este termolabilă
- pepsina se folosește în industria băuturilor răcoritoare, în industria berii la stabilizarea coloidală în timpul pasteurizării



Enzimele de origine microbiană



Obținerea enzimelor de origine microbiană a luat o amploare deosebită după clarificarea mecanismelor de biosinteză a enzimelor de către microorganisme. Spre deosebire de sursele de origine vegetală și animală, folosirea surselor microbiene de enzime prezintă unele avantaje majore:

- producția de enzime de natură microbiană **nu depinde de condițiile climaterice și geografice**;
- se utilizează **materii prime regenerabile** ce pot fi reprezentate deseori de deșeuri din alte industrii;
- **randamentele pot fi mărite** prin optimizarea condițiilor de cultivare și prin alegerea de tulpini microbiene performante.

Toate aceste avantaje au făcut ca producția mondială de enzime de origine microbiană să cunoască o dezvoltare importantă în ultimele decenii, pentru obținerea lor fiind necesară parcurgerea mai multor etape obligatorii.

Stabilirea enzimei ce urmează a fi obținută

- În obținerea unei enzime de uz industrial se ține cont, în primul rând, de procesele de biotransformare în care va fi utilizată enzima respectivă. Este absolut obligatorie determinarea principalelor caracteristici ale enzimei în cauză, cele mai importante fiind următoarele:
 - **Specificitatea de acțiune.** Din acest punct de vedere o problemă extrem de importantă o constituie activitatea globală a preparatelor enzimatiche comerciale dată fiind probabilitatea existenței și altor capacități catalitice pe lângă cea principală, activități ce pot realiza transformări indezirabile.
 - **pH-ul optim de acțiune.** Acest factor poate manifesta o influență hotărâtoare asupra bunei desfășurări a proceselor biotehnologice realizate de enzime. În general, se aleg enzime ce își mențin activitatea catalitică într-un interval cât mai larg posibil de pH.
 - **Temperatura optimă de acțiune.** În general, în industrie sunt preferate enzimele a căror temperatură optimă de acțiune este cât mai mare posibil deoarece la temperaturi relativ crescute este facilitată menținerea sterilității mediului.

Etapele procesului de obtinere a enzimelor microbiene

Alegerea tulpinii microbiene

Tulpinile microbiene producătoare trebuie să îndeplinească o serie de condiții

Studii de optimizare a proceselor fermentative



Cultivarea tulpinii producătoare

Culturi de suprafață

Culturi submerse



Extracția și purificarea enzimelor

Centrifugarea, filtrarea, evaporarea, precipitarea reversibilă, liofilizarea

Conditionare sub formă de pudre, soluții, cristale, sub formă imobilizată

Microorganismele

- Tulpini obținute prin screening conventional
 - Tulpini obținute prin recombinare genetică a tulpinilor clasice
- Mutatie genetica.
Evolutie dirijata.



Enzime stabile în conditii extreme de: pH, temperatura, săruri.
Enzimele rezistente la detergenți ...
Enzimele rezistentă la temperatura (amidon) ...



Producția în microorganismele cultivate de enzime rezistente în conditii extreme

- Microorganismele producatoare
 - Sunt non-patogene
 - Oferă randamente ridicate la fermentație pornind de la materii prime ieftine
 - Produc enzime extracelulare în principal

Microorganisme

- Pentru obținerea de enzime la scară industrială, tulpinile microbiene producătoare trebuie să îndeplinească o serie de condiții (*Aunstrup, K. – 1979*):
 - să se dezvolte pe medii cât mai simple cu puțință și ieftine;
 - să producă cât mai puțini metaboliți secundari;
 - enzima ce urmează a fi obținută să fie exportată în mediul de incubare în așa fel încât să fie ușor de izolat și purificat;
 - să nu fie poluante;
 - să nu fie patogene și să nu producă metaboliți toxici.

Enzimele in industria alimentara

- Dacă enzimele în cauză urmează să fie utilizate în industria alimentară, tulpinile microbiene producătoare trebuie să îndeplinească toate condițiile **G.R.A.S.** (*Generaly Recognized As Safe*) adică toate condițiile impuse produselor alimentare.
- De aceea, orice nouă tulpină studiată, înainte de a fi utilizată în producerea de enzime, este supusă unui minuțios examen toxicologic, ceea ce necesită mult timp.
- Acesta este motivul datorită căruia majoritatea cercetătorilor preferă tulpinile microbiene deja incluse în cataloagele G.R.A.S.

Content of a GRAS Monograph:
✓ Identity of the substance
✓ Production process
✓ Natural occurrence and use
✓ Analytical methodology
✓ Estimated exposure
✓ Safety data
✓ Safety evaluation
✓ GRAS determination

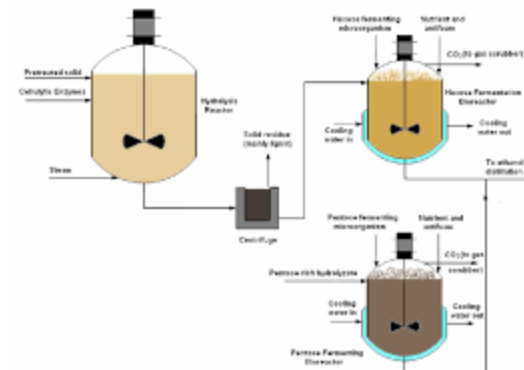
Cultivarea tulpinii producătoare

- **Inițial**, enzimele de origine microbiană se obțineau prin realizarea culturilor de suprafață pe medii **solide sau semisolide**. Această metodă se mai utilizează încă la obținerea unor enzime de origine fungică cum ar fi amilazele (*Aspergillus*), proteazele (*Aspergillus* și *Mucor*), pectinazele (*Penicillium*) și altele. **Actualmente** sunt însă preferate **culturile submerse** deoarece în cazul culturilor pe mediu solid apar dificultăți în ceea ce privește controlul temperaturii, umidității și aerării. Culturile în mediu lichid reduc riscul contaminării și permit controlul periodic al parametrilor biochimici și microbiologici.



Fermentația

- Utilizarea de materii prime disponibile ca: cereale, cum ar fi făină de soia, extract de porumb
- Stabilirea condițiilor optime de fermentare la nivel de laborator (2-20 L)
 - Optimizarea condițiilor de fermentatie: necesar de O_2 , pH-ul, continut de carbohidrati si azot proteic, oligoelemente
 - Tipul de fermentatie: discontinuu, continuu, semi-continuu, cu recirculare, etc...
- Schimbarea scarii de operare (Scale up)
 - pilot: 200 L la 3 m³
 - industrial 10 -100 m³



Extracția și purificarea enzimelor

- La sfârșitul perioadei de cultivare, enzimele trebuie extrase din celule și/sau lichidul de cultură după care sunt supuse unui șir de operațiuni pentru obținerea preparatelor comerciale. Cel mai adesea se folosește **centrifugarea, filtrarea, evaporarea, precipitarea reversibilă, liofilizarea** ș.a., iar preparatele enzimatice obținute se pot comercializa sub formă de pudre, soluții, cristale, sub formă imobilizată etc.
- În cazul enzimelor *intracelulare* extracția lor este mai dificilă și presupune realizarea unei etape suplimentare de liză a celulelor microbiene, după care procedurile sunt similare cu cele aplicate enzimelor extracelulare.

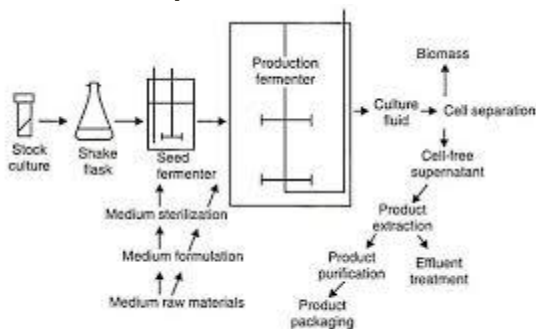
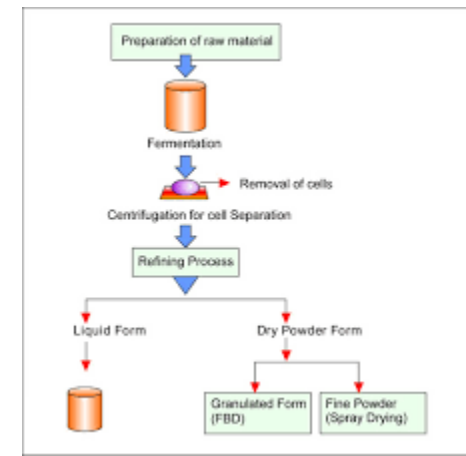


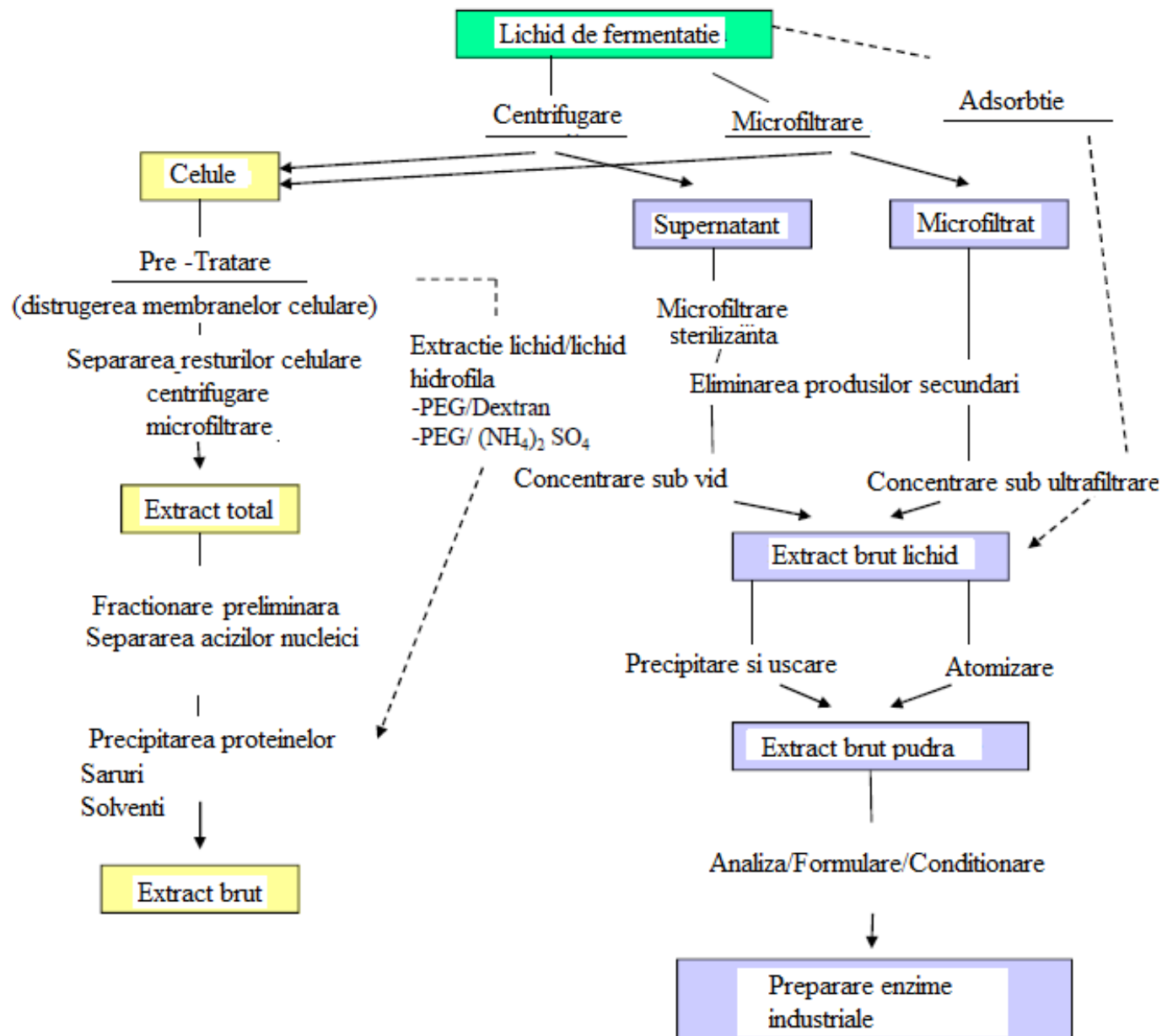
Fig. 2.1: A schematic representation of a typical fermentation process



Extracție/purificare

- Cantitățile de enzime produse în mediul de cultură sunt în general mici:
400 L de cultură de *Staphylococcus aureus* → 15 g nuclează
15 000 l de cultura *Streptomyces R61* → 3 g carboxipeptidaza
- Obiective
 1. Eliminarea
 - microorganismului producător
 - substanțelor dizolvate și a resturilor de materii prime
 - produselor secundare rezultate sub acțiunea denaturantă a temperaturii, pH-ului sau a contaminanților
 2. Obținerea unei cantități cât mai mare de enzimă

Metode



Producatori de enzime

- Principalii producatori sunt:

NOVOZYME, Danemark~50%

DSM Food Specialities, Hollande~20%

DANISCO/GENENCOR International, USA.....~25%

SOLVAY-MILES, USA~5%

Activitatea enzimatică

Activitatea enzimatică molară (moleculară)

este indicată de numărul de molecule de substrat transformate în produși, într-un minut, sub influența unui mol de enzimă.

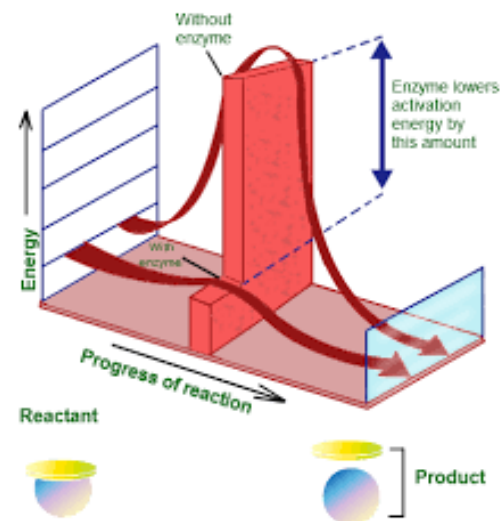
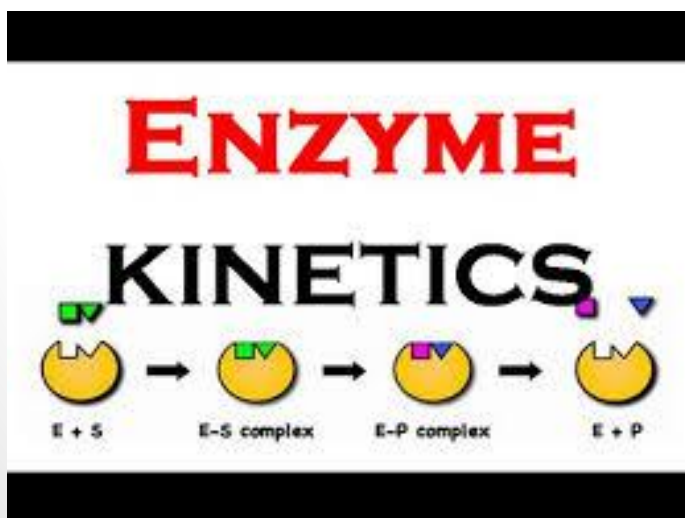
Katalul (Kat) reprezintă cantitatea de enzimă care transformă 1 mol de substrat într-o secundă.

Cinetica enzimatica

- Viteza proceselor enzimaticice
- Ecuatia Michaelis Menten
- Metode de liniarizare
- Factori care afecteaza viteza reacțiilor enzimaticice
- Mecanisme de actiune ale enzimelor

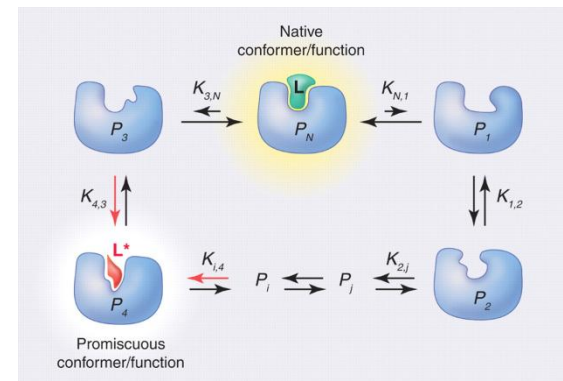
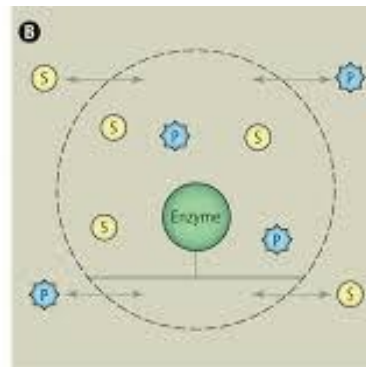
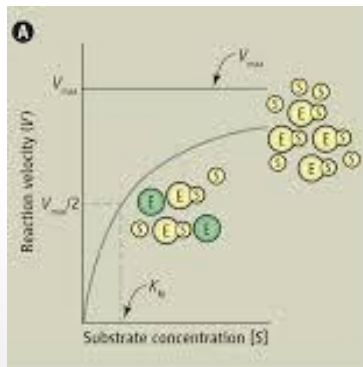
Notiuni de cinetica

- Studiul mecanismului reacțiilor enzimatică, a proceselor metabolice și a vitezei de transformare a substratului în produs se face prin **metoda cinetică**.
- Studiul cineticii enzimatică, ca și în cinetica chimică, se bazează pe **măsurarea vitezei de reacție** în condiții standard și în diferite condiții particulare create într-un anumit scop.



Notiuni de cinetica

- Prin studiul cineticii enzimatice este explicat modul in care enzimele actioneaza, permitand determinarea **vitezei maxime de reactie** a unei enzime si **a afinitatii sale pentru substrat** sau pentru unii efectori.
- Determinarea vitezei de reactie nu releva stoechiometria reactiei sau mecanismul acesteia, deci este necesara o ecuatie care sa faca legatura intre viteza initiala a reactiei (determinata experimental) si concentratia reactantilor.



Notiuni de cinetica

- Ordin de reactie

Ordin 1

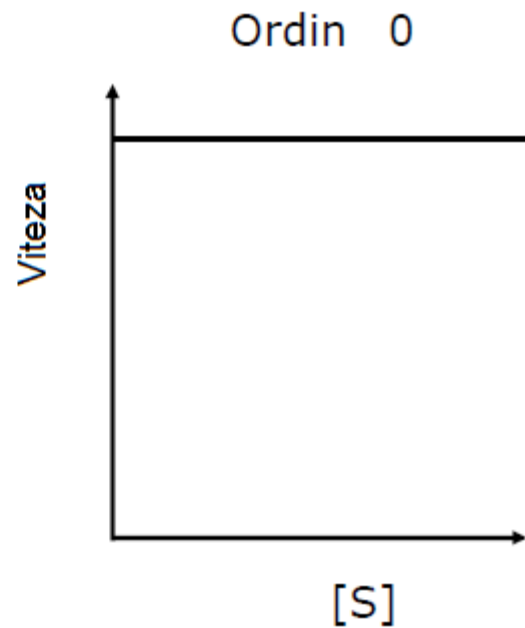
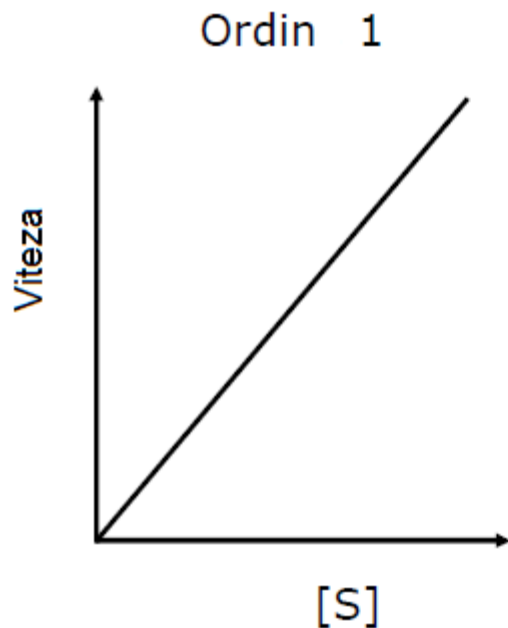
$$v_1 = k_1[S]$$

Ordin 2

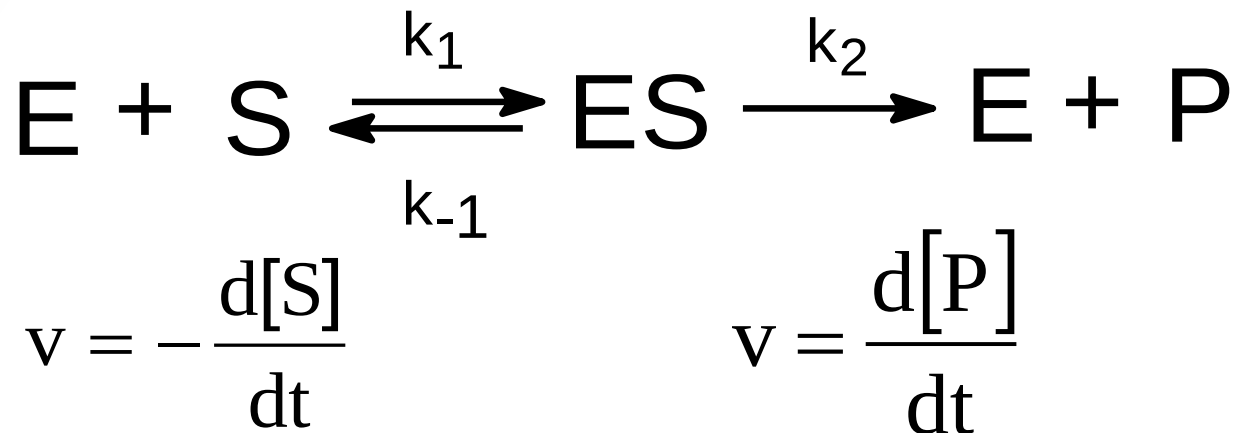
$$v_1 = k_1[S]^2 ; v_1 = k_1[S][S_1]$$

Ordin 0

$$v_1 = k_1$$



Viteza de reactie



Deși cazul enzimelor monomerice cu un singur substrat este relativ rar, **cinetica clasică** a enzimelor monomerice în fază staționară cu un singur substrat este modul cel mai simplu de a trata și a înțelege cinetica enzimatică. Cele mai multe enzime au însă mai multe substraturi dând naștere la produse diferite nerespectând comportamentul clasic.

În reacția $\text{S} \longrightarrow \text{P}$, pe măsura ce reacția avansează, crește concentrația produsului de reacție și scade cea a substratului.

Michaelis e Menten



Leonor Michaelis (1875-1949)

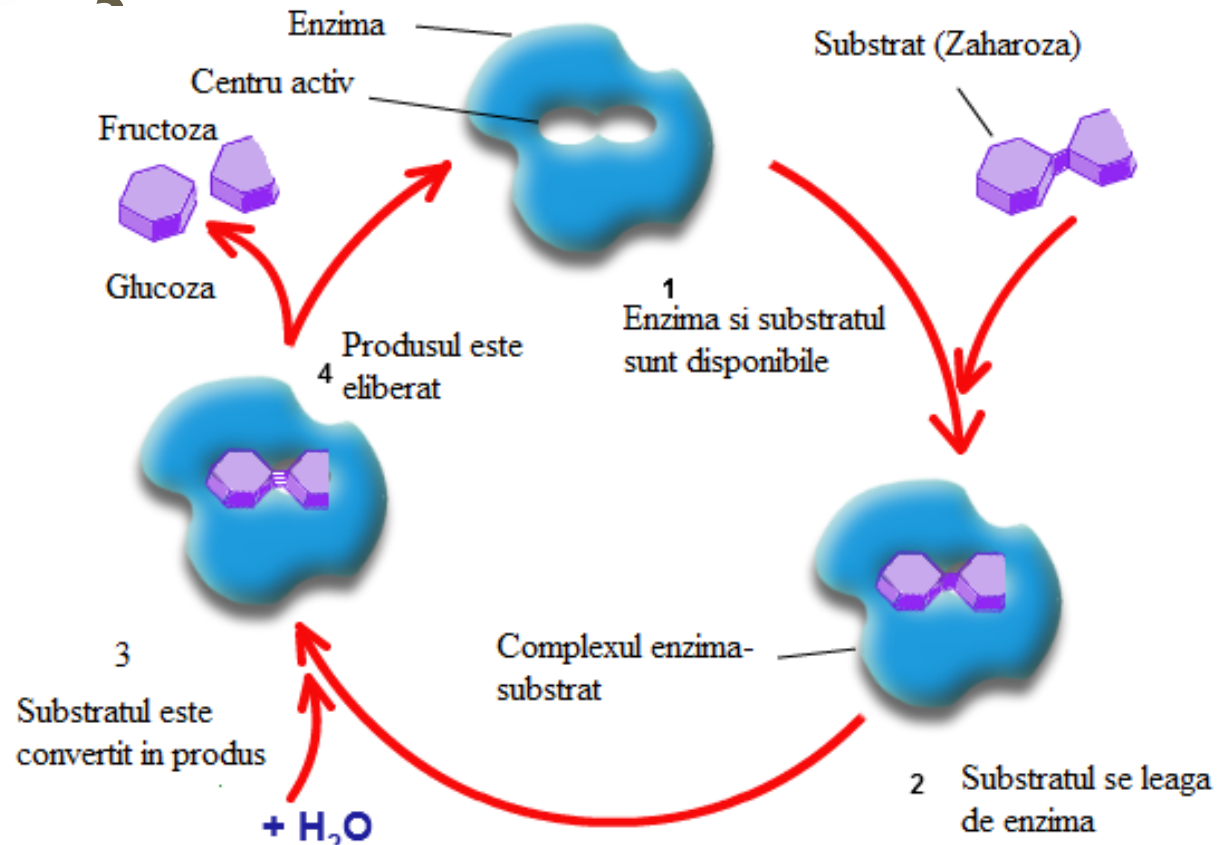


Maud Menten (1879-1960)

Ecuatia Michaelis-Menten

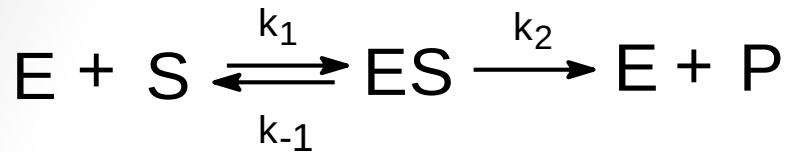
- L. Michaelis si M. Menten au propus o teorie generala de actiune a enzimelor bazata pe ideea ca enzima si substratul se asociaza reversibil pentru a forma complexul enzima-substrat.
- Ecuatia Michaelis - Menten a fost stabilită în ipoteza că $C_S \gg C_E$. Creșterea concentrației enzimei din mediul de reacție peste o anumită limită atrage după sine anularea ipotezei, iar de aceea viteza reacției enzimaticice nu va mai fi direct proporțională cu concentrația enzimei.
- Ecuatia Michaelis – Menten descrie viteza de formare a produsului într-un proces enzimatic, reprezinta modelul ideal pentru viteza proceselor enzimaticice în regim staționar, lipsit de procese secundare de inhibiție

Ecuatia Michaelis-Menten



În reacțiile cu un singur substrat, menținând constantă concentrația enzimei, creșterea concentrației de substrat determină mărirea vitezei de reacție până când se atinge o valoare maximă peste care oricât ar crește concentrația substratului viteza reacției enzimatice rămâne nemodificată. La concentrații mici de substrat, viteza de reacție este proporțională cu concentrația substratului (reacții de ordin 1). La concentrații mari de substrat, viteza de reacție devine independentă de concentrația substratului (reacții de ordin 0), enzima saturându-se cu substrat.

Ecuatia Michaelis-Menten



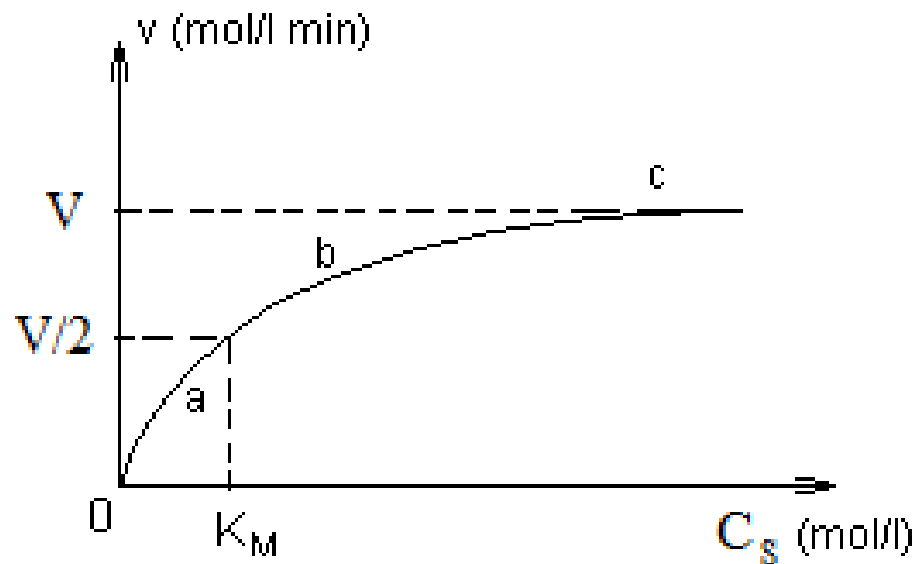
$$v_p = V \cdot \frac{C_S}{C_S + K_M}$$

$$k_2 C_E = V$$

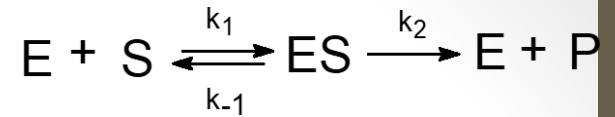
$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

$$C_S \gg C_E$$

Descrie viteza de formare a produsului într-un proces enzimatic, reprezentând modelul ideal pentru viteza proceselor enzimatiche în regim staționar, lipsit de procese secundare de inhibiție.



Deducere ecuatie



Viteza de formare a produsului în procesul enzimatic descris de sistem este:

$$V_p = k_2 \cdot C_c \quad (2)$$

Pentru determinarea concentrației complexului enzimă – substrat, C_c , se utilizează expresia vitezei de formare a acestuia, pentru cazul în care $C_s \gg C_E$:

$$dC_c/dt = k_{+1} \cdot (C_E - C_c) \cdot C_s - k_{-1} \cdot C_c - k_2 \cdot C_c \quad (3)$$

În regim staționar, concentrația complexului nu variază în timp, iar expresia devine :

$$dC_c/dt = 0$$

$$k_{+1} \cdot (C_E - C_c) \cdot C_s - k_{-1} \cdot C_c - k_2 \cdot C_c = 0 \quad (4)$$

$$k_{+1} \cdot C_E \cdot C_s - k_{+1} \cdot C_c \cdot C_s - k_{-1} \cdot C_c - k_2 \cdot C_c = 0$$

$$k_{+1} \cdot C_E \cdot C_s = k_{+1} \cdot C_c \cdot C_s + k_{-1} \cdot C_c + k_2 \cdot C_c$$

$$k_{+1} \cdot C_E \cdot C_s = C_c \cdot (k_{+1} \cdot C_s + k_{-1} + k_2)$$

$$C_c = (k_{+1} \cdot C_E \cdot C_s) / (k_{+1} \cdot C_s + k_{-1} + k_2) \quad \text{se împarte la } K_{+1}$$

$$C_c = C_E \cdot C_s / [(k_{+1}/k_{+1}) \cdot C_s + k_{-1}/k_{+1} + k_2/k_{+1}]$$

$$C_c = C_E \cdot C_s / [C_s + (k_{-1} + k_2)/k_{+1}] \quad (5)$$

Combinând relațiile (2) și (5) rezultă:

$$V_p = k_2 \cdot C_c = \frac{k_2 \cdot C_E \cdot C_s}{[C_s + (k_{-1} + k_2)/k_{+1}]}$$

În care :

$V_m = k_2 \cdot C_E$ – viteza maximă de formare a produsului ce corespunde stadiului în care întreaga cantitate de enzimă formează complexul enzimă – substratul;

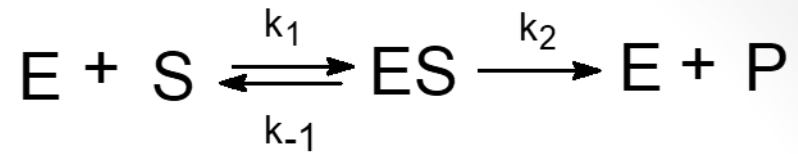
- $K_s = k_{-1}/k_{+1}$ – constanta de echilibru la disocierea complexului enzimă – substrat

- $K_M = K_s + k_2/k_{+1}$ – constanta Michaelis – Menten

Constanta K_M este egală cu constanta K_s numai atunci când $k_2 \ll k_{+1}$

$$V_p = k_2 \cdot C_c$$

$$C_S \gg C_E:$$



$$dC_c/dt = k_{+1} \cdot (C_E - C_c) \cdot C_S - k_{-1} \cdot C_c - k_2 \cdot C_c$$

$$dC_c/dt = 0$$

$$k_{+1} \cdot (C_E - C_c) \cdot C_S - k_{-1} \cdot C_c - k_2 \cdot C_c = 0 \quad (\text{se desface paranteza})$$

$$k_{+1} \cdot C_E \cdot C_S - k_{+1} \cdot C_c \cdot C_S - k_{-1} \cdot C_c - k_2 \cdot C_c = 0 \quad (\text{se separa termenii care includ } C_c)$$

$$k_{+1} \cdot C_E \cdot C_S = k_{+1} \cdot C_c \cdot C_S + k_{-1} \cdot C_c + k_2 \cdot C_c \quad (\text{se scoate in factor comun } C_c)$$

$$k_{+1} \cdot C_E \cdot C_S = C_c \cdot (k_{+1} \cdot C_S + k_{-1} + k_2) \quad (\text{se calculeaza } C_c)$$

$$C_c = (k_{+1} \cdot C_E \cdot C_S) / (k_{+1} \cdot C_S + k_{-1} + k_2) \quad \text{dr. se imparte la } K_{+1}$$

$$C_c = C_E \cdot C_S / [(k_{+1} / k_{+1}) \cdot C_S + k_{-1} / k_{+1} + k_2 / k_{+1}] \quad \text{se egaleaza cu } 1 \cdot k_{+1} / k_{+1}$$

$$C_c = C_E \cdot C_S / [C_S + (k_{-1} + k_2) / k_{+1}] \quad \text{se inlocuieste in prima ecuatie}$$

$$V_p = k_2 \cdot C_c = \frac{k_2 \cdot C_E \cdot C_S}{[C_S + (k_{-1} + k_2) / k_{+1}]}$$

V_m

K_m

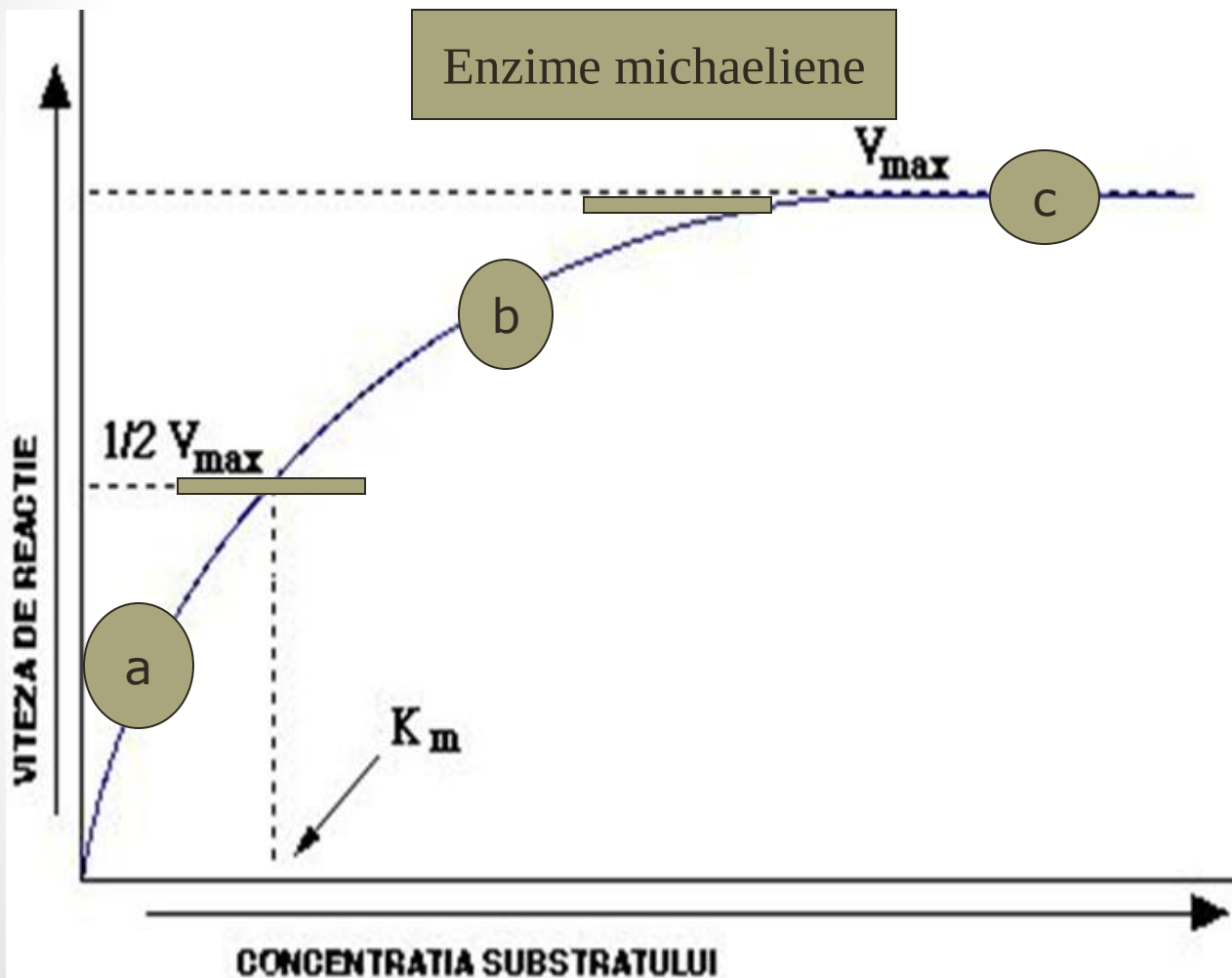
Cinetica enzimatică

- **Semnificatia Km si vmax**

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

- Daca $v = v_{\max}/2$, inlocuind in ecuatia Michaelis-Menten se deduce faptul ca $K_m = [S]$, deci constanta Michaelis poate fi definita drept **concentratia de substrat la care viteza de reactie este jumătate din viteza maxima**
- Constanta Michaelis, K_m , este un indice al **afinitatii enzimei** pentru substrat, variind invers proportional cu aceasta

Cinetica enzimatică



- Zona “a”- v crește proportional cu $[s]$
- Zona “b” – creșterea v cu $[s]$ nu este proportională
- Zona “c” – este atins V_{max} la $[s]$ infinită

Cinetica enzimatică

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

- Pentru orice E se poate defini, alaturi de K_m si $v_{\max}$, **numarul de turn-over** al enzimei, ca fiind numarul de molecule de S convertite in produs de reactie pe molecula de E in unitatea de timp, atunci cand E este saturata cu S
- Ecuatia Lineweaver-Burk
- Deoarece reprezentarea ecuatiei Michaelis -Menten este curba a carei interpretare este dificila, s-au realizat reprezentari liniare ale dependentei vitezei de reactie de $[S]$, folosite la interpretarea datelor experimentale:
- *reprezentarea Lineweaver-Burk, reprezentarea Hanes-Woolf, etc.*

Cinetica enzimatică

Ecuția Lineweaver Burk

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

Michaelis-Menten Equation

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m + [S]}{V_{\max} [S]}$$

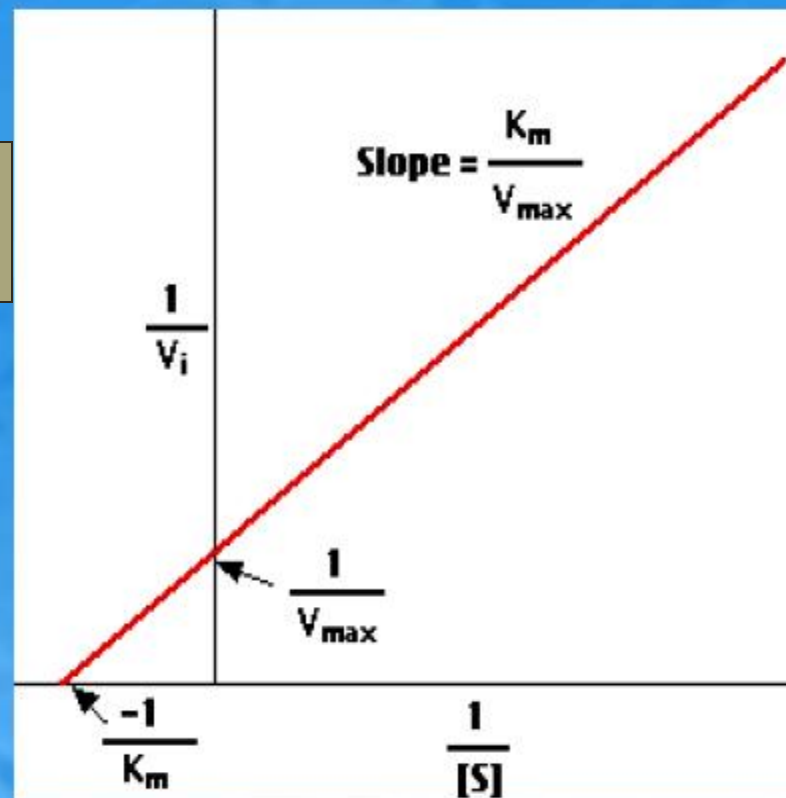
Reciproca ecuatiei
Michaelis-Menten

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max} [S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max} [S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

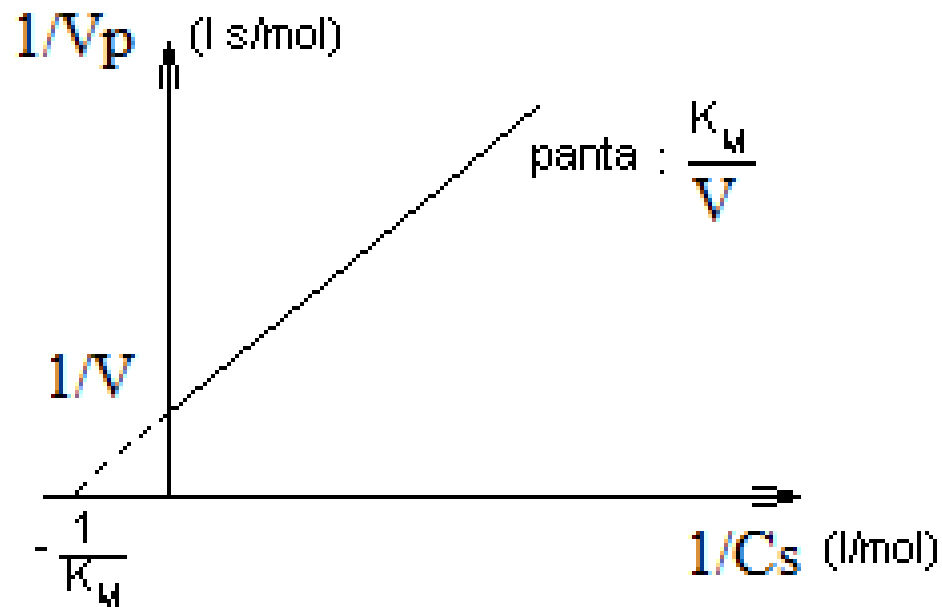
Slope = $K_m / V_{\max}$
y Intercept = $1 / V_{\max}$

Lineweaver-Burk Plot



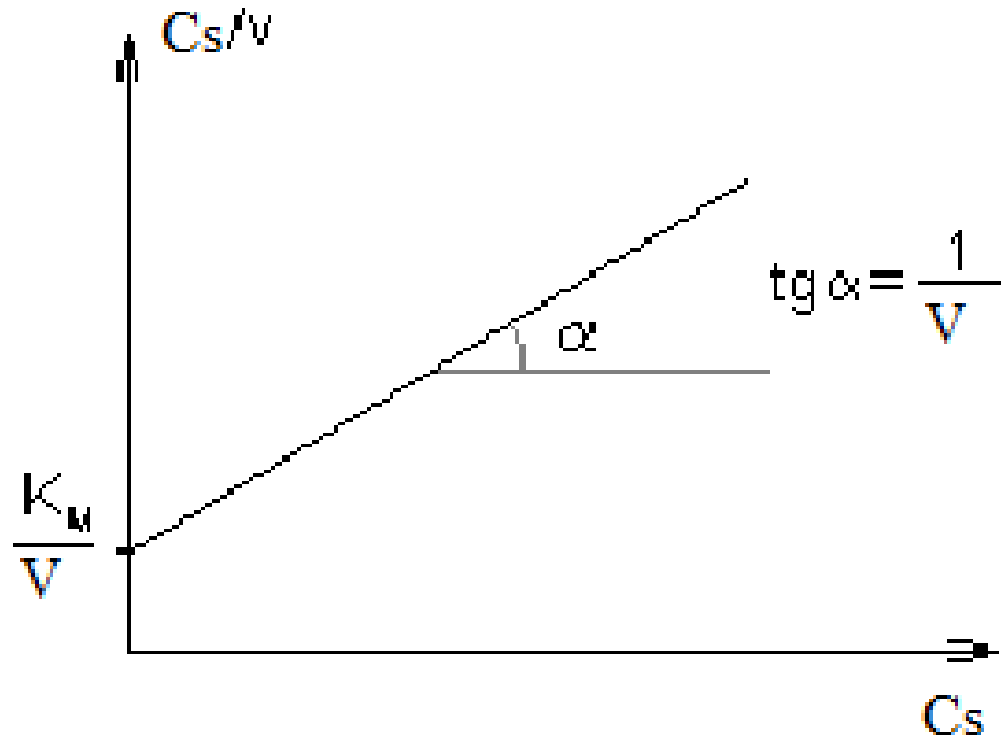
Ecuatia Lineweaver-Burk

$$\frac{1}{v_p} = \frac{K_M}{V} \cdot \frac{1}{C_S} + \frac{1}{V}$$



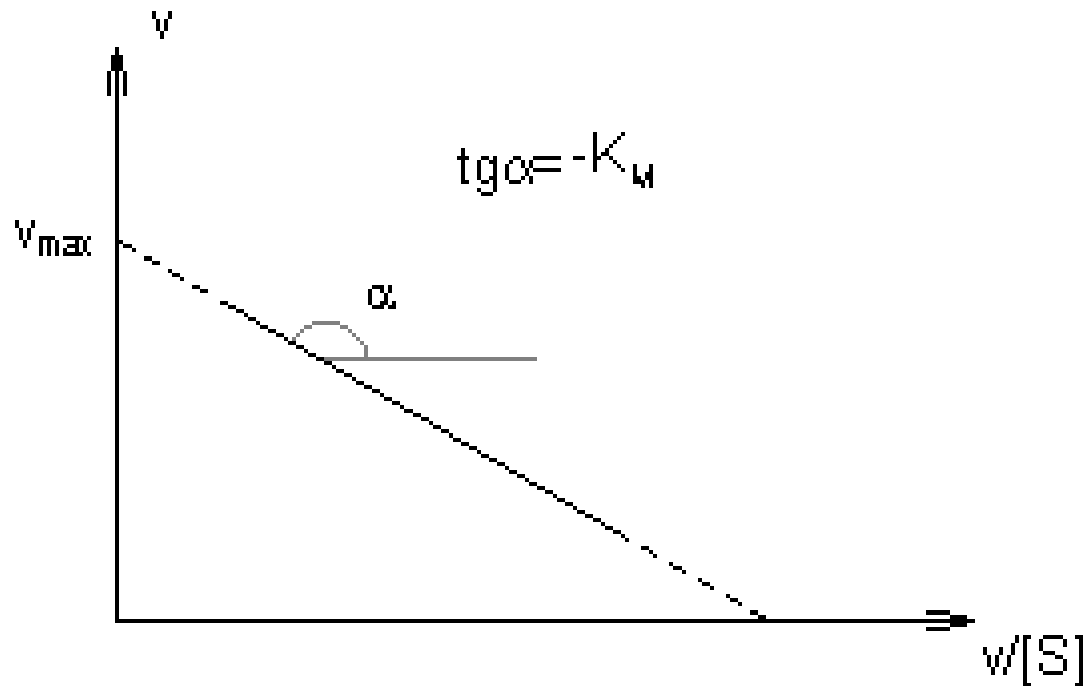
Ecuatia Hanes-Woolf

$$\frac{C_S}{v_p} = \frac{1}{V} \cdot C_S + \frac{K_M}{V}$$



Ecuatia Eadie-Hofstee

$$v_p = -K_M \cdot \frac{v_p}{C_S} + V$$



Ecuatia Michaelis-Menten

- Modelul Michaelis – Menten a fost conceput ca un model ideal și descrie viteza de formare a produselor în procese de fermentație perfecte. Dar acest model, ce abordează cinetica enzimatică în regim staționar, poate fi extins și la procese în care, alături de transformarea enzimatică a substratului în produs, intervin reacții de inhibiție competitivă sau necompetitivă a enzimelor. Prezența inhibitorilor nu se poate evita, deoarece ei apar ca urmare a degradării mediului nutritiv în timpul sterilizării, a unor reacții secundare și nu numai.
- Principalele tipuri de inhibiții întâlnite curent în procesele de fermentație sunt :
 - inhibiție competitivă;
 - inhibiție necompetitivă;
 - inhibiție de substrat;
 - inhibiție de produs.

Caracteristicile reactiei

- Constanta Michaelis-Menten
- Viteza maxima a procesului enzimatic
- Constanta vitezei catalitice $-k_{\text{cat}}$ - numărul de transformări substrat-produs pe care fiecare centrul activ le catalizează în unitatea de timp - **turnover**

Factorii care influențează viteza de reacție (activitatea enzimatică)

- **1. Concentrația enzimei**
- **2. Natura și concentrația substratului**
- **3. Temperatura**
- **4. pH-ul**
- **5. Influența efectorilor**
 - 5.1. Activarea
 - 5.2. Inhibiția
 - a) ireversibilă (otrăvirea)
 - b) reversibilă -competitivă și necompetitivă
- **6. Alți factori:** ionii din mediu, detergenții, potențialul redox al mediului, presiunea, radiațiile UV, X, β

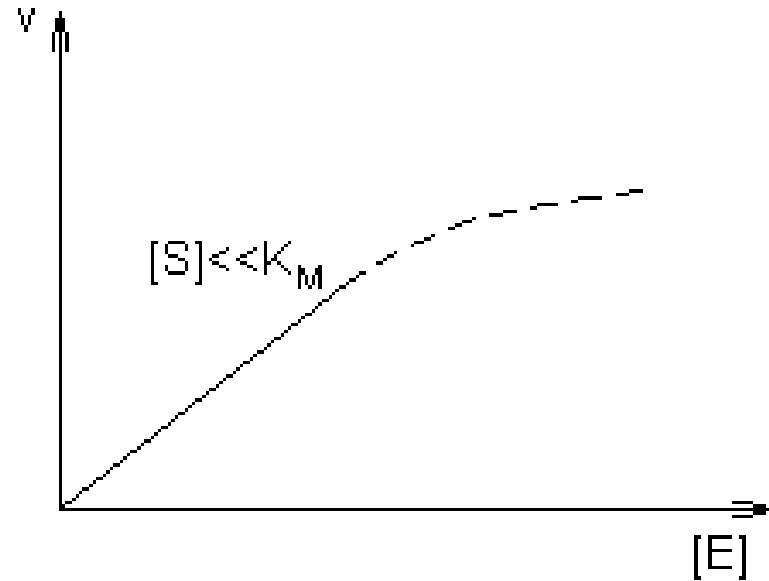
Factorii care influențează viteza de reacție (activitatea enzimatică)

- Acționând în organismele vii, enzimele se comportă total diferit față de catalizatorii chimici la acțiunea unor factori de mediu. Astfel, enzimele își manifestă activitatea catalitică maximă în condiții fiziologic normale de pH, temperatură, presiune osmotică etc. Pe de altă parte, dinamica activității enzimatică la concentrații diferite ale substratului, enzimei, modulatorilor etc. este de asemenea diferită.



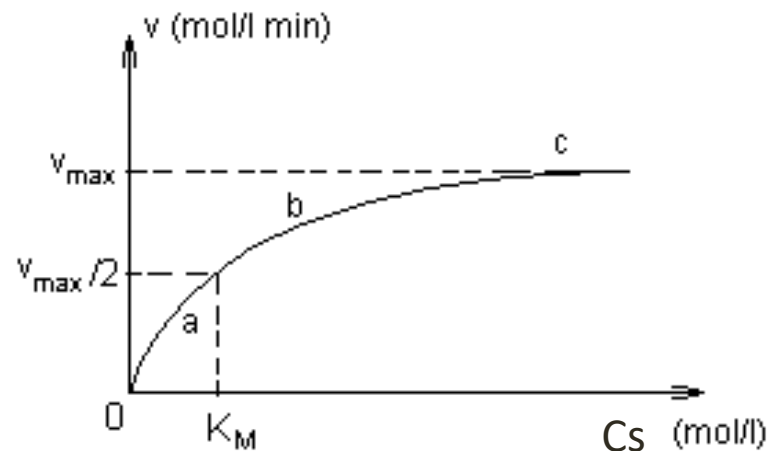
1. Concentrația enzimei

$$v_0 = k \cdot [E] = \frac{[P]}{t}$$



- analizele medicale (mai ales ale sângelui), deoarece variațiile sunt corelate cu diferite stări patologice

2. Natura și concentrația substratului



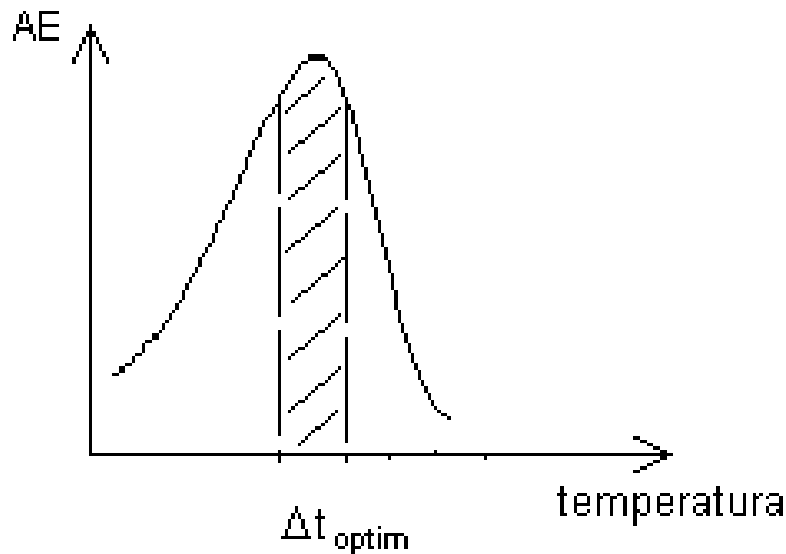
- Constanta K_M este independentă de concentrația enzimei, fiind caracteristică cuplului enzimă-substrat studiat.
- Teoria Michaelis-Menten
 - **zona (a)**: pentru $[S] \ll K_M$ se obține dependență liniară indică o reacție de ordinul întâi.
 - **zona (b)**: arc de hiperbolă echilaterală, ceea ce corespunde unei reacții de ordin fracționar
 - **zona (c)**: pentru $[S] \gg K_M$ se obține un palier și ordin de reacție zero

- Concentratia substratului
- In reactiile cu un singur S, mentinand constanta C_E , cresterea C_S determina marirea vitezei de reactie pana cand se atinge o valoare maxima peste care oricat ar creste concentratia substratului viteza reactiei enzimatice ramane nemodificata
- La concentratii mici de S, viteza de reactie este proportionala cu C_S (reactii de ordin 1)
- La concentratii mari de S, viteza de reactie devine independenta de concentratia substratului (reactii de ordin 0), enzima saturandu-se cu S.

- Concentratia substratului
- L. Michaelis si M. Menten au propus o teorie generala de actiune a enzimelor bazata pe ideea ca enzima si substratul se asociaza reversibil pentru a forma complexul ES.
- Ecuatia exprima faptul ca viteza unei reactii enzimatice este determinata de concentratia de substrat la acel moment si de constantele K_m si V_{max} .
- Aspectul curbei descrise de ecuatia Michaelis-Menten este hiperbolic

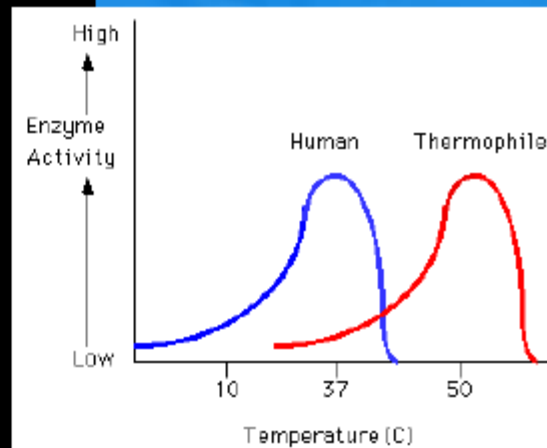
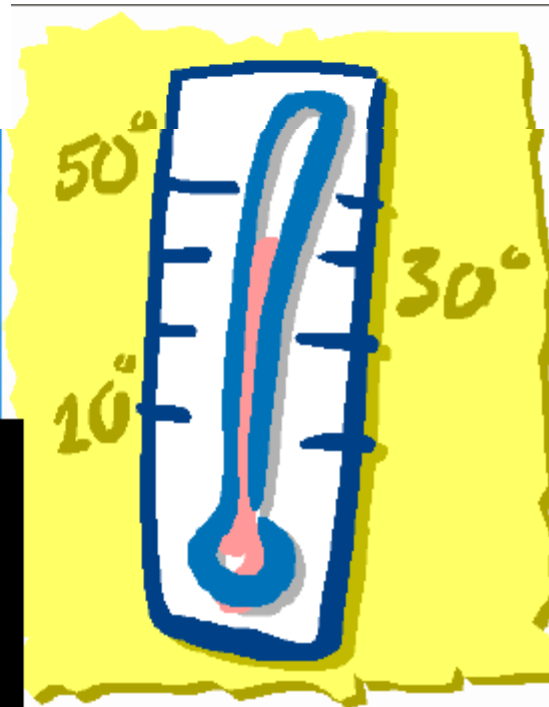
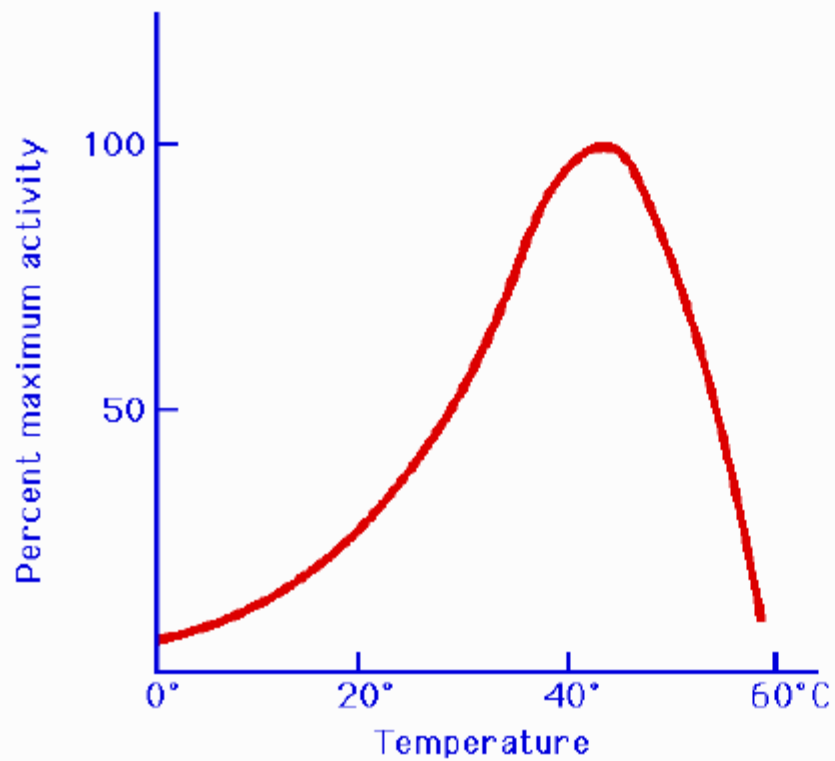
3. Temperatura

- Determinarea activității enzimatice se recomanda la 25°C , când gradul de denaturare este aproape nul, iar viteza de reacție, deși este mică, este proporțională cu timpul.
- Între 0°C și 40°C activitatea celor mai multe enzime se dublează când temperatura crește cu 10°C .
- Temperaturile de $0-4^{\circ}\text{C}$ sunt temperaturi de conservare pentru majoritatea enzimelor.

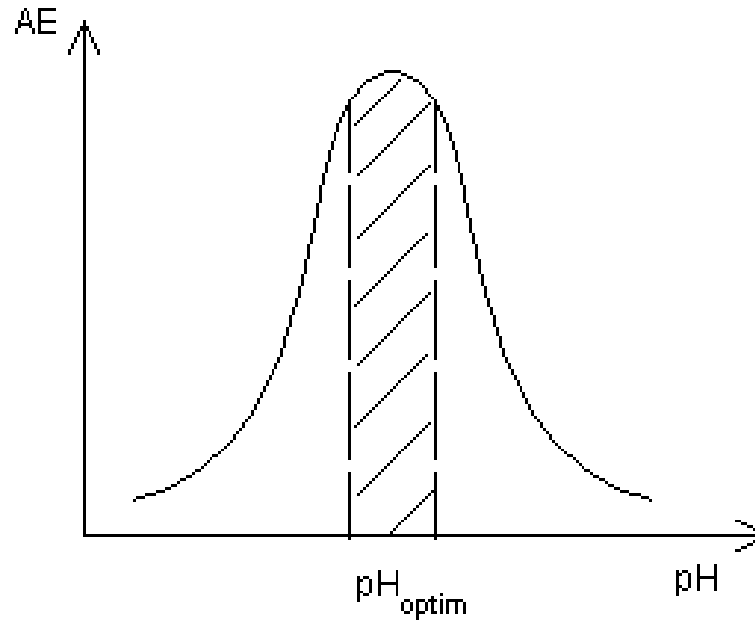


- Temperatura
- Efectul temperaturii asupra activitatii enzimelor este rezultanta actiunii a doi factori opusi, cresterea vitezei de reactie cu temperatura si denaturarea termica a enzimelor
- Activitatea oricarei enzime variaza cu temperatura
- Temperatura optima pentru enzimele din organismul uman este 37-40⁰C, la plante 50-60 ⁰C, iar pentru cele din microorganismele din apele termale este 80-100 ⁰C
- Determinarea activitatii unei enzime trebuie sa se faca la o temperatura intre 25-37 ⁰C.

temperatura



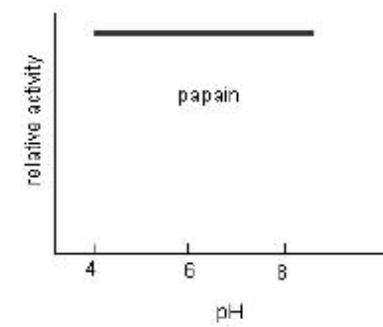
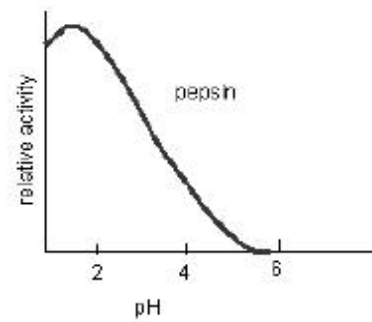
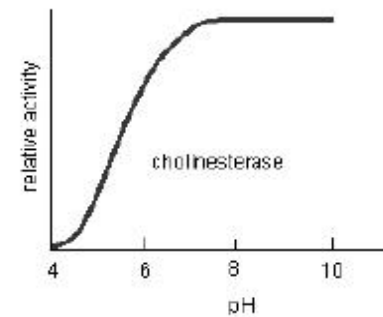
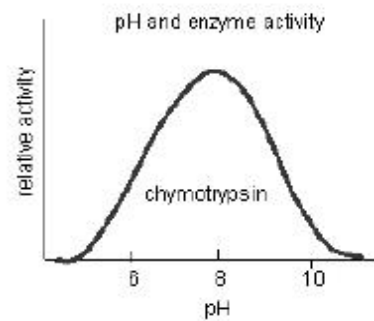
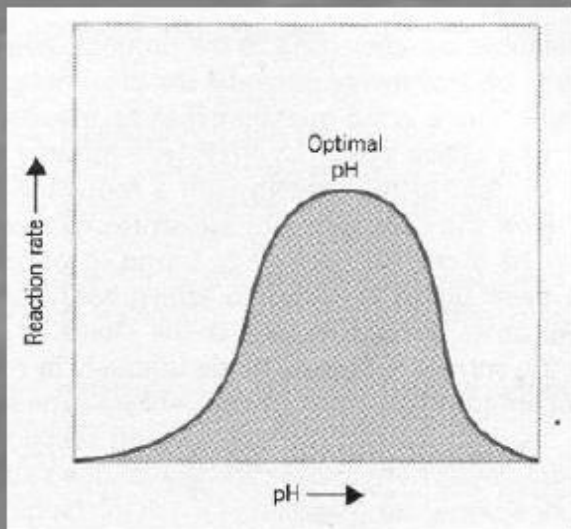
4. pH-ul



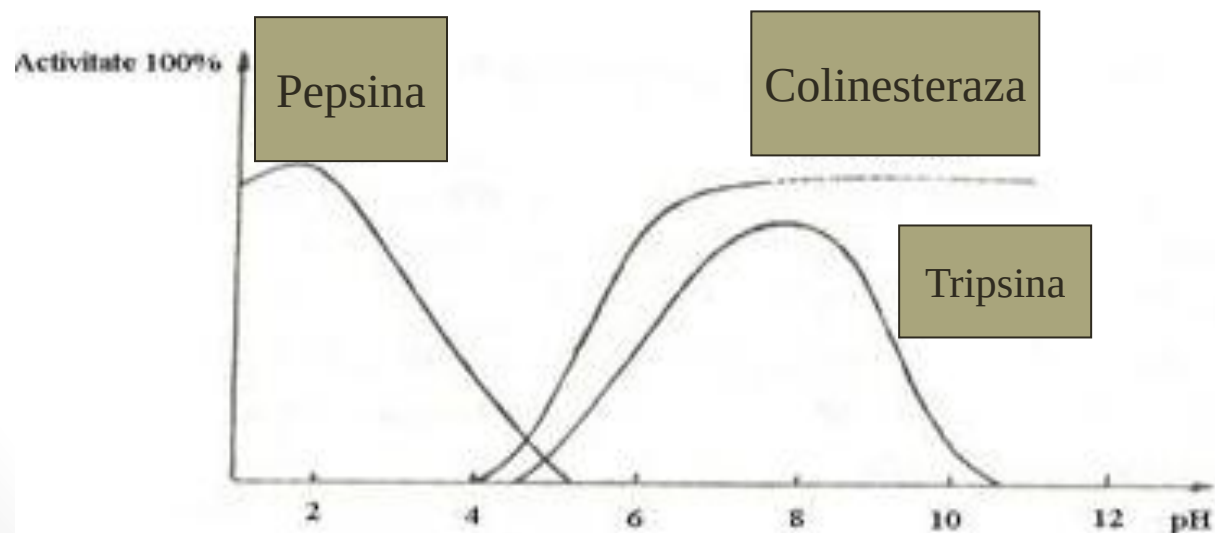
- pepsina din sucul gastric $pH=1,5 \dots 4,0$;
- arginaza la un $pH > 10$,
- enzimele de origine animală au în general ca pH al acțiunii maxime intervalul de pH fiziologic

- pH-ul
- Pentru enzimele din organismul uman, pH-ul optim de actiune este pH-ul normal al mediului in care ele isi manifesta actiunea catalitica
- Centrul activ al enzimelor contine grupe ionizabile, acide sau bazice, deci modificarea pH-ului are ca efect modificarea gradului de disociere si, implicit, modificarea vitezei de reactie.

pH



- Pentru enzimele din organismul uman pH-ul optim este între 5-9, dar exista enzime ce actioneaza si in afara acestui interval. De exemplu, pepsina actioneaza la pH 1,5-2, fosfatazele alcaline la pH 9-10, iar fosfatazele acide la pH 4,5-5.



5. Influența efectorilor

- **Efectorii enzimatici** sunt substanțe chimice care prin prezența lor în mediul de reacție modifică activitatea catalitică a enzimei (scăzând-o sau măbind-o). Aceștia pot fi deci inhibitori sau activatori enzimatici.
- Se remarcă dublul rol al efectorilor:
 - **rol biologic** - prin reglarea metabolismului
 - **rol biochimic** - prin furnizarea unor date prețioase în legătură cu mecanismul de participare al enzimelor la reacțiile chimice

Activarea

- **Activatorii** pot fi de natură anorganică și organică. Dintre cei de natură anorganică, se cunoaște acțiunea ionilor cu numere atomice între 1 și 35, a unor lantanide și a unor anioni (Cl^- , Br^- , NO_3^- , ClO_3^- - asupra amilazei salivare).
- Un alt tip de activare este cea prin **antiinhibiție** care constă în înlăturarea unei substanțe inhibitoare care împiedică desfășurarea reacției enzimatică (cianurile alcaline activează ureaza inhibată de sărurile de Cu^{2+}).

Inhibiția

- **Inhibitorii** sunt acele substanțe care prin prezența lor **diminuează** sau **anihilează** activitatea catalitică a enzimei.

Aplicatii

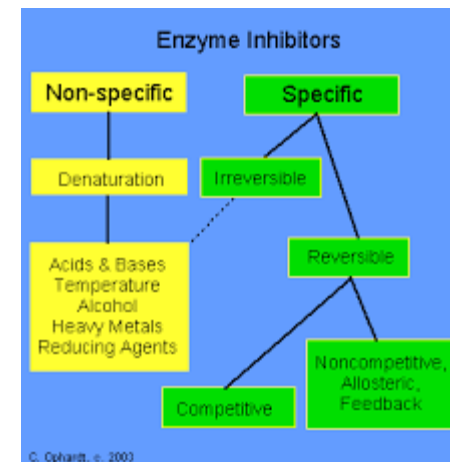
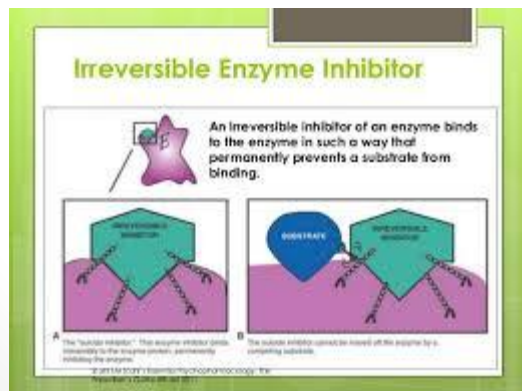
- utilizarea lor poate oferi informații cu privire la natura grupărilor funcționale din centrul catalitic al enzimei, precum și a aminoacizilor implicați în menținerea conformației speciale a enzimei
- oferă informații despre specificitatea de substrat a enzimei
- inhibiția unor enzime cu componenți celulari specifici constituie un element în controlul reacțiilor enzimaticе
- utilizarea unor medicamente în terapie se bazează pe inhibarea specifică a unor enzime.

Exemple de medicamente care functioneaza ca si inhibitori

Medicament inhibitor	Afectiune	Enzima tinta
Captopril	Hipertensiune	Enzima de conversie a angiotensinei
Aspirina	Inflamatie, durere, febra	Prostagladin sintaza
Norfloxacin		
Lovastatin	Infectii urinare	ADN-giraza
Acid clavulanic	Hipercolesterolemie	HMGCoA reductaza
Aciclovir	Rezistenta bacteriana	B-Lactamaza
Zidovudina	Herpes	ADN polimeraza virala
Alopurinol	SIDA	Revers transcriptaza virala
Trimetoprim	Guta	Xantin oxidaza
Fluorouracil	Infectii bacteriene	Dihidrofolat reductaza
Fenelzina	Cancer	Timidilat sintaza
Acetazolamida	Cancer	Monoaminoxidaza cerebrala
Zileuton	Depresii	Anhidraza carbonica
	Glaucom	Lipoxigenaza
	Alergii	

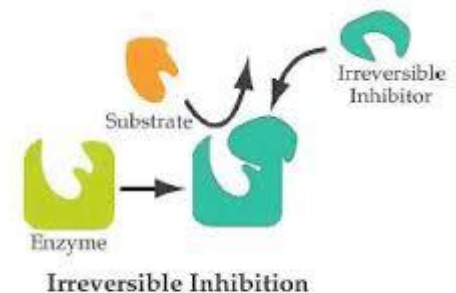
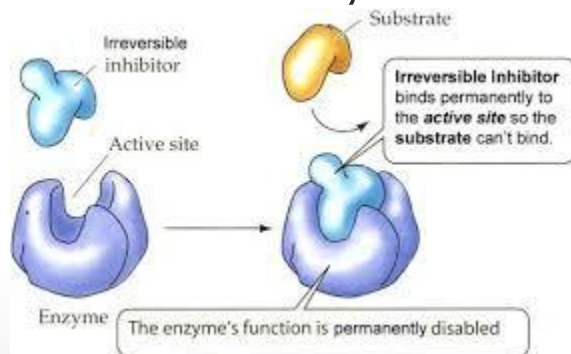
a) Inhibiția ireversibilă (otrăvirea)

- Inhibitorul ireversibil se poate lega de enzimă prin legături covalente sau necovalente foarte puternice, astfel încât disocierea inhibitorului este foarte lentă sau imposibilă.
- Este dată de sistemele nebiologice. Inhibiție de acest tip produc metalele grele (Hg, Cu, Ag), agenții alchilanți, agenții oxidanți și alte complexe denaturante (CO, H₂S, NH₃, HCN).



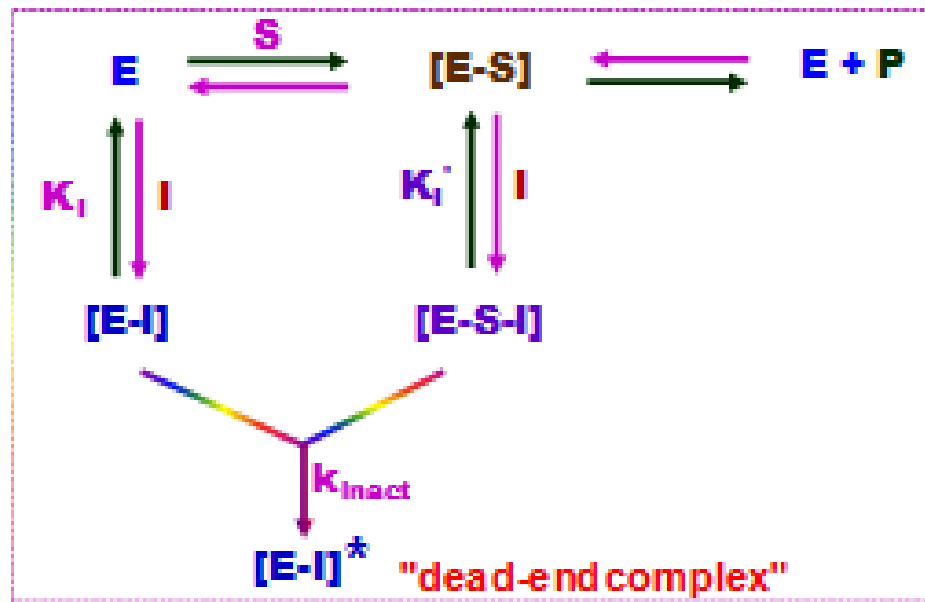
a) Inhibiția ireversibilă (otrăvirea)

- Inhibitorul (I) acționează lent, fiind necesar un timp de contact între enzimă și inhibitor pentru ca inhibiția să fie evidențiată.
- Inhibitorul ireversibil nu este specific pentru o anumită enzimă, ci, în general, unui grup de enzime.
- Un exemplu îl constituie cazul pesticidelor organofosforice și carbamice care reacționează cu hidroxilul serinic din centrul activ al serin-proteazelor (colinesteraza, chimotripsina)



Inhibiție ireversibilă

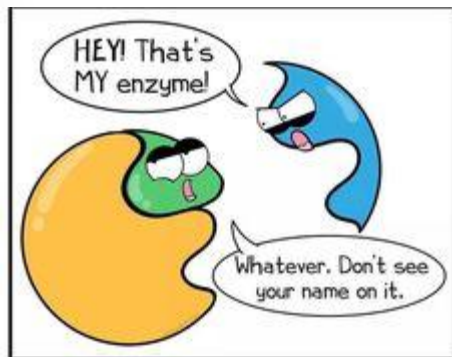
- Schema



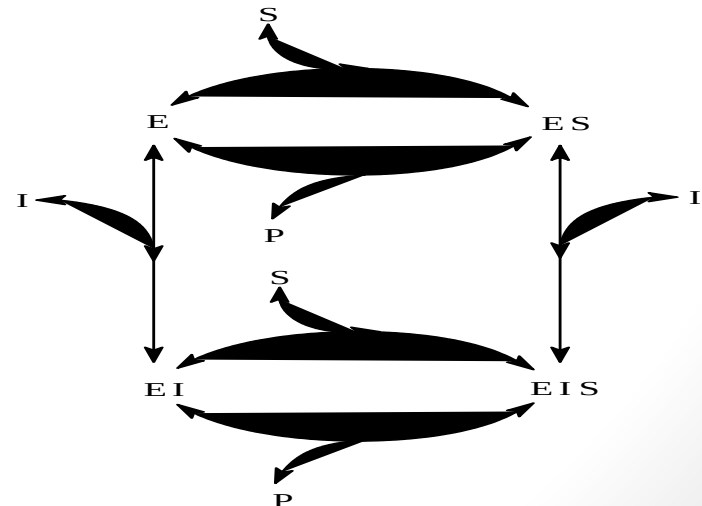
b) Inhibitie reversibila

Inhibitorii reversibili sau inhibitorii propriu-ziși **diminuează viteza reacțiilor enzimaticе, dar aceasta revine la valoarea ei normală după înlăturarea inhibitorului.**

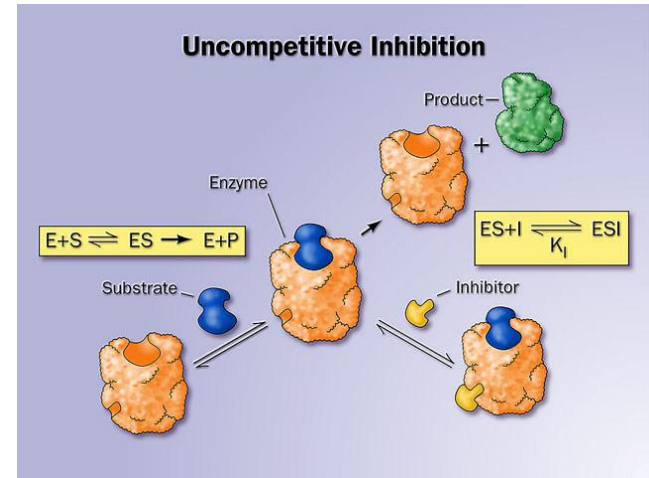
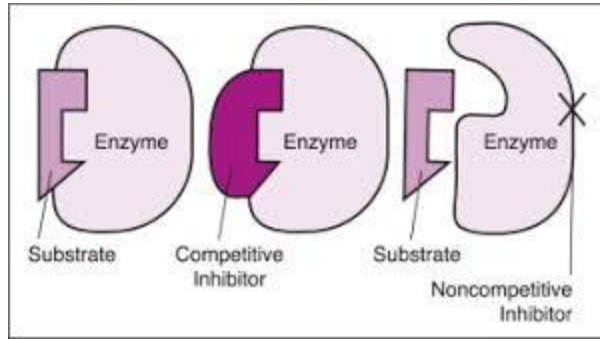
- Este de mai multe tipuri:
 - ***inhibiția competitivă***
 - ***inhibiția necompetitivă***
 - ***inhibiția incompetitivă*** sau ***anticompetitivă***
 - ***inhibiția mixtă***



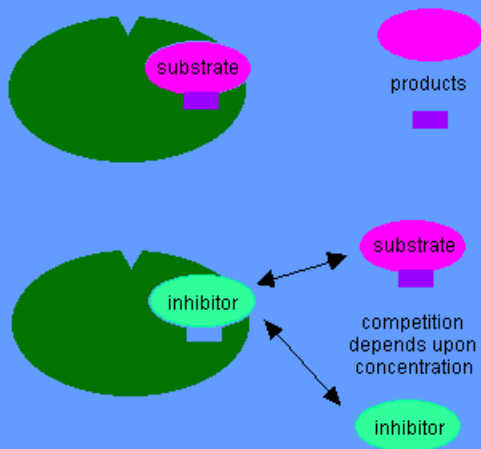
Competitive Inhibitors: If it fits, it sits.



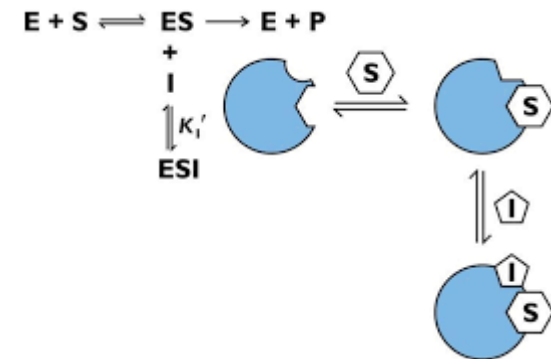
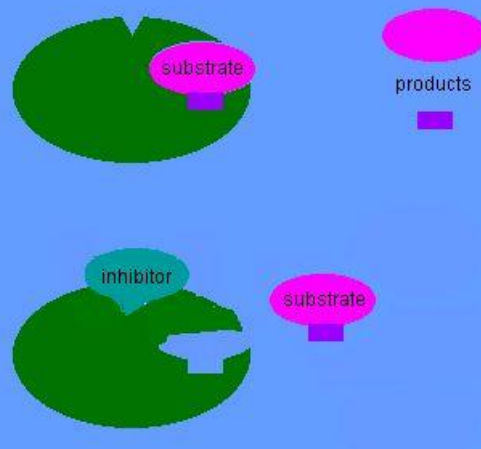
Inhibitori



Competitive Inhibitor



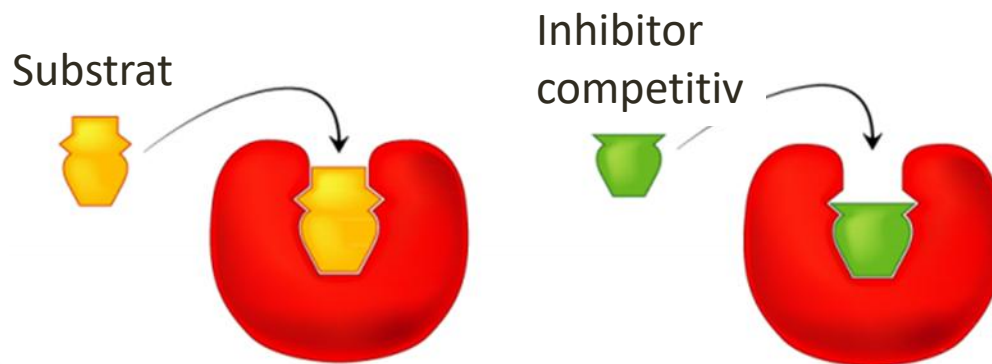
Noncompetitive Inhibitor



b) Inhibiția reversibilă

Inhibiția competitivă (de asociere exclusivă)

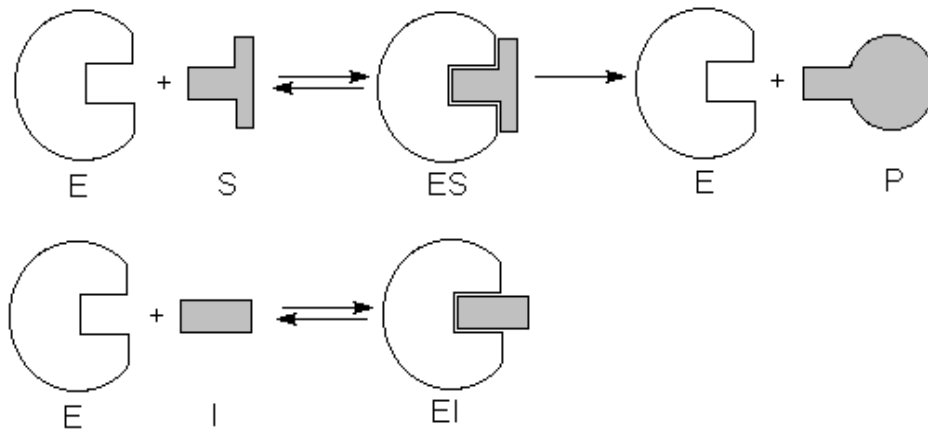
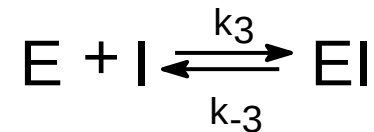
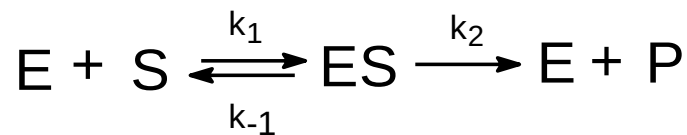
- Inhibitorul competitiv **diminuează activitatea** enzimatică datorită interacției în genere, cu aceleași grupări funcționale din centrul catalitic la care se fixează și substratul în cursul reacției enzimatice.
- Inhibiția competitivă poate fi remediată prin creșterea concentrației substratului.
- Inhibitorii competitivi reduc numărul de molecule de enzimă care pot să fixeze substratul.



b) Inhibiția reversibilă

Inhibiția competitivă (de asociere exclusivă)

- In mediul de reacție apar două tipuri de complexe binare, ES și EI



- Etanolul se administrează și în cazul otrăvirii cu metanol, manifestându-se inhibiția competitivă

Inhibiția competitivă (de asociere exclusivă)

- *Ecuția Michaelis-Menten*

- Se observă că viteza maximă este aceeași în ambele cazuri ale reacției enzimatiche neinhibate și inhibate.

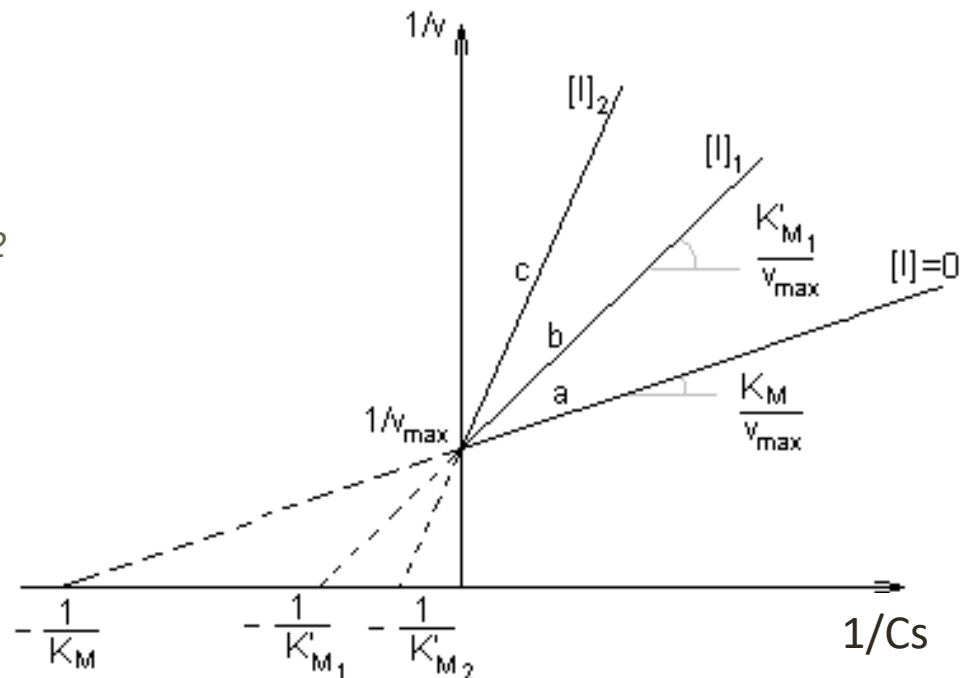
- Pentru a determina valoarea constantei K_M este utilă reprezentarea grafică a ecuației Lineweaver-Burk

- (a) neinhibat $[I]=0$

- (b), (c) inhibat $[I]_1 < [I]_2$

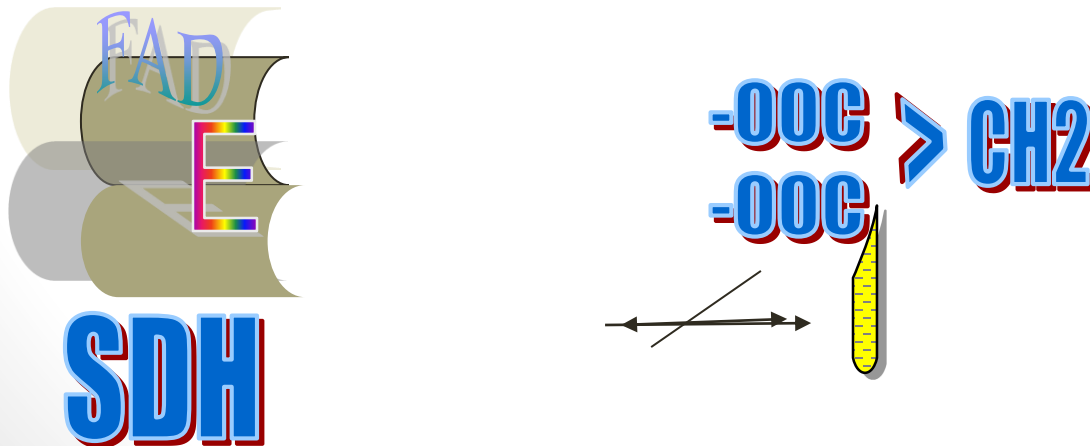
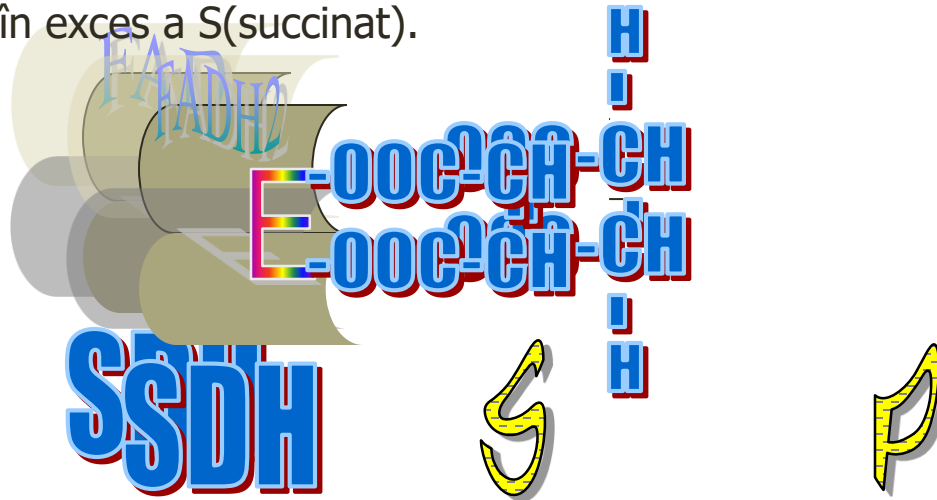
$$V = \frac{V_{\max} \cdot Cs}{K_M' + Cs}$$

$$K_M' = K_M \left(1 + \frac{Ci}{K_i} \right)$$



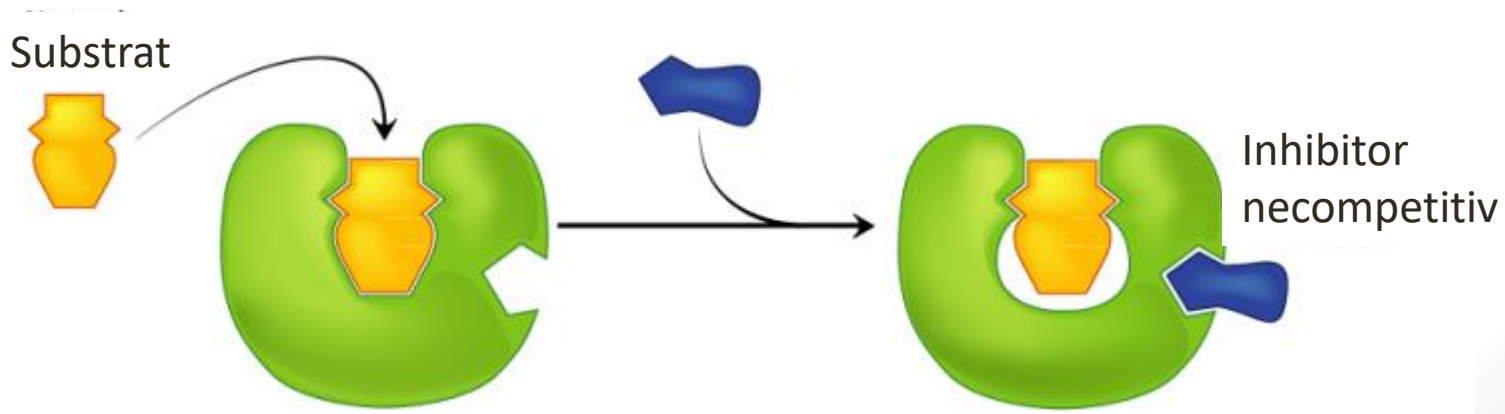
Inhibiție competitivă

- Inhibitorul se aseamănă după structură cu S și se fixează în CA al E, împiedicând fixarea și transformarea S.
- Nu e posibilă fixarea simultană a S și a I. E va fixa pe acel competitor care se afla într-o concentrație mai mare.
- Inhibiția enzimei (SDH) cu malonat. SDH oxidează succinatul în fumarat
- Malonatul inhibă aceasta E datorită asemănării cu S.
- Particularitatea principală a acestui tip de inhibiție este că poate fi înlăturată cu adăugarea în exces a S(succinat).

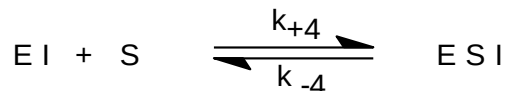
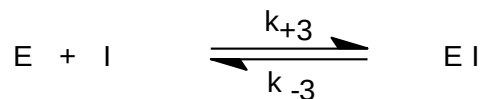
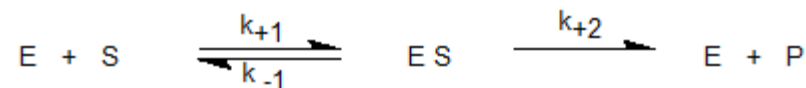


Inhibiția necompetitivă (de asociație neexclusivă)

- Inhibitorii necompetitivi **nu au structuri asemănătoare substratului** și nu concurează cu acesta pentru aceleași grupe funcționale din centrul activ enzimatic.
- Inhibitorul necompetitiv **se fixează la alt situs al enzimei**, ceea ce duce la modificarea conformațională a centrului catalitic, afectând legarea substratului și, în ultimă instanță, viteza reacției enzimatice.
- Substratul și inhibitorul se pot lega simultan la molecula enzimei, dovedind că locurile de legare nu se suprapun



Inhibiția necompetitivă (de asociație neexclusivă)



$$v = \frac{V_{\max} \cdot Cs}{K_M + Cs} \cdot \frac{1}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

$$v = \frac{V'_{\max} \cdot Cs}{K_M + Cs}$$

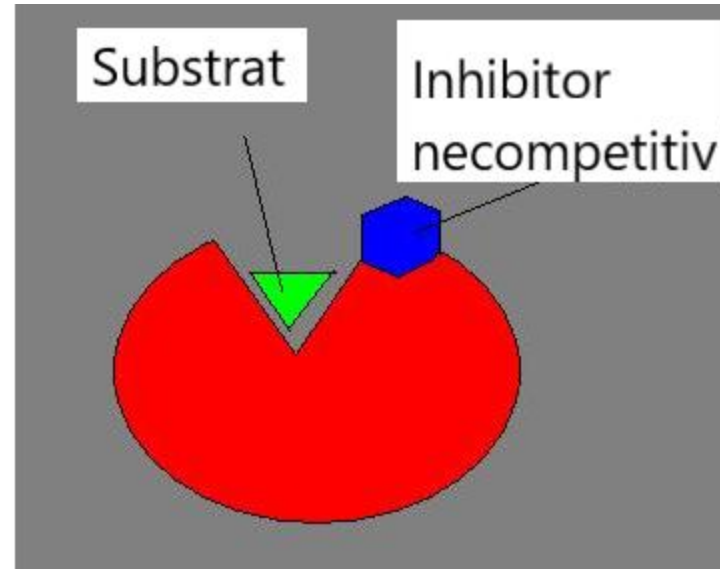
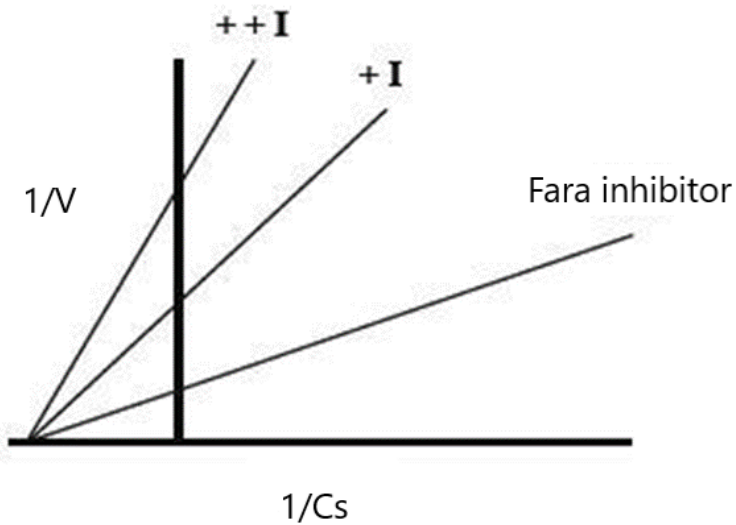
$$V'_{\max} = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

În cazul acestui tip de inhibiție între inhibitor și substrat nu există o analogie structurală, inhibitorul legându-se la situsuri specifice, altele decât situsul catalitic.

Inhibiția necompetitivă presupune că inhibitorul afectează activitatea catalitică a enzimei dar nu și legarea enzimei de substrat.

Legarea inhibitorului de enzima determină *modificări conformationale* ale moleculelor enzimatice influențând $V_{\max}$ și nu K_M .

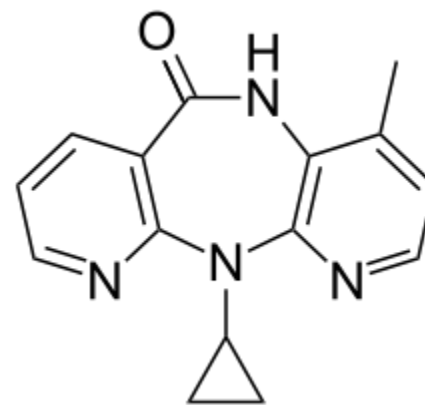
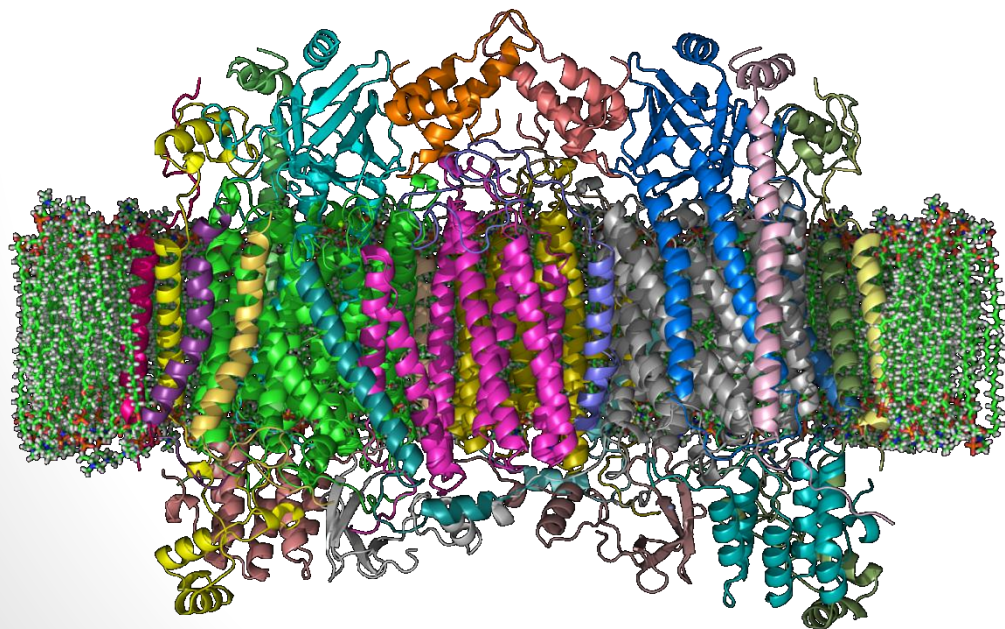
Determinarea parametrilor cinetici



În inhibiția necompetitivă, are loc o scădere a valorii parametrului V_{max} , constanta K_M rămânând nemodificată

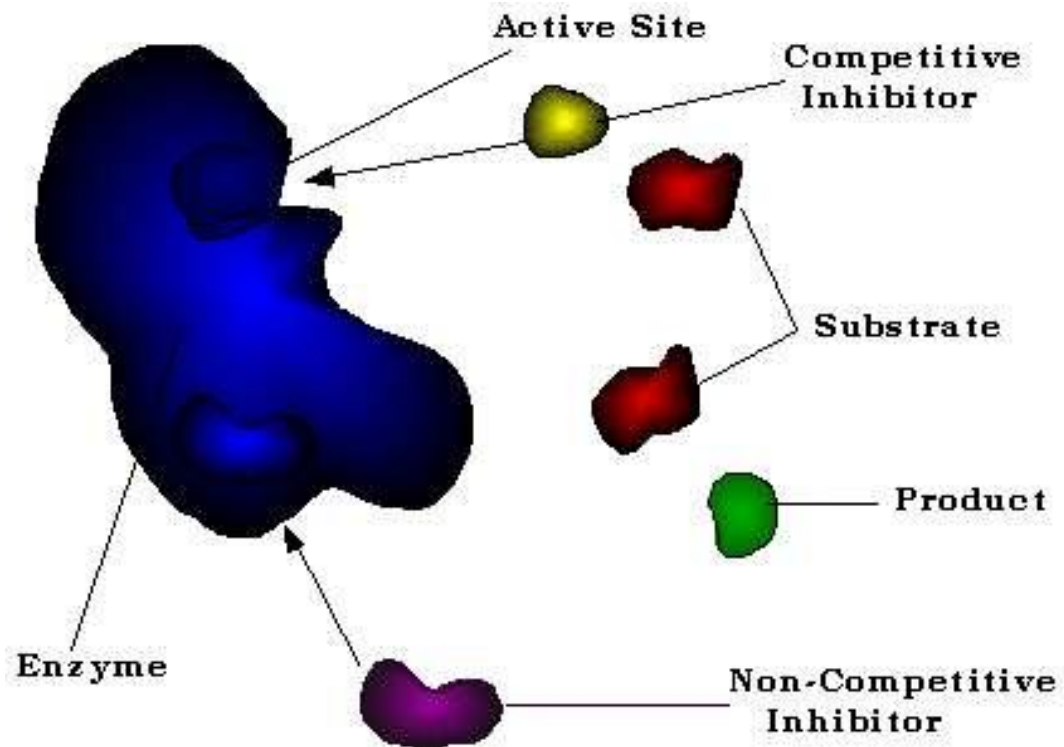
Inhibitie necompetitiva

Exemple de inhibitie necompetitiva: combinarea CN^- cu fierul in *citocrom c oxidaza* sau complexarea ionilor metalelor grele, Hg^{2+} si Ag^+ , prin intermediul gruparilor $-\text{SH}$ din enzima. Nevirapina este un alt inhibitor care se leaga la o portiune hidrofoba din enzima si nu la situsul catalitic.



<i>Inhibitor competitiv</i>	<i>Inhibitor necompetitiv</i>
<i>Inhibitorul prezintă o structură asemănătoare substratului</i>	<i>Inhibitorul nu prezintă analogie cu substratul</i>
<i>Apare o competiție cu substratul la legarea de centrul catalitic al enzimei</i>	<i>Acționează asupra enzimei într-o zonă diferită de centrul catalitic, cu formarea unui sistem inactiv</i>
<i>$(K_M)_{\text{Inhibitor competitiv}} > (K_M)_{\text{În absența inhibitorului}}$</i>	<i>Nu influențează K_M</i>
<i>Nu se modifică $V_{\max}$</i>	<i>$(V_{\max})_{\text{Inhibitor necompetitiv}} < (V_{\max})_{\text{in absența inhibitorului}}$</i>
<i>Ex. sulfamide (medicamente cu acțiune bacteriostatică)</i>	<i>Ex. ionii metalelor grele inhibă enzimele ce conțin grupări tiolice</i>

Inhibitie

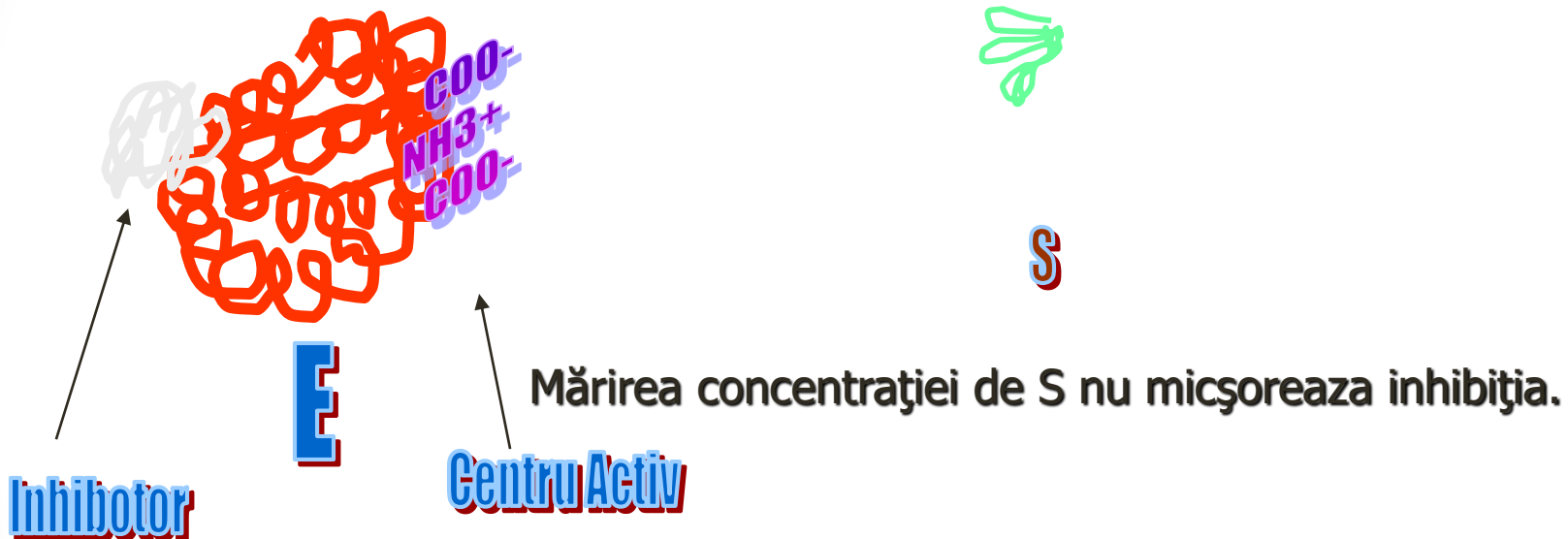


Inhibiția necompetitivă

- inhibitorul nu se aseamănă ca structura cu S
- I și S se leagă simultan cu E dar centrele de legare sunt diferite
- $E + S + I \rightleftharpoons ESI$
- Acest tip de inhibiție nu se înlătură prin exces de substrat.
- Activitatea I constă în micșorarea numărului turnover al E, dar nu și numărul de molecule de S legate.
- Cei mai importanți inhibitori de acest tip în celulele vii sunt produsele intermediare ale metabolismului, care reversibil se fixează la centre specifice (centre alosterice) pe suprafața unor enzime reglatoare și modifică activitatea lor.
- I poate fi înlăturat de substanțe care îl leagă – numite reactivatori

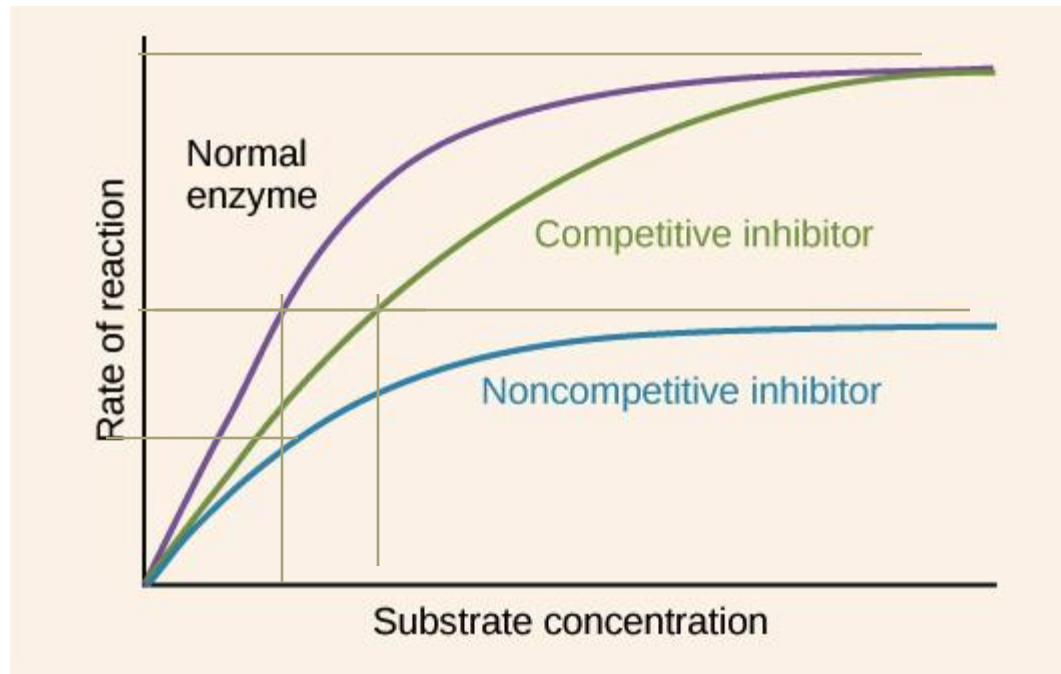
Inhibiție necompetitivă

I și S se leagă simultan cu E în locusuri diferite

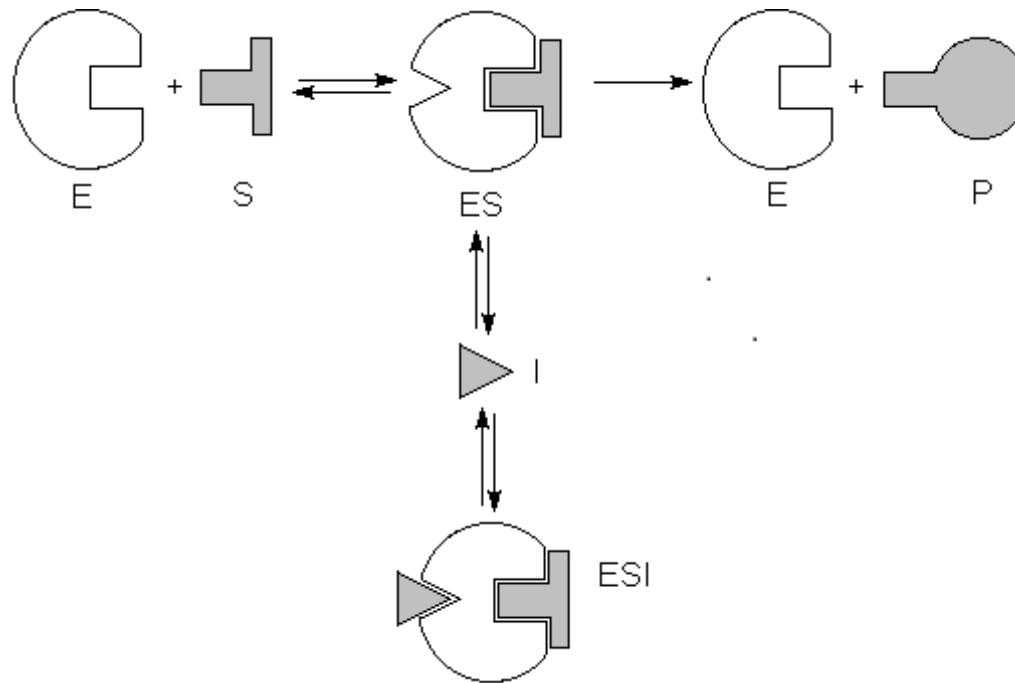


- inhibitorii de acest tip în celulele vii sint produsele intermediare ale metabolismului, care reversibil se fixează la unele E reglatoare și modifică activitatea lor.

Inhibitori

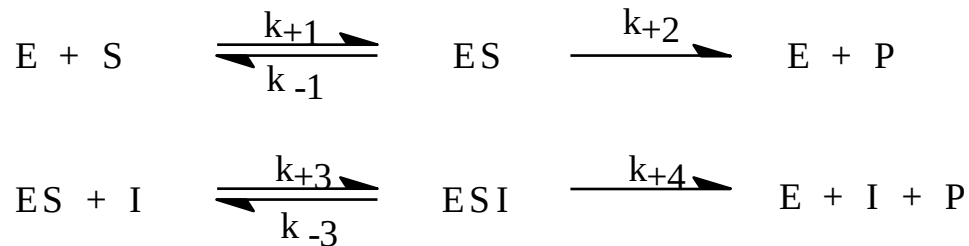


Inhibiția incompetitivă (anticompetitivă, blocaj al complexului intermediar ES)



- Inhibitorul incompetitiv nu se fixează pe enzima liberă, ci interacționează cu complexul E S, modificând valorile ambilor parametri cinetici K_M și v_{max}

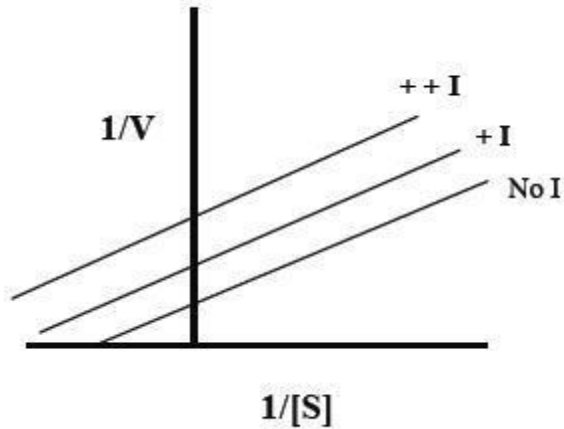
Inhibiția incompetitivă



În inhibiția incompetitivă inhibitorul nu se fixează pe enzima liberă ci interacționează cu complexul ES, motiv pentru care influențează ambii parametri enzimatici ($V_{\max}$ și K_M).

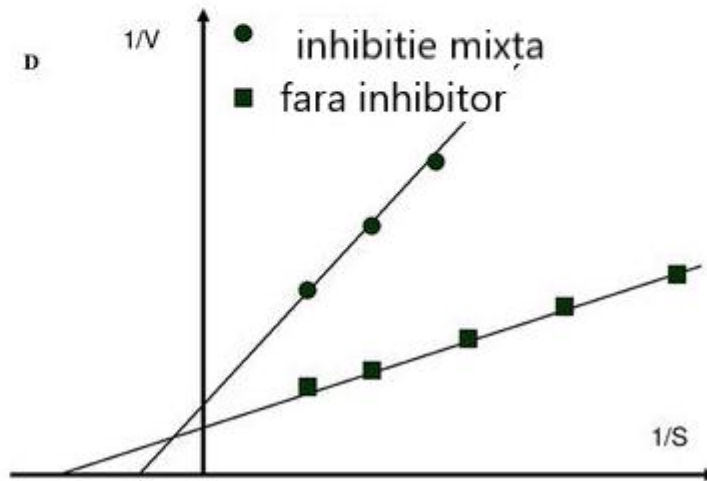
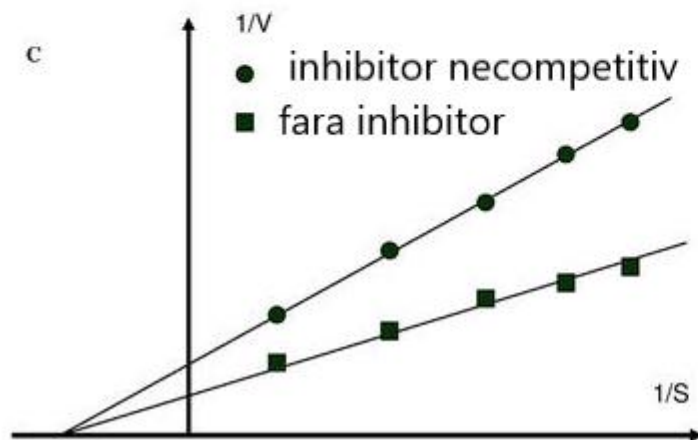
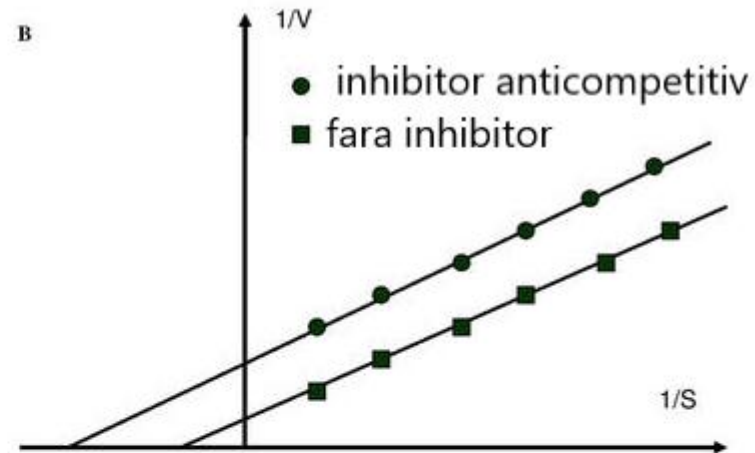
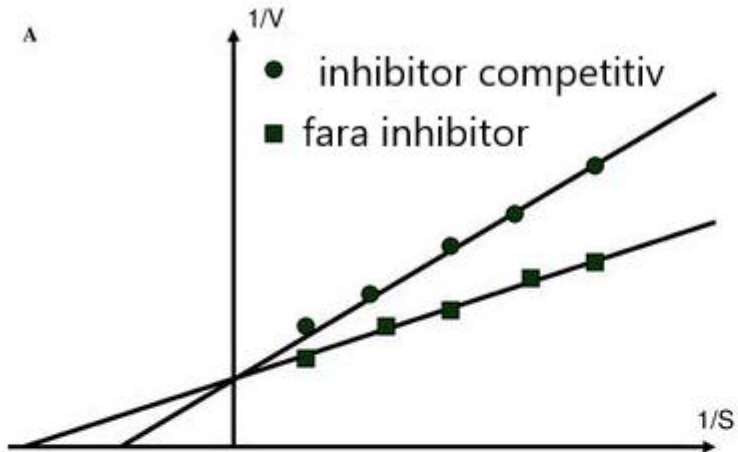
$$v = \frac{V'_{\max} \cdot [S]}{K'_M + [S]} \qquad V'_{\max} = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \quad ; \quad K'_M = K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

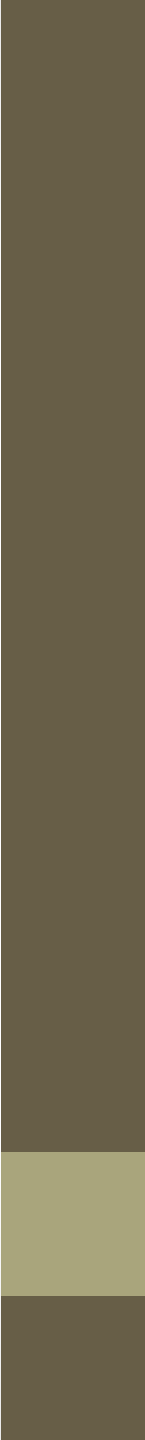
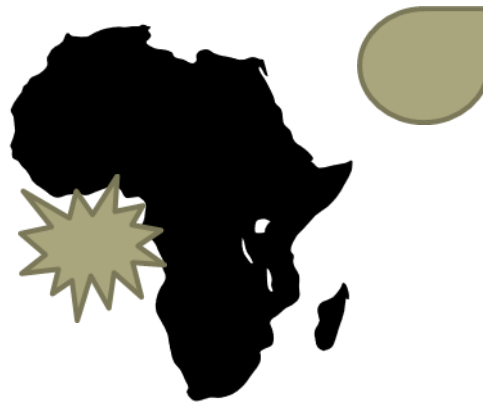
Determinarea parametrilor cinetici



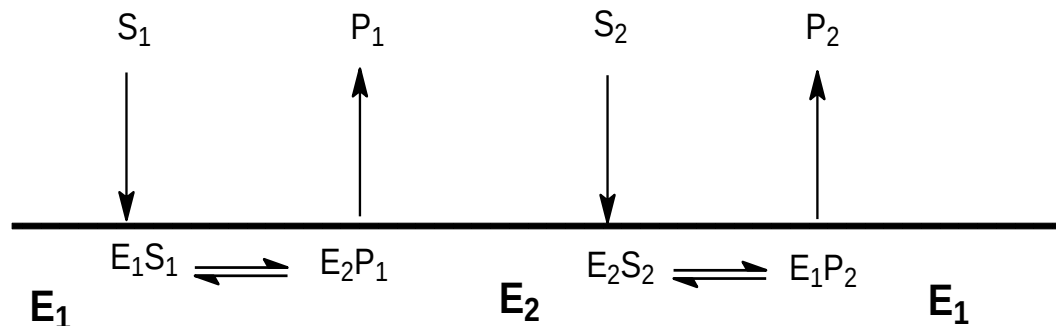
În inhibiția incompetitivă, inhibitorul nu se fixează pe enzima liberă ci interacționează cu complexul Michaelis, din care cauză are efecte similare atât asupra lui V_{max} cât și a lui K_M .

Inhibitie



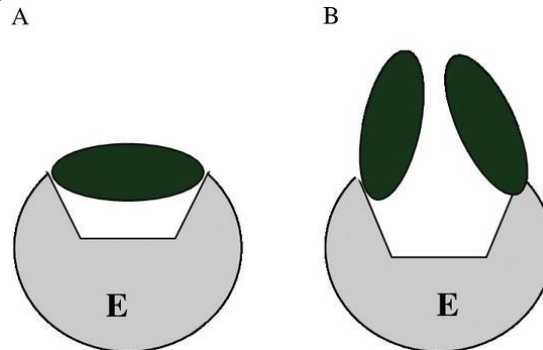


Inhibiție mixtă

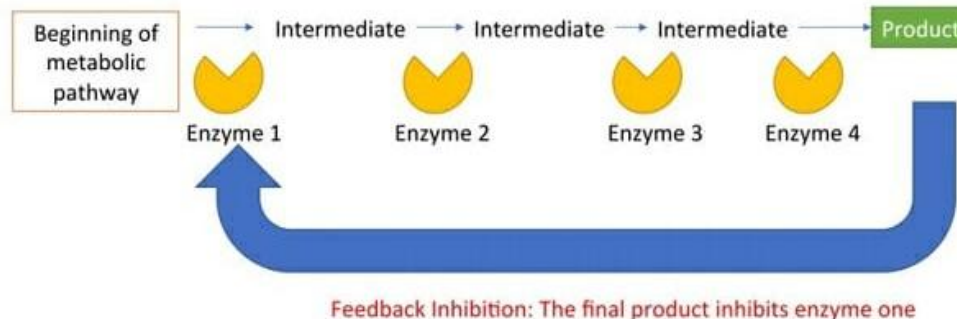


- Enzima poate oscila între două forme conformaționale $E_1 \leftrightarrow E_2$.
- Produsul P_2 se comportă ca un **inhibitor competitiv** în raport cu substratul S_1 și ca un **inhibitor necompetitiv** în raport cu substratul S_2 .
- Produsul P_1 este **inhibitor competitiv** în raport cu substratul S_2 și respectiv **necompetitiv** în raport cu substratul S_1 .

- **inhibiția prin modificarea covalentă** a moleculei enzimei - prin fosforilare pe baza ATP-ului. Unele enzime fosforilate pierd activitatea de exemplu enzima glicogensintetaza
- **Inhibiția prin exces de S** – în CA se fixează simultan surplus de S – ce nu poate fi transformat. Este o inhibiție reversibilă – înlăturarea S.



- **Retroinhibiție** -



6. Alți factori

- ionii din mediu,
- detergenții,
- potențialul redox al mediului,
- presiunea,
- radiațiile UV, X, β

Ionii metalici

O serie de enzime necesita pentru a-si indeplini rolul catalizator prezenta in mediu a unor ioni metalici, in cantitati sub foarte mici, urme, cum sunt α - amilaza (Ca^{2+}), alcool dehidrogenaza (Zn^{2+}), peroxidaza (Fe^{3+}), carbonic anhidraza (Zn^{2+}) sau a altor ioni, majoritatea bivalenti.

- Ionii de calciu: fosforilaza
- Ionii de zinc: Carboxipeptidazele, termolizina (*Bacillus thermoproteolyticus*)
- Ionii de magneziu: Kinazele
- Alți ioni metalici care joacă rol de cofactori:
 - Ureaza este o enzimă care conține ioni de nichel
 - Xantin oxidaza (XO) este o enzimă (pe bază de molibden) care catalizează conversia xantinei la acid uric (antioxidant)
 - Aminoxidazele dependente de ioni de cupru sunt enzime care convertesc aminele primare în aldehide.

Prezenta acestor ioni peste o anumita limita sau a ionilor metalelor grele (Cd, Pb, Hg, Ni) in mediu poate deteriora functia biologica a unor enzime.

Detergentii

Detergentii sunt molecule amfipatice.

Cand concentratia lor in mediu creste, ei pot forma micle, la asa numita *concentratie critica micelara*. Deoarece miclele formate ingreuneaza purificarile prin procedee cromatografice, trebuie utilizate concentratii sub valoarea celei critice micelare.

Unii detergenti nu denatureaza proteinele globulare sau nu interfera cu activitatile biologice ale acestora, in timp ce altii, cum ar fi SDS - Dodecil sulfat de sodiu, sunt puternic denaturanti. In prezenta SDS proteinele globulare sufera modificari conformationale puternice care le afecteaza functia biologica, iar proteinele cu structura oligomera sunt disociate in subunitati.

Detergentii trebuie utilizati cu discernamant in extractia enzimelor. Pentru unele enzime detergentii reprezinta singura posibilitate de solubilizare din formatiunile celulare in care sunt incluse, iar pentru altele detergentii sunt agentii denaturanti puternici. In cazul unor enzime utilizarea detergentilor este necesara nu numai la extractie, ci si pe tot parcursul procedeeelor de purificare, la finalul purificarii obtinandu-se complexe detergent – enzima.

Potențialul redox al mediului

- **Fenomene de oxidare**

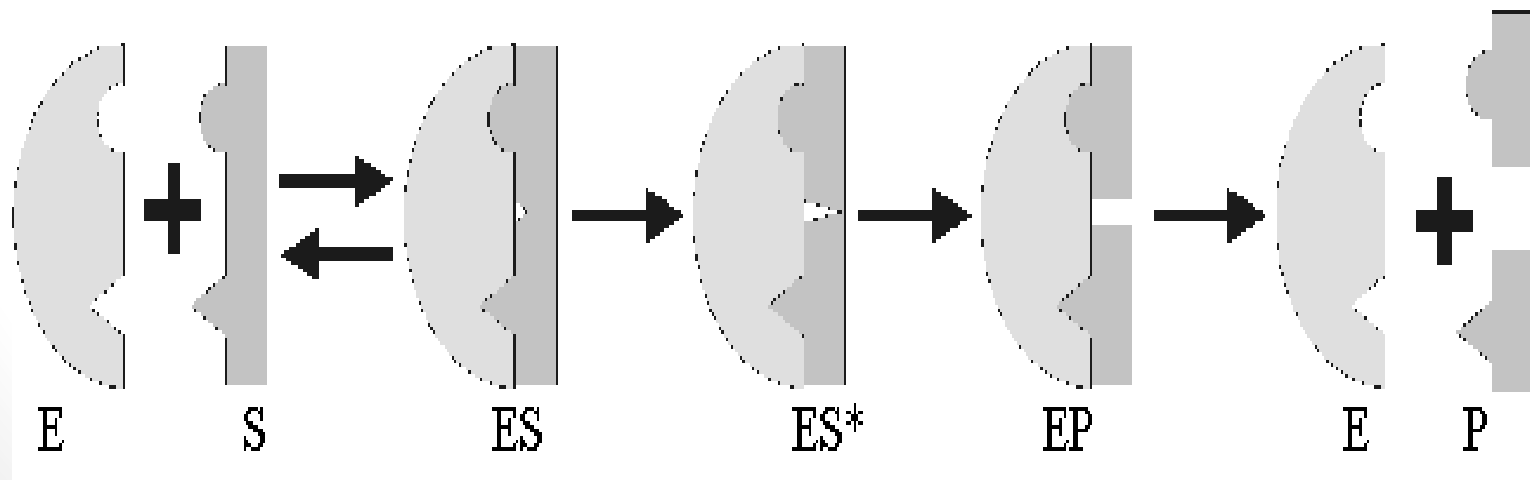
În interiorul celulelor, catenele laterale ale resturilor de cisteina, metionina, sunt menținute în formă redusă (-SH) datorită mediului reductor existent. În urma dezintegrării, celulele devin expuse oxigenului și apare tendința ca grupările SH să formeze punți disulfurice sau să fie oxidate.

Un agent reductor ce se găsește în toate plantele este acidul ascorbic. Utilizarea lui este însă limitată doar la produse farmaceutice sau alimente deoarece trebuie adăugat în cantități mari și are un preț de cost ridicat.

Un studiu întreprins asupra stabilității soluțiilor agenților reductori a evidențiat că aceștia sunt puțin stabili la valori ridicate de pH, la temperaturi ridicate și în prezența unor concentrații mici de ioni de Ca^{2+} . Includerea în soluțiile de acid etilendiamino tetraacetic (EDTA) le mărește stabilitatea.

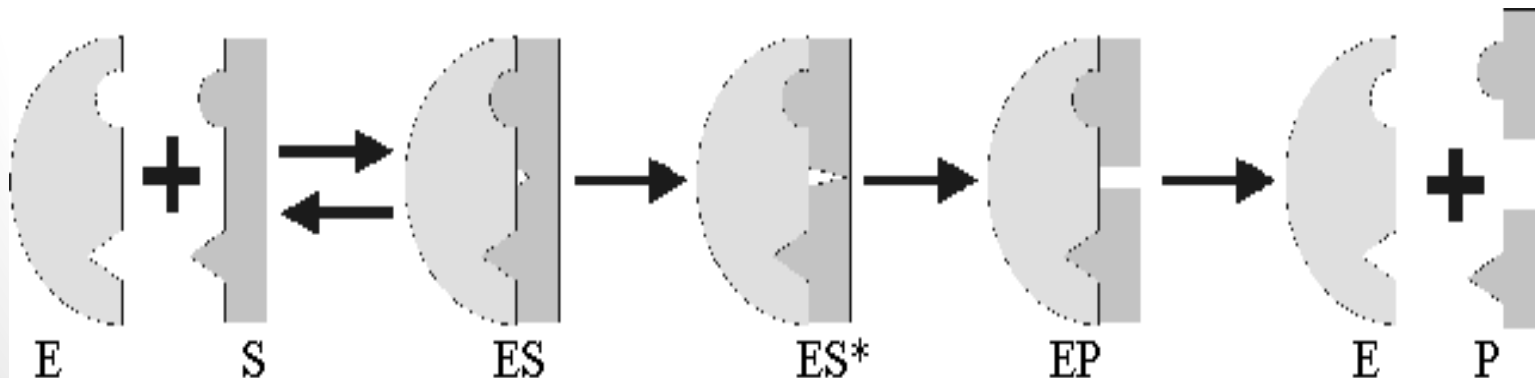
MECANISMUL DE ACȚIUNE AL ENZIMELOR

- Procesul catalizei enzimatice poate fi divizat convențional în trei stadii:
1. **Difuzia S spre E** și legarea cu CA al E - **formarea complexului ES**. Prima etapă de scurtă durată depinde de concentrația substratului și de viteza lui de difuzie spre centrul activ al enzimei.



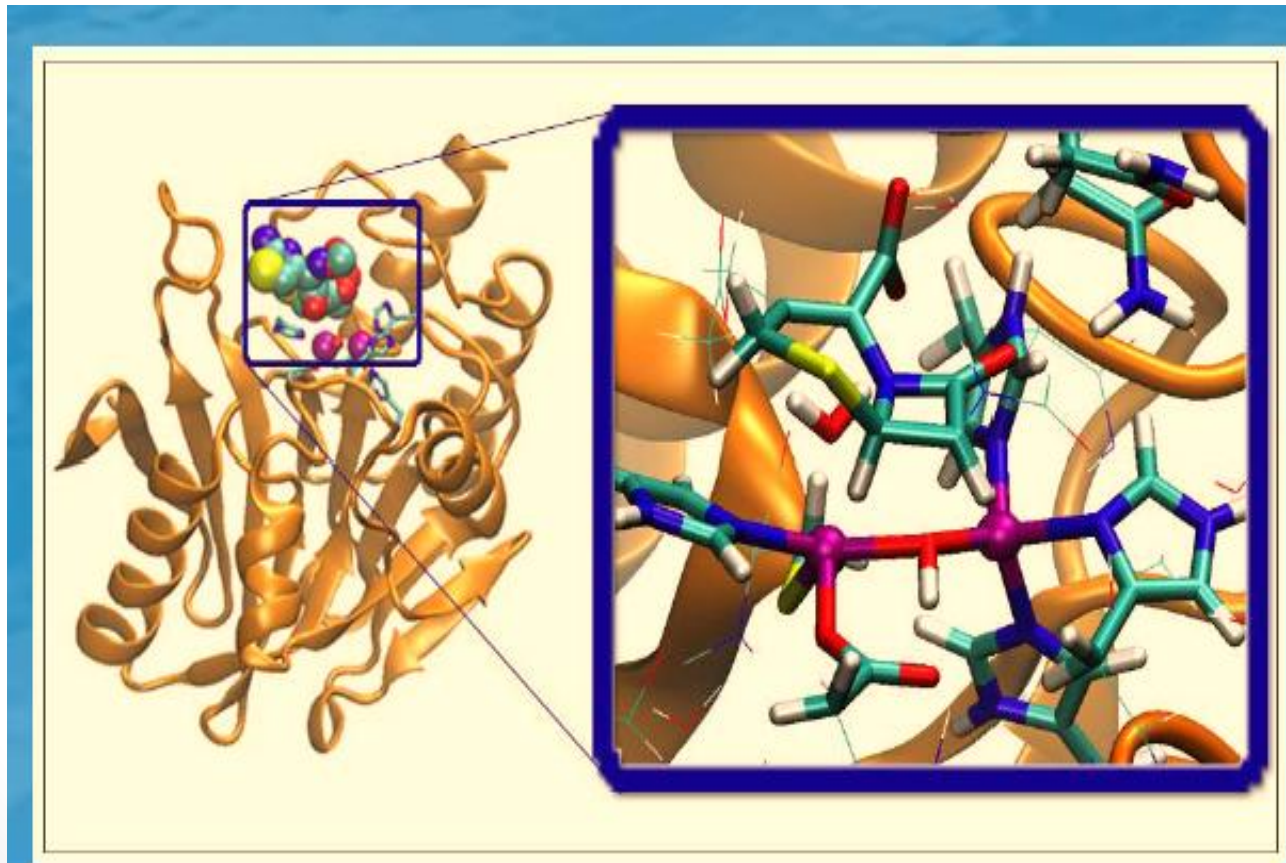
Mecanismul de acțiune al E

2. Transformarea complexului primar ES în complexul activat, indicat în ecuație prin ES^* . Această etapă este cea mai lentă și depinde de energia de activare a reacției chimice respective. La această etapă are loc dereglarea legăturilor S, ruperea lor sau formarea noilor legături în urma interacțiunii grupelor catalitice ale enzimei.
3. Despărțirea produselor reacției de CA al E și difuzia lor în mediul ambiant (complexul EP disociază în E și P).



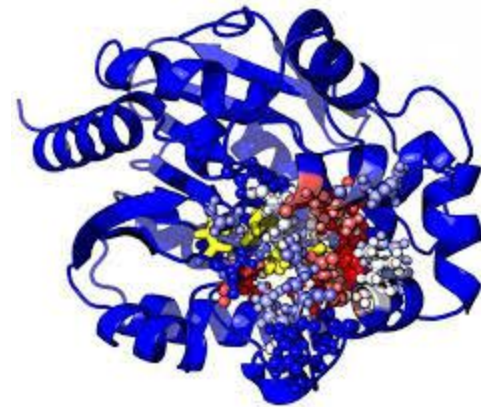
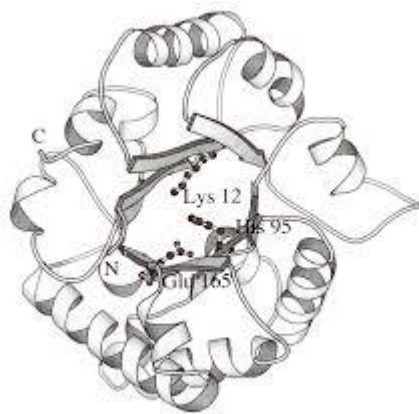
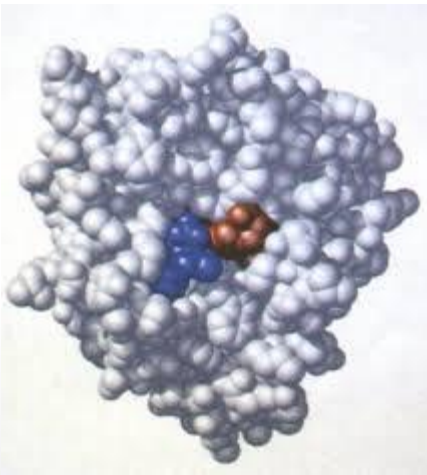
Centrul activ al enzimelor

- O regiune a componentei proteice în care resturile de AA sunt aranjate astfel încât să permită o interacțiune adecvată cu substratul



Centrul activ al enzimelor

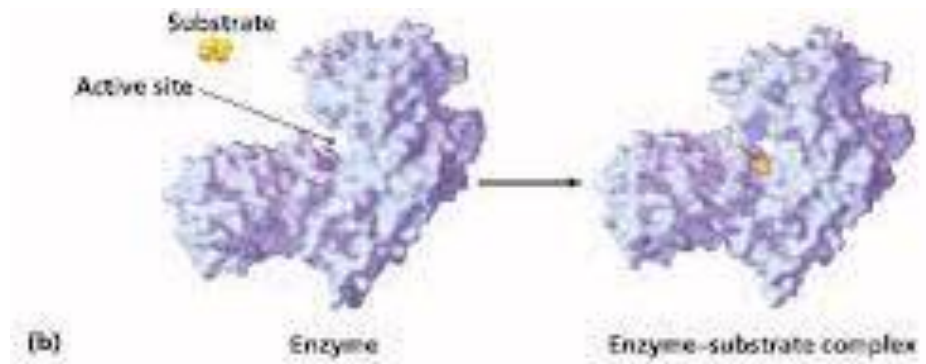
- Centrul activ cuprinde resturi (AA) de fixare a substratului cât și resturi catalitice
- Centrul activ ocupă o porțiune mică din enzimă și este o entitate tridimensională
- Cofactorii joacă un rol important atât în fixarea S cât și în procesul catalitic
- Substratul trebuie să aibă o formă potrivită pentru a pătrunde în centrul activ al unei enzime



Centrul activ al enzimelor

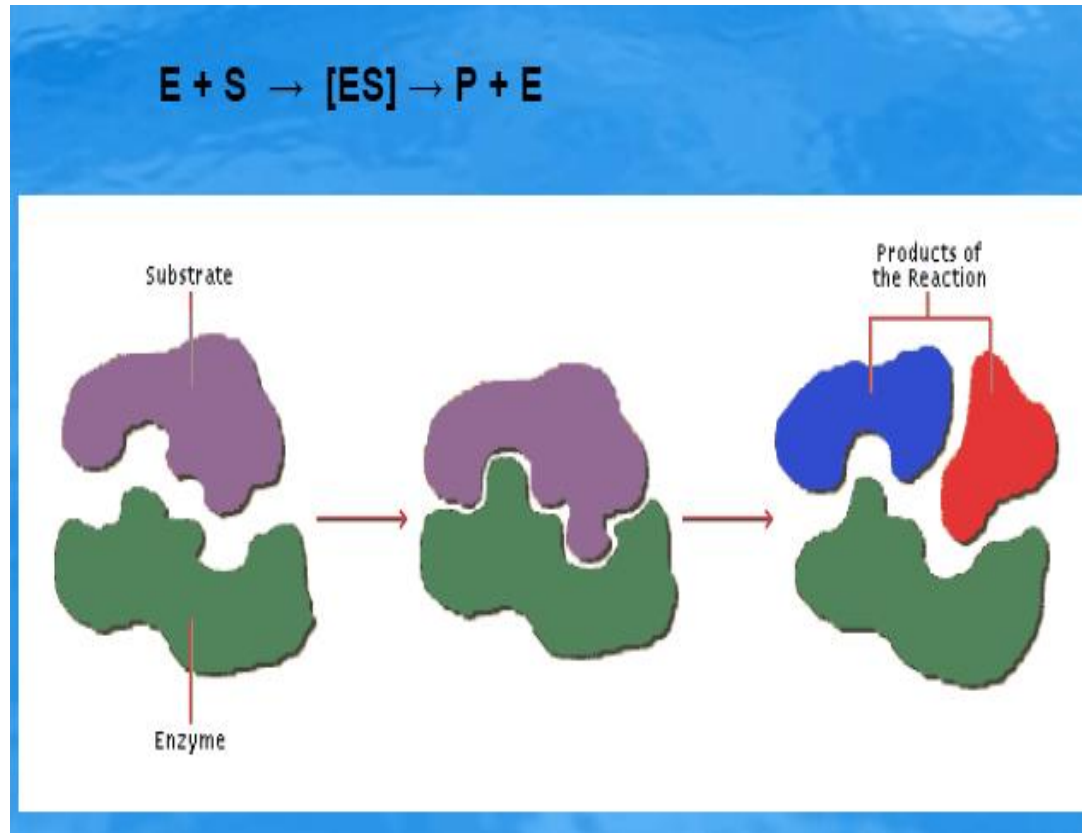
- Complexul ES la nivelul centrului activ este stabilizat prin:

- Atracții electrostatice
- Legături de hidrogen
- Interacțiuni hidrofobe



- După fixarea substratului la centrul activ al enzimei numeroase resturi laterale ale aminoacizilor din vecinătatea substratului catalizează transformarea acestuia.

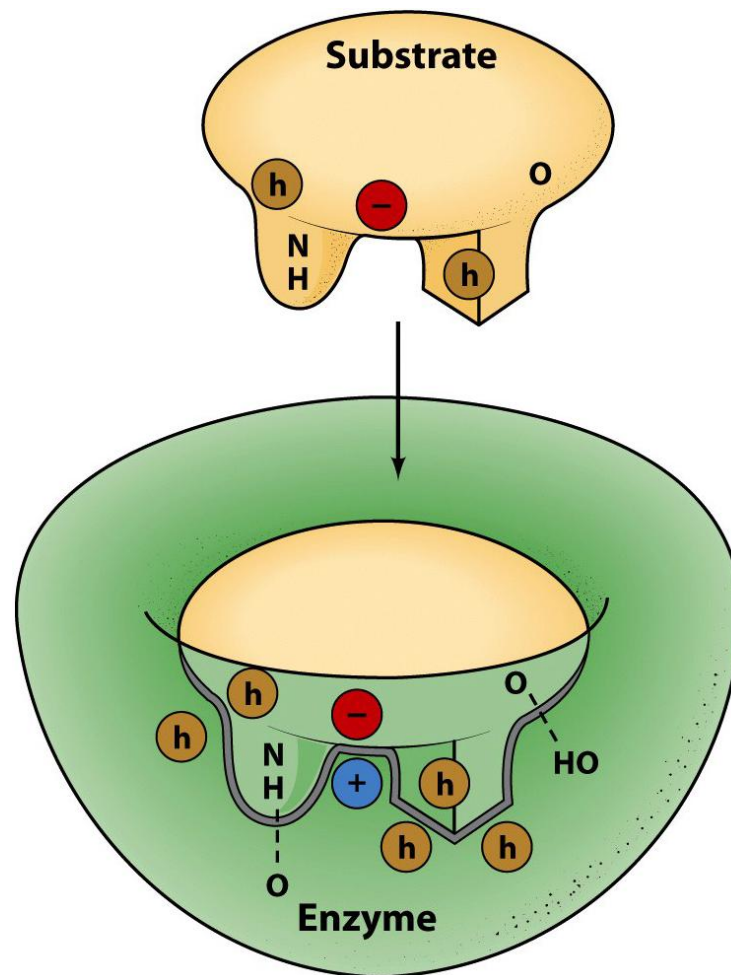
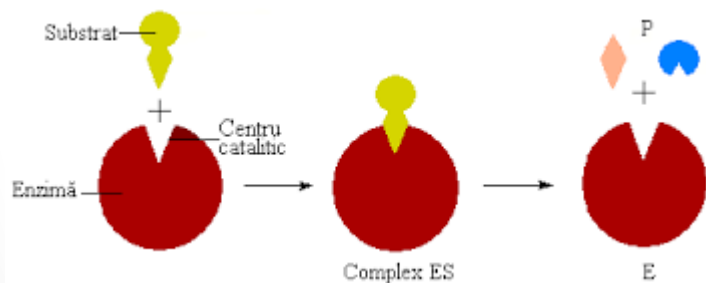
Centrul activ al enzimelor



S se leagă de E prin forțe relativ slabe; complexul ES care se formează trece în produșii de reacție cu eliberarea E sau poate reface S inițial

Exista mai multe ipoteze referitoare la recunoasterea moleculara dintre substrat si enzima

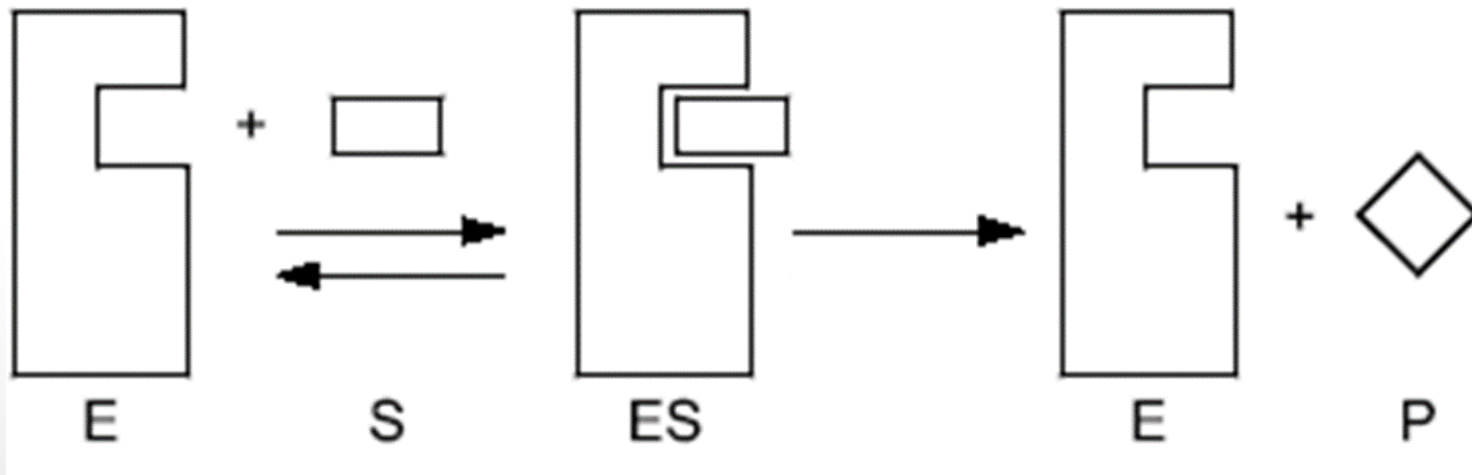
- Ipoteza "lacat -cheie"/ Ipoteza tiparului rigid
- Ipoteza ajustarii induse;
- Ipoteza starii de tranzitie.

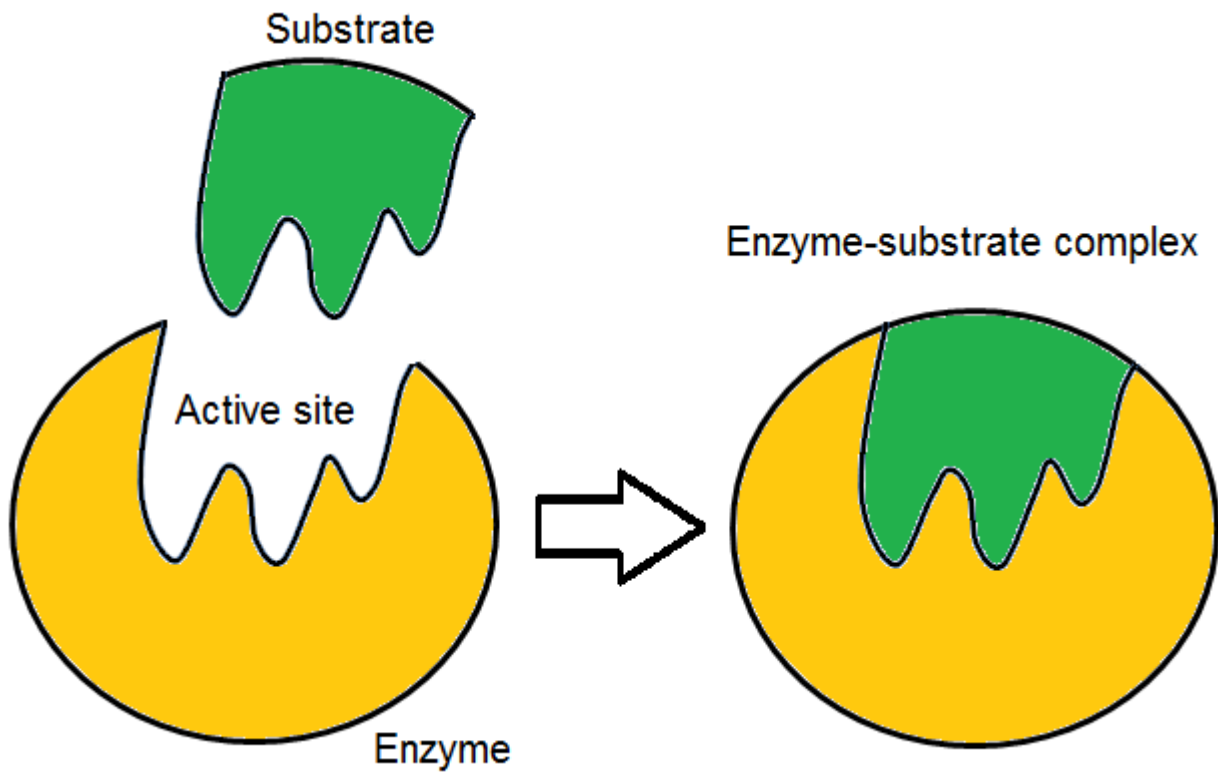


Mecanisme catalitice

După modul de acțiune al enzimei asupra substratului se cunosc mai multe ipoteze.

- **Ipoteza tiparului rigid – lacat – cheie**
- Modelul clasic (Emil Fischer) consideră că potrivirea substratului cu centrul activ al enzimei este analog cu potrivirea “lacăt-cheie”. Acest model presupune o rigiditate a structurii enzimei în zona centrului activ.

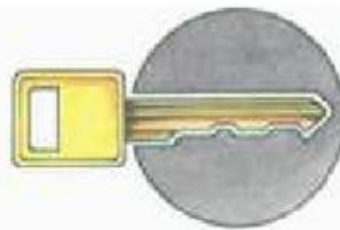




Substrat



Enzimă

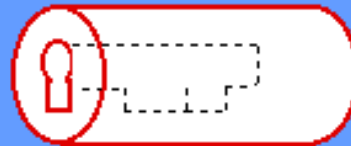


Complexul ES

Lock and Key Analogy



key = substrate



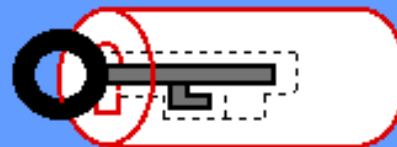
lock = enzyme



correct fit,
will react



incorrect substrate

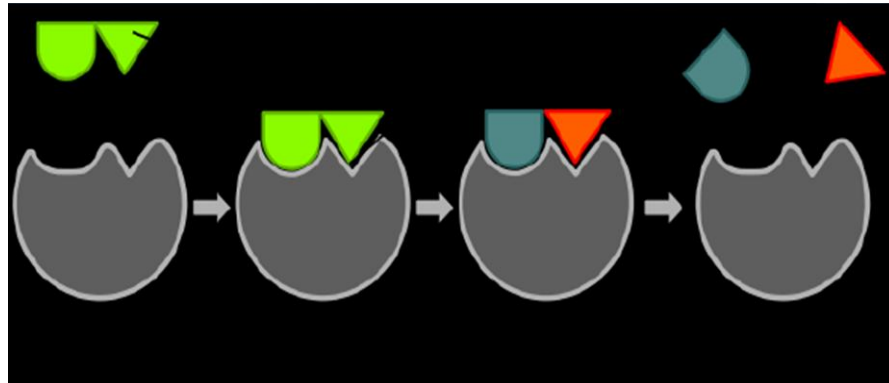
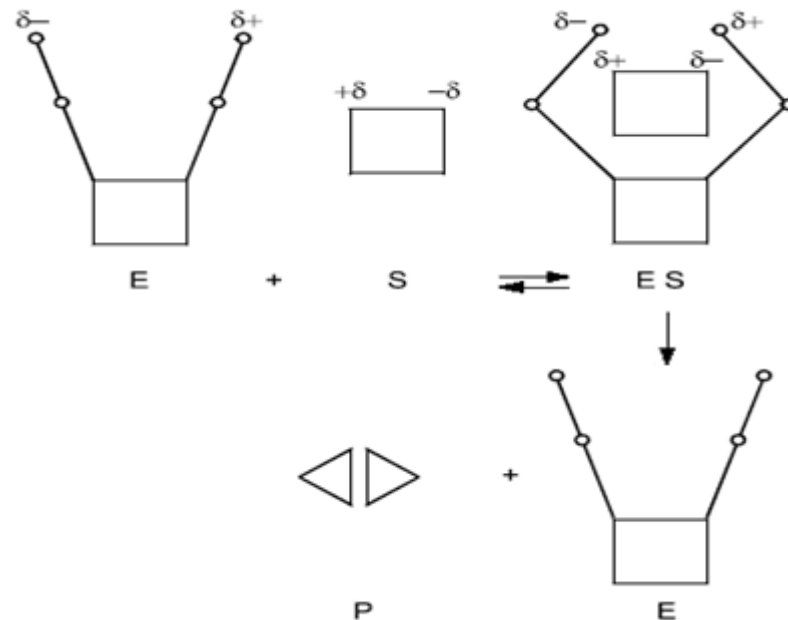


no reaction

Mecanisme catalitice

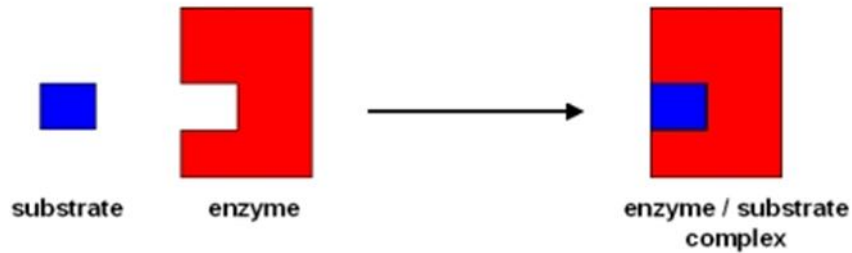
- Ipoteza modificărilor conformaționale**

Ipoteza modificărilor conformaționale enzimatică în timpul formării complexului enzimă-substrat, se materializează prin orientări spațiale prin intermediul grupărilor funcționale polarizate. Modelul Kochland, numit “centrul activ indus”, presupune o flexibilitate a CA. În enzima liberă CA este “preformat” într-o configurație spațială ușor diferită de cea necesară fixării S.

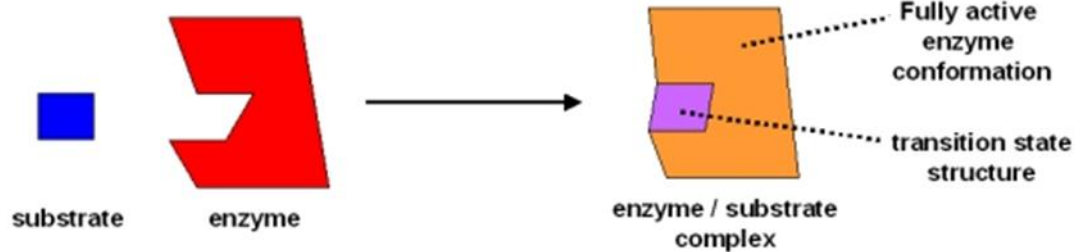


Comparatie

"Lock and Key" Model of Substrate Binding (Fischer)

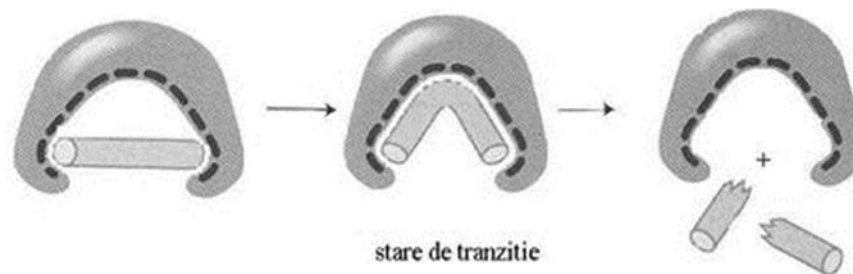


"Induced Fit" Model of Substrate Binding (Koshland)



Ipoteza starii de tranzitie

- **Ipoteza starii de tranzitie** postuleaza existenta complexului ES ca o structura interactiva in care enzimele determina substratul sa adopte o "forma" ce imita structura starii de tranzitie. Conformatia activa a enzimei este relativ instabila in absenta substratului, enzima revenind la conformatia initiala



(Cataliza prin distorsiune)

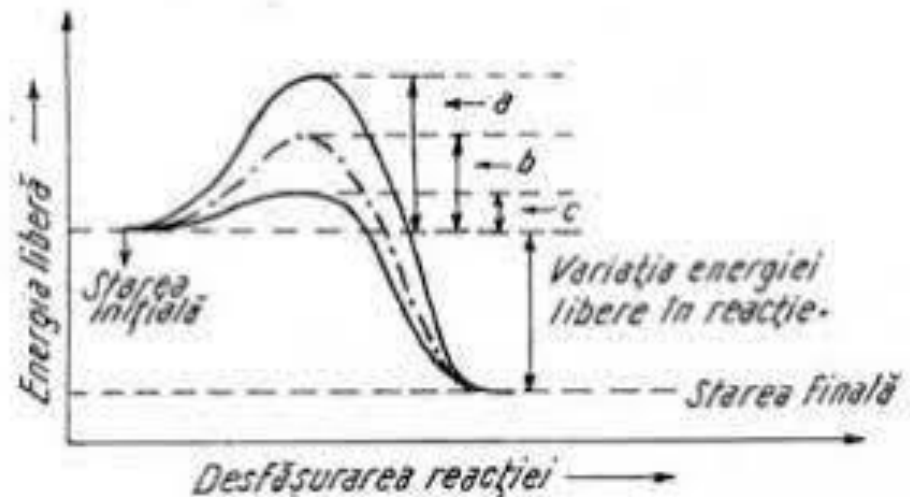
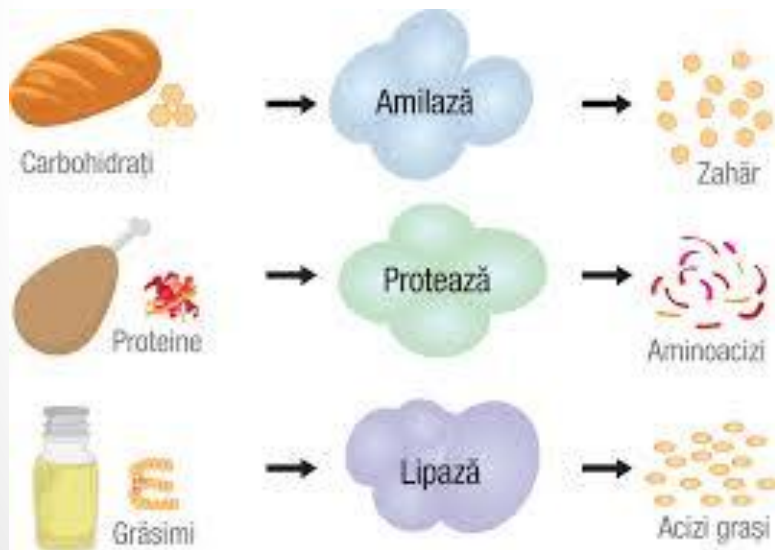
Mecanismul de actiune al enzimelor

- Ipoteza starii de tranzitie (Cataliza prin distorsiune)
- Se aplică în special la enzimele hidrolitice
- Accelerarea vitezei de reacție prin acest mecanism s-ar datora inducerii unei tensiuni în molecula substratului, ceea ce ar determina “activarea” sa.
- Se presupune astfel că legarea specifică a substratului de molecula enzimei induce apariția unei tensiuni sau a unei **deformări în legătura ce urmează a fi scindată**
- Deformarea survenită permite complexului enzimă-substrat să fie mai reactiv decât substratul singur și să se transforme mai rapid în produșii de reacție.

Mecanismul de actiune al enzimelor

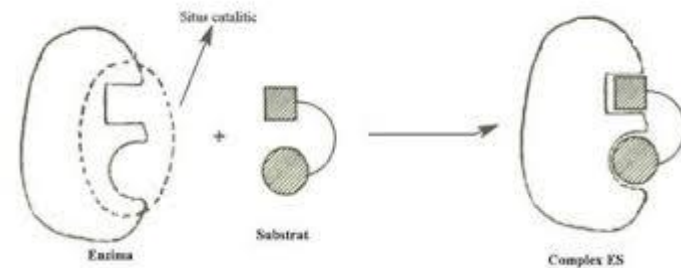
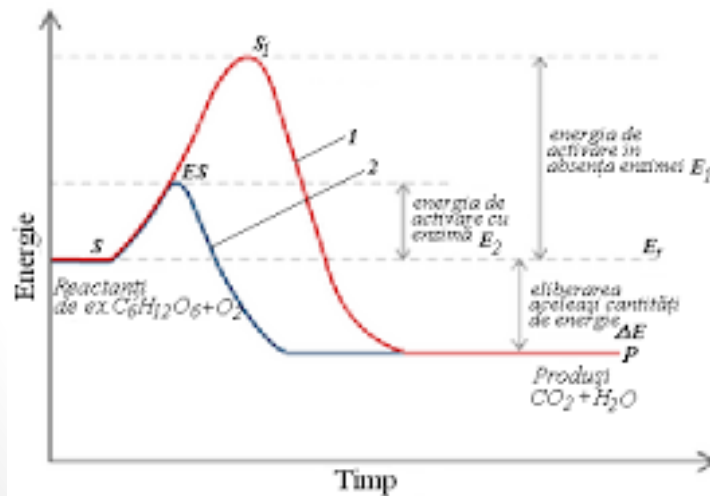
Enzimele sunt catalizatori biologici, care nu sunt produsi si nici consumati in timpul reactiilor biochimice. NU declanseaza o reactie chimica ci doar intensifica viteza reactiilor catalizate

ENZIMELE MODIFICA VITEZA REACTIEI DAR NU CONSTANTA DE ECHILIBRU



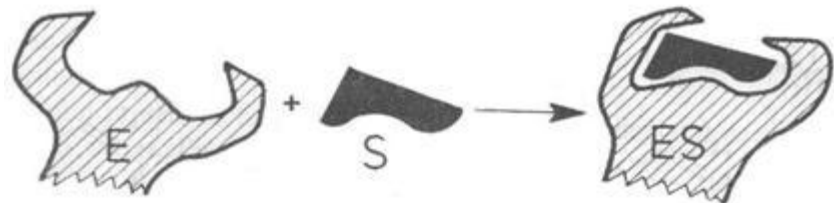
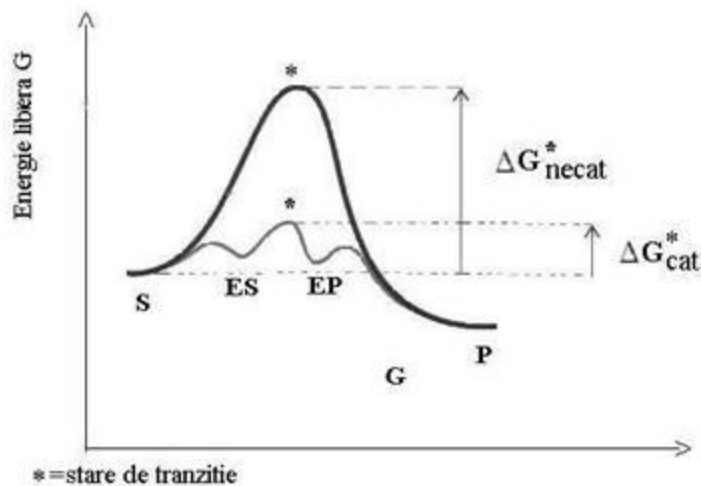
Mecanismul de actiune al enzimelor

- Intr-o reactie $S \rightarrow P$, la un moment dat un anumit numar de molecule de substrat au energia necesara sa atinga o stare reactiva si instabila, denumita stare de tranzitie, intermediara intre S si P
- Aceasta poate fie sa se transforme in produsul P fie sa reformeze substratul si se situeaza la punctul maxim al diagramei energetice ce caracterizeaza relatia intre S si P



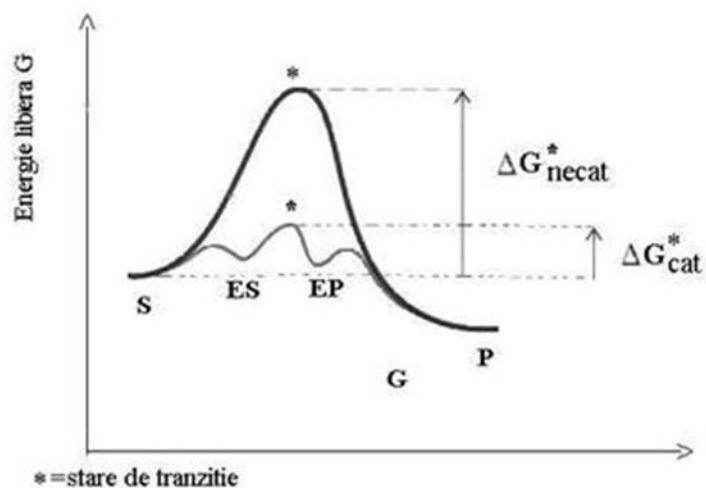
MECANISMUL REACTIEI:

- Enzima formează cu substratul un produs intermediar reactiv, cu o viață scurtă. Sub această formă intermediară, substratul intrat în reacție suferă modificări electronice sub acțiunea centrilor activi ai enzimei, rezultând produsul de reacție.



Mecanismul de actiune al enzimelor

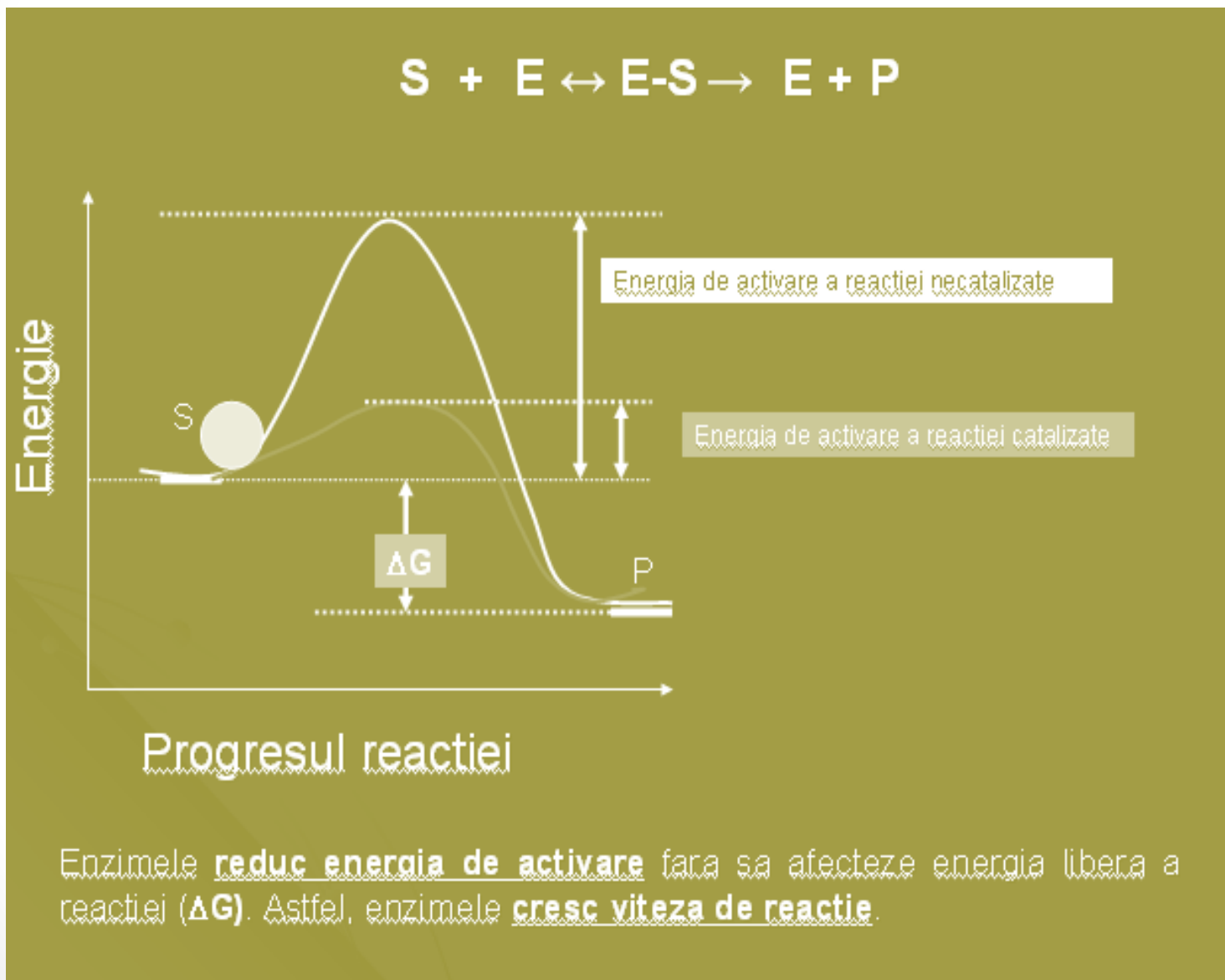
- Reactia se desfasoara cu o viteza proportionala cu concentratia moleculelor de substrat ce au energia necesara pentru a realiza tranzitia
- Cu cat este mai mare aceasta energie fata de energia medie cu atat sunt mai putine molecule capabile sa realizeze tranzitia si reactia se desfasoara mai greu
- Bariera de energie dintre energia starii de tranzitie si energia libera medie a lui S se numeste **energie de activare**.



Mecanismul de actiune al enzimelor

- Energia libera a unei reactii (ΔG)
- Energia de activare: necesara energizarii unui substrat pentru a atinge o stare de tranzitie in care exista o mare probabilitate ca o legatura chimica sa se formeze sau sa se rupa in substrat
- Enzimele reduc energia de activare fara sa afecteze energia libera a reactiei (ΔG) Astfel, enzimele cresc viteza de reactie

Mecanismul de actiune al enzimelor



Mecanismul de acțiune al enzimelor

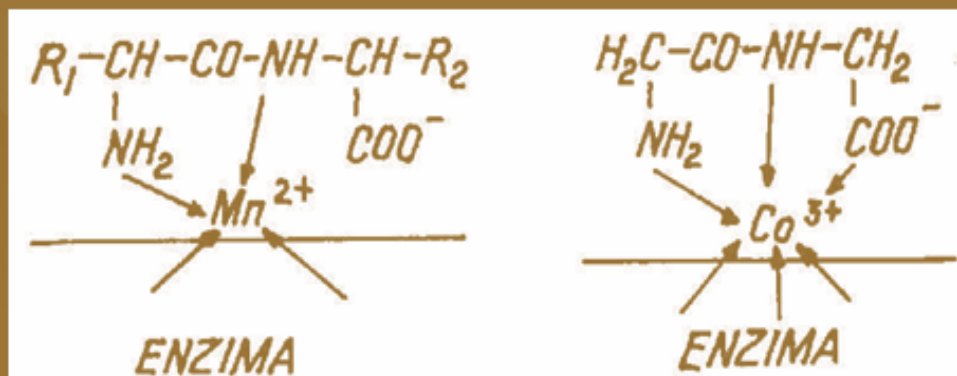
- Enzimele nu acționează toate după un singur mecanism de reacție universal valabil
- Dintre numeroasele mecanisme de acțiune propuse, cele mai importante sunt:
 - ❖ cataliza acido-bazică,
 - ❖ cataliza covalentă
 - ❖ cataliza prin ioni metalici

Mecanismul de actiune al enzimelor

- Cataliza prin ioni metalici

Rolul metalelor in cataliza enzimatica

- Sunt componente esentiale ale centrului catalitic (activ);
- Intermediaza formarea complexului ES;
- Necesari in mentinerea structurii 3D a enzimei;
- Participa in reactii de transfer de electroni



Mecanisme catalitice

- În **cataliza prin intermediul ionilor metalici**, enzimele necesită pentru activare ioni pozitivi metalici. Din această clasă de enzime se disting metalo-enzimele și enzimele metal activate.
 - **Metaloenzimele** conțin ioni ai metalelor tranziționale legați puternic de enzimă (Fe^{2+} ; Fe^{3+} ; Zn^{2+} ; Co^{3+} ; Mn^{2+}).
 - **Enzimele metal activate** leagă slab ionii metalelor alcaline sau alcalino-teroase (Na^+ ; K^+ ; Ca^{2+} ; Mg^{2+}). Ionii metalelor participă la procesele catalitice prin medierea reacțiilor de oxidare-reducere modificându-și reversibil stările de oxidare sau prin stabilizarea electrostatică și ecranarea sarcinilor negative.

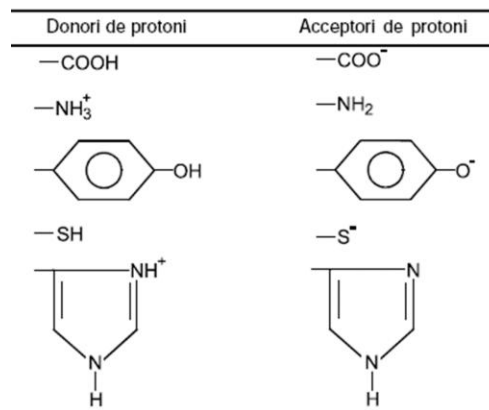
Mecanismul de actiune al enzimelor

- **Cataliza acido-bazica**

- Este cel mai frecvent mecanism întâlnit in cataliza enzimatică
- Consta in procese de transfer de protoni intre gruparile acido-bazice ale enzimei si cele ale substratului

În calitate de catalizatori acido-bazici generali pot funcționa

- grupările carboxilice sau aminice libere ale resturilor aminoacizilor acizi sau bazici;
- gruparea tiol a cisteinei,
- gruparea imidazol a histidinei și
- gruparea hidroxil a tirozinei.



Mecanismul de actiune al enzimelor

Cataliza acido-bazica

Viteza reactiilor catalizate de acizi sau baze este influentata de doi factori importanti:

- **Taria acizilor sau a bazelor:** gruparea imidazol a histidinei are $pK_a=6$, actionand ca donor/acceptor la pH fiziologic
- **Viteza cu care acidul sau baza cedeaza/accepta protoni;** si din acest punct de vedere este eficienta His

In **chimotripsina**, aminoacizii Asp 102 si His 57 functioneaza ca grupe cu caracter acid si, respectiv caracter bazic.

Mecanismul de actiune al enzimelor

- **Cataliza covalenta**
- Formarea complexului enzimă-substrat presupune formarea unei legături puternice, de tip covalent (punere in comun a electronilor), între S și E
- In acest tip de cataliza, atacul unei grupe electrophile sau nucleofile din situsul activ al enzimei asupra substratului determina atasarea acestuia prin legaturi covalente la enzima.
- Enzime formeaza legaturi covalente cu substratul, labilizandu-l fata de cel in forma nelegata

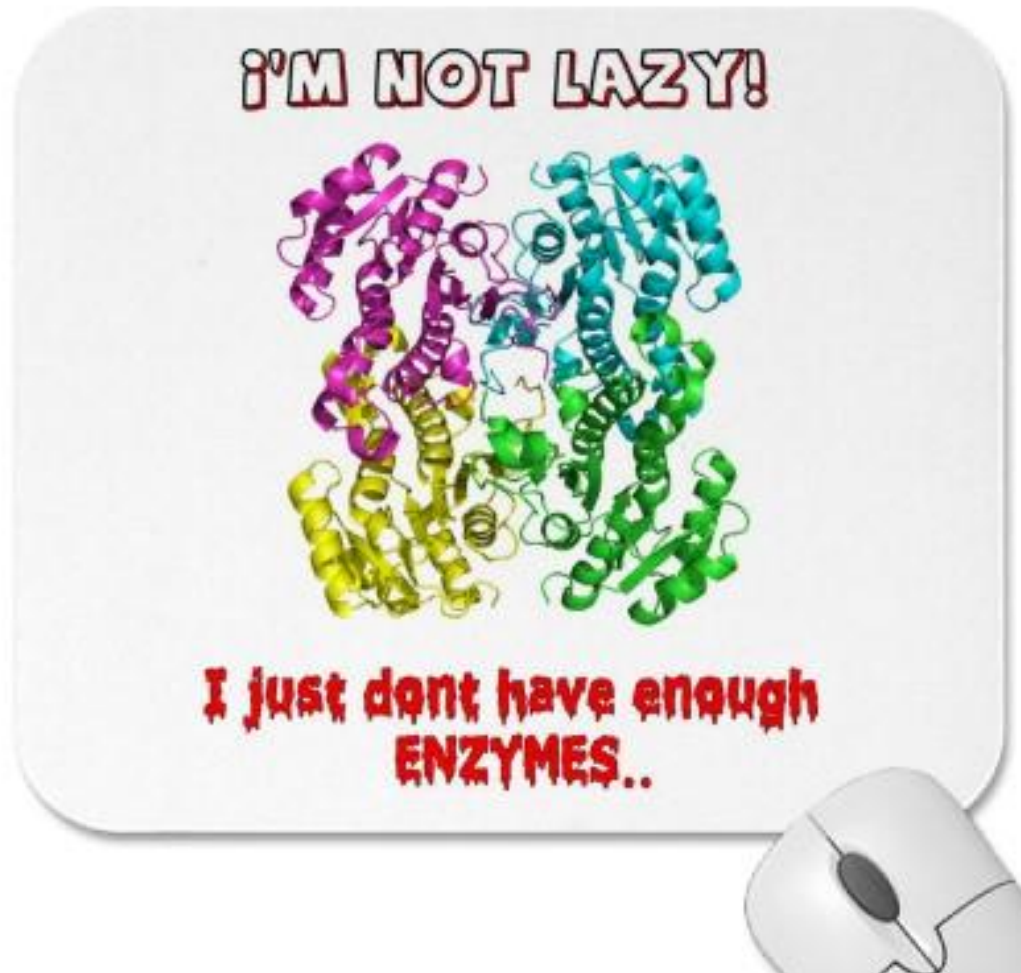
Enzime care actioneaza prin cataliza covalenta

Enzima	Aminoacid implicat	Intermediar covalent
Serin proteaze	Serina	Acil - Serina
Gliceraldehid-3-P-DH	Cisteina	Acil - Cisteina
Fosfataza alcalina	Serina	Fosfoserina
Aldolaza	Amino	Baza Schiff
Decarboxilaze, transaminaze		

Care este mecanismul ce atribuie enzimelor o activitate intensă?

1. *Apropierea și orientarea substratului fata de grupa catalitică*: legătura chimică explorată a substratului se află nu numai foarte aproape, dar și direct orientată față de grupele catalitice, în consecință, probabilitatea de a atinge starea de tranziție de către complexul ES crește.
2. *Tensionarea și deformarea* sunt într-o concordanță indusă: legarea substratului produce modificări conformaționale în molecula enzimei, tensionând structura centrului activ, concomitent deformându-se și substratul legat, ceea ce favorizează atingerea stării de tranziție a complexului ES. Apare concordanța indusă, adică modificări în structura terțiară și cuaternară a moleculei enzimaticice.
3. *Cataliza generală acido bazică*: în centrul activ al enzimei conlucrează grupe specifice ale resturilor de aminoacizi, servind drept donatori sau acceptori de protoni. Grupele acide și bazice reprezintă catalizatori efectivi ai multor substanțe organice din soluțiile apoase.
4. *Cataliza covalentă*: Enzimele reacționează cu substraturile, formând compuși ES instabili legați covalent, care în reacțiile ulterioare formează produsul reacției mult mai rapid decât în reacțiile necatalizate.

Avem nevoie de enzime!



Imobilizarea enzimelor

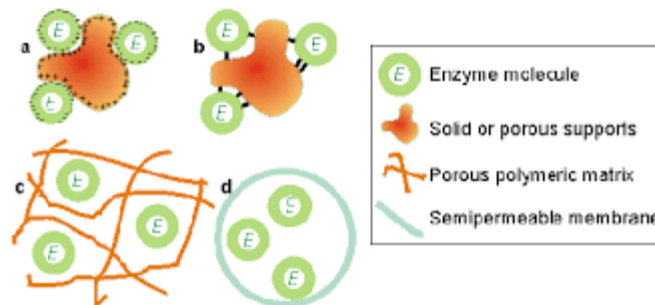
- *Prin imobilizarea enzimei se înțelege limitarea gradului de „libertate” al moleculei proteice datorită legării sale de un suport prin intermediul altor funcții decât cele care fac parte din situsul activ al enzimei.*
- Enzimele imobilizate prezintă o serie de avantaje care permit utilizarea lor în biotehnologiile actuale: separarea ușoară din amestecul de reacție, reciclarea catalizatorului, stabilitatea lui, conducerea în sistem continuu a unui proces, reglarea vitezei de reacție, modificarea controlată a proprietăților și chiar a specificității enzimelor, obținerea unui bioproduct de puritate avansată, posibilitatea de studiu a aspectelor fundamentale a enzimologiei și biologiei moleculare.
- Deși există și o serie de dezavantaje (sterilizarea reactoarelor, limitări difuzionale, modificarea proprietăților enzimatică, colmatarea de suporturi și reactoare), avantajele le compensează și determină utilizarea lor la nivel industrial.

Imobilizarea enzimelor

- Principalele metode de imobilizare sunt de includere sau de legare a enzimelor în diferite suporturi insolubile sau care devin insolubile după ce se combină cu enzima.

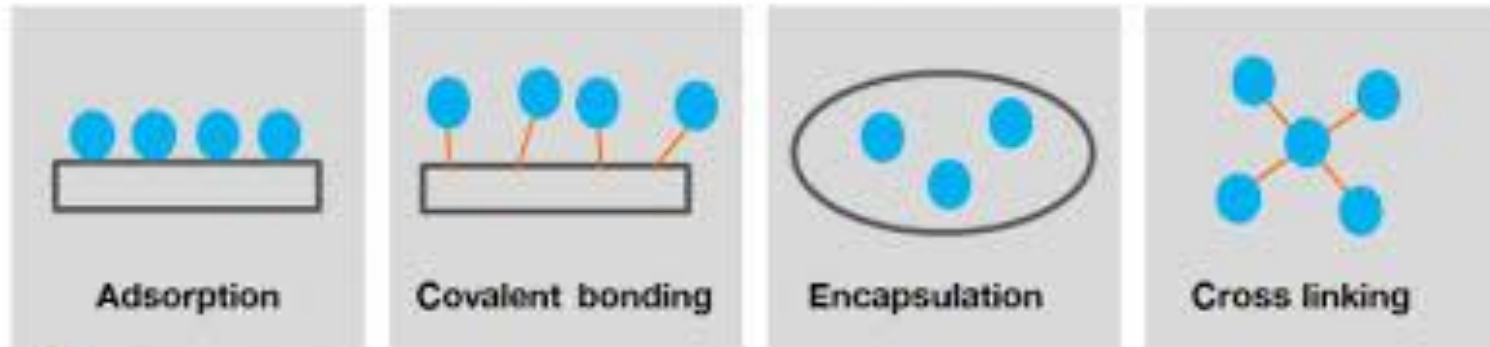
- Pot fi:

- *adsorbție,*
- *incluziune și*
- *legare covalenta.*

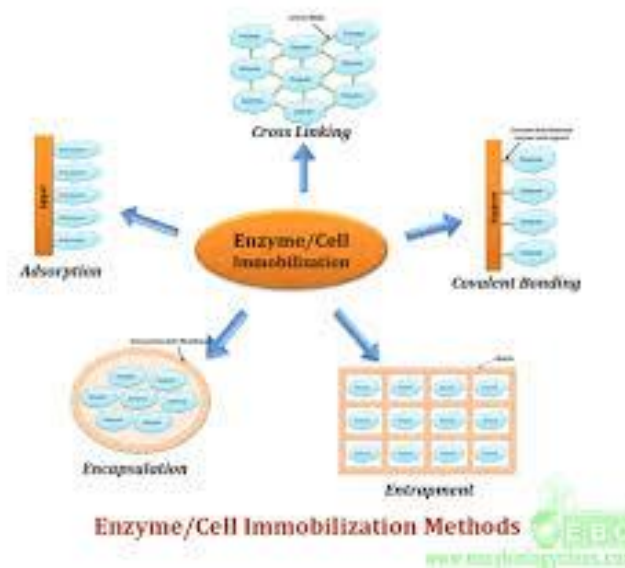
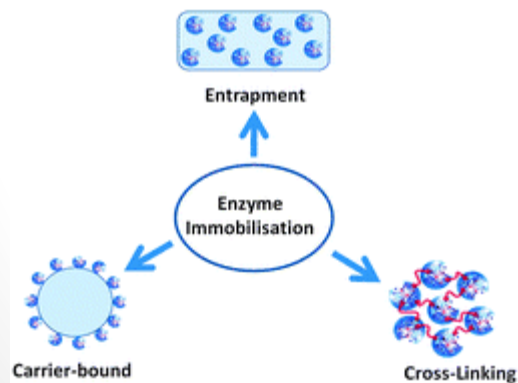


- Indiferent de modul prin care se realizează imobilizarea trebuie să se asigure condiții în care se menține stabilitatea conformației native a enzimei (temperaturi scăzute, pH optim de acțiune etc.) și suportul trebuie să : nu denatureze enzima, să fie rezistent la modificările de pH sau temperatură și să posede proprietăți hidrofile.

Imobilizarea enzimelor

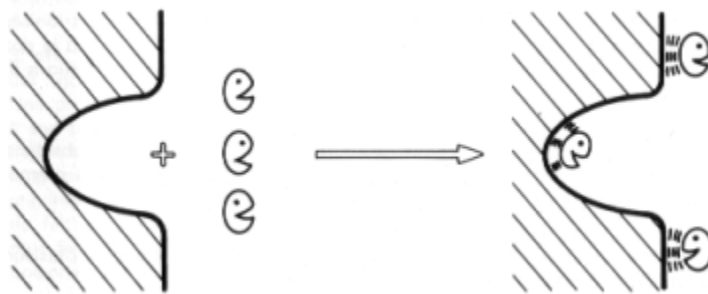


● = Enzyme molecule



Adsorbția

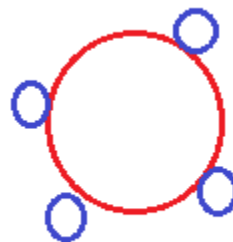
- **Adsorbția** este un procedeu de **legare reversibilă** a enzimei pe un suport insolubil, realizându-se conform principiilor cromatografiei. Enzimele pot fi adsorbite ca rezultat al interacțiilor, de tip secundar, fizice și ionice, între grupările funcționale ale enzimelor și ale suportului.



Tipuri de interacții în procesul de adsorbție

Interacțiile enzimă –suport implică, într-un mod mai mult sau mai puțin complex legături cu nivel energetic scăzut. Aceste interacții pot fi :

- *Interacții Van der Waals*
- *Interacțiile hidrofobe*
- *Legătura de hidrogen*
- *Transferul de sarcini*
- *Schimb de liganzi*
- *Chemisorbție.*



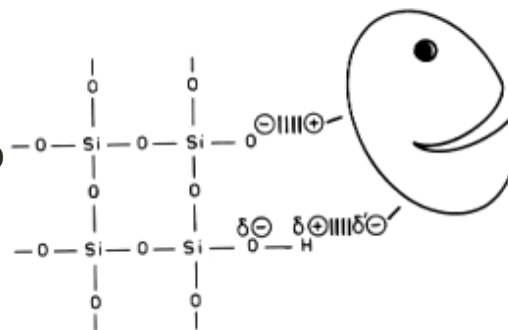
Principalele tipuri de suport.

- Ca suport adsorbanti de enzime pot fi utilizate un număr foarte mare de compuși. Ei pot fi suport minerali sau organici.

1. Suport minerali.

- ☐ Argile
- ☐ Sticlă poroasă, silice poroasă

Alte materiale cum sunt materiale ceramice, hidroxiapoxizi și hidroxi ai metalelor, cuarțul



2. Suport organici

- ☐ Schimbătorii de ioni
- ☐ Colagenul.
- ☐ Alți suport pot fi celuloza, amidonul , taninurile, poliuretanul etc....

3. Imobilizarea prin punți metalice se poate aplica atât suportilor anorganici cât și organici. In aceste metode suportilor utilizați (argile sau organici cum este celuloza) li se adaugă pentru activare unele săruri metalice care vor stabili cu enzima punți metalice sau chelați. Sărurile metalice utilizate pot fi TiCl_4 , TiCl_3 , SnCl_4 , SnCl_2 , ZrCl_4 , etc. Suportul solid este menținut timp de 5 – 10 minute în soluția sării metalice și apoi uscat la 45°C . Sarea care nu a reacționat este eliminată prin spălare. Enzima este apoi imobilizată prin simpla punere în contact cu suportul astfel activat.

Avantaje și dezavantaje

Avantaje

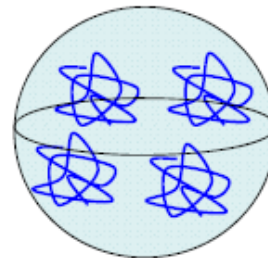
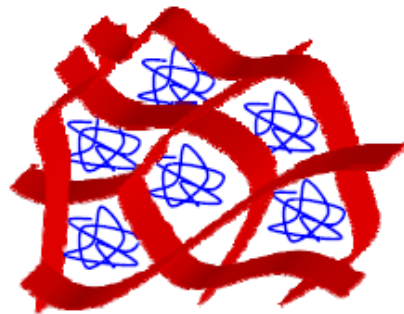
- Este extrem de ușor de aplicat fiind suficienta punerea în contact a enzimei cu suportul. Este posibilă regenerarea complexelor enzime – suporturi.

Dezavantaje

- Fenomenele de partiție fiind prin excelență reversibile riscul apariției procesului de desorbție poate oricând apare și este foarte variabil în funcție de afinitatea enzimei față de suport.
- Afinitatea unei enzime pentru un suport dat depinde de repartiția grupelor funcționale pe suprafața sa și deci de structura sa tridimensională fiind dificil de stabilit *a priori* eficacitatea unei adsorbții.
- Enzima fiind imobilizată prin legătură directă pe suprafața unui suport, accesibilitatea la situsul activ poate fi dificilă în conformitate cu orientarea moleculei de enzimă.
- Capacitatea de adsorbție este direct determinată de suprafața disponibilă, adsorbanții prezentându-se adesea sub forme extreme de variate.

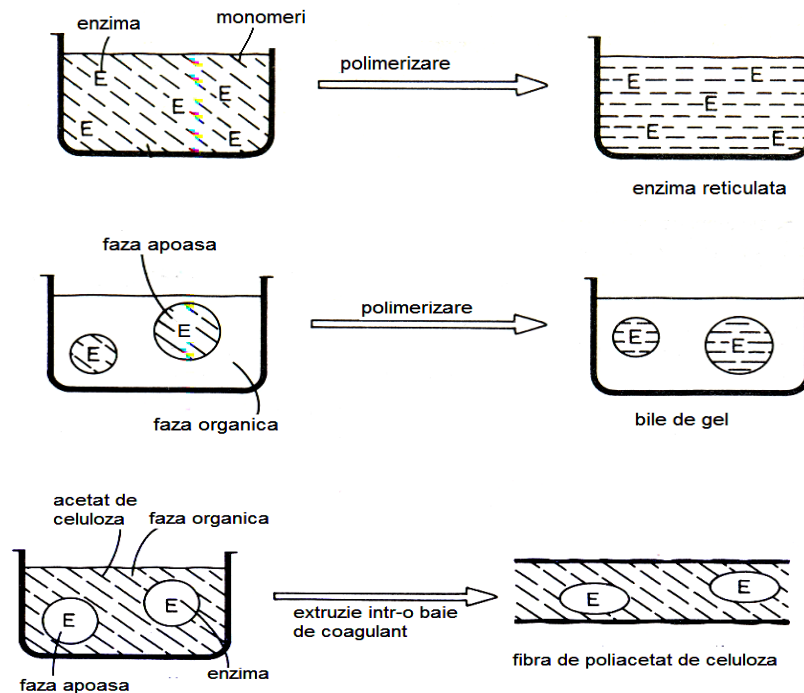
Incluziunea

- Constă în **includerea mecanică, de obicei ireversibilă, a moleculelor de enzimă într-o matrice insolubilă**. Modalitățile prin care este inclusă enzima într-un suport insolubil pot fi grupate în două categorii principale :
- **includerea în rețeaua tridimensională a suportului - polimerizarea enzimei** sau
- **delimitarea enzimei în interiorul unui volum ce o separă de restul matricii insolubile printr-o membrană semipermeabilă proces - încapsularea enzimei**



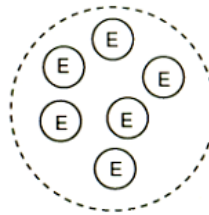
Imobilizarea prin polimerizare.

- În această metodă preparatul enzimatic este dispersat în soluția de monomeri pentru a forma un amestec omogen (soluție sau emulsie). Polimerizarea monomerilor conduce la formarea unor rețele în interiorul cărora este prinsă enzima.
- Prin procese de polimerizare și/sau copolimerizarea se pot obține produși cu forme geometrice a purtătorului diferite : granule mici de genul unor bile poroase, tuburi, fibre, filtre poroase, membrane semipermeabile etc.

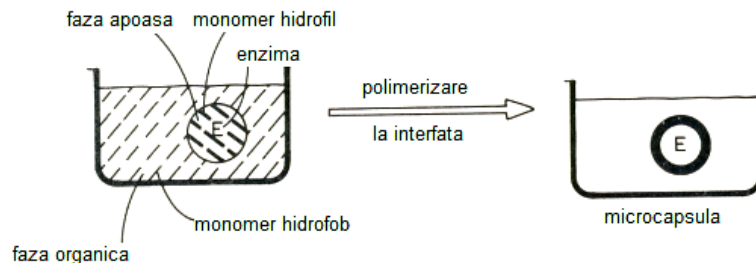


Încapsularea

- Constă în captarea soluției de enzimă într-un compartiment limitat de o membrană selectivă care nu lasă să treacă decât moleculele mici.



- Încapsularea constă fie prin formarea unei membrane în jurul unei micropicături de emulsie ce conține enzima conducând la realizarea unei microcapsule fie prin reținerea moleculelor de enzimă într-un macrovolum separat de mediul înconjurător de membrana semipermeabilă



Avantaje și dezavantaje

- **Avantaje**

- Reacțiile de **polimerizare** sau de gelificare sunt reacții bine stăpânite cu mecanisme de reacție cunoscute. Reactivii implicați sunt reactivi de uzanță clasică atât la nivel de laborator cât și industrial astfel încât extrapolarea acestor metode nu întâmpină nici o dificultate din punct de vedere al disponibilităților de materiale.
- Procesul **de includere** permite imobilizarea completă a enzimei de interes într-o singură etapă. Deoarece nu este implicată nici o legătură între enzima de interes și polimer, riscurile de denaturare sunt limitate. Reacțiile de incluziune nu prezintă nici un caracter de specificitate și pot fi astfel aplicabile oricărui tip de enzimă, indiferent de structura sa primară sau tridimensională.

- **Dezavantaje**

- Condițiile de polimerizare pot afecta enzima prin procese de denaturare datorate intervenției radicalilor liberi (persulfat de potasiu) sau valori de pH ridicate (sinteza nylonului).
- Localizarea enzimei într-o microcapsulă sau un volum limitat de o membrană semipermeabilă implică obligatoriu transferuri de masă, a substratului la enzimă și apoi a produșilor în soluție. Fenomenele **de difuzie și cele de de limitare sterică** în interiorul și exteriorul particulelor limitează capacitatea de acțiune a enzimelor.
- Uneori proprietățile mecanice ale gelurilor obținute nu sunt suficient de satisfăcătoare pentru ca enzima imobilizată să poată fi utilizată la nivel pilot sau industrial.

Legarea covalentă

- constă în reacția chimică dintre grupările reactive ale suportului cu cele ale enzimei, conducând la imobilizarea ireversibilă a enzimei.
- Un interes deosebit îl prezintă metodele chimice care permit legarea enzimelor prin grupări funcționale indiferente pentru cataliză:
 - amino (α sau ϵ),
 - imido (de la triptofan) ,
 - amido (de la asparagina, glutamine),
 - hidroxil (de la serina, treonina),
 - carboxil (α , β sau γ),
 - tiol (de la cisteina),
 - metiltiol (de la metionina),
 - guanidil (de la arginina),
 - imidazol (de la histidina).

Legarea se poate realiza pe suporturi anorganice (sticlă poroasă, materiale ceramice), pe suporturi naturale (celuloza, chitina, dextrană, agaroză) sau pe polimeri sintetici (nailon, polistiren, poliacrilamida), prin intermediul unor grupări imidocarbonat, oxiran, azida, diazo, izotiocianat, triazinil, etc

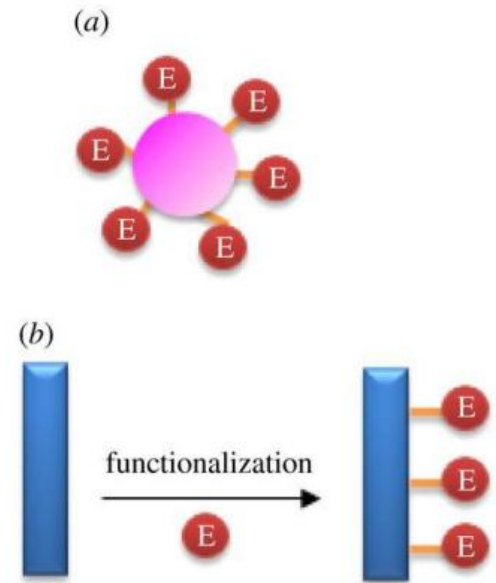
Legarea covalentă

- Matrici / suporturi utilizate în legarea covalentă a enzimelor:
 - Carbohidrați: celuloză, DEAE celuloză, agaroză
 - Agenți sintetici: poliacrilamidă
 - Proteine (colagen, gelatină, albumină)
 - Matrici cu grupări amino: amino-benzil-celuloză
 - Suporturi anorganice: sticlă poroasă, silicagel CNBr-agaroză și CNBr-Sepharose

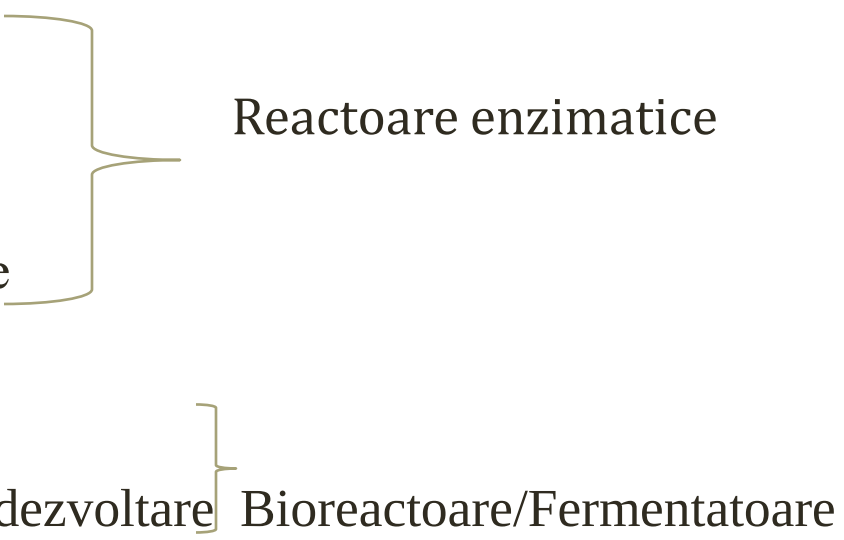
Grupările —OH și —NH_2 formează mai ușor legături covalente

Legarea covalentă

- Materialele (pentru imobilizare) caracteristici:
 - suprafață compatibilă cu a enzimei;
 - grupări reactive pentru atașarea enzimelor;
 - capacitate mare de legare;
 - inertă față de componentii reacției enzimatice;
 - stabilitate mare în condițiile optime ale reacției enzimatice

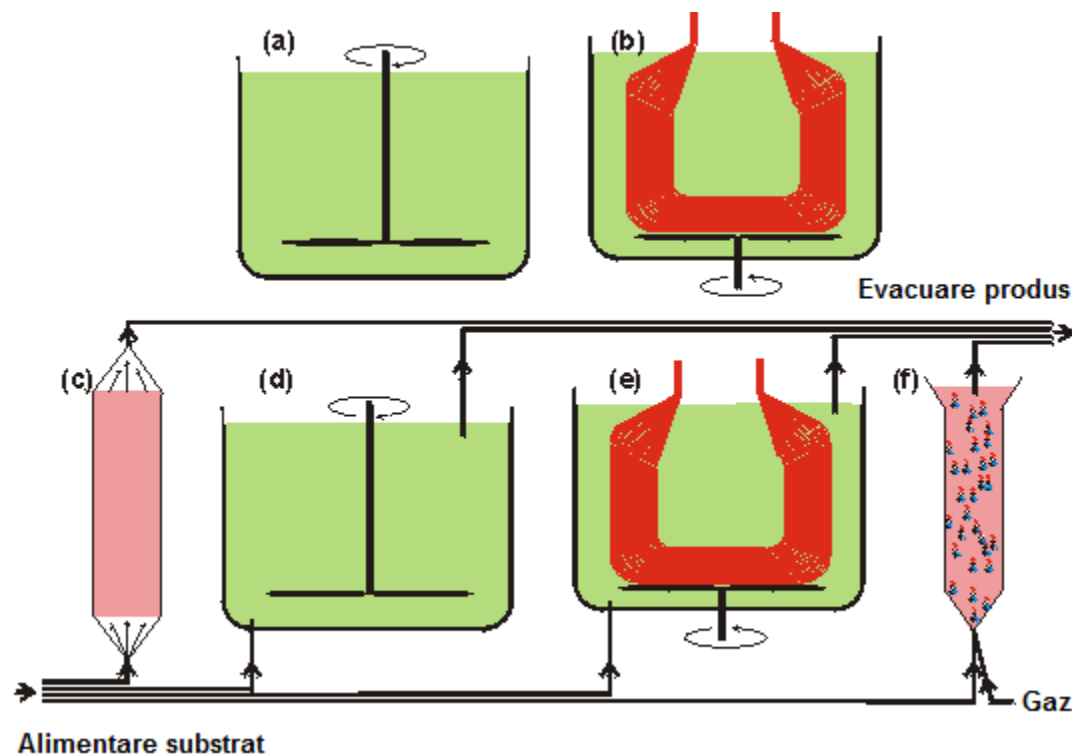


Reactoare enzimatice

- Principalele tipuri de reactoare
 - Reactoarele pot fi clasificate în funcție de:
 - Forma enzimei utilizate/natura catalizatorului
 - Geometria și hidrodinamica reactorului
 - Natura catalizatorului
 - Enzime solubile
 - Enzime imobilizate
 - Organite celulare imobilizate
 - Celule imobilizate fără creștere
 - Celulele libere sau
 - Celule imobilizate cu creștere/dezvoltare
- Reactoare enzimatice
- Bioreactoare/Fermentatoare
- 

Reactoare enzimatice

- Un reactor enzimatic constă dintr-un vas sau o serie de vase, utilizate pentru a realiza o conversie dorită prin intermediul unei enzime.
- Exista mai multe tipuri de astfel de reactoare:



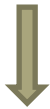
- a.) Reactor discontinuu cu agitare, (STR);
- b.) Reactor discontinuu cu membrană (MR),
- c.) reactor cu strat fix (PBR), numit reactor cu flux (PFR), care conține enzima imobilizată cu ajutorul unui suport
- d.) reactor continuu cu agitare (CSTR), care este o versiune cu funcționare continuă a (a);
- e.) reactor continuu cu membrană (CMR), care este o versiune operată în mod continuu a (b);
- f.) reactor în strat fluidizat (FBR), în care fluxul de gaz și / sau substrat al enzimei imobilizate menține particulele într-o stare fluidizată.

Reactoare enzimatice

- Geometria și hidrodinamica reactorului

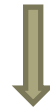
- Reactoare

Reactoare discontinue
(alimentare, apoi reacție)



Reactor discontinuu cu
amestecare perfecta

Reactoare continue
Alimentare și reacție



Reactor continuu cu amestecare perfecta CSTR

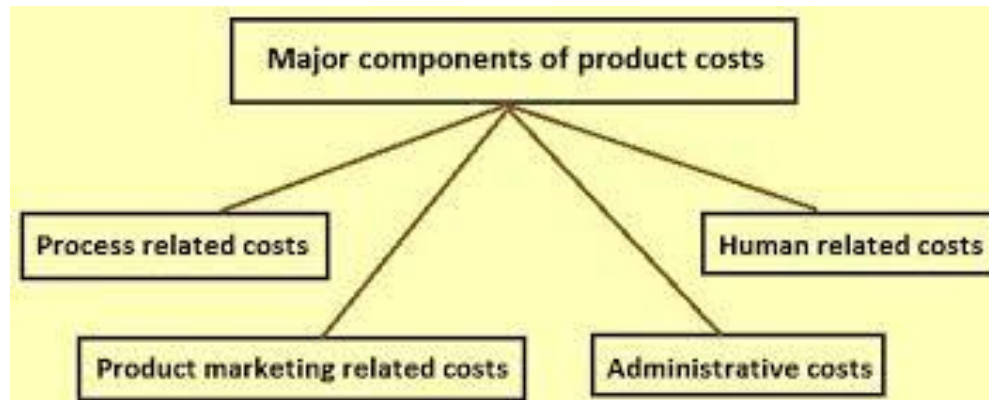
Reactor cu strat fix PBR

Reactor cu strat fluidizat FBR

Reactor cu membrana

Reactoare enzimatice

- Există mai mulți factori importanți care determină alegerea reactorului pentru un anumit proces.
- În general, alegerea depinde de costul determinat de o productivitate impusa pentru anumite specificații ale produsului.
 - Aceasta trebuie să includă **costurile asociate cu substratul (s), prelucrarea în aval, salariile, amortizarea, cheltuielile generale și costurile implicate pentru cercetare și dezvoltare**, în plus față de costurile mai evidente cum ar fi: **construirea și funcționarea reactorului enzimatic**.
- Alți factori care contribuie sunt posibilitatea alegerii formei sub care va lucra enzima (de exemplu, liberă sau imobilizată), cinetica reacției și proprietățile fizice ale suportului.
- Atenție trebuie acordată și scării de funcționare, eventuala necesitate de control a pH-ului și a temperaturii, alimentarea și îndepărtarea gazelor și stabilitatea enzimei, a substratului și a produsului.



Parametrii unui reactor enzimatic

- Conversie

$$X = \frac{S_0 - S}{S_0} \cdot 100$$

Raportul dintre cantitatea de substrat care s-a transformat în reacția chimică și cantitatea de substrat intrată într-un reactor

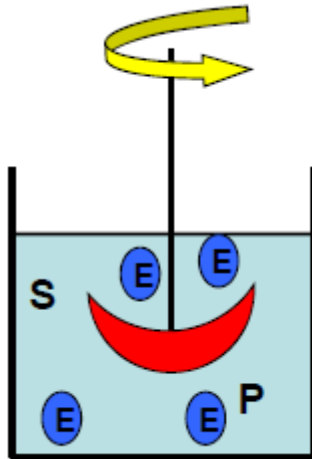
- Productivitate

$$\frac{Q \cdot P}{V_r}$$

Cantitatea de produs obținut pe unitatea de timp și volumul reactorului

Reactoare enzimatice

- Reactor discontinuu



Echipamente nu foarte scumpe

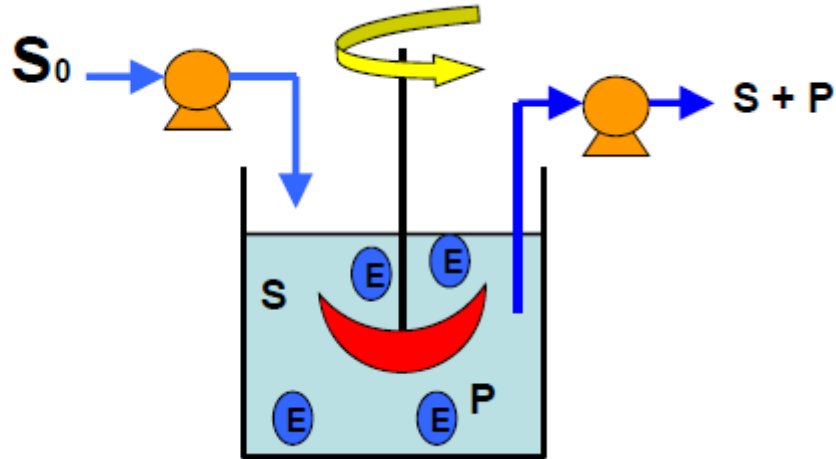
Reglare simpla a pH-ului, temperaturii

Se pot utiliza enzime solubile sau imobilizate

Pot utiliza substrate in diferite stari de agregare, viscoase, ...

- Reactor continuu

cu amestecare perfecta

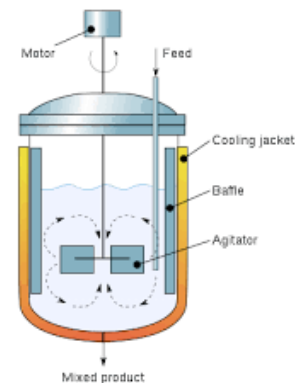
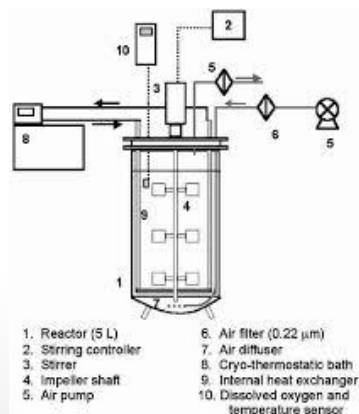


Echipamente mai scumpe

Permite lucrul in regim continuu

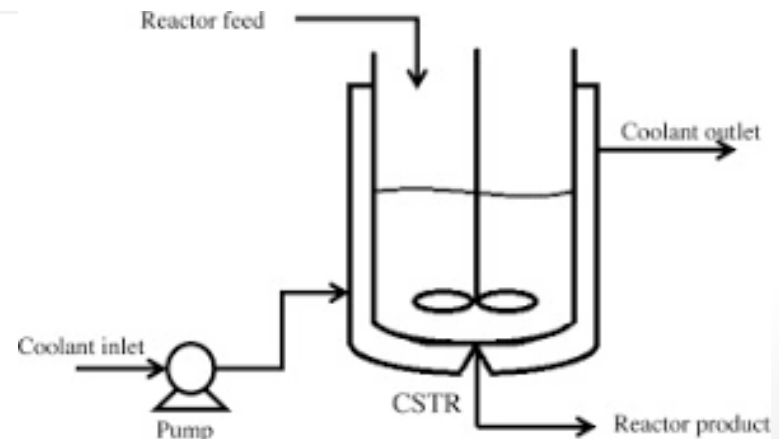
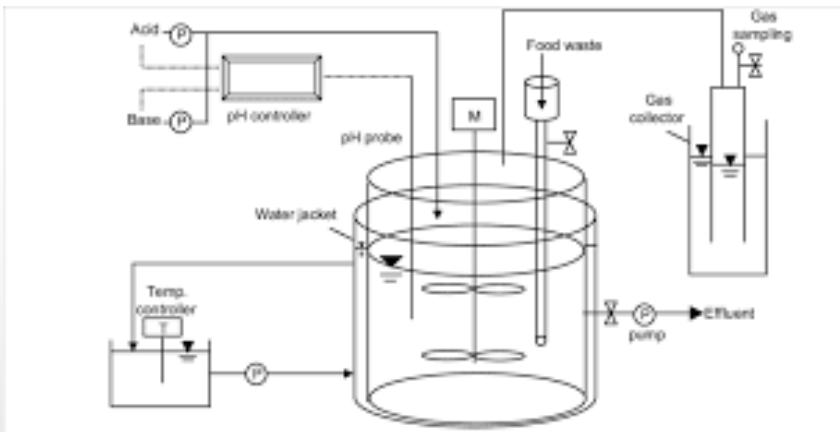
Reactor discontinuu

- Reactoarele discontinue constau, în general, dintr-un rezervor care conține un agitator. În mod normal, vasul este prevăzut cu sicane fixe care îmbunătățesc eficiența de amestecare.
- Un reactor discontinuu este unul în care **tot produsul este îndepărtat, cât de repede este practic posibil**, după un timp determinat. În general, acest lucru înseamnă că moleculele de enzimă și substrat au **timpi de reședință identici în reactor**, deși în unele circumstanțe poate fi nevoie de adăugări suplimentare de enzimă și / sau substrat (adică, funcționare cu alimentare continuă sau cu recirculare).
- **Costurile de exploatare** ale reactoarelor discontinue **sunt mai mari** decât în cazul proceselor continue, datorită **necesității de a goli și reumple regulat și de multe ori reactoarele**. Această procedură nu este numai costisitoare în sine, ci înseamnă că există **perioade considerabile în care aceste reactoare nu sunt productive**.
- Reactoarele discontinue pot suferi, de asemenea, **variații de la lot la lot**, deoarece condițiile de reacție se schimbă în timp și pot fi dificil de optimizat imediat.
- Cu toate acestea, au o serie de **caracteristici avantajoase**. Principala dintre acestea este **simplitatea lor atât în utilizare**, cât și în dezvoltarea proceselor. Din acest motiv, acestea sunt preferate pentru **producția la scară mică de produse la prețuri ridicate**, în special în cazul în care același echipament trebuie utilizat pentru o serie de conversii diferite. Ele oferă **un mediu perfect controlabil, util pentru reacțiile lente, unde compoziția poate fi monitorizată cu exactitate și condițiile** (de exemplu, temperatura, pH-ul, concentrațiile de coenzimă) variate pe toată durata reacției. Ele sunt de asemenea utilizate atunci când funcționarea continuă a unui proces se dovedește a fi dificilă datorită naturii vâscoase sau intractabile a amestecului de reacție.

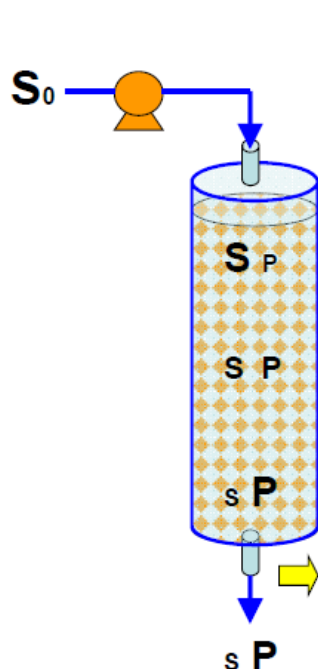


Reactor continuu

- Omogenizarea perfecta permite un **control riguros al temperaturii si pH-ului**. In plus are si avantajul ca **minimizeaza problemele legate de rezistentele difuzionale**.
- Sunt larg raspandite, au o **configuratie simpla**, sunt usor de construit si permit inlocuirea usoara a catalizatorului. De asemenea, permite utilizarea substraturilor cu o solubilitate redusă, permițând utilizarea unor volume mari care conțin concentrații mici de substrat.
- Acest reactor este format dintr-un rezervor cu amestecare care conține enzima, care este în mod normal imobilizata. **Solutia de substrat este pompata continuu în reactor în același timp cu eliminarea produsului**. Dacă reactorul se comportă într-un mod ideal, există o amestecare totală și fluxul de produs este identic cu faza lichidă din reactor și invariant în timp. Unele molecule de substrat pot fi îndepărtate rapid din reactor, în timp ce altele pot rămâne pentru perioade substanțiale.
- Este un reactor ușor de construit, versatil și ieftin, care permite încărcarea și înlocuirea simplă a catalizatorului. **CSTR-urile tind să fie destul de mari** intrucat trebuie să fie amestecate eficient. Volumele lor sunt de obicei de aproximativ cinci până la zece ori volumul enzimei imobilizate conținute. Aceasta are însă avantajul că există o **rezistență foarte mică la curgerea solutiei de substrat, care poate conține substrat coloidal sau insolubil, atât timp cât particulele insolubile nu sunt capabile să măture enzima imobilizată din reactor**. Natura mecanică a agitării limitează suporturile pentru enzimele imobilizate la materiale care nu se dezintegrează ușor. Cu toate acestea, se poate utiliza o particulă destul de mică (până la aproximativ 10 mm diametru), dacă sunt suficient de dense pentru a rămâne în reactor. Acest lucru minimizează problemele datorate rezistenței difuzionale.



Reactoare enzimatice



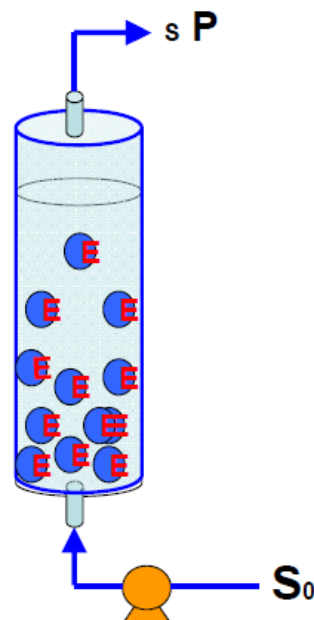
- **Reactor in strat fix**

Valori ridicate ale conversiei

Colmatare, Infundare

NU substrat vascos sau gazos

Reglare dificila a pH-ului



Reactor in strat fluidizat

Intermediar intre CSTR si PBB

Fara colmatare

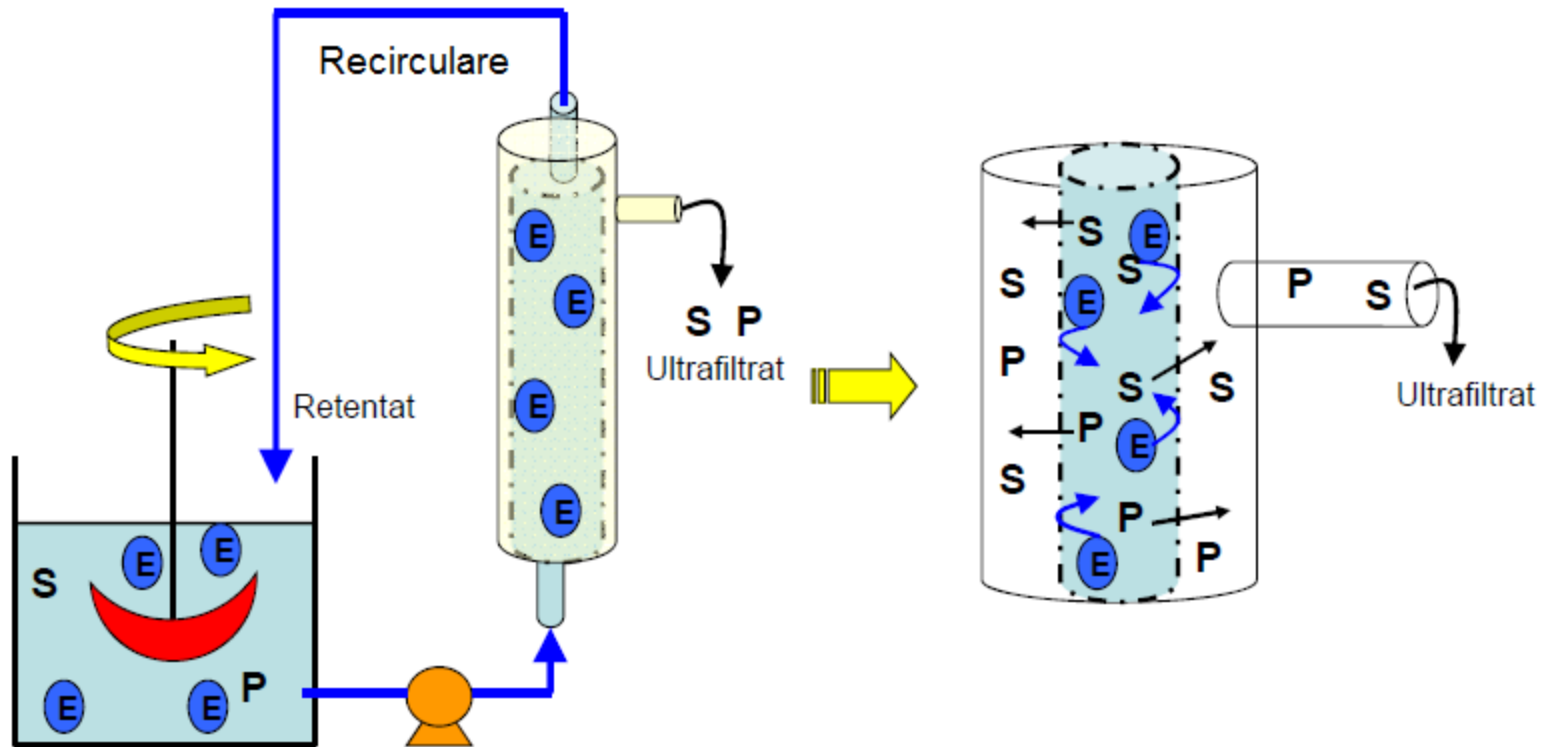
DA substrat vascos sau gazos

Reglare mai usoara a pH-ului

Reactoare enzimatice

- **În reactoarele PBR si FBR, timpul mediu de rezidență al moleculelor de substrat din reactor este mult mai scurt decât cel al catalizatorului sub forma de enzimele imobilizate. Aceasta duce la o productivitate mult mai mare dintr-o cantitate fixă de enzimă decât se obține în procesele discontinue.**
- **Reactor cu strat fix – PBR**
- In acest caz particulele de enzima imobilizata sunt sustinute cu ajutorul unui suport (placa perforata, sita) intr-o colona acare va fi traversata de solutia de substrat amestecarea fiind absenta. Caracteristica cea mai importanta a acestui tip de reactor, este ca materia curge ca un piston (plug flow reactor), sau cu deplasare totala. Deci, tot curentul de substrat curge cu aceeasi viteza, paralel cu axa reactorului, tot produsul iese cu acelasi tmp de stationare. Desi este des intalnit (configuratie simpla si usor de construit), prezinta si dezavantaje: necesita o curgere in regim turbulent, care implica viteze de alimentare inacceptabile.
- **Reactor cu start fluidizat – FBR**
- Reactorul consta dintr-un cilindru vertical care contine stratul de enzima imobilizata sustinut de o sita sau o placa perforata. Stratul este fluidizat printr-o miscare rapida de sus in jos a substratului singur, sau in combinatie cu un lichid sau un gaz (inert sau care se utilizeaza in reactie). Viteza de fluidizare este cuprinsa intre 0.2-1 cm/s.

Reactoare enzimatice



- Poate funcționa continuu, cu o enzimă solubilă
Hidroliza unui substrat macromolecular → crește rata de conversie

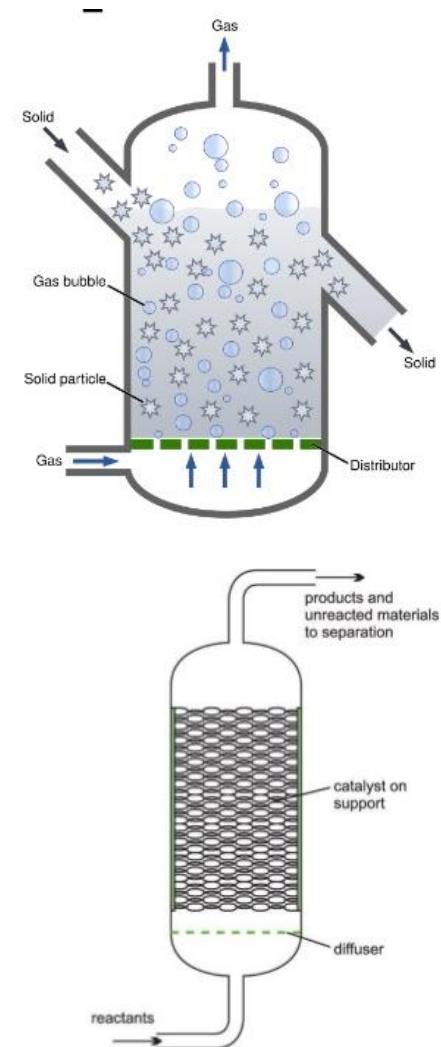
Reactoare enzimatice

- Găsirea soluției optime constructive și de funcționare pentru un reactor enzimatic **nu este întotdeauna o sarcină ușoară**.
- Pe de o parte, pot fi preferate reactoarele de tip discontinuu sau semi-continuu, atunci când:
 - **enzimele prezintă o activitate ridicată, dar și o rată mare de dezactivare,**
 - **enzima este ieftină**
 - **produsul poate fi ușor separat**
 - **contaminarea acesteia cu enzima nu este importantă.**
- În schimb, utilizarea **enzimelor imobilizate** oferă o:
 - separare ușoară a produsului (cu mai puține impurități),
 - o pierdere mai mică a enzimelor,
 - o stabilitate crescută a enzimei (și posibilitatea de stocare / reciclare),
 - protecția enzimei și
 - un control mai bun al procesului .

Reactoare enzimatice

- **Imobilizarea enzimelor** se realizează pe un suport adecvat (pulbere, mărgel, folii, fibre, matrice etc.) realizate dintr-o mare varietate de materiale (alumină, silicati de aluminiu, ceramică, argilă, geluri, cărbune, polimeri etc.) (prin funcționalizare, reticulare, copolimerizare, cristalizare, legare covalentă) pentru a crește stabilitatea enzimei, afectând mai puțin activitatea sa.
- Cu toate acestea, imobilizarea enzimelor este costisitoare și duce la o scădere considerabilă a activității datorită:
 - interacțiunilor matrice-enzimă (schimbarea structurii enzimei)
 - rezistenței suplimentare introduse de etapa de difuzie prin suport.

Mai mult, atunci când **viteza de dezactivare** a enzimei este suficient de mare, utilizarea reactoarelor cu strat fix cu enzime imobilizate devine prea costisitoare și nefuncțională, necesitând regenerarea / înlocuirea frecventă a biocatalizatorului.



Reactoare enzimatice

- Pentru a decide cu privire la cel mai potrivit reactor și modul de funcționare pentru un proces enzimatic, comparația trebuie să se bazeze pe impunerea aceleiași capacități de producție și timpul de reacție / staționare.
- În general, **optimizarea unui bioreactor** implică derivarea condițiilor de funcționare care asigură maximizarea unui criteriu economic/de performanță (cum ar fi conversia, randamentul, productivitatea, beneficiul, timpul de operare, utilitățile etc.) în prezența constrângerilor tehnologice și de siguranță.
- Derivarea unei astfel de politici optime nu este o sarcină ușoară, datorită complexității procesului biochimic, a factorilor de influență multipli care trebuie luați în considerare, a caracteristicilor variabile de materii prime / biocatalizator și a sensibilității ridicate a procesului la condițiile de operare.

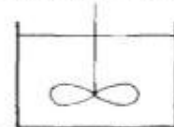
CHOICETM
OPTIMUM

Reactoare enzimatice

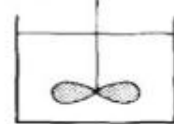
- Punctul cheie în alegerea dintre alternativele reactorului este stabilitatea termică și chimică a enzimei, exprimată prin timpul său de înjumătățire în anumite condiții de funcționare.
- **Dacă enzima este ieftină**, reactorul discontinuu/ semi-continuu poate fi o alegere bună pentru proces. Utilizarea reactorului semi-continuu este deosebit de atractivă, datorită posibilităților sporite de a controla procesul prin controlul adăugării de co-reactanți (enzime, co-enzime, substrat, aditivi). Astfel, eficiența procesului este adaptată prin ajustarea sistemului de alimentare pe lot, ceea ce duce la o productivitate mai mare a reactorului folosind un volum de reacție redus.



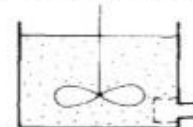
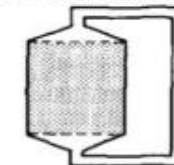
(a) Stirred tank for soluble enzymes. (b) Stirred tank for immobilized enzyme



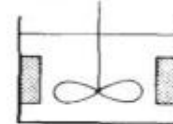
(c) Stirred tank with immobilized basket paddles



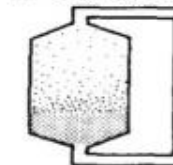
(e) Total recycle packed bed reactor



(d) Stirred tank with immobilized enzyme basket baffles



(f) Total recycle fluidized bed reactor

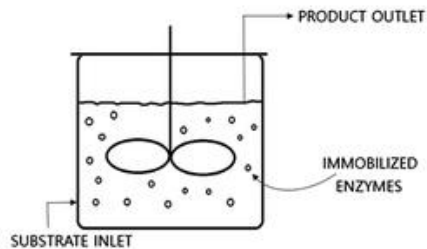


Reactoare enzimatice

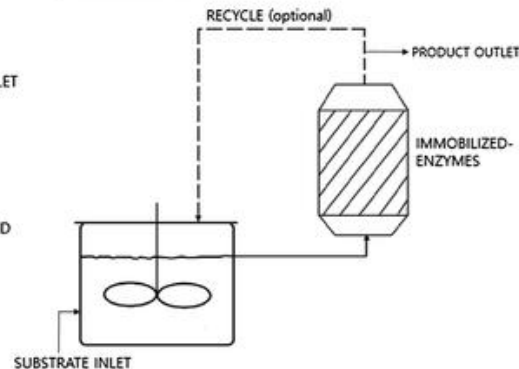
- **Dacă enzima este scumpă** și imobilizarea sa pe un suport solid adecvat raportează o creștere considerabilă a stabilității sale, se recomandă reactoarele cu strat fix sau reactoarele cu strat fluidizat, permițând multe zile de funcționare continuă, cu o productivitate acceptabilă. Politica optimă de alimentare a acestor reactoare trebuie să compenseze dezactivarea continuă a enzimei păstrând o conversie de ieșire cvasi-constantă

CONTINUOUS STIRRED-TANK REACTOR

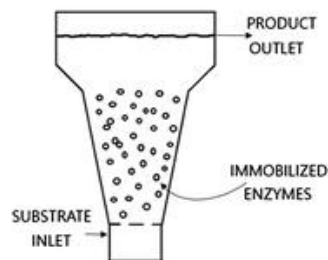
(CSTR)



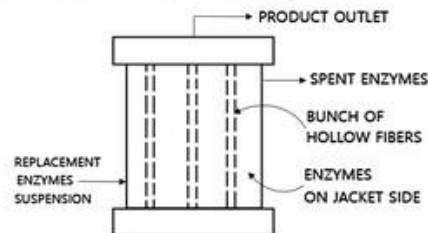
PACKED-BED REACTOR



FLUIDIZED-BED REACTOR



HOLLOW-FIBER MEMBRANE REACTOR



DE RETINUT!!!

- **ENZIMELE**

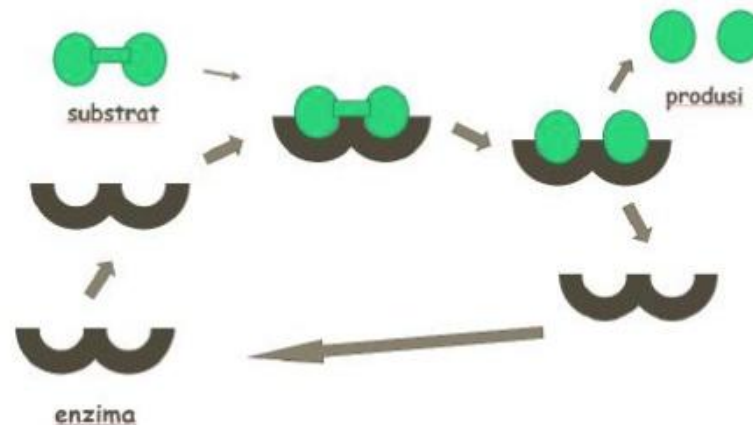
- ❖ Au o formă distinctă 3D esențială pentru activitate.
- ❖ Sunt catalizatori biologici extrem de eficienți și specifici.
- ❖ Accelerează viteza unei reacții biochimice posibilă (Modifica viteza de reacție, nu echilibrul de reacție).
- ❖ Nu se consumă în reacție.
- ❖ Sunt extrem de specifice.
- ❖ Vor reacționa cu unele molecule similare mai ales în cazul în care concentrația lor este mare.
- ❖ Stabilizează starea de tranziție.
- ❖ Viteza de reacție depinde de concentrația enzimei, substratului, precum și de eficiența enzimei.

Enzime



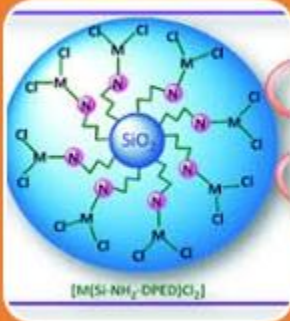
Enzimele sunt proteine cu structură complexă, deoarece lanțurile de aminoacizi se pliază și se organizează sub formă de ghem sau globulă, generând o arhitectură tridimensională specifică care include o zonă funcțională, centrul activ, capabilă să recunoască substratul și să îl lege, permițând astfel catalizarea eficientă a reacțiilor biochimice.

$\text{Enzimă} + \text{Substrat} \rightleftharpoons \text{Complex Enzimă-Substrat} \rightarrow \text{Produs} + \text{Enzimă (regenerată)}$



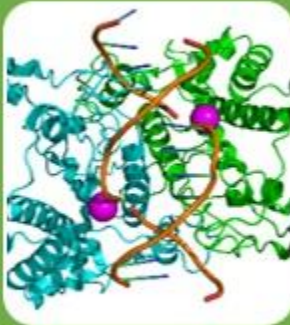
Mecanismul reacției enzimatice presupune legarea substratului la enzima, cu formarea unui complex activat care permite obținerea produsului și eliberarea enzimei, care va relua ciclul catalitic

Enzyme vs catalizatori chimici



Catalizatori chimici

- Substanțe chimice anorganice
- De obicei nespecifici, pot cataliza mai multe reacții similare
- Funcționează adesea în condiții extreme (temperaturi ridicate, presiuni mari)
- Reduc energia de activare fără a forma un complex specific
- De obicei nu sunt reglați biologic



Enzime

- Majoritatea sunt proteine; unele ARN-uri (ribozime)
- Foarte specifici pentru substrat și tipul de reacție
- Funcționează optim în condiții fiziologice (temperatură și pH moderate)
- Formează complexe enzima-substrat și reduc energia de activare
- Activitatea poate fi reglată prin inhibitori sau activatori

Relevanța industrială a diferențelor între enzime și catalizatori chimici generali

Caracteristică	Enzime (biocatalizatori)	Catalizatori chimici tradiționali	Relevanță industrială
Temperatura de lucru	Scăzută sau moderată	Poate fi ridicată	Reduc consumul energetic și protejează substanțele sensibile termic
Presiunea de lucru	Normală sau moderată	Poate fi ridicată	Procese mai sigure și mai economice
Specificitate	Foarte mare pentru substrat	Generală, mai puțin selectivă	Produse cu puritate crescută și mai puține subproduse nedorite
Viteză de reacție	Rapidă pentru substratul specific	Rapidă în multe reacții	Poate fi optimizată în funcție de proces
Stabilitate	Sensibile la condiții extreme	Mai stabile la temperaturi și pH extreme	Alegerea depinde de condițiile procesului industrial
Impact mediu	Redus, mai ecologic	Poate genera deșeuri sau subproduse	Contribuie la sustenabilitate și reducerea costurilor de purificare
Costuri	Mai mari pentru producere și purificare	Variabil, adesea mai mici	Evaluarea cost-beneficiu în funcție de volum și complexitate