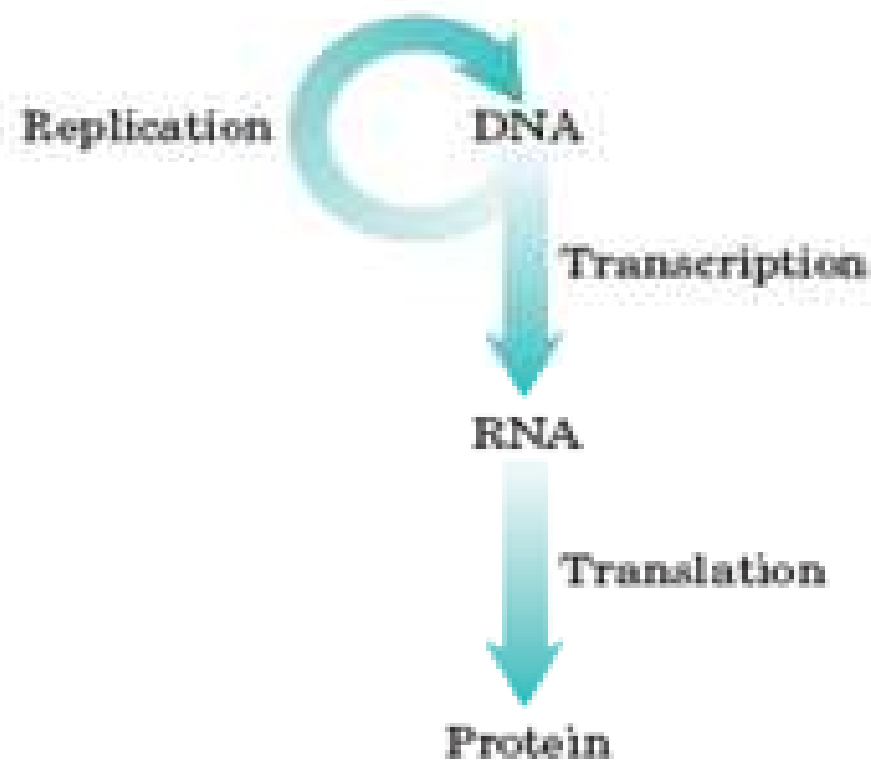


Primena enzima

- Tehnike molekularne biologije
- Industrijska primena
- Klinička enzimologija



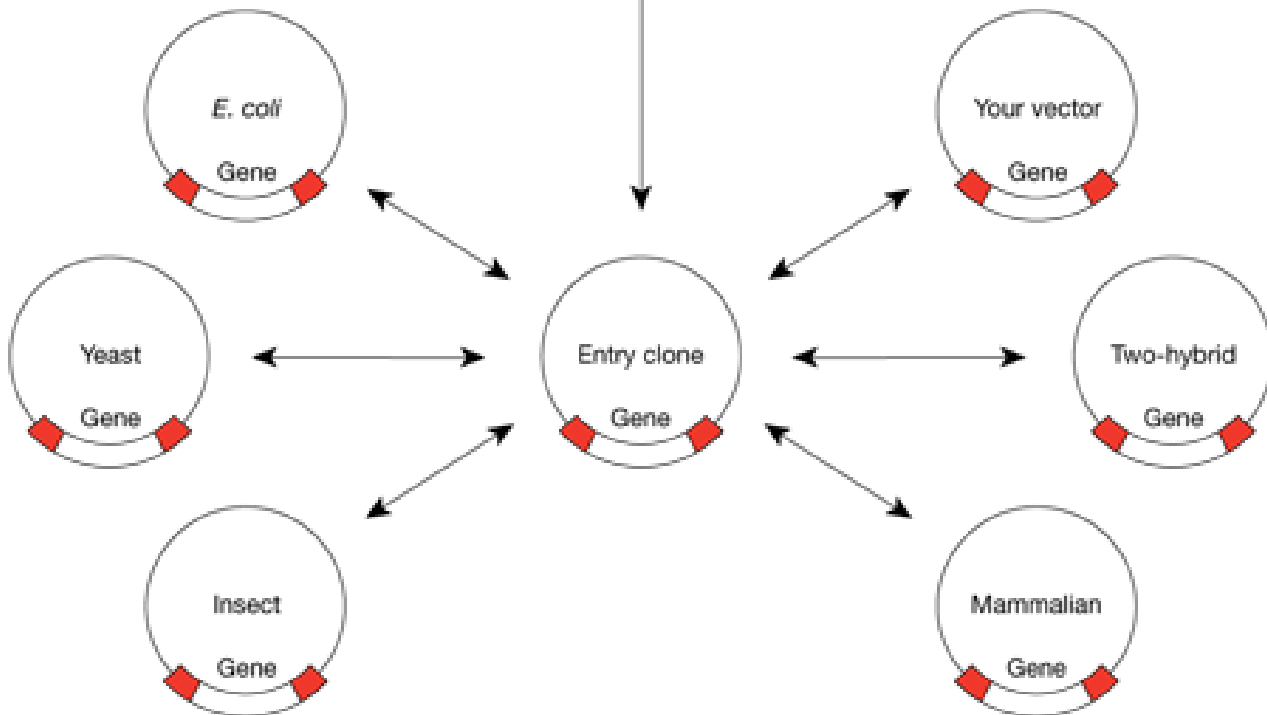
The central dogma of molecular biology, showing the general pathways of information flow via replication, transcription, and translation. The term "dogma" is a misnomer. Introduced by Francis Crick at a time when little evidence supported these ideas, the dogma has become a well-established principle.

DNA fragments from:

Polymerase
chain reaction

Restriction
endonuclease
digestion and ligation

cDNA library

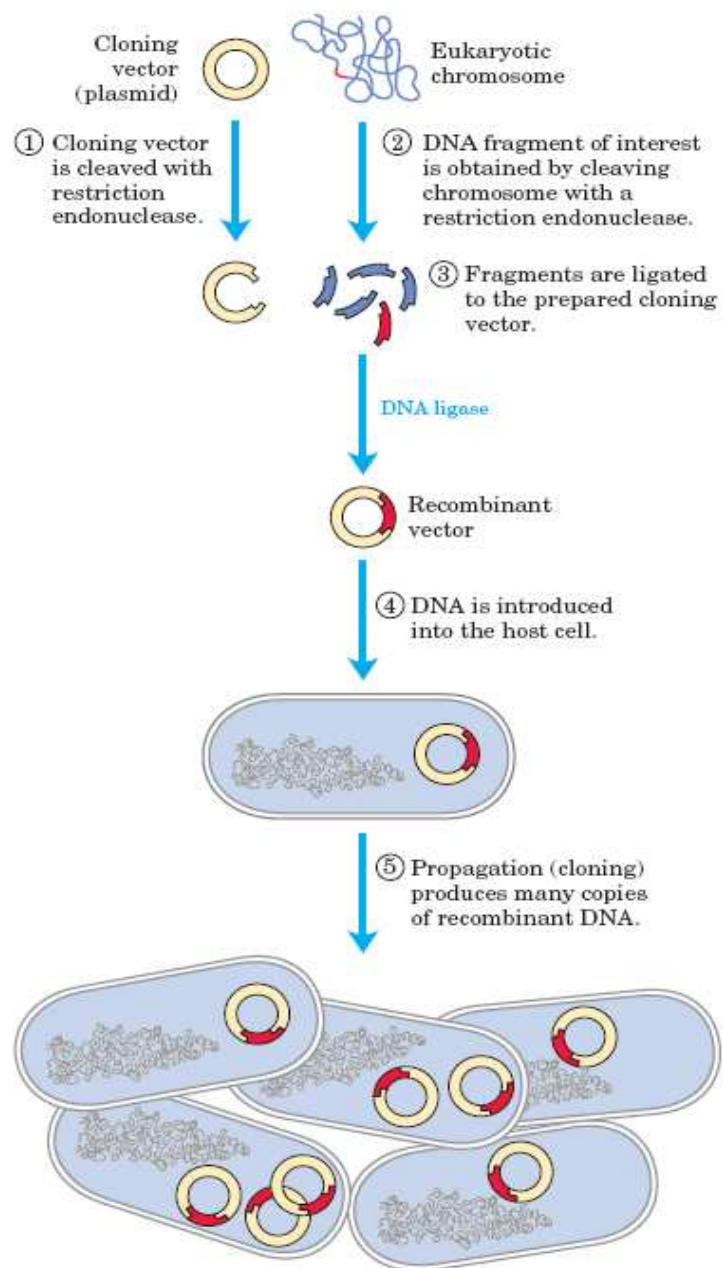


Kloniranje gena podrazumeva:

- Isecanje i otvaranje prečišćene plazmidne DNA
- Ubacivanje i spajanje target DNA sa plazmidnom DNA u reakciji katalizovanoj ligazom
- Isecanje i spajanje DNA se mora pratiti, npr. elektroforezom
- Transformacija veštačkog rekombinantnog DNA molekula u *E. coli* ćeliju ili nekog drugog domaćina

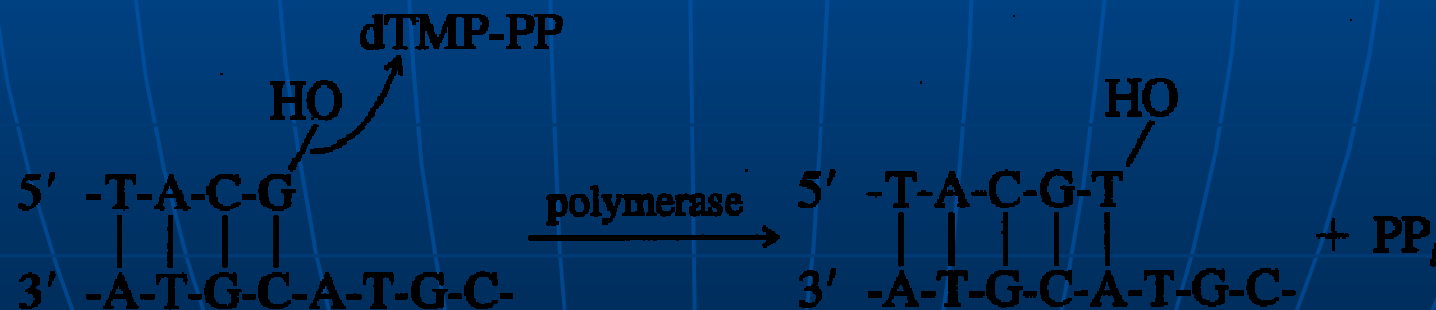
TABLE 9–1 Some Enzymes Used in Recombinant DNA Technology

| <i>Enzyme(s)</i> | <i>Function</i> |
|-------------------------------------|--|
| Type II restriction endonucleases | Cleave DNAs at specific base sequences |
| DNA ligase | Joins two DNA molecules or fragments |
| DNA polymerase I (<i>E. coli</i>) | Fills gaps in duplexes by stepwise addition of nucleotides to 3' ends |
| Reverse transcriptase | Makes a DNA copy of an RNA molecule |
| Polynucleotide kinase | Adds a phosphate to the 5'-OH end of a polynucleotide to label it or permit ligation |
| Terminal transferase | Adds homopolymer tails to the 3'-OH ends of a linear duplex |
| Exonuclease III | Removes nucleotide residues from the 3' ends of a DNA strand |
| Bacteriophage λ exonuclease | Removes nucleotides from the 5' ends of a duplex to expose single-stranded 3' ends |
| Alkaline phosphatase | Removes terminal phosphates from either the 5' or 3' end (or both) |

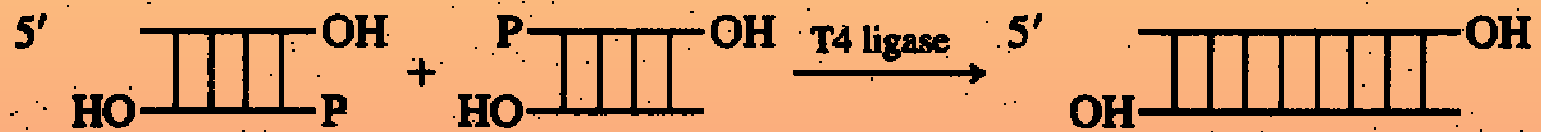


DNK moze biti umnožena: DNK polimeraza

1. Potrebna je DNK matrica
2. Potrebni su DNK & RNK prajmeri koji asosuju sa matricom i poseduju 3' hidroksilnu grupu na (dezoksi)ribozi
3. Replikacija teče isključivo u 5' – 3' pravcu, pri čemu četiri 5'-deoksinukleozid trifosfata služe kao izvor monomera
4. Replikaciju diktira matrica u skladu sa Watson-Crick-ovim pravilima sparivanja baza



DNK fragmenti mogu biti spojeni korišćenjem enzima



Praznine u DNK mogu biti popunjene: DNK ligaze

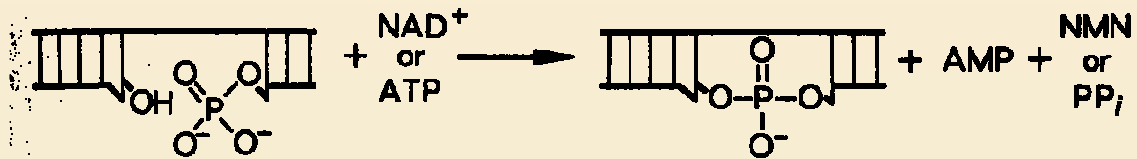


Figure 14.4 The DNA ligase reaction. NMN = nicotinamide mononucleotide.

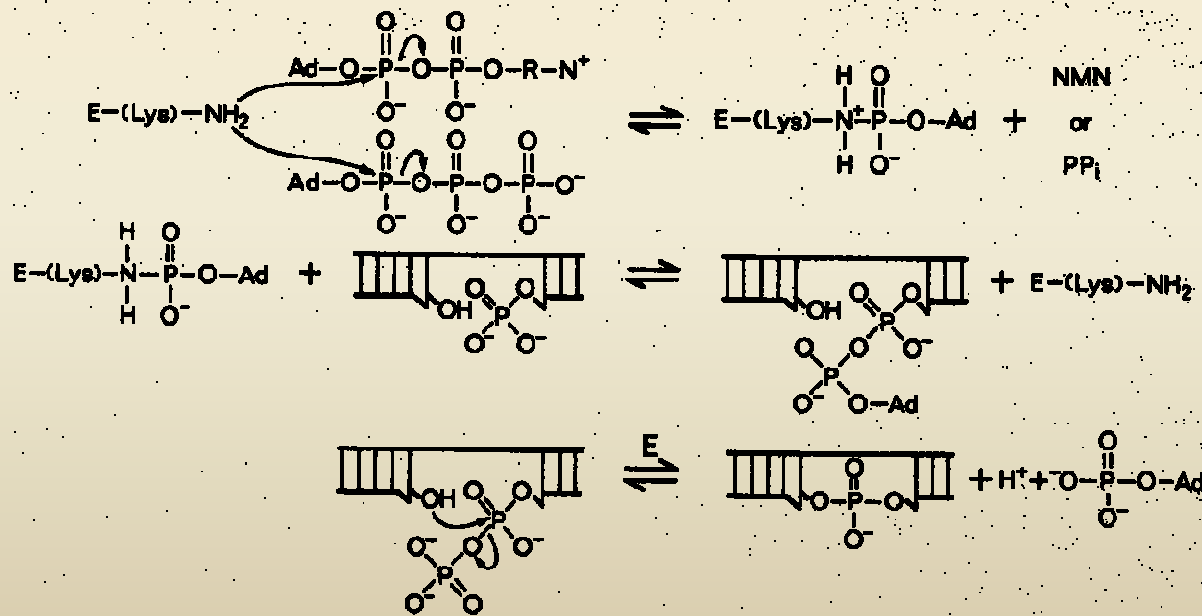


Figure 14.5 The mechanism of DNA ligation.

Mehanizam dejstva DNK ligaze

1. Adenil grupa NAD^+ se prebacuje na ϵ -amino grupu Lys i formira neobičan fosfoamidni adukt koji se lako izoluje.
2. Adenil grupa aktiviranog enzima se prebacuje na 5' terminus prekida da bi oformio adeniliranu DNK. AMP se vezuje za 5' nukleotid preko pirofosfatne veze (a ne fosfodiestarske).
3. DNK ligaza katalizuje formiranje fosfodiestarske veze napadom 3' hidroksila na 5' fosforil grupu, zatvarajući tako prekid i oslobađajući AMP.

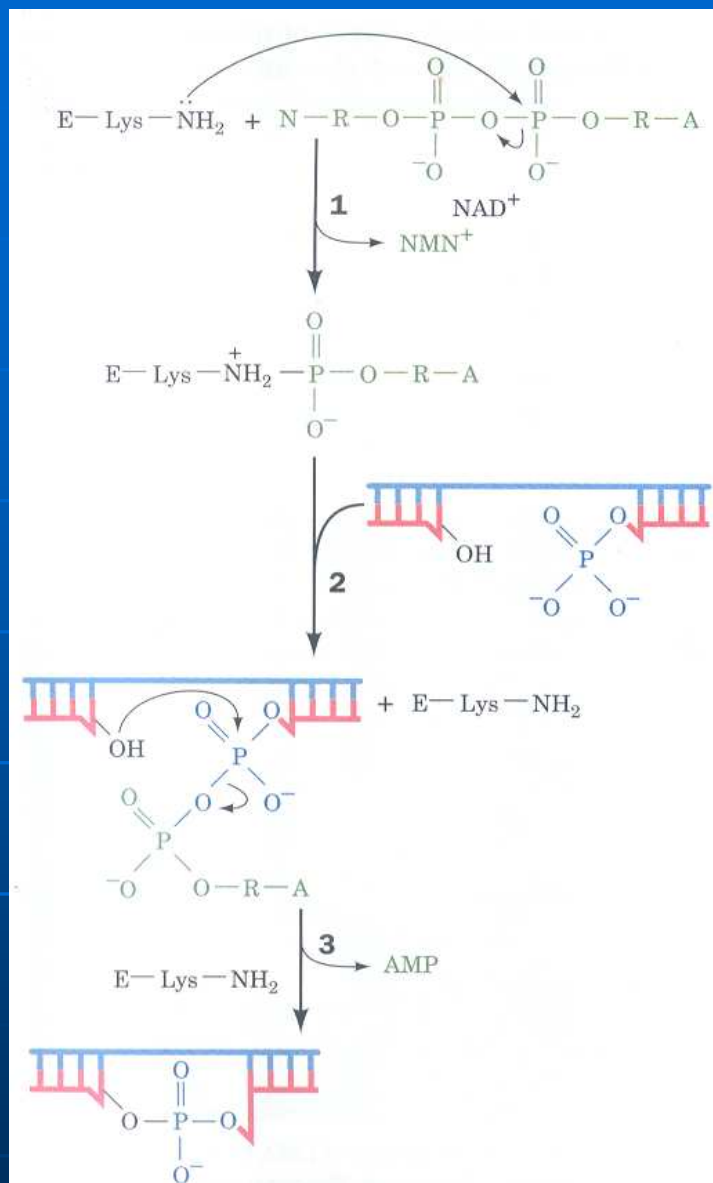


FIGURE 31-16. The reactions catalyzed by *E. coli* DNA ligase. In eukaryotic and T4 DNA ligases, NAD^+ is replaced by ATP so that PP_i , rather than NMN^+ is eliminated in the first reaction step. The numbered steps are described in the text.

Dvostruki DNK lanac može biti isečen na specifičnim sekvencama: Restriktivna endonukleaza

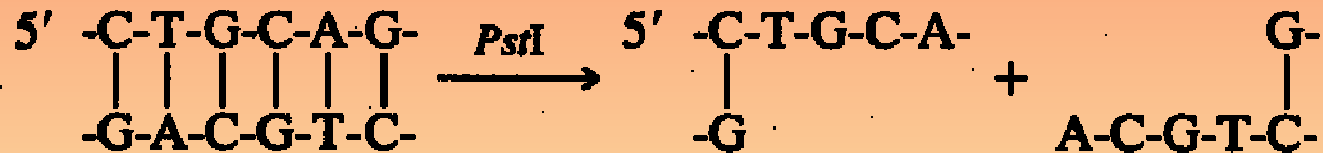
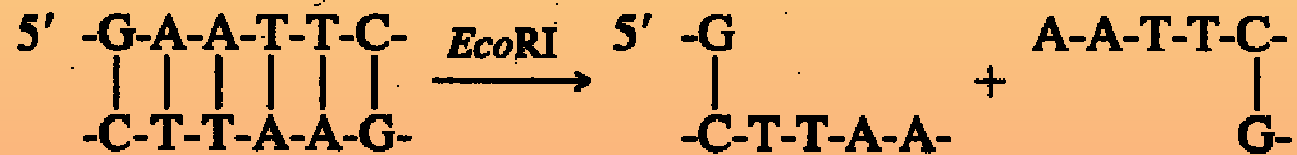
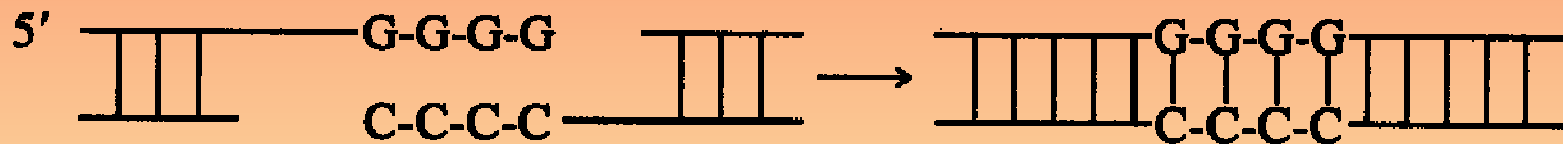


TABLE 9-2 Recognition Sequences for Some Type II Restriction Endonucleases

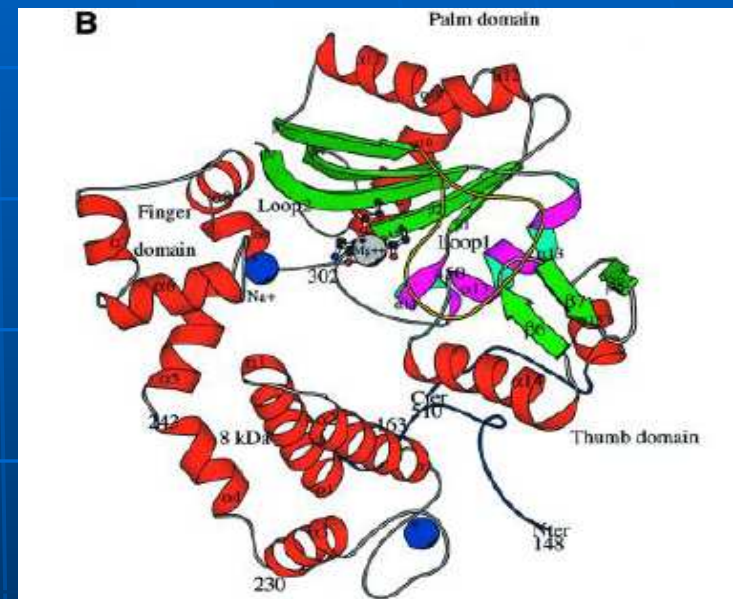
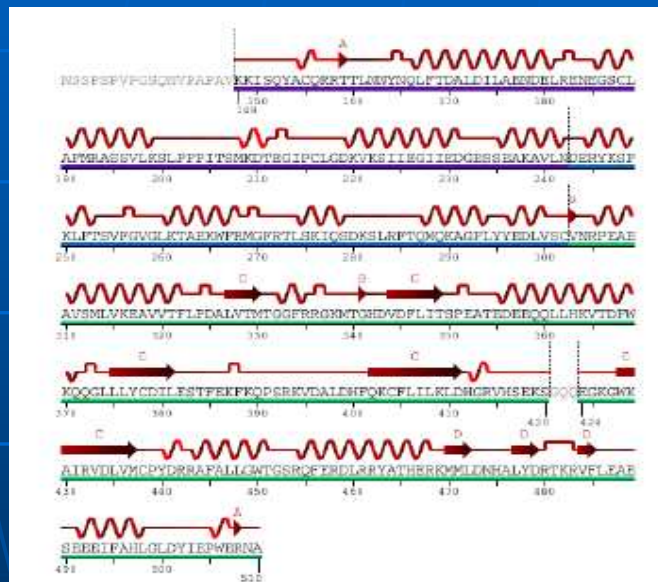
| | | | |
|----------------|--|-----------------|--|
| <i>Bam</i> HI | $\begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{ G G A T C C } (3') \\ \text{ C C T A G G} \\ * \quad \uparrow \end{array}$ | <i>Hind</i> III | $\begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{ A A G C T T } (3') \\ \text{ T T C G A A} \\ \quad \uparrow \end{array}$ |
| <i>Cl</i> I | $\begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{ A T C G A T } (3') \\ \text{ T A G C T A} \\ * \quad \uparrow \end{array}$ | <i>Not</i> I | $\begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{ G C G G C C G C } (3') \\ \text{ C G C C G G C G} \\ \quad \uparrow \end{array}$ |
| <i>Eco</i> RI | $\begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{ G A A T T C } (3') \\ \text{ C T T A A G} \\ * \quad \uparrow \end{array}$ | <i>Pst</i> I | $\begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{ C T G C A G } (3') \\ \text{ G A C G T C} \\ \uparrow * \end{array}$ |
| <i>Eco</i> RV | $\begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{ G A T A T C } (3') \\ \text{ C T A T A G} \\ \quad \uparrow \end{array}$ | <i>Pvu</i> II | $\begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{ C A G C T G } (3') \\ \text{ G T C G A C} \\ \quad \uparrow \end{array}$ |
| <i>Hae</i> III | $\begin{array}{c} \downarrow * \\ (5') \text{ G G C C C } (3') \\ \text{ C C G G} \\ * \uparrow \end{array}$ | <i>Tth</i> 111I | $\begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{ G A C N N N G T C } (3') \\ \text{ C T G N N N C A G} \\ \quad \uparrow \end{array}$ |

Arrows indicate the phosphodiester bonds cleaved by each restriction endonuclease. Asterisks indicate bases that are methylated by the corresponding methylase (where known). N denotes any base. Note that the name of each enzyme consists of a three-letter abbreviation (in *italics*) of the bacterial species from which it is derived, sometimes followed by a strain designation and Roman numerals to distinguish different restriction endonucleases isolated from the same bacterial species. Thus *Bam*HI is the first (I) restriction endonuclease characterized from *Bacillus amyloliquefaciens*, strain H.

Spajanje DNK komplementarno homopolimetričkim repovima: Terminalna transferaza



TdT



Aminokiselinska sekvenca i raspored sekundarnih struktura katalitičnog centra TdT

Procesivna nasuprot distributivne polimerizacije

Enzimi koji disosuju nakon svake adicije i koji mogu da deluju na više lanaca se označavaju kao DISTRIBUTIVNI
Oni koji procesuju duž istog lanca bez disocijacije se označavaju kao PROCESIVNI

Industrijska primena enzima

Imobilizacija enzima

- Prednosti imobilizovanih enzima:
 - Višekratna upotreba
 - Reakcija se može lako kontrolisati i zaustaviti jednostavnim izdvajanjem biokatalizatora
 - Povećana stabilnost biokatalizatora
 - Povećana produktivnost
 - Mogućnost automatizacije
 - Model sistemi za proučavanje enzima vezanih za membrane ćelija

Postupci imobilizacije

- Adsorpcija enzima na čvrstim nosačima
- Kovalentno vezivanje za čvrste nosače
- Smeštanje enzima u polupropustljivu membranu
- Obuhvatanje enzima nosačem
- Imobilizacija enzima na granici faza tečno-tečno

Adsorpcija enzima na čvrstim nosačima

- Adsorpcija se zasniva na slabim privlačnim silama

- Pristupačnost adsorbensa
- Blagi reakcioni uslovi
- Aktivnost imobilizovanog enzima velika
- Jednostavnost
- Široka primenljivost
- Mogućnost regeneracije
- Nespecifičnost
- Desorpcija sa nosača usled slabih veza
- Često potrebno i dodatno umrežavanje
- Kontaminacija proizvoda
- Odsustvo opštih protokola

Načini izvodjenja adsorpcije:

Statička metoda

Dinamička metoda

Metoda elektrotaloženja

Adsorpcija u koloni

Mehanizam adsorpcije

- Difuzija molekula enzima do površine nosača
- Difuzija molekula enzima unutar pora nosača
- Formiranje monomolekulskog sloja enzima

Adsorpcija enzima na čvrstim nosačima

- **Uticaj različitih činilaca na adsorpciju enzima:**
 - pH i jonska jačina
 - Specifična površina nosača
 - Osobine enzima i nosača
 - Temperatura
 - Koncentracija enzima
- **Specifična površina nosača**
 - Neporozan nosač
 - Porozan nosač
 - Mikroporozan
 - Mezoporozan
 - Makroporozan (dijametar veći od 50 nm)

■ Adsorpcija enzima na prethodno modifikovanim nosačima:

- Prethodna modifikacija nosača često može doprineti jačem vezivanju enzima na nosač. Pored povećanja jačine vezivanja, modifikacija nosača često omogućuje bolje katalitičke osobine imobilisanog enzima usled stvaranja povoljne mikrookoline
- Obrada nosača puferima
- Obrada nosača rastvorima koji sadrže jone metala
- Obrada nosača albuminom

■ Komercijalno dostupni nosači za imobilizaciju

- Ne postoji univerzalan nosač, ali on bi trebalo da poseduje osobine kao što su: velika površina, mehanička i termička stabilnost, odgovarajući oblik i veličina čestica, rezistentnost na mikrobiološku kontaminaciju, mogućnost da se lako regeneriše.
- Nosači se dele prema hemijskom sastavu na neorganske i organske, a prema morfološkim osobinama na neporozne i porozne.

Nosači koji se koriste za adsorpciju

■ Neorganski nosači

- Silicijum
- Aluminiyum
- Zeoliti
- Porozno staklo
- Oksidi metala
- Keramika
- Aktivni ugalj

■ Organski nosači

- Celuloza
- Skrob
- Dekstran
- Polisaharidi algi: agar, agaroza, alginat, karagenan
- Hitin, hitozan-polisaharidi sa amino grupama

Kovalentno vezivanje enzima na čvrste nosače

- Stabilni imobilisani preparati
- Nema kontaminacije proizvoda
- Velika raznovrsnost postupaka
- Moguće reakcije sa svim supstratima
- Nema difuzionih limitacija
- Skupa i složena metoda
- Teška optimizacija uslova (inhibitori, modifikatori)
- Gubitak aktivnosti enzima
- Teška regeneracija nosača

Osobine kovalentne imobilizacije enzima

- Enzimi se obično imobilizuju preko amino grupe, karboksilne grupe, sulfidrilne grupe, imidazolne grupe, hidroksilne grupe ili fenolnog jezgra tirozina.
- Mali je broj grupa koje su toliko aktivne da se odmah može pristupiti njihovom povezivanju. Usled toga, veoma retko se nosači koriste direktno za vezivanje enzima i u većini slučajeva, treba prethodno aktivirati bilo nosač, bilo enzim. Metde kovalentnog vezivanja su obično složene, skupe i sastoje se iz najmanje dve faze: aktivacije ili modifikacije nosača i vezivanje enzima za nosač.
- Pod aktivacijom nosača podrazumeva se izvođenje hemijske reakcije između nosača i aktivatora, pri čemu se na njegovoj površini stvaraju nove elektrofilne grupe koje pokazuju veliku reaktivnost prema nukleofilnim grupama u molekulu enzima.
- I neorganski i organski nosači se aktiviraju uvođenjem hemijski reaktivnijih grupa.

Osobine kovalentne imobilizacije

- Kovalentno imobilisani enzimi su stabilni u širokom opsegu spoljnih uslova i nalaze veliku primenu u medicini i prehrambenoj industriji gde ne sme doći do kontaminacije proizvoda proteinima
- Prema broju postupaka i specifičnih agenasa koji se koriste ovaj metod imobilizacije raznovrsniji je od ostalih metoda. Odabiranjem odgovarajućih nosača i modifikacijom određenih funkcionalnih grupa nosača i enzima mogu se nameski menjati karakteristike imobilisanog enzima.
- Veoma je važno pri hemijskom vezivanju enzima za nosač da učestvuju samo one funkcionalne grupe u molekulu enzima koje nisu bitne za njegovu aktivnost. Bitno je i da te grupe budu reaktivne, kako bi imobilizacija bila selektivna i da bi se odvijala u blagim uslovima pri kojima neće doći do denaturacije enzima.
- Nosač ne sme da ima nikakve reaktivne grupe koje bi bile u stanju da vežu supstrat, ili neka druga jedinjenja. Pored toga, na nosaču ne sme da bude fizičke adsorpcije enzima kao ni adsorpcije neke druge supstance iz rastvora.

Ciljevi kovalentne imobilizacije

- Imobilisani enzim treba da zadrži što više od početne aktivnosti, što se može postići na različite načine:
 - Izborom nosača i metoda koji omogućavaju blage uslove imobilizacije
 - Da se smanji količina enzima vezanog u nekatalitičkoj konformaciji (imobilizacija u prisustvu supstrata, proizvoda, inhibitora ili nekog drugog liganda)
 - Da se smanje sterne smetnje
 - Primena međuagenasa čime se omogućava da se enzim udalji sa površine nosača.

Obuhvatanje enzima nosačem

- Metode imobilizacije koje se zasnivaju na obuhvatanju enzima nosačem se grubo mogu podeliti na zarobljavanje enzima u polimerne matrice i umrežavanje enzima funkcionalnim agensima.
- Smeštanje enzima u trodimenzionalnu mrežu gusto isprepletenih polimernih lanaca, koji stvaraju gel, pri čemu matrica gela treba da bude dovoljno porozna da kroz nju mogu neometano da prolaze molekuli supstrata i proizvoda reakcije, a da enzim ne može da napusti matricu i pređe u okolni rastvor.
- Enzim bi trebalo da bude ravnomerno distribuiran unutar polimera. Između molekula enzima i polimernih lanaca mogu da se formiraju jonske i vodonične veze koje doprinose da enzim ostane unutar gela.
- Za imobilizaciju se najviše koriste gelovi na bazi poliakrilamida.

Umrežavanje enzima

- Umrežavanje enzima se zasniva na intra- i intermolekulskom vezivanju molekula enzima i bifunkcionalnog agensa. Molekuli enzima se vezuju među sobom, ili sa drugim proteinima preko bifunkcionalnog agensa i grade trodimenzionalne agregate koji su nerastvorni u vodi.
- Agensi koji se najčešće koriste su glutaraldehid, bis-diazobenzidin, dialdehid skroba, alifatični amini.
- Mala primena ove metode je zbog velikog utroška enzima, a imobilizovani preparat ima loše mehaničke osobine. Metoda se može kombinovati sa adsorpcijom enzima na čvrste nosače i naknadnom umrežavanju imobilizovanog enzima bifunkcionalnih agensima.

Smeštanje enzima iza polupropustljive barijere

- Enzim se smešta iza čvrste polupropustljive barijere, koja najčešće propušta supstrat i proizvode reakcije, a zadržava enzim u ograničenom prostoru (**inkapsulacija enzima**).
- Alternativno, enzim se nalazi mehanički zarobljen, adsorbovan, ili kovalentno vezan u samoj poroznoj barijeri (**imobilizacija enzima u membranama**).

Primena enzima u industriji hrane

Osnovne komponente hrane

- Biopolimeri
 - Proteini
 - Ugljeni hidrati
 - Lipidi
- Jedinjenja malih molekularnih masa
 - estri
 - mono- i disaharidi
 - Terpeni
 - Fenoli
 - glikozidi...

Enzimi kao aditivi u industriji hrane

■ Izvori

- Biljke
- Životinje
- Mikroorganizmi
- *Rekombinantna tehnologija*

■ Prednosti

- "Mild technology"
- Visoka specifičnost
- Širok izbor enzimskih specifičnosti u prirodi
- Prirodni (organski)
- Ne-toksični

■ Egzogeni enzimi

- "screening" novih enzima klasičnim tehnikama iz prirodnih izvora
- Protein inženjeringom (*in vitro* evolucija)

■ Endogeni enzimi

■ Endogeni inhibitori

Osnovne grupe enzima koje su našle primenu u industriji hrane

■ Hidrolaze

- Proteaze
- Lipaze
- Glikohidrolaze (pektinaze i celulaze)

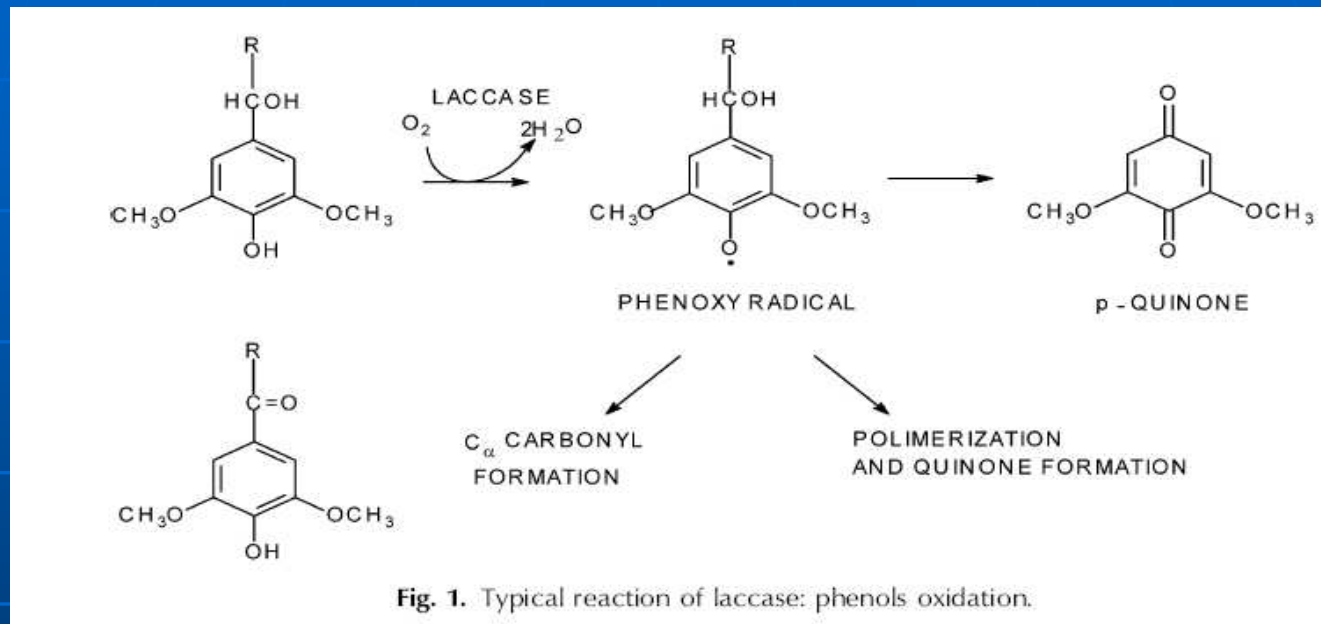
■ Oksidaze i transferaze

- Tirozinaze
- Lakaze
- Peroksidaze
- Transaminaze
- Glukozo-oksidge

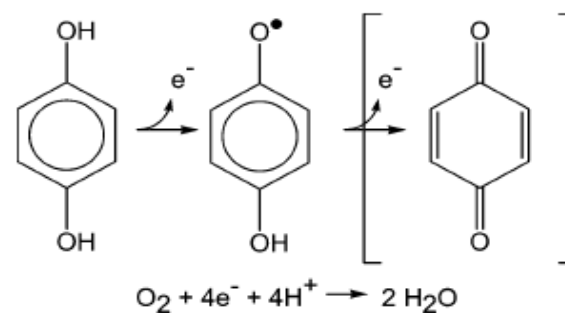
Lakaza (*p*-difenol oksidaza, EC 1.10.3.2)

- Polifenol oksidaza koja sadrži bakar
- Fiziološka uloga je u sintezi lignina
- Izvori
 - Bakterije
 - Gljive
 - Biljke
- Supstrati
 - Polifenoli
 - Metoksi supstituisani fenoli
 - Diamini... (ali ne i Tyr!)

Mehanizam dejstva lakaze



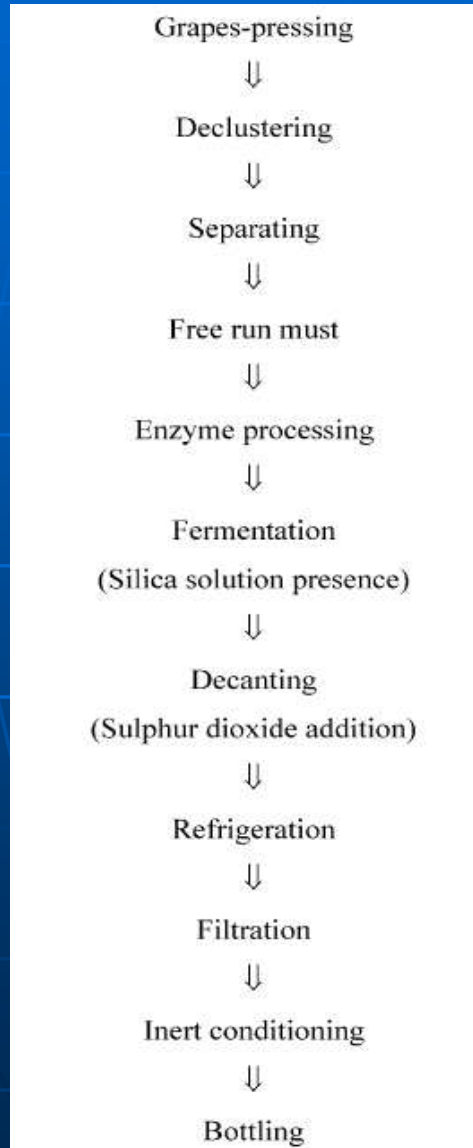
Scheme 1. Laccase-Catalyzed Oxidation of a Diphenol



Primena lakaze u industriji

- Razgradnja opasnih materija u industrijskim vodama
- Proizvodnja vina, piva, sokova i hleba
- Odredjivanje koncentracije askorbinske kiseline
- Geliranje pektina iz šećerne repe
- Biosenzori

Upotreba lakaze u proizvodnji vina



■ Sastav vina

- Etanol
- Organske kiseline
- Soli
- Fenolna jedinjenja (boja i ukus)
 - Derivati cinaminske kiseline
 - Derivati katehina
 - **Antocijanidini**
 - **Malvidin** (monoglukozyd antocijanidina, glavni izvor boje u grožđu)

■ Madeirizacija

- Oksidacija aldehida, amino kiselina i proteina u vinu katalizovana gvožđem, bakrom, ili enzimima
- Polifenoli se mogu ukloniti polivinilpolipirrolidonom (selektivno?)
- Madeirizacija se može sprečiti dodavanjem sumpor-dioksida

■ Enzimski aditivi u proizvodnji vina

- **Lakaze** (pH optimum 2.5-4, stabilnost u kiseloj sredini, reverzibilna inhibicija sulfitima)
- Tanaze
- Fenolaze
- Antocijanaze

■ Imobilizovani enzimi

- **Stabilizacija piva**
 - Uklanjanje fenola i viška kiseonika
- **Određivanje askorbinske kiseline**
 - Na bazi inhibicije oksidacije 2,3-diaminofenazina
- **Uklanjanje kiseonika iz proizvoda na bazi ulja (majonez i sl.)**
- **Poboljšanje ukusa čokolade**
- **Proizvodnja hleba**
 - Poboljšava mehanička svojstva glutenskih struktura (povećava se volumen i mekoća)

Upotreba oksidaza u proizvodnji hleba i peciva: molekularne osnove

- Tokom mešanja testa nastaje kompleksna kvaternarna struktura (gluten) koja se sastoji od kovalentno povezanih gluteninskih podjedinica. Veze koje učestvuju u gradjenju ovih struktura su disulfidne i ditirozin veze.
- HMW gluteninska podjedinica je mase 65 – 120 kD i veoma kompleksne strukture.

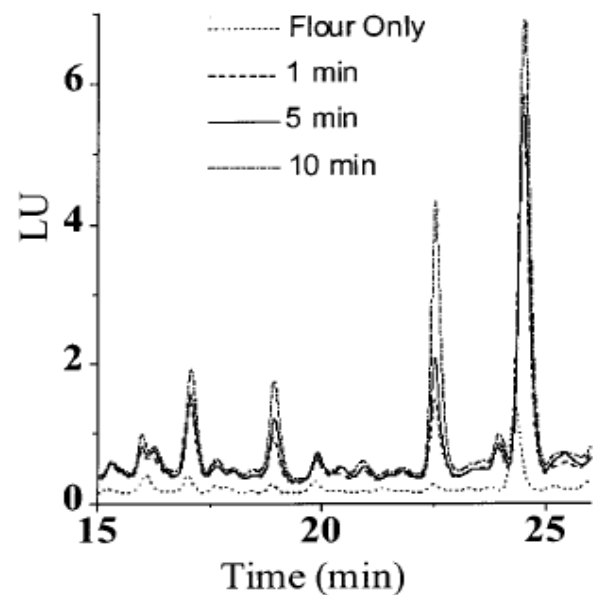


Figure 1. Direct fluorescence detection during HPLC analysis of amino acids hydrolyzed from flour and dough made from that flour mixed for 1, 5, and 10 min. Four significant peaks at 17, 18.5, 22.5, and 24.5 min increased during mixing. Dityrosine and isodityrosine standards eluted at approximately 18.5 and 24.5 min, respectively. Each of these peaks represented cross-links that were not present or were present in very low levels in the flour and form upon mixing the flour in water over time. The peaks eluting at 22.5 and 24.5 min also increased notably when 1% free tyrosine was added into the mixograph analyses (data not shown).

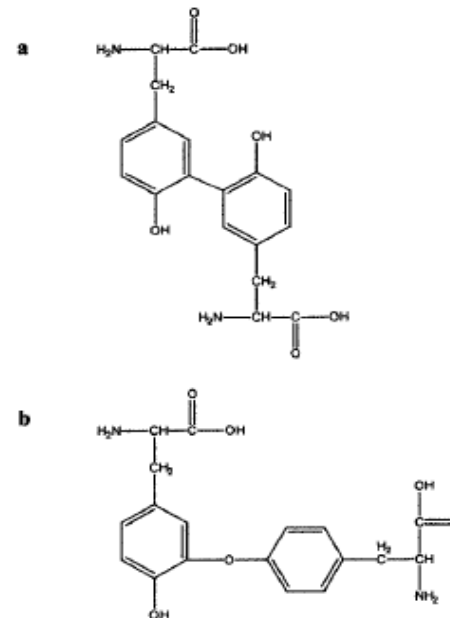


Figure 2. Structures of (a) dityrosine and (b) isodityrosine.

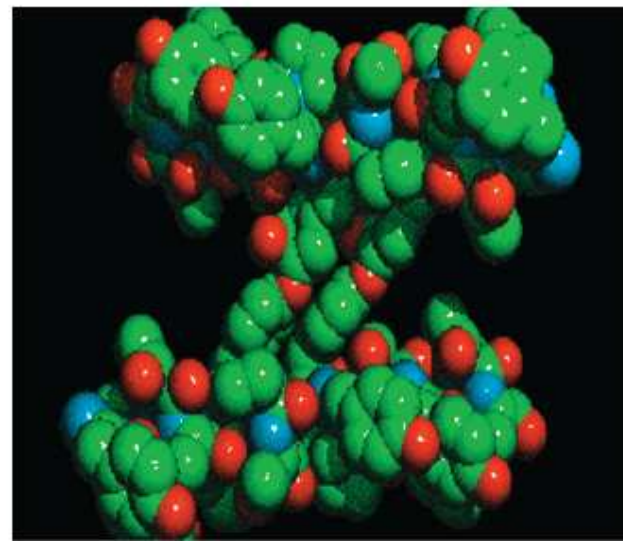


Figure 3. Model showing two glutenin peptides with the sequence YYPTSQQGYPTSQQGYPTS linked together through double-tyrosine cross-links.

Peroksidazom indukovano ukršteno povezivanje tirozina i ferulinske kiseline

- In vivo, peroxidaza ukršteno povezuje komponente ćelijskih zidova biljaka preko ferulinske kiseline esterifikovane polisaharidima. Ovaj enzim deluje i na tirozin. U smeši proteina i saharida, moguće su homo- i heteroveze između tirozina i ferulinske kiseline.

Brzina konverzije različitih supstata peroksidazom

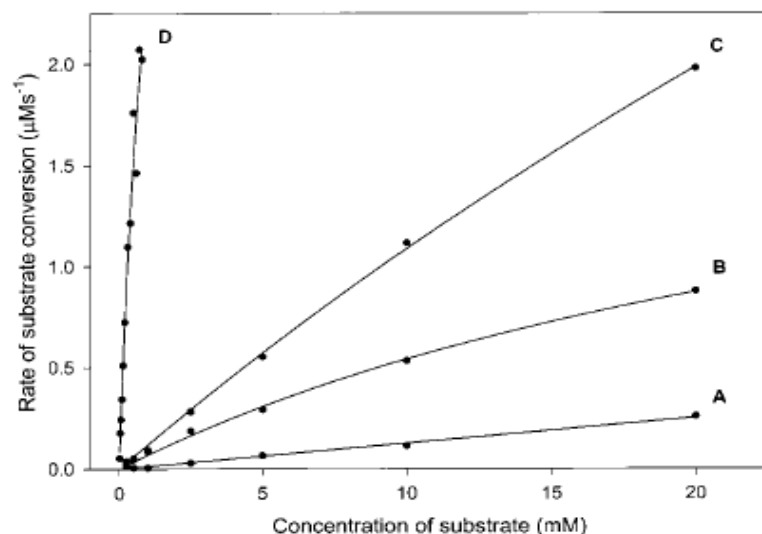


Figure 1. Rate of tyrosine conversion for GYG (A), YGG (B), GGY (C), and FA (D) as a function of the substrate concentration upon incubation with HRP and H₂O₂.

Table 1. Overall Extinction Coefficients at 318 nm for the Products of the Complete Conversion ($\Delta^{318}\epsilon_{app}$) and Apparent Values of V_{max}/K_M for the Conversion of GYG, YGG, GGY, and FA

| | substrate | | | |
|--|-----------|-------|------|------|
| | GYG | YGG | GGY | FA |
| $\Delta^{318}\epsilon_{app}$ (M ⁻¹ cm ⁻¹) | 310 | 590 | 715 | 7000 |
| $(V/K)_{app}$ (s ⁻¹) | 0.014 | 0.078 | 0.13 | 1.66 |

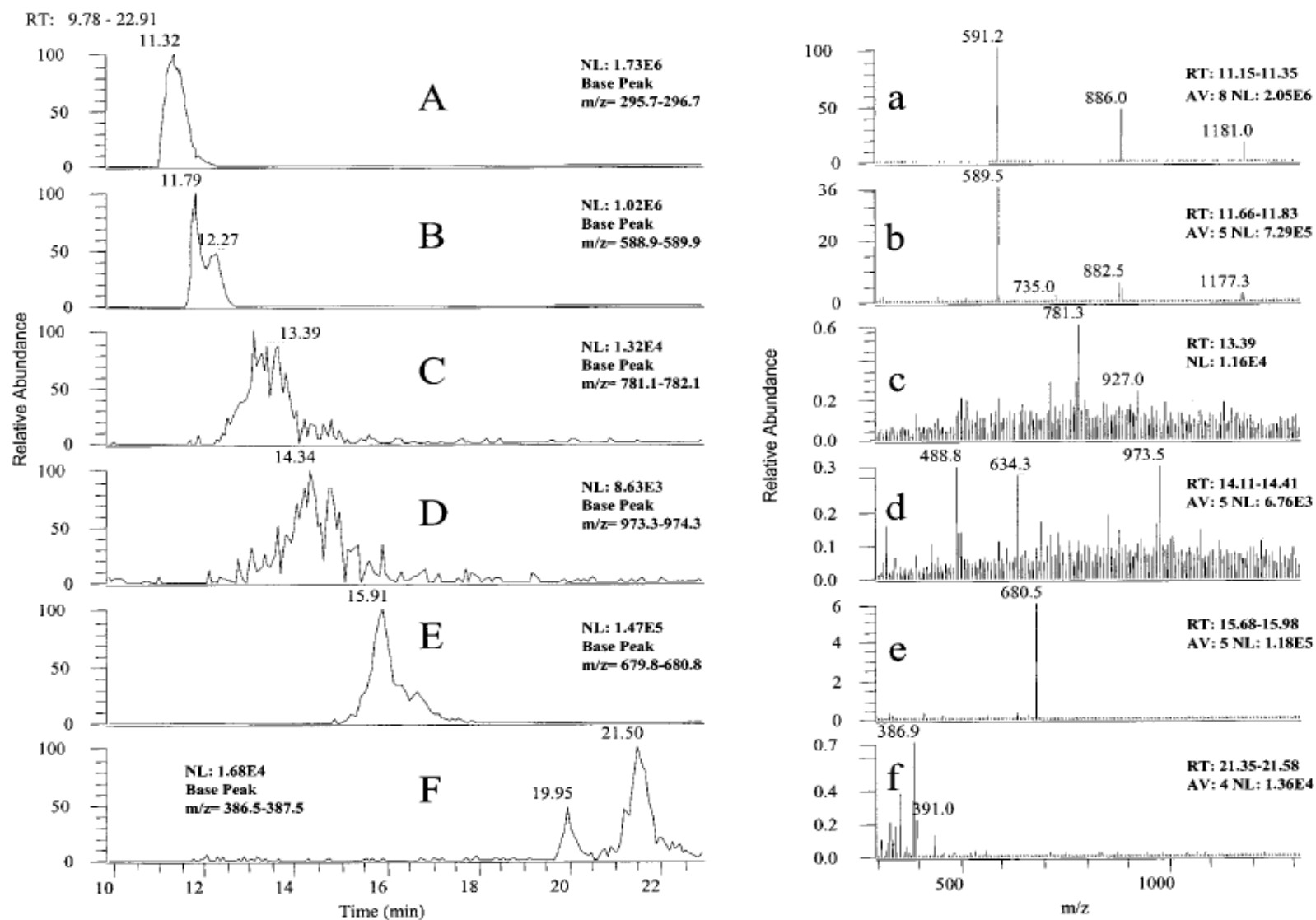


Figure 2. Base-peak RP-HPLC chromatograms of the kinetically controlled heteroincubation of GYG and FA (A–F), with RP-HPLC elution of the mass indicated in each chromatogram and corresponding selected mass spectra of these eluates (a–f): (A/a) GYG; (B/b) (GYG)₂; (C/c) FA-(GYG)₂; (D/d) FA-(GYG)₂-FA; (E/e) FA-GYG-FA; (F/f) (FA)₂.

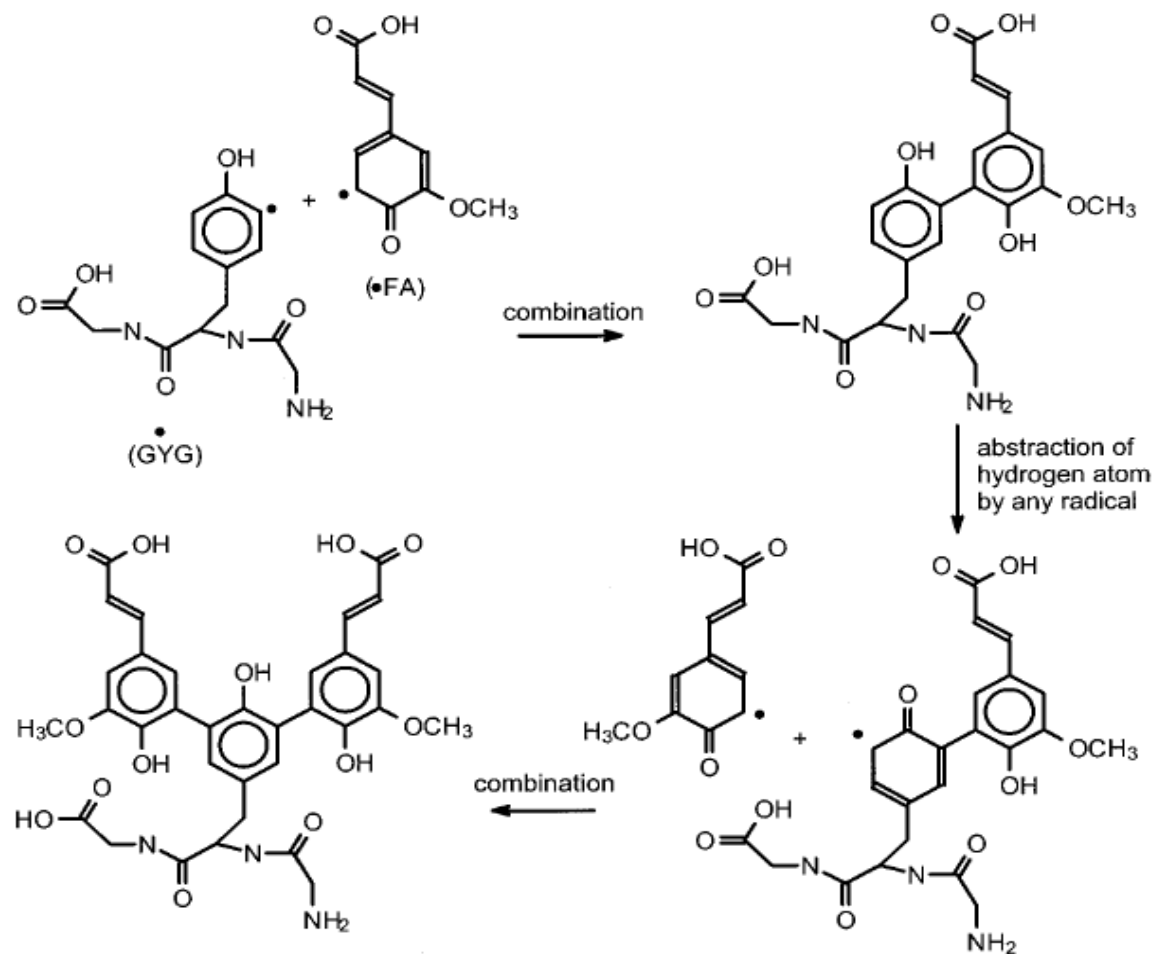


Figure 3. Proposed mechanism for the formation of the most predominant heteroadduct, FA-GYG-FA.

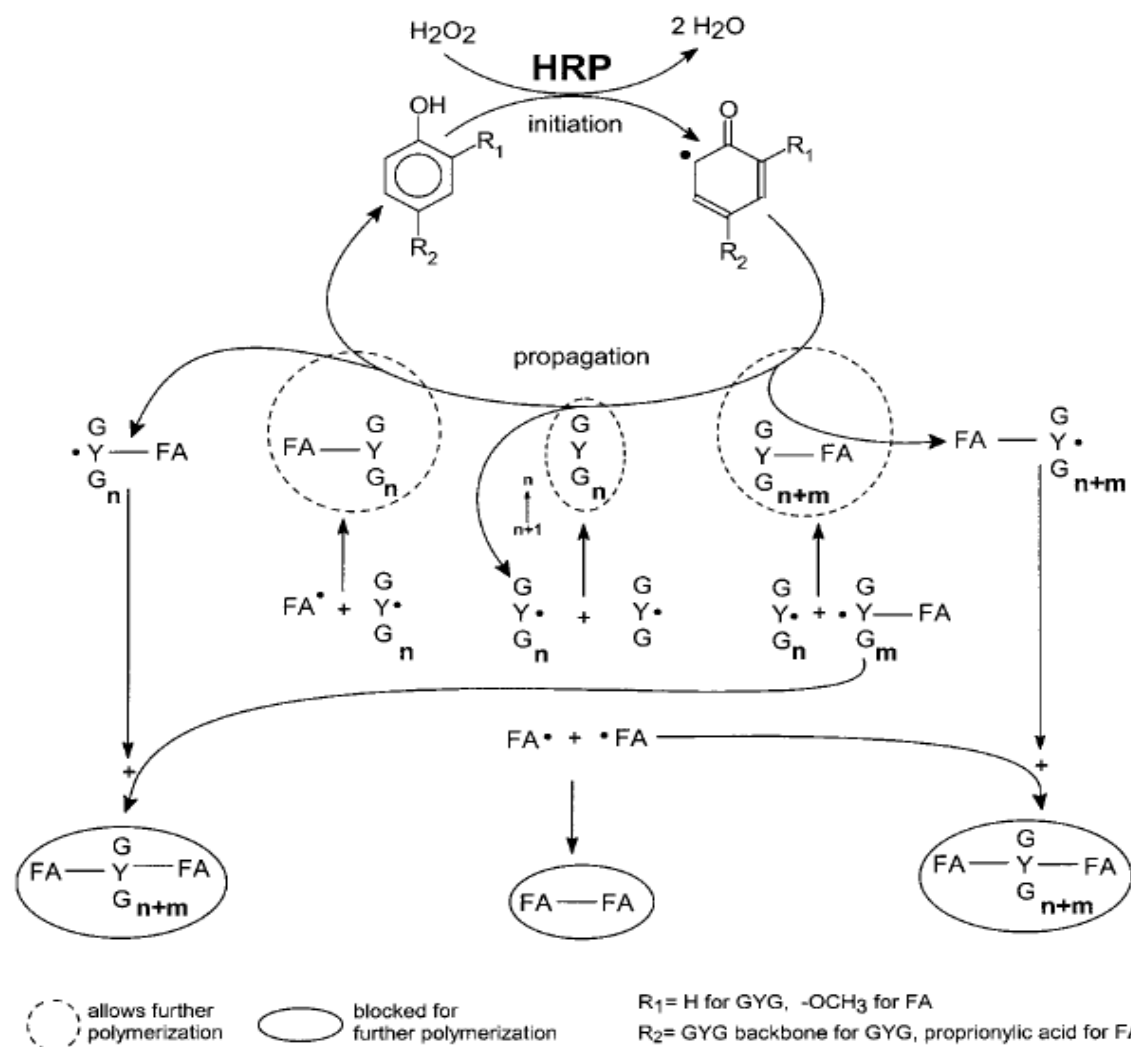


Figure 4. Cycles of radical reactions in the heteroincubation mixture of GYG and FA explaining the GYG oligomers and heteroadducts.

Transglutaminazom indukovano ukršteno povezivanje proteina brašna



Figure 1. SDS-PAGE of gliadin and gluten crosslinked by TGase.

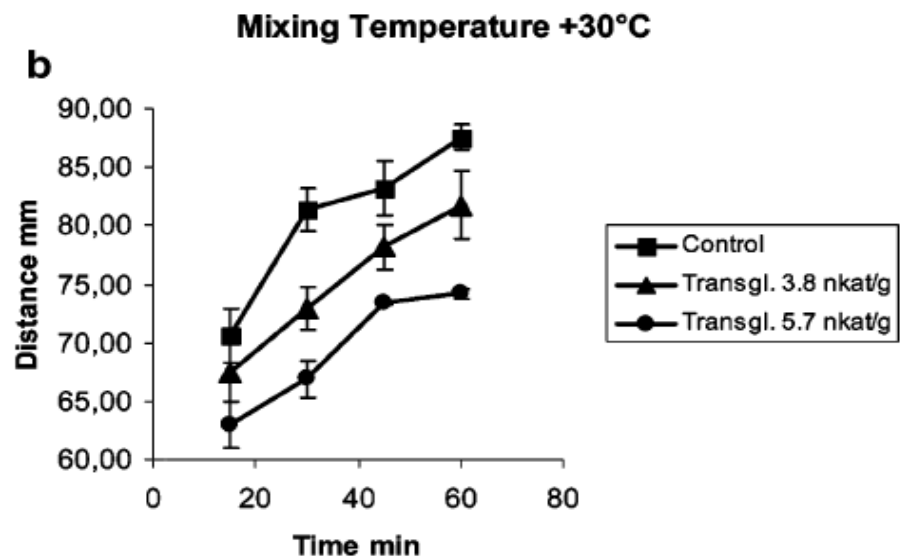
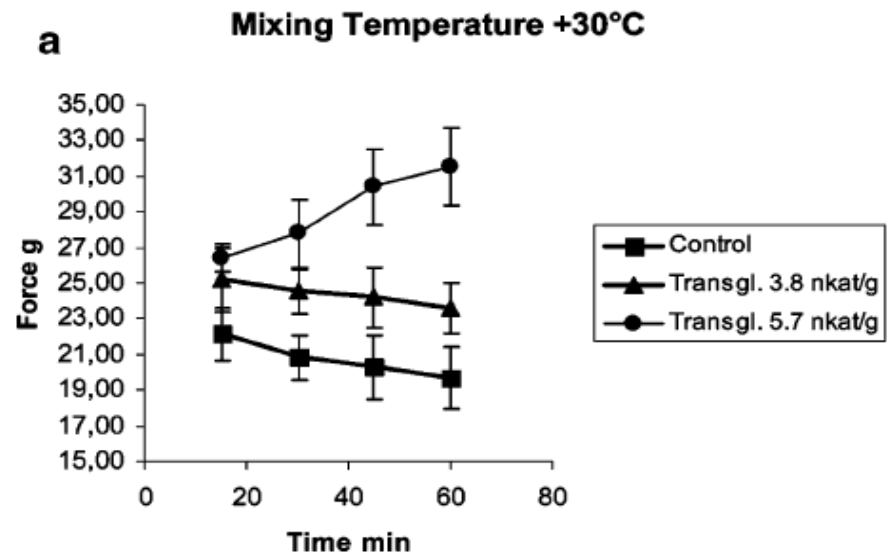


Figure 3. Effect of dough resting time after mixing on (a) resistant force and (b) the extensibility of dough. Mean values \pm standard error of seven replicates.

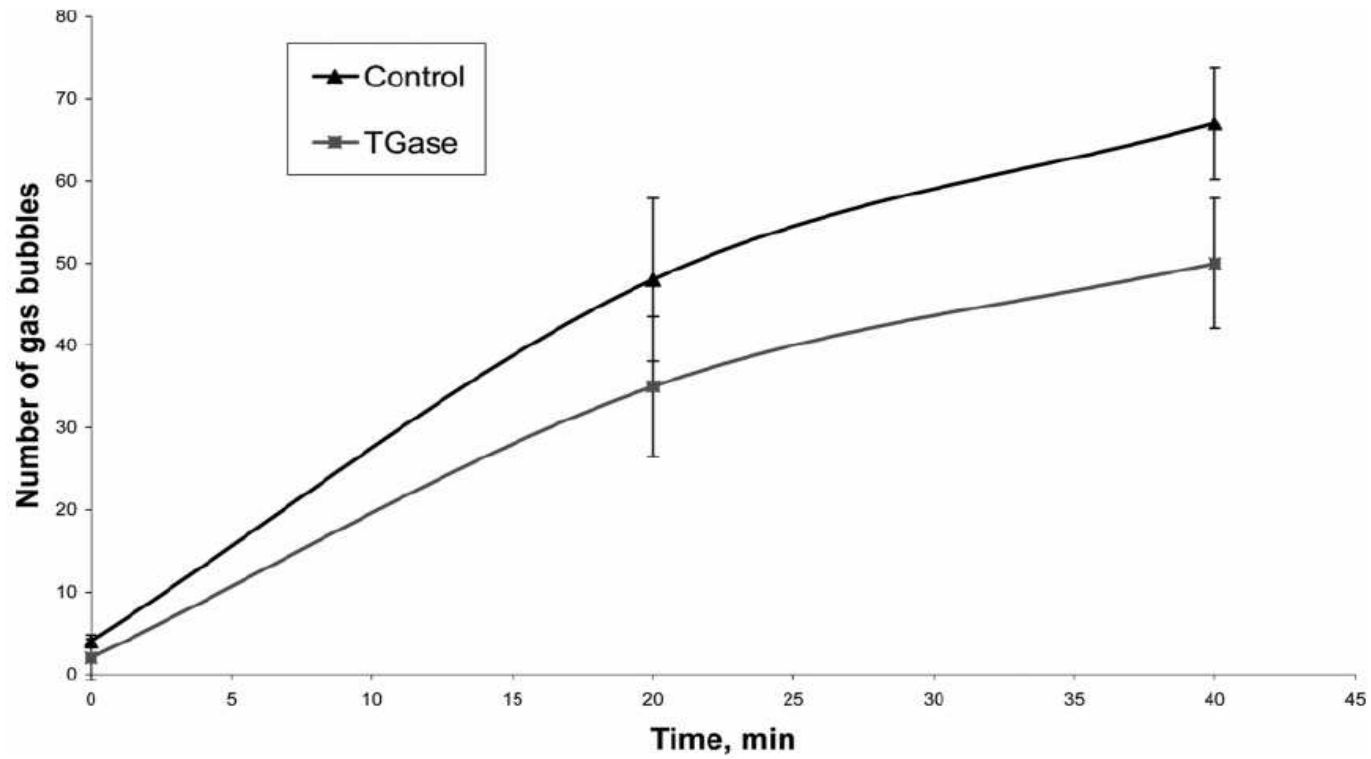


Figure 4. Number of largest air bubbles (0.01–0.05 mm²) after mixing and 20 and 40 min of proofing time. Mean values \pm standard error of four different sections.

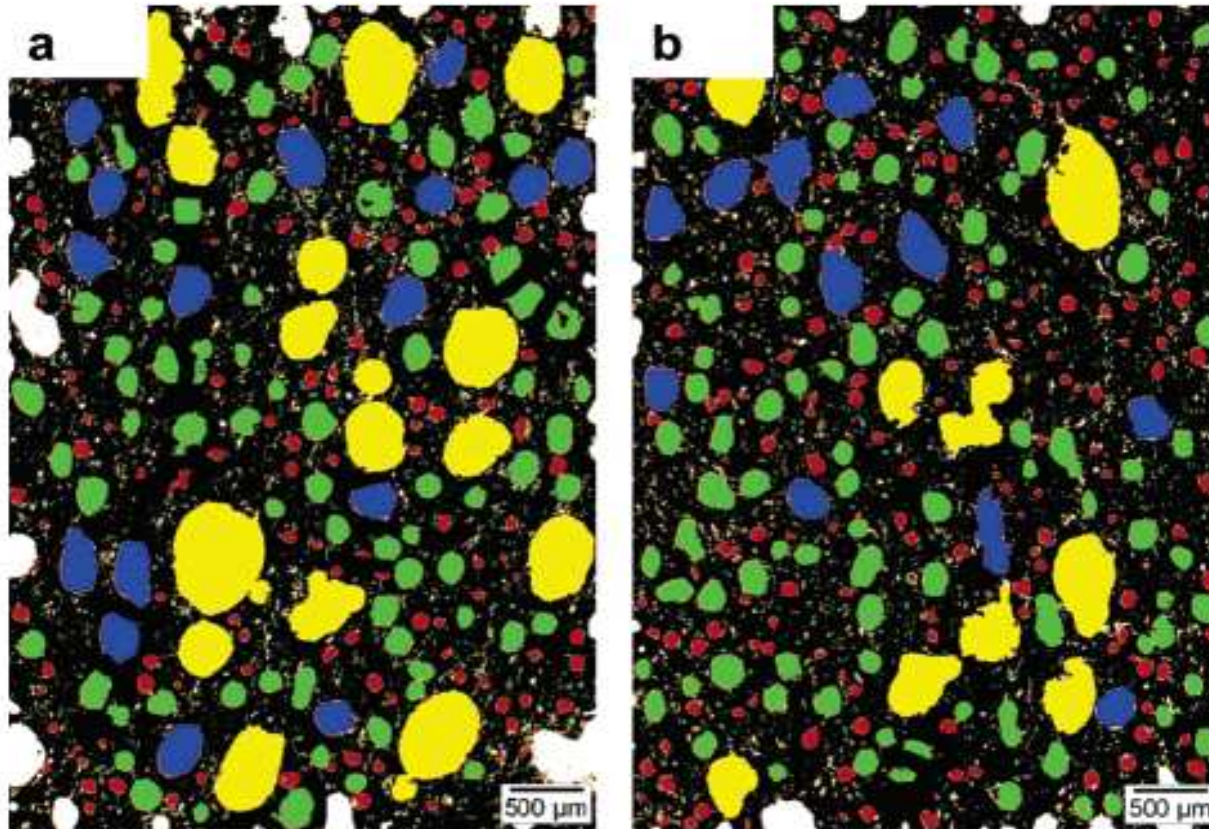


Figure 5. Representative micrograph of a fermented (a) control dough and (b) TGase (5.7 nkat/g) containing dough after 20 min of proofing. The largest bubbles (0.01–0.05 mm²) are yellow, the next largest bubbles (0.005–0.01 mm²) are blue, the second smallest bubbles (0.001–0.005 mm²) are green, and the smallest bubbles (0.0001–0.001 mm²) are red.

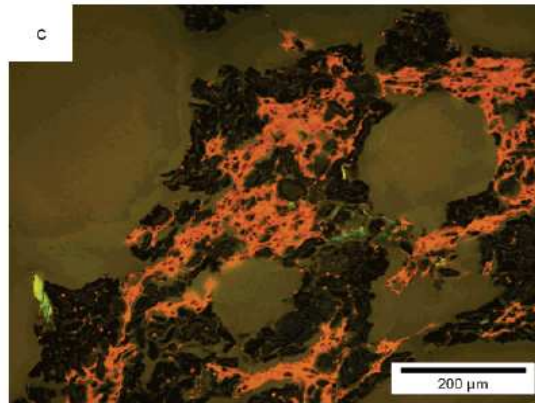
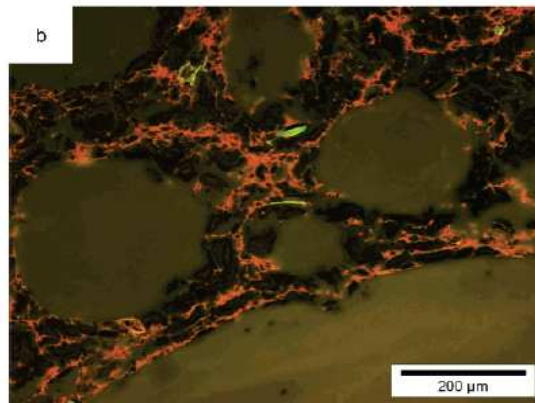
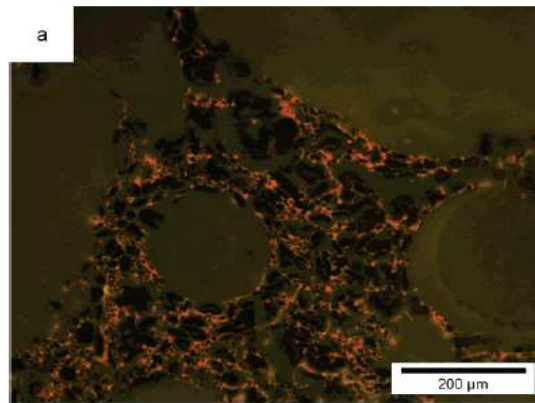


Figure 7. Micrographs of (a) the control bread, (b) bread containing 5.7 nkat/g TGase, and (c) bread containing 11.4 nkat TGase/g flour baked from organic flour at 10% of farinogram absorption. The protein has been stained orange by the acid fuchsin.

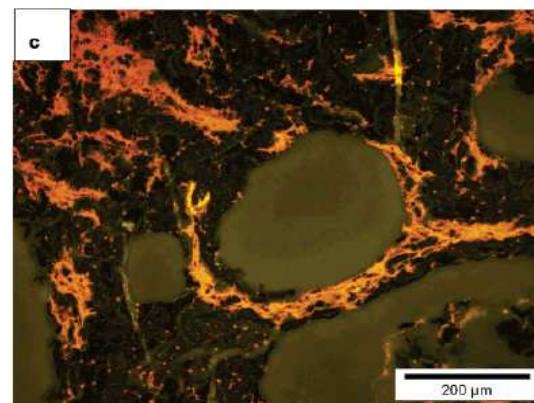
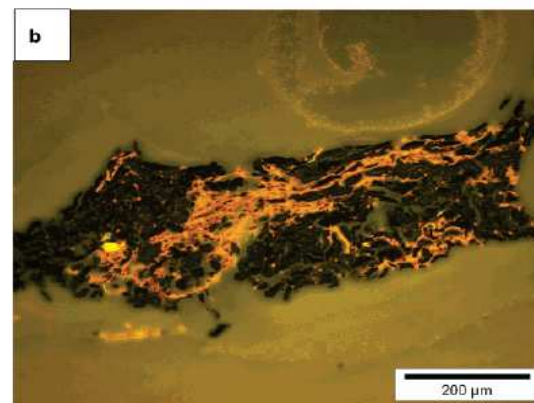
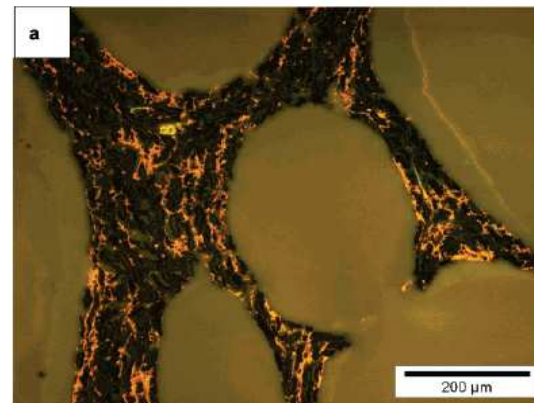


Figure 8. Micrographs of (a) control bread, (b) bread containing TGase at a activity level of 5.7 nkat/g, and (c) bread containing 11.4 nkat TGase/g flour baked from normal flour at 10% of farinogram absorption. The protein has been stained as in the previous figure.

Uticaj transglutaminaze na fiziko-hemijske osobine proteina mleka

- Transglutaminaza (TGaza) je enzim koji katalizuje acil transfer sa glutamina na slobodnu amino grupu (α ili ϵ -amino grupu lizina). Na taj način se formira izopeptidna veza ϵ -(γ -glutamil) lizin, koja može da bude inter, ili intramolekulska.
- Intermolekulska veza koja tako nastaje je odgovorna za fenomen ukrštenog povezivanja proteina tokom tretmana ovim enzimom, proteina mleka, brašna, ili mesa.
- Ukršteno-povezani proteini tih namirnica imaju bolje mehaničke osobine i lakše se dalje obraduju.

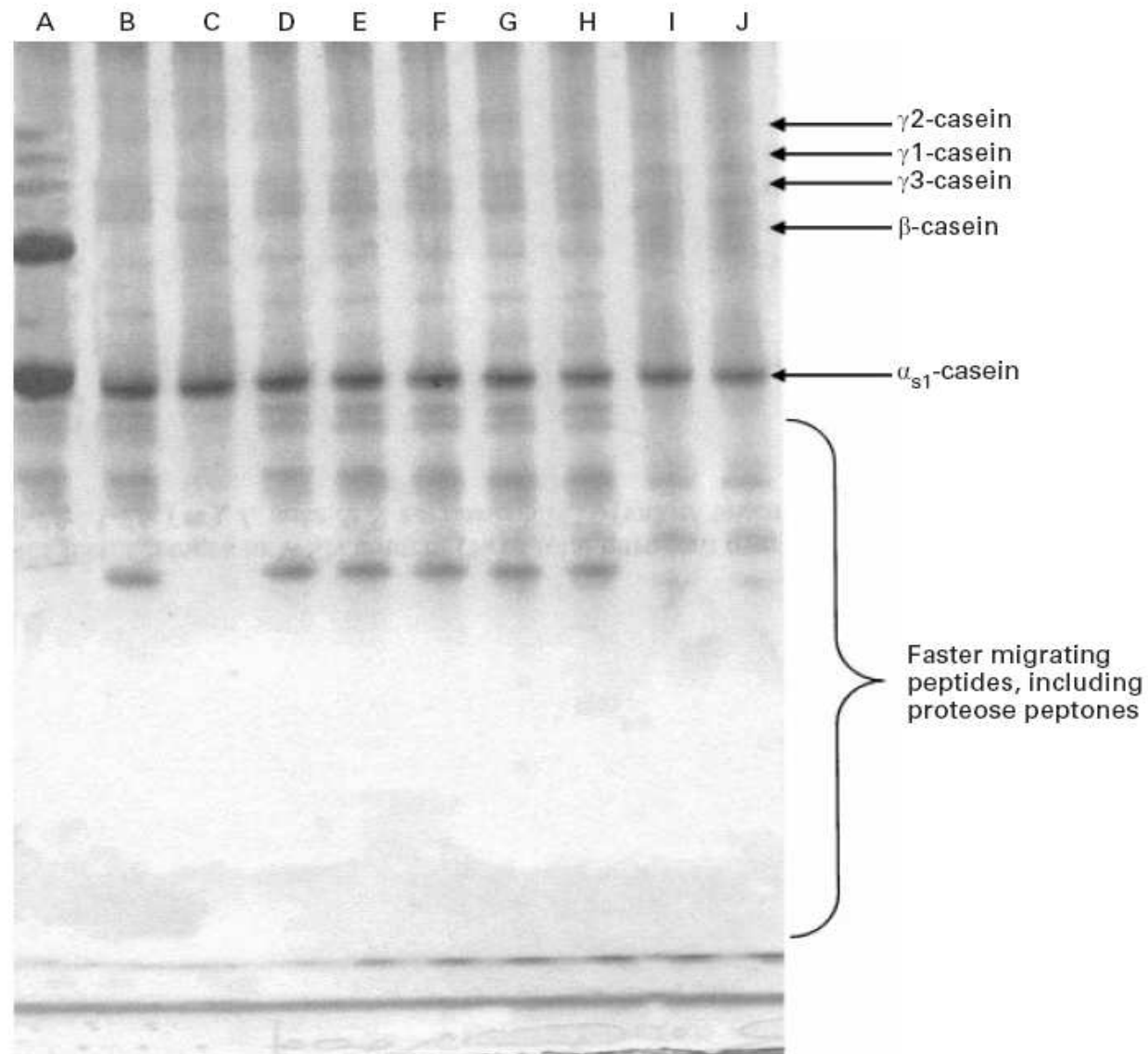
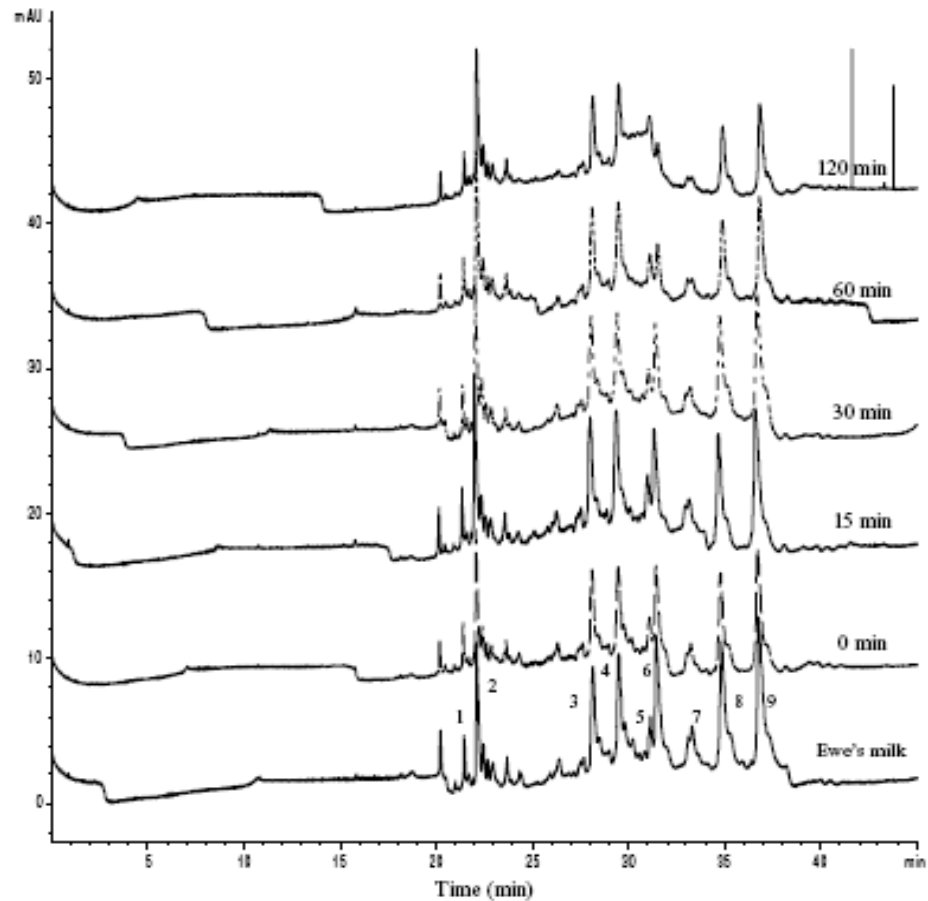


Fig. 3. Urea-polyacrylamide gel electrophoretograms of raw skimmed milk treated with transglutaminase (TGase) for 24 h at 6 °C and incubated at 37 °C for 0 or 6 h (lanes B and C), and raw TGase-treated skimmed milk incubated with plasmin (10 mg/l) at 37 °C at 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 h (lanes D to J, respectively). Similar results were obtained for skimmed milk preheated at 80 °C for 1 min prior to incubation with TGase (not shown). Raw control skimmed milk is shown in lane A.

Fig. 2 Effect of the incubation time in the capillary electrophoresis profiles of preheated ewe's milk (85 °C/15 min) treated with transglutaminase (final enzyme/substrate ratio of 0.02% at 40 °C). 1= α -lactalbumin; 2= β -lactoglobulin; 3= α_{s1} -casein I; 4= α_{s1} -casein II; 5= α_{s1} -casein III; 6= κ -casein; 7= β -casein; 8= β_2 -casein; 9= β_1 -casein



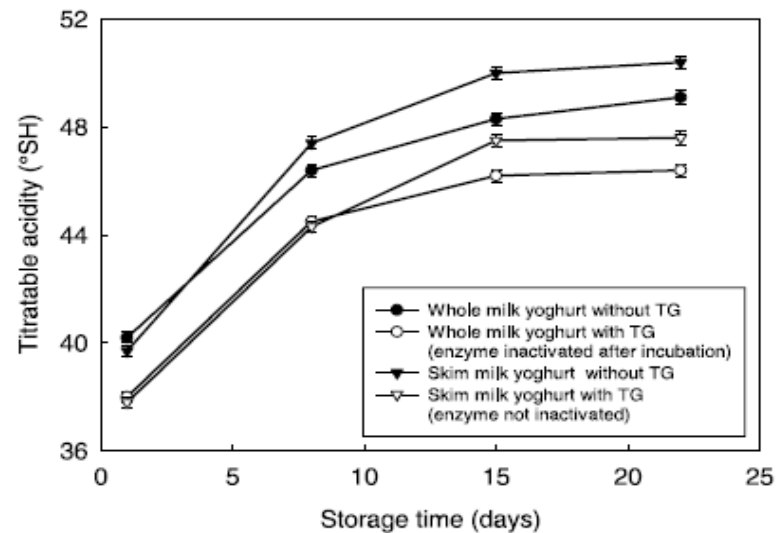


Figure 1 Titratable acidity (°SH) of whole milk yoghurt and skim-milk yoghurt with or without transglutaminase (TG) treatment. TG was inactivated in whole milk after incubation of 2 h at 40°C. In skim-milk, TG-incubation and bacterial fermentation were done simultaneously (i.e. no inactivation of TG).

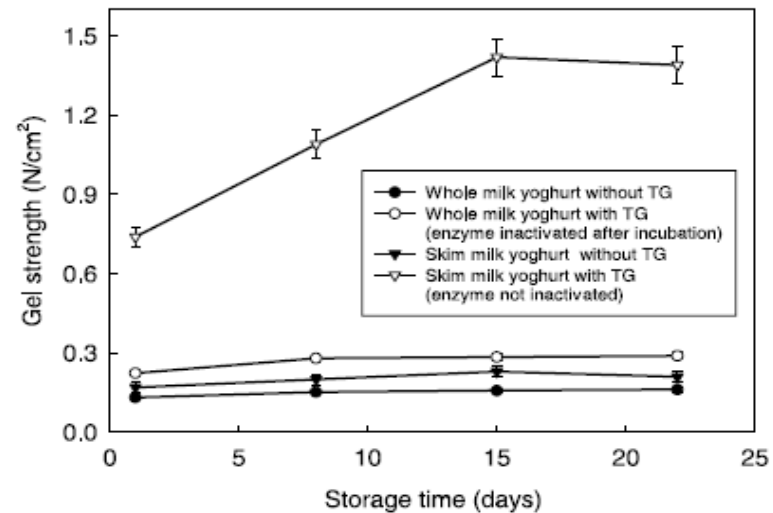


Figure 2 Gel strength of whole milk yoghurt and skim-milk yoghurt with or without transglutaminase treatment. TG was inactivated in whole milk after incubation of 2 h at 40°C. In skim-milk, TG-incubation and bacterial fermentation were done simultaneously (i.e. no inactivation of TG).

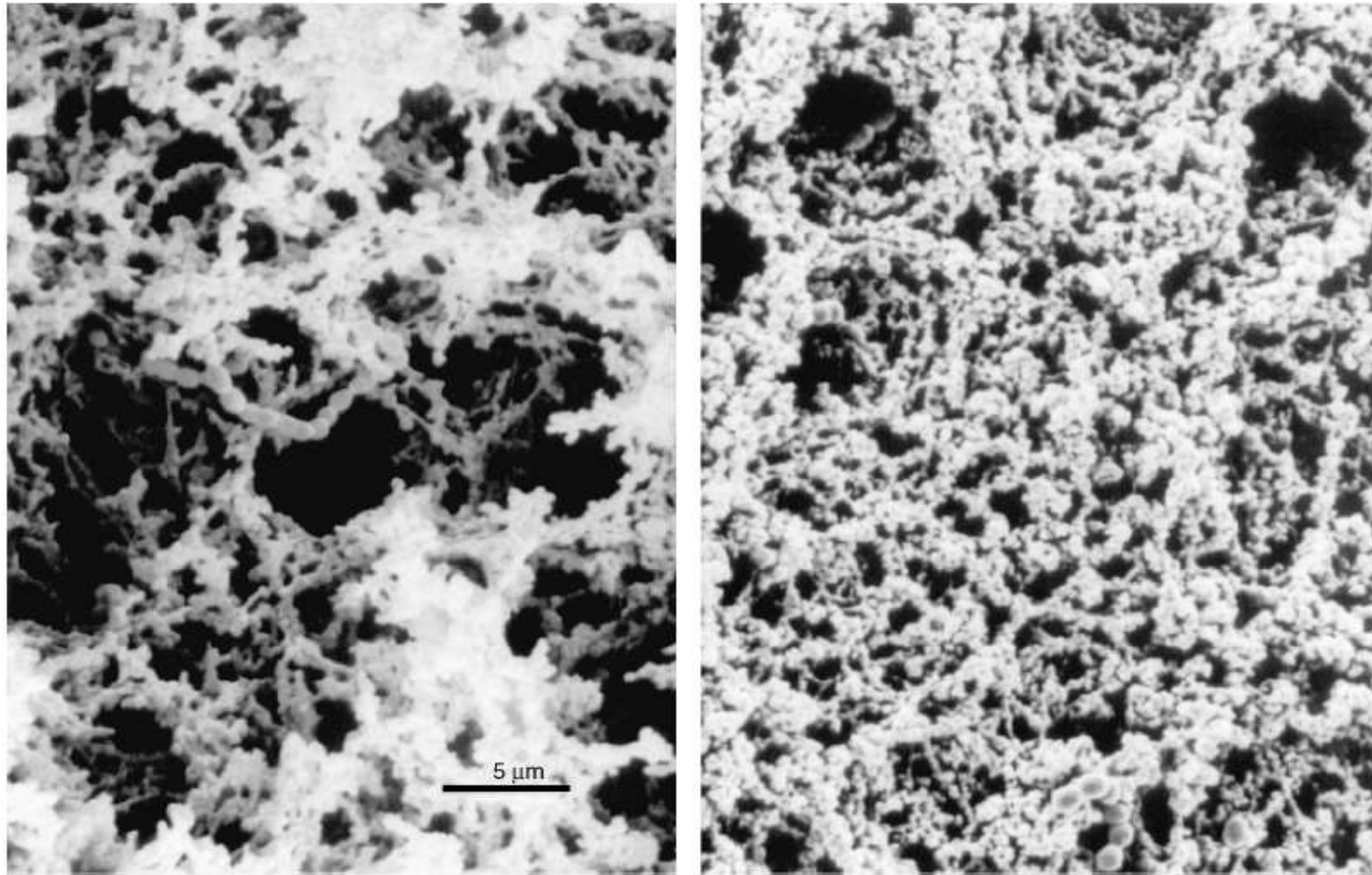


Figure 3 Scanning electron micrographs of skim-milk yoghurt gels from transglutaminase-treated (2 h at 40°C, right) or untreated milk (left). Length of the bar is 5 µm.

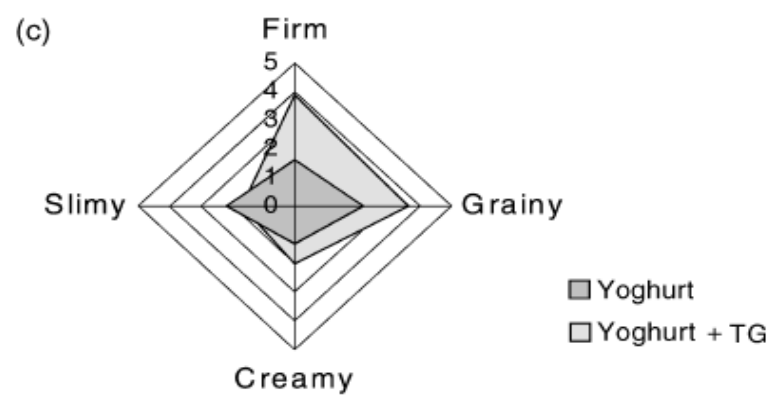
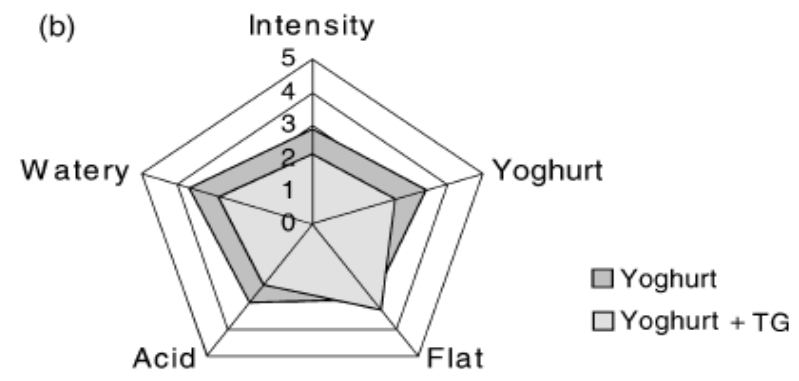
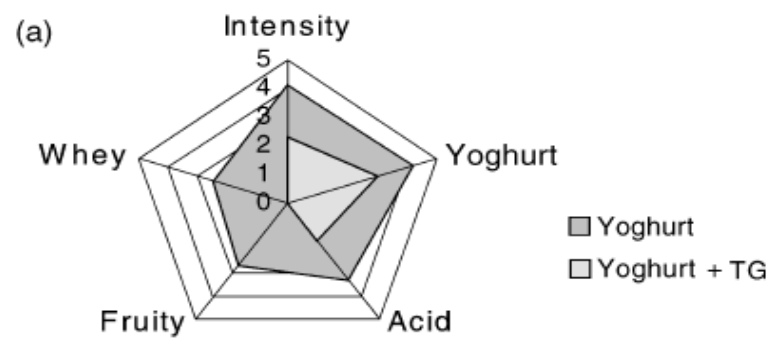


Figure 5 Sensory properties of skim-milk yoghurt from untreated and transglutaminase-treated (2 h at 40°C) milk. (a) odour; (b) taste; (c) consistency.

Dejstvo lakaze i transglutaminaze na proteine mesa

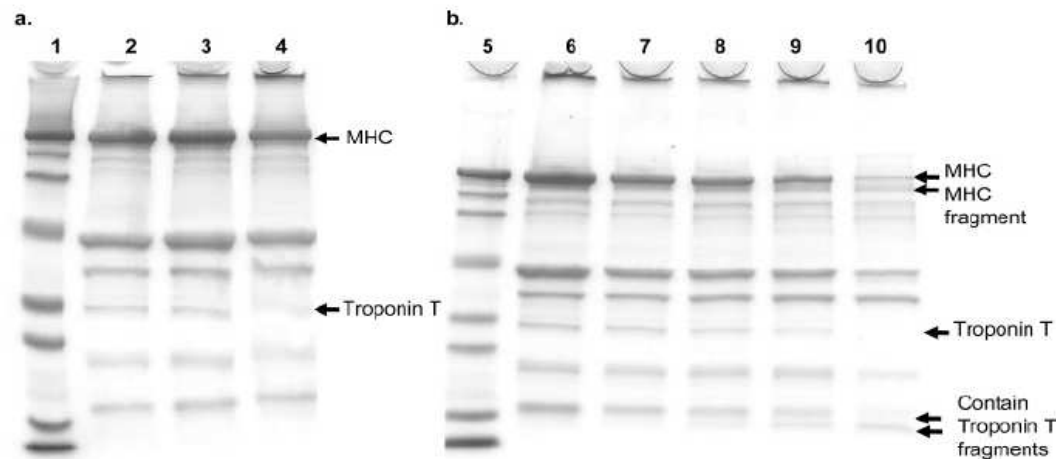


Figure 2. SDS-PAGE of SSP treated with (a) 50 nkat/g and (b) 200 nkat/g of laccase. Samples drawn from different time points of the treatment with 50 nkat of laccase/g (lane 2, after 1 h; lane 3, after 3 h; and lane 4, after 24 h). Samples drawn from different time points of the treatment with 200 nkat of laccase/g (lane 6, at time 0; lane 7, after 1 h; lane 8, after 3 h; lane 9, after 6 h; and lane 10, after 24 h). Lanes 1 and 5, molecular-weight marker (209, 124, 80, 49, 35, 29, 21, and 7 kDa). Treatment conditions: 50 mM sodium-phosphate buffer at pH 6, protein concentration of 3 mg/mL, 0.60 M Na⁺, at 40 °C. A total of 9 μ L of the soluble fraction was loaded/lane.

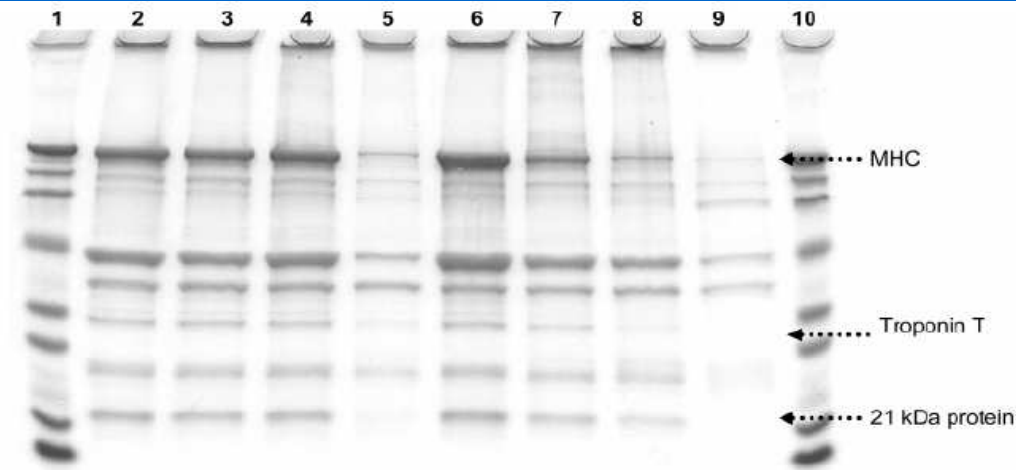


Figure 3. SDS–PAGE of SSP treated with 10 nkat/g (lanes 2–5) and 100 nkat/g of TG (lanes 6–9). Samples drawn from different time points of the treatment with 10 nkat of TG/g (lane 2, at time 0; lane 3, after 3 h; lane 4, after 6 h; and lane 5, after 24 h). Samples drawn from different time points of the treatment with 100 nkat of TG/g (lane 6, at time 0; lane 7, after 3 h; lane 8, after 6 h; and lane 9, after 24 h). Lanes 1 and 10, molecular-weight marker (209, 124, 80, 49, 35, 29, 21, and 7 kDa). Treatment conditions: 50 mM sodium-phosphate buffer at pH 6, protein concentration of 3 mg/mL, 0.60 M Na⁺, at 40 °C. A total of 9 μ L of the soluble fraction was loaded/lane.

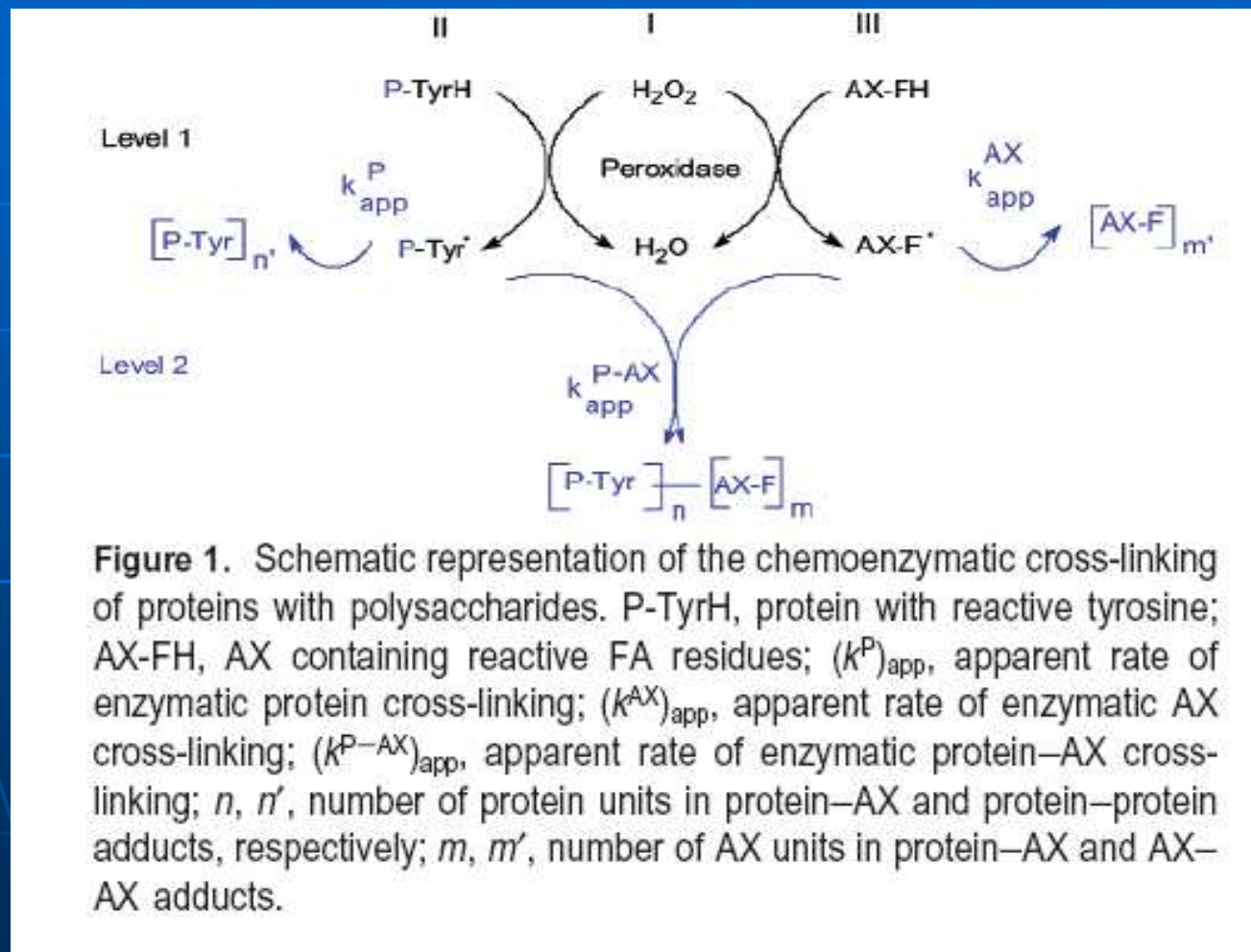
Table 1. Heat Transition (ΔH) and Peak Temperature (T_{max}) of the Enzyme-Treated Myofibrils

| pretreatment ^a | pretreatment time (h) | 1st transition peak (myosin) | | 2nd transition peak (actin) | |
|---------------------------|-----------------------|------------------------------|----------------|-----------------------------|----------------|
| | | ΔH (J/g) | T_{max} (°C) | ΔH (J/g) | T_{max} (°C) |
| control | 1 | 5.93 ab (0.30) ^b | 59.35 a (0.01) | 0.18 a (0.05) | 66.26 a (0.81) |
| | 3 | 5.86 ab (0.81) | 59.52 a (0.02) | 0.17 a (0.05) | 65.93 a (0.61) |
| TG 100 nkat/g | 1 | 4.29 a (0) | 58.45 a (0.13) | 0.44 b (0.01) | 66.69 a (0.47) |
| | 3 | 4.14 a (0) | 58.59 a (0.28) | 0.45 b (0.02) | 66.74 a (0.51) |
| Laccase 200 nkat/g | 1 | 6.50 b (0.71) | 59.14 a (0.57) | 0.48 b (0.04) | 66.96 a (0.57) |
| | 3 | 5.79 ab (0.51) | 58.71 a (0.28) | 0.17 a (0.04) | 66.45 a (0.64) |

^a Pretreatment conditions: 40 °C, 50 mM sodium-phosphate buffer at pH 6, 0.60 M Na⁺, 70 mg protein/mL. Myofibrils were heated from 40 to 100 °C at 10 °C/min.

^b Means with different letters in the same column are significantly different at $p < 0.05$. Values in parentheses are standard deviations for the means.

Protein-polisaharid heteroadukti



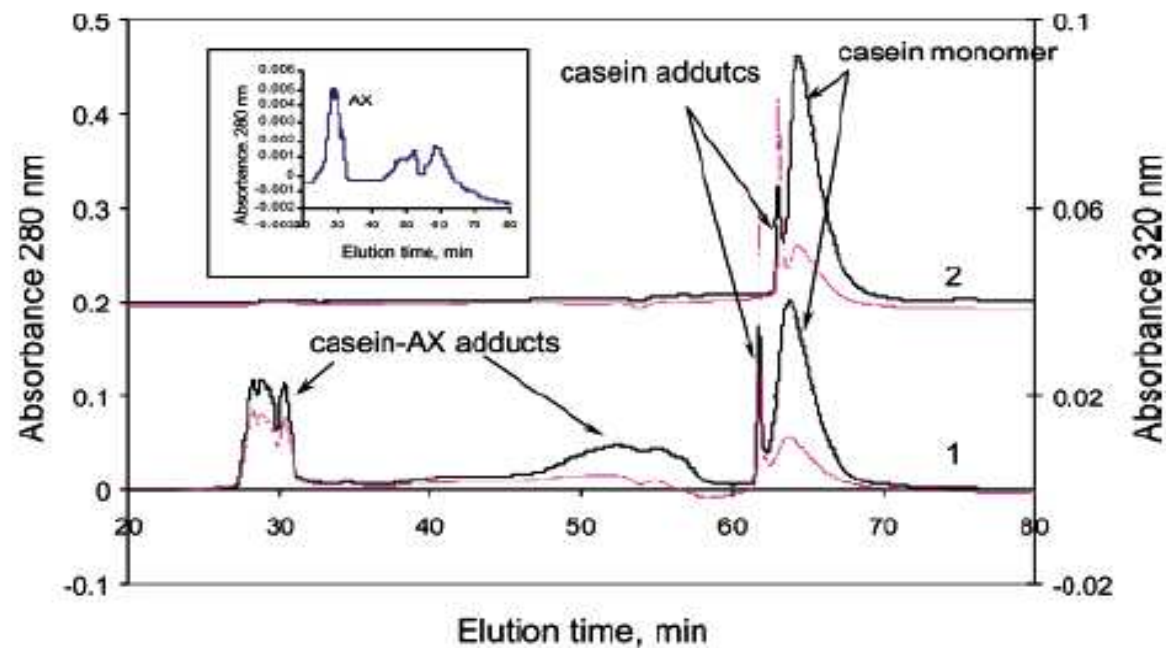


Figure 3. SE-HPLC of β -casein–AX reaction at pH 7, 25 °C, 500 nM HRP, and 4 h. Trace 1: 0.4 mM β -casein, 80 μ M AX, 10 mM hydrogen peroxide, and AX sequentially added. Trace 2: 0.1 mM β -casein and 10 mM hydrogen peroxide. Black line: detection at 280 nm, on left Y-axis. Purple line: detection at 320 nm, on the right Y-axis. The insert shows the SE-HPLC elution pattern of a 1% AX solution.

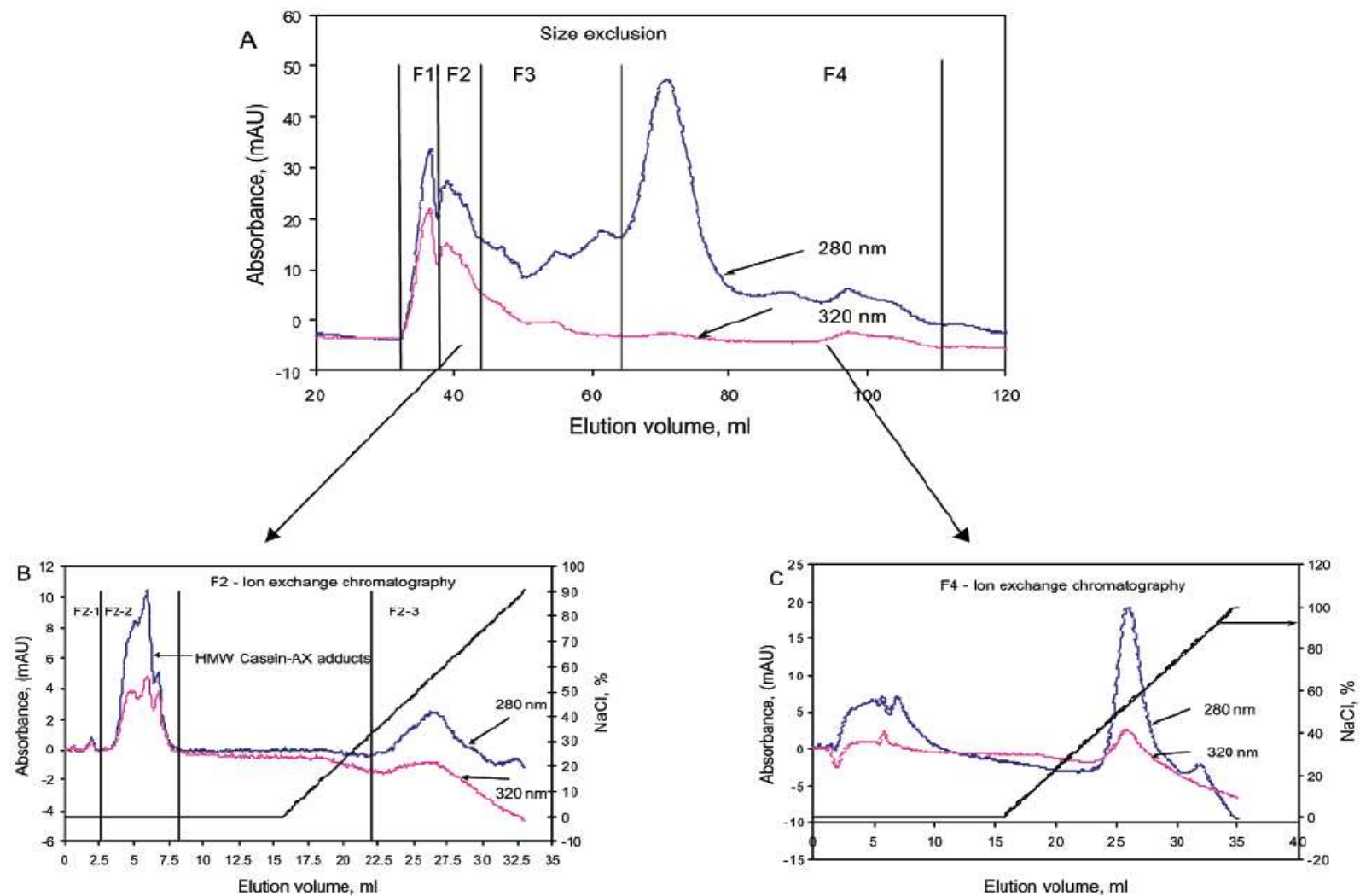


Figure 4. Fractionation of cross-linking products by consecutive gel filtration and anion exchange chromatography. Cross-linking conditions: 80 μ M AX, $[P]/[AX] = 10$, $[S]/[E] = 10^3$, $[H_2O_2]/[S] = 2$, pH 7, $T = 25^\circ C$, and 24 h. Blue trace, absorbance at 280 nm; purple, absorbance at 320 nm; and black, NaCl gradient.

Klinički aspekti enzimologije

Odredjivanje enzimskih aktivnosti za kliničku dijagnozu

- Enzim bi trebalo da bude prisutan u krvi, urinu ili nekom lako dostupnom tkivnom fluidu.
- Enzimski test bi trebalo da bude jednostavan
- Razlike u enzimskoj aktivnosti između normalnog i patološkog stanja bi trebalo da budu dijagnostički značajne uz dobru korelaciju između enzimske aktivnosti i patološkog stanja
- Poželjno je i da je enzim dovoljno stabilan.

Enzimi su prisutni u serumu kao:

- plazma-specifični enzimi;
- plazma-nespecifični enzimi.

- inicijalna dijagnostika;
- praćenje toka bolesti;
- praćenje odgovora pacijenta na tretman.

Idealno je pratiti aktivnost u serumu enzima koji je visoko tkivno-specifičan (kisela-fosfataza u prostati ili acetil-holinesteraza u eritrocitima)...

Neki enzimi imaju tkivno-specifične izoenzimske forme (laktat-dehidrogenaza) koje je moguće razlikovati elektroforezom.

Određivanje enzimске aktivnosti pri postavljanju kliničke dijagnoze

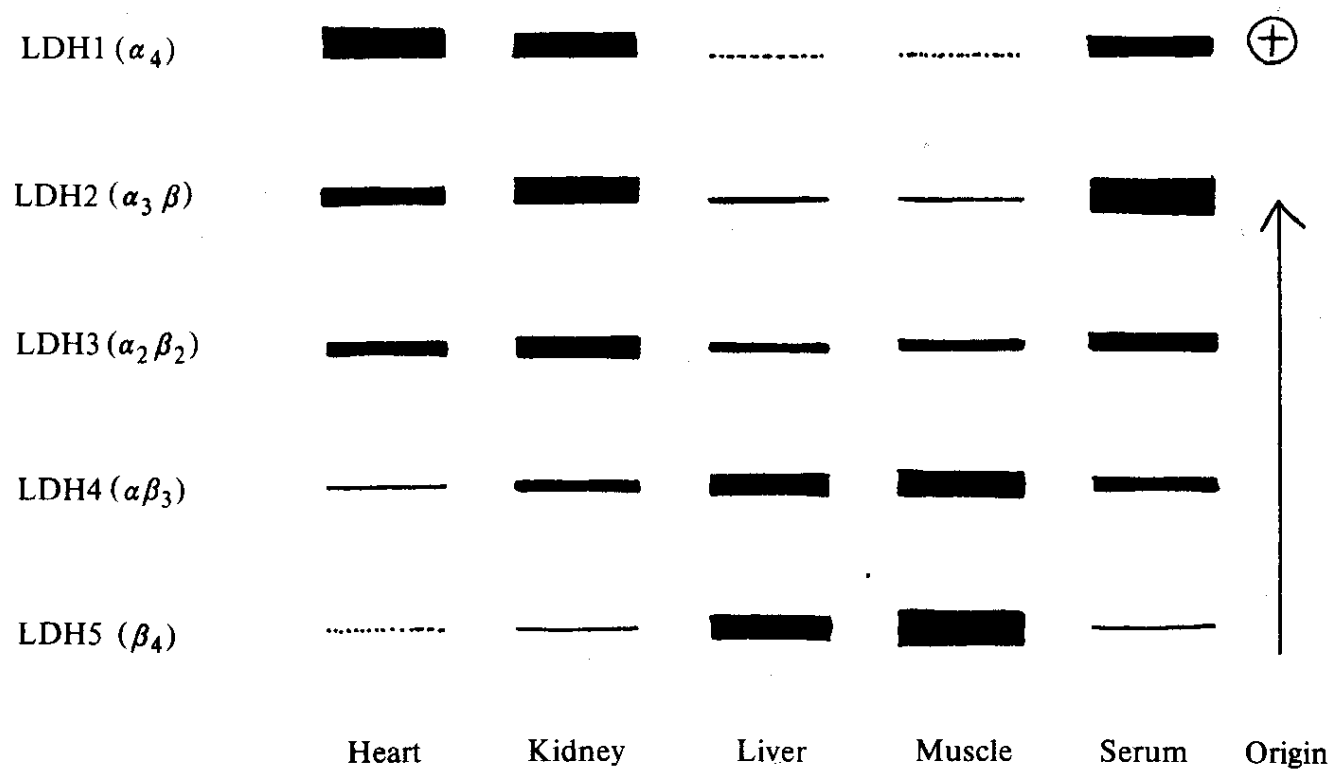


Fig. 10.1. Electrophoretic separation of isoenzymes of lactate dehydrogenase from different tissues.

Methods used to determine the tissue of origin of serum enzymes

| Enzyme | Differentiation by electrophoresis | Differentiation by other methods |
|-----------------------|--|--|
| Lactate dehydrogenase | LDH-1 predominant in heart, erythrocytes, brain and kidney LDH-3 predominant in leucocytes, adrenal and thyroid LDH-5 predominant in skeletal muscle and liver | Differential heat stability, LDH-4 and LDH-5 show greater heat lability. LDH-1 is more sensitive to inhibition by excess pyruvate than LDH-5 |
| Acid phosphatase | | Prostate enzyme inhibited by tartrate. Erythrocyte enzyme inhibited by formaldehyde. Differential activities towards substrates, phenyl phosphate and glycerol 2-phosphate and thymolphthalein phosphate |
| Alkaline phosphatase | Complex electrophoretic patterns. Liver enzyme most cationic | Placental enzyme shows greater heat stability. Enzymes from both placenta and intestine are sensitive to phenylalanine |
| Creatine kinase | Brain, lung and thyroid mostly CK-1 (or BB). Skeletal muscle almost exclusively CK-3. Cardiac tissue CK-3 + about 15% CK-2 | |

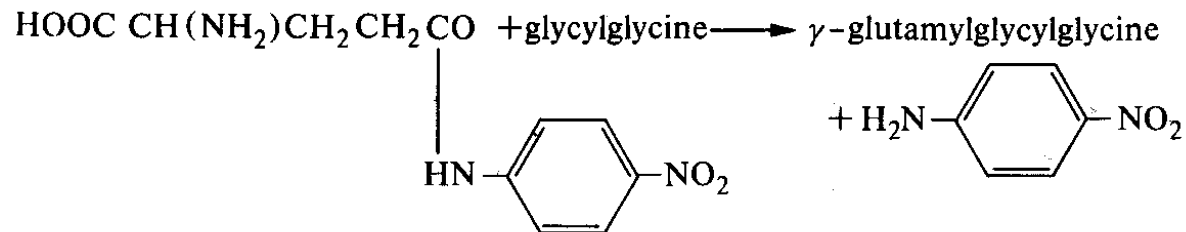
Klinička enzimologija bolesti jetre

- Aspartat aminotransferaza (SGOT), alanin aminotransferaza (SGPT), alkalna fosfataza i γ -glutamilttransferaza.
- Laktat dehidrogenaza i izocitrat dehidrogenaza.
- Ornitin karbamoiltransferaza.
- Oboljenja jetre: hepatitis (viralni ili toksični), ciroza, primarni i sekundarni tumori jetre, obstrukcija žučne kese, tumori... Akutna, intermitenta ili hronična stanja.
- Aktivnost aminotransferaza tj. odnos SGOT i SGPT
- Alkalne fosfataze su prisutne u jetri i kostima, izoenzimske forme...

Klinička enzimologija bolesti jetre

- | | | |
|--------------------------------------|----------------------|------------------------------|
| 1. Aspartate + 2-oxoglutarate | \rightleftharpoons | Oxaloacetate + Glutamate |
| Oxaloacetate + NADH + H ⁺ | \rightleftharpoons | Malate + NAD ⁺ . |
| 2. Alanine + 2-Oxoglutarate | \rightleftharpoons | Pyruvate + Glutamate |
| Pyruvate + NADH + H ⁺ | \rightleftharpoons | Lactate + NAD ⁺ . |

Aktivnost alkalne fosfataze je praćena merenjem hidrolize p-nitrofenil fosfata. Aktivnost γ -glutamyltransferaze je praćena merenjem intenziteta otpuštanja p-nitroanilina kad se γ -glutamyl-p-nitroanilid upotrebljava kao jedan od supstrata. p-nitroanilin apsorbuje na 400 nm



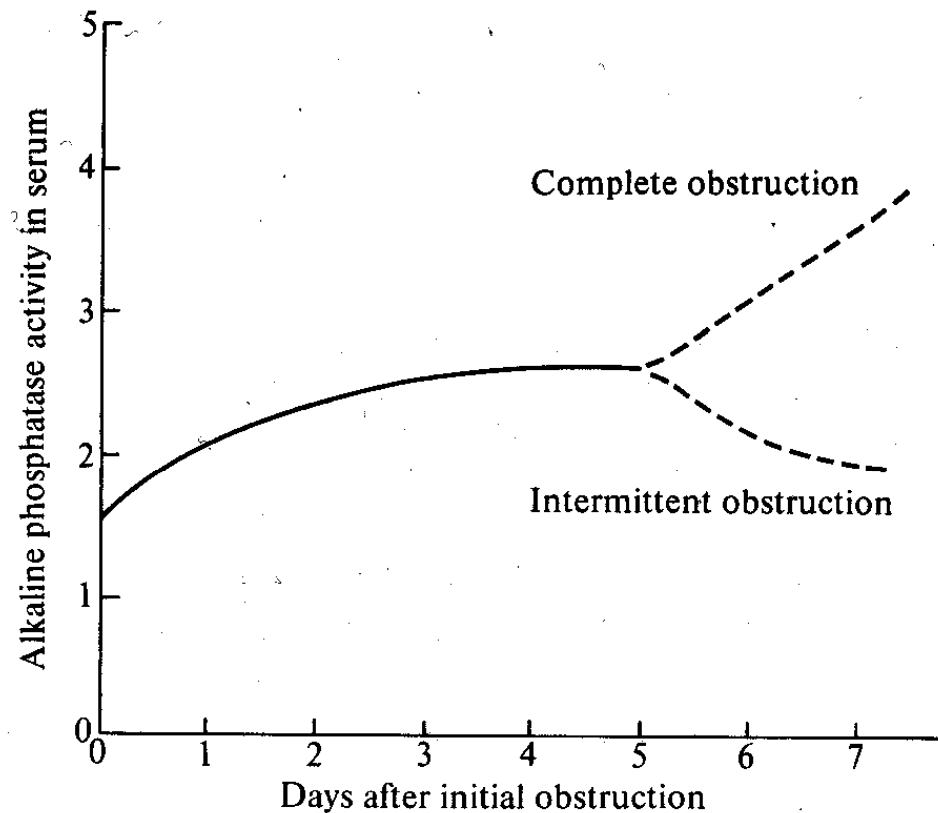


Fig. 10.2. Typical changes in the activity of serum alkaline phosphatase after complete and intermittent obstructive jaundice (see reference 4.)

AP/SGPT odnos...

γ -glutamyltransferaza – hronični alkoholizam (ciroza jetre), metastaze...

Klinička enzimologija bolesti srca

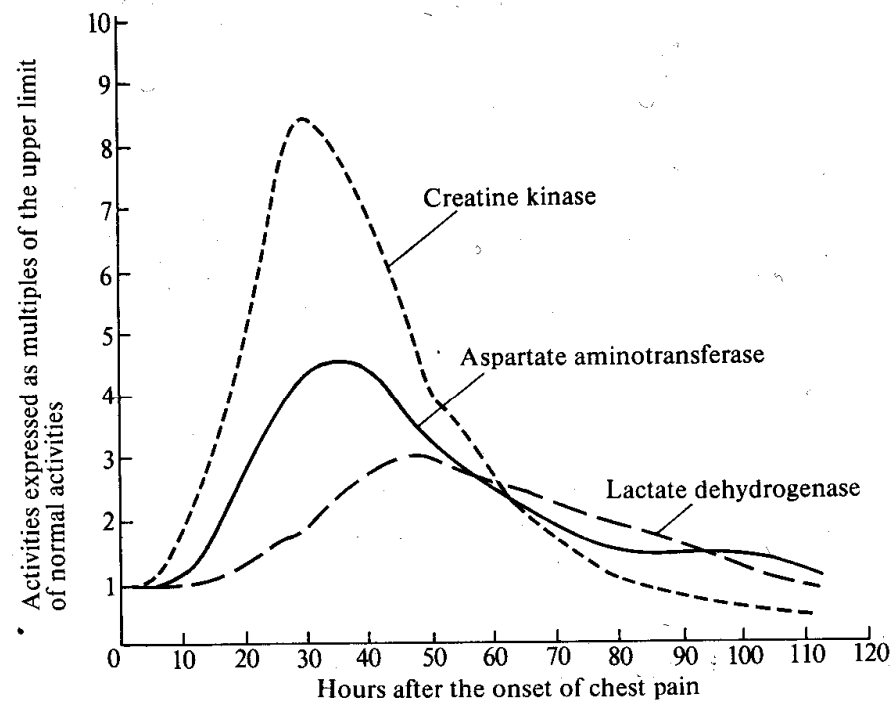


Fig. 10.3. Typical changes in the activities of serum creatine kinase, aspartate aminotransferase (SGOT), and lactate dehydrogenase following myocardial infarction. Activities are expressed as multiples of the upper limit of the normal level (see reference 1).

Kreatin kinaza (izoforme, osim CK-3 (MM tip) iz skeletnih mišića, ima i oko 15 % CK-2 (MB tip) izoforme), SGOT i laktat dehidrogenaza (takodje se prati izoenzimski profil).

SGOT/SGPT u miokardu je 20-25, a u jetri 3-5...Medjutim, CK i GT su precizniji pokazatelji.

α -Amilaza

- - Pankreas i pljuvačne žlezde
- - Akutni pankreatitis (20-30 puta)
- - Hronični pankreatitis ili karcinom pankreaza – malo povišen nivo.
- - Zbog niske Mm (49 kD) može se detektovati i u urinu (kao i uropepsinogen).

Kreatin-kinaza i fruktozo-bisfosfat aldolaza

- - Oboljenja skeletnih mišića (distrofije), izoenzimski profil CK

Alkalna fosfataza

- - Veliki broj izoformi. Nalazi se u velikom broju tkiva: intestinalni epitelijum, bubrezi, kosti, leukociti, jetra i placenta.
- - Tri tipa: placentalni (termostabilan), intestinalni i iz drugih tkiva

Kisela fosfataza

- - Nalazi se u velikom broju tkiva: jetra, slezina, eritrociti i prostata.
- - Važan za dijagnostiku kancera prostate.
- - Veoma je labilan, kontaminacija usled lize eritrocita (inhibicija tartaratom i formaldehidom).
- - Prostatični enzim je veoma specifičan za timoftalein fosfat.

Otkrivanje & značaj enzimске deficijencije (nedostatka)

- Za detekciju oboljenja se redje koriste enzimski testovi – detektuju se metaboliti (fenilketourija se detektuje merenjem fenilpiruvata u urinu ili krvi).
- Neke urodjene greške u metabolizmu su relativno neškodljive (albinizam, alkaptonurija), ali druge se moraju detektovati rano da bi se štetni efekti defekta sprečili na vreme. Fenilketourija i galaktozemija npr.

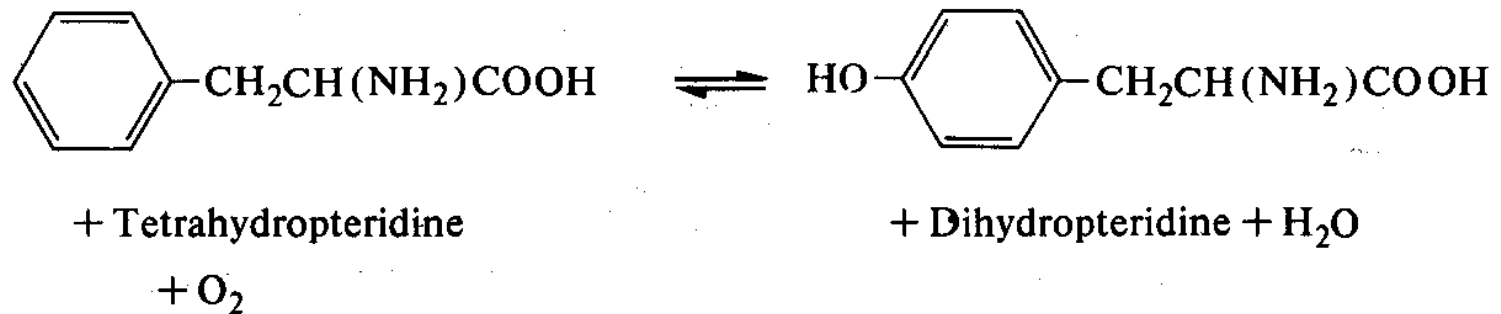
Otkrivanje & značaj enzimске deficijencije (nedostatka)

Some examples of inborn errors in metabolism due to enzyme deficiencies

| Inborn error | Enzyme deficiency |
|------------------------------|---|
| Alcaptonuria | homogentisate 1,2-dioxygenase |
| Phenylketonuria | phenylalanine 4-monooxygenase |
| Cystinuria | (renal and intestinal transport defect of cysteine, ornithine and lysine) |
| Maple syrup disease | branched chain oxy-acid oxidative decarboxylases |
| Galactosaemia | UDPglucose-hexose-1-phosphate uridylyltransferase |
| Glycogen storage diseases | glucose-6-phosphatase, α -D-glucosidase, debranching enzyme, liver or muscle phosphorylase |
| Pentosuria | L-xylulose reductase |
| Tay-Sachs disease | β -N-acetyl-D-hexosaminidase |
| Nieman-Pick disease | phospholipase C |
| Gangliosidosis (generalized) | β -D-galactosidase |
| Acatlasia | catalase |

Otkrivanje & značaj enzimске deficijencije (nedostatka)

Kod fenilketourije nedostaje enzim fenilalanin-4-monooksigenaza koji katalizuje reakciju:



Zbog toga se Phe razgradjuje putem minornog mehanizma preko gradjenja fenilpiruvata

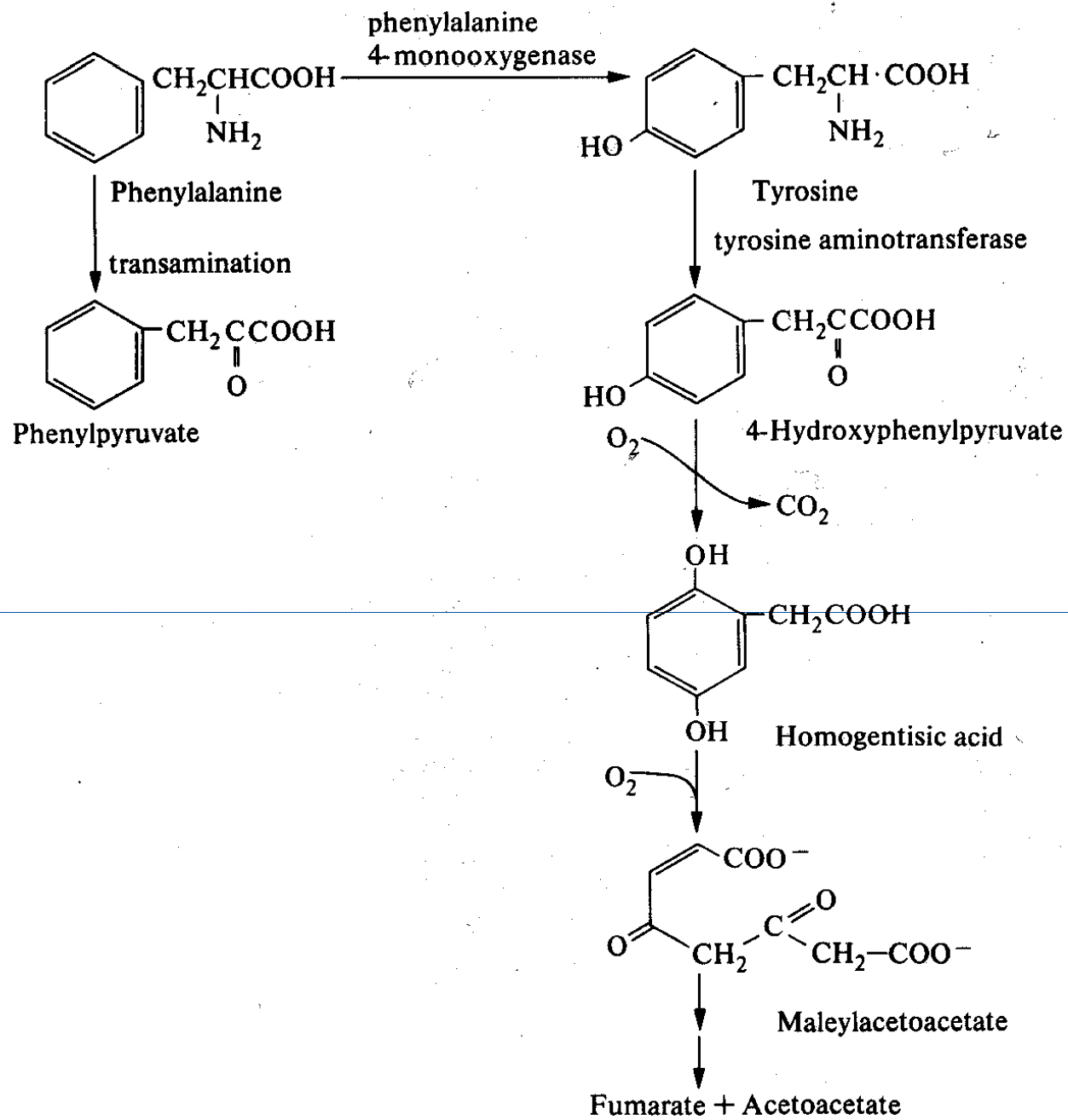


Fig. 10.4. Metabolic pathway for the degradation of phenylalanine in humans.

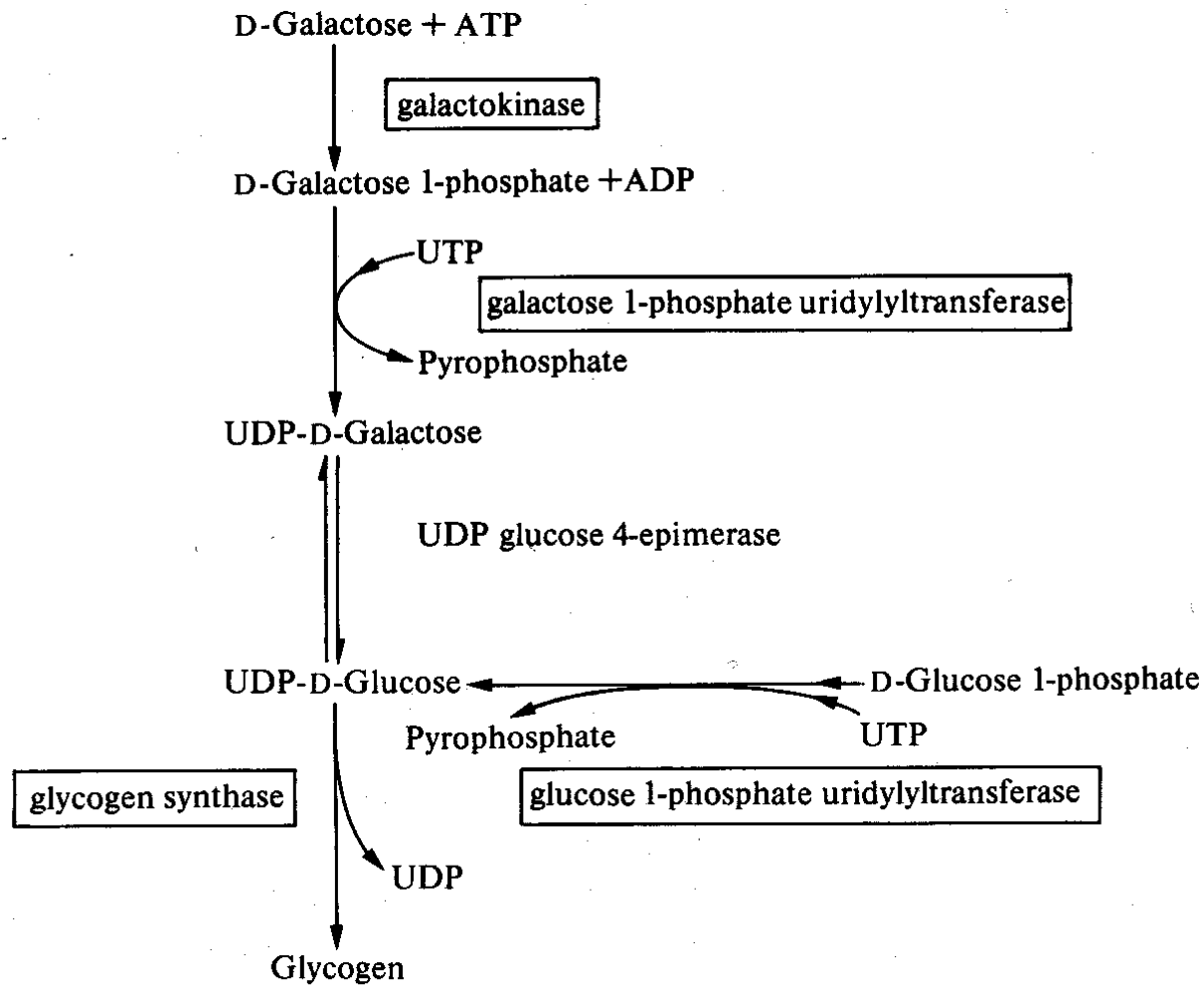
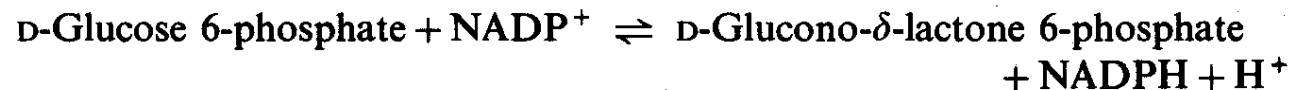


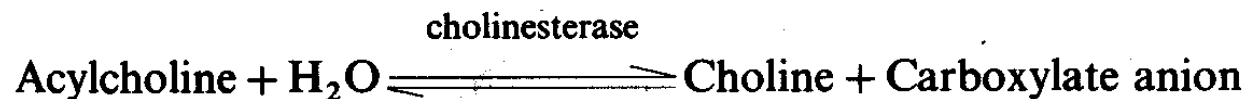
Fig. 10.5. The pathways of galactose metabolism.

Kod galaktozemije deficijenti enzim je galaktozo-1-fosfat uridiltransferaza. Ovaj enzim je prisutan u brojnim tkivima, uključujući eritrocite. Detektuje se testom na liziranim eritrocitima.

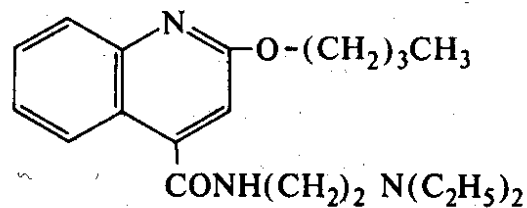
Najčešća urodjena bolest koja deluje na eritrocite je deficijencija glukozo-6-fosfat dehidrogenaze. Manifestuje se kao hemolitička anemija indukovana snižavanjem nivoa glutathiona (nakon tretmana lekovima koji inhibiraju ovaj enzim koji je prisutan u veoma malim koncentracijama). Snižava se intracelularna koncentracija NADPH koji je neophodan za redukciju oksidovanog glutathiona.



- Drugi primer osetljivosti na lekove koja je povezana sa urodjenom deficijencijom je u slučaju serum holinesteraze (pseudoholinesteraza). Sukcnil holin (mišićni relaksant) u slučaju deficijencije pseudoholinesteraze se ne razgradjuje normalno i daleko duže deluje nego kod normalnih subjekata. Ovaj enzim kod deficijentnih osoba ima daleko višu Km za sve testirane supstrate nego normalna forma ovog enzima.



Succinyl choline



Dibucaine

Upotreba enzima radi određivanja koncentracije metabolita od kliničkog značaja

Metabolit se enzimski transformiše u proizvod čija koncentracija se određuje spektrofotometrijski. Visoka specifičnost enzima omogućava određivanje metabolita u prisustvu brojnih drugih supstanci u urinu ili serumu.

Kuplovane reakcije omogućavaju pomeranje ravnoteže na desno tj. u povoljnom smeru. Takođe, moguće je i hemijski ukloniti proizvod enzimske reakcije.

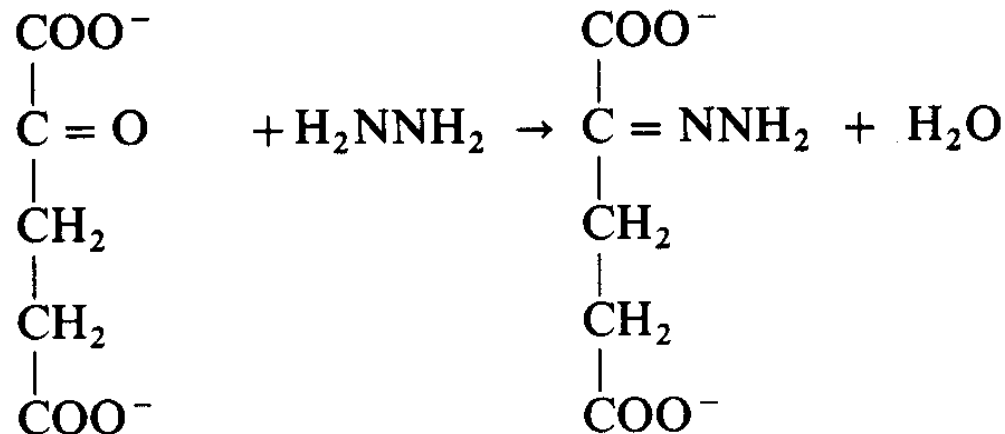
$$K = \frac{[\text{fructose 6-phosphate}]}{[\text{glucose 6-phosphate}]} = 0.3,$$

1. D-Fructose 6-phosphate \rightleftharpoons D-Glucose 6-phosphate.
2. D-Glucose 6-phosphate + NADP⁺ \rightleftharpoons D-Glucono- δ -lactone 6-phosphate + NADPH + H⁺.
3. D-Glucono- δ -lactone 6-phosphate + H₂O \rightleftharpoons 6-Phospho-D-gluconate.

Upotreba enzima radi određivanja koncentracije metabolita od kliničkog značaja



2-oksoglutarat reaguje sa hidrazinom...

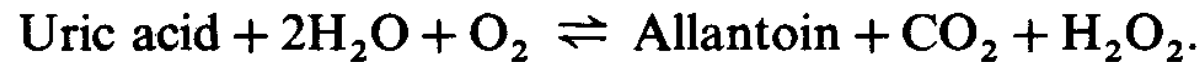


Mokraćna kiselina

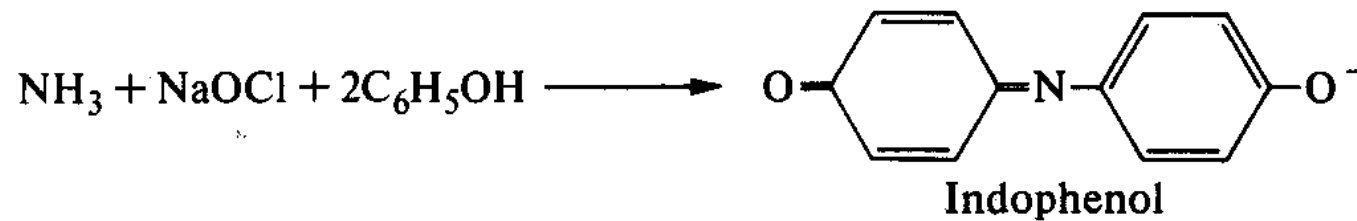
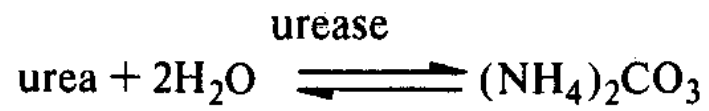
Chemical



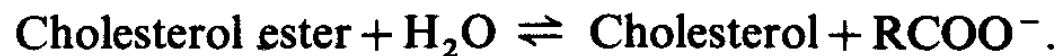
Enzymatic



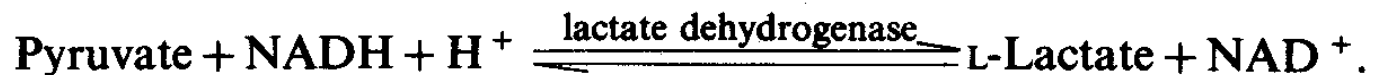
Urea



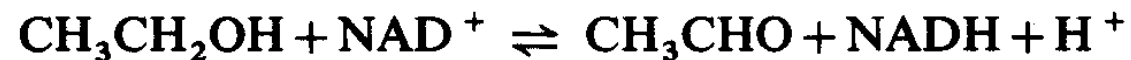
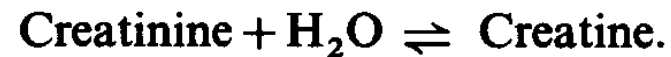
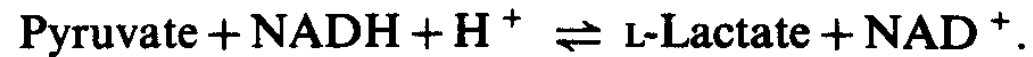
Holesterol, holesterolski estri & trigliceridi



Merenje nivoa serumskih triglicerida u plazmi i serumu je korisno pri praćenju toka dijabetesa, nefroza i obstrukcije žuči. Merenje se može vršiti i enzimski, obično nakon alkalne hidrolize triglicerida. Glicerol koji se tako dobija se može odredjivati u testu koji koristi sledeći kuplovani sistem:



Ostali metaboliti



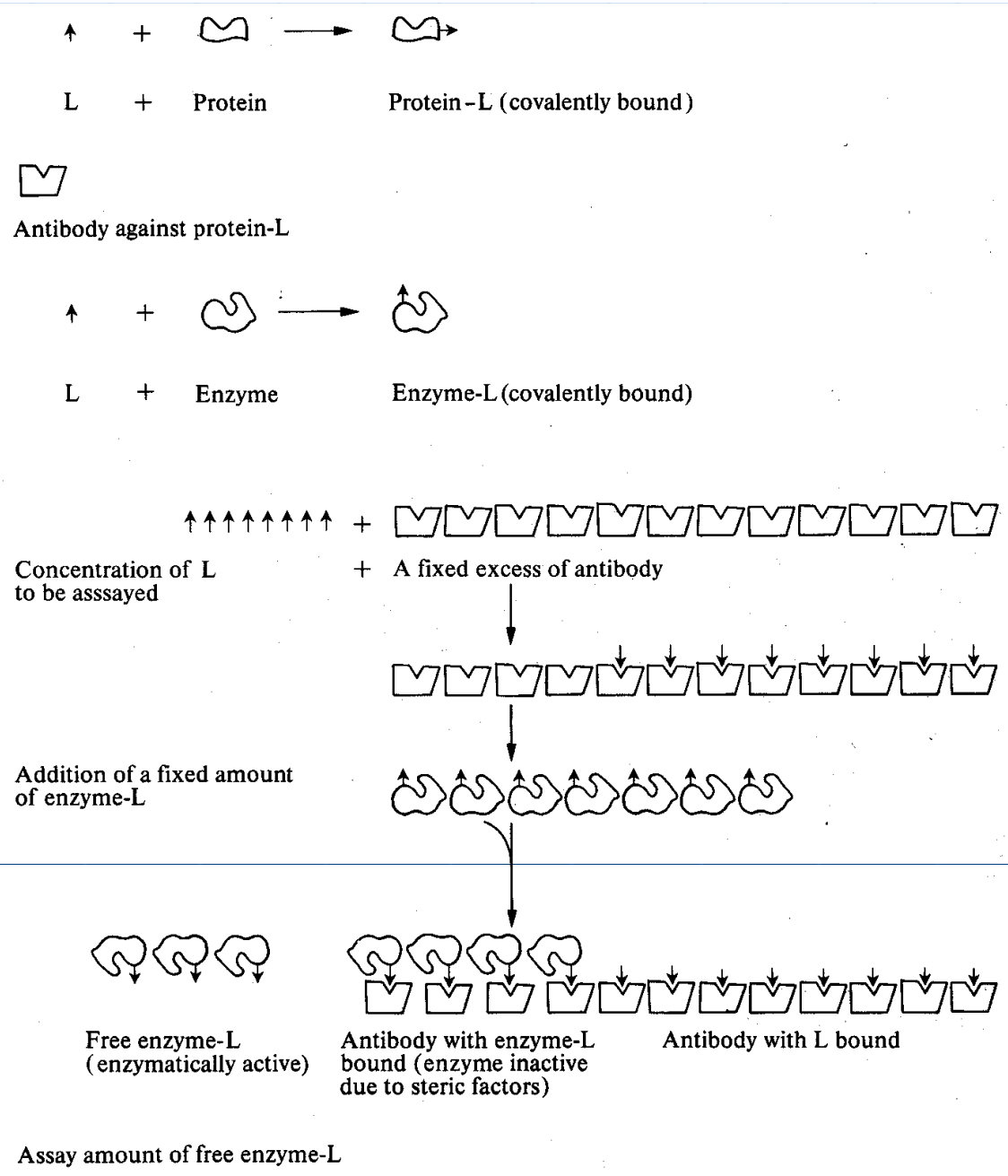


Fig. 10.6. The method of enzyme immunoassay. The diagram illustrates how this method is used to assay compound L after forming a covalent derivative of compound L with a purified enzyme.