

rezerva ugljena ovisit će u najvećoj mjeri o mogućnosti ekonomične upotrebe plodnih reaktora i o povoljnom rješenju iskorištenja ulja iz uljnih škrljevac i bituminoznog pijeska.

LIT.: E. Ayres, Ch. A. Scarlott, Energy sources — The wealth of the world, New York-Toronto-London 1952. — P. C. Putnam, Energy in the future, New York 1953. — P. Ailleret, Énergie — les besoins d'énergie, Paris 1963. — Perspectives énergétiques mondiale, rapport général, Symposium sur le rôle futur du charbon dans les économie nationales et mondiales, Varsovie 1970; Genève 1970. — United Nations, World energy supplies 1961-1970, New York 1972. — Isti, World energy supplies 1968-1971, New York 1973. — M. Brezinić, Mjerenje i računanje u tehnici i znanosti, Zagreb 1971. — The US National Committee of the World Energy Conference, Survey of the energy resources 1974, New York 1974.

H. Požar

ENZIMI (fermenti), biokatalizatori, tvari biološkog porijekla (tj. proizvedene u živim stanicama) koje ubrzavaju kemijske reakcije potrebne za održavanje životnih funkcija. Enzimi ne djeluju samo u živim organizmima (*in vivo*) nego i izvan njih, npr. u laboratorijskim posudama (*in vitro* — u staklu). Oni se stoga industrijski proizvode i upotrebljavaju kao izvanredno efektivni katalizatori.

Tvari koje organizmi primaju iz sredine u kojoj žive, kao izvor energije i kao materijal za izgradnju vlastitog tkiva, kemijski su razmjerno postojeće: u laboratorijskim se uvjetima mogu razgraditi i prisiliti na reakcije s drugim tvarima samo oštrim zahvatima (povišenjem temperature i/ili tlaka, djelovanjem jakih kiselina i lužina, itd.); u organizmima te se iste tvari rastvaraju i reagiraju pod vrlo blagim uvjetima (na temperaturi tijela, pod normalnim tlakom, u razrijeđenim otopinama, u neutralnoj ili gotovo neutralnoj sredini, itd.) zahvaljujući enzimima koji te reakcije ubrzavaju i do desetak triliona puta.

Ime *enzim* napravljeno je prema grčkom *ένζυμη εν ζυμη, u kvasu*, a ime *ferment* prema latinskom *fermentum, kvas*. Oba ta imena podsjećaju na najstariji poznati enzimski «preparat», kvas ili kiselo tijesto, koje se već u antikom Egiptu upotrebljavalo u proizvodnji kruha. Drugi, već u starom vijeku, poznati enzimski preparati jesu sirilo (iz sluznice želuca preživača), koje se u proizvodnji sira upotrebljava za grušanje mlijeka, i slad, dobiven od proklijalih zrna žita i upotrebljavan u proizvodnji piva.

Enzime su prvi nešto podrobnije ispitali neki kemičari u prvoj polovici XIX st. Oni su se bavili nekim tada slabo definiranim tvarima koje su zvali fermenti i za koje su znali da izazivaju biološke reakcije, napose one najbolje poznate u njihovo vrijeme: alkoholno vrenje uz pomoć kvasca i razgradnju bjelancevina i škroba u probavnom traktu životinja. Tako je Leuchs 1831 ispitivao faktor u sliki koji hidrolizira škrob i nazvao ga ptijalin (ptyalin), Schwann 1836 faktor, nazvan pepsin, koji u želucu cijepa bjelancevine. Već 1814 K. G. S. Kirchoff je pokazao da se škrob s pomoću pšeničnog ekstrakta može pregraditi u šećer, a Apayen i Persoz su 1834 tvar istih svojstava izdvojili iz slada i nazvali je *dijastaza*. Liebig je 1837 otkrio agens koji (pri razgradnji amigdalina) katalitičkim djelovanjem hidrolitski otcjepljuje glukozu; taj je agens nazvao emulzin. Cagniard-Latour i Kützing su 1838 našli da alkoholno vrenje uzrokuje živi organizmi. Onda su organizme koji izazivaju biokemijske reakcije počeli nazivati «organiziranim fermentima» i razlikovati ih od «neorganiziranih fermentata» kao što su ptijalin, pepsin i dijastaza. Pasteur je 1857 postavio «vitalističku» teoriju alkoholnog vrenja, prema kojoj je ono vezano uz metaboličnu djelatnost žive stanice; toj je teoriji Liebig 1870 suprotstavio teoriju o čisto kemijskom djelovanju fermenta pri alkoholnom vrenju, nakon što je već 1839 tumačio djelovanje emulzina kao katalizu. (Već je Berzelius 1836 alkoholno vrenje ustroio među katalitičke reakcije.) Da bi izbjegao svadu oko organiziranih i neorganiziranih fermentata, Kühne je 1878 za topljive fermente upotrijebio naziv «enzimi». Otkako su 1897 E. i H. Buchner pokazali da sok iscijeđen iz zdrobljenih kvasčevih gljivica izaziva alkoholno vrenje jer sadrži otopljen enzim «zimazu», nije više opravdano razlikovati (organizirane) fermente od enzima, te se danas nazivi «enzim» i «ferment» upotrebljavaju kao sinonimi. (Donedavno se u francuskom jeziku i naziv «diastase» upotrebljavao kao sinonim za «enzim».)

Kao najvažniji koraci u daljem razvoju enzimologije mogu se navesti ovi: E. Fischer uveo je pojam specifičnosti enzima i za tumačenje specifičnosti stvorio koncepciju «brave i ključa» (1894). Pojam «koenzima» uveo je Bertrand 1897. L. Michaelis i M. L. Menten iznijeli su 1913 teoriju o načinu djelovanja enzima preko kompleksa sa supstratom. Prvi enzim (ureazu) u kristaliziranom, ali ne i čistom stanju pripremio je Sumner 1926, malo kasnije (1932/33) Northrup i suradnici publicirali su svoje klasične radove o izolaciji proteolitičkih enzima. 1935/36 otkrila je veza između vitamina i koenzima. Bergmann i Fruton preciziraju 1941 teoriju aktivnog područja enzima. Phillips, North, Blake i suradnici prvi su 1956 jednom enzim — lizozimu — odredili tercijarnu strukturu, tj. način na koji su skupčani polipeptidni lanci njegove globularne molekule; uskoro poslije toga objašnjena je i veza između strukture i funkcije tog enzima. 1969 pošlo je za rukom dvjema nezavisnim grupama istraživača izvesti prvu totalnu sintezu jednog enzima (ribonukleaze): Denkwalteru i Hirschmannu jednom, a Gutteu i Merrifieldu drugom metodom.

Dosad je otkriveno ~1500 vrsta enzima (a ima ih vjerojatno mnogo više); svi su poznati enzimi globularne bjelancevine (v. *Bjelancevine*, TE 2, str 56) molekulske težine od 12 000 do više stotina tisuća. Svi enzimi molekulske težine veće od ~80 000 kojima je struktura određena sastavljeni su od više identičnih jedinica manje molekulske težine. Takav se sastav naziva *kvartarnom strukturom*.

Jednom tipu enzima katalitičko je djelovanje uvjetovano samo strukturom bjelancevine od koje su isključivo sastavljeni — to su *čisti enzimi*; drugi, *složeni enzimi*, sadrže, osim bjelancevinaste (proteinske) komponente, i niskomolekularnu neproteinsku komponentu, zvanu *koenzim* ili *prostetska grupa enzima*. Jednim se složenim enzimima neproteinska komponenta, koenzim, može od proteinske komponente, apoenzima, lako odvojiti (npr. dijalizom); razdvojeni dijelovi nemaju katalitičko djelovanje, ali se spajanjem apoenzima s koenzimom može opet dobiti aktivni

cjeloviti enzim (holoenzim). Drugi složeni enzimi predstavljaju konjugirane (složene) bjelancevine (proteide) koje tek kad se razgrade oslobađaju sastojke koji potječu od velikog proteinskog dijela i sastojke male molekulske težine, prostetske grupe enzima. Proteinski dio enzima se od prostetske grupe enzima u tom slučaju ne može odvojiti bez definitivnog gubitka enzimske aktivnosti. Među enzime ove posljednje vrste idu i enzimi u kojima se nalaze atomi metala vezani s proteinom (*metaloproteinski enzimi*).

Mnogi autori smatraju da je nemoguće razlikovati koenzim od prostetske grupe enzima na temelju čvrstine kojom je neproteinski dio enzima vezan s proteinskim, budući da tu nema oštre granice. Ti autori izraze «koenzim» i «prostetska grupa enzima» smatraju pravim sinonimima. I u ovom članku, kad to ne može izazvati zabunu, upotrijebljen je radi kratkoće izraz «koenzim» umjesto «koenzim ili prostetska grupa enzima». Dalje je naveden i drugi način na koji se može razlikovati koenzim od prostetske grupe enzima.

Enzimima je svojstvena, pored velike *aktivnosti*, tj. sposobnosti da prisutni i u vrlo malim količinama snažno katalitički djeluju, također *specifičnost* djelovanja, tj. svojstvo da katalitički djeluju samo na reakcije određene vrste, po pravilu čak samo kad u tim reakcijama sudjeluju određeni spojevi (kaže se da djeluju samo na određeni *supstrat*). Zbog toga što se u živim organizmima može istodobno odvijati vrlo velik broj različitih reakcija među različitim spojevima, i broj je različitih enzima vrlo velik. (Ocjenuje se da u jednoj stanici može biti i do 2000 vrsta enzima.) Koenzima (prostetskih grupa), međutim, ima mnogo manje vrsta nego enzima, jer isti koenzim može biti sastojak većeg broja različitih enzima.

Osim koenzima ili prostetskih grupa, koji su sastojci enzima, često je za uspješno katalitičko djelovanje enzima potrebno prisustvo nekih drugih tvari, koje nisu sastojci enzima; te se tvari nazivaju *aktivatorima*. Neki su aktivatori potrebni zbog toga što organizam ponekad ne proizvodi aktivne enzime, nego «pret-hodnike» enzima, proenzime ili zimogene, tvari takva sastava da predstavljaju u neku ruku enzime u kojima je aktivnost «maskirana»; ti aktivatori mehanizmom «demaskiranja» pretvaraju proenzim u aktivni enzim. Drugi tip aktivatora djeluje mehanizmom deinhibicije, tj. time što uklanja tvari koje ometaju djelovanje enzima (inhibitore, o njima v. dalje). Neki su enzimi aktivni samo u prisutnosti metalnih iona.

Tvari koje su potrebne da bi određeni protein mogao djelovati kao enzim, dakle koenzimi (odn. prostetske grupe enzima), aktivatori i metali (kao ioni u mediju ili kao sastojci enzima) nazivaju se ponekad *kofaktorima* enzima. (Neki autori upotrebljavaju izraz «kofaktor» kao sinonim za «koenzim».)

Enzimska kinetika. Prisutnost nekog enzima ispoljava se time što se određena reakcija koja se u odsutnosti enzima odvija neizmjerljivo sporo, tj. praktički nikako, ubrzava toliko da joj brzina postaje mjerljiva. Brzina reakcije postignuta djelovanjem enzima mjera je za njegovu aktivnost, a budući da je pod povoljnim uvjetima proporcionalna količini prisutnog enzima, ona može biti i mjera za tu količinu. Odatle važnost zakonitosti koje upravljaju brzinom reakcijâ kataliziranih enzimima — enzimске kinetike.

Kemijska reakcija nastaje kad se molekule reaktanata uspješno sudare, tj. kad prosječna energija sudara nadmašuje energetsku barijeru koja određenu reakciju sprečava. Reakcija je to brza što se u jedinici vremena više molekula sudara i što je od ukupnog broja sudara veći broj uspješan. Budući da prisutnost katalizatora ne može povećati ukupni broj sudara među molekulama reaktanata, djelovanje se katalizatora pripisuje tome što oni povećavaju broj uspješnih sudara smanjujući energiju (energiju aktivacije) kojom se moraju sudariti molekule reaktanata da bi reakcija potekla. Prema Arrheniusu (v. *Kemijska kinetika i kataliza*) ovisnost je brzine reakcije o energiji aktivacije eksponencijalna, stoga već malo smanjenje energije aktivacije katalizatorima jako ubrzava reakciju. Povećavanje brzine reakcije enzimima (od praktički nula do velikih vrijednosti) postiže se sniženjem energije aktivacije na 1/3 do 1/2 osnovne vrijednosti.

Enzimi ubrzavaju pretvorbu reaktanata (supstrata) u produkte reakcije (S → P), tj. smanjuju energiju aktivacije, zbog toga što se u prisutnosti enzima ta pretvorba ne ostvaruje izravno, nego se molekule supstrata S povezuju s molekulom enzima E u kompleks enzim-supstrat ES, koji se nakon vrlo kratkog vremena raspada na slobodni enzim i produkte reakcije: E + S → ES → P + E (sl. 1). Tako regenerirana molekula enzima može se odmah povezati s drugom molekulom supstrata i katalizirati njezin prijelaz u molekulu (molekule) produk(a)ta. Time se tumači velika aktivnost enzima, tj. pojava da neobično male količine enzima mogu djelovati na velike količine supstrata u kratkom vremenu.

Prema zakonu o djelovanju masa (v. *Kemijska kinetika*), brzina je reakcije proporcionalna koncentraciji reaktanata. U reverzibilnoj reakciji enzima sa supstratom, E + S ⇌ ES, brzina je asocijacije

između supstrata i enzima, prema tome, proporcionalna koncentracijama enzima i supstrata ($v = k_{+1}[E][S]$), a brzina disocijacije kompleksa proporcionalna koncentraciji kompleksa ES ($v_{-1} = k_{-1}[ES]$). Kad je postignuta ravnoteža, postaje $v_{+1} = v_{-1}$, pa je $k_{+1}[E][S] = k_{-1}[ES]$, ili

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = K_s \quad (1)$$

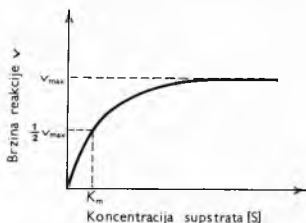
(K_s je *supstratna konstanta*; ona je jednaka konstanti disocijacije kompleksa ES.) Iz jedn. (1) može se zaključiti ovo: Ako se uz



Sl. 1. Smanjenje energije aktivacije enzimskom katalizom

konstantnu koncentraciju enzima povećava koncentracija supstrata, povećava se i koncentracija kompleksa ES u ravnotežnoj smjesi. Taj se porast može, međutim, nastaviti samo do koncentracije supstrata koja je u takvom omjeru prema konstantnoj ukupnoj koncentraciji enzima da je praktički sav enzim vezan za supstratom, tj. enzim je supstratom »zasićen«. Iznad te »koncentracije zasićenja«, koncentracija [ES] ostaje pri daljem povećanju koncentracije supstrata praktički konstantna.

Za reakciju raspada kompleksa ES na produkte uz regeneraciju enzima $ES \rightarrow P + E$, Michaelis i Mentenova su pretpostavili da je bitno sporija od reakcije stvaranja kompleksa ES, te stoga njezina brzina određuje brzinu ukupne reakcije $E + S \rightarrow P + E$. Poput brzine disocijacije kompleksa ES, brzina ukupne reakcije, koja se može mjeriti, proporcionalna je koncentraciji ES ($v = k_2[ES]$), te se koncentracija [ES] može smatrati mjerom za brzinu ukupne katalizirane reakcije. Zaključak iz jedn. (1) može se onda formulirati ovako: uz konstantnu koncentraciju enzima, brzina katalizirane reakcije s porastom koncentracije supstrata raste do konstantne vrijednosti v_{max} , koju postiže na koncentraciji zasićenja i koja se daljim povećanjem koncentracije supstrata ne mijenja. Ta ovisnost brzine reakcije o koncentraciji supstrata (uz konstantnu koncentraciju enzima) prikazana je u dijagramu sl. 2.



Sl. 2. Dijagram $v, [S]$: ovisnost brzine katalizirane reakcije o koncentraciji supstrata

Maksimalna brzina v_{max} i koncentracija zasićenja različite su za različite enzime, a za isti enzim različite su za različite supstrate. One su također ovisne o (konstantnoj) koncentraciji enzima. Maksimalna se brzina v_{max} može na dijagramu sl. 2 dovoljno točno očitati, ali koncentracija zasićenja ne može. Dobro definirani odnosi dobivaju se ako se kao karakteristična brzina uzme polovica maksimalne brzine, $v_{max}/2$. Prema pretpostavkama Michaelisa i Mentenove, brzina reakcije proporcionalna je koncentraciji [ES]: kad je brzina reakcije polovica maksimalne, i koncentracija je [ES] polovica maksimalne, tj. od ukupne je količine enzima polovica onda prisutna kao slobodan enzim E, a druga kao kompleks ES; tada su koncentracije [E] i [ES] jednake, te se u jedn. (1) kratak, pa ostaje

$$[S]_{v_{max}/2} = K_s = K_m,$$

tj. koncentracija supstrata pri kojoj je (uz konstantnu koncentraciju enzima) brzina jednaka polovici maksimalne (a enzim na polovicu zasićen) karakteristična je konstanta, jednaka konstanti disocijacije kompleksa ES. Ta se karakteristična konstanta naziva

Michaelisovom konstantom i označuje sa K_m . Ona ima (kako se vidi na sl. 2), dimenziju koncentracije, a njene su vrijednosti za većinu reakcija između 10^{-2} i 10^{-5} mol/l.

Michaelisova konstanta može se izračunati iz eksperimentalno određenih podataka, naime, iz brzine reakcije uz određenu koncentraciju supstrata i maksimalne brzine reakcije. Prema iznijetim je pretpostavkama $v = k_2[ES]$, a v_{max} je proporcionalno koncentraciji kompleksa ES kad se sav prisutni enzim nalazi vezan u tom kompleksu, tj. kad je koncentracija kompleksa [ES] jednaka ukupnoj koncentraciji enzima $[E]_t$: $v_{max} = k_2[E]_t$. Koncentracija slobodnog enzima [E], kad je koncentracija slobodnog supstrata jednaka [S], jednaka je $[E]_t - [ES]$, pa se jedn. (1) može pisati

$$\frac{([E]_t - [ES])[S]}{[ES]} = K_m,$$

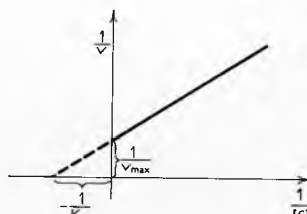
iz čega slijedi

$$[ES] = \frac{[E]_t[S]}{K_m + [S]},$$

$$v = k_2[ES] = \frac{k_2[E]_t[S]}{K_m + [S]} = \frac{v_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (2)$$

U posljednjem izrazu sve se veličine osim K_m mogu eksperimentalno odrediti, pa se Michaelisova konstanta K_m može izračunati iz eksperimentalnih podataka. Grafički se ta konstanta i maksimalna brzina reakcije mogu odrediti ako se upotrijebi recipročni izraz:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m + [S]}{v_{max}[S]} = \frac{K_m}{v_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}}.$$

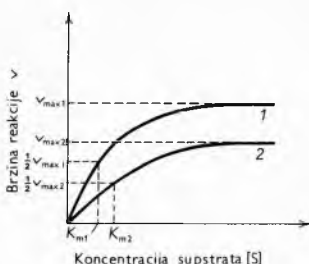


Sl. 3. Lineweaver-Burkov dijagram

Ako se umjesto pretpostavke da se između koncentracija [E], [S] i [ES] uspostavlja ravnoteža uzme pretpostavka da se uspostavlja *stacionarno stanje*, te se kompleks ES istom brzinom stvara i raspada, može se dokazati da Michaelisova konstanta nije jednaka $k_{-1}/k_{+1} = K_s$, nego $K_m = \frac{k_{-1} + k_{+1}}{k_2}$. Kao brzinu

v treba uvijek uzeti brzinu na samom početku reakcije (*početnu brzinu reakcije*), kad je koncentracija produkta (a) još mala te nema utjecaja na brzinu reakcije. Za većinu enzimskih reakcija može se, međutim, pretpostaviti $K_m = K_s$.

Kad je Michaelisova konstanta poznata, s pomoću nje i jedn. (2) — dakle uz uvjet da je $k_{+2} \ll k_{-1}$ i/ili $k_{+2} \ll k_{+1}$ — može se izračunati brzina reakcije iz koncentracije supstrata. K_m predstavlja također mjeru za afinitet određenog enzima prema određenom supstratu. Iz sl. 4 razabire se (ako se uzme da se krivulje odnose na različite supstrate) da je vrijednost Michaelisove konstante to veća za određeni enzim i različite supstrate što je aktivnost enzima prema supstratu manja, tj. što više supstrata treba uz konstantnu količinu enzima ili što manje enzima uz konstantnu količinu supstrata; odnosno (ako se uzme da se krivulje odnose na različite enzime), vidi se da prema određenom supstratu onaj enzim ima veći afinitet, tj. onog će enzima trebati manje za postizanje određene brzine reakcije, za koji je Michaelisova konstanta manja.



Sl. 4. Dijagram $v, [S]$ za dva različita enzima ili supstrata

Jedinice aktivnosti enzima i iz nje izvedenih veličina. *Aktivnost enzima* definirana je kao brzina reakcije supstrata koja se može pripisati katalitičkom djelovanju enzima. Aktivnost (ak-

tiviteta) enzima je fizička veličina koja se može eksperimentalno odrediti i izraziti u pogodnim jedinicama.

Odbor za enzime u Internacionalnoj uniji za biokemiju (IUB) preporučio je 1961 da se brzina reakcije izrazi u mikromolima na minutu ($\mu\text{mol}/\text{min}$) i da se jedinica za količinu enzima, *enzimska jedinica* (U), definiše kao količina enzima koja katalizira pretvorbu jednog mikromola supstrata na minutu pod standardiziranim okolnostima ($1 \text{ U} = 1 \mu\text{mol}/\text{min}$). Ta se jedinica u enzimološkoj praksi još dosta upotrebljava. U njezinoj definiciji, međutim, točno značenje izraza «količina enzima» nije određeno. Ta definicija treba da bude primjenljiva i na enzime koji nisu nikad bili izolirani niti vagani, a u tom slučaju riječ «količina» u njoj ne može značiti isto što i «masa», niti isto što i «količina tvari» (broj molova) u kemiji. «Količina» je u kontekstu definicije «enzimske jedinice» čisto apstraktan pojam, koristan u određenim izračunavanjima, ali nije mjerljiva fizička veličina. Stoga udruženi odbor za nomenklaturu Internacionalnih unija za biokemiju i za čistu i primijenjenu kemiju (IUPAC/IUB) u svojim najnovijim preporukama (1972) preporuča da se pojam «enzimske jedinice», kao fizički nedefinirane «količine enzima», napusti — da se uopće po pravilu ne govori o količini enzima, nego enzima karakterizira svojom aktivnošću.

Kao jedinicu enzimske aktivnosti odbor za nomenklaturu IUPAC/IUB preporuča *katal* (kat), količinu aktivnosti koja pretvara jedan mol supstrata na sekundu. Ta je jedinica često prevelika za praktičnu upotrebu, pa se upotrebljavaju njezini submultipli mikrokatal, nanokatal i pikokatal (μkat , nkat , pkat), koji odgovaraju pretvorbi jednog mikromola, nanomola, odnosno pikomola na sekundu.

Odnos između katala i enzimske jedinice U jest ovaj:

$$1 \text{ kat} = 1 \text{ mol/s} = 60 \text{ mol/min} = 60 \cdot 10^6 \mu\text{mol/min} \hat{=} 60 \cdot 10^7 \text{ U}$$

$$1 \text{ U} \hat{=} 1 \mu\text{mol/min} = \frac{1}{60} \mu\text{mol/s} = \frac{1}{60} \mu\text{kat} = 16,67 \text{ nkat.}$$

Enzimska je aktivnost pod povoljnim okolnostima proporcionalna masi enzima; koeficijent proporcionalnosti pod specifičnim uvjetima zove se *specifična aktivnost*. Specifična aktivnost nekog enzimskeg preparata izražava se normalno u jedinicama *katal po kilogramu proteina*, odn. pogodnim submultiplima te jedinice.

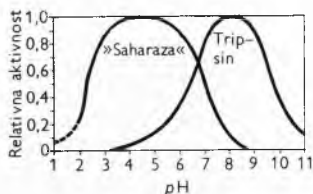
Koeficijent proporcionalnosti između aktivnosti i količine enzimske tvari zove se *molarna aktivnost* i mjeri se jedinicama *katal po molu enzima*, odn. pogodnim submultiplima te jedinice.

Aktivnost se svim enzimima može odrediti, ali se samo enzimima koji su izolirani u čistom stanju ona može rastaviti na sastavne faktore: specifičnu aktivnost i masu, a samo enzimima kojima je određena molarna težina, na sastavne faktore: molarnu aktivnost i količinu enzimske tvari.

Koncentracija enzimske aktivnosti u nekoj otopini mjeri se jedinicom *katal na litru* ili pogodnim submultiplima te jedinice.

Faktori koji utječu na aktivnost enzima. Enzimi, koji su proteini kompleksne strukture, maksimalno ubrzavaju reakciju supstrata samo kad im molekula ima određenu prostornu strukturu. Svaki utjecaj koji tu strukturu razgrađuje ili bitno mijenja, ima kao posljedicu nestanak ili smanjenje aktivnosti enzima. Utjecaji koji najčešće na taj način djeluju na aktivnost enzima jesu promjene koncentracije vodikovih iona (pH), promjene temperature i promjene u prirodi supstrata.

Utjecaj koncentracije vodikovih iona. Krivulje na sl. 5 prikazuju tipičnu ovisnost enzimske aktivnosti od pH -vrijednosti. (Za pH



Sl. 5. Dijagram ovisnosti aktivnosti enzima o pH -vrijednosti

v. *Električna mjerenja*, TE 3, str. 643.) Kako se vidi, postoji određena pH -vrijednost, tzv. *pH -optimum*, pri kojoj je aktivnost enzima (početna brzina enzimske reakcije) maksimalna. Maksimum može biti više ili manje izražen, a može i degenerirati u užu ili širi plato, tj. može postojati veći ili manji interval pH -vrijednosti kod kojih je aktivnost enzima mak-

simalna. (Neki se enzimi ponašaju atipično, oni nemaju pH -optimum, nego im aktivnost s pH -vrijednošću raste do određene vrijednosti od koje dalje ostaje konstantna.) Za većinu poznatih enzima pH -optimum je u neutralnom ili slabo kiselom području; ekstremne vrijednosti imaju neki probavni enzimi, npr. pepsin 1,5–2,5, tripsin 7,5–10.

Utjecaj temperature. Kao svim kemijskim reakcijama, tako i enzimskim reakcijama brzina raste s porastom temperature uslijed porasta kinetičke energije molekula koje reagiraju. Enzimskim reakcijama, međutim, brzina raste s temperaturom samo do određenog maksimuma, a pri daljem povišenju temperature aktivitet naglo pada zbog sve veće toplinske denaturacije bjelančevina enzima, tj. narušavanja njihove tercijarne strukture.

Toplinska inaktivacija enzima razmjerna je temperaturi i vremenu djelovanja tako da optimalna temperatura ovisi i o trajanju pokusa: to je niža što pokus dulje traje. Temperaturni optimum životinjskih enzima često je blizu temperature tijela, za biljne enzime može biti između 60 i 70 °C; iznimno, za mikroorganizme koji su se prilagodili životu u vrućim prirodnim vrelima, optimalna temperatura može ležati čak i blizu 100 °C. Toplinska postojanost enzima, a time i optimalna temperatura, ovisi inače o mnoštvu faktora; na primjer, ona je veća kad je koncentracija enzima niska, pH -vrijednost optimalna, vlažnost mala; pročišćeni enzim u koncentriranoj otopini ekstremnog pH toplinski je vrlo osjetljiv.

Djelovanje niskih temperatura. Brzina kemijskih reakcija, koja s povišenjem temperature raste, sa snižavanjem temperature, dakako, opada. Ali kad se enzimi pothlade na temperaturu ispod točke smrzavanja vode, ili kad se voda dijelom izdvaja smrzavanjem, nastupa niz pojava — one sve i nisu ni dovoljno poznate ili objašnjene — koje često ne dopuštaju da se na osnovi Arrheniusova zakona o ovisnosti brzine reakcije o temperaturi sa sigurnošću predviđi da li će hlađenje na nisku temperaturu ili smrzavanje prekinuti djelovanje enzima. Ponekad se odstupanje od Arrheniusova zakona pokušava tumačiti promjenama u konformaciji enzimske molekule. Izmrzavanje može na djelovanje enzima utjecati i neizravno: uslijed porasta koncentracije ostalih otopljenih tvari (soli, inhibitora i dr.) može doći do potpune ireverzibilne ili reverzibilne inaktivacije enzima, ali su primijećeni i slučajevi iznenađujućeg porasta aktivnosti enzima u nekim djelomično smrznutim sistemima. (To se tumači, među ostalim, i heterogenom katalizom na ploham kristala leda.)

Sa sigurnošću se može očekivati potpuni prekid djelovanja enzima ako se otopina ohladi ispod eutektične temperature, te se time cijeli sistem potpuno imobilizira u čvrstom stanju.

Pri odmrzavanju enzimi ponovo imaju priliku za brzo djelovanje, jer je struktura smrznutog pa odmrznutog biološkog materijala manje ili više oštećena, te dolazi do dodira između prije razdvojenih sastojaka sistema (enzima i supstrata), a enzim, koji smrzavanjem nije bio oštećen, gotovo se u cijelosti reaktivira. Stoga je odmrznuti materijal još podložniji promjenama nego inaktivan. Pri skladištenju smrznutog materijala posebno su nepoželjne i opasne oscilacije temperature u širem rasponu (s lokalnim odmrzavanjem); taj je moment naročito važan pri dugotrajnijem skladištenju pokvarljivog materijala na niskim temperaturama.

Djelovanje vlažnosti. Ponašanje enzima u bezvodnim sistemima toliko je različito od njihova ponašanja u prisutnosti vode da bi se moglo govoriti o posebnoj «kemiji enzima u čvrstom stanju». Utjecaj vlage na aktivnost suhih enzima nije detaljnije i sustavnije ispitan, ali se iz proteinske prirode enzima i iz studija bjelančevina i nukleinskih kiselina može zaključiti da vlaga može na suhe enzime djelovati dvojako: može izazvati njihovo oštećenje, a može ih i zaštititi od oštećenja.

Djelovanje ionizirajućeg zračenja. Izloženi li se enzimi ionizirajućem zračenju, oni se u većoj ili manjoj mjeri dezaktiviraju, već prema vrsti zračenja i primljenoj dozi (v. *Dozimetrija jonizirajućih zračenja*, TE 3, str. 387). Brzina inaktivacije raste uglavnom linearno s dozom zračenja. Efekt zračenja ovisan je, osim o dozi, i o mnoštvu drugih faktora. Općenito vrijedi da osjetljivost enzima prema zračenju naglo raste sa stupnjem pročišćenja. Tako su, npr., enzimi u namirnicama — gdje su prisutne i mnoge druge tvari — daleko manje osjetljivi od djelomično ili potpuno pročišćenih preparata enzima. U djelomično ili potpuno osušanim sirovinama ili namirnicama enzimi su vrlo otporni prema ionizirajućem zračenju. Tako se, npr., djelovanjem doze od 2,5 Mrad, koja inače ima sterilizirajući učin, dijastatska i alfa-amilazna aktivnost slada gubi tek u neznatnoj mjeri; to može biti i od praktičnog značenja. Enzimi su manje otporni prema zračenju kad je prisutan uzduh nego u vakuumu.

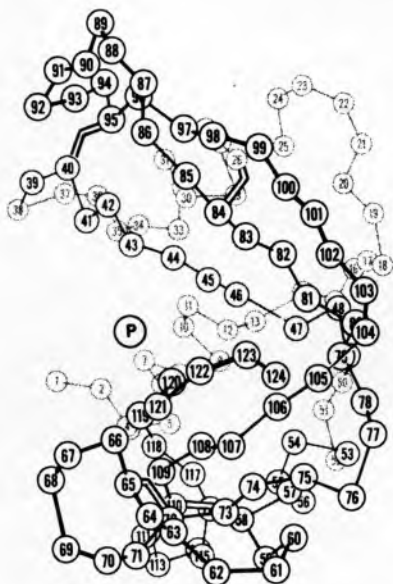
Toplina i zračenje djeluju sinergistički, tj. njihov zajednički učinak veći je nego suma pojedinačnih učinaka. To može biti važno u eventualnoj primjeni ionizirajućeg zračenja pri konzerviranju namirnica: kombinacijom djelovanja topline i zračenja smanjuje se doza potrebna za inaktiviranje enzima koji mogu uzrokovati kvarenje.

Dezaktiviranje enzima kemijskim djelovanjem. Prisutnost određenih metala u molekuli metaloproteinskih enzima prijeko je potrebna za djelatnost enzima. Ioni u otopini koji vežu te metale mogu više ili manje specifično «otrovati» enzime, tj. potpuno i ireverzibilno im oduzeti aktivnost. Vrlo je poznat primjer blokiranja fermenta disanja, koji sadrži željezo, cijanidnim ionima CN^- . Enzime, opet, kojima aktivnost ovisi o slobodnim grupama SH truju, obrnuto, metalni ioni (Cu- ili Hg-ioni). Sumpor-dioksid (ion HSO_3^- ili SO_3^{2-}) mehanizmom koji nije sasvim objašnjen potpuno inaktivira sve enzime (stoga se upotrebljava, npr., kao konzervans za vino i voćne sokove). Tvari koje tvore helatne komplekse s ionima metalâ, npr. etilen-diamino-tetraoctena kiselina (EDTA), mogu enzime inaktivirati, ako se vežu za metal

u aktivnom području enzima, ili sprečavati inaktiviranje, ako vežu metalne ione u otopini koji blokiraju enzim. (Više o aktivatorima i inhibitorima enzimske djelatnost v. dalje.)

Kao bjelančevine, enzimi se inače dezaktiviraju i svim reakcijama koje ih denaturiraju ili kemijski modificiraju.

Specifičnost enzima, tj. pojava da svaki enzim može djelovati samo na određeni supstrat ili na grupu srodnih supstrata (*supstratna specifičnost*), odn. katalizirati samo određenu reakciju tog supstrata (*reakcijska specifičnost*) pripisuje se podudarnosti prostorne strukture enzima i supstrata što ga enzim može aktivirati. Pri spajanju enzima E i supstrata S u kompleks ES molekule supstrata moraju pristajati u molekulu enzima »kao ključ u bravu« (E. Fischer). Prostorna konfiguracija supstrata mora biti takva da atomi supstrata mogu bar na tri *točke interakcije* (Bergmann i Frutton 1941) reagirati s aktivnim funkcionalnim grupama enzima. Skup točaka interakcije između enzima i supstrata naziva se *aktivnim područjem* enzima. Budući da je molekula supstrata (odn. onaj dio molekule koji sudjeluje u kataliziranoj reakciji) uvijek mnogo manja od molekule enzima, aktivno područje predstavlja po pravilu vrlo mali dio ukupne molekule enzima. Za ilustraciju rečenog (i ujedno kao primjer strukture visokomolekularnog enzima) prikazana je na sl. 6 molekula enzima ribonukleaze



Sl. 6. Ribonukleaza A. Fosfatna grupa (P) pokazuje položaj aktivnog centra. Disulfidni mostovi prikazani su dvostrukim stromljenim linijama

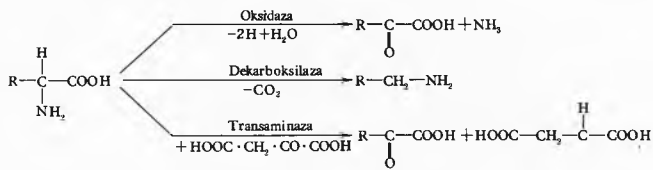
A. Na slici se vidi da je polipeptidni lanac te globularne bjelančevine pomoću četiri disulfidne veze sklopčan tako da molekula ima (na slici lijevo u sredini) dubok usjek, u kojemu se nalazi aktivno područje enzima. U taj usjek pristaje molekula supstrata, ribonukleinske kiseline, čiju hidrolizu enzim katalizira. Točke interakcije enzima sa supstratom, koje su uslijed sklopčanosti polipeptidnog lanca jedna blizu druge, duž polipeptidnog lanca mogu biti jako udaljene jedna od druge, npr. ostaci aminokiseline br. 12 i br. 121.

U stvaranju aktivnog područja sudjeluju ponekad atomske grupe različitih polipeptidnih lanaca, zatim koenzimi (prostetske grupe enzima) i/ili ionski kofaktori. Selektivnim povezivanjem supstrata na aktivnom području stvara se jedinstveni kompleks unutar kojeg se zbivaju kemijske reakcije (preraspodjela elektrona, prekidanje postojećih i stvaranje novih kovalentnih veza itd.); te se reakcije završavaju otjepljivanjem nastalih produkata i regeneracijom aktivnog područja enzima.

Prema novijoj *teoriji induciranoj prilagodivanju* (*induced fit*, Koshland), koju potvrđuje ispitivanje Phillipsa i suradnika na liozozimu, aktivno područje nije preformirano u molekuli slobodnog enzima, nego se stvara *ad hoc*, tj. supstrat ne pristaje od samog početka u enzim kao ključ u bravu, nego se polipeptidni lanci itd. enzima tek nakon početnog slabog vezanja supstrata uz enzim, kao supstratom privučeni, pomiču tako da se reaktivne grupe na njima približe odgovarajućim atomima supstrata.

Navedena teorija specifičnosti čini razumljivom reakcijsku specifičnost i supstratnu specifičnost enzima. Prema strukturi aktivnog područja enzima, različiti enzimi aktiviraju isti supstrat za različite reakcije (supstratna specifičnost) ili selektivno aktiviraju za istu vrst reakcije različite supstrate (reakcijska specifičnost.)

Primjer za reakcijsku specifičnost je djelovanje različitih enzima na amino-kiseline: oksidazama one se oksidativno dezaminiraju, dekarboksilazama se dekarboksiliraju, a transaminazama im se amino-grupa prenosi na drugu karbonsku kiselinu:



[Uzred rečeno, dekarboksilaze i transaminaze imaju isti koenzim, što pokazuje da je nosilac reakcijske specifičnosti apoenzim, a koenzim zapravo djeluje kao »kosupstrat« (v. dalje Koenzimi).]

Primjer za supstratnu specifičnost predstavlja *sterična specifičnost*, tj. specifičnost u odnosu prema optički aktivnim stereoizomerima: neki enzimi iste reakcijske specifičnosti cijepaju samo jedan od dva moguća stereoizomera (optička antipoda), a na drugi ne djeluju (ili djeluju mnogo slabije), ili, obrnuto, pri biosintezi optički neaktivnog spoja iz optički neaktivnih supstrata kataliziraju postanak samo jednog od dva moguća stereoizomera. Izraz je supstratne specifičnosti inače sama činjenica da postoji mnogo oksidaza, dekarboksilaza itd., od kojih svaka djeluje samo na određene supstrate ili grupe supstrata.

Enzimi mogu imati vrlo različite stupnjeve supstratne specifičnosti. Neki su razmjerno slabo specifični (npr., neke hidrolaze djeluju na mnogo različitih supstrata), drugi djeluju na raznovrsne supstrate koji sadrže određene grupe atoma (takvu *grupu specifičnost* imaju, npr., α -galaktozidaza i β -glukozidaza, koje cijepaju sve α -galaktozide, odn. β -glukozide, ali ne odgovarajuće β -, odn. α -spojve); treća skupina enzima, opet, obuhvaća enzime koji djeluju samo na jedan jedini supstrat (*apsolutna specifičnost*).

Enzimska inhibicija. Tvari koje koče enzimsku djelatnost, *inhibitori* enzima, imaju izuzetno važnu ulogu u normalnom metabolizmu živih bića, u biokemijskim istraživanjima, u toksikologiji, u farmakologiji i medicini, u tehnici.

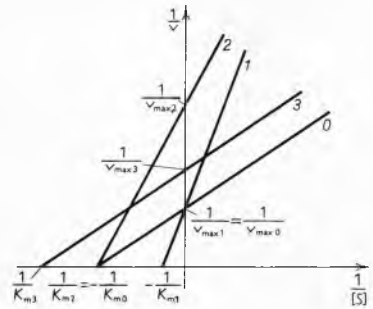
Netko je rekao da je život niz katalitičkih reakcija reguliranih genima. Da bi se te životne reakcije mogle regulirati, tj. uskladiti među sobom i usmjeravati prema potrebama organizma, pored enzima, koji te reakcije ubrzavaju, treba da djeluju i tvari koje katalizirane reakcije u potrebnoj mjeri usporavaju time što inhibiraju, koče, enzimsku djelatnost. Na taj se način brzine zastopnih reakcija u slijedu koji predstavlja *normalni metabolički put* usklađuju tako da se uspostavlja stacionarno stanje. U *biokemijskim istraživanjima* slijed reakcija u metaboličkim putovima određuje se obično tako da se jakim inhibitorom zakači djelovanje nekog specifičnog enzima koji katalizira jednu od reakcija slijeda, uslijed čega se produkti prethodne reakcije (koji bi se zakačenom reakcijom brzo razlagali) nagomilavaju u tolikoj količini da se mogu identificirati. Primjenom inhibitora dobivene su vrijedne indicije o tome kakvim se kemijskim vezama supstrat veže za enzim u kompleksu ES. Mnogi *otrovi* djeluju time što inhibiraju enzime (npr., arsenati blokiraju neke enzimске reakcije sudjelujući u njima umjesto srodnih fosfata; nervni otrovi blokiraju aktivno područje holinesteraze, koja je bitan faktor u prenosu nervnih impulsa; neki se inhibitori enzima proizvode u sve većim količinama kao insekticidi); ispitujući *in vitro* djelovanje toksičnih tvari kao inhibitora pronalaze se protuotrovi. Neki *lijekovi*, npr. sulfanilamidi i, vjerojatno, neki antibiotici, djeluju time što inhibiraju bitne enzime patogenih mikroorganizama. U nekim se postupcima *konzerviranja namirnica* djelovanje štetnih enzima koči pogodnim inhibitorima.

Može se razlikovati više vrsta inhibicije enzima. Ako inhibitor koči enzimsko djelovanje time što reagira samo s enzimom E (a ne i kompleksom ES) govori se o *konkurentnoj ili kompetitivnoj inhibiciji* zbog toga što se u tom slučaju inhibitor natječe sa supstratom za mjesto vezivanja na aktivnom području enzima. Budući da u tom natjecanju supstrat pobjeđuje to više što mu je koncentracija veća, konkurentna se inhibicija može smanjiti ili spriječiti povećanjem koncentracije supstrata. Inhibitori koji nisu konkurentni djeluju time što reagiraju ili samo s kompleksom ES (u tom se slučaju govori o *nekonkurentnoj ili nekompetitivnoj inhibiciji*) ili pak reagiraju i sa slobodnim enzimom i s kompleksom ES (*nonkonkurentna ili nonkompetitivna inhibicija*). Inhibicija koja nije konkurentna ne može se spriječiti povećanjem koncentracije supstrata, ali nekonkurentni inhibitor djeluje slabije na niskim koncentracijama supstrata (kad je manji dio enzima vezan u kompleksu) nego na visokim (kad je i koncentracija kompleksa ES veća), a djelovanje nonkonkurentnog inhibitora približno je jednake jakosti na svim koncentracijama supstrata jer ovisi o ukupnoj koncentraciji enzima, i vezanog i slobodnog. Po tim razlikama u ovisnosti inhibitoranskog djelovanja o koncentraciji supstrata može se utvrditi koja je vrsta inhibicije u danom

slučaju posrijedi. Sl. 7 prikazuje kako se te razlike odražavaju u Lineweaver-Burkovu dijagramu.

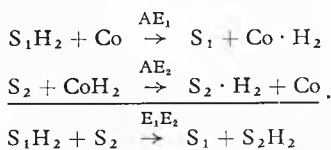
Kao dalja vrsta inhibicije može se spomenuti *inhibicija viškom supstrata*. Kad je koncentracija supstrata vrlo velika, pored aktivnog kompleksa ES može se stvarati također neaktivni (ili mnogo manje aktivni) kompleks ESS. U tom slučaju Michaelis-Mentenova krivulja (v. sl. 2) ima maksimum na određenoj optimalnoj koncentraciji.

Posebna je vrsta enzimске inhibicije alosterična inhibicija. Ta je inhibicija specijalan slučaj *alosterične regulacije* tzv. *efektorima*. To su tvari razmjerno male molekulske težine, koje se vežu za molekulu enzima na određenom mjestu izvan aktivnog područja i time, izgleda, modificiraju kvartarnu strukturu enzima tako da se enzimov aktivnost smanjuje ili povećava. Efektori su po svoj prilici izvanredno važni za metaboličke procese jer služe njihovoj automatskoj regulaciji »povratnom vezom»: kad takvom efektoru kao krajnjem produktu metaboličkog lanca reakcijâ koncentracija naraste iznad ili padne ispod normale, to je znak da slijed reakcija protječe prebrzo, odn. presporo; efektor onda reagira sa enzimom neke ranije reakcije u lancu i alosteričnom inhibicijom ili aktivacijom svodi brzinu te reakcije (a time i ostalih reakcija u lancu) na normalu.

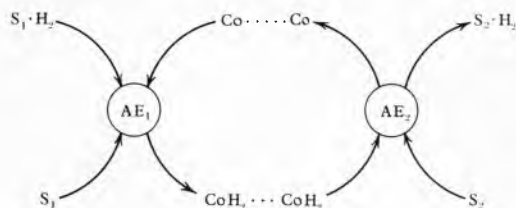


Sl. 7. Lineweaver-Burkov dijagram za različite vrste inhibicije

Koenzimi. Kako je već rečeno, neki enzimi sastoje se, osim od visokomolekularnog proteinskog dijela, i od nižemolekularnog, neproteinskog, termostabilnog dijela zvanog koenzim ili prostetska grupa enzima; taj dio enzima može s proteinskim dijelom biti slabije ili čvršće vezan; koenzim, odn. prostetska grupa, svojim vlastitim aktivnim grupama sudjeluje u stvaranju aktivnog područja enzima, ali nije nosilac specifičnosti enzima (v. str. 337). Danas se zna da koenzim nije katalizator u smislu klasične definicije tog pojma, jer on u reakciji koju enzim katalizira ne ostaje nepromijenjen, nego se u toj reakciji kemijski mijenja. Tek drugom reakcijom, koja slijedi odmah iza prve, i u kojoj sudjeluje drugi supstrat, a katalizira je isti ili drugi enzimski protein, koenzim se regenerira. Kad se neproteinski dio od proteinskog može bez ireverzibilnog poništavanja enzimске aktivnosti odvojiti (tj. kad se (holo)enzim sastoji od apoenzima i koenzima), koenzim se sa stanovišta reakcijskog mehanizma načelno ne razlikuje od supstrata, pa je opravdano predloženo da se smatra *kosupstratom*. Na primjer, reakcija prenosa vodika sa supstrata S_1 na supstrat S_2 katalizirana apoenzimima AE_1 i AE_2 i koenzimom Co može se pisati

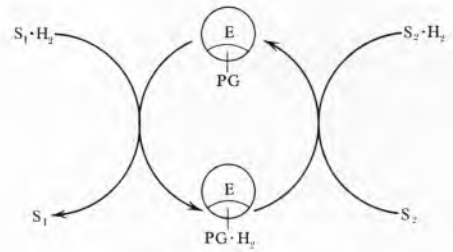


Kao katalizator ukupne reakcije prenosa ne djeluje, dakle, jedan određeni enzim, nego tek enzimski sistem sastavljen od dva različita enzima E_1 i E_2 , pri čemu zajednički koenzim djeluje kao prenosilac (sl. 8). Kad je neproteinski dio enzima s proteinskim



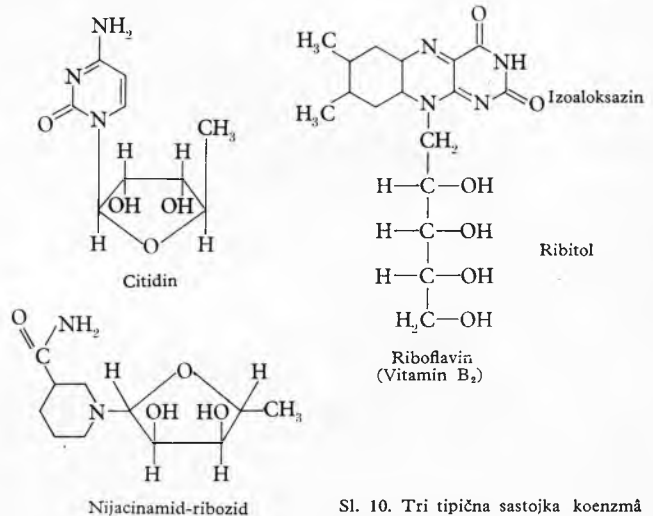
Sl. 8. Koenzim kao prenosilac vodika sa supstrata S_1 na supstrat S_2

čvrsto vezan kao prostetska grupa, ova može, jednako kao kosupstrat, posredovati prijenos atoma ili atomske grupacije od supstrata-davaoca supstratu-primaocu, ostajući pri tom stalno vezana za isti proteinski dio enzima (sl. 9).



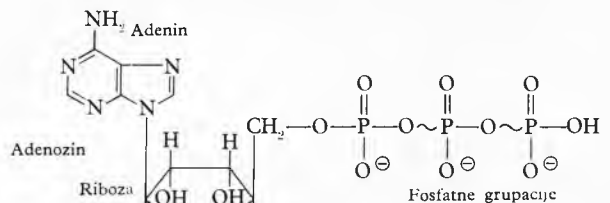
Sl. 9. Prostetska grupa enzima kao prenosilac vodika sa supstrata S_1 na supstrat S_2

Kemijski sastav i struktura koenzima. Gotovo svi koenzimi sadrže kao bitnu sastojinu jednu ili više fosfatnih grupacija često vezanu u obliku nukleozidfosfata ili nukleotida. (Nukleozidom se naziva organska baza vezana s nekim monosaharidom pomoću N-glikozidne veze, v. sl. 10.) Kao organske baze, u sastavu nukleozida, pojavljuju se, npr., derivati piridina, pirimidina, purina, pteridina; šećerni je sastojak nukleozida (monosaharid) gotovo uvijek ista pentoza: riboza. Na sl. 10 prikazana su, primjera radi, dva nukleozida koji se pojavljuju kao sastojci koenzimâ.



Sl. 10. Tri tipična sastojka koenzimâ

Važna je spoznaja da su neki vitamini (gotovo uvijek vitamini grupe B) sastojci nekih koenzima (v. *Vitamini*). Na sl. 10 prikazana je struktura riboflavina (vitamina B_2), sastojka tzv. flavoproteinâ (»žutih fermentâ«), prostetske grupe mnogih aerobnih oksidaza (npr. glukoze oksidaze).



Sl. 11. Adenzin-trifosfat (ATP)

Vitamini organizam ne može sam izgraditi, nego ih mora primiti izvana u hrani. Neke avitaminoze, bolesti koje se pojavljuju kad u hrani nema dovoljno vitamina, uzrokovane su očito time što tijelo ne može izgraditi prijeko potrebne koenzime koji sadrže te vitamine.

Sl. 11 prikazuje, kao primjer, strukturu adenzin-trifosfata (ATP), nukleozida razmjerno jednostavne strukture, koji ima u organizmu važnu ulogu »spremišta» za kemijsku energiju.

Kad se veze označene u sl. 11 valovitim crtom (~) cijepaju, oslobađa se velika energija, koju su molekule ATP pri svojoj izgradnji uzele od energije oslobođene metabolizmom hranila i «usklađivača». Pomoću ATP kemijska se energija hrane prenosi na molekule koje sudjeluju u endotermnim reakcijama (bolje reći: endergonim reakcijama, tj. reakcijama u kojima je promjena slobodne energije pozitivna).

Imobilizacija enzima. Studij pojedinih intracelularnih enzima otežan je time što se oni nakon izdvajanja iz stanice nalaze u stanju različitom od prirodnog: dok su u stanici redovito imobilizirani (nepokretni) na nekoj podlozi i često jedan od drugog odvojeni polupropusnim membranama, nakon izdvajanja nalaze se u razrijeđenju otopini i među sobom izmiješani; u tom stanju oni su po pravilu nestabilni. Da bi se u vodi topljivi enzimi mogli ispitivati u stanju bližem prirodnom, u laboratoriju su izrađene metode kojima se njihove molekule imobiliziraju, tj. udruživanjem s nekim čvrstim netopljivim tijelom prisiljavaju na to da se zadržavaju u ograničenom dijelu prostora. Uskoro se pokazalo da je imobilizacija enzima presudno važna i za primjenu enzima u procesnoj tehnici: njome ne samo da su postali načelno primjenljivi i intracelularni enzimi nego je uopće postala moguća ekonomična primjena u velikom mjerilu čistih enzima kao izvanredno aktivnih i selektivnih katalizatora.

Čisti enzimi i enzimski sistemi previše su skupi da bi se mogli upotrijebiti u procesnoj tehnici onako kako se danas upotrebljavaju sirovi i malo pročišćeni preparati (ukoliko ne ulaze u konačni produkt, ti se preparati nakon jednokratne upotrebe inaktiviraju ili uklanjaju i odbacuju). Imobilizacijom enzima stvorena je mogućnost da se oni upotrebljavaju ponovljeno (kad se proces izvodi u šaržama) ili trajno (ako je proces kontinuiran), tj. onako kako se u procesnoj tehnici upotrebljavaju drugi čvrsti katalizatori: za heterogenu katalizu.

Enzimi su se imobilizirali u laboratoriju ovim postupcima: fizičkom ili kemijskom adsorpcijom na različite podloge, kovalentnim vezanjem enzima za topljive ili netopljive polimere, poprečnim povezivanjem (umrežavanjem) proteinskih molekula enzima, zatim uklapanjem enzimskih molekula u neki gel (hladetanastu masu), membranu ili mikrokapsule.

Kao podloge za adsorpciju enzima upotrijebljeni su porozno staklo, kvarc, bentonit, kaolinit, drveni ugljen, silika-gel, celuloza, za kemisorpciju (ionsko vezanje) ionoizmjenjivačke smole, karboksil-metilceluloza (CM-celuloza), dietil-aminoetilceluloza (DEAE-celuloza), Sephadex (sintetski polimer na bazi polisaharida dekstrana). Enzimi su *adsorpcijom* po pravilu reverzibilno vezani dosta slabim vezama. *Kovalentno vezanje* enzima uz čvrstu podlogu jamačno će se za tehničke svrhe najviše upotrebljavati. Ono se ostvaruje posredstvom kemikalija koje površinu nosioca kemijski modificiraju tako da se molekule enzima za nju mogu kovalentno vezati. Npr., ako se karboksilna grupa CM-celuloze (odn. metilkarboksilna grupa njezina metilnog estera) ili amidna grupa poliakrilamida djelovanjem hidrazina i natrijum-nitrata pretvori u azidnu, za tu se grupu molekula bjelanjčevine jednom svojom aaminskom grupom može čvrsto vezati. *Uklapanje enzima* u hladetanastu masu, koja sprečava velike molekule enzima da difundiraju k supstratu, ali dopušta malim molekulama supstrata da dopru do enzima, obično se postiže tako da se enzim i monomer nosioca otope u vodi pa nosilac polimerizira u prisutnosti nekog sredstva za umrežavanje. Takvim ili sličnim načinom uklopljeni su enzimi u poliakrilamid ili škrob, i također dobivene polupropusne membrane u koje su uloženi enzimi. I za tehniku vrlo zanimljiva modifikacija tog postupka je *mikroinkapsulacija*, oklapanje mikroskopskih kapljica enzimске suspenzije u organskoj tekućini tankom polupropusnom membranom. Dobivene mikrokapsule u neku ruku predstavljaju umjetne stanice. *Intermolekularnim poprečnim vezanjem* (stvaranjem mostova među molekulama, umrežavanjem) može se učvrstiti ili uopće ostvariti veza između nosioca i nekih na njegovoj površini adsorbiranih enzima. Tako je npr. imobiliziran papain s pomoću glutaraldehida.

Imobilizacija enzima je osnova na kojoj se konstituirala nova grana tehnike: *enzimsko inženjerstvo*. Na jedan od gore navedenih načina mogu se imobilizirati enzimi na nosiocima u obliku granula, ploča, membrana, vlakana, mikrocijevi, mikrokapsula i dr., pa na osnovi tako imobiliziranih enzima konstruirati reaktori različitih tipova (v. str. 344).

Imobilizirani enzimi često su stabilniji od slobodnih, a mogu imati i izmijenjena svojstva (drugi pH-optimum, drugu Michaelisovu konstantu, drugu supstratnu specifičnost i dr.).

U tome se naziru mogućnosti manipuliranja enzimima radi dobivanja katalizatora za određene svrhe. Dalju perspektivnu mogućnost predstavlja proizvodnja imobiliziranih multienzimskih sistema za provođenje višestepenih reakcija jednim prolazom supstrata kroz reaktor.

Podjela i nomenklatura enzima. U ranom periodu razvoja enzimologije davana su enzimima imena bez sistema, većinom s nastavkom na *-in* (tripsin, pepsin, emulzin); neka od njih i danas su u upotrebi. Kasnije su se, prema predlogu Duclauxa (1898), imena enzima tvorila uz pomoć nastavka *-aza* (po uzoru na ime »dijastaza«); taj se nastavak dodavao ili imenu reakcije što je enzim katalizira (npr. pektin-depolimeraza depolimerizira pektin) ili imenu supstrata što ga enzim (hidrolitički) cijepa (proteaze cijepaju bjelanjčevine, esterase estere, fosfataze estere fosforne kiseline, lipaze cijepaju masti, amilaze škrob, pektinaze pektin, itd.).

Internacionalna unija za biokemiju izdala je 1961 preporuku (revidiranu 1965 i 1967) za racionalnu nomenklaturu enzima. U toj nomenklaturi, koja se osniva na klasifikaciji enzima što je Unija istovremeno predlaže, nastavak *-aza* dodaje se isključivo grupnom imenu reakcije koju enzim katalizira, i to samo imenu 6 reakcijskih grupa na koje je Unija podijelila sve enzimске reakcije (i prema tome također enzime): 1. oksidoredukcijske reakcije kataliziraju *oksidoreduktaze*; 2. reakcije prijenosa (transfera) atomskih grupa — *transferaze*; 3. reakcije hidrolize — *hidrolaze*; 4. reakcije razgradnje (lize) — *lijaze*; 5. reakcije izomerizacije — *izomeraze*; 6. reakcije spajanja dviju molekula na račun energije uskladištene u nukleozid-trifosfatu ATP (v. gore) — *ligaze* ili sintetaze. Ako enzimi 4. grupe (lijaze) kataliziraju razgradnju suprotnu reakciju, sintezu, mogu se nazivati »sintazama«. Da se te sintetaze ne bi zamjenjivale sa »sintetazama«, enzimima grupe 6., Unija preporuča da se umjesto »sintetaza« kaže »ligaza« (lat. *ligo* vezem).

Grupe se dalje dijele na podgrupe i potpodgrupe prema tabl. 1.

Sistemska naziv pojedinog enzima sastoji se od dva dijela: imena supstrata na koji djeluje enzim (odn., ako djeluje na dva supstrata ili supstrat i kosupstrat, njihova imena odvojena dvočerkom) i ime grupe koja ukazuje na prirodu reakcije što je enzim katalizira.

U imenu enzima napisanom u preporuci Unije na engleskom jeziku, između ta dva dijela imena nalazi se razmak, u skladu s engleskim pravopisom. Prema našem, kao i prema ruskom pravopisu, tu bi trebalo da se stavi crtica, ali kako u imenu enzima može biti i drugih crtica, ne bi bilo uvijek jasno gdje svršava prvi, a počinje drugi dio imena. Rusi su taj problem riješili tako da između oba dijela sistemskog imena enzima stavljaju nešto dulju crticu; taj je način pisanja primijenjen i u ovom članku.

Klasifikacija Unije za biokemiju preporuča i *indeksaciju (numeraciju) enzima*. Prema toj preporuci svaki enzim ima jednoznačan indeks sastavljen od četiri broja odvojena točkama; to su redom: brojevi grupe, podgrupe, potpodgrupe i redni broj individualnog enzima u potpodgrupi. Npr.: Acetil-CoA—hidrolaza 3.1.2.1.; D-glukoza-6-fosfat: NADP⁺—oksidoreduktaza 1.1.1.49 (Acetil-CoA je kratica za acetil-koenzim A, tzv. »aktiviranu octenu kiselinu«, a NADP⁺ za nikotinamid-adenin-dinukleotidfosfat, v. gore).

Budući da su već sistemska imena mnogih supstrata (prema nomenklaturi Unije za čistu i primijenjenu kemiju, IUPAC) duga i složena, sistemska su nazivi mnogih važnih enzima vrlo nezgrapni. Stoga preporuka Unije za takve enzime navodi i kraća, *radna ili trivijalna imena*. Takva radna imena enzima imaju često nastavak *-aza* dodat imenu supstrata na koji enzimi djeluju ili imenu reakcija različitih od onih šest koje su gore navedene. Tako se, npr., enzim koji se starim imenom nazivao invertaza ili saharaza, a ima sistemska naziv β -D-fruktofuranozid—fruktohidrolaza, indeks 3.2.1.26, naziva kraće β -fruktofuranozidaza, a β -D-glukoza: oksigen—oksidoreduktaza, 1.1.3.4, kraće se naziva glukoze oksidaza. Kao radno ime u nekim se izuzetnim slučajevima za enzime koji imaju i sistemska naziv preporuča, uz skraćeni sistemska naziv, također staro trivijalno ili po nekom drugom sistemu sastavljeno ime, npr. lizozim, ali po pravilu se takva trivijalna imena (kao sukraza, saharaza, invertaza, maltaza, laktaza itd.) ne preporučaju. Međutim, neki enzimi kojima način djelovanja još nije dovoljno poznat (to su u prvom redu peptid-hidrolaze podgrupe 3.4.4., kao pepsin, renin, tripsin, papain, ficin, bromelain, keratinaza) i u sistemu Unije imaju ta stara imena, jer im se sistemska nazivi još ne mogu dati.

Najnovije (1972), dopunjeno i umnogome izmijenjeno izdanje preporuka u vezi s nomenklaturom i klasifikacijom enzima izdala je udružena Komisija za biokemijsku nomenklaturu Internacionalne unije za čistu i primijenjenu kemiju (IUPAC) i Internacionalne unije za biokemiju (IUB). Uvaživi prigovor stavljen iz prakse da su sistemska imena enzima često previše duga i zamršena da bi se mogla upotrebljavati kao nazivi za neki enzim

Tablica 1
KLASIFIKACIJA, NUMERACIJA I NOMENKLATURA ENZIMA

- 1. Oksidoreduktaze** tvore sistemsko ime prema shemi *donor-akceptor-oksidoreduktaza*. Na podgrupe se dijele prema prirodni donora, a na potpodgrupe prema akceptoru. Pri tom određenim akceptorima u numeraciji pripadaju u svim podgrupama iste brojeke i to:
- 1.n.1 Akceptor je NAD^+ ili NADP^+
 - 1.n.2 Akceptor je citohrom
 - 1.n.3 Akceptor je O_2
 - 1.n.4 Akceptor je disulfidni spoj
 - 1.n.5 Akceptori su kinoni ili njima srodni spojevi
 - 1.n.6 Akceptor je neka dušična grupa
 - 1.n.7 Akceptor je željezo-sumporni protein
 - 1.n.99 Koriste se drugim akceptorima
- Podgrupe ($n = 1 \dots 14$) i potpodgrupe u grupi 1 jesu:
- 1.1 Djeluju na grupu CH-OH donora
Potpodgrupe su: 1.1.1, 1.1.2, 1.1.3, 1.1.99.
 - 1.2 Djeluju na aldehidnu ili ketonsku grupu donora
Potpodgrupe su: 1.2.1, 1.2.2, 1.2.3, 1.2.4, 1.2.7, 1.2.99.
 - 1.3 Djeluju na grupu CH-CH donora
Potpodgrupe su: 1.3.1, 1.3.2, 1.3.3, 1.3.7, 1.3.99.
 - 1.4 Djeluju na grupu CH-NH_2 donora
Potpodgrupe su: 1.4.1, 1.4.3, 1.4.4.
 - 1.5 Djeluju na grupu C-NH donora
Potpodgrupe su: 1.5.1, 1.5.3, 1.5.99.
 - 1.6 Djeluju na NADH ili NADPH kao donor
Potpodgrupe su: 1.6.1, 1.6.2, 1.6.4, 1.6.5, 1.6.6, 1.6.7, 1.6.99.
 - 1.7 Djeluju na druge dušične spojeve kao donore
Potpodgrupe su: 1.7.2, 1.7.3, 1.7.7, 1.7.99.
 - 1.8 Djeluju na sumporne grupe donora
Potpodgrupe su: 1.8.1, 1.8.2, 1.8.3, 1.8.4, 1.8.5, 1.8.6, 1.8.7, 1.8.99.
 - 1.9 Djeluju na grupe hema u donorima
Potpodgrupe su: 1.9.3, 1.9.6, 1.9.99.
 - 1.10 Djeluju na difenole ili srodne spojeve kao donore
Potpodgrupe su: 1.10.2, 1.10.3.
 - 1.11 Djeluju na H_2O_2 kao akceptor
 - 1.12 Djeluju na vodik kao donor
Potpodgrupe su: 1.12.1, 1.12.2, 1.12.7.
 - 1.13 Djeluju na pojedinačne donore uz ugrađivanje molekularnog kisika (oksigenaze)
Potpodgrupe jesu:
 - 1.13.11 Ugrađuju se dva atoma kisika
 - 1.13.12 Ugrađuje se jedan atom kisika
 - 1.13.99 Različiti (treba ih dalje karakterizirati)
 - 1.14 Djeluju na srene donore uz ugrađivanje kisika. Kad nije drukčije rečeno (potpodgrupe 1.14.11 i 1.14.12) katalizirano se reakcijom ugrađuje jedan atom kisika. Potpodgrupe jesu:
 - 1.14.11 Jedan je donor 2-oksiglutarat, a po jedan atom kisika ugrađuje se u oba donora
 - 1.14.12 Jedan je donor NADH ili NADPH , a dva atoma kisika ugrađuju se u jedan od donora
 - 1.14.13 Jedan je donor NADH ili NADPH , a ugrađuje se jedan atom kisika
 - 1.14.14 Jedan je donor reducirani flavin ili flavoprotein
 - 1.14.15 Jedan je donor reducirani željezo-sumporni protein
 - 1.14.16 Jedan je donor reducirani piridin
 - 1.14.17 Jedan je donor askorbat
 - 1.14.18 Jedan je donor neki drugi spoj
 - 1.15 Djeluju na superoksidne radikale kao akceptore
 - 1.16 Oksidiraju metalne ione
Potpodgrupa je 1.16.3
 - 1.17 Djeluju na grupe $-\text{CH}_2-$
Potpodgrupe su: 1.17.1, 1.17.4
- 2. Transferaze** tvore sistemsko ime prema shemi: *donor-akceptor-prenesena grupa-transferaza*. Podgrupe i potpodgrupe jesu:
- 2.1 Prenose jednoglučine grupe
 - 2.1.1 Metiltransferaze
 - 2.1.2 Hidroksimetil-, formil- i srodne transferaze
 - 2.1.3 Karboksil- i karbamoid-transferaze
 - 2.1.4 Amidinotransferaze
 - 2.2 Prenose aldehidne ili ketonske ostatke
 - 2.3 Aciltransferaze
 - 2.3.1 Aciltransferaze
 - 2.3.2 Aminoaciltransferaze
 - 2.4 Glikoziltransferaze
 - 2.4.1 Heksoziltransferaze
 - 2.4.2 Pentoziltransferaze
 - 2.4.99 Prenose druge glicerozilne grupe
 - 2.5 Prenose alkalne ili arilne grupe različite od metilnih
 - 2.6 Prenose dušične grupe
 - 2.6.1 Aminotransferaze
 - 2.6.3 Oksiminotransferaze
 - 2.7 Prenose grupe koje sadrže fosfor
 - 2.7.1 Fosfotransferaze s alkoholnom grupom kao akceptorom
 - 2.7.2 Fosfotransferaze s karboksilnom grupom kao akceptorom
 - 2.7.3 Fosfotransferaze s dušičnom grupom kao akceptorom
 - 2.7.4 Fosfotransferaze s fosfatnom grupom kao akceptorom
 - 2.7.5 Fosfotransferaze s regeneracijom donora (izgleda da kataliziraju intramolekularne prenose)
 - 2.7.6 Pirofosfotransferaze
 - 2.7.7 Nukleotidiltransferaze
 - 2.7.8 Prenose druge supstituirane fosfatne grupe
 - 2.7.9 Fosfotransferaze sa sparenim akceptorima
 - 2.8 Prenose grupe koje sadrže sumpor
 - 2.8.1 Sulfidtransferaze
 - 2.8.2 Sulfotransferaze
 - 2.8.3 CoA-transferaze
- 3. Hidrolaze** tvore sistemsko ime prema shemi: *supstrat-hidrolaza*. Priroda reakcije se ponekad pobliže označuje prefiksima: (amido-hidrolaze, fosfohidrolaze itd.). Podgrupe i potpodgrupe jesu:
- 3.1 Djeluju na esterske veze
 - 3.1.1 Hidrolaze esterā karbonskih kiselina
 - 3.1.2 Hidrolaze tiolnih estera
 - 3.1.3 Hidrolaze monoesterā fosforne kiseline
 - 3.1.4 Hidrolaze diesterā fosforne kiseline
 - 3.1.5 Hidrolaze trifosfornih monoesterā
 - 3.1.6 Hidrolaze esterā sumporne kiseline
 - 3.1.7 Hidrolaze difosfornih monoesterā
 - 3.2 Djeluju na glikozilne spojeve
 - 3.2.1 Hidrolaze O-glikozilnih spojeva
 - 3.2.2 Hidrolaze N-glikozilnih spojeva
 - 3.2.3 Hidrolaze S-glikozilnih spojeva
 - 3.3 Djeluju na esterske veze
 - 3.3.1 Hidrolaze tioeterā
 - 3.3.2 Hidrolaze eterā
 - 3.4 Djeluju na peptidne veze
 - 3.4.11 α -Aminoacilpeptidhidrolaze
 - 3.4.12 Hidrolaze peptidilaminokiselina ili acilaminokiselina
 - 3.4.13 Dipeptidhidrolaze
 - 3.4.14 Dipeptidilpeptidhidrolaze
 - 3.4.15 Peptididipeptidhidrolaze
 - 3.4.21 Serinproteinaze
 - 3.4.22 SH-proteinaze
 - 3.4.23 Kiselinske proteinaze
 - 3.4.24 Metalo-proteinaze
 - 3.4.99 Proteinaze nepoznatog katalitičkog mehanizma
 - 3.5 Djeluju na veze C-N različite od peptidnih
 - 3.5.1 u linijskim amidima
 - 3.5.2 u cikličkim amidima
 - 3.5.3 u linijskim amidinima
 - 3.5.4 u cikličkim amidinima
 - 3.5.5 u nitrilima
 - 3.5.99 u drugim spojevima
 - 3.6 Djeluju na anhidride kiselina
 - 3.6.1 na anhidride koji sadrže fosforil
 - 3.7 Djeluju na veze C-C
 - 3.7.1 u ketonskim tvarima
 - 3.8 Djeluju na haloidne veze
 - 3.8.1 u C-haloidnim spojevima
 - 3.8.2 u P-haloidnim spojevima
 - 3.9 Djeluju na veze P-N
 - 3.10 Djeluju na veze S-N
 - 3.11 Djeluju na veze C-P
- 4. Lijaze** tvore sistemsko ime tako da se prefiksima (hidro-, amono-, karboksi-, itd.) i imenom supstrata označuje priroda reakcije kojom se nehidrolitski uklanja grupa iz supstrata ostavljajući dvostruke veze (ili adiraju grupe na dvostruke veze). Podgrupe i potpodgrupe jesu:
- 4.1 Lijaze ugljik-ugljik
 - 4.1.1 Karboksi-lijaze
 - 4.1.2 Aldehid-lijaze
 - 4.1.3 Lijaze oksikiselina
 - 4.1.99 Druge lijaze ugljik-ugljik
 - 4.2 Lijaze ugljik-kisik
 - 4.2.1 Hidro-lijaze
 - 4.2.2 Lijaze koje djeluju na polisaharide
 - 4.2.99 Druge lijaze ugljik-kisik
 - 4.3 Lijaze ugljik-dušik
 - 4.3.1 Amono-lijaze
 - 4.3.2 Amidin-lijaze
 - 4.4 Lijaze ugljik-sumpor
 - 4.5 Lijaze ugljik-halogen
 - 4.6 Lijaze fosfor-kisik
 - 4.99 Druge lijaze
- 5. Izomeraze** tvore sistemsko ime uz upotrebu prefiksa kojima je označena priroda reakcija izomerizacije što ih one kataliziraju (cis-trans, keto-enol, itd.). Podgrupe i potpodgrupe jesu:
- 5.1 Racemaze i epimeraze
 - 5.1.1 Djeluju na aminokiseline i njihove derivat
 - 5.1.2 Djeluju na hidroksikiseline i njihove derivat
 - 5.1.3 Djeluju na ugljikohidrate i njihove derivat
 - 5.1.99 Djeluju na druge spojeve
 - 5.2 Cis-trans-izomeraze
 - 5.3 Intramolekularne oksidoreduktaze
 - 5.3.1 Pretvaraju aldeze u ketoze i obratno
 - 5.3.2 Pretvaraju keto-grupe u enolne grupe i obratno
 - 5.3.3 Premještaju veze $\text{C}=\text{C}$
 - 5.3.4 Premještaju veze $\text{S}-\text{S}$
 - 5.3.99 Druge intramolekularne oksidoreduktaze
 - 5.4 Intramolekularne transferaze
 - 5.4.1 Prenose acilne grupe
 - 5.4.2 Prenose fosforilne grupe
 - 5.4.3 Prenose amino-grupe
 - 5.4.99 Prenose druge grupe
 - 5.5 Intramolekularne lijaze
 - 5.99 Druge izomeraze
- 6. Ligaze (sintetaze)** tvore sistemsko ime prema shemi X-Y-ligaze (tvori ADP), gdje su X i Y molekule čije vezanje enzim katalizira, a u zagradi je oznaka fosfata u koenzimu čija se pirofosfatna veza katalizirano reakcijom kida. Podgrupe i potpodgrupe jesu:
- 6.1 Tvore veze C-C
 - 6.1.1 Ligaze koje tvore aminoacil-tRNA i srodne spojeve
 - 6.2 Tvore veze C-S
 - 6.2.1 Kiselinsko-tiolne ligaze
 - 6.3 Tvore veze C-N
 - 6.3.1 Kiselinsko-amonijačne ligaze (amid-sintetaze)
 - 6.3.2 Kiselinsko-aminokiselinske ligaze (peptid-sintetaze)
 - 6.3.3 Cikloligaze
 - 6.3.4 Druge C-N-ligaze
 - 6.3.5 C-N-ligaze s glutaminom kao amido-N-donorom
 - 6.4 Tvore veze C-C
 - 6.5 Tvore fosfatno-esterske veze
- Tumač kratica:** ADP, — adenozin-5'-difosfat; CoA — koenzim A; DNA — deoksiribonukleinska kiselina; NAD^+ (NADH) — oksidirani (reducirani) nikotinamid-adenin-dinukleat; NADP^+ (NADPH) — oksidirani (reducirani) nikotinamid-adenin-dinukleat-fosfat; RNA — ribonukleinska kiselina; tRNA — transfer-RNA.

svaki put kad se u spominje (npr. u nekom članku koji o njemu radi), ta komisija sad preporuča da se upotrebljava kao naziv za enzim prvenstveno naziv koji je gore spomenut kao *radni*, a sistemski naziv, kojim je točno označeno kojoj grupi neki enzim pripada i koju reakciju katalizira, da se u članku i sl. o njemu navede bar jedanput. U popisu enzima naveden je taj radni naziv, kao *preporučeni naziv* na prvom mjestu, ispred sistemskog, a za tvorenje preporučenih naziva po jedinstvenim načelima sastavljene su posebne preporuke.

Neka stara imena koja Unija ne preporuča ipak se u praksi i literaturi češće susreću. Kad se u ovom članku takva imena budu upotrijebila, staviti će se među navodne znakove, npr. *invertaza*, *saharaza*.

Industrijska proizvodnja enzima i njihova upotreba

Enzimi se već stoljećima upotrebljavaju kao katalizatori biokemijskih reakcija u kućanstvu, obrtu i industriji, ali za tu svrhu upotrebljavani preparati bili su donedavna ili sirove i nečiste smjese enzima izoliranih iz materijala životinjskog i biljnog porijekla, ili žive stanice mikroorganizama (gljivica i bakterija) koje su izazivale reakcije (vrenja, fermentacije) svojim intracelularnim i ekstracelularnim enzimima. Tek u posljednjih desetak-dvadesetak godina sve brže se razvija proizvodnja čistih enzimskih preparata i čistih enzima, koji sve više zamjenjuju i klasične enzimske preparate i neenzimske katalizatore, a nalaze primjenu i za izvođenje novih reakcija u industriji.

Pošto je nedavno pošlo za rukom totalno sintetizirati jedan enzim (ribonukleazu, v. str. 334) i konstruirati aparaturu koja tu sintezu izvodi automatski, nema sumnje da će se u bližoj ili daljoj budućnosti sintetski proizvoditi enzimi, ili bar spojevi s enzimskom djelatnošću (*modeli* ili *analogi* enzima) i kemijski modificirani prirodni enzimi. Danas, međutim, enzimi se industrijski dobivaju isključivo s pomoću živih stanica.

J. Takamine je već g. 1894 patentirao postupak proizvodnje diastatskih enzima iz gljivica, ali upotreba njegovih preparata u industriji alkohola nije se održala jer je uzrokovala neugodan miris i okus proizvoda. Röhm je 1908 pokazao da se enzimi iz gušterače (pankreas) mogu upotrijebiti za mekšanje sirove kože prije štavljena, i kožarska je industrija taj enzimski postupak brzo prihvatila. Isto tako su pivovare prihvatile upotrebu proteolitskih enzima za sprečavanje zamučivanja ohlađenog piva izlučenim bjelancevinama, prema patentu Wallersteina (1911). Upotreba tripsinskih enzima pri pranju tekstila, koju je predložio Röhm 1913, u većoj se mjeri uvela samo u Evropi, i to samo za namakanje rublja.

U početku tridesetih godina ovog stoljeća uvedena je upotreba pektinaza za bistenje voćnih sokova. Upotreba gljivičnih enzima za pripremu slatkih sirupa razvila se za vrijeme drugog svjetskog rata, potaknuta oskudicom šećera, i dovela je u USA do proizvodnje sve većeg broja raznovrsnih sirupa. U početku pedesetih godina uvedeni su u pekarstvo enzimi industrijski proizvedeni s pomoću mikroba. Stari prijedlog da se gljivični enzimi primijene u industriji alkohola ponovo je na se svratio pažnju za vrijeme drugog svjetskog rata, ali tek proizvodnja gljivične amiloglukozidaze (dekstrin-6- α -glukozidaze 3.2.1.33), potkraj šezdesetih godina, postala je upotreba gljivičnih enzima u alkoholnoj industriji povoljnija od upotrebe slada.

U posljednjih tridesetak godina veoma se proširilo znanje o prirodi i djelovanju enzima, umijeće izoliranja i pročišćavanja pojedinačnih enzima i tehnika njihove imobilizacije radi upotrebe enzima kao katalizatora u reaktorima različitih tipova. Usljed toga postaju realne mnoge zamisli i spekulacije o primjeni više ili manje čistih enzima u industriji, analitici i medicini, pa je oživjela djelatnost ispitivanja ostvarljivosti tih potencijalnih primjena a time i razvijanja postupaka proizvodnje pojedinih čistih enzima.

Proizvodnja industrijskih enzima obuhvaća izbor i selekcioniranje organizma s pomoću kojeg će se proizvoditi željeni enzim; povećanje proizvodnje enzima u izabranom organizmu izazivanjem mutacije, hibridizacijom i sl.; umnožavanje organizma, odn. izazivanje povećane proizvodnje enzima u njemu stvaranjem optimalnih uvjeta za to; odvajanje enzima od organizma u kojemu je proizveden; koncentraciju, pročišćavanje i stabilizaciju enzima, imobilizaciju enzima; standardizaciju enzimske aktivnosti u konačnom proizvodu (formulaciju). (U proizvodnji određenog industrijskog enzima ne primjenjuju se po pravilu svi ti postupci, ali obavezno neki od njih.)

Pri nabranjanju postupaka što ih obuhvaća proizvodnja industrijskih enzima imala se u vidu prvenstveno proizvodnja enzima s pomoću mikroorganizama, tipična za modernu enzimsku tehnologiju. Ali i postupci dobivanja enzima iz životinjskih i biljnih sirovina mogu se svesti pod nabrojene postupke. Npr. za proizvodnju slada, kao preparata amilaze, izabire se pogodan organizam (zrno ječma, pšenice i sl.) kao potencijalni proizvođač tog enzima; hibridizacijom se odgajaju sorte biljke kojima plodovi proizvode više traženog enzima; stvaranjem pogodnih uvjeta za klijanje zrna (namakanjem, grijanjem, prozračivanjem, dodavanjem stimulatora) izaziva se stvaranje enzima; sušenjem proklijalog zrna (*zrelog slada*) stabilizira se enzim.

Razlozi zbog kojih se mikroorganizmi (mikrobi: plijesni, jednostanične gljivice, bakterije) prvenstveno upotrebljavaju u proizvodnji enzima jesu ovi: selekcijom, hibridizacijom, mutacijom mogu se dobiti organizmi koji obilno proizvode prvenstveno tražene enzime u ekonomski povoljnom supstratu; mikrobi se brzo razmnožavaju te se iz male količine cjepiva (inokuluma) mogu za kratko vrijeme uzgajati goleme količine biomase; određenim režimom ishrane, rasta i razmnožavanja mikroba, primjenom mehanizama indukcije i inhibicije različitih enzima, može se optimirati sadržaj traženog enzima u biomasi.

Selekcija radnog organizma. Selekcijom se nastoje izolirati stanice organizma koji će, razmnožen u velikom mjerilu, proizvoditi traženi enzim u što čistijem stanju uz što manje troškove.

Prva odluka pri tom bit će da li selekcijom izolirati organizam koji proizvodi intracelularni enzim (koji ostaje i djeluje u stanici) ili ekstracelularni (koji se u stanici proizvodi i onda kroz staničnu membranu izbacuje u okolnu sredinu). Intracelularni enzim ima prednost da je koncentriran u tkivu koje se može lako izdvojiti iz prevrele komine, ali nedostatak da ga nije uvijek lako iz stanice izdvojati i odvojiti od drugih sastojaka stanice. Ekstracelularni enzimi, opet, dobivaju se u filtratu od biomase znatno čistiji, ali u razrijeđenoj otopini čija koncentracija može iziskivati prilične troškove.

Većina danas proizvedenih industrijskih enzima jesu ekstracelularni [među razmjerno malobrojnim intracelularnim industrijskim enzimima je β -fruktosidaza (*invertaza*) iz kvasca]; međutim, uz uvjet da se razviju metode za njihovu ekonomičnu proizvodnju i primjenu, intracelularni enzimi imaju dobru perspektivu za primjenu kao industrijski katalizatori, s obzirom na to da su to većinom enzimi koji kataliziraju sinteze spojeva iz jednostavnijih sastojaka, za razliku od ekstracelularnih enzima, koji mahom kataliziraju kemijske reakcije razgradnje.

Druga svojstva koja se traže od radnih organizama jesu da imaju stabilne karakteristike prinosa enzima, proizvodnje sporā i uvjetā za razvoj, da se što lakše filtriraju, centrifugiraju ili dezintegriiraju (ako treba), da ne proizvode otrovne ili inače nepoželjne nusproizvode i da se razmnožavaju i rastu na jeftinim supstratima.

Selekcioniranom organizmu mogu se svojstva dalje poboljšati *mutacijom*. Za to postoje različite tehnike, kojima je prinos enzima s pomoću određenih mutanata mikroorganizama povećan na dvostruko, deseterostruko, stotruko, pa i mnogo više, u odnosu prema polaznom organizmu. Znatno povećanje proizvodnosti mikroorganizama postignuto je, npr., upotrebom ultravioletnog svjetla i nitrogenskih iperita kao mutagena. Mutacijom, kao i hibridizacijom, dobiva se niz novih sojeva, koji se ponovo probiru. Proizvođači po pravilu drže u tajnosti kojim sojem mikroorganizma proizvode neki enzim i na koji su način od njega došli, pa je o tome mnogo toga tehničkoj javnosti nepoznato.

Biotehnologija enzima. Enzimi se mahom industrijski proizvode u aparaturi koja je i inače svojstvena kemijskoj tehnologiji i biotehnologiji drugih proizvoda, npr. namirnica.

Sl. 12 prikazuje kombiniranu shemu proizvodnje enzima i enzimskih preparata iz biljnih i životinjskih sirovina, te uz pomoć mikroba.

Izvori enzima. Pod tim naslovom lijevo u shemi navedene su sirovine životinjskog i biljnog porijekla, te biomase, dobivene različitim načinima umnožavanja mikroba, koje služe kao izvori enzima.

Sirovine životinjskog porijekla jesu mahom žlijezde s unutrašnjim lučenjem, koje se dobivaju od životinja zaklanih u industrijskim klaonicama. To su nusprodukti klaonica pa je njihova raspoložljivost ograničena prometom klaonica. Da se spriječi gubitak enzimske aktivnosti, taj materijal treba nakon klanja brzo ukloniti i odmah zaštititi smrzavanjem ili liofilizacijom (sušenjem smrznutog materijala sublimacijom vode u vakuumu). Sirovine biljnog porijekla jesu ili biljno tkivo (dijelovi biljaka) ili sok biljaka. Biljke se, dakako, u načelu, mogu uzgajati u željenim količinama, ali kako se mnoge biljke koje daju sirovine za enzime uzgajaju prvenstveno radi ploda, a za proizvodnju enzima se upotrebljavaju nusproizvodi, tj. drugi dijelovi biljke, količine biljnih sirovina raspoloživih za proizvodnju enzima po pravilu su također ograničene.

Mikrobi razmnoženi da bi služili kao sirovina za proizvodnju enzima i enzimskih preparata dobivaju se industrijski na jedan od dva načina: površinskim uzgojem radnog organizma ili dubinskim (submerznim) uzgojem. Po površinskoj metodi, kojom se najviše uzgajaju plijesni, mikroorganizmi se razmnožavaju na površini ovlaženih mekinja ili zrna riže, koje su ili razasterte (uz dodatak hranjivih tvari i soli) na plitkim tavama u tankom sloju kroz koji (ili preko kojeg) se tjera struja zraka, ili zgrnute na hrpe u debelom sloju, ili se u okretnim bubnjevima prebacuju u kontaktu sa zrakom. Pri dubinskoj metodi mikroorganizmi se uzgajaju u dubokim posudama (zvanim fermentori) unutar tekućine koja se miješa uz provođenje zraka.

Fermentori u kojima se proizvodi biomasa kao izvor enzima u načelu se ne razlikuju od aparata upotrebljivanih za provedbu fermentacija u drugim granama biotehnologije, npr. od fermentora opisanog u članku *Antibiotici*, TE 1, str. 305. U istom

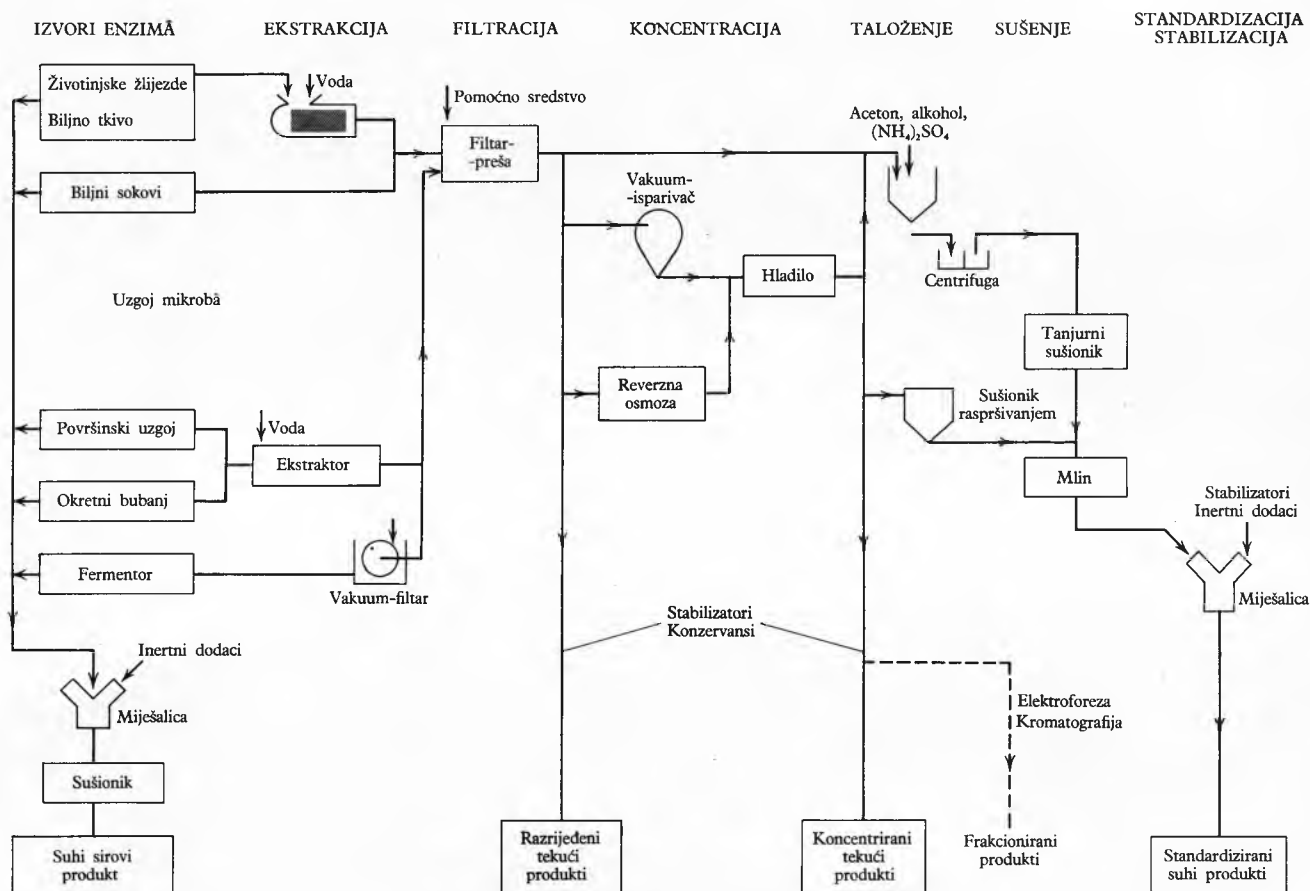
članku na istom mjestu prikazani su ukratko i postupci selekcije, čuvanja sojeva mikroorganizama, pripreme hranjivih podloga i inokuluma te problematika industrijske fermentacije, koja je u načelu ista u proizvodnji antibiotika i u proizvodnji enzima. Fermentacija se može danas provoditi i kontinuiranim postupkom, ali se još uvijek u industriji provodi mahom diskontinuirano (na šarže) jer je na taj način lakša kontrola vrlo osjetljivog procesa i manji je rizik ekonomskih gubitaka u slučaju da nastane infekcija kulture neželjenim mikroorganizmima.

Uvjeti koji pogoduju brzom rastu mikroorganizama ne moraju biti oni isti koji pogoduju obilnijoj proizvodnji enzima u njihovim stanicama. U novije vrijeme poznata je korisna uloga stvari koje, dodate kulturi, stimuliraju (indukcijom) proizvodnju enzima u stanicama mikroorganizama. Za tu se svrhu upotrebljavaju supstrati enzima, produkti enzimske djelatnosti, površinski aktivne tvari.

Suhi sirovi produkti. Preparati koji sadrže enzime u najmanje čistom stanju dobivaju se time što se sirovina, po potrebi usitnjena, izmiješa (ev. uz dodatak inertnih sastojaka za razrjeđenje radi podešavanja aktivnosti preparata) i osuši. Dovedena enzimi su se industrijski primjenjivali mahom u tom obliku, a u

ba prije toga dezintegriranjem osloboditi enzim iz stanica.) Filtrat, kojemu se po pravilu dodaju sredstva za stabilizaciju i konzerviranje enzima, predstavlja *razrijeđeni tekući enzimski produkt*. Takav produkt, koncentriran isparavanjem vode u vakuumu ili reverznom osmozom, daje *koncentrirani tekući enzimski produkt*. Tekući enzimski produkti upotrebljavaju se za raškrobljavanje u industriji tekstila i za bistrenje voćnih sokova.

Koncentrirani suhi enzimski produkti. Tekući enzimski produkt isparen do suha pod blagim uvjetima (po pravilu raspršivanjem u struji toplog zraka, v. *Sušenje*), ili iz njega taloženjem izlučeni, centrifugiranjem odvojeni pa osušeni čišći enzim, usitnjen i promiješan uz dodatak suhih stabilizatora i inertnih sastojaka za razrjeđenje, daje suhe standardizirane enzimске produkte. Iz koncentriranih otopina mogu se zasad uglavnom samo laboratorijskim specijalnim metodama, npr. ultrafiltracijom, elektroforetskim frakcioniranjem (v. članak *Elektrokinetičke operacije*, TE 4, str. 400) ili kromatografijom (v. *Kromatografija*), dobiti *frakcionirani produkti*, pa i čisti enzimi.



Sl. 12. Proizvodnja enzima i enzimskih preparata

nekim se proizvodnjama još uvijek u tom obliku upotrebljavaju. Danas su takvi suhi sirovi produkti također poluproizvodi iz kojih se dobivaju čišći enzimski preparati. Pored slada i sirila mogu se kao primjeri takvih preparata navesti sirovi papain, osušeni mliječni sok (lateks) iz nezrelog ploda tropske palme *Carica papaya*; sušene »pljesnive mekinje« dobivene površinskim uzgojem mikroorganizama i sušena biomasa dobivena dubinskim uzgojem.

Tekući enzimski produkti. Radi dobivanja čišćih enzimskih preparata, takvi sušeni međuprodukti ili (v. sl. 12) nesušeno usitnjeno životinjsko tkivo, biljno tkivo i površinske kulture mikroorganizama na vlažnom supstratu ekstrahiraju se vodom i otopina ekstrakta filtrira filtrom uz upotrebu pomoćnog sredstva (v. *Filtracija*). Biljni sokovi se izravno filtriraju pod tlakom, a prevrela komina s biomasom dobivenom dubinskom metodom prethodno se odvoji od biomase filtriranjem bubnjastim vakuum-filtrom. (Ako je posrijedi dobivanje intracelularnog enzima, tre-

Koncentrirani suhi enzimski produkti zahtijevaju mnogo pažnje u upotrebi (pomno doziranje, dovoljno miješanje itd.). Potrošači stoga vole preparate toliko razrijeđene inertnim materijalom da imaju aktivnost potrebnu za određenu primjenu. Priprema takvih preparata određene aktivnosti naziva se *standardizacijom* ili *formulacijom*.

Vrste industrijskih enzima i njihova primjena

Enzimi iz sirovina životinjskog i biljnog porijekla upotrebljavaju se odavno u razmjerno velikim količinama. Mnogi od njih upotrebljavat će se vjerojatno i u budućnosti, jer su zbog svojih specifičnih svojstava naročito pogodni za svrhe kojima služe, a predstavljaju često, u stvari, jeftine nusprođukte drugih proizvodnja. Ali zbog rastuće potražnje za tim enzimima sve se više osjeća da je njihova sirovinska baza preuska, te njihova proizvodnja postaje skuplja, pa je sve više stimulirana proizvodnja industrijskih enzima istih svojstava iz mikroorganizama, proizvod-

nja koja daje enzime u praktički neograničenim količinama i ima druge prednosti, koje su gore navedene (v. str. 341). Osim kao zamjena za enzime životinjskog i biljnog porijekla, industrijski enzimi iz mikroorganizama (mikrobni enzimi) već sada se upotrebljavaju za kataliziranje nekih procesa koji su se prije provodili bez pomoći enzima ili se uopće nisu provodili, a s razvojem »enzimskog inženjersva« njihova će uloga u tehnici postati sve veća i sve važnija.

Industrijski enzimi životinjskog porijekla i njihova zamjena mikrobnim enzimima. U najvećim se količinama proizvode industrijski enzimi preparati životinjskog porijekla iz gušterače (pankreas) svinje, goveda i ovce (*pankreatski preparati*) koji sadrže proteaze (enzime koji cijepaju bjelancevine) i lipaze (enzime koji cijepaju masti), uz amilaze (enzime koji cijepaju škrob). Za većinu svrha upotrebljavaju se siroviji preparati, za medicinske svrhe proizvodi se i čišća proteaza tripsin. Najstarija je industrijska primjena pankreatskih preparata za mekšanje sirove kože; za te svrhe se i danas pretežno upotrebljavaju takvi preparati, ali se već i zamjenjuju proteazama proizvedenim uz pomoć plijesni *Aspergillus flavus oryzae* i bakterije *Bacillus subtilis*. Pankreatski preparati propisuju se kao lijek pacijentima s pankreatskim smetnjama ili nakon operativnog uklanjanja pankreasa. I u toj primjeni mogli bi se ti preparati zamijeniti kombinacijom enzima iz mikroorganizama *B. subtilis*, *A. flavus oryzae* i *A. niger*. Pankreatski preparati sastojci su sredstava za uklanjanje tvrdokornih mrlja u čistiocima tekstila. Aktivnost takvih preparata obično se povećava dodatkom amilaze, proteaze i lipaze mikrobnog porijekla. Pankreatski preparati kao sredstva za namakanje rublja, patentirani već 1913, nisu se mogli održati kao sredstva za pranje jer ne podnose visoke temperature i pH-vrijednosti primijenjene u ciklu pranja.

»Animalna dijastaza«, pankreatski preparat s povećanim sadržajem α -amilaze, enzima koji hidrolizira škrob, upotrebljava se za raškrobljivanje i za pripremu preparata za škrobljenje u tekstilnoj industriji; za istu svrhu upotrebljavala se i amilaza iz slada, a danas se u pretežnoj mjeri za te svrhe upotrebljava amilaza iz *B. subtilis*, koja je toplinski stabilnija.

Lipaza (triacilglicerol-acilhidrolaza 3.1.1.3) koja se, osim iz pankreasa, dobiva i iz žlijezda slinovnica teleta, iz žlijezda jareta i s pomoću plijesni, upotrebljava se u sirarstvu, pa kao sastojak sredstava za poboljšanje probave, kao dodatak stočnoj hrani, u obradi otpadnih voda, i dr. Proteaze tripsin 3.4.21.4 i himotripsin 3.4.21.1 upotrebljavaju se u farmaceutskim preparatima (npr. sredstvima za poboljšanje probave), za mekšanje mesa, kao dodatak stočnoj hrani i hrani za živad i sl. Za slične svrhe upotrebljava se i pepsin 3.4.23.1/2. Pepsin iz želučane sluznice svinja upotrebljava se i za bistrenje piva. Pred mikrobnim proteazama ima u toj primjeni prednost što mu je pH-optimum nizak (1,8–2,2). Hijaluronoglukozidaza (hijaluronat-4-glikanohidrolaza 3.2.1.35/36) proizvodi se iz testisa (muške spolne žlijezde) goveda i upotrebljava se u medicini (v. str. 344).

Iz jetre i krvi životinja proizvode se preparati katalaze (hidrogen-peroksid:hidrogen-peroksid—oksidoreduktaze 1.11.1.6), enzima koji katalizira raspad vodik-peroksida na vodu i kisik, tj. njegovu istovremenu oksidaciju (dehidrogenaciju) na kisik i redukciju (dezoksigenaciju) na vodu. Katalaza se proizvodi također uz pomoć mikrobâ i upotrebljava se u prehrambenoj industriji (pivo, sir, hladna sterilizacija mlijeka), za bijeljenje tekstila i krzna, u industriji kože i gume (proizvodnja pjenaste gume), u farmaceutskoj industriji i industriji kozmetike.

Remin (3.4.23.4, himozin), proteolitski enzim sirila, preparata dobivenog ekstrakcijom iz četvrtog želuca (»sirišta«) mladih preživača (najviše teladi, a rjeđe jagnjadi i jaradi) koji se hrane samo mlijekom, upotrebljava se uvelike za grušanje mlijeka (»podsiravanje«) u proizvodnji sira. On hidrolizom pretvara kazein u parakazein, koji se u prisutnosti kalcija taloži u obliku elastične gruševine (koagulata). Tek u novije vrijeme dobiveni su industrijski enzimi mikrobnog porijekla (npr. iz *Endothia parasitica* i *Mucor pusillus*) koji mogu zamijeniti sirilo u proizvodnji sira a da mu ne kvare aromu.

Industrijski enzimi biljnog porijekla i njihova zamjena mikrobnim enzimima. Najvažniji enzimi koji se proizvode iz biljnih sirovina navedeni su u nastavku.

Amilaze iz žitarica najšire su upotrebljavani industrijski enzimi. Amilaze u sladu već se stoljećima upotrebljavaju u proizvodnji piva, a dugo se upotrebljavaju i u proizvodnji alkohola vrenjem iz škrobnih sirovina. U tim primjenama slada imaju važnu ulogu i intracelularna α -amilaza (1,4- α -D-glukan—glukanohidrolaza 3.2.1.1.), koja škrob hidrolizom prevodi u topljivi dekstrin, i ekstracelularna β -amilaza (1,4- α -D-glukan—maltohidrolaza 3.2.1.2.), koja dekstrin hidrolizira u maltozu, šećer koji podliježe alkoholnom vrenju djelovanjem enzima iz kvasčevih gljivica. Prevođenje škroba u otopinu može se izvesti i amilazom iz *B. subtilis*, analognom α -amilazi. (Manje pogodna je amilaza iz plijesni jer je toplinski manje stabilna.) Prevođenje dekstrina u šećer može se provesti amilo-1,6-glukozidazom (dekstrin-6- α -glukozidazom 3.2.1.33) iz plijesni *A. niger* ili *Rhizopus oryzae*. Taj enzim proizvodi glukozu umjesto maltoze, i to s boljim iskorištenjem dekstrina, pa je stoga iscrpак alkohola veći kad je komina pripremljena mikrobnim enzimom nego kad je pripremljena sladom. Mikrobnim je enzim osim toga otporniji prema infekciji bakterijama i prema niskom pH. U proizvodnji alkoholnih pića upotrebljava se mahom slad jer im daje poželjnu aromu.

Amilaze iz žitarica upotrebljavaju se u pekarstvu kao dodaci brašnu. U brašnu obično ima dosta β -amilaze, ali premalo α -amilaze da bi se dovoljno brzo razvijao CO₂ alkoholnim vrenjem. Stoga se ponekad brašnu u mlinu dodaje 0,25–0,5% α -amilaze u obliku mljevenog slada, da bi se oštećeni škrob u tijestu gotovo potpuno pretvorio u šećer. U modernoj pekarskoj praksi dodaje se tijestu α -amilaza iz *A. flavus oryzae* da bi se ubrzalo vrenje i da bi kruh dobio poželjna svojstva (kao: lijepu boju kore, elastičnu sredinu). Mikrobnim enzimski preparati pogodniji su nego slad kao dodaci tijestu jer se mogu proizvesti s velikom aktivnošću i bez proteaze, ili s predodređenim sadržajem proteaze, a manje su onečišćeni bakterijama nego slad.

Druge primjene enzima u kojima su mikrobnim amilazama zamijenile sladnu (kao i animalnu) jesu raškrobljivanje tekstila i priprema sredstva za škrobljenje tekstila. Za te svrhe upotrebljavaju se najčešće amilaze iz *B. subtilis* jer su otpornije prema povišenoj temperaturi i jeftinije se proizvode nego amilaze iz plijesni.

Industrijske proteaze biljnog porijekla: papain, bromelain i (u manjoj mjeri) ficin, upotrebljavaju se u prehrambenoj industriji za bistrenje hladnog piva i za mekšanje mesa, a u farmaceutskoj industriji kao sastojci sredstava za olakšanje probave. (Kad se pivo ohladi ispod određene temperature, ono se zamuti od izlučenih bjelancevina; dodate proteaze te bjelancevine razgrađuju i time pivo izbistre.) Papain se dobiva iz mliječnog soka plodova, lišća i debla tropske palme *Carica papaya*, a bromelain iz ploda i drugih dijelova tropske zeleni ananas (*Ananas sativus*, *A. comosus*, *Bromelia ananas*). Ficin, dobiven iz mliječnog soka smokve (*Ficus carica*), upotrebljava se za iste svrhe u znatno manjoj mjeri, vjerojatno zbog toga što jako djeluje na nativni protein i što je teško njime rukovati. Proteaze iz plijesni *A. flavus oryzae* i, u manjoj mjeri, iz bakterije *B. subtilis* upotrebljavaju se umjesto proteaza ili kao proteaze biljnog porijekla u svim njihovim primjenama, ali papain se danas još ipak najviše upotrebljava.

Lipoksigenaza (linoleat: oksigen—oksidoreduktaza 1.13.11.12, »lipoksidaza«), koja se dobiva iz brašna soje (*Glycine hispida*, *Soja hispida*), spada u oksigenaze: katalizira oksidaciju nezasićenih ulja na njihove peroksidge. Upotrebljava se za bijeljenje pšeničnog brašna. Iako mnogi enzimi iz plijesni jednako djeluju na prirodne pigmente u brašnu, oni dosad nisu mogli istisnuti biljnu lipoksidazu iz upotrebe.

Ureaza (urea—amidohidrolaza 3.5.1.5), enzim koji katalizira rastvaranje mokraćevine (uree, karbamida) na ugljik-dioksid i amonijak, obilno prisutna naročito u mahunarkama, dobiva se iz vrste graha *Canavalia ensiformis*, a služi u kliničkoj kemijskoj analizi pri određivanju sadržaja mokraćevine u krvi.

Drugi enzimi mikrobnog porijekla koji se industrijski proizvode navedeni su u nastavku.

β -Fruktofuranozidaza (β -D-fruktofuranozid—fruktohidrolaza 3.2.1.26, »invertaza«) iz pivarskog kvasca (gljivica *Saccharomyces cerevisiae* i *S. carlsbergensis*), enzim koji katalizira inverziju saharoze na glukozu i fruktozu, na tržištu je kao industrijski enzim za primjenu u proizvodnji bonbona i invertnog šećera. (Invertni šećer teže kristalizira nego obični, saharoza.)

»Pektinaze« (poligalakturonaza: poli-(1,4- α -poligalakturonid)—glukanohidrolaza, indeks 3.2.1.15; pektinesteraza: pektin—pektinohidrolaza, indeks 3.1.1.11; pektat-lijaza: poli-(1,4- α -D-galakturonid)—lijaza, indeks 4.2.99.3, »pektat-transeliminaza«) cijepaju pektine, polisaharide koji se nalaze u staničnim stijenkama i međustaničnim slojevima kopnenih biljaka, mogu tvoriti voluminozne gelove (hladetinaste mase), a sadrže kao glavne sastojke polimere D-galakturonske kiseline i njenog metilnog estera. Dobivaju se iz različitih vrsta plijesni rodova *Aspergillus* i *Penicillium* a upotrebljavaju se kao sredstva koja u industriji voćnih sokova olakšavaju bistrenje, filtraciju i koncentraciju sokova; omogućavaju također pripremu i skladištenje koncentriranih voćnih sokova na niskim temperaturama, njihov transport bez geliranja i razređivanje na svakom pogodnom mjestu i u svako vrijeme. Pektinaze povećavaju također iscrpak mošta u proizvodnji vina i ubrzavaju proces starenja. Upotrebljavaju se i pri obradi zelenog kavinog zrna da se ubrza skidanje želatinoznog omotača na kavinom plodu. (Prirodna fermentacija može pokvariti kvalitet kavinog zrna.)

Glukoze oksidaza (β -D-glukoza : oksigen—oksidoreduktaza 1.1.3.4) katalizira oksidaciju glukoze na glukonsku kiselinu i istovremeno vode na peroksid vodika H_2O_2 . Proizvodi se iz plijesni *A. niger* i *P. notatum*. Upotrebljava se u kemijskoj analizi za dokazivanje i određivanje glukoze (npr. za dijagnozu šećerne bolesti), a u prehrambenoj industriji za uklanjanje malih količina glukoze ili kisika, pri čemu treba da bude prisutna i katalaza koja rastvara nastali vodik-peroksid. Upotrebljava se, npr., za uklanjanje glukoze iz bjelanjka prije sušenja jaja (u proizvodnji jaja u prahu) i za uklanjanje malih količina kisika zaostalog u hermetički zatvorenim limenkama s namirnicama. (U limenku se umeće paketić sa glukozom, oksidazom i katalazom.)

Amilo-1, 6-glukozidaza (dekstrin—6- α -glukozidaza 3.2.1.33), iz *Aspergillus niger* i *Rhizopus oryzae* gotovo kvantitativno pretvara škrob u glukozu, te se upotrebljava u novije vrijeme u industrijskoj proizvodnji glukoze. Smjese te glukanolhidrolaze s amilazom iz *A. oryzae*, ili ta amilaza sama, upotrebljavaju se za proizvodnju različitih vrsti sirupa iz kukuruznog škroba, koja je proizvodnja u USA vrlo raširena. *Glukoze izomeraza* pretvara glukozu u fruktozu, koja je mnogo slada od nje. U Japanu, gdje je ponuda običnog šećera (saharoze) ograničena, izrađen je na toj osnovi postupak za proizvodnju slatkog sirupa koji može služiti kao zamjena za saharozu. Po tom postupku sad rade i neki proizvođači sirupa u USA.

Razvijanje proizvodnje proteolitičkih enzimskih preparata stabilnih na visokom pH u prisutnosti fosfata i drugih sastojaka detergenata i na temperaturi do 60 °C iz dubinske kulture selekcioniranih sojeva *B. subtilis* (1963/64) stvorilo je veliko tržište enzimskih dodataka detergentima i dalo poticaj jačanju industrije enzima uopće. Ta primjena enzima znatno je ograničena u najnovije vrijeme, kad se pokazalo da »enzimi« dodavani detergentima, u stvari većinom vrlo nečisti autolizati bakterija, mogu sadržati otrove i izazivati alergije. Reklama koja je pratila uvođenje »biološkog pranja« popularizirala je enzime, ali je s tim raširenije bilo nakon spomenutih otkrića o upotrijebljenim enzimima nepovjeranje izazvano prema enzimima uopće, što još danas u tehnički razvijenim zemljama otežava primjenu enzima u nekim industrijama.

Enzimi kao lijekovi. U medicini se enzimi u liječenju upotrebljavaju uglavnom na dva načina: ili se bolesniku daju (kroz usta ili injekcijama) enzimi koje tijelo i samo proizvodi, ali u nedovoljnoj količini, ili se upotrebljavaju za razgrađivanje tkiva, lučevina i sl. Tako sredstva za olakšanje probave sadrže enzime (amilaze, proteaze, lipaze i/ili celulaze) koji razgrađuju sastojke hrane; proteolitičkim enzimima se selektivno razgrađuje (digerira) nepoželjno mrtvo, nekrotično i uništeno tkivo sa rana, ozljeda, opekotina itd.; streptokinaza, streptodornaza, papain, bakterijalne amilaze i proteaze upotrebljavaju se u sredstvima protiv upala, streptokinaza i srodni enzimi također za rastvaranje ugrušaka u krvi i za sprečavanje stvaranja novih ugrušaka; streptodornaza rastvara dezoksiribonukleoprotein, koji uvjetuje viskoznost upalnog eksudata, te time smanjuje viskoznost gnojnog eksudata i olakšava njegovu resorpciju i drenažu; hijaluronidaza (budući da hidrolizira hijaluronsku kiselinu, koja čini normalnu barijeru za otopine uvedene u tkivo), ubrizgana istovremeno s lokalnim anestetikom, omogućuje njegovo brzo širenje u tkivu; penicilaza brzo razgrađuje u tijelu pacijenta sav penicilin koji je izazvao u njemu akutne alergične reakcije. Još bi se mogle navesti i druge primjene industrijskih enzima u medicini, od kojih su samo neke već uvedene u kliničku praksu, a druge su tek u stadiju ispitivanja.

Enzimi u prehrambenoj industriji. Kako se može razabrati iz prikaza primjene industrijskih enzima, većina njih upotrebljava se u proizvodnji namirnica. Međutim, enzimi u prehrambenoj tehnologiji imaju, pored te pozitivne uloge, i drugu, negativnu, te je u djelovanju prehrambenog tehnologa borba protiv enzima bar isto tako važna kao njihova primjena. Neki autohtoni enzimi, tj. enzimi koji se od prirode nalaze u namirnicama, imaju nepoželjno djelovanje na različite hranjive sastojke namirnice (npr. hidrolaze, askorbat-oksidaza), na pigmente i boju u cjelini (*o*-difenol-oksidaza, peroksidaza, klorofilaza), na teksturu (pektolitički enzimi), na okus i miris (proteaze i dr.). Stoga je u toku prerade namirnica često potrebno te enzime inaktivirati. Tipična je *toplinska inaktivacija* enzima kratkotrajnim intenzivnim zagrijavanjem mlijeka ili blanširanjem (parenjem, furenjem) pri konzerviranju voća, povrća, mesa, riba i mliječnih proizvoda. Blanširanje se obavlja prije onih operacija u kojima bi se (uslijed umjerenog povišenja temperature, intenzivnog dodira sa zrakom, itd.) pojačalo djelovanje enzima. Općenito uzevši, enzimi su toplinski znatno manje postojani nego mikroorganizmi; stoga pri klasičnim postupcima sterilizacije toplinom nije potrebno posebno voditi računa o njima. Ali kad se primjenjuje sterilizacija kratkotrajnim zagrijavanjem na visoke temperature (postupcima HTST—High Temperature Short Time) može se dogoditi da se uništavaju mikroorganizmi normalne toplinske otpornosti, ali ne i štetni enzimi kojima za denaturaciju treba neko vrijeme. Pri konzerviranju namirnica smržavanjem ne može se hlađenje do ispod ledišta izvršiti tako brzo da se praktički trenutno prelazi preko širokog temperaturnog područja u kojem su enzimi još aktivni (što bi zapravo bilo potrebno da se spriječi njihova djelatnost); stoga se namirnice obično podvrgavaju blanširanju i prije samog hlađenja.

Osim toplinskom obradom (ili uz nju) enzimi se mogu inaktivirati također *kemijski* ili *ionizirajućim zračenjem*. Za prvo, primjeri su obrada namirnica sumpor-dioksidom ili sulfinitom otopenom prije sušenja ili radi čuvanja do finalizacije i dr., a za druge, »radurizacija«, ozračivanje mesa jestivih školjaka i mekušaca manjim dozama zračenja pri njihovom konzerviranju grijanjem, da bi se spriječilo tamnjenje i gubitak kvaliteta uslijed djelovanja enzima *o*-difenol—oksidaze (»tirozinaze«).

Na kraju treba primijetiti da se u prehrambenoj tehnologiji enzimi ne samo ili dodaju ili uništavaju, nego da ima i postupaka koji idu za tim da se nativni enzimi u potrebnoj količini sačuvaju. Kao primjer može se navesti kontrola djelovanja pektolitičkih enzima u proizvodnji koncentrata rajčice. Da bi taj koncentrat imao potrebnu konzistenciju, u njemu mora biti sačuvana neka količina nativnih pektinskih tvari, ali pregusti koncentrat uslijed prevelikog sadržaja pektinskih tvari lako zagori u isparivaču, te produkt potamni i dobije gorak okus. Ako prerađena sorta rajčica sadrži malo pektina, grubo usitnjeni plodovi griju se parom da bi se inaktivirali enzimi koji razgrađuju pektine, pa se i od takvih plodova dobije gust i sjajan koncentrat. Sorte rajčice koje imaju u tkivu previše pektina prerađuju se hladnom ekstrakcijom i pasiranjem; u tim uvjetima prisutni enzimi u određenoj mjeri razgrađuju pektine, te oni u naknadnoj toplinskoj obradi ne prave teškoća.

Enzimsko inženjerstvo

Kako je već rečeno, imobilizacijom enzima (v. str. 339) stvorena je mogućnost da se enzimi, koji su se dosad u industriji upotrebljavali uglavnom kao »potrošni materijal«, upotrijebe kao katalizatori u modernoj procesnoj tehnici. Dio procesnog (ili kemijskog) inženjerstva koje se osniva na upotrebi (imobiliziranih) enzima kao katalizatora u pogodnim reaktorima nazvan je enzimskim inženjerstvom. U enzimskom inženjerstvu uključena je, osim konstrukcije i proračuna reaktora s enzimskim katalizatorima, također tehnika proizvodnje tih katalizatora, počevši od izbora i selekcije pogodnog organizma-proizvođača, preko razmnožavanja tog organizma do izdvajanja, prečišćavanja i imobilizacije enzima. Osim reaktora, enzimski inženjer konstruira, ako je riječ o šaržnom procesu, aparaturu za rekuperaciju enzima radi njegove ponovne upotrebe, a s obzirom na otpore koji se suprotstavljaju uvođenju enzima u procesnu tehniku, danas je jedna od važnih zadaća enzimskog inženjera da u praksi ostvari proces u enzimskim reaktorima i demonstrira ekonomsku prednost enzimске tehnolo-

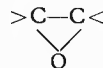
logije pred klasičnom kemijskom. U tom poslu enzimsko inženjersvo koristi se rezultatima danas izvanredno intenzivnog istraživačkog rada na selekciji organizama-proizvođača enzima, na izolaciji enzima, njihovu prečišćavanju i imobilizaciji u oblicima pogodnim za ekonomičnu upotrebu u reaktorima. Enzimsko inženjersvo moći će se koristiti svim tipovima reaktora poznatim u kemijskom inženjersvu, kao miješalicama, punjenim kolonama, kolonama s fluidiziranim slojem, cijevnim reaktorima (v. *Reaktorska tehnika*). Za rekuperaciju suspendiranog katalizatora na izlazu iz miješalice radi njegove recirkulacije predviđa se najčešće ultrafiltracija (v. i *Membrane*).

Enzimsko inženjersvo nalazi se danas tek na početku svog razvoja. Do 1973 bila su, prema literaturi, u pogonu samo dva industrijska procesa s imobiliziranim katalizatorima. U USA i Vel. Britaniji upotrijebljena je na celulozi imobilizirana penicilin-amidaza (penicilin—amidohidrolaza 3.5.1.11) da se od benzil-penicilina otcijepi acilna grupa; time dobivena 6-amino-penicilinska kiselina sirovina je za proizvodnju mnogih drugih penicilina. Više se saznalo o japanskom postrojenju za kontinuirano razdvajanje acetil-DL-aminokiselina (racemata metionina, alana, triptofana, valina i dr.) s pomoću aminoacilaze (N-acilamino-

Enzyme physics (prijevod s ruskog), New York 1969. — *W. P. Jencks*, Catalysis in chemistry and enzymology, New York 1969. — *G. J. Hajny, P. T. Reese*, Cellulases and their application, Washington 1969. — *A. Williams*, Introduction to the chemistry of enzyme action, London 1969. — *D. Desmuelle, H. Neurath, M. Olesen*, eds., Structure-function relationships of proteolytic enzymes, Munksgaard, Denmark 1970. — *D. Perlman*, ed., Advances in applied microbiology, vol. 13, New York 1970. — *D. H. Rubin*, Enzymes (industrial) — Technology assessment series, Springfield, Va 1971. — *W. T. Faith, C. E. Newbeck, E. T. Reese*, Production and application of enzymes, u djelu: *T. K. Ghose, A. Fichter*, eds., Advances in biochemical engineering, vol. 1, Berlin-Heidelberg-New York 1971. — *A. D. B. Malcolm*, Enzymes. An introduction to biological catalysis, London 1971. — *J. Brisou*, Techniques d'enzymologie bactérienne, Paris 1971. — *E. J. Beckhorn*, Enzymes, industrial production, u djelu: Encyclopedia of science and technology, vol. 5, New York 1971. — *T. M. S. Chang*, Artificial cells, Springfield, Ill. 1972. — *L. B. Wingard, Jr.*, Enzyme engineering, u djelu: *T. K. Ghose, A. Fichter, N. Blakebrough*, eds., Advances in biochemical engineering, vol. 2, Berlin-Heidelberg-New York 1972. — *L. B. Wingard, Jr.*, ed., Enzyme engineering, New York 1972. — *H. Gutfreund*, Enzymes: Physical principles, New York-Chichester 1972. — *K. M. Plowman*, Enzyme kinetics, New York 1972. — *K. J. Laidler, P. S. Bunting*, The chemical kinetics of enzyme action, Oxford 1973. — *E. Zeffren*, The study of enzyme mechanisms, New York-Chichester 1973. — *M. R. Bender, L. J. Brubacher*, Catalysis and enzyme action, New York 1973. — Enzyme nomenclature. Recommendations (1972) of the Commission on Biochemical Nomenclature on the nomenclature and classification of enzymes, together with the units and the symbols of enzyme kinetics. — Enciklopedijska i serijska djela o enzimima: — *J. B. Sumner, K. Myrback*, eds., The enzymes. Chemistry and mechanism of action, 2 vols, New York 1950/51. — *P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrback*, eds., The enzymes, 8 vols., New York 1959/71. — *F. D. Boyer*, ed., The enzymes, 8 vols. New York 1970/73. — *S. P. Colowick, N. O. Kaplan*, Methods in enzymology, vol. 1—32 (37 svezaka), New York 1955/74 (nastavlja se). — *F. F. Nord*, ed., Advances in enzymology and related subjects of biochemistry, vol. 4—34, New York 1944/71. — *A. Meister*, ed., Advances in enzymology, vol. 35—39, New York 1971/73 (nastavlja se). — *Hoppe-Seyler/Thierfelder*, Handbuch der physiologischen und pathologischen Analyse, Band VI (3 sveska), Berlin 1964. — *R. Weidenhagen*, Ergebnisse der Enzymforschung, Leipzig 1954.

M. Bošković R. Podhorsky

EPOKSIDI (epoksi-spojivi, epoksiderivati, oksirani), ciklički (unutrašnji) eteri koji u svojim molekulama sadrže jedan ili više heterocikličkih tročlanih oksidnih (oksidanskih) prstena:



(1)

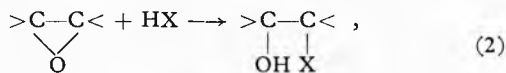
U epoksidi u širem smislu ubrajaju se ponekad i spojevi koji sadrže heterocikličke oksidne prstene sa više od 3 člana. Tako se npr. tetrahidrofuran $CH_2CH_2CH_2CH_2O$ naziva također 1,4-epoksidbutanom.

Zbog velike reaktivnosti oksiranskog prstena, epoksidi — pored toga što se kao konačni produkti upotrebljavaju za mnoge vrlo različite svrhe — predstavljaju međuprodukte za dobivanje bezbrojnih industrijskih proizvoda: plastičnih masa, sintetskih vlakana, premaznih sredstava, otapala, omeškivača, maziva, ljejkova, ljepila, detergenata, eksplozivâ i drugih tvari o kojima je riječ na drugim mjestima u ovoj enciklopediji. U ovom članku bit će od velikog broja danas poznatih epoksida opisani samo tehnički najvažniji: etilenoksid, propilenoksid, stirenoksid, tehnički važni epoksidirani esteri masnih kiselina i smjese tih estera kakve se dobivaju epoksidacijom nezasićenih masnih ulja.

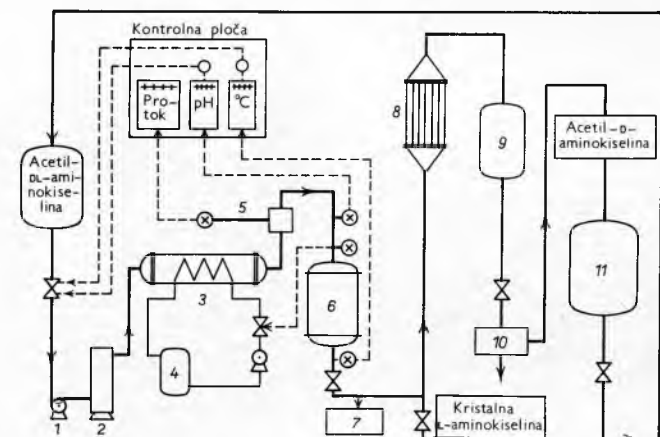
Prvi epoksid, etilenoksid, pripremio je francuski kemičar C. A. Wurtz (1859) reakcijom etilenklorhidrina s kalijumskom lužinom. Opsežnije sinteze epoksida iz olefinâ s pomoću peroksidbenzojeve kiseline objavio je N. Perileschajev (1909). Još dugo nakon toga, te i analogne sinteze upotrebljavale su se samo u preparativnoj i analitičkoj kemiji. Zanimanje industrije za tu skupinu spojeva uspjeli su pobuditi tek D. Swern i suradnici svojim radovima krajem četrdesetih godina.

Svojstva epoksida. Epoksidi su općenito tekućine s vonjem etera. Oksiranski prsten u njihovim molekulama povisuje im vrelišta u usporedbi s vrelištima odgovarajućih im etera i ugljikovodika. Iz istog razloga je i topljivost epoksida u vodi i polarnim otapalima veća.

Najznačajnije kemijsko svojstvo epoksida jest veliki afinitet oksiranskog prstena prema spojevima s pokretljivim atomom vodika u molekuli. Pri tome se općenito otvara prsten na jako polarnoj vezi između atoma ugljika i kisika. Ta se reakcija može prikazati shemom



gdje HX može biti voda, kiselina, neki alkohol, amin itd. Mehanizam ovih reakcija je ionski, bez obzira na to da li se radi o neutralnoj, kiseloj ili baznoj sredini (iznimku pri tome možda čine jedino reakcije katalitičke hidrogenacije). Reakcije (2) obično se obavljaju u polarnim otapalima (neke se u odsutnosti otapala uopće ne odvijaju).



Sl. 13. Tehnološka shema postupka za dobivanje fiziološki aktivne aminokiseline iz racemata. 1 Pumpa, 2 filter, 3 izmjenjivač topline, 4 tank za toplu vodu, 5 mjerilo protoka, 6 enzimski reaktor, 7 automatski registrator reakcije, 8 ispravljač, 9 kristalizator, 10 separator, 11 posuda za racemizaciju

kiseline—amidohidrolaze 3.5.1.14) imobilizirane na dietilamino-etil-Sephadexu radi proizvodnje njihovih fizioloških aktivnih L-oblika. Sl. 11 pokazuje tehnološku shemu tog postrojenja, kojemu je kapacitet 715 kg L-metionina na dan.

LIT.: V. Henri, Lois générales de l'action des diastases, Paris 1903. — H. Colin, H. Belval, G. Legrand, Oxydases et déshydratases, Paris 1947. — J. H. Northrup, M. Kunitz, H. M. Herriott, Crystalline enzymes, New York 1948. — J. T. Edsall, ed., Enzymes and enzyme systems, Cambridge, Mass. 1951. — F. Jayle, Les biocatalyseurs, 2 vols., Lons-le-Saunier 1952. — K. Myrback, Enzymatische Katalyse. Einführung in die Enzymchemie, Berlin-New York 1953. — J. B. Sumner, G. F. Somers, Chemistry and methods of enzymes, New York 1953. — O. Hoffmann-Ostenhof, Enzymologie, Wien 1954. — W. D. McElroy, B. Glass, eds., A symposium on the mechanism of enzyme action, Oxford 1954. — O. H. Gaebler, ed., Enzymes: units of biological structure and function (Henry Ford Hospital international symposium), New York 1956. — A. H. Mehler, Introduction to enzymology, New York 1957. — J. B. Neilands, P. K. Stumpf, Outlines of enzyme chemistry, New York 1958. — K. Ichihara, ed., Proceedings of the international symposium on enzyme chemistry, Tokyo and Kyoto 1957, New York 1958. — R. Ammon, W. Dirscherl, Fermente, Hormone, Vitamine und die Beziehungen dieser Wirkstoffe zueinander, Stuttgart 1959. — F. Haurowitz, Progress in biochemistry since 1949, Basel-New York 1959. — H. W. Schultz, Food enzymes, Westport, Conn. 1960. — D. Shugar, Enzymes and isoenzymes, New York 1960. — O. Hayaishi, Oxygenases, New York 1962. — J. L. Webb, Enzyme and metabolic inhibitors, 3 vols., New York 1963/66. — M. Privat de Garilhe, Les nucléases, Paris 1964. — M. Dixon, E. C. Webb, Enzymes, New York 1964. — P. Boivin et al., Enzymologie, Paris 1964. — A. E. Браунштейн, ред., Ферменты, Москва 1964. — B. A. Яколев, Кинетика ферментативного катализа, Москва 1965. — H. V. Bergmeyer, Methods in enzymatic analysis, New York 1965. — J. B. S. Haldane, The enzymes, Cambridge, Mass. 1965. — G. I. de Beze, Enzymes, industrial, u djelu: Kirk-Othmer, Encyclopedia of chemical technology, vol. 8, New York 1965. — G. Reed, Enzymes in food processing, New York 1966. — G. C. Guilbault, Enzymatic methods in analysis, New York 1966. — H. J. Pepler, ed., Microbial technology, New York 1967. — B. R. Baker, Design of active site directed irreversible enzyme inhibitors. Organic chemistry of the enzymatic active site, New York 1967. — H. Gutfreund, An introduction to the study of enzymes, New York 1967. — S. Bernhard, The structure and function of enzymes, New York 1968. — E. Kwanne, A. Pihl, The regulation of enzymatic activity and allosteric interactions, New York 1968. — T. E. Barman, Enzyme handbook, 2 vols., Berlin-Heidelberg-New York 1969. — M. V. Volkenshtein,