

ENZIMSKA KINETIKA

“ Mnoga tela... imaju osobinu da prema drugim telima ispoljavaju dejstvo koje veoma različito od hemijskog afiniteta...

Posredstvom ovog dejstva ona prouzrokuju razaranja u (drugim) telima i stvaraju nova jedinjenja u čiji sastav sama ne stupaju. Ova nova, do sada nepoznata sila zajednička je i za organsku i za neorgansku prirodu...

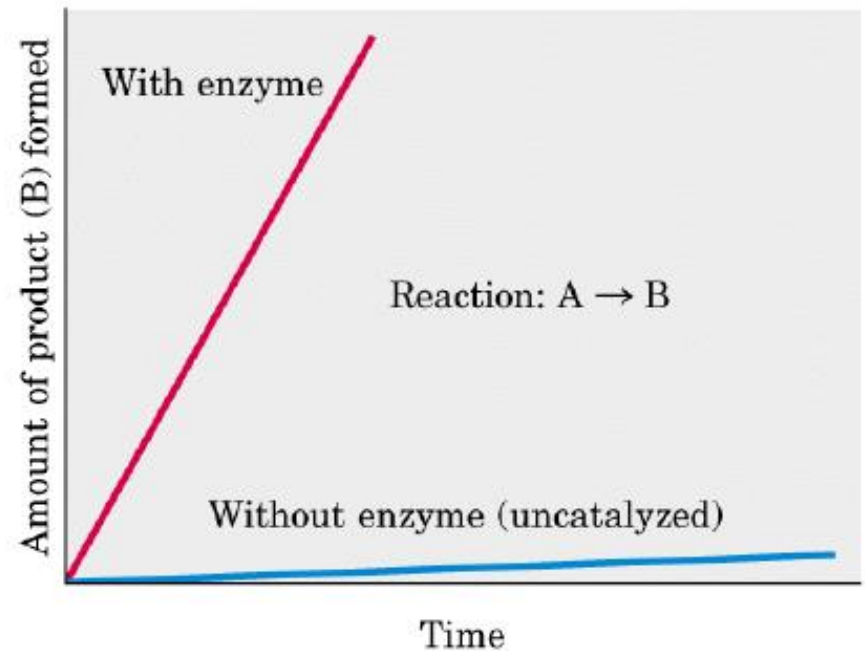
Nazvaću..ovu silu katalitičkom silom.

Takođe, nazvaću katalizom razlaganje tela posredstvom ove sile.

(J.J.Berzelius, Edinburgh New Philosophical Journal, XXI, 233, 1836)

- Definicija po UPAC-u iz 1981. :
“Katalizator je supstanca koja dovodi do ubrzanja hemijske reakcije ali tako da ukupna promena standardne Gibsove energije (ukupne reakcije) ostaje nepromenjena.”

- **ENZIMI**- proteini koji deluju kao katalizatori
 - Ribozimi- RNK molekuli sa katalitičkom funkcijom
 - ubrzavaju hemijske reakcije u biološkim sistemima
- BIOKATALIZATORI-**



Enzimi- osobine

- **Visoka *specifičnost* prema reakciji.**
- **Aktivnost enzima se može *regulisati*.**
- ✓ **Supstrat**
- ✓ **Dostupnost enzima (ekspresija, lokalizacija)**
- ✓ **Reverzibilna kovalentna modifikacija**
- ✓ **Alosterna kontrola (drugi protein ili kofaktori)**

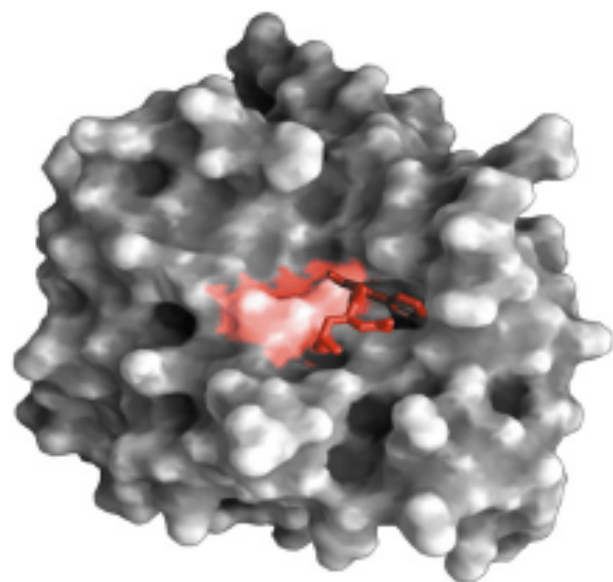
- Specifičnost enzimске katalize
 - specifičnost se ogleda u odnosu na
 - **tip reakcije** koju katališu
 - **supstrat** -među mnogim molekulima “biraju” samo određeni (apsolutna i široka)
 - **produkt** -od suptrata nastaje samo jedan proizvod (nema sporednih proizvoda)

- specifičnost i brzina reakcija katalisanih enzimima je rezultat
 - jedinstvene sekvence aminokiselina koja omogućava formiranje trodimenzionalne strukture enzimskog molekula

Specifičnost enzima

- Enzimi su specifični što znači da deluju na tačno određene supstrate u tačno određenim reakcijama
- specifičnost može biti:
- **Apsolutna** (samo na jedno jedinjenje): npr. **ureaza** na ureu, **arginaza** na arginin
- **Relativna** ili grupna (na grupu jedinjenja slične strukture): npr. **lipaze** hidrolizuju estarsku vezu u lipidima između svih alkohola i masnih kiselina, a najefikasniji su ako se radi o estrima glicerola i masne kiseline.

Aktivno mesto (katalitičko, vezujuće)



- deo enzimskog molekula (udubljenje, žljeb) gde se vezuje supstrat i tako formira enzim-supstrat kompleks
- mesto vezivanja supstrata određuje specifičnost prema supstratu
- takođe i deo molekula enzima gde se odvija reakcija

Specifičnost enzima i aktivni centar

1. Aktivno mesto enzima je malo u poređenju sa celom enzimskom molekulom
 - Veličina enzima i supstrata
 - Enzim je obično veći od supstrata izuzev:
 - amilaze, DNK polimeraze, proteaze

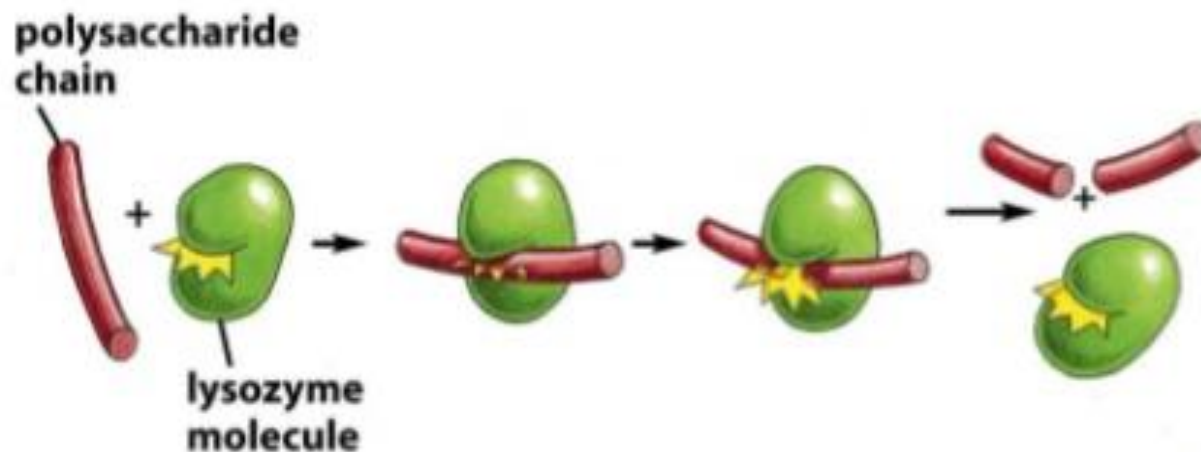
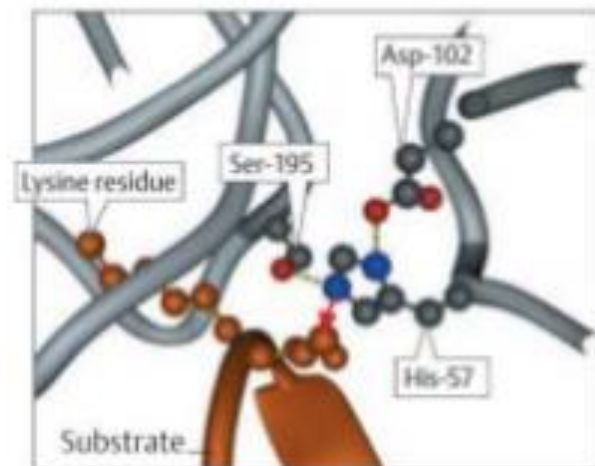


Figure 1-7b Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Specifičnost enzima i aktivni centar

2. Aktivno mesto je trodimenzionalne strukture jer je protein tercijerne strukture
3. Veze aktivnog centra i enzima su nekovalentne. Vodonične veze, Van der Valsove, elektrostatske i hidrofobične.
4. Lokacija aktivnog mesta
Aktivno mesto je obično u procepu tj šupljini.
Aktivni centar je hidrofoban.

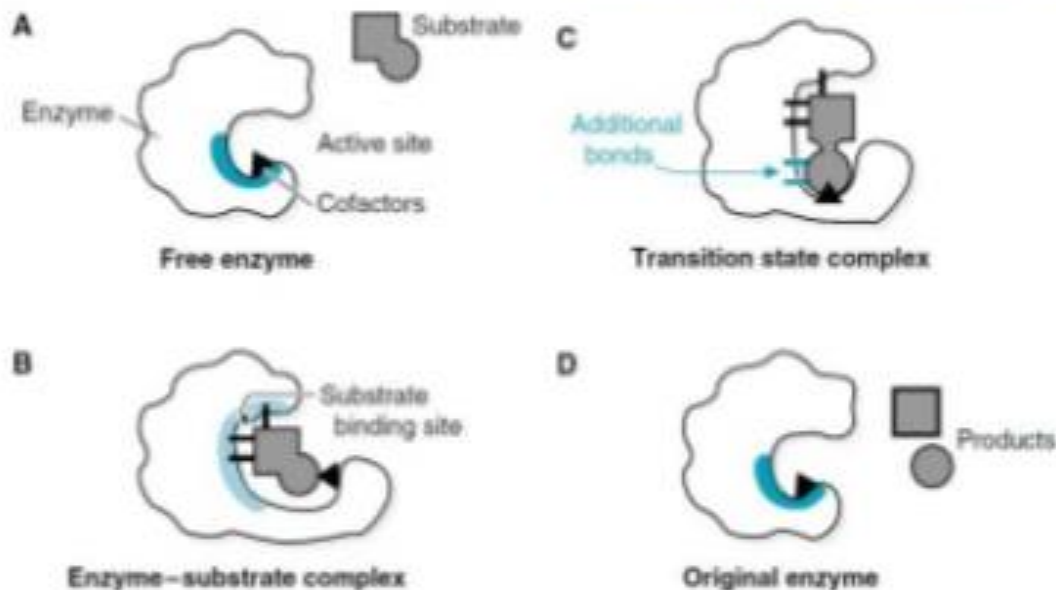


2. Trypsin: active center

Opšte karakteristike aktivnog mesta enzima

Enzim sadrži aktivno katalitičko mesto, sa regionom gde se vezuje supstrat. Aktivno mesto može da sadrži i kofaktore, neproteinska jedinjenja koja asistiraju u katalizi.

Funkcionalne grupe aminokiselinskih ostataka i kofaktori participiraju u stvaranju tranzicionog kompleksa i taj kompleks je stabilizovan dodatnim nekovalentnim vezama sa enzimom



Supstrat stvara veze sa aminokiselinama na mestu za vezivanje supstrata u aktivnom mestu enzima. Vezivanje supstrata indukuje konformacione promene u aktivnom mestu.

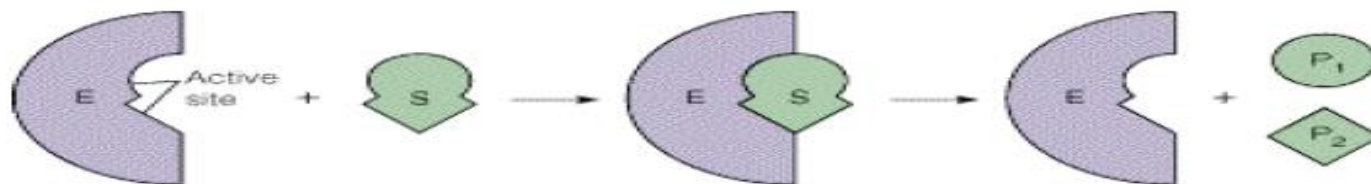
Prodot reakcije disocira i enzim se vraća u originalnu konformaciju

Dva modela formiranja enzim-supstrat kompleksa

- model “ključa i brave”
 - aminokiselinski ostaci formiraju komplementarnu trodimenzionalnu strukturu koja “prepoznaje” supstrat
- model indukovano podražavanja
 - vodonične veze, hidrofobne i elektrostatske interakcije povezuju supstrat i enzim i vode daljim konformacionim promjenama i enzima i supstrata

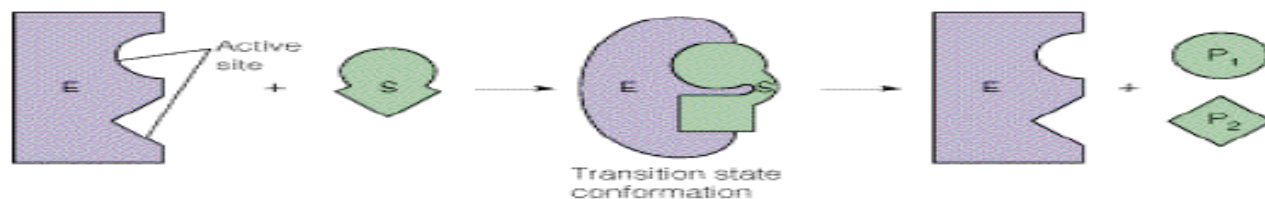
model “ključ-brava”

komplementarnost između supstrata i aktivnog mesta



(a) Lock-and-key model

- model indukovanog prilagodjavanja
 - promena konformacije enzima i supstrata
 - vezivanje supstrata indukuje konformacione promene enzima koje omogućavaju nove interakcije molekula supstrata sa funkcionalnim grupama enzima



(b) Induced fit model

Hemijska priroda enzima

- proteini
- proteini + kofaktor
 - kofaktor
 - metalni joni
 - prostetična grupa (najčešće trajno vezana za enzim)
 - koenzim (povezan sa enzimom samo tokom katalize)

apoenzim (proteinski deo enzima) + koenzim =
holoenzim

- U katalizi učestvuju funkcionalne grupe aktivnog mesta koje potiču od aminokiselinskih ostataka polipeptidnog lanca ili/i kofaktora (koenzima, metalnih jona)

Mnogi mikroelementi (metalni joni) su kofaktori enzima

- omogućavaju vezivanje supstrata ili koenzima za enzim (deluju kao elektrofil i tako stabilizuju anjonsku formu prelaznog stanja ili vezuju anjonske supstrate)
- donori su elektrona u oksido-redukcionim reakcijama

table 8–1

Some Inorganic Elements That Serve as Cofactors for Enzymes

Cu^{2+}

Cytochrome oxidase

Fe^{2+} or Fe^{3+}

Cytochrome oxidase, catalase, peroxidase

K^{+}

Pyruvate kinase

Mg^{2+}

Hexokinase, glucose 6-phosphatase, pyruvate kinase

Mn^{2+}

Arginase, ribonucleotide reductase

Mo

Dinitrogenase

Ni^{2+}

Urease

Se

Glutathione peroxidase

Zn^{2+}

Carbonic anhydrase, alcohol dehydrogenase,
carboxypeptidases A and B

Koenzimi

- organski molekul (neproteinske prirode) koji obezbeđuju funkcionalne grupe za enzimsku katalizu
- kod čoveka se često sintetišu od vitamina

Dve osnovne klase koenzima

- koenzimi koji
 - učestvuju u reakcijama prenosa grupa
 - jednim delom se čvrsto vezuju za supstrat (aktivirajući ga za prenos neke grupe, dodatak vode i dr.).
 - drugim delom se čvrsto vezuju za enzim (ako ostaju trajno vezani zovu se prostetična grupa)
 - biotin, tiamin pirofosfat, koenzim A

- u oksido-redukcionim reakcijama
 - sadrže specifične funkcionalne grupe za prenos elektrona (u formi hidridnog jona, atoma vodonika ili kiseonika)
 - ne vezuju se kovalentno za supstrat i posebnim delom se vezuju za enzim
 - nikotinamid adenin dinukleotid (NAD⁺), flavin adenin dinukleotid (FAD)

Koenzimske forme vitamina

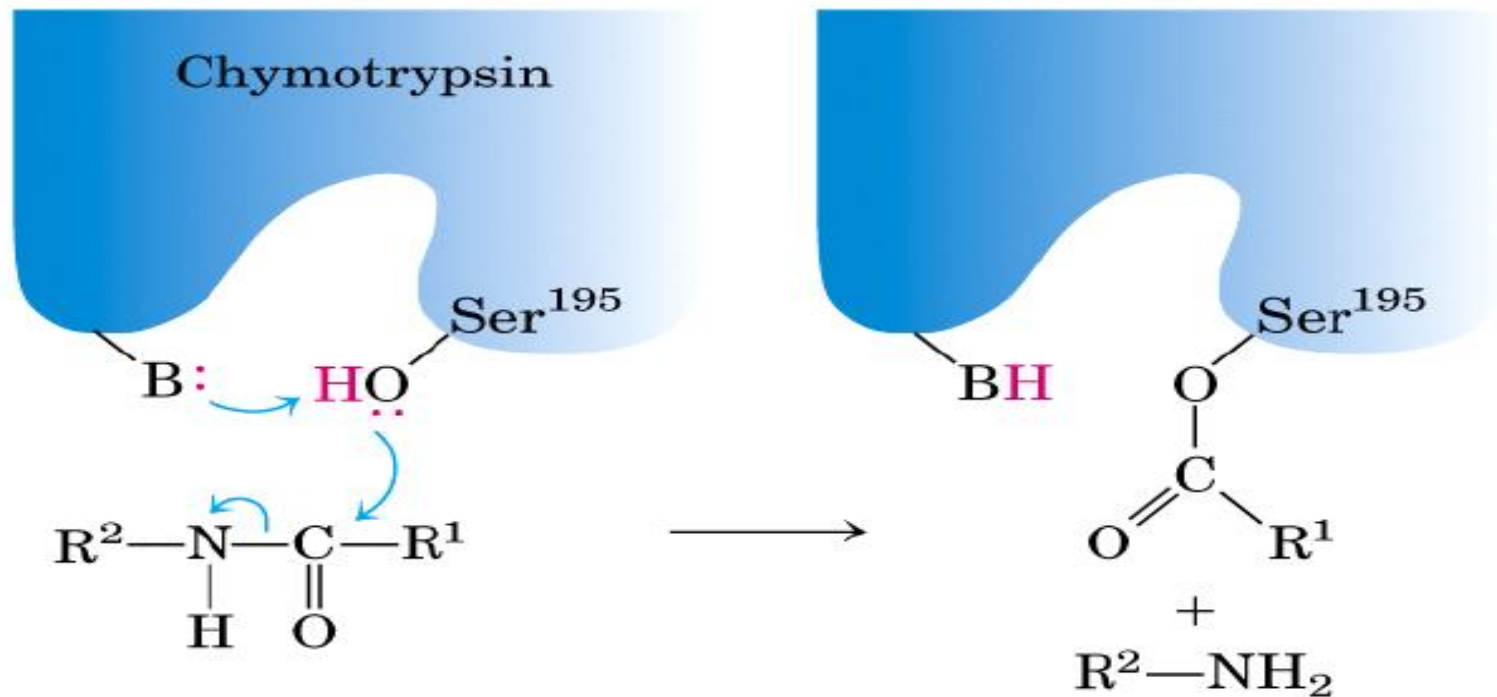
Some Coenzymes That Serve as Transient Carriers of Specific Atoms or Functional Groups*

Coenzyme	Examples of chemical groups transferred	Dietary precursor in mammals
Biocytin	CO ₂	Biotin
Coenzyme A	Acyl groups	Pantothenic acid and other compounds
5'-Deoxyadenosylcobalamin (coenzyme B ₁₂)	H atoms and alkyl groups	Vitamin B ₁₂
Flavin adenine dinucleotide	Electrons	Riboflavin (vitamin B ₂)
Lipoate	Electrons and acyl groups	Not required in diet
Nicotinamide adenine dinucleotide	Hydride ion (: H ⁻)	Nicotinic acid (niacin)
Pyridoxal phosphate	Amino groups	Pyridoxine (vitamin B ₆)
Tetrahydrofolate	One-carbon groups	Folate
Thiamine pyrophosphate	Aldehydes	Thiamine (vitamin B ₁)

Mehanizmi enzimske katalize uključuju

- acido-baznu katalizu
- formiranje kovalentnih intermedijera
- stabilizaciju prelaznog stanja
- blizina i orijentacija

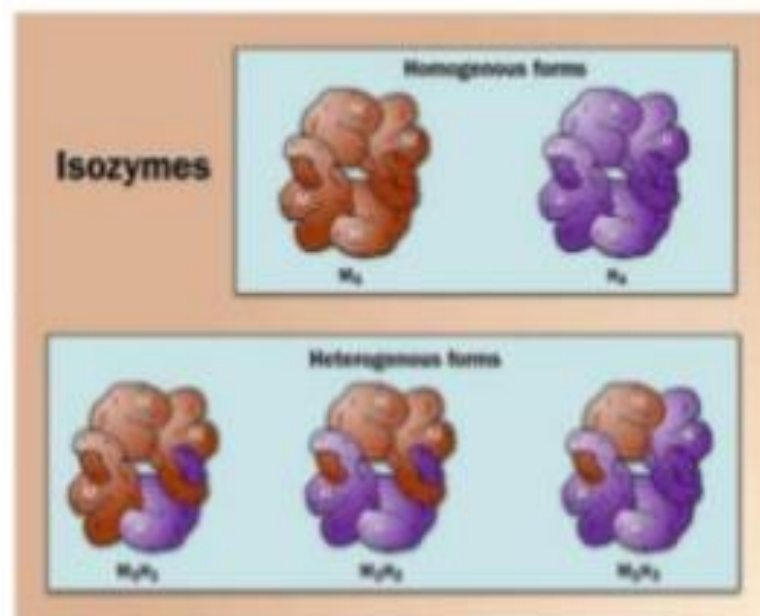
Primjer: katalitički mehanizmi himotripsina



Struktura enzima kao proteina

Tipovi proteinske strukture enzima

- Kvarternarna struktura
- Katalitička aktivnost enzima tj fiziološka aktivnost enzimske molekule vezana je za terciarnu odnosno kvarternarnu strukturu
- Kvarternarna struktura se sastoji iz subjedinica
- Homogene forme
 - Kopije istih polipeptidnih lanaca
- Heterogene forme
 - Različiti polipeptidni lanci



MULTIENZIMSKI SISTEMI

- ✓ Katalitička aktivnost enzima u ćelijama nije samostalna, oni su međusobno povezani u tkz. **ENZIMSKE SISTEME.**
- ✓ Funkcionalno povezivanje se dešava preko: metabolita, koenzima i strukturno (multienzimski kompleksi).
 - **Piruvat dehidrogenazni kompleks (ima 3 enzima)**
 - **Sinteza masnih kiselina- multikatalitički protein (ima 7 enzima).**
- ✓ **Dezmoenzimi** – spajanje enzimskih sistema sa ćelijskim organelama.
- ✓ Veći broj enzima i koenzima, katališe reakcije u nizu.

Klasifikacija enzima

(Enzyme Commission –EC)

International Classification of Enzymes*

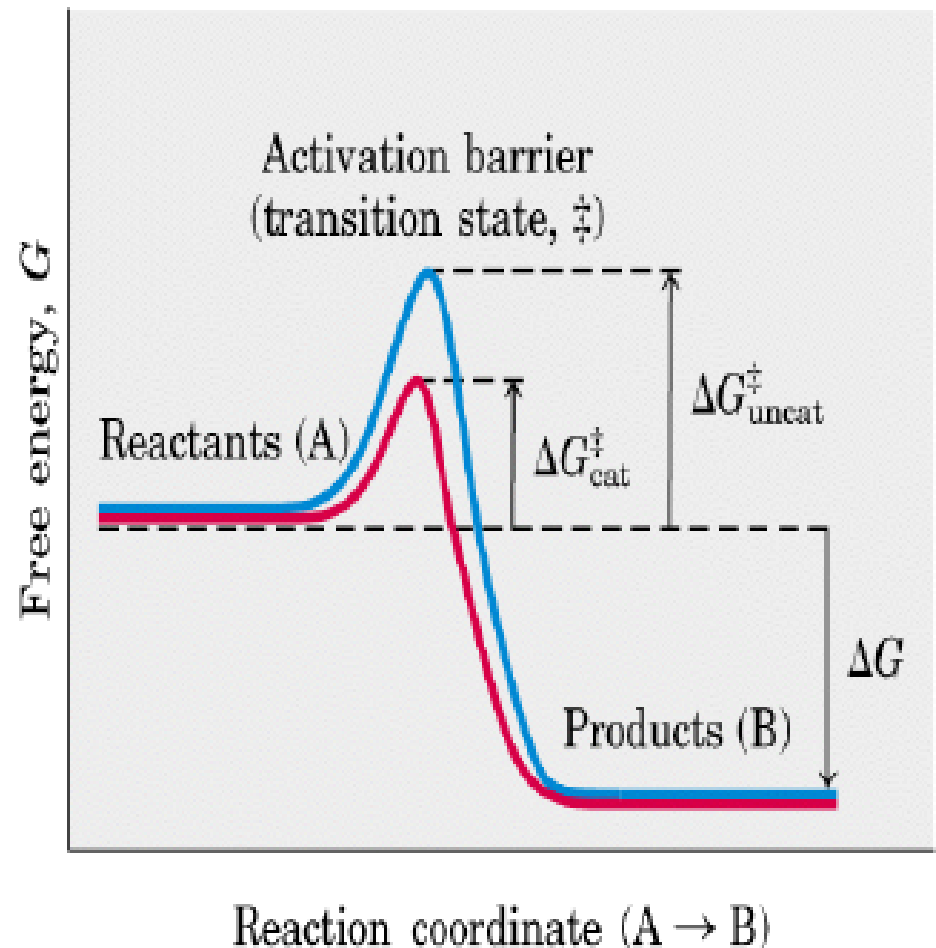
No.	Class	Type of reaction catalyzed
1	Oxidoreductases	Transfer of electrons (hydride ions or H atoms)
2	Transferases	Group-transfer reactions
3	Hydrolases	Hydrolysis reactions (transfer of functional groups to water)
4	Lyases	Addition of groups to double bonds, or formation of double bonds by removal of groups
5	Isomerases	Transfer of groups within molecules to yield isomeric forms
6	Ligases	Formation of C—C, C—S, C—O, and C—N bonds by condensation reactions coupled to ATP cleavage

Primer: alkohol dehidrogenaza

- Trivijalno ime: alkohol dehidrogenaza
- Sistemsko ime: alkohol:NAD⁺ oksidoreduktaza
- EC 1.1.1.1.
 - Klasa: oksidoreduktaza
 - Poklasa: oksidacija hidroksilne grupe
 - Podpodklasa: NAD⁺ kao koenzim
 - Redni broj u podpodklasi: prvi na listi u podpodklasi

KINETIKA ENZIMSKIH REAKCIJA

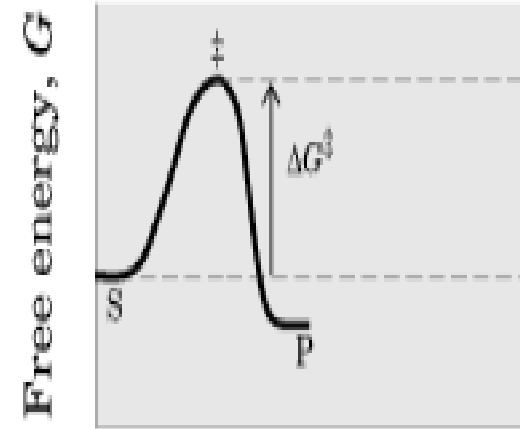
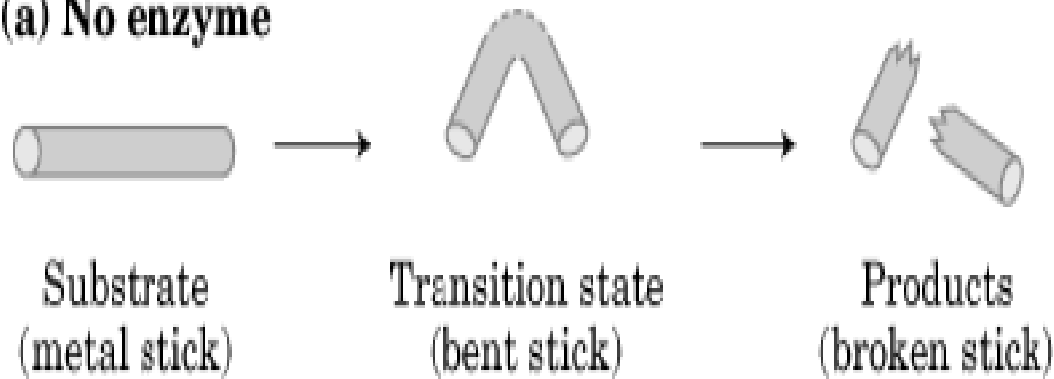
enzimi ubrzavaju
hemijske reakcije
smanjenjem količine
energije potrebne za
dostizanje visoko-
energetskog
intermedijernog
stanja reakcije
(kompleks prelaznog
stanja) – smanjena
energije aktivacije



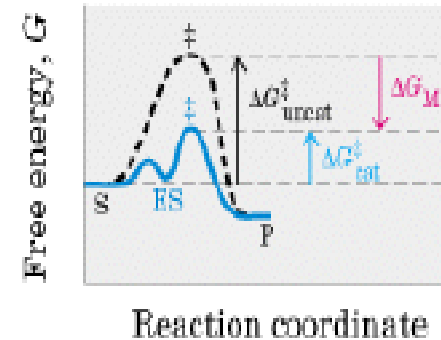
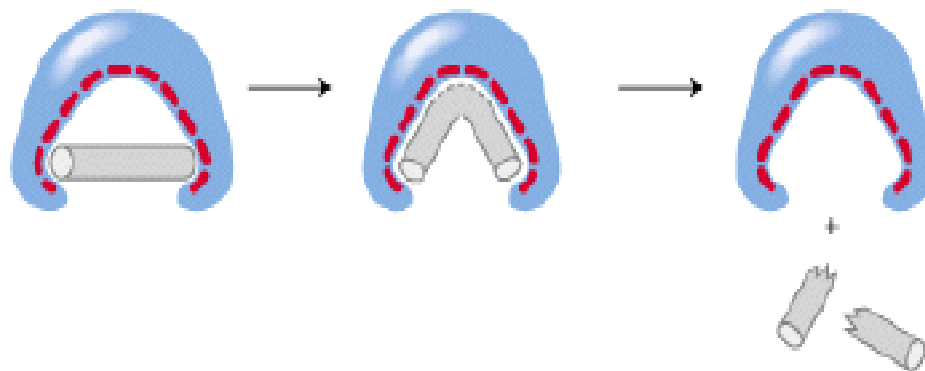
- enzimima katalisane reakcije imaju 3 koraka
 - vezivanje supstrata $E + S \leftrightarrow ES$
 - konverzija vezanog supstrata u vezani produkt $ES \leftrightarrow EP$
 - oslobađanje produkta $EP \leftrightarrow P$

- korak 1.
 - enzimi vezuju supstrat/e čiju transformaciju katališu i dovode ih u najpovoljniji položaj za efikasnu reakciju
- korak 2.
 - enzim učestvuje u formiranju i raskidanju veza neophodnih za nastanak produkta
- korak 3.
 - produkt se oslobađa, a enzim vraća u svoje originalno stanje

(a) No enzyme



(c) Enzyme complementary to transition state



Enzimska kinetika

- Teorijski sve enzimске reakcije su reverzibilne
 - Praktično obično je reakcija u jednom pravcu brža
- Kinetika enzimске reakcije je važna za:
 1. Metaboličke procese
 - U biološkim procesima je niz enzimskih reakcija
 - Nastali produkt je supstrat za sledeću enzimsku reakciju
 2. Laboratorijska određivanja
 - U laboratoriji kod određivanja aktivnosti enzima obično imamo više povezanih enzimskih reakcija kako bi se odredila aktivnost prvog enzima ili koncentracija inicijalnog supstrata u lancu enzimskih reakcija
 - Indikatorske reakcije – kinetika indikatorske reakcije ?
 - Prva reakcija (merna reakcija) je ograničavajuća

Enzimski kinetika

- Merenje aktivnosti enzima - merenje brzine enzimске reakcije
 - Promena supstrata u jedinici vremena
 - Promena produkta u jedinici vremena

$$v = \frac{-d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt}$$

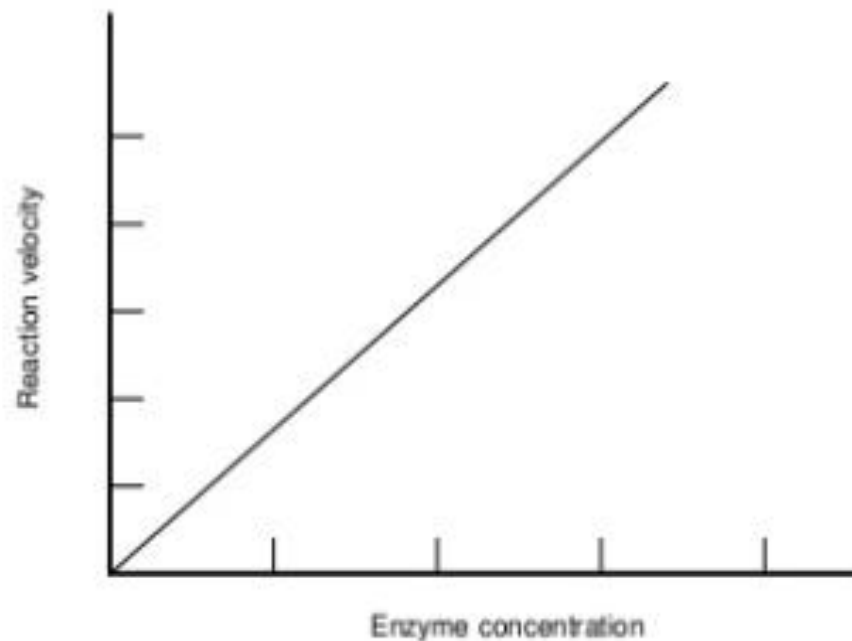
Faktori koji utiču na brzinu enzimski katalizovanih reakcija

- Koncentracija enzima
- Koncentracija supstrata
- pH
- Temperatura
- Prisustvo inhibitora, aktivatora, koenzima i prostetičnih grupa

Koncentracija enzima

Zavisnost brzine enzimske reakcije od koncentracije enzima pod uslovom da je prisutan višak supstrata.

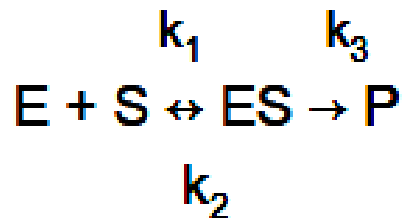
$$[S] \gg [E], V \approx [E]$$



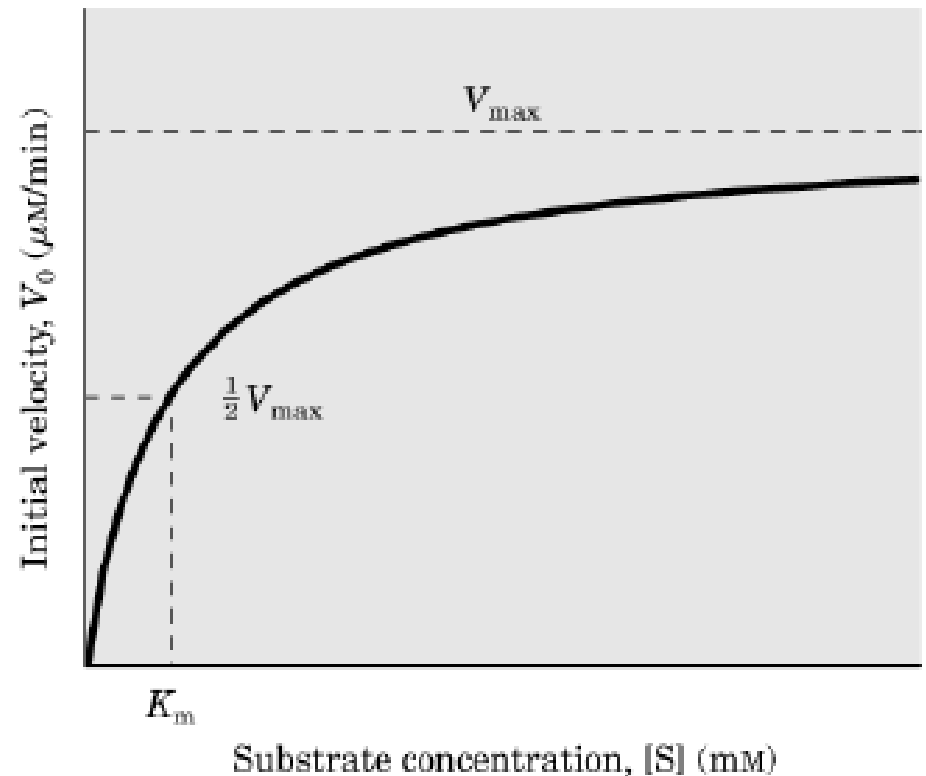
Mehanizmi regulacije enzimske aktivnosti

- brzina enzimski katalisane reakcije zavisi od koncentracije supstrata
 - matematički se predstavlja Michaelis-Menten-ovom jednačinom
- kovalentna modifikacija aminokiselinskih ostataka proteina u polipeptidnom lancu enzima
- interakcija sa modulator proteinima
 - vezuju se za enzim
 - menjaju konformaciju enzima i tako njegovu aktivnost
 - mehanizam povratne sprege (feedback)
 - najčešće prve reakcije metaboličkog puta

Regulacija koncentracijom supstrata



Brzina (količina stvaranja produkta u jedinici vremena) svih enzima zavisi od koncentracije supstrata



- Izražava se

- Michaelis-Menten jednačinom

- Michaelis-Menten-ova konstanta
 - $K_m = (k_2 + k_3)/k_1$

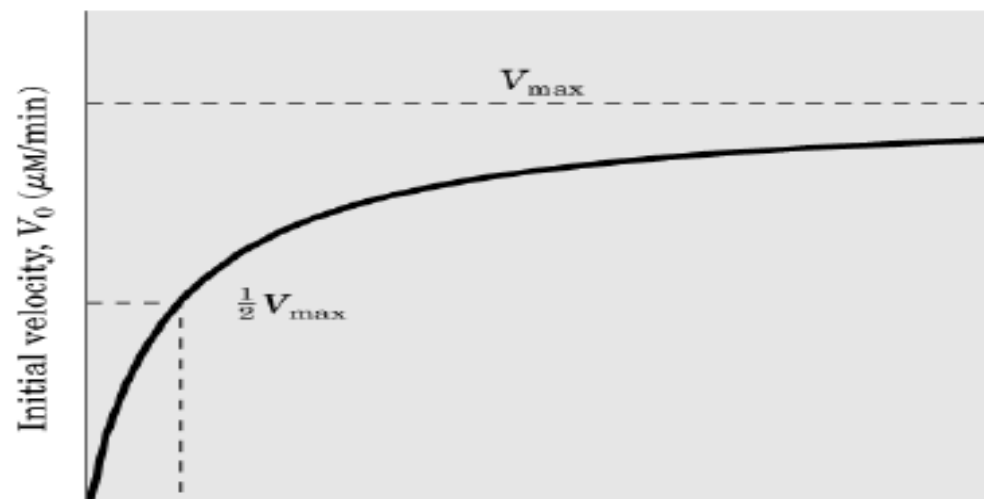
$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

- $[S] > K_m$
- $[S] < K_m$
- $[S] = K_m$

$$V_0 = V_{\max}$$

$$V_0 = V_{\max} [S] / K_m$$

$$V_0 = V_{\max} / 2$$



Enzimske reakcije sa jednim supstratom

1. Reakcija prvog reda

Brzina enzimske reakcije zavisi od koncentracije supstrata (niske konc)

2. Mešovitog tipa

3. Nultog reda

Brzina reakcije ne zavisi od koncentracije supstrata

Michaelis – Mentenova jednačina

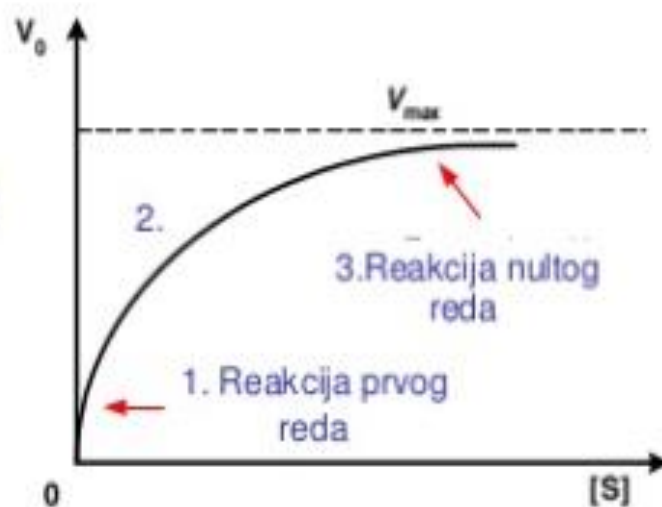
$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

K_m Michaelis-Mentenova konstanta

Definicija:

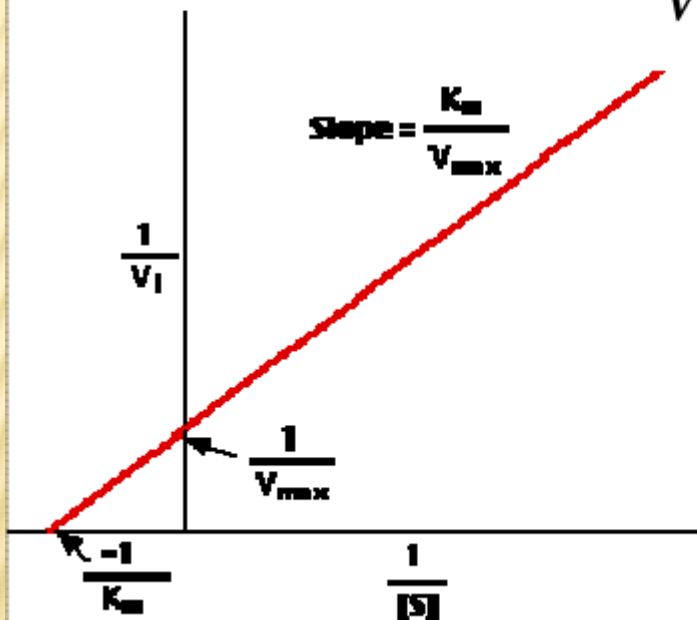
K_m je koncentracija supstrata pri kojoj se postiže polovina maksimalne brzine

$V_{\max}$ – Maksimalna postignuta brzina enzimske reakcije.



- Lineweaver-Burk (recipročne vrednosti)

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\max}[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$



- izoenzimi heksokinaze

- heksokinaza I K_m 0.05 mM
 - u eritrocitima (zavisni isključivo od glukoze)
- glukokinaza (jetra i pankreas) 5.0 – 6.0 mM
 - jetra preuzima “višak” iz krvi → glikogen

Izračunavanje kinetičkih konstanti enzimskih reakcija

- Software za izračunavanje K_m i V_{max} za enzime
- <http://med.umich.edu/biochem/enzsources/software.ttm>
- <http://www.sigmaplot.com/products/sigmaplot/enzyme-mod.php>

Upotreba K_m

- **Izbor optimalne koncentracije supstrata**
- Za poređenje vezivanja homolognih ili sličnih supstrata za jedan te isti enzim
- K_m služi za poređenje svojstava sličnih enzima iz različitih izvora
- Izoenzimi određeni različitim genskim lokusima razlikuju se u K_m

Efekat pH

pH optimumi

Većina enzima oko 7,0

Ekstremi

Pepsin 1,5

Alkalna fosfataza 10,5

pH kriva je zavisna od

1. Jonizacije supstrata
2. Stepena disocije a.k. u bočnim lancima

Uticaj na trodimenzionalnu konformaciju

Denaturacija enzima pri ekstremnim pH

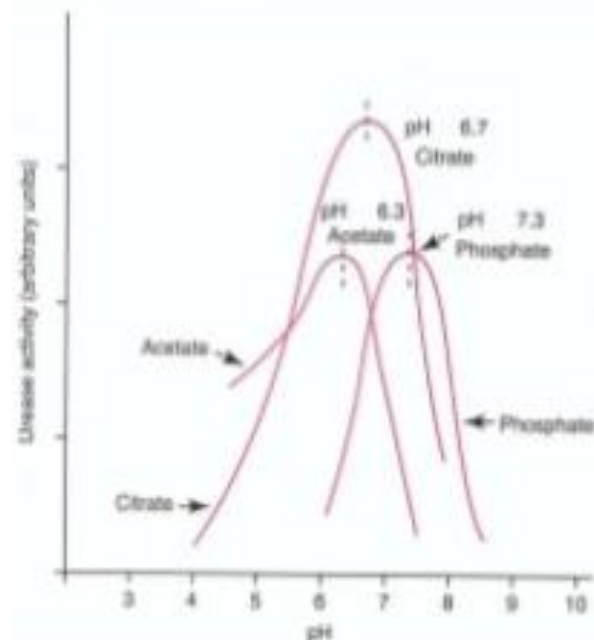
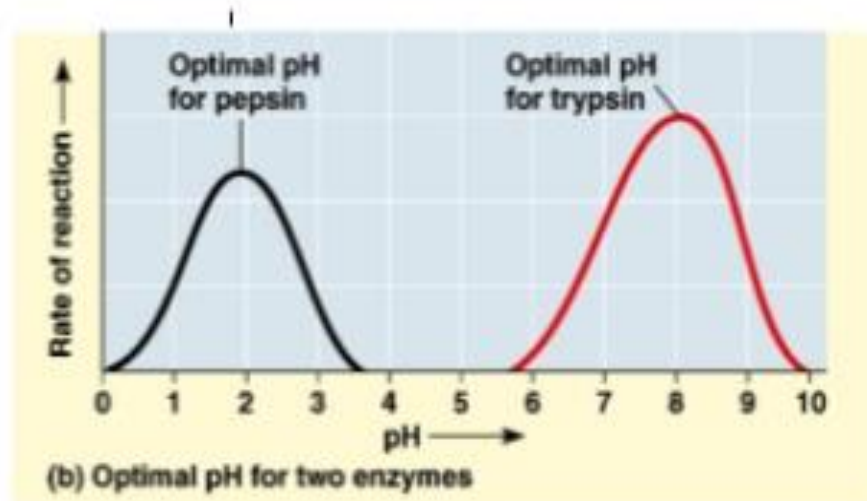
Izbor pufera

Dovoljan kapacitet da neutrališe

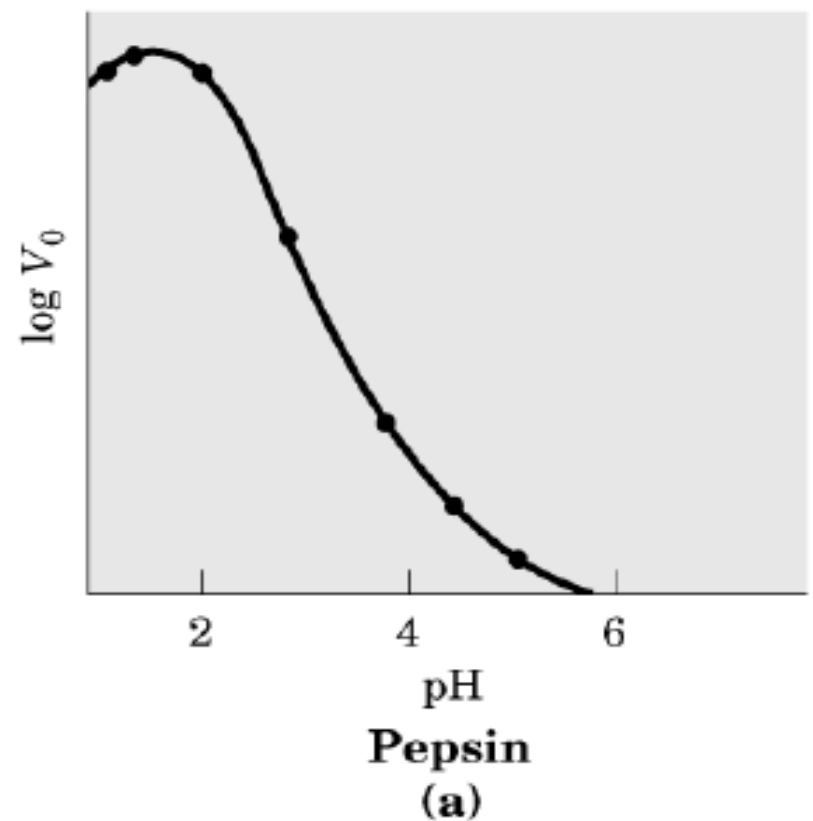
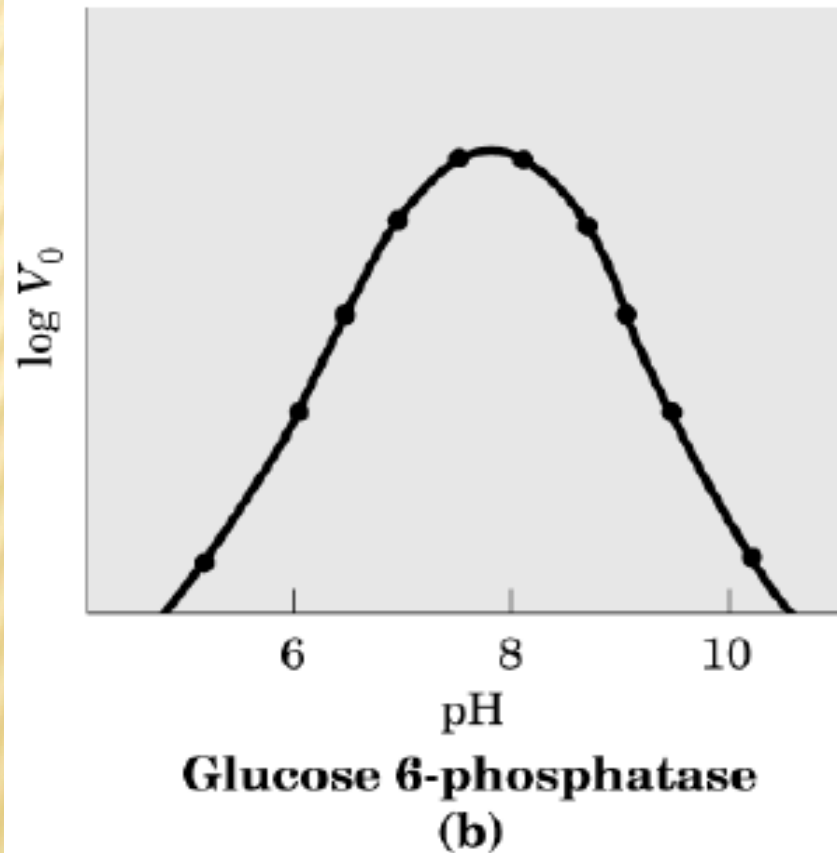
- efekat uzorka (seruma)
- stvorenih baza ili kiselina

Uticaj pKa pri izboru pufera

Maksimalni kapacitet pufera blizu pKa



Optimalni uslovi za enzimsku reakciju – temperatura i pH



Efekat temperature i optimalna temperatura

Q_{10} relativne brzine enzimske reakcije na dve temperature razlika za 10°C

Q_{10} od 1,7 do 2,5

Inicijalna brzina raste sa porastom t

Vreme potrebno za termostatiranje

Termalna inaktivacija i denaturacija

Temperatura inaktivacije $60-70^{\circ}\text{C}$

Gubitak tercijarne strukture

Uticaj na temp inaktivacije:

- supstrat i njegova koncentracija
- pH
- pufer i jonska jačina
- prisustvo drugih proteina iz seruma stabilise enzime

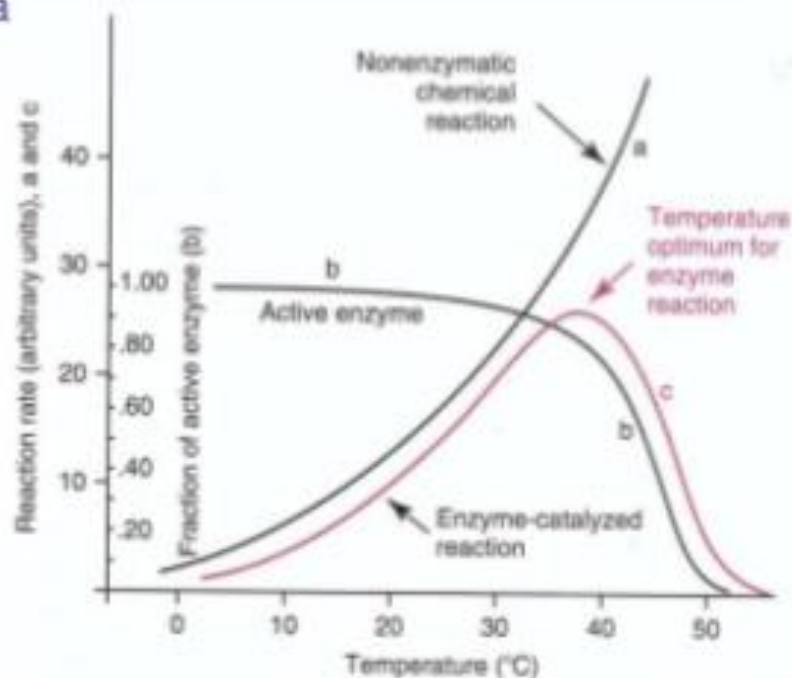
Čuvanje uzoraka

Amilaza stabilna na 22°C (24 sata), kisela fosfataza nestabilna (u frižideru u kiseloj sredini $\text{pH}=6,0$);

Alkalna fosfataza i efekat odmrzavanja; LD-5 (jetreni izoenzim - inaktivacija u frižideru

Preporuke IFCC

Analizatori na 37°C



Regulacija enzimske aktivnosti inhibicijom

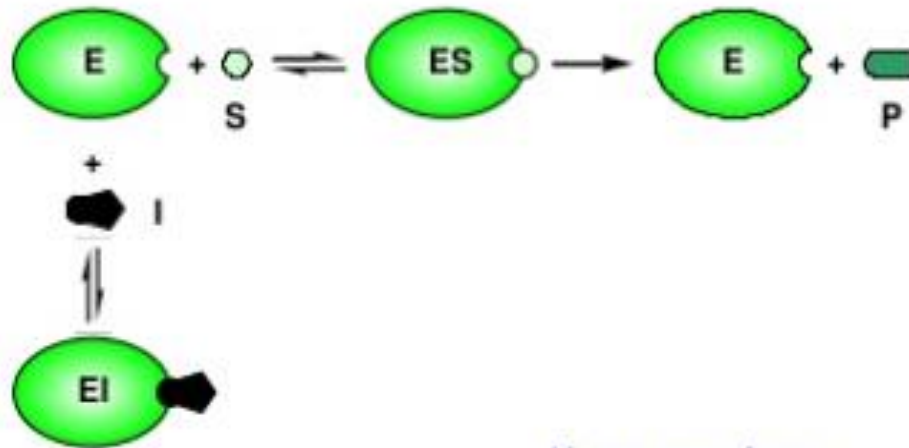
- inhibitori supstance koje se vezuju za enzim i smanjuju brzinu katalize
- reverzibilna inhibicija
 - inhibitor se vezuje za enzim nekovalentno
 - lako se odvaja od enzima
- dejstvo mnogih lekova i toksina je u inhibiciji enzima
 - Toksini najčešće reverzibilni inhibitori

Reverzibilni inhibitori (često sami produkti reakcije)

- prema odnosu supstrata i inhibitora
 - kompetitivna inhibicija
 - nekompetitivna inhibicija
 - akompetitivna inhibicija

1.Reverzibilna inhibicija

Kompetitivna inhibicija



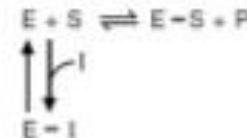
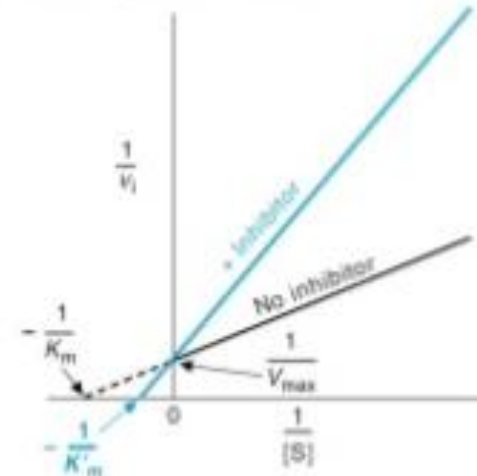
K_m se povečava
 V_{max} se ne menja

Kompetitivni inhibitor je strukturni analog
 supstratu

- Inhibicija viškom supstrata
- Inhibicija bisupstratnih reakcija
- Inhibicija produktom

Primer alkalna fosfataza

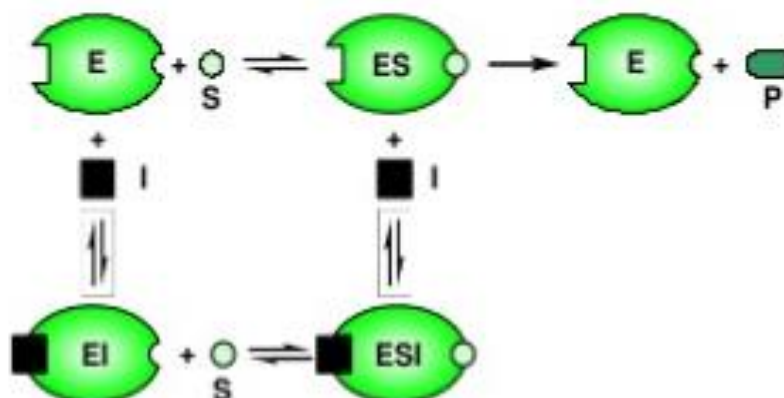
A. Competitive inhibition



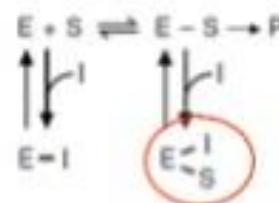
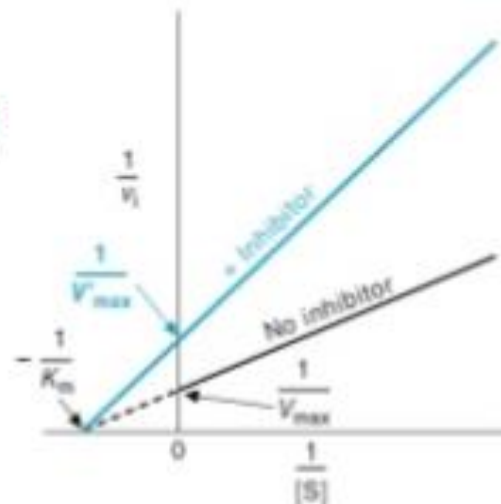
$$v = \frac{V_{max} [S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)}$$

1. Reverzibilna inhibicija

Nekompetitivna inhibicija



B. Pure noncompetitive inhibition

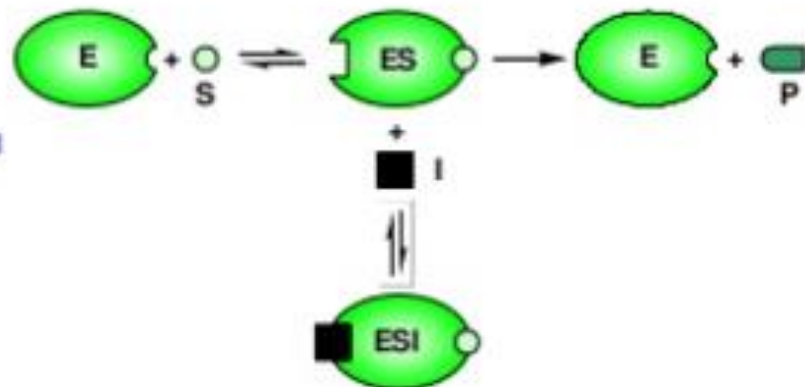


Tercijarni kompleks

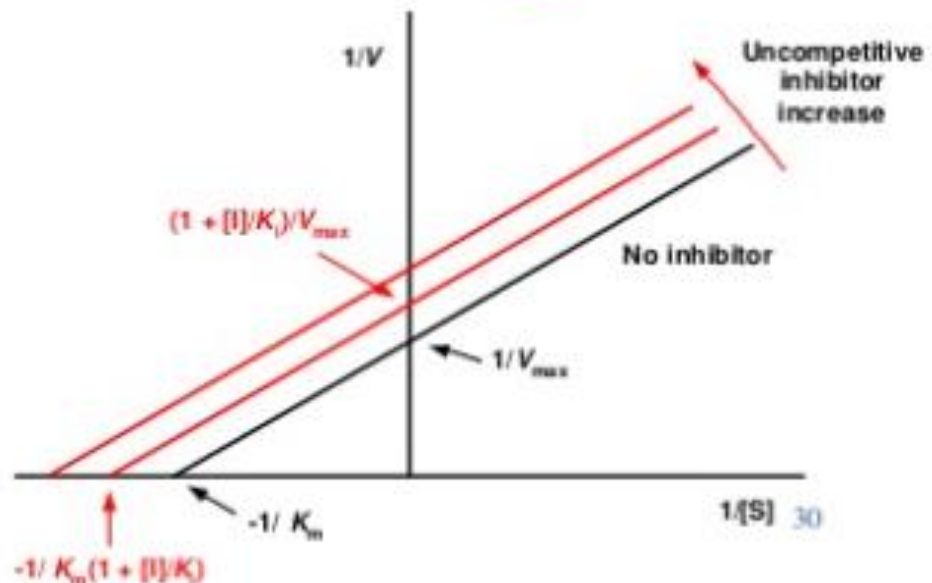
Nekompetitivni inhibitor se strukturno razlikuje od supstrata
 Inhibitor se ne vezuje za supstrat vezujuće mesto
 K_m se ne menja
 V_{max} se redukuje

1. Reverzibilna inhibicija Akompitivna inhibicija

Kombinacija inhibitora sa ES kompleksom
Najpre se vezuje prvi supstrat
a onda se gradi tercijarni kompleks
Bisupstratne reakcije



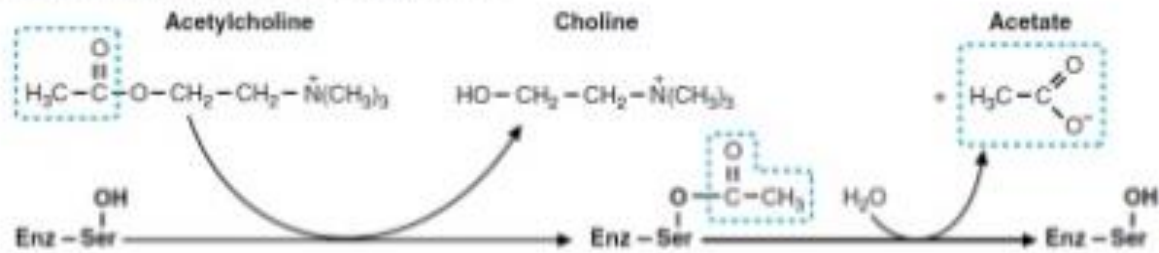
K_m se menja i V_{max} se menja
Sniženje oba parametra
Paralelna kriva



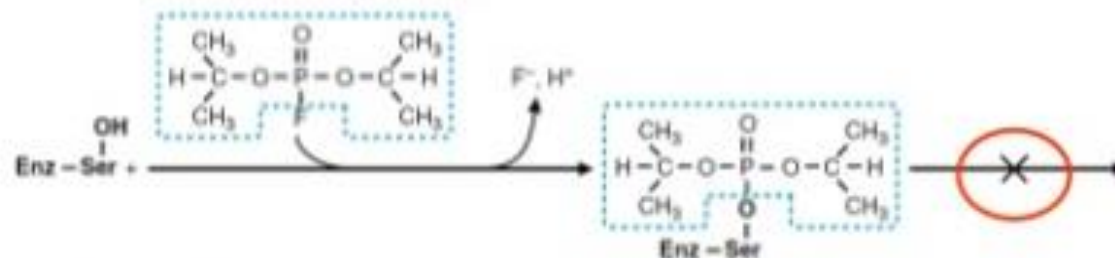
2. Ireverzibilna inhibicija

Primer ireverzibilne inhibicije

A. Normal reaction of acetylcholinesterase



B. Reaction with organophosphorus inhibitors



Fiziološka inhibicija

- Tripsin sa tripsin-inhibitorom
- Ireverzibilna inhibicija proteolitičkog dejstva tripsina

2. Ireverzibilna inhibicija

Teški metali vezuju SH grupe



Inhibicija enzima sa jodoacetamidom vezivanjem za SH grupe serinskog ostatka

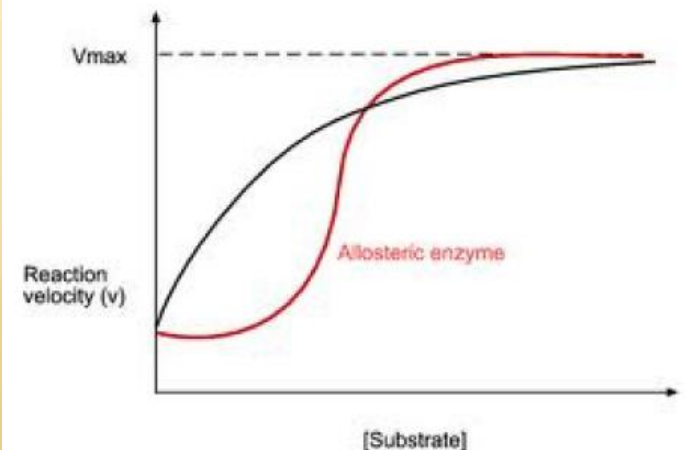


Regulacija enzimske aktivnosti konformacionim promenama (brza regulacija)

- alosterna aktivacija i inhibicija (alosterni enzimi)
- kovalentne modifikacije (fosforilacija)
- protein-protein interakcija (između regulatorne i katalitičke subjedinice)
- proteolitičko razlaganje

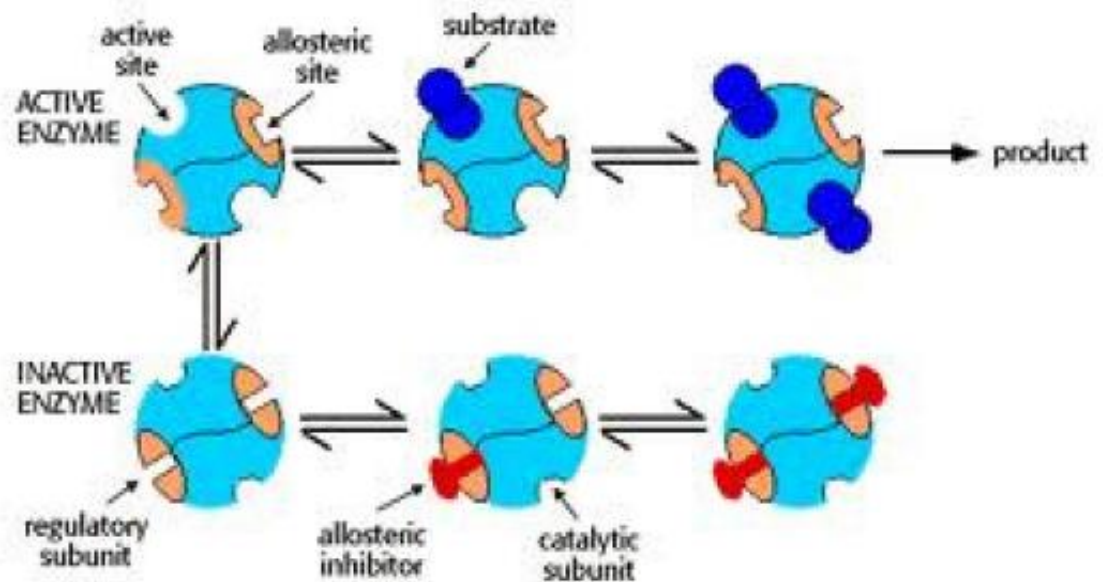
Alosterna aktivacija i inhibicija

- Alosterni enzim obično ima dve ili više subjedinica
- Nisu svi proteini sa katernom strukturom alosterni već samo oni sa izraženim kooperativnim efektom, tj.
 - subjedinice vezivanje supstrata za jednu subjedinicu menja konformaciju ostalih- kooperativno vezivanje supstrata –sigmoidalna kinetika
 - Kooperativnost modulirana efektorima (aktivatori



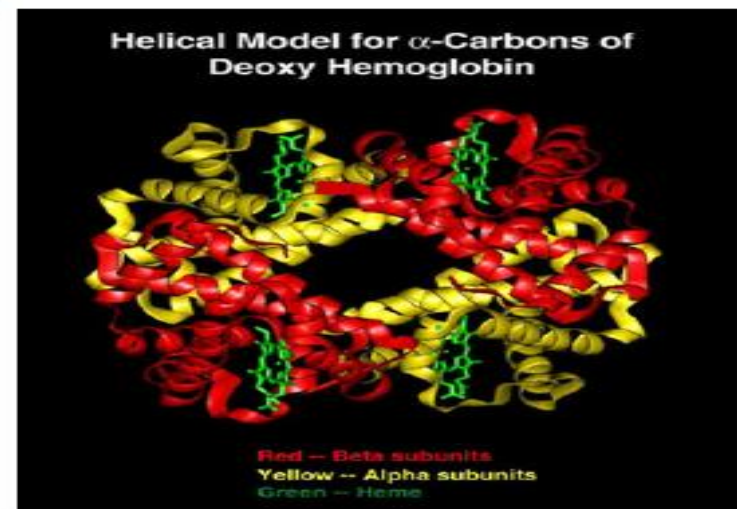
- **alosterni efektori**

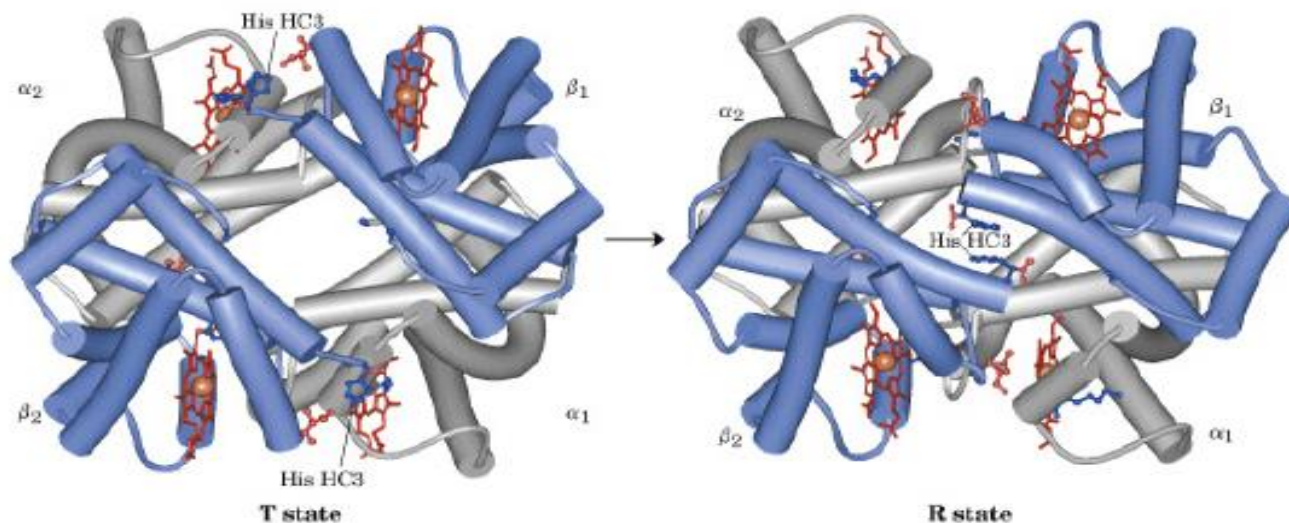
- alosterni inhibitori imaju jači uticaj od ostalih (kompetitivni, nekompetitivni, akomepetitivni) inhibitora
- ne zauzimaju katalitičko mesto – mogu delovati kao aktivatori
- efekat alosternog efektora brz



Hemoglobin kao alosterni protein

- globularni protein (4 subjedinice, 2 alfa, 2 beta) u eritrocitima
 - prenosi kiseonik iz pluća u tkiva
 - CO_2 i H^+ iz tkiva u pluća
 - nosi i otpušta NO (vazodilator)
-
- HbA1, 2 α (141 a.k.) i 2 β (146 a.k.), 98%
 - HbA2, 2 α , 2 δ
 - HbF, 2 α , 2 γ





Agensi (efektori) koji utiču na vezivanje kiseonika

- vodonikovi joni
- 2,3-bisfosfoglicerat
- kovalentno vezivanje CO_2

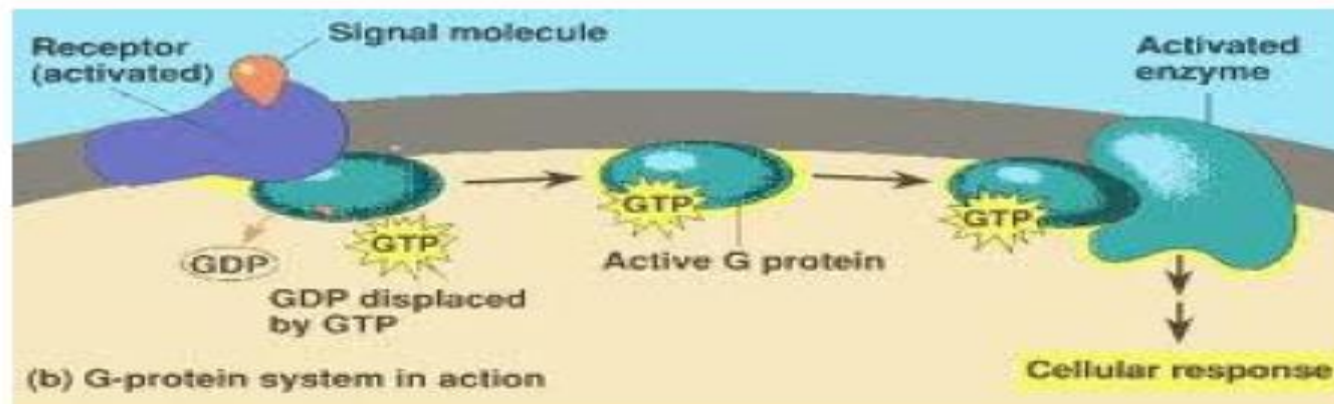
Kovalentne modifikacije

- Fosforilacijom

- sa protein kinazama ili protein fosfatazama
- u fosforilaciji učestvuje ATP i -OH grupe Ser, Thr i Tyr

Protein-protein interakcije

- receptor (protein) – G protein
- G protein – adenilat ciklaza



Proteolitičko razlaganje

- proenzimi (zimogeni)
 - za aktivaciju neophodno proteolitičko razlaganje (ireverzibilno)
 - himotripsinogen (tripsinom se konvertuje u himotripsin)
 - kod koagulacije krvi (održavanje hemostaze - konstantne zapremine krvi)
 - fibrinogen prelazi u fibrin delovanjem trombina (serin proteaza)
 - aktivacija trombina – koagulaciona kaskada

3. Inhibicija antitelima

- Antitela u principu ne inhibiraju enzimsku aktivnost
- Mogućnost inhibicije zbog
 - Sternih smetnji antitela
 - Konformacionih promena

Inhibicija aktivnosti enzimske molekule obeležene haptenom kao rezultat kombinacije sa specifičnim antitelima je osnov homogenog imunoenzimskog eseja EMIT

INHIBICIJA ANTITJELIMA

- ✗ **Poliklonalna antitijela (imunoglobulini)** – smanjuju učestalost neželjenih pojava, kod anafilakse, serumske slabosti, glomerulonefritisa, odnosno ova At su usmjerena protiv ćelijskom imuniteta (humanih limfocita ili ćelija timusa T i B limfocita čovjeka).
- ✗ **mTOR inhibitori** (mammalian target of rapamycin)-inhibicija mTOR kinaze, ključni enzim u diobi ćelija; predstavnici su sirolimus i everolimus
- ✗ **Kortikosteroidi** – djeluju preko glukokortikoidnih receptora – inhibicija IL-1 i IL-2 – inhibicija sinteze DNK i RNK.

Aktivacija enzima

- Aktivatori povećavaju brzinu enzimske reakcije
- Metalni joni, koenzimi i prostetične grupe

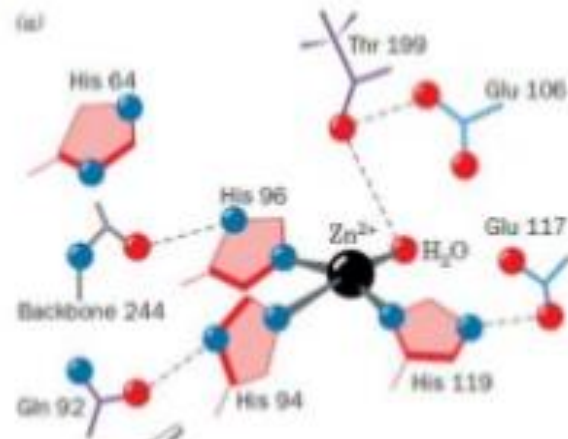
1. Metalni joni

- Mehanizam dejstva metalnih jona na aktivaciju enzima:
 - Metalni joni kao integralni delovi strukture enzima
 - Zn u alkalnoj fosfatazi i karboksipeptidazi A
- Uloga metalnog jona
 - Stabilizacija tercijerne i kvarterne strukture
 - Uklanjanje dvovalentnog katjona sa EDTA dovodi do konformacionih promena i inaktivacije enzima
 - Reaktivacija enzima dijalizom u rastvoru metala ili dodatak metalnog jona

Aktivacija enzima

- Vezivanje jona za enzim:
 - čvrsto kao deo strukture enzima i ima dodatnu katalitičku aktivnost
 - slabo vezivanje
 - prolazno vezivanje za enzim ili supstrat
- Neophodnost dodavanja jona, ako postoji deficijencija
 - efekat dodavanja jona može biti i inhibicija

- Primer
- kinaza – fosfo transferaze Mg^{2+}
- Amilaza - dodatak hloridnog anjona



Karboanhidraza

FAKTORI KOJI UTJECU NA AKTIVNOST ENZIMA

DOB, VRSTA, SPOL, ISHRANA, SMJEŠTAJ

MIŠICNI NAPOR, STRES, LIJEKOVI, VAĐENJE KRV

*ANTIKOAGULANSI - EDTA, oksalat, citrat smanjuju
aktivnost enzima*

HEMOLIZA - uglavnom povećava aktivnost

*LIPEMIJA - uglavnom povećava aktivnost, a ponekad
ovisi o metodi*