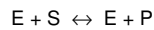


Enzimkinetika

Az enzimes reakció sebességének leírása, jellemző paraméterek azonosítása. Ha:



A sztöchiometriához mindegyiket mól-ban vagy gramm-ban kellene kifejezni. De: az enzimpreparátum sohasem tiszta.

Ezért az enzimek mennyiségét a hatásuk alapján adjuk meg:



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

Enzimkinetika

Egy egység (Unit) az az enzim mennyiség, amely 1 μmol szubsztrátot alakít át vagy 1 μmol terméket képez 1 perc alatt adott reakció körülmények között.

SI rendszerben: 1 Katal: 1 mol szubsztrátot alakít át 1 s alatt.

Ez hatalmas egység, praktikusabb a nanoKatal = 10^{-9} Kat

$$1 \text{ U} = 16,67 \text{ nanoKatal}$$

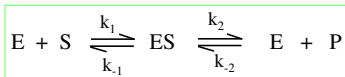
Fajlagos aktivitás: U/mg, U/ml



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

Michaelis-Menten kinetika



Kiindulási feltételezések:

- $k_{-2} = 0$ (a második lépés irreverzibilis)
- az első lépés gyorsan egyensúlyra jut =

RAPID EKUILIBRIUM: $k_1SE = k_{-1}(ES)$

Egyensúlyi állandója: $K_s = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{S \cdot E}{(ES)}$

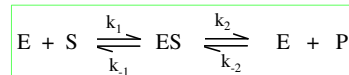
- az ES komplex stabil, az EP komplex elhanyagolható



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

Michaelis-Menten kinetika



- egy aktív centrum, egy szubsztrát
- aktivitás helyett koncentráció használható
- $(S) \gg (E_0)$ vagyis $E_0 / S \ll 1$

a „minket érdeklő” reakciósebesség: $V = \frac{dP}{dt} = k_2(ES)$

anyagmérleg az enzimre: $E_0 = E + (ES)$



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

Michaelis-Menten kinetika

Osszuk el a két egyenletet:

$$\frac{V}{E_0} = \frac{k_2(ES)}{E + (ES)}$$

Helyettesítsük be:

$$K_s = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{S \cdot E}{(ES)}$$

$$\frac{V}{E_0} = \frac{k_2 \frac{S \cdot E}{K_s}}{E + \frac{S \cdot E}{K_s}}$$

Rendezzük át:

$$\frac{V}{k_2 E_0} = \frac{\frac{S}{K_s}}{1 + \frac{S}{K_s}} = \frac{S}{K_s + S}$$

$$V_{\max} = k_2 E_0$$

mert $V = \frac{dP}{dt} = k_2(ES)$ volt



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

Michaelis-Menten kinetika

Ebből a sebességi egyenlet:

$$V = V_{\max} \frac{S}{K_s + S} \quad \text{avagy} \quad \frac{V}{V_{\max}} = \frac{\frac{S}{K_s}}{1 + \frac{S}{K_s}}$$



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

M és M

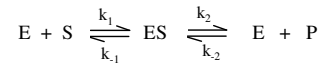


Maud Menten
1879-1960

Leonor Michaelis
1875-1949

Michaelis, L., Menten, M. (1913) Die kinetik der invertinwirkung, *Biochemische Zeitung* 49, 333-369

Briggs-Haldane kinetika



Ugyanazok a difegyenletek, de a feltételezés: (kvázi) állandó-
 sult állapot = steady state ↓

$$\frac{dS}{dt} = -k_1ES + k_{-1}(ES)$$

$$d(ES)/dt = 0$$

$$\frac{d(ES)}{dt} = k_1ES - k_{-1}(ES) - k_2(ES)$$

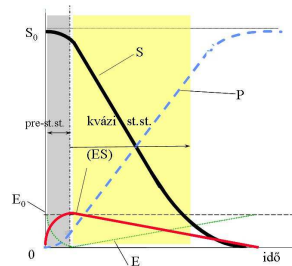
(S) >> (E₀) vagyis E₀/S << 1

k₁ES > k₋₁(ES) ill. k₁ES > k₂(ES)

$$\frac{dP}{dt} = k_2(ES)$$

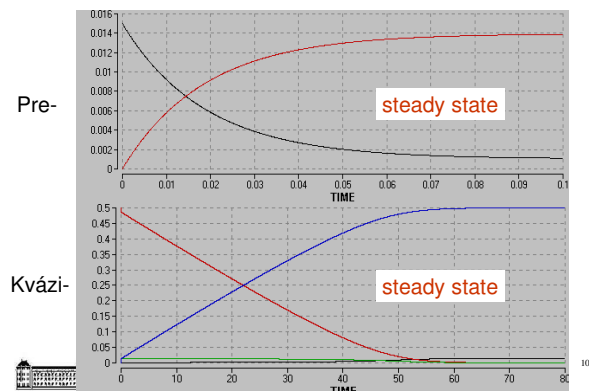
Briggs-Haldane kinetika

Egy rövid átmeneti szakasz (pre-steady state) után csak nagyon lassú a változás (kvázi-steady state).



Briggs, G. E., and Haldane, J. B. (1925) A Note on the Kinetics of Enzyme Action, *Biochem J* 19, 338-339.

A Briggs-Haldane kinetika numerikus szimulációja



Briggs-Haldane kinetika

$$\frac{d(ES)}{dt} = k_1 \cdot E \cdot S - k_{-1}(ES) - k_2(ES) = 0$$

$$k_1 \cdot E \cdot S = (k_{-1} + k_2)(ES)$$

$$(ES) = \frac{k_1 \cdot E \cdot S}{(k_{-1} + k_2)} \quad E + (ES) = E_0$$

$$V = \frac{k_2 E_0 S}{K_m + S} = V_{max} \frac{S}{K_m + S}$$

$$K_m = (k_{-1} + k_2) / k_1$$

Michaelis állandó

Diskusszió

Michaelis-Menten

Briggs-Haldane

$$V = V_{max} \frac{S}{K_s + S}$$

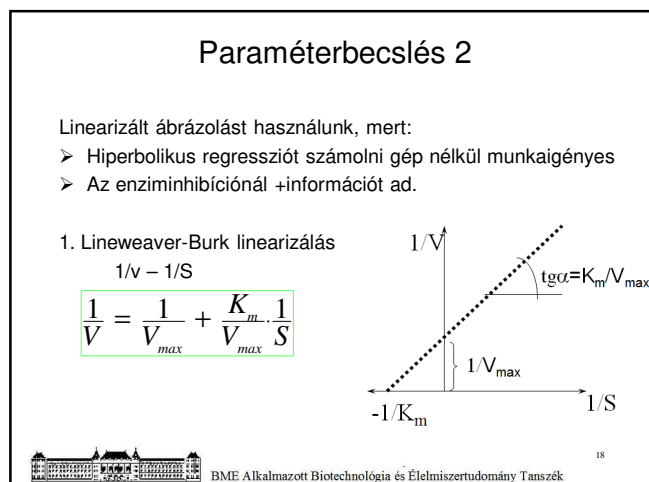
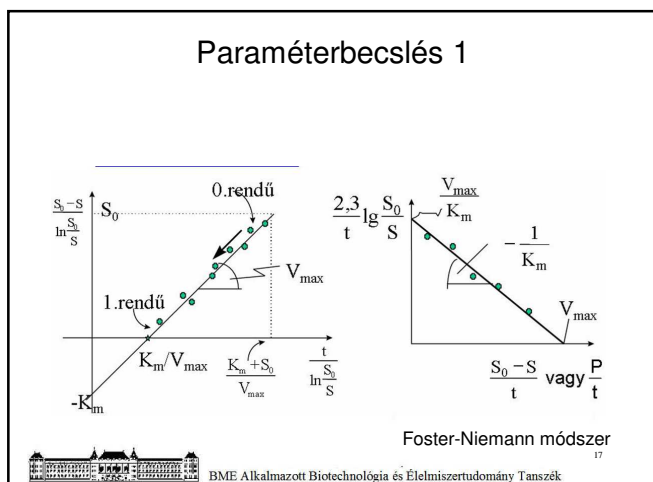
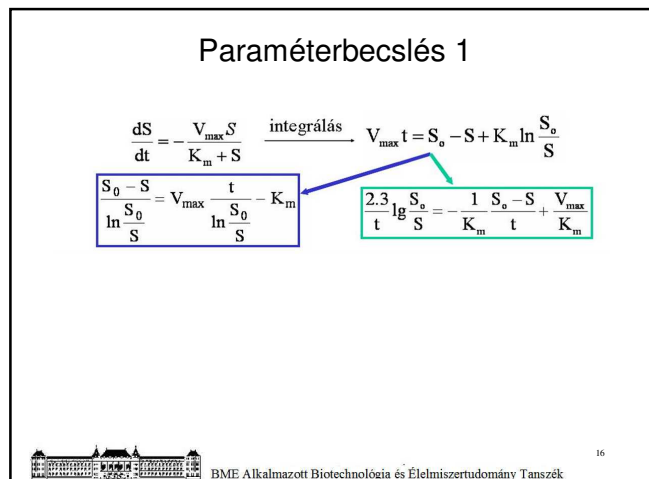
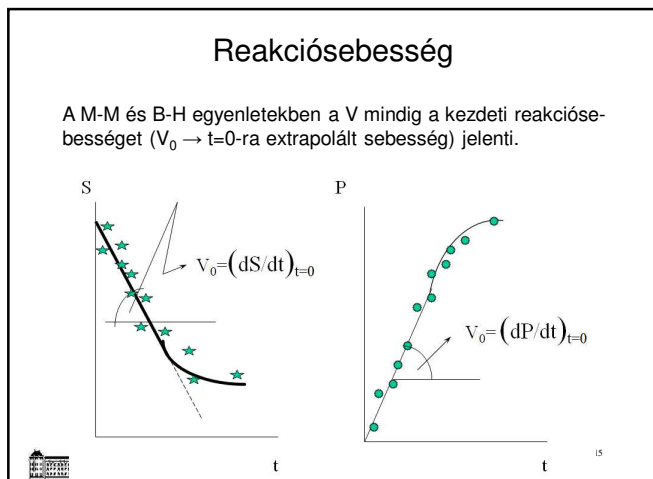
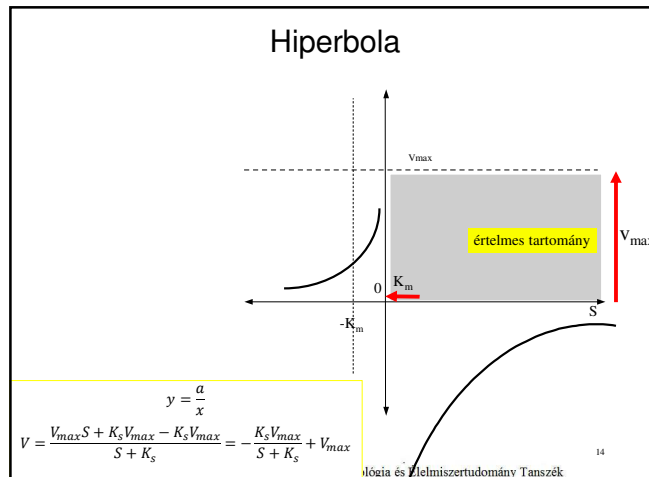
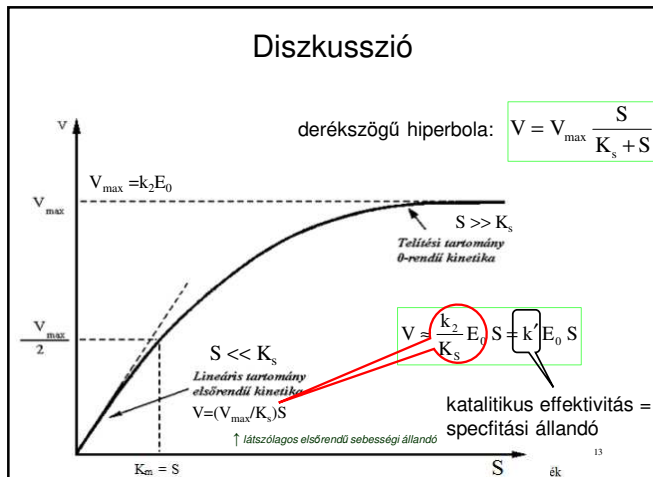
$$V = V_{max} \frac{S}{K_m + S}$$

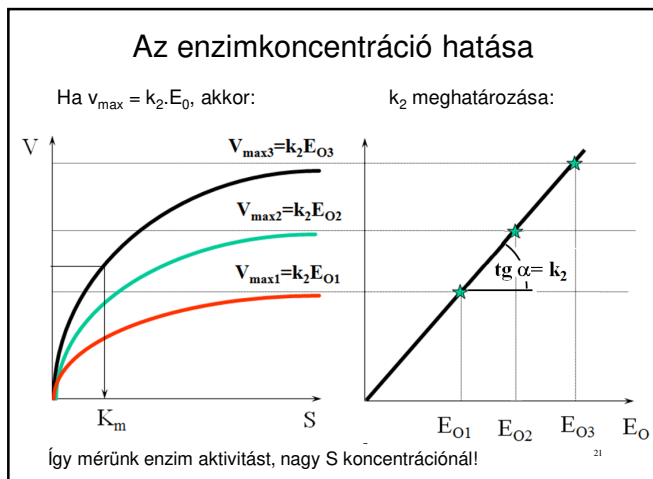
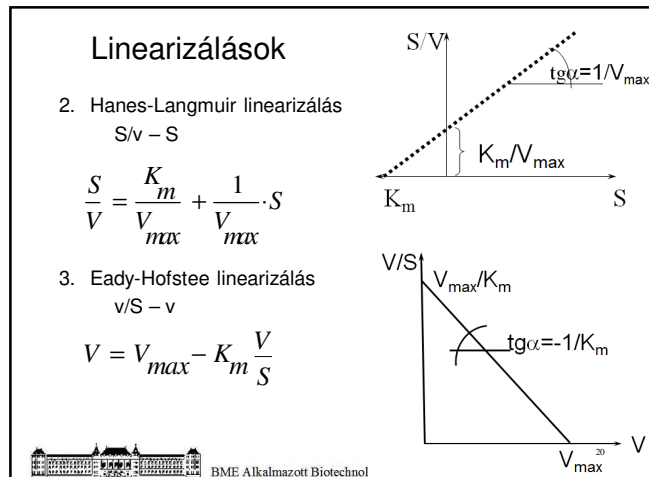
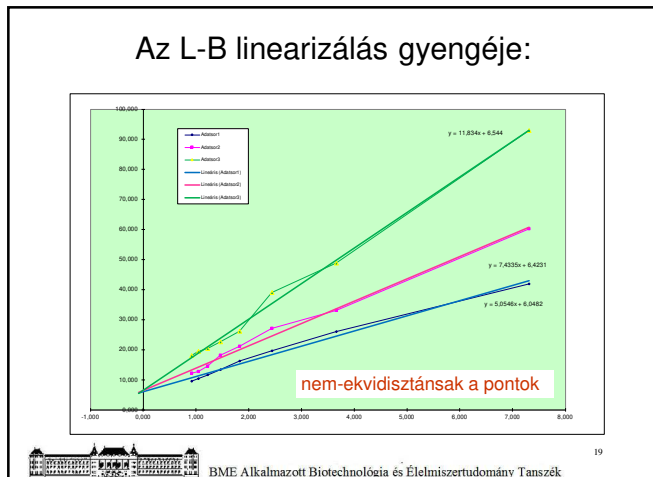
$$K_s = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

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

$$K_m = K_s + \frac{k_2}{k_1}$$

ha (k₁) >> (k₂) akkor a két konstans azonos!





A kinetikai paraméterek

V_{max} : nem maximum, hanem limit \rightarrow határsebesség

Nem enzimetulajdonság, mert függ E_0 -tól: $V_{max} = k_2 \cdot E_0 \rightarrow$
= **AKTIVITÁS**

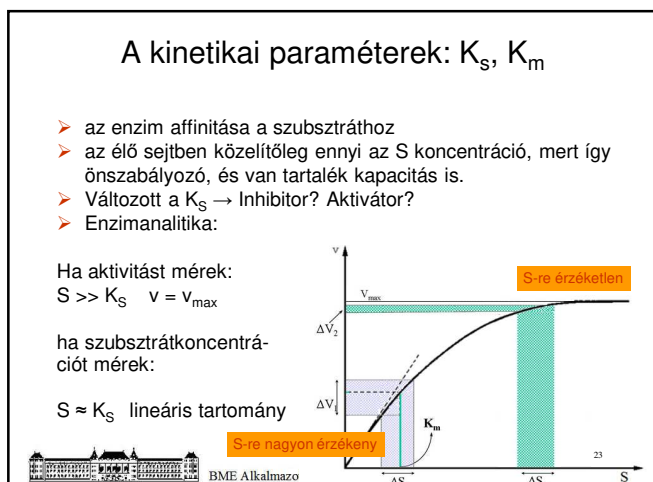
A k_2 enzimetulajdonság = turnover number, váltásszám [s^{-1}] \rightarrow
az enzimmolekula átalakítási frekvenciája

Kiterjesztés minden enzimre és minden kinetikára:

$$V_{max} = k_{cat} \cdot E_0$$

k_{cat} [s^{-1}]: egy enzimmolekula átalakítási frekvenciája S-telítés esetén: egy enzimmolekula időegység alatt hány molekula szubsztrátot alakít át.

22
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék



A kinetikai paraméterek

k_1 10^7 - 10^{10} $dm^3 mol^{-1} min^{-1}$ [max. érték (10^{11}) a kis molekulák diffúziósebessége]

k_{-1} 10^2 - 10^6 min^{-1}

k_2 50 - 10^7 min^{-1}

K_m 10^{-6} - 10^{-2} mol/dm^3

TABLE 13-1. THE VALUES OF K_M , k_{cat} , AND k_{cat}/K_M FOR SOME ENZYMES AND SUBSTRATES

Enzyme	Substrate	K_M (M)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($M^{-1} s^{-1}$)
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	9.5×10^{-3}	1.4×10^4	1.5×10^6
Carbonic anhydrase	CO_2	1.2×10^{-2}	1.0×10^6	8.3×10^7
	HCO_3^-	2.6×10^{-2}	4.0×10^5	1.5×10^7
Catalase	H_2O_2	2.5×10^{-2}	1.0×10^7	4.0×10^8
Chymotrypsin	N-Acetyllysine ethyl ester	4.4×10^{-1}	5.1×10^3	1.2×10^{-1}
	N-Acetylvaline ethyl ester	8.8×10^{-2}	1.7×10^3	1.9
	N-Acetyltyrosine ethyl ester	6.6×10^{-4}	1.9×10^3	2.9×10^3
Fumarase	Fumarate	5.0×10^{-6}	8.0×10^2	1.6×10^8
	Malate	2.5×10^{-3}	9.0×10^2	3.6×10^7
Urease	Urea	2.5×10^{-2}	1.0×10^4	4.0×10^5

K_{cat} : α -amiláz: $500 s^{-1}$, glükóamiláz: $160 s^{-1}$, glükóz-izomeráz: $3 s^{-1}$

k_{cat} értékek

↓ k_{cat} (s⁻¹)

k_{cat} alsó határa metabolikus enzimeknél
 Legtöbb enzim e két szélső eset között
 Természetes enzimeknél: >10⁵
 Mesterséges E-nél (DNA-zyme, abzyme): <10³

$$\frac{k_{cat}}{K_m} = 10^7 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1} = \frac{10^7 \text{ s}^{-1}}{1 \text{ M}} = \frac{1 \text{ s}^{-1}}{10^{-7} \text{ M}}$$

25

Fajlagos aktivitás és váltásszám

Ez a kettő hasonlít egymásra, mert:

$$\text{fajlagos aktivitás} = \frac{\text{Unit}}{\text{mg E}} = \frac{\mu\text{mól S}}{\text{min} \cdot \text{mg E}}$$

$$\text{váltásszám} = \frac{\text{db S}}{\text{sec} \cdot \text{db E}} = \frac{\mu\text{mól S}}{\text{sec} \cdot \mu\text{mól E}}$$

Az enzimmennyiség átszámolásával összehozhatók.

26

Fajlagos aktivitás és váltásszám

Ha az enzim móltömege 60000 és fajlagos aktivitása 1 U/mg, mekkora a k_{cat}?

Ms= 60000 Da 1 U/mg k_{cat}=? s⁻¹

$$1 \text{ U} = \frac{1 \mu\text{mól S}}{1 \text{ min}} \quad 1 \text{ U/mg} = \frac{1 \mu\text{mól S}}{1 \text{ min} \cdot 1 \text{ mg E}}$$

mivel

$$1 \text{ mg E} = \frac{1}{60000} \text{ mmol E} = \frac{1}{60} \mu\text{mól E}$$

$$1 \text{ U/mg} = \frac{1 \mu\text{mól S}}{60 \text{ s} \cdot \frac{1}{60} \mu\text{mól E}} = \frac{1 \mu\text{mól S}}{1 \text{ s} \cdot 1 \mu\text{mól E}} = 1 \text{ s}^{-1} = k_{cat}$$

27

Reverzibilis reakciók

Alap: minden enzimes reakció reverzibilis – egyensúlyra vezet. Sokszor ez az egyensúly erősen eltolódik az egyik oldalra – pl. a **biopolimerek hidrolizálásánál** (amilázok, proteinázok), más-hol viszont közel 50-50%-os (például a glükóz izomeráz reakció)

glükóz ⇌ fruktóz

Mindkét kinetikai leírásban feltételeztük, hogy a k₋₂ = 0, ezért a reverzibilis reakciót két ellentétes egyirányú folyamat leírásából állítjuk össze.

28

Reverzibilis reakciók

Fizkém reakciókinetika egymást követő (konzekutív) egyensúlyi reakciók leírására:

$$A + B \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} C \xrightleftharpoons[k_{-2}]{k_2} D + E$$

$$K_1 = \frac{k_1}{k_{-1}} \quad K_2 = \frac{k_2}{k_{-2}}$$

$$K_{\text{eq(üilibríum)}} = K_1 K_2 = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} k_{-2}}$$

29

Reverzibilis reakciók

$$E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightleftharpoons[k_{-2}]{k_2} E + P$$

A két ellentétes irányú reakció egyensúlyi állandóit fölírva:

$$K_s = \frac{k_{+1}}{k_{-1}} = \frac{(ES)}{S \cdot E} \quad K_p = \frac{k_{-2}}{k_{+2}} = \frac{(ES)}{P \cdot E}$$

A közös elemet kiemelve:

$$\frac{k_{+1}}{k_{-1}} S = \frac{(ES)}{E} = \frac{k_{-2}}{k_{+2}} P$$

Az eredő egyensúlyi állapotot kifejezhetjük:

$$K_{\text{eq(üilibríum)}} = \frac{P}{S} = \frac{k_{+1} k_{+2}}{k_{-1} k_{-2}}$$

30

Reverzibilis reakciók

HALDANE leírásához:

$$E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightleftharpoons[k_{-2}]{k_2} E + P$$

$$K_{ms} = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \quad V_{maxs} = k_2 E_0 \quad V_{maxp} = k_{-1} E_0$$

$$K_{mp} = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_{-2}}$$

$$K_1 = \frac{k_1}{k_{-1}} \quad K_2 = \frac{k_2}{k_{-2}}$$

$1/K_S \leftarrow \quad \rightarrow K_P$

31 BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Reverzibilis reakciók

Végezzük el a következő osztásokat:

$$\frac{V_{maxs}}{K_{ms}} = \frac{k_1 k_2 E_0}{k_2 + k_{-1}} \quad \text{és} \quad \frac{V_{maxp}}{K_{mp}} = \frac{k_{-2} k_{-1} E_0}{k_2 + k_{-1}}$$

$$\frac{V_{maxs}}{K_{ms}} = \frac{V_{maxp} K_{mp}}{V_{maxp} K_{ms}} = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} k_{-2}} = K_{eq} \quad \text{ugyanaz!}$$

Egyensúlyi állandóra ugyanazt kaptuk - HALDANE összefüggés

32 BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Reverzibilis reakciók

MI TÖRTÉNIK?

S → P vagy P → S

MITŐL FÜGG? K_{eq} , S, P értéke

Itt feltételezzük az EP komplex létezését:

$$E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightleftharpoons[k_{-2}]{k_2} EP \rightleftharpoons E + P$$

33 BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Reverzibilis reakciók

Az eredő sebesség a két folyamat különbsége:

$$V_{netto} = V_{előre} - V_{vissza} = k_2(ES) - k_{-2}(EP)$$

Ezt az eddigiekhez hasonlóan az enzim anyagmértékével osztjuk el:

$$E_0 = E + (ES) + (EP)$$

$$\frac{v_{előre}}{E_0} = \frac{k_2(ES)}{E + (ES) + (EP)} \quad \frac{v_{vissza}}{E_0} = \frac{k_{-2}(EP)}{E + (ES) + (EP)}$$

ebből:

$$\Delta v = \frac{E_0 k_2 (ES) - E_0 k_{-2} (EP)}{E + (ES) + (EP)}$$

34 BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Reverzibilis reakciók

Behelyettesítve :

$$\Delta v = \frac{v_{maxs} \frac{S}{K_s} E - v_{maxp} \frac{P}{K_p} E}{E + (ES) + (EP)}$$

figyelembe véve, hogy:

$$(ES) = E \frac{S}{K_s} \quad (EP) = E \frac{P}{K_p}$$

$$\Delta v = \frac{v_{maxs} \frac{S}{K_s} E - v_{maxp} \frac{P}{K_p} E}{E + \frac{S}{K_s} E + \frac{P}{K_p} E} \quad \text{azaz} \quad \Delta v = \frac{V_{maxs} \left(\frac{S}{K_s} - \frac{P}{K_p} \right)}{K_{ms} \left(1 + \frac{P}{K_{mp}} \right) + S}$$

Reverzibilis M-M egyenlet₃₅

35 BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Reverzibilis reakciók

$$\Delta v = \frac{V_{maxs} \left(\frac{S}{K_s} - \frac{P}{K_p} \right)}{K_{ms} \left(1 + \frac{P}{K_{mp}} \right) + S} \quad \text{ahol} \quad \frac{P}{K_{eq}} = S_{eq} \quad \text{azaz} \quad (S - S_{eq}) \quad \text{a}$$

szubsztrát koncentráció eltérése az egyensúlytól.

$\left(1 + \frac{P}{K_{mp}} \right)$ pedig analóg $\left(1 + \frac{I}{K_I} \right)$ -vel, azaz P kompetitív inhibítorként viselkedik.

36 BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék