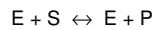


Enzimkinetika

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



A sztöchiometriához mindegyiket mól-ban vagy grammal kellene kifejezni. De: az enzimpredarátum 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

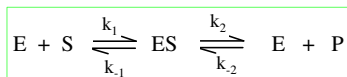
Fajlagos aktivitás: E/mg, E/ml



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

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

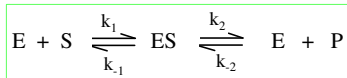
- az ES komplex stabil, az EP komplex elhanyagolható



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 enzime: $E_0 = E + (ES)$



Michaelis-Menten kinetika

Osszuk el a két egyenletet:

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

Helyettesítsük be:

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

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

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



Michaelis-Menten kinetika

Ebből az sebességi egyenlet:

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



M és M



Maud Menten
1879-1960

Leonor Michaelis
1875-1949

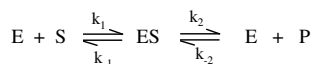
Michaelis, L., Menten, M. (1913) Die kinetik der invertinwirkung, *Biochemische Zeitung* 49, 333-369



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

Briggs-Haldane kinetika



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

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

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

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

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

(S) >> (E₀) vagyis E₀/S << 1
 k₁ES > k₋₁(ES) ill. k₁ES > k₂(ES)

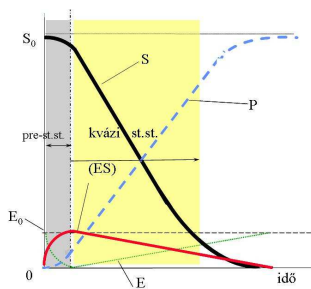


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8

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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

9

Briggs-Haldane kinetika

$$\frac{d(ES)}{dt} = k_1 E_0 S - k_{-1}(ES) - k_2(ES) = 0$$

$$k_1 E_0 S = (k_{-1} + k_2)(ES)$$

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

$$E + (ES) = E_0$$

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

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

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 10

Diskusszió

| | |
|---|--|
| <p>Michaelis -Menten</p> $V = V_{max} \frac{S}{K_s + S}$ $K_s = \frac{k_{-1}}{k_1}$ | <p>Briggs-Haldane</p> $V = V_{max} \frac{S}{K_m + S}$ $K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$ |
|---|--|

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

ha $(k_1) \gg (k_2)$ akkor a két konstans azonos!

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 11

Diskusszió

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

$V_{max} = k_2 E_0$

$S \gg K_s$
Teljesí tartomány
0-rendű kinetika

$S \ll K_s$
Lineáris tartomány
elsőrendű kinetika
 $V = (V_{max}/K_s) S$

$V = \frac{k_2}{K_s} E_0 S = k' E_0 S$

katalitikus hatékonyság =
specifi(c)i állandó

12

Reakciósebesség

A M-M és B-H egyenletekben a V mindig a kezdeti reakciósebességet ($V_0 \rightarrow t=0$ -ra extrapolált sebesség) jelenti.

S

t

P

t

Linearizálások

Linearizált ábrázolást használunk, mert:

- Hiperbolikus regressziót számolni gép nélkül munkaigényes
- Az enziminhibíciónál +információt ad.

1. Lineweaver-Burk linearizálás

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{S}$$

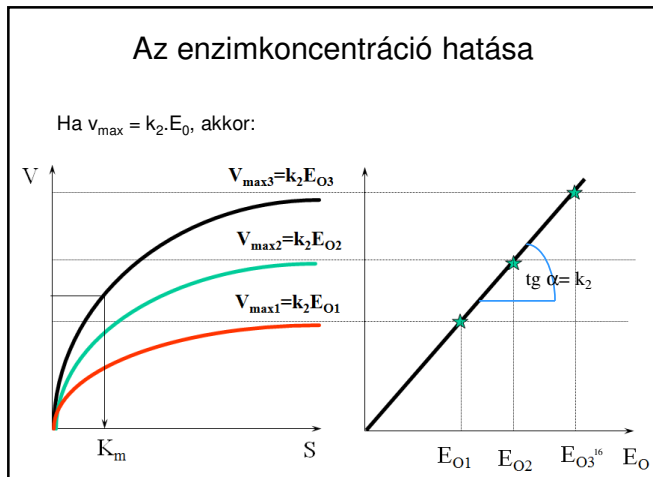
Linearizálások

2. Hanes-Langmuir linearizálás

$$\frac{S}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} + \frac{1}{V_{max}} \cdot S$$

3. Eady-Hofstee linearizálás

$$v = V_{max} - K_m \frac{v}{S}$$



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 szubsztátot alakít át.

17

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A kinetikai paraméterek: K_S , K_m

- \triangleright az enzim affinitása a szubsztáthoz
- \triangleright az élő sejtben közelítőleg ennyi az S koncentráció, mert így jól szabályozza a sebességet
- \triangleright Változott a $K_S \rightarrow$ Inhibitor? Aktivátor?
- \triangleright Enzimanalítika:

ha aktivitást mérek:
 $S \gg K_S \quad v = v_{max}$

ha szubsztátkoncentrációt mérek:
 $S \ll K_S$ lineáris tartomány

The graph shows reaction rate V on the y-axis and substrate concentration S on the x-axis. A hyperbolic curve approaches a horizontal asymptote at V_{max} . A green shaded region at low S is labeled 'Túl érzékeny' (too sensitive), and an orange shaded region at high S is labeled 'érzéketlen' (insensitive). The Michaelis constant K_m is marked on the x-axis. Vertical lines indicate ΔS_1 and ΔS_2 on the x-axis, and ΔV_1 and ΔV_2 on the y-axis.

18

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A kinetikai paraméterek

- k_1 10^7 - 10^{10} $\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{min}^{-1}$ [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

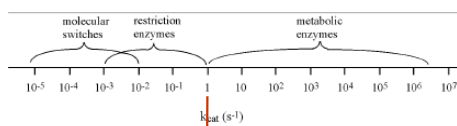
| Enzyme | Substrate | K_M (M) | k_{cat} (s^{-1}) | k_{cat}/K_M ($M^{-1} s^{-1}$) |
|----------------------|------------------------------|----------------------|------------------------|-----------------------------------|
| Acetylcholinesterase | Acetylcholine | 9.5×10^{-3} | 1.4×10^4 | 1.5×10^6 |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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

19

k_{cat} értékek



k_{cat} alsó határa metabolikus enzimeknél

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

Legtöbb enzim e két szélső eset között

Természetes enzimeknél: $>10^5$
 Mesterséges E-nél (DNA-zyme, abzyme): $<10^3$



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

20

Reverzibilis reakciók

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



Mindkét kinetikai leírásban feltételeztük, hogy a $k_{-2} = 0$, ezért a reverzibilis reakciót két ellentétes egyirányú folyamat leírásából állítjuk össze.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

21

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:

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

A közös elemet kiemelve:

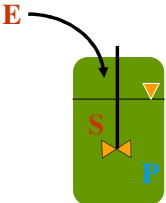
$$\frac{k_{+1}}{k_{-1}} S = \frac{(ES)}{E} = \frac{k_{-2}}{k_{+2}} P$$

Az eredő egyensúlyi állandót kifejezhetjük:

$$K_{eq(\text{uilibrium})} = \frac{P}{S} = \frac{k_{+1} k_{+2}}{k_{-1} k_{-2}} \quad \text{ugyanaz!}$$


22

Reverzibilis reakciók




MI TÖRTÉNIK? ?

$S \rightarrow P$ vagy $P \rightarrow S$

MITŐL FÜGG?

Itt feltételezzük az EP komplex létezését:

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


24

Reverzibilis reakciók

Az eredő sebesség a két folyamat különbsége:


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

Ezt az eddigiekhez hasonlóan az enzim anyagmértékével osztjuk el:

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

$$\frac{V_{\text{előre}}}{E_o} = \frac{k_2(ES)}{E + (ES) + (EP)} \qquad \frac{V_{\text{vissza}}}{E_o} = \frac{k_{-2}(EP)}{E + (ES) + (EP)}$$

ebből:

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


24

Reverzibilis reakciók

Behelyettesítve:

$$\Delta v = \frac{v_{\max S}(ES) - v_{\max P}(EP)}{E + (ES) + (EP)}$$

figyelembe véve, hogy:

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

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

Reverzibilis M-M egyenlet₂₅



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Reverzibilis reakciók

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

szubsztrát koncentráció eltérése az egyensúlytól.

$$\left(1 + \frac{P}{K_{mp}} \right) \quad \text{pedig analóg} \quad \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) \quad \text{-vel, azaz P kompetitív}$$

inhibítorként viselkedik.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

26
