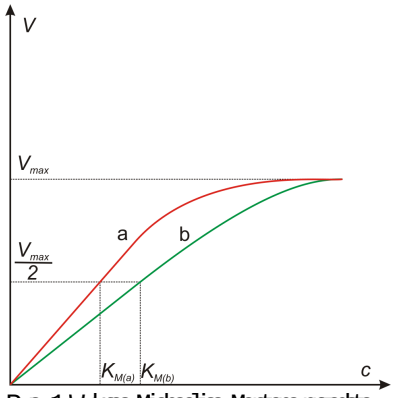
UNIWERSYTET PRZYRODNICZY
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
KATEDRA BIOCHEMII I FIZJOLOGII ZWIERZĄT
Zakład Biochemii
20-033 Lublin, ul. Akademicka 12
tel. 081 445 69 73

Kinetyka enzymatyczna
(część teoretyczna)

Kinetyka enzymatyczna opisuje wpływ różnych czynników (stężenia reagujących substancji, temperatury, pH, obecności katalizatorów i inhibitorów, itp.) na szybkość reakcji enzymatycznej. Poniżej omówiony został wpływ najważniejszych czynników na szybkość reakcji.

Wpływ stężenia substratu

Szybkość reakcji enzymatycznej (V) rośnie wraz ze wzrostem stężenia substratu (c). W pewnym przedziale stężeń (w reakcjach jednosubstratowych) szybkość reakcji jest liniowo zależna od stężenia substratu. Zależność tę przedstawia wykres **Michaelisa-Menten**. Krzywa zależności V od c ma przebieg hiperboliczny. Przy wysokim stężeniu substratu prędkość reakcji osiąga wartość maksymalną (V_{max}). Dalszy wzrost stężenia substratu nie zwiększa szybkości reakcji.

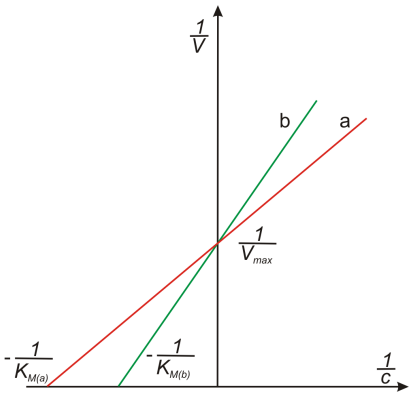


Rys. 1 Wykres Michaelisa-Mentena przedstawiający zależność szybkości reakcji (V) od stężenia substratu (c) dla enzymu o różnym powinowactwie do substratów a i b

Stężenie substratu, przy którym prędkość reakcji osiąga połowę prędkości maksymalnej, nosi nazwę stałej Michaelisa, oznaczanej symbolem K_M. Jest ona miarą powinowactwa enzymu do określonego substratu. Wyraża się ją najczęściej w µmol/dm^3.

W wielu przypadkach enzym może przekształcać kilka substratów, ale wykazuje różne powinowactwo do każdego z nich (Rys. 1). Poszczególne substraty są łatwiej – **a** bądź trudniej – **b** wiązane w miejscu aktywnym enzymu. W przypadku **a** reakcja osiąga prędkość maksymalną już przy niskim stężeniu substratu. Stała Michaelita jest niska. W przypadku **b** reakcja osiąga prędkość maksymalną przy wysokim stężeniu substratu. Stała Michaelita jest wysoka.

Zależność szybkości reakcji od stężenia substratu można przedstawić w postaci wykresu **Lineweavera-Burka** (Rys. 2). Na osi rzędnych oznacza się odwrotność prędkości reakcji, na osi odciętych odwrotność stężenia substratu. Zależność ma charakter liniowy. Prosta przecina osie współrzędnych w dwóch charakterystycznych punktach, oś rzędnych w punkcie od-



Rys. 2 Zależność szybkości (V) reakcji enzymatycznej od stężenia substratu (c) według Lineweavera-Burka), dla enzymu o różnym powinowactwie do substratów a i b

powiadającym odwrotności prędkości maksymalnej, a oś odciętych w punkcie odpowiadającym ujemnej odwrotności stałej Michaelisa.

✳ Reakcje enzymatyczne stanowią złożone układy kilku reakcji pośrednich o różnych szybkościach reakcji. W 1913 roku Michaelis i Menten zaproponowali zapis przebiegu reakcji enzymatycznej jako:

$$E+S \underset{v_2}{\overset{v_1}{\rightleftharpoons}} ES \underset{v_4}{\overset{v_3}{\rightleftharpoons}} E+P$$

gdzie: [E] - to stężenie enzymu, [S] - stężenie substratu, [P] – stężenie produktu i [ES] – stężenie kompleksu enzym-substrat, v_1 – szybkość powstawania kompleksu enzym-substrat, v_2 – szybkość rozkładu kompleksu enzym-substrat, v_3 – szybkość rozkładu kompleksu enzym-produkt, v_4 – szybkość powstawania kompleksu enzym-produkt.

Odpowiednie szybkości reakcji można zapisać następująco:

$$v_1 = k_1[E][S]\ ;\quad v_2 = k_2[ES]\ ;\quad v_3 = k_3[ES]\ ;\quad v_4 = k_4[E][P]$$

gdzie: k_1 – stała szybkości reakcji E + S → ES, k_2 – stała szybkości reakcji ES → E + S, k_3 – stała szybkości reakcji ES → E + P, k_4 – stała szybkości reakcji E + P → ES.
Kompleks ES tworzy się z szybkością $v_1 + v_2$, a rozkłada z szybkością $v_2 + v_3$. W stanie równowagi można przyjąć iż obie sumy są sobie równe $v_1 + v_2 = v_2 + v_3$. Po podstawieniu można zapisać:

$$k_1[E][S] + k_4[E][P] = k_2[ES] + k_3[ES]$$

$$[E](k_1[S]+k_4[P]) = [ES](k_2+k_3)$$

$$\frac{[ES]}{[E]} = \frac{k_1[S]+k_4[P]}{k_2+k_3} = \frac{k_1[S]}{k_2+k_3} + \frac{k_1[P]}{k_2+k_3}$$

Początkowe stężenie produktu [P] jest bardzo małe, można je więc pominąć:

$$\frac{[ES]}{[E]} = \frac{k_1[S]}{k_2+k_3}$$

$$\frac{[ES]}{[E][S]} = \frac{k_1}{k_2+k_3}$$

Szybkość reakcji zależy od stężenia kompleksu enzym substrat [ES], stałą równowagi omawianego układu można zapisać jako:

$$K = \frac{k_2+k3}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

Stała ta nosi nazwę stałej Michaelisa i jest oznaczana symbolem K_M.

W stanie równowagi stężenie enzymu [E] jest równe stężeniu enzymu wolnego niezwiązanego w kompleksie [ES], [E] = [E]-[ES], stąd można zapisać:

$$K_M = \frac{([E]-[ES])[S]}{[ES]}$$

Po przekształceniu otrzymujemy:

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_M+[S]}$$

Dzieląc stronami przez [S], otrzymujemy:

$$[ES] = \frac{[E]}{\frac{K_M}{[S]}+1}$$

Szybkość reakcji enzymatycznej determinuje głównie stężenie enzymu i szybkość przekształcania się kompleksu enzym-substrat [ES] w produkt. Opisuje to równanie: $v = v_3 = k_3[ES]$. Porównując powyższe równania otrzymujemy:

$$v = k_3 \frac{[E]}{\frac{K_M}{[S]}+1}$$

W przypadku gdy stężenie substratu [S] jest dużo większe od K_M, równanie można zapisać:

$$v = k_3[E]$$

Równanie to opisuje zatem szybkość maksymalną reakcji, oznaczaną jako V_{max}.
Podstawiając oznaczenie V_{max} otrzymujemy:

$$v = \frac{V_{max}}{\frac{K_M}{[S]}+1}$$

Przekształcając powyższe równanie można zapisać jako:

$$(V_{max} - v)(+[S]) = (V_{max} K_M)$$

Równanie to nosi nazwę równania Michaelisa-Menten. Jest to równanie hiperboli, która dąży do osiągnięcia wartości V_{max}.

Gdy stężenie substratu [S] równa się K_M wtedy równanie Michaelisa-Menten przybierze formę:

$$v = \frac{V_{max}}{2}$$

Pozwala to na graficzne wyznaczenie stałej Michaelisa K_M. Niestety metoda ta jest kłopotliwa, gdyż nie daje pewności czy osiągnięta została już szybkość maksymalna reakcji. Aby ułatwić wyznaczenie K_M przekształćmy równanie Michaelisa-Menten do postaci liniowej:

$$\frac{1}{v} = \frac{\frac{K_M}{[S]}+1}{V_{max}}$$

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

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max}} + \frac{1}{[S]}$$

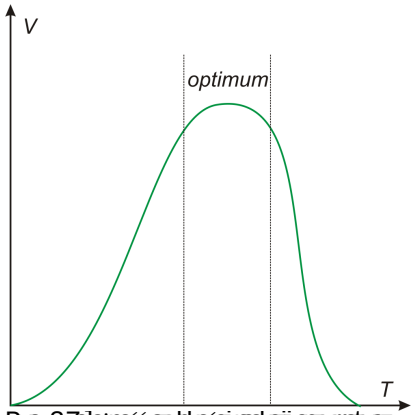
Powyższe równanie nosi nazwę równania Lineweavera-Burka.

Wpływ temperatury

Prędkość reakcji enzymatycznej w pewnym przedziale temperatur (0-40°C) wzrasta wraz z temperaturą. Na ogół wzrost temperatury o 10°C podwaja prędkość reakcji, którą charakteryzuje współczynnik vant Hoffa.

Większość enzymów traci nieodwracalnie aktywność powyżej 65°C, gdyż następuje denaturacja cieplna białek enzymatycznych.

Wzrost szybkości reakcji pod wpływem temperatury jest wynikiem aktywacji cząsteczek substratów. Energia ta, zwana energią aktywacji, powoduje rozluźnienie wiązań w reagujących cząsteczkach oraz służy do pokonania sił odpychania międzycząsteczkowego.



Rys. 3 Zależność szybkości reakcji enzymatycznej (V) od temperatury (T)

Enzymy zmniejszając energię aktywacji obniżają barierę energetyczna pomiędzy poszczególnymi reagującymi cząsteczkami. Obniżenie energii aktywacji nawet nieduże, prowadzi do znacznego wzrostu szybkości reakcji. Np. w procesie rozkładu H_2O_2 na O_2 i H_2O, energia aktywacji bez katalizatora wynosi 75kJ/mol, w obecności katalazy tylko 23 kJ/mol, a reakcja przebiega $3x10^{11}$ razy szybciej.

Optymalne temperatury zależne są od czasu inkubacji, pH, stężenia soli, obecności aktywatorów, inhibitorów. Aktywność w temperaturze optymalnej nie jest stała, ale spada w miarę przedłużania czasu pomiaru (przebiegu reakcji). Zjawisko to ma kilka przyczyn: narastanie szybkości o kierunku przeciwnym w miarę gromadzenia się produktów reakcji,

hamowanie aktywności przez produkt, zmniejszenie stężenia substratu, zmiany pH i itp.

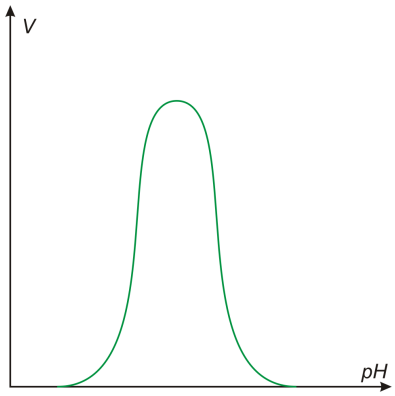
✳ Współczynnik vant Hoffa wskazuje ile razy zwiększy się szybkość reakcji przy podniesieniu temperatury o 10°.

$$Q_{10} = \frac{k_{T+10}}{k_T}$$

gdzie: k_T – stała szybkości rekcji w temperaturze wyjściowej, k_{T+10} – stała szybkości rekcji w temperaturze o 10° wyższej.

Wpływ pH

Optymalne pH dla każdego enzymu utrzymywane jest przy pomocy buforów. Wykazano, że skład i stężenie (siła jonowa) użytego bufor ma istotne znaczenie przy wyznaczaniu optimum pH, które może okazać się różne w odmiennych buforach. Z reguły szybkość reakcji enzymatycznej jest odwrotnie proporcjonalna do kwadratu siły jonowej. Składniki buforu mogą wpływać aktywująco lub hamująco na aktywność enzymu w sposób bezpośredni lub pośredni. Wpływ bezpośredni związany jest z oddziaływaniem składników buforu na centrum aktywne, zaś pośredni z jonizacją grup poza centrum aktywnym. Składniki buforu mogą również reagować z kofaktorami, wiązać np. kationy wymagane do aktywności enzymów (wapń przez ortofosforany w buforze fosforanowym). Należy również zwracać uwagę na pojemność buforową, zwłaszcza gdy w przebiegu reakcji powstają produkty kwasowe, które mogą doprowadzić do przekroczenia pojemności i znacznej zmiany pH.



Rys. 4 Zależność szybkości reakcji enzymatycznej (V) od pH (pH)

Większość enzymów jest nieczynna poniżej pH 4 oraz powyżej pH 10 (po przekroczeniu tych skrajnych wartości następuje zwykle denaturacja białka enzymatycznego). Optimum pH dla enzymów z wyciągów tkankowych znajduje się w środowisku zbliżonym do obojętnego. Są też enzymy o skrajnych optimach pH, np. dla pepsyny przypada ono w pH – 1,5, dla fosfatazy alkalicznej w pH – 9,5.

Wpływ aktywatorów

Różnego rodzaju aktywatory nie biorące udziału w reakcji katalitycznej uczynniają enzymy lub zwiększają ich aktywność. Można je podzielić na 3 grupy:

1. jony niektórych metali, wbudowanych w cząsteczkę apoenzymu,
2. związki wielkocząsteczkowe o charakterze białkowym działające przez odsłonięcie grup czynnych,
3. drobnocząsteczkowe połączenia organiczne usuwające wpływ związków hamujących.

Liczne „pierwiastki śladowe” są niezbędnymi składnikami pokarmowymi dla organizmu ponieważ pełnią rolę swoistych aktywatorów poszczególnych enzymów.

Enzymy są aktywowane najczęściej przez następujące jony:

1. Mg^{2+} (fosfatazy, fosforylazy, fosfokinazy, syntetazy),
2. Zn^{2+} (anhydraza węglanowa, dehydrogenaza mleczanowa i alkoholowa oraz proteazy),
3. Mn^{2+} (peptydazy, arginaza),
4. Ca^{2+} (lipaza),
5. Cu^{2+} (oksydazy),
6. oraz niekiedy Fe^{3+}, Fe^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Na^{+}, K^{+}. Kationy metali ciężkich mają działanie hamujące.

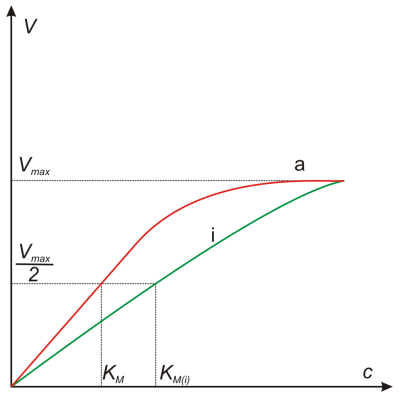
Aniony mają mały wpływ na aktywność enzymów. Wyjątkiem jest amylaza aktywowana chlorkami.

Enzymy niekiedy wydzielane są w postaci nie wykazującej czynności katalitycznej, czyli w postaci prekursorów (proenzymów). Na przykład trypsynogen przechodzi w czynną postać, trypsynę, pod działaniem aktywatora – proteolitycznego enzymu enteropeptydazy (enterokinazy).

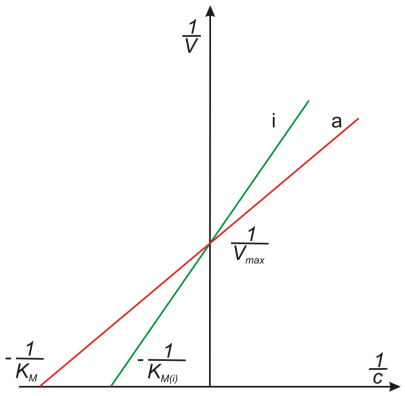
Aktywność wielu enzymów łatwo ulega zahamowaniu. Proces ten nazywamy inhibicją, a czynniki hamujące przebieg reakcji enzymatycznych to inhibitory. Dzielą się one na 3 grupy:

1. inhibitory kompetycyjne (współzawodniczące)
2. inhibitory niekompetycyjne (niewspółzawodniczące)
3. inhibitory akompetycyjne

Inhibitory kompetycyjne charakteryzują się budową chemiczną podobną do substratu. Dzięki temu mogą konkurować z substratem o miejsce w centrum aktywnym enzymu i przyłączają się tylko w tym miejscu. Konsekwencją tych właściwości jest zależność stopnia inhibicji od stężenia inhibitora i odwracalność takiej inhibicji.



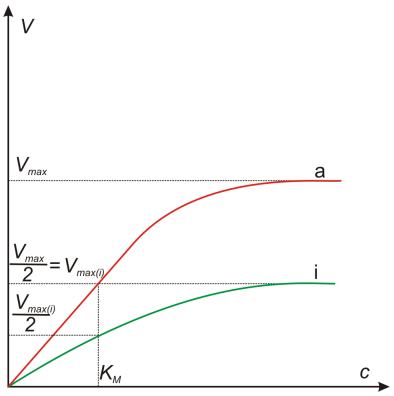
Rys. 5 Wykres Michaelisa-Mentena w obecności inhibitora kompetencyjnego (i) i jego braku (a)



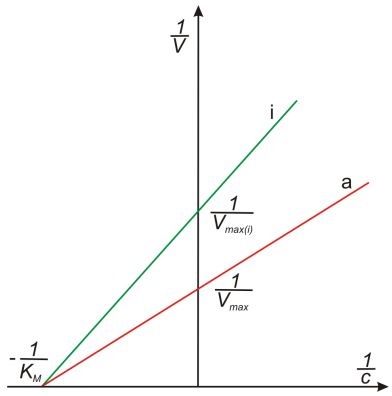
Rys. 6 Wykres Lineweavera-Burka w obecności inhibitora kompetencyjnego (i) i jego braku (a)

Wartość K_M ulega zwiększeniu, V_{max} pozostaje bez zmian, a stosunek tych wartości do siebie wzrasta.

Inhibitory niekompetycyjne mogą mieć różną budowę, łączą się nie tylko z enzymem, ale również z całym kompleksem enzym-substrat, blokując jego przekształcenie i rozpad. Wartość K_M pozostaje bez zmian, V_{max} zmniejsza się, a ich stosunek wzrasta.



Rys. 7 Wykres Michaelisa-Mentena w obecności inhibitora niekompetencyjnego (i) i jego braku (a)

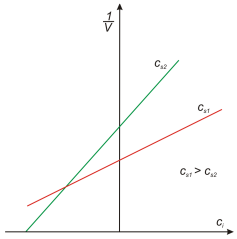


Rys. 8 Wykres Lineweavera-Burka w obecności inhibitora niekompetencyjnego (i) i jego braku (a)

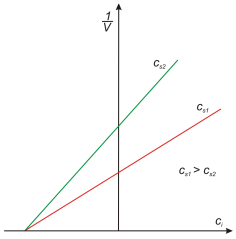
Inhibitory akompetycyjne łączą się tylko z kompleksem enzym-substrat. Wartość K_M w tej sytuacji zmniejsza się, V_{max} także, a ich stosunek pozostaje bez zmian.

✳ W praktyce wiele inhibitorów wykazuje właściwości pośrednie pomiędzy inhibicją kompetycyjną i niekompetycyjną. Zjawisko to opisano jako inhibicję mieszaną.

✳ Typ hamowania (kompetycyjny lub niekompetycyjny) można określić też za pomocą metody Dixona. Przy stałym stężeniu substratu oznacza się szybkość reakcji przy różnych stężeniach inhibitora. Powtarzając oznaczenie dla innego stężenia substratu (c_s)(lub kilku) wykreśla się zależność *1/V* od stężenia inhibitora (c_i). Miejsce przecięcia się ze sobą wykresów dla różnych stężeń określa stalą reakcji łączenia się inhibitora z enzymem w kompleks enzym-inhibitor.



Rys. 9 Wykres Dixona dla inhibitora kompetecyjnego



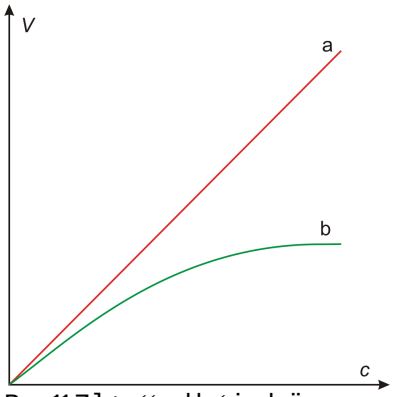
Rys. 10 Wykres Dixona dla inhibitora niekompetecyjnego

Wpływ stężenia enzymu i czasu

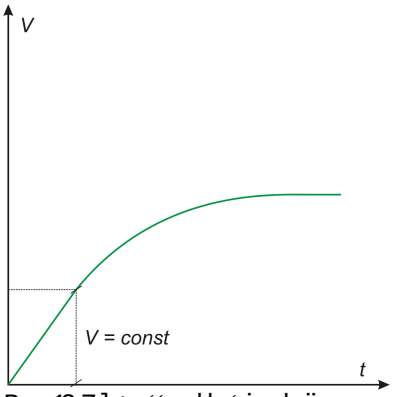
Zależność szybkości reakcji od stężenia enzymu najdogodniej jest obserwować przy dużych stężeniach substratu, kiedy szybkość ta nie jest zależna od stężenia substratu (reakcja zerowego rzędu) i jest ona proporcjonalna do stężenia enzymu (przy niezbyt dużych stężeniach enzymu).

W mieszaninie reagującej w ustalonych warunkach, optymalnych dla reakcji enzymatycznych, aktywność enzymów tylko w pewnym okresie czasu ma wartość stałą (szybkość reakcji jest funkcją prostej), następnie spada. Wówczas stężenia przetworzonego substratu (tworzącego się produktu) przestają być proporcjonalne do stężenia enzymu. Dlatego w reakcjach enzymatycznych ważne jest aby prowadzić pomiary w takim okre-

sie, kiedy szybkość reakcji ma wartość stałą, tzn., że reakcja ma kinetykę zerowego rzędu, lub dokonanie pomiarów tzw. szybkości początkowej reakcji. Szybkość początkowa jest niezależna od rzędu reakcji.



Rys. 11 Zależność szybkości reakcji enzymatycznej (V) od stężenia enzymu (c) przy 2 różnych stężeniach substratu (a – enzym wysycany substratem, b – enzym nie wysycany substratem)



Rys. 12 Zależność szybkości reakcji enzymatycznej (V) od czasu (t)

I. Bańkowski E., Biochemia, 2004, Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław,
II. Mierzejewski T., Wierciński J., Misky-Pietrzak R., Słowikowska-Postój B., Przewodnik do ćwiczeń z chemii ogólnej i biochemii zwierząt, 1990, Wydawnictwo Akademii Rolniczej, Lublin,
III. Kłyszejko-Stefanowicz L. (red.), Ćwiczenia z biochemii, 1980, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa.