

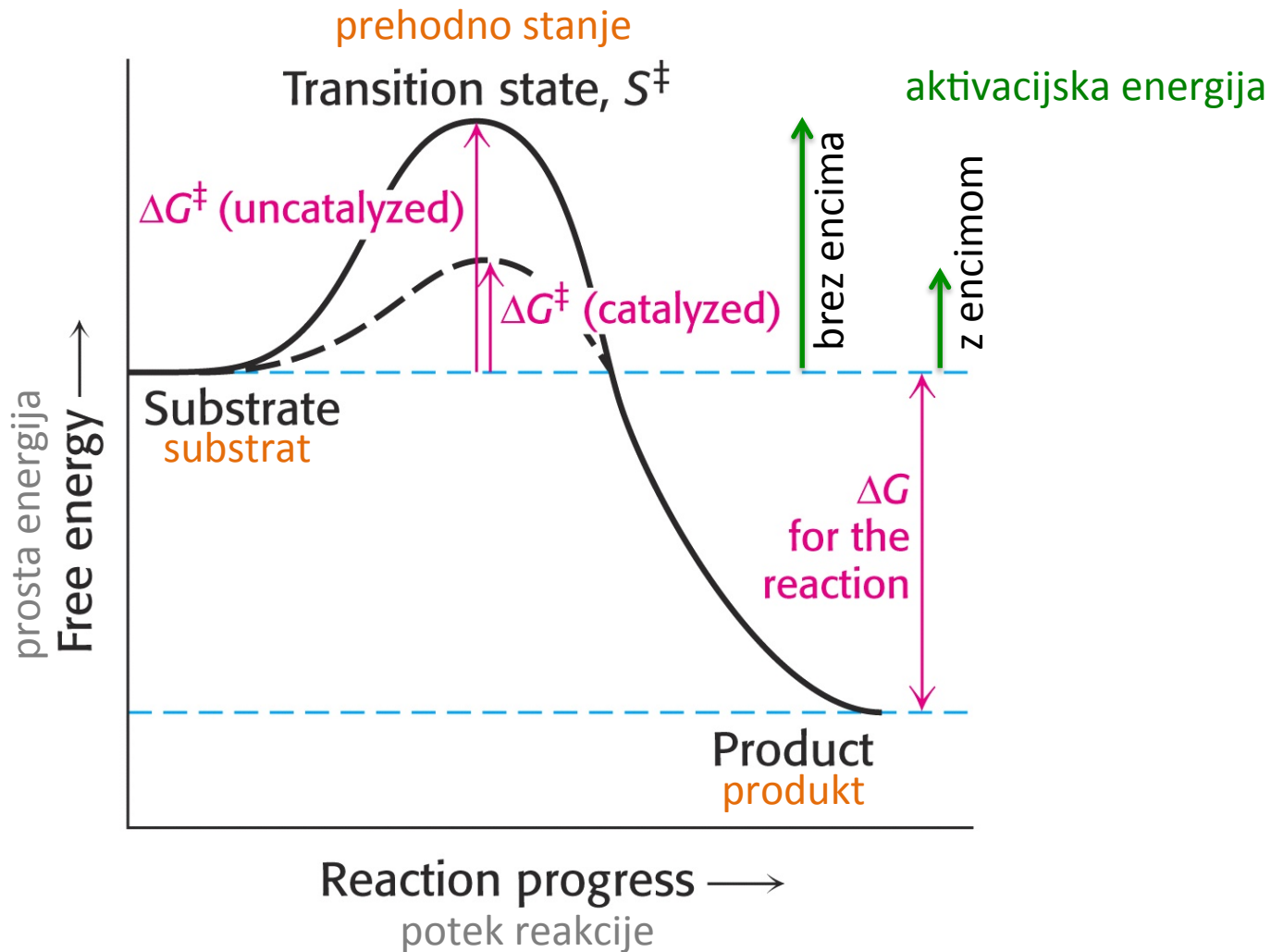
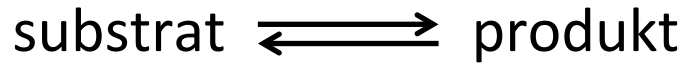
Univerza v Ljubljani
Fakulteta za *kemijo in kemijsko tehnologijo*
Katedra za biokemijo



Biokemijski praktikum

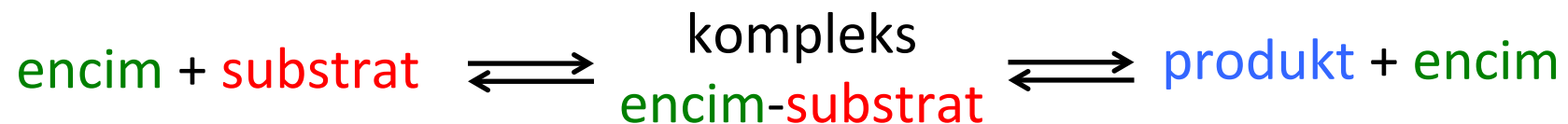
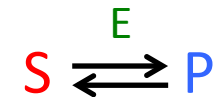
11. vaja – Kinetika encimsko kataliziranih reakcij

Kemijske reakcije in energija



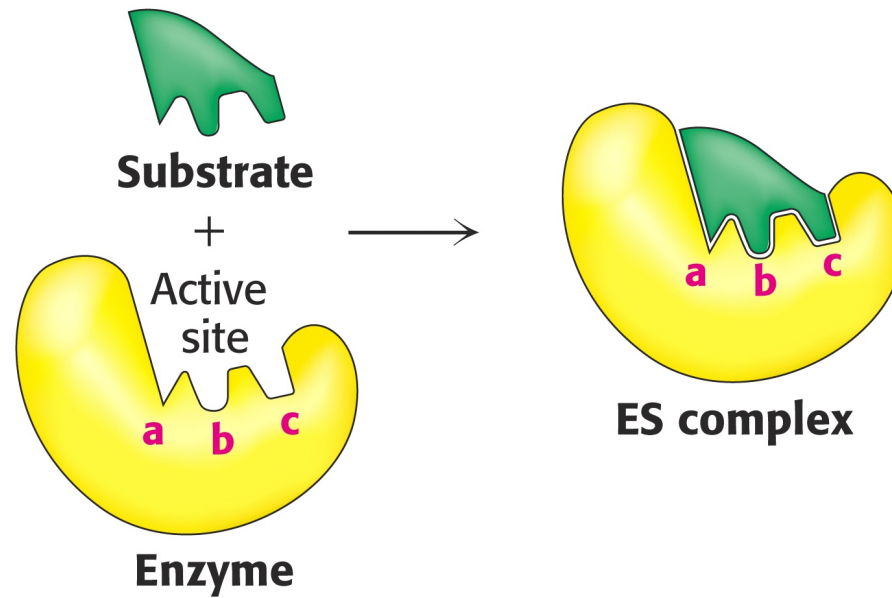
Encimsko katalizirane reakcije

- encimi – biološki katalizatorji
- encimi se pri reakciji, ki jo katalizirajo, ne spremenijo

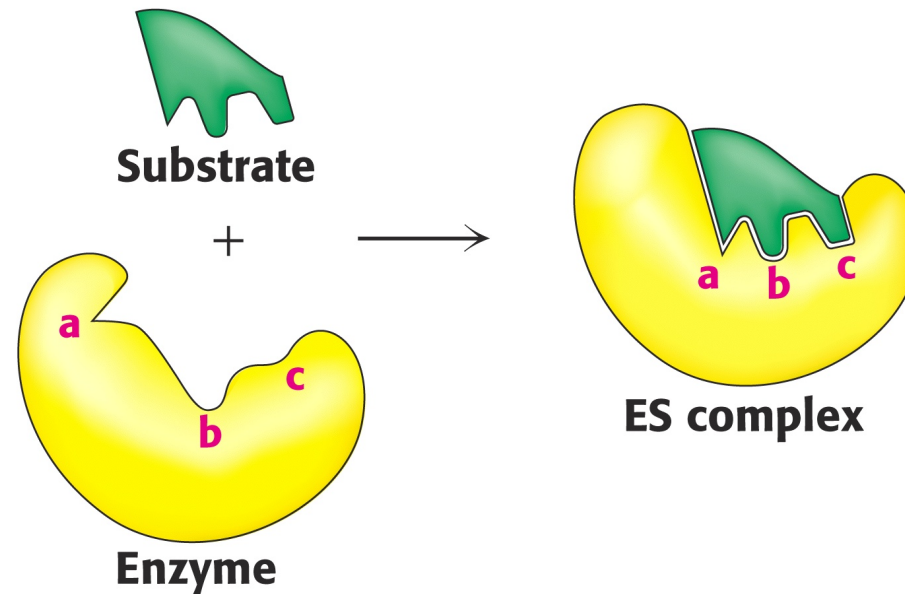


Specifičnost

ujemanje



inducirano ujemanje
(ang. *induced fit*)



Reakcijska hitrost in konstante reakcijske hitrosti

Na splošno velja: reakcijska hitrost = $v = \frac{d[P]}{dt}$

Za **monomolekularne** reakcije velja:

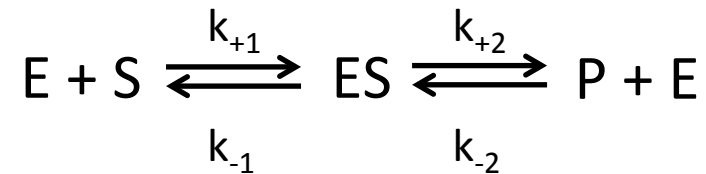
$$v = k[\text{reaktant}]$$

Za **bimolekularne** reakcije velja:

$$v = k[\text{reaktant}_1][\text{reaktant}_2]$$

k – konstanta reakcijske hitrosti

Reakcijska hitrost in konstante reakcijske hitrosti



$$\text{reakcijska hitrost} = v = \frac{d[P]}{dt}$$

$$\text{hitrost nastanka ES} = \frac{d[ES]}{dt} = k_{+1}[E_0][S] + k_{-2}[P][E_0]$$

$$\text{hitrost razpada ES} = -\frac{d[ES]}{dt} = k_{-1}[ES] + k_{+2}[ES]$$

$[E_0]$ – koncentracija prostega encima

“Steady state” (stanje dinamičnega ravnotežja)



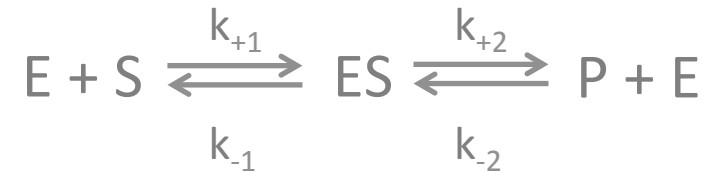
- v začetku reakcije kompleks ES šele nastaja
- hkrati z nastajanjem kompleksa ES začne le-ta tudi razpadati
- po določenem času se hitrosti nastanka in razpada kompleksa ES izenačita - dosežemo **stanje dinamičnega ravnotežja**

hitrost nastanka ES = hitrost razpada ES

$$k_{+1}[E_0][S] + k_{-2}[P][E_0] = k_{-1}[ES] + k_{+2}[ES]$$

kratak čas po začetku reakcije: $[P]=0$

Michaelis-Mentenova konstanta



- koncentracije prostega encima E_0 in koncentracije kompleksa ES ne moremo meriti \rightarrow izpeljemo $[E]_{\text{celotna}}$

$$k_{+1}[E_0][S] + k_{-2}[P][E_0] = k_{-1}[ES] + k_{+2}[ES]$$

$$[E]_{\text{cel}} = [E_0] + [ES]$$

$[P] \sim 0$
ob začetku
reakcije
(nasl. slika!)

$$k_{+1}([E]_{\text{cel}} - [ES])[S] = (k_{-1} + k_{+2})[ES]$$

$$[ES](k_{-1} + k_{+2} + k_{+1}[S]) = k_{+1}[E]_{\text{cel}}[S]$$

$$[ES] = \frac{[E]_{\text{cel}}[S]}{\frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} + [S]} \quad \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} = K_M$$

Začetna hitrost reakcije (ob $t = 0$) v_0

- pojem vpeljemo zato, da se pri računanju izognemo težavam zaradi:
 - reakcije $P \rightarrow S$ (posebej pri visokih konc. produkta),
 - inhibicije encima s strani produkta in
 - postopne inaktivacije encima



$$v_0 = \left(\frac{d[P]}{dt} \right)_{t=0} = k_{+2}[ES] = k_{+2} \frac{[E]_{\text{cel}} [S]}{K_M + [S]}$$

Maksimalna hitrost & Michaelis-Mentenova enačba

- dosežemo jo pri visokih koncentracijah substrata
- velja $[ES] = [E]_{\text{cel}}$ (ves encim je nasičen s substratom)

$$v_{\text{max}} = k_{+2}[ES]$$

$$v_0 = k_{+2} \frac{[E]_{\text{cel}} [S]}{K_M + [S]}$$



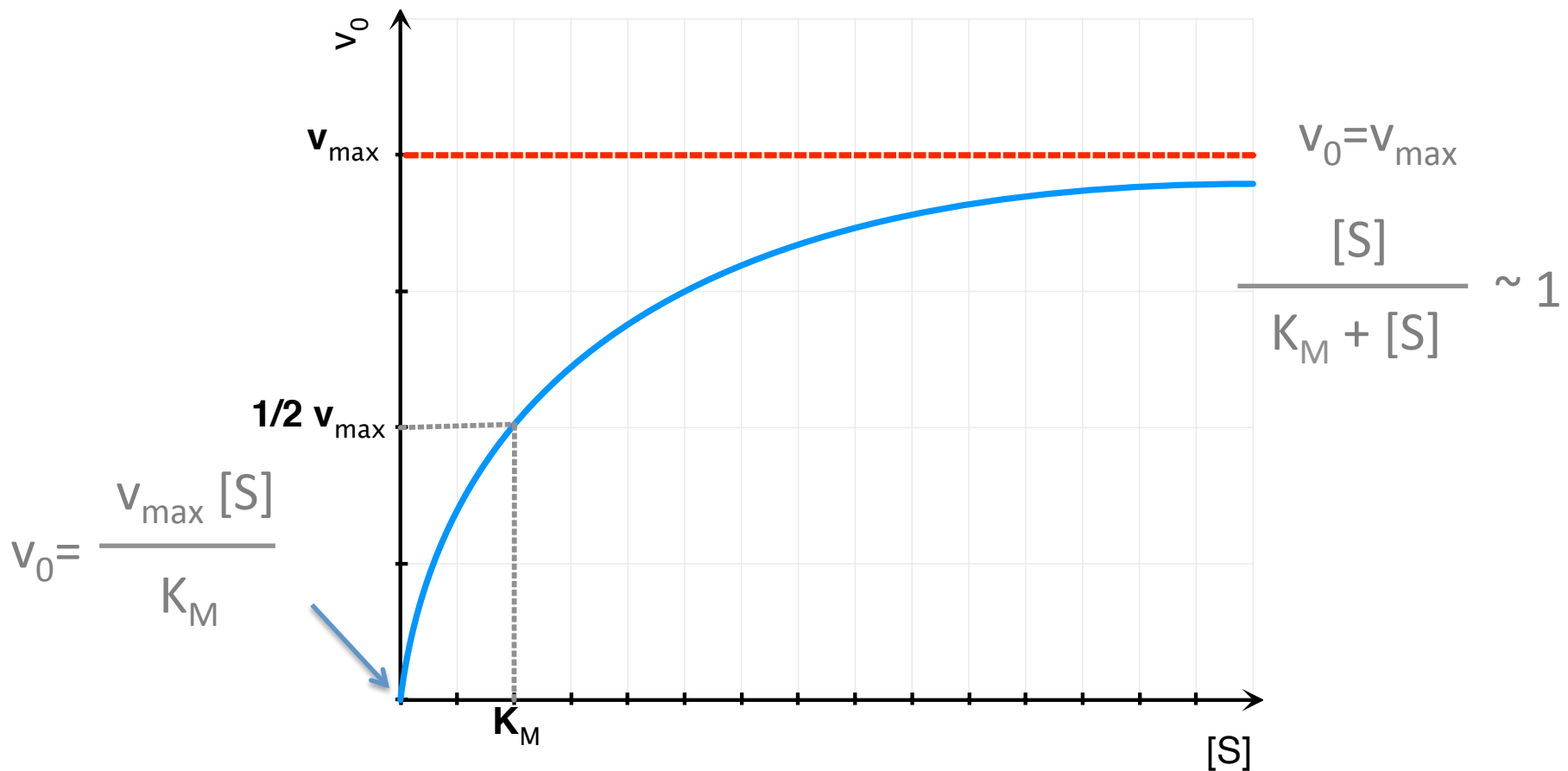
**Michaelis-
Mentenova
enačba**

$$v_0 = \frac{v_{\text{max}}[S]}{K_M + [S]}$$

Michaelis-Mentenova krivulja

$$v_0 = \frac{v_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

- K_M je tista konc. substrata, pri kateri je $v_0 = v_{\max}/2$
- **K_M ima enoto koncentracije!!!**
- **nizka** vrednost K_M pomeni **visoko afiniteto** encima do substrata



Pretvorbno število

- pretvorbno število (angl. *turnover number*) = katalizna konstanta
- pove nam število molekul substrata, ki jih ena molekula encima v enoti časa pretvori v produkt (ob predpostavki, da je encim nasičen s substratom)

$$k_{\text{cat}} = k_{+2}$$

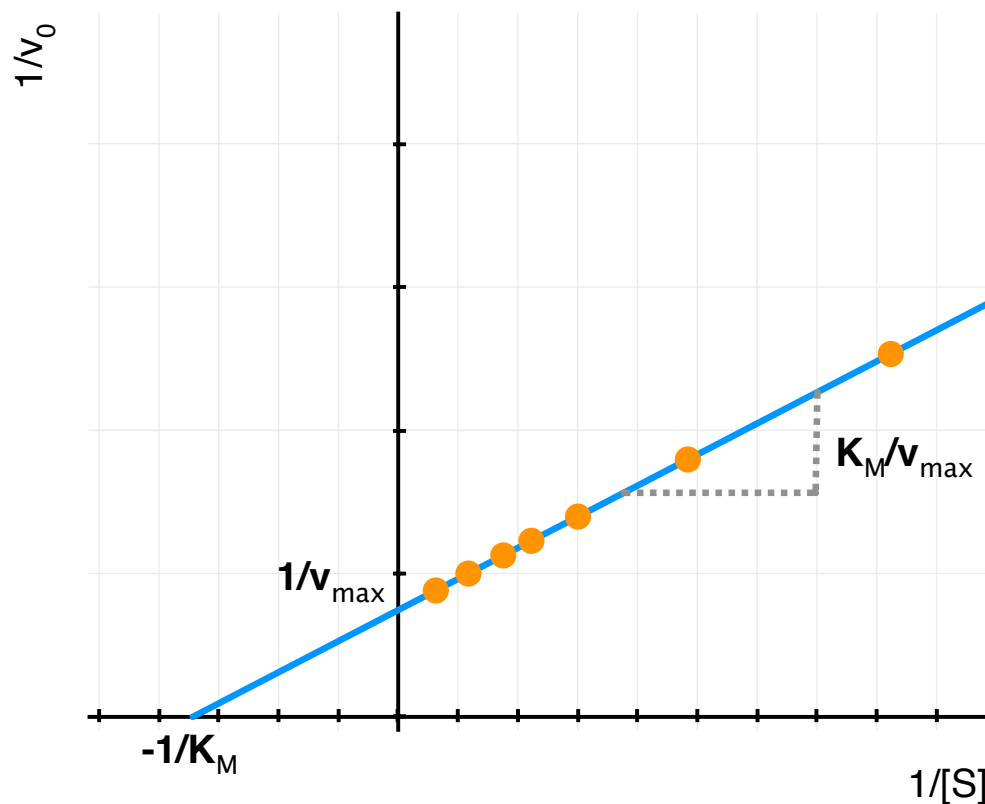
Linearizacija Michaelis-Mentenove krivulje

- iz običajne krivulje je težko odčitati K_M in v_{max} → **linearizacija**
- pogoste metode linearizacije:
 - Lineweaver-Burkova metoda (najmanj točna)
 - Eadie-Hofsteejeva metoda
 - Hanesova metoda

Lineweaver-Burkova metoda

(dvojna recipročna zveza)

$$v_0 = \frac{v_{\max}[S]}{K_M + [S]} \xrightarrow{\text{"obrnemo"}} \frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{v_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}}$$



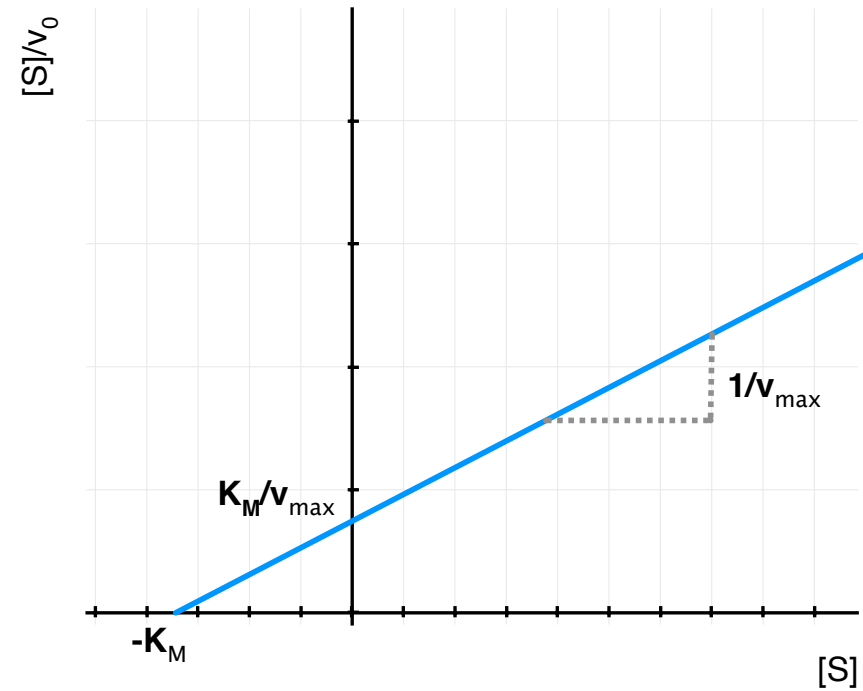
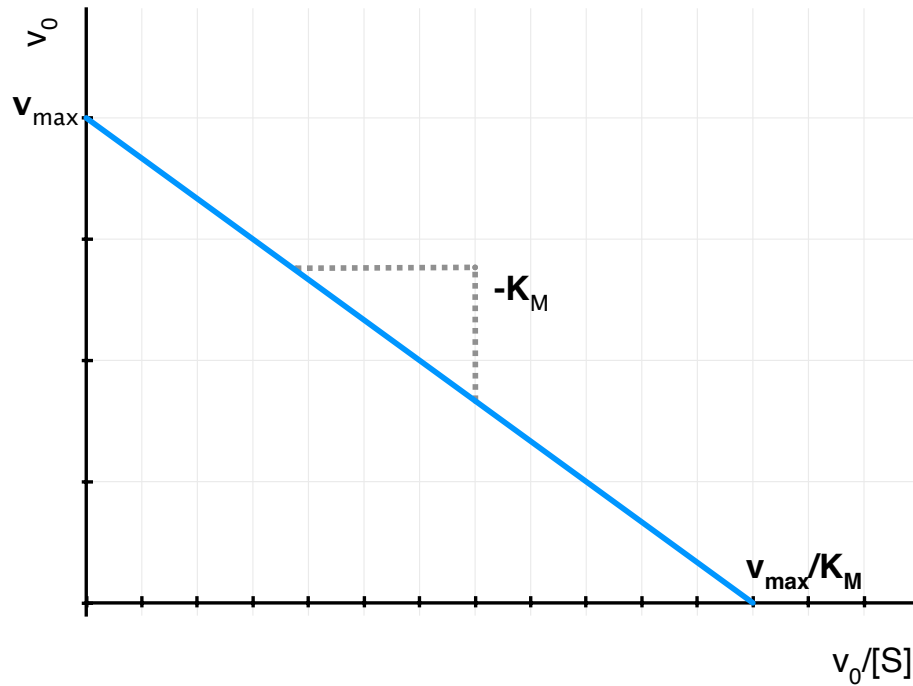
Slabosti:

- težko izberemo odstopajoče meritve
- majhne napake pri nizkih $[S]$ → velika odstopanja pri $1/[S]$
- neenakomerna porazdelitev točk

Eadie-Hofsteejeva metoda

Hanesova metoda

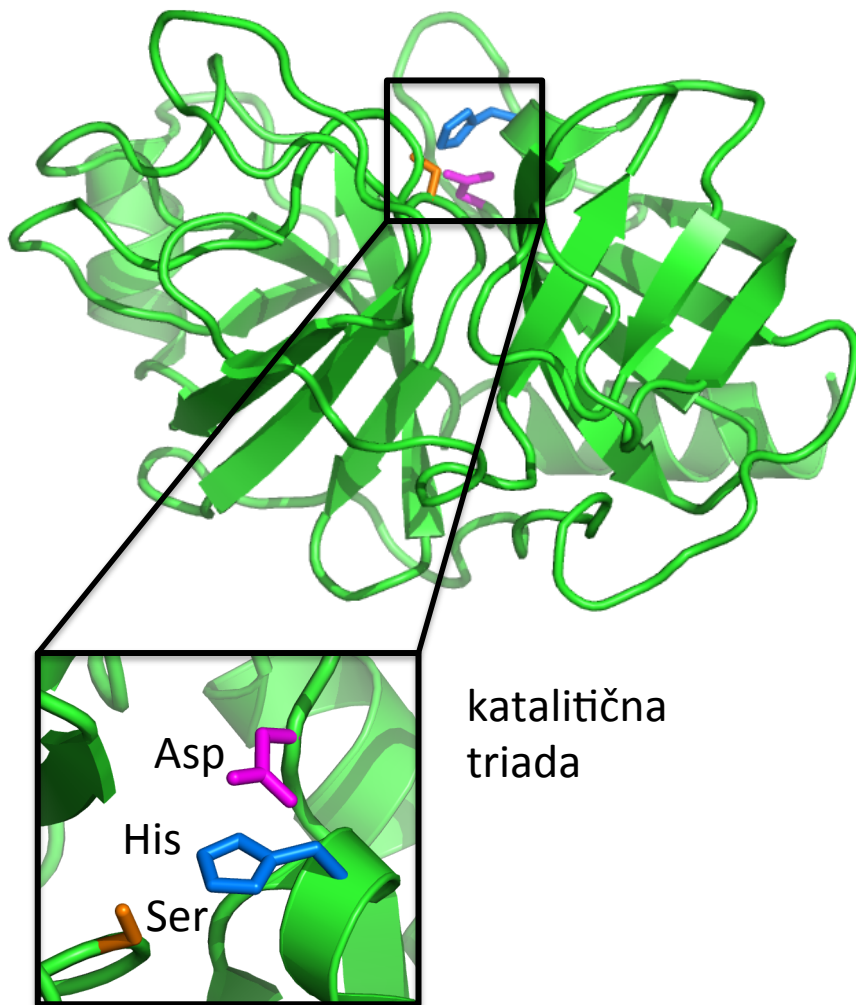
$$v_0 = v_{\max} - K_M \frac{v_0}{[S]} \leftarrow v_0 = \frac{v_{\max}[S]}{K_M + [S]} \rightarrow \frac{[S]}{v_0} = \frac{K_M}{v_{\max}} + \frac{1}{v_{\max}} [S]$$



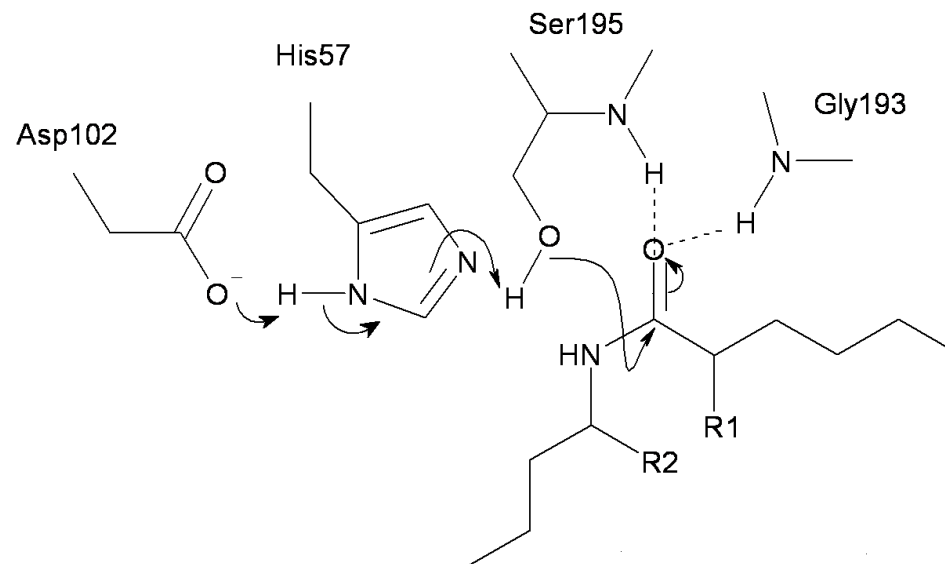
11. vaja

Namen: določitev K_M in v_{max} za sistem tripsin-BAPNA

tripsin – serinska peptidaza



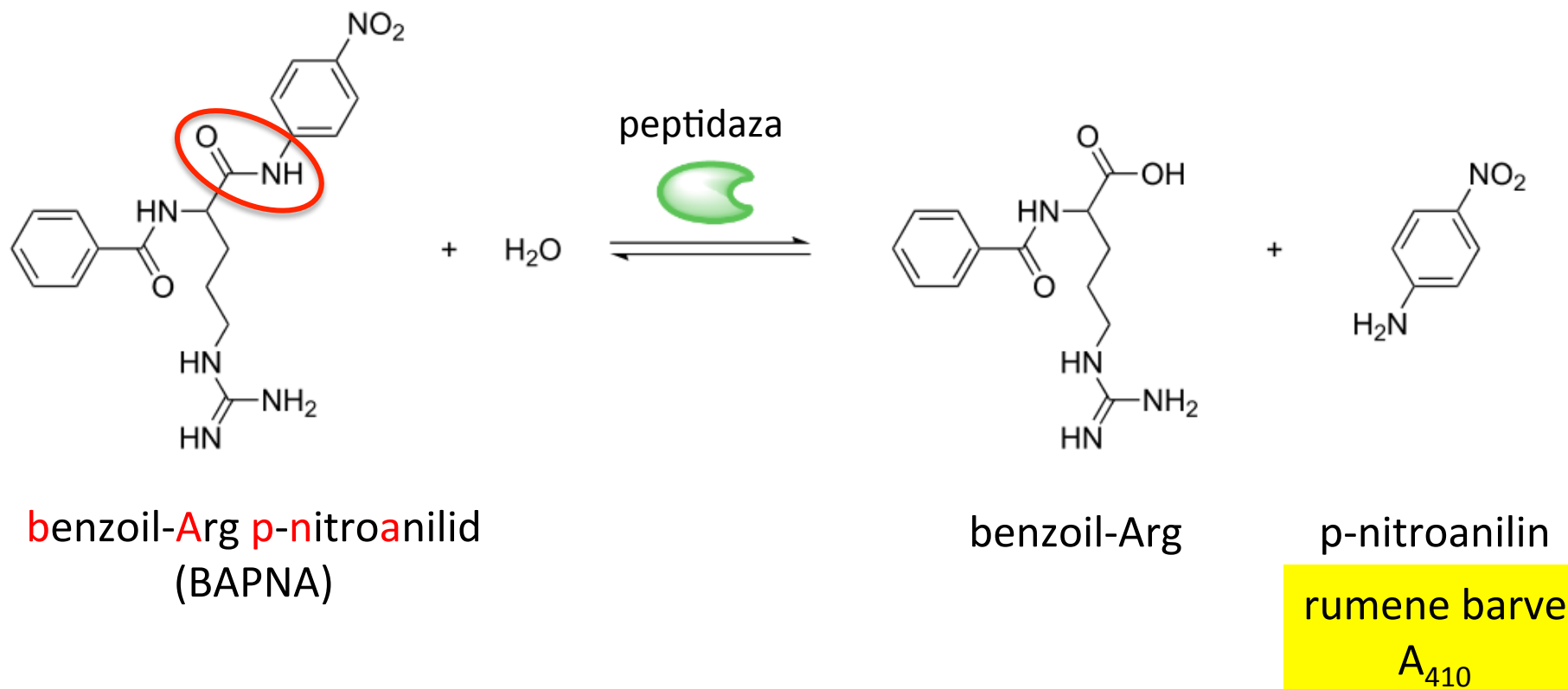
Ser je vključen v nukleofilni napad na CO peptidne vezi substrata



11. vaja

Namen: določitev K_M in v_{max} za sistem tripsin-BAPNA

BAPNA – sintetični substrat

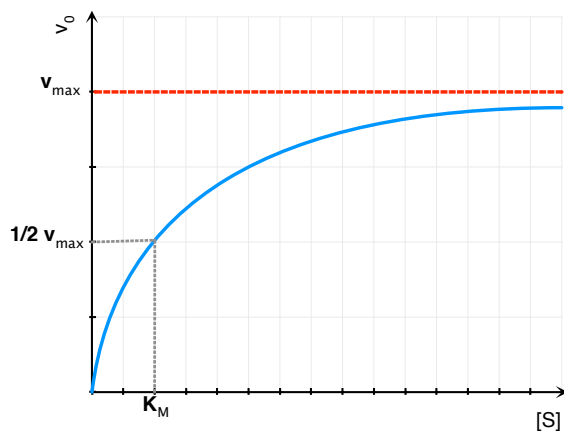


11. vaja

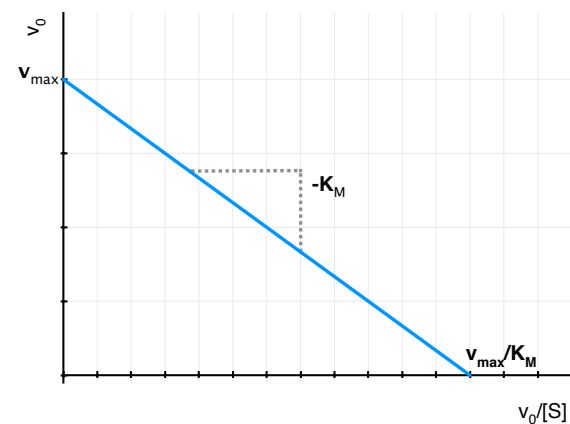
Namen: določitev K_M in v_{\max} za sistem tripsin-BAPNA

Postopek dela:

1. Priprava raztopin substrata (različne konc. BAPNA).
2. Merjenje encimske hitrosti ($A_{410}(t)$) pri različnih [BAPNA].
3. Določitev K_M in v_{\max} iz:



Michaelis-Mentenovega diagrama



Eadie-Hofsteejevega diagrama