


## Enzimkinetika

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

$$E + S \leftrightarrow E + P$$

A sztöchiometriához mindegyiket mól-ban vagy grammal kellene kifejezni. De: az enzimpreparátum sohasem tiszta.  
 Ezért az enzimek mennyiségét a hatásuk alapján adjuk meg:




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<sup>-9</sup> Kat  
 1 U = 16,67 nanoKatal


Fajlagos aktivitás:      U/mg,      U/ml



2

## Enzimkinetika

Kérem, hogy jegyezzék fel azoknak a diáknak a sorszámát, amit már tanultatok máshol! (Pl. fizikéből, reakciókinetikaként.) Kíváncsi vagyok a határra, amitől kezdve újat mondok.  
 Később Slidoval elkérem a számokat.



3

## Michaelis-Menten kinetika


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

Kiindulási feltételezések:

- k<sub>2</sub> = 0 (a második lépés irreverzibilis)
- az első lépés gyorsan egyensúlyra jut = **RAPID EKUILIBRIUM**: k<sub>1</sub>SE = k<sub>-1</sub>(ES)

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

- az ES komplex stabil, az EP komplex elhanyagolható



4


## Michaelis-Menten kinetika

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

- egy aktív centrum, egy szubsztrát
- aktivitás helyett koncentráció használható
- (S) >> (E<sub>0</sub>) vagyis E<sub>0</sub> / S << 1

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

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



5

## 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:

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


**V<sub>max</sub> = k<sub>2</sub>E<sub>0</sub>** mert  $V = \frac{dP}{dt} = k_2(ES)$  volt



6

### Michaelis-Menten kinetika

Ebből a sebességi egyenlet:

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


7

### 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



8

### Briggs-Haldane kinetika

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

Ugyanazok a difegyenletek, de a feltételezés: (kvázi) állandósult állapot = steady state ↓


$$\frac{dS}{dt} = -k_1 ES + k_{-1}(ES)$$

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

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

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

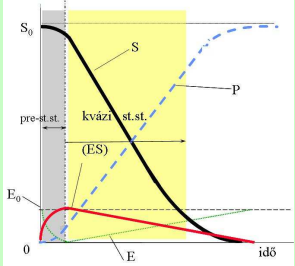
(S) >> (E<sub>0</sub>) vagyis E<sub>0</sub>/S << 1  
 k<sub>1</sub>ES > k<sub>-1</sub>(ES) ill. k<sub>1</sub>ES > k<sub>2</sub>(ES)




9

### Briggs-Haldane kinetika

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



10

### 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



11

### Diskusszió

Michaelis-Menten

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

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

Briggs-Haldane

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

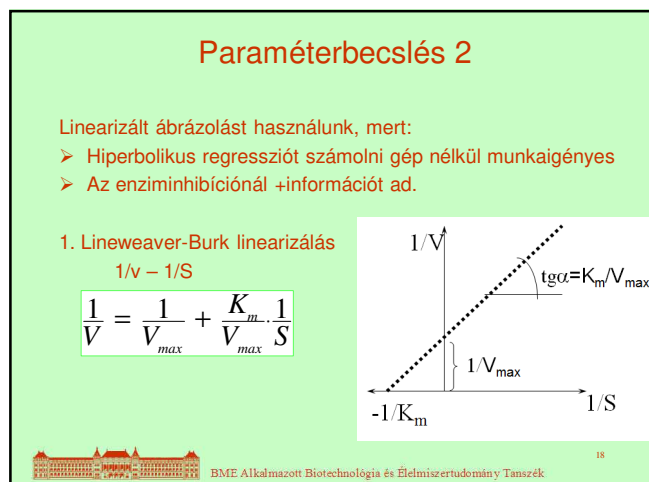
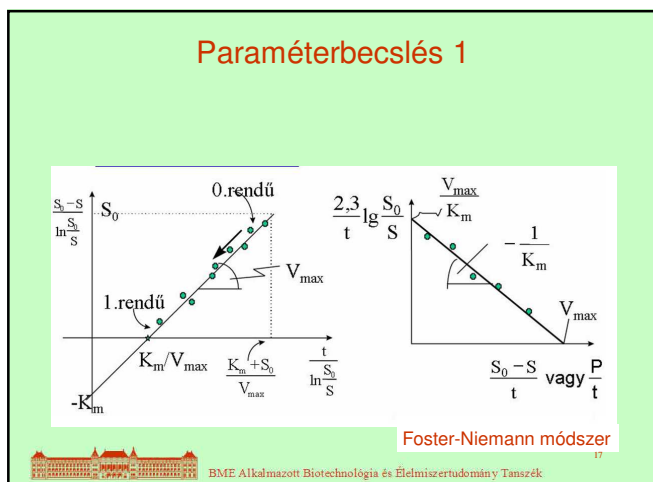
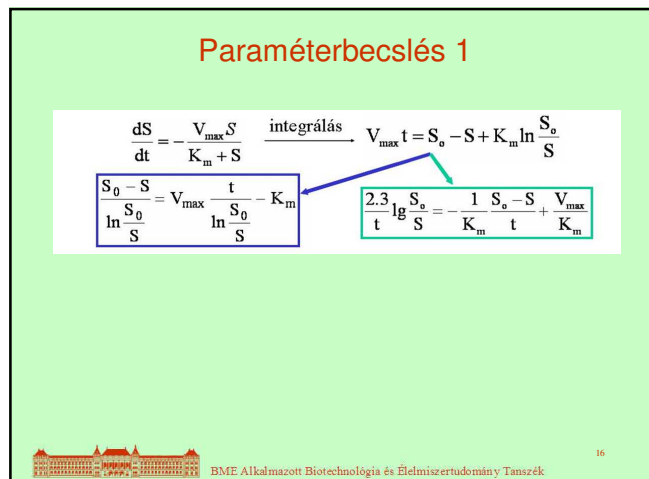
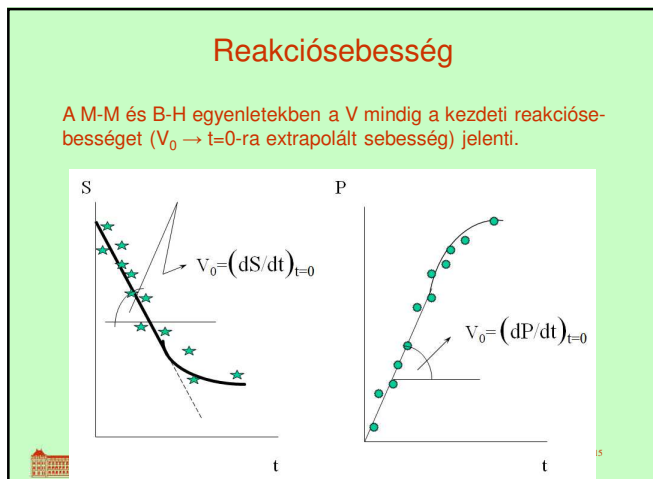
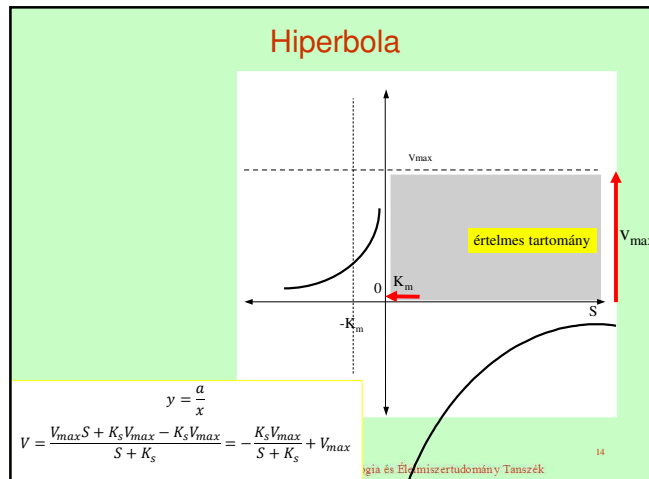
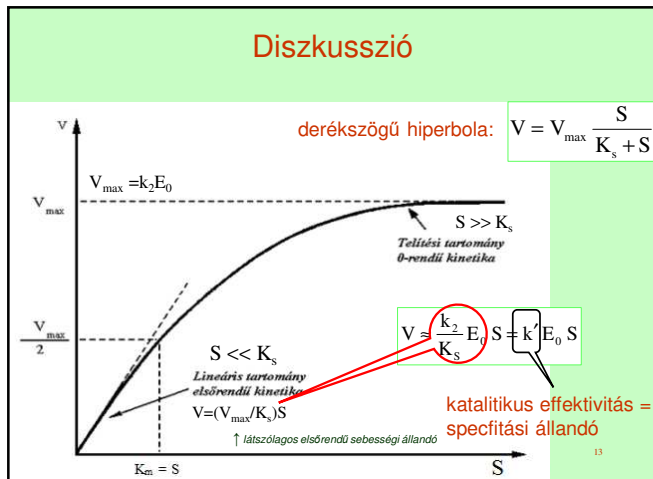
$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

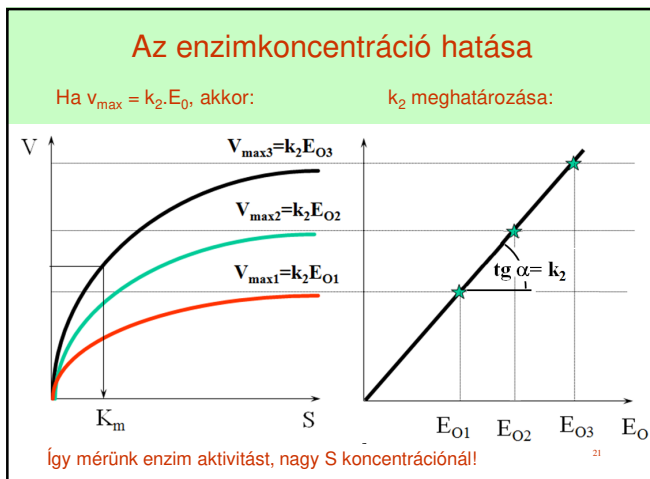
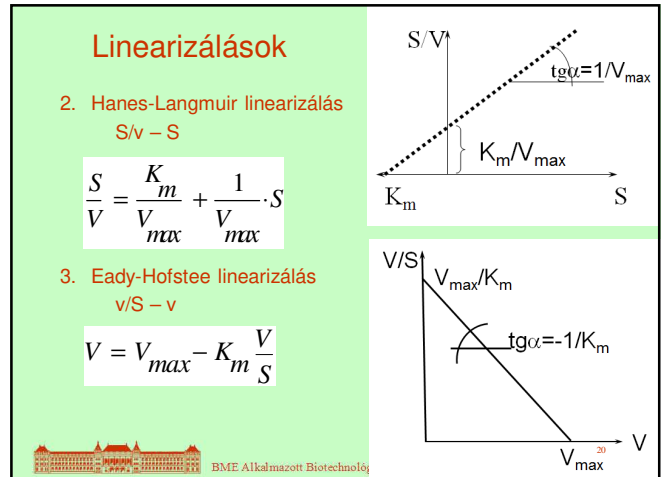
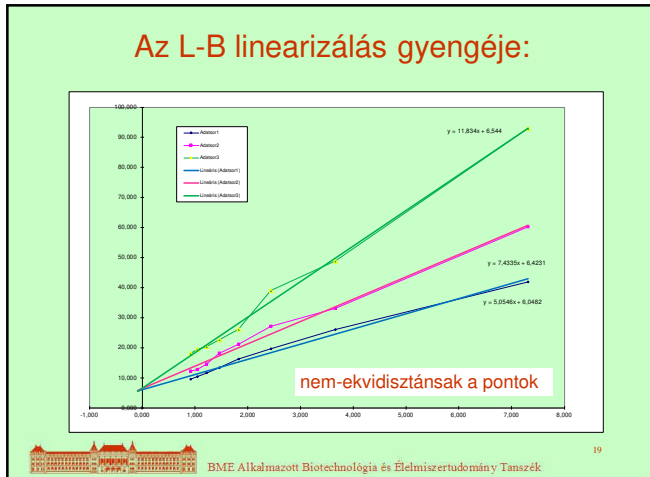
$$K_m = K_s + \frac{k_2}{k_1}$$

ha (k<sub>1</sub>) >> (k<sub>2</sub>) akkor a két konstans azonos!



12





### slido

Kérem, írjátok be azon diák sorszámaikat (vesszőkkel elválasztva), amiknek az anyagát más tárgyból már tanultátok!

Start presenting to display the poll results on this slide.

22

### A kinetikai paraméterek

$V_{max}$ : nem maximum, hanem limit → határsebesség

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

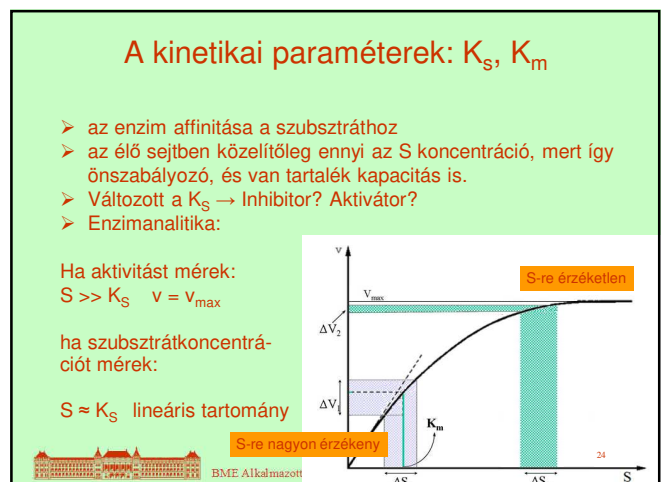
A  $k_2$  enzimplajdonság = turnover number, váltásszám [ $s^{-1}$ ] → az enzimmolekula átalakítási frekvenciája

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.

23 BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék



### A kinetikai paraméterek

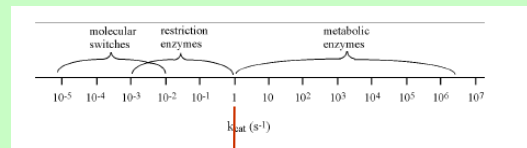
- $k_1$   $10^7$ - $10^{10}$   $\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{min}^{-1}$  [max. érték ( $10^{11}$ ) a kis molekulák diffúziósebessége]
- $k_{-1}$   $10^2$ - $10^6$   $\text{min}^{-1}$
- $k_2$   $50$ - $10^7$   $\text{min}^{-1}$
- $K_m$   $10^{-6}$  -  $10^{-2}$   $\text{mol/dm}^3$

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)	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_M$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	$9.5 \times 10^{-3}$	$1.4 \times 10^4$	$1.5 \times 10^6$
Carbonic anhydrase	$\text{CO}_2$	$1.2 \times 10^{-2}$	$1.0 \times 10^6$	$8.3 \times 10^7$
	$\text{HCO}_3^-$	$2.6 \times 10^{-2}$	$4.0 \times 10^6$	$1.5 \times 10^7$
Catalase	$\text{H}_2\text{O}_2$	$2.5 \times 10^{-2}$	$1.0 \times 10^7$	$4.0 \times 10^8$
Chymotrypsin	<i>N</i> -Acetylglucine ethyl ester	$4.4 \times 10^{-1}$	$5.1 \times 10^{-2}$	$1.2 \times 10^{-1}$
	<i>N</i> -Acetylvaline ethyl ester	$8.8 \times 10^{-2}$	$1.7 \times 10^{-1}$	1.9
	<i>N</i> -Acetyltyrosine ethyl ester	$6.6 \times 10^{-4}$	$1.9 \times 10^2$	$2.9 \times 10^5$
Fumarase	Fumarate	$5.0 \times 10^{-4}$	$8.0 \times 10^2$	$1.6 \times 10^6$
	Malate	$2.5 \times 10^{-3}$	$9.0 \times 10^2$	$3.6 \times 10^5$
Urease	Urea	$2.5 \times 10^{-2}$	$1.0 \times 10^4$	$4.0 \times 10^5$

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

### $k_{cat}$ értékek



$k_{cat}$  alsó határa metabolikus enzimeknél

Legtöbb enzim e két szélső eset között

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

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



### Fajlagos aktivitás és váltásszám

Ez a kettő hasonlít egymásra, mert:

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

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

Ha az enzimpreparátum tiszta, nincs benne ballaszt anyag, akkor a kettő kb. egyenlő.



### Fajlagos aktivitás és váltásszám

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

$M_s = 60000 \text{ Da}$      $1 \text{ U/mg}$      $k_{cat} = ? \text{ s}^{-1}$

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

mivel

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

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



### 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)

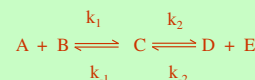


Mindkét kinetikai leírásban feltételeztük, hogy a  $k_{-2} = 0$ , ezért a reverzibilis reakciót két ellentétes egyirányú folyamat leírásából állítjuk össze.



### Reverzibilis reakciók

Fizkém reakciókinetika egymást követő (konzekutív) egyensúlyi reakciók leírására:



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

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



### Reverzibilis reakciók

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

A két ellentétes irányú reakció egyensúlyi állandóit főlrva:

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

A közös elemet kiemelve:

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

Az eredő egyensúlyi állandót kifejezhetjük:

$$K_{eq}(\text{uilibrium}) = \frac{P_{eq}}{S_{eq}} = \frac{k_{+1}k_{+2}}{k_{-1}k_{-2}}$$

31 BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### Reverzibilis reakciók

HALDANE leírásához:

$$K_{ms} = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \quad E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightleftharpoons[k_{-2}]{k_2} E + P \quad V_{maxs} = k_2 E_o$$

$$K_{mp} = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_{-2}} \quad V_{maxp} = k_{-1} E_o$$

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

$1/K_s \quad \leftarrow \quad \rightarrow \quad K_p$

32 BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### Reverzibilis reakciók

Végezzük el a következő osztásokat:

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

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

Egyensúlyi állandóra ugyanazt kaptuk - HALDANE összefüggés

33 BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### Reverzibilis reakciók

**MI TÖRTÉNIK?**  
 $S \rightarrow P$  vagy  $P \rightarrow S$  ?

**MITŐL FÜGG?**  $K_{eq}$ ,  $S$ ,  $P$  értéke

Itt feltételezzük az EP komplex létezését:

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

34 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:

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

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

ebből:

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

35 BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### Reverzibilis reakciók

Behelyettesítve :

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

figyelembe véve, hogy:

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

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

Reverzibilis M-M egyenlet<sup>36</sup>

36 BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### Reverzibilis reakciók

$$\Delta v = \frac{v_{\max s} \frac{S}{K_s} - v_{\max p} \frac{P}{K_p}}{\frac{S}{K_s} + \frac{P}{K_p} + S}$$

$$\Delta v = \frac{v_{\max s} S - v_{\max p} \frac{K_s P}{K_p}}{K_s + S + \frac{K_s P}{K_p}}$$

$$\frac{v_{\max s}}{v_{\max p}} = \frac{k_2}{k_{-1}} \frac{P_0}{S_0}$$

$$v_{\max p} = v_{\max s} \frac{k_{-1}}{k_2}$$

$$\frac{K_s}{K_p} = \frac{(k_2 + k_{-1})k_{-2}}{k_1(k_2 + k_{-1})} = \frac{k_{-2}}{k_1}$$

$$\Delta v = \frac{v_{\max s} S - v_{\max p} \frac{k_{-1} k_{-2} P}{k_2 k_1}}{K_s \left(1 + \frac{P}{K_p}\right) + S}$$

$$\Delta v = \frac{v_{\max s} S - v_{\max p} \frac{P}{K_{eq}}}{K_s \left(1 + \frac{P}{K_p}\right) + S}$$

$$K_{eq} = \frac{P_{eq}}{S_{eq}} = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} k_{-2}}$$

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 37

### Reverzibilis reakciók

$$\Delta v = \frac{v_{\max s} S - v_{\max p} \frac{P}{K_{eq}}}{K_s \left(1 + \frac{P}{K_p}\right) + S}$$

$$\frac{P}{K_{eq}} = \frac{P \cdot S_{eq}}{P_{eq}}$$

$$\Delta v = \frac{v_{\max s} \left(S - S_{eq} \frac{P}{P_{eq}}\right)}{K_s \left(1 + \frac{P}{K_p}\right) + S}$$

$$(S - S_{eq}) = P_{eq} - P = K_{eq} \cdot S_{eq} - P$$

$$P = K_{eq} \cdot S_{eq} - S + S_{eq} = S_{eq} (K_{eq} + 1) - S$$

$$\Delta v = \frac{v_{\max s} \left(S - \frac{S_{eq} (K_{eq} + 1) - S}{K_{eq}}\right)}{K_s \left(1 + \frac{P}{K_p}\right) + S}$$

$$\Delta v = \frac{v_{\max s} \left(\frac{S K_{eq} - S_{eq} K_{eq} - S_{eq} + S}{K_{eq}}\right)}{K_s \left(1 + \frac{P}{K_p}\right) + S}$$

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 38

### Reverzibilis reakciók

$$\Delta v = \frac{v_{\max s} \left(S - S_{eq} - \frac{S_{eq}}{K_{eq}} + \frac{S}{K_{eq}}\right)}{K_s \left(1 + \frac{P}{K_p}\right) + S}$$

$$\Delta v = \frac{v_{\max s} (S - S_{eq}) \left(1 + \frac{1}{K_{eq}}\right)}{K_s \left(1 + \frac{P}{K_p}\right) + S}$$

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 39

### Reverzibilis reakciók

$$\Delta v = \frac{v_{\max s} (S - S_{eq}) \left(1 + \frac{1}{K_{eq}}\right)}{K_s \left(1 + \frac{P}{K_p}\right) + S}$$

A reakció sebessége nem állandó, az egyensúlyt közelítve lassul.

A hajtóerő az a szubsztrát koncentráció eltérése  $(S - S_{eq})$  az egyensúlytól.

A nevezőben pedig az  $\left(1 + \frac{P}{K_{mp}}\right)$  tag az jelenti, hogy a termék kompetitív inhibitorként viselkedik (ld. a következő fejezetben).

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 40

### slido

Melyik levezetés melyik szakasza volt a legkevésbé érthető/követhető?

Start presenting to display the poll results on this slide. 41