

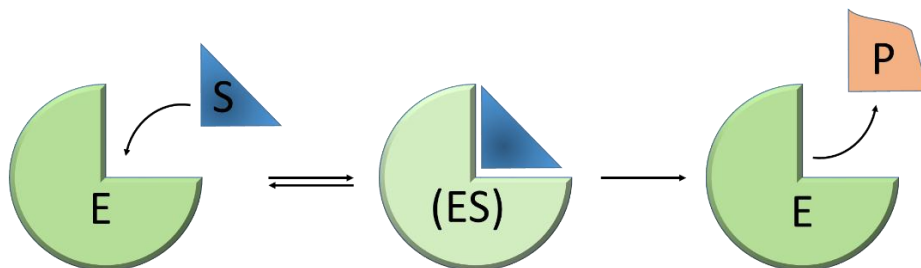
M5. KINETYKA REAKCJI ENZYMATYCZNYCH

Zagadnienia: Pojęcie enzymu. Mechanizm Michaelisa-Menten. Kinetyka chemiczna: szybkość reakcji, reakcje elementarne, rząd reakcji (Szybkość reakcji chemicznych). Równania kinetyczne prostych reakcji zerowego, pierwszego i drugiego rzędu. Równania kinetyczne reakcji odwracalnych, równoległych, następczych. Energia aktywacji, teoria stanu przejściowego. Metoda stanu stacjonarnego.

Wstęp

Enzymy są w większości przypadków białkowymi katalizatorami działającymi w układach biologicznych wyróżniającymi się siłą katalityczną i specyficznością. Działanie enzymów, tak jak i innych katalizatorów, polega na obniżeniu energii aktywacji w reakcji chemicznej przez stabilizację stanów przejściowych, które na drogach reakcji są stanami o najwyższej energii. Dzięki selektywności tej stabilizacji, enzymy są w stanie decydować o tym, która z kilku możliwych reakcji chemicznych zostanie zrealizowana. Konsekwencją stabilizacji stanu przejściowego jest zwiększenie szybkości przejścia substratów w produkty. Enzymy przyspieszają reakcje chemiczne co najmniej milionkrotnie w porównaniu do reakcji nieenzymatycznej, nie zmieniając przy tym stanu równowagi. Oznacza to, że stabilizacja stanu przejściowego przyspiesza obie reakcje biegnące w przeciwnych kierunkach.

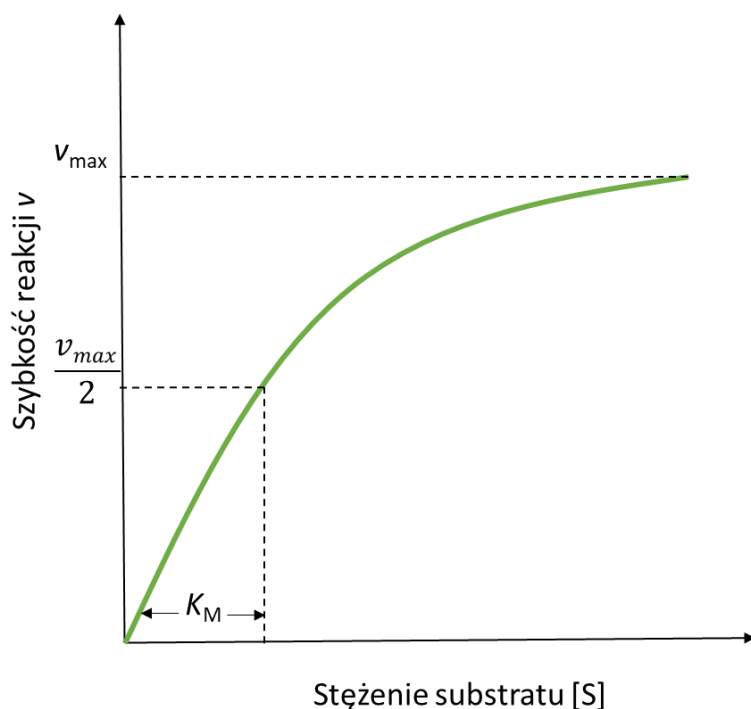
Warunkiem katalizy enzymatycznej jest związanie substratu (S) w miejscu aktywnym enzymu (E) wykorzystując lokalne oddziaływania między enzymem a substratem (wiązania wodorowe, siły elektrostatyczne oraz siły van der Waalsa) oraz wzajemne dopasowanie struktury przestrzennej miejsca aktywnego i cząsteczki substratu (**Rysunek M5-1**). Uwolnione miejsce aktywne enzymu może wiązać kolejne cząsteczki substratu.



Rysunek M5-1 Istota mechanizmu działania enzymów, gdzie E oznacza enzym, S substrat, P produkt a (ES) kompleks enzym-substrat.

Z termodynamicznego punktu widzenia, zmiana energii swobodnej ΔG może przybrać wartość ujemną dla reakcjach spontanicznych, wartość równą zero dla układu w stanie równowagi oraz wartość dodatnią dla reakcji nie zachodzących spontanicznie. Do przebiegu tej ostatniej, konieczne jest dostarczenie energii z zewnątrz (reakcja endotermiczna). Pamiętać należy także, że ΔG nie zależy od drogi reakcji, a wyłącznie od różnicy energii swobodnej między stanem początkowym (substratem) a stanem końcowym (produktem). Stężenie enzymu pełniącego rolę katalizatora pozostaje niezmiennie podczas reakcji. W wielu przypadkach nie zmieniają się także właściwości miejsc aktywnych po związaniu substratu.

Dla wielu enzymów szybkość katalizy V_0 (liczba moli produktu utworzonego w czasie 1 sekundy) zmienia się ze stężeniem substratu $[S]$ w sposób przedstawiony na **Rysunku M5-2**. Ze wzrostem stężenia substratu, szybkość katalizy rośnie liniowo, następnie przy większych stężeniach substratu ulega zwolnieniu i osiąga wartość maksymalną. Ta paraboliczna zależność między szybkością reakcji enzymatycznej a stężeniem substratu jest nazywana modelem Michaelisa-Menten (**Rysunek M5-2**).



Rysunek M5-2 Zależność szybkości reakcji (v) od stężenia substratu $[S]$ w równaniu Michaelisa-Menten.

Sekwencję reakcji enzymatycznych można wyrazić następującym schematem:



gdzie k_1 , k_{-1} i k_2 są stałymi szybkości odpowiednich reakcji.

Korzystając z powyższego schematu, szybkość v przyrostu stężenia produktu reakcji $[P]$ można zapisać następująco:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2 \cdot [ES] \quad (M5-2)$$

Związek między stężeniem kompleksu enzym-substrat ($[ES]$) a stężeniem enzymu i substratu można określić wykorzystując tzw. metodę stanu stacjonarnego, zakładając jednakową szybkość tworzenia i rozpadu takiego kompleksu ($k_{-1} = k_2$):

$$k_1 \cdot [E] \cdot [S] = k_{-1} \cdot [ES] + k_2 \cdot [ES] \quad (M5-3)$$

Oznacza to, że:

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \quad (M5-4)$$

a więc stałe (stacjonarne) stężenie kompleksu enzym-substrat w czasie reakcji.

W typowych reakcjach enzymatycznych całkowite stężenie enzymu $[E]_0$ jest znacznie mniejsze od całkowitego stężenia substratu $[S]_0$ ($[E]_0 \ll [S]_0$) i zatem stężenie substratu związanego z enzymem jest znacznie mniejsze od stężenia wolnego substratu $[ES] \ll [S]$. Stężenie wolnego substratu praktycznie nie różni się wtedy od całkowitego stężenia substratu $[S] \approx [S]_0 = [S] + [ES]$. Natomiast większość miejsc aktywnych enzymu zostaje związana w kompleks z substratem i zatem stężenie wolnego enzymu wyraża wzór:

$$[E] = [E]_0 - [ES] \quad (M5-5)$$

Podstawienie prawej strony **Równanie M5-5** i $[S] \approx [S]_0$ do **Równania M5-3** daje:

$$k_1 \cdot [S]_0 \cdot ([E]_0 - [ES]) = k_{-1} \cdot [ES] + k_2 \cdot [ES] \quad (M5-6)$$

Równanie M5-6 można przekształcić do wyrażenia opisującego stężenie kompleksu aktywnego:

$$k[S] = -\frac{d[S]}{dt} \quad (M5-7)$$

Po podzieleniu licznika i mianownika przez k_1 otrzymujemy:

$$[ES] = [E]_0 \frac{[S]_0}{[S]_0 + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}} \quad (M5-8)$$

gdzie wyrażenie $(k_{-1} + k_2)/k_1$ nazywane jest stałą Michaelisa K_M , a wzór można przedstawić w następujący sposób:

$$[ES] = [E]_0 \frac{[S]_0}{[S]_0 + K_M} \quad (M5-9)$$

Ze **Wzoru M5-8** wynika, że wszystkie miejsca aktywne enzymu będą zajęte przez substrat wtedy, kiedy $[S]_0$ jest dużo większe od K_M .

Podstawiając **Wzory M5-7** i **M5-9** do **Równania M5-2** otrzymujemy:

$$v = k_2 \cdot [E]_0 \frac{k_1 \cdot [S]_0}{k_1 \cdot [S]_0 + k_{-1} + k_2} = k_2 \cdot [E]_0 \frac{[S]_0}{[S]_0 + K_M} \quad (M5-10)$$

Ze **Wzoru M5-10** wynika, że szybkość reakcji osiąga wartość maksymalną (v_{max}) w warunkach wysycenia wszystkich miejsc aktywnych enzymu przez substrat. Ponieważ dla dostatecznie dużego stężenia substratu $[S]_0/([S]_0 + K_M) \approx 1$, to:

$$v_{max} = k_2 \cdot [E]_0 \quad (M5-11)$$

Maksymalna wartość szybkości reakcji enzymatycznej będzie zależna od całkowitego stężenia enzymu jak i od stałych szybkości reakcji rozpadu kompleksu enzym-substrat do produktów.

Z podstawienia Wzoru M5-11 do Równania M5-10 powstaje równanie Michaelisa-Menten:

$$v = v_{\max} \frac{[S]_0}{[S]_0 + K_M} \quad (M5-12)$$

z którego wynika fizyczny sens stałej Michaelisa, K_M . Jeżeli $[S]_0 = K_M$, wtedy $v = v_{\max}/2$. Fakt ten stanowi podstawę dla stwierdzenia, że stała K_M jest równa takiemu stężeniu substratu, przy którym szybkość reakcji enzymatycznej osiąga połowę wartości maksymalnej dla danej wartości stężenia $[E]_0$. Stała K_M odpowiada takiemu stężeniu substratu, przy którym obsadza on połowę miejsc aktywnych enzymu. Należy pamiętać, że stała K_M jest określona przez wartości k_1 , k_{-1} i k_2 a dla większości enzymów jej wartość waha się w granicach 10^{-1} - 10^{-7} M.

Przebieg zależności szybkości reakcji enzymatycznej od stężenia substratu wg Wyrażenia M5-11, czyli w warunkach $[E]_0 \ll [S]$, jest pokazany na Rysunku M5-2. Przy małym stężeniu całkowitym substratu ($[S]_0 \ll K_M$), szybkość tworzenia produktu rośnie wprost proporcjonalnie do $[S]_0$ i dla danego $[E]_0 = \text{const}$ zależy od wartości ilorazu (k_2/K_M):

$$v = v_{\max} \frac{[S]_0}{K_M} = \left(\frac{k_2}{K_M}\right) \cdot [E]_0 \cdot [S]_0 \quad (M5-13)$$

Dalej, przy dostatecznie dużym stężeniu substratu ($[S]_0 \gg K_M$), tworzenie się produktu następuje z maksymalną szybkością ($v = v_{\max}$), niezależnie od ewentualnego dalszego wzrostu stężenia substratu.

Przy znanym stężeniu enzymu $[E]_0$ szybkość maksymalna $v_{\max}$ ujawnia liczbę obrotów enzymu, czyli liczbę cząsteczek substratu przekształconych w produkt reakcji w jednostce czasu przez 1 mol enzymu w warunkach pełnego wysycenia enzymu przez substrat. Liczba obrotów jest więc równa stałej k_2 . Dla większości enzymów w środowisku fizjologicznym jest ona zawarta w granicach od 1 do 10^4 s⁻¹. Każdy cykl katalizy następuje w czasie różnym $1/k_2$ [s].

Po przedstawieniu obu stron równania Michaelisa-Menten w formie odwrotności otrzymujemy liniową zależność ($y = ax + b$):

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{\max}} + \frac{K_M}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{S_0} \quad (M5-14)$$

Na rysunku widoczny jest punkt przecięcia prostej z osią rzędnych ($y = 1/v$) wyznaczający wartość wyrażenia $b = 1/v_{\max}$ [dm³ s mol⁻¹] przy $[E]_0 = \text{const}$.

Natomiast ze współczynnika kierunkowego prostej względem osi odciętych $a = K_M/v_{\max}$ [s] można obliczyć wartość K_M [mol dm⁻³]. Powyższy sposób wyznaczania wartości stałej K_M i $v_{\max}$ znany jest jako metoda Lineweavera-Burka.

Reakcją badaną w ćwiczeniu jest hydroliza sacharozy do glukozy i fruktozy przy użyciu enzymu inwertazy drożdżowej. Enzym ten ułatwia rozerwanie wiązania glikozydowego w sacharozie w pH około 4,7 (warunki optymalne). Enzym staje się nieaktywny w pH ≥ 10 , zatem podwyższając pH roztworu można zatrzymać reakcję. Katalizowaną enzymatycznie reakcję hydrolizy sacharozy prowadzi się w roztworach tego związku o różnym tężeniu początkowym, jednak zawsze w warunkach dużego nadmiaru substratu w stosunku do enzymu o stałym stężeniu całkowitym, $[E]_0$. W związku z tym stężenie wolnego substratu w trakcie reakcji praktycznie nie różni się od

całkowitego stężenia substratu: $[S] \approx [S]_0$. Powstające w czasie trwania reakcji glukoza (G) i fruktoza (F) mają jednakowe stężenie. Przy tym przyrost stężenia glukozy (względnie fruktozy) jest równy ubytkowi stężenia sacharozy w danym okresie czasu.

Wykonanie ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest wyznaczenie parametrów kinetycznych (stałej Michaelisa K_M i maksymalnej szybkości v_{max}) reakcji hydrolizy sacharozy katalizowanej przez inwertazę drożdżową (sacharazę) korzystając z metody spektrofotometrycznej i odczynnika dinitrosalicylowego o $pH = 13,5$. W środowisku zasadowym glukoza redukuje anion 3,5-dinitrosalicylowy (o jasno żółtym zabarwieniu) do anionu 3-amino-5-nitrosalicylowego (o zabarwieniu brązowym), a sama utlenia się do kwasu glukonowego (bezbarnego). Ponieważ fruktoza w obecności jonów hydroksylowych ulega izomeryzacji do glukozy, to stężenie intensywnie barwnego anionu 3-amino-5-nitrosalicylowego, tworzącego się po dodaniu odczynnika dinitrosalicylowego do mieszaniny glukozy z fruktozą, jest równe sumarycznemu stężeniu obu tych cukrów.

Odczynniki

Roztwór wzorcowy glukozy i fruktozy w wodzie o stężeniu $0,005 \text{ mol/dm}^3$.

Bufor o $pH = 4,78$ wg Brittona I Robinsona

Odczynnik dinitrosalicylowy o $pH = 13,5$

Roztwór sacharozy o $c = 0,1 \text{ M}$ w buforze o $pH = 4,78$ ($V=25 \text{ cm}^3$)

Roztwór inwertazy

Wykonanie krzywej kalibracyjnej

- W probówkach od 1 do 8 sporządzić roztwory wzorcowe o objętości 2 cm^3 zawierające rosnące stężenie glukozy $[G]_{wz}$ i fruktozy $[F]_{wz}$ oraz roztwór odniesienia (roztwór 9). Objętości i stężenia umieścić w tabeli 1.
- Następnie dodać po 2 cm^3 odczynnika dinitrosalicylowego i po dokładnym wymieszaniu wstawić na 10 minut do łaźni wodnej z wrzącą wodą.
- Po tym czasie próbki wyjąć, wystudzić i dodać do każdego roztworu 8 cm^3 wody i wymieszać.
- Zmierzyć absorbancję dla każdej próbki przy długości fali 550 nm , a wyniki umieścić w Tabeli M5-1.
- Wykreślić zależność zmierzonej absorbancji od sumarycznego stężenia glukozy i fruktozy w objętości 2 cm^3 .
- Wyznaczyć współczynnik kierunkowy oraz parametr b otrzymanej prostej, pamiętając, że

$$A_{\lambda=550nm}^{wz} = a_{wz}([G]_{wz} + [F]_{wz}) + b_{wz} \quad (M5-15)$$

Tabela M5-1 Dane eksperymentalne

Nr próbówki	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Objętość odczynników w cm ³								
Roztwór wzorcowy									0
woda									1
Bufor o pH = 4,78	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sumaryczne stężenie glukozy i fruktozy $[G]_{wz} + [F]_{wz}$ [mol dm ⁻³] w próbach wzorcowych o objętości 2 cm ³									
$A_{\lambda=550nm}^{wz}$									

Reakcja hydroliza sacharozy:

- W próbkach 1a do 8a przygotować roztwory sacharozy, w których będzie przeprowadzana reakcja hydrolizy w obecności inwertazy. Objętości odczynników wprowadzanych do próbek podane są w Tabeli M5-2.
- Ponadto w próbce oznaczonej jako 9a sporządzić roztwór odniesienia (niezbędny w pomiarach absorbancji po zakończeniu reakcji hydrolizy sacharozy) wlewając do niej 1 cm³ roztworu buforowego, 2 cm³ odczynnika dinitrosalicylowego i 5 cm³ wody.
- W osobnym naczyniu przygotować roztwór enzymu w ilości potrzebnej do wykonania doświadczenia (uwaga: pobrany z lodówki roztwór inwertazy o stężeniu 0,004 mg/cm³ rozcieńczyć czterokrotnie i dobrze wymieszać).
- Zawartość próbek 1a do 8a zawierających sacharozę oraz próbkę 9a z roztworem odniesienia, a także naczynie z rozcieńczonym roztworem enzymu termostatować w temperaturze 37°C przez 15 minut.
- Po tym czasie, w próbkach 1a do 8a dodać w jednakowych odstępach czasu (np. co 1 minutę) po 1 cm³ roztworu inwertazy.
- Po dodaniu enzymu należy każdy roztwór dokładnie wymieszać i pozostawić w termostacie przez 10 minut ($\Delta t = 600$ s).
- Następnie należy dodać do każdej próbki 2 cm³ odczynnika dinitrosalicylowego i dokładnie wymieszać, po czym kolejno, co 1 minutę, należy dodawać 2 cm³ tego odczynnika do pozostałych próbek i zawartość dokładnie wymieszać.

- Następnie roztwory zawierające sacharozę (1a do 8a) oraz roztwór odniesienia (9a) ogrzać przez 10 minut w temperaturze około 100 °C, co zapewnia odpowiednią szybkość reakcji między anionem 3,5-dinitrosalicylowym a glukozą, jak również reakcji transformacji fruktozy do glukozy.
- Następnie wystudzić wszystkie roztwory (1a do 9a) i uzupełnić wodą destylowaną do 8 cm³. Zawartość probówek dokładnie wymieszać i zmierzyć absorbancję przy długości fali $\lambda = 550 \text{ nm}$ wykonujemy pomiar absorbancji względem roztworu odniesienia zawartego w probówce 9a. (Alternatywą jest wykonanie pomiarów absorbancji wszystkich roztworów, 1a do 9a, względem wody).

Tabela M5-2 Obliczenia

	1a	2a	3a	4a	5a	6a	7a	8a
	Objętość odczynników w cm ³							
0,1 M roztwór sacharozy w buforze pH 4,78	0,1	0,15	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7
Bufor pH 4,78	0,9	0,85	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3
Początkowe stężenie sacharozy $[S]_0$ w roztworach o objętości 2 cm ³ [mol dm ⁻³]								
$1/[S]_0$ [dm ³ mol ⁻¹]								
$A_{\lambda=550nm}$								
Sumaryczne stężenie produktów po hydrolizie $\Delta[G] + \Delta[F]$ [mol dm ⁻³]								
$\Delta[G]$ [mol dm ⁻³]								
$v = (\Delta[G]/\Delta t)$ [mol dm ⁻³ s ⁻¹]								
$1/v$ [mol ⁻¹ dm ³ s]								

Opracowanie wyników

Określić sumaryczny przyrost stężenia glukozy i fruktozy ($\Delta([G] + \Delta[F])$) tworzących się w czasie (Δt) hydrolizy sacharozy katalizowanej przez inwertazę w roztworach 1a do 8a o objętości 2 cm³ (korzystając z przygotowanej krzywej wzorcowej) korzystając z wyrażenia:

$$(\Delta[G] + \Delta[F]) = \frac{(A_{\lambda=550nm} - b_{wz})}{a_{wz}} \quad (M5-16)$$

gdzie a_{wz} oznacza współczynnik kierunkowy w liniowej zależności wzorcowej zaś b_{wz}

to wyraz wolny w tej zależności. Przyrost stężenia glukozy jak i fruktozy jest równy połowie sumarycznego stężenia tych cukrów:

$$\Delta[G] = \Delta[F] = \frac{(\Delta[G] + \Delta[F])}{2} = \frac{(A_{\lambda=550nm} - b_{wz})}{2 \cdot a_{wz}} \quad (M5-17)$$

Biorąc ten fakt pod uwagę, obliczamy szybkość katalizowanej enzymatycznie hydrolizy sacharozy w kolejnych badanych roztworach, definiowaną przez przyrost stężenia jednego z produktów w jednostce czasu:

$$v = \frac{\Delta[G]}{\Delta t} = \frac{\Delta[F]}{\Delta t} \quad (M5-18)$$

W ostatnim etapie przeprowadzamy analizę danych zestawionych w tabeli 2 na podstawie **Równanie Lineweavera-Burka** (M5-14) i sporządzamy wykres we współrzędnych: $1/v$ od $1/[S]$. Korzystając z regresji liniowej, z parametru $b = 1/v_{\max}$ [$\text{mol}^{-1}\text{dm}^3\text{s}$] określonego przez punkt przecięcia linii prostej (przechodzącej przez punkty pomiarowe) z osią $y = 1/v$ przy $1/[S]_0 = 0$, wyznaczamy maksymalną szybkość reakcji enzymatycznej: $v_{\max} = 1/b$ [$\text{mol dm}^{-3} \text{s}^{-1}$]. Z kolei ze współczynnika kierunkowego $a = K_M/v_{\max}$ [s] obliczamy stałą Michaelisa.

Niepewność oznaczeń wynosi:

$$\Delta v_{\max} = \left| \frac{\delta v_{\max}}{\delta b} \right| \Delta b = \left| \frac{-1}{b^2} \right| \Delta b [\text{mol dm}^{-3} \text{s}^{-1}] \quad (M5-19)$$

$$\Delta K_M = \left| \frac{\delta K_M}{\delta a} \right| \Delta a + \left| \frac{\delta K_M}{\delta b} \right| \Delta b = \left| \frac{1}{b} \right| \Delta a [\text{mol dm}^{-3}] \quad (M5-20)$$