

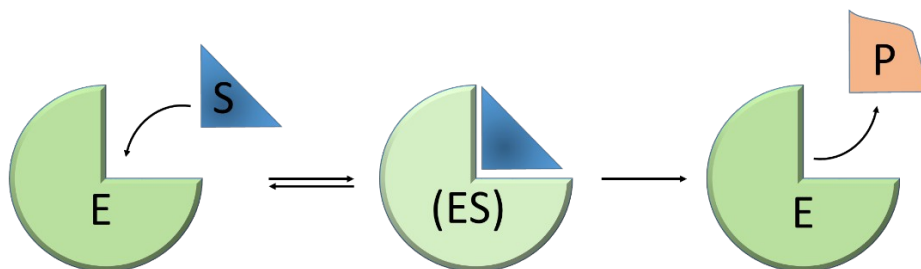
Ćwiczenie 14

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.

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 1). Uwolnione miejsce aktywne enzymu może wiązać kolejne cząsteczki substratu.

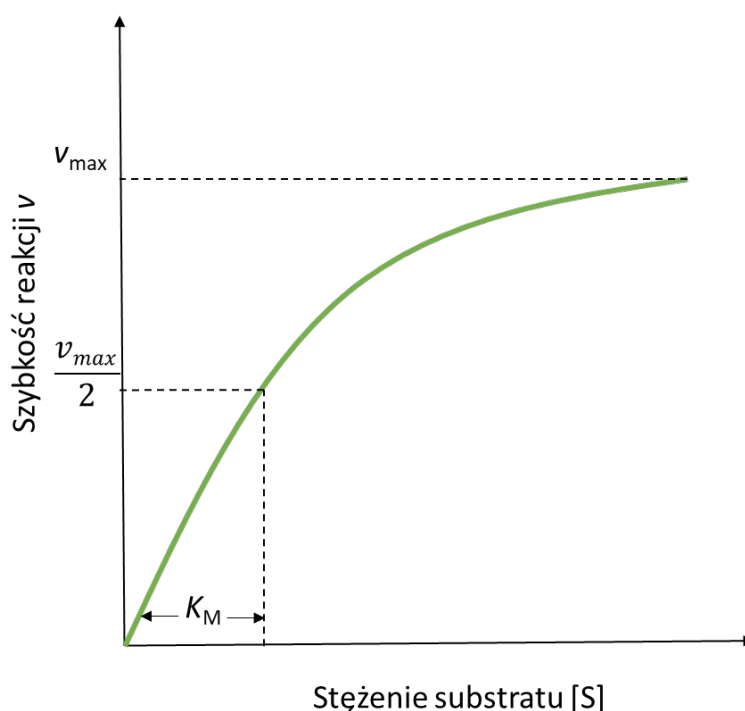


Rys. 1. Istota mechanizmu działania enzymów, gdzie E oznacza enzym, S substrat, P produkt a (ES) kompleks enzym-substrat.

Z termodynamicznego punktu widzenia, zmiana energii swobodnej ΔG może przybrać wartość ujemną dla reakcji 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 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 2).



Rys. 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:

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

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 ($k_{-1} = k_2$):

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

Oznacza to, że:

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

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:

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

Podstawienie prawej strony wyrażenia 5 i $[S] \approx [S]_0$ do równania (3) daje:

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

Wyrażenie (6) można przekształcić do wyrażenia opisującego stężenie kompleksu aktywnego:

$$[ES] = [E]_0 \frac{k_1 \cdot [S]_0}{k_1 \cdot [S]_0 + k_{-1} + k_2} \quad (7)$$

Po podzieleniu licznika i mianownika przez k_1 otrzymujemy:

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

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

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

Ze wzoru (8) wynika, że wszystkie miejsca aktywne enzymu będą zajęte przez substrat wtedy, kiedy $[S]_0$ jest dużo większe od K_M .

Podstawiając wzory (7) i (9) do równania (2) otrzymujemy:

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

Ze wzoru (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:

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

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 (11) do równania (10) powstaje równanie Michaelisa-Menten:

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

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} mol/dm³.

Przebieg zależności szybkości reakcji enzymatycznej od stężenia substratu wg wyrażenia (11), czyli w warunkach $[E]_0 \ll [S]$, jest pokazany na rysunku. 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):

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

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 ($y=ax+b$):

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

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

Sumaryczne stężenie glukozy i fruktozy [G] _{wz} + [F] _{wz} [mol dm ⁻³] w próbach wzorcowych o objętości 2 cm ³									
$A_{\lambda=550\text{ nm}}^{\text{wz}}$									

Reakcja hydroliza sacharozy:

1. W probówkach 1a do 8a przygotować roztwory sacharozy, w których będzie przeprowadzana reakcja hydrolizy w obecności inwertazy. Objętości odczynników wprowadzanych do probówek podane są w tabeli 2.
2. Ponadto w probówce 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.
3. 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).
4. Zawartość probówek 1a do 8a zawierających sacharozę oraz probówkę 9a z roztworem odniesienia, a także naczynie z rozcieńczonym roztworem enzymu termostatować w temperaturze 37°C przez 15 minut.
5. Po tym czasie, w probówkach 1a do 8a dodać w jednakowych odstępach czasu (np. co 1 minutę) po 1 cm³ roztworu inwertazy.
6. Po dodaniu enzymu należy każdy roztwór dokładnie wymieszać i pozostawić w termostacie przez 10 minut ($\Delta t = 600\text{ s}$).
7. Następnie należy dodać do każdej probówki 2 cm³ odczynnika dinitrosalicylowego i dokładnie wymieszać, po czym kolejno, co 1 minutę, należy dodawać 2 cm³ tego odczynnika do pozostałych probówek i zawartość dokładnie wymieszać.
8. 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.
9. 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 2.

	1a	2a	3a	4a	5a	6a	7a	8a
	Ilość odczynników w cm ³							
Roztwór 0,1	0,1	0,15	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7

mol/dm ³ sacharozy o buforze o pH 4,78								
Bufor o 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 [mol dm ⁻³]								
A _{λ=550 nm}								
Sumaryczne stężenie produktów po hydrolizie Δ[G] + Δ[F] [mol dm ⁻³]								
Δ[G] [mol dm ⁻³]								
v = (Δ[G]/Δt) [mol dm ⁻³ s ⁻¹]								
1/v [mol ⁻¹ dm ³ s]								

Opracowanie wyników

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

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

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:

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

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:

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

W ostatnim etapie przeprowadzamy analizę danych zestawionych w tabeli 2 na podstawie równanie Lineweavera-Burka (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:

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

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