

# APPENDIKS 5

## Enzymkinetik og enzymgrupper

### Enzymkinetik

I dette appendiks uddybes de enzymatiske reaktioners kinetik, dvs. hvordan man beskriver deres reaktionsrater og -hastigheder kvantitativt. Teksten uddyber figurerne i Biokemibogen side 83-89. Enzymkinetik finder anvendelse både inden for forskning og bioteknologi og bruges til at beregne hvilke enzymmængder man skal bruge.

Figur 89 viser energiforholdene i en enzymatisk katalyseret reaktion hvor et substrat omdannes til et produkt:



Hastigheden,  $v$ , hvormed reaktionen sker, kan bestemmes ved at måle ændringen,  $\Delta$ , i substratets eller produktets koncentration,  $[S]$  og  $[P]$ , pr. tidsenhed:

$$v = \frac{\Delta[P]}{\Delta t} = -\frac{\Delta[S]}{\Delta t}$$

Målingen kan kun foretages over så kort tid at koncentrationsændringerne ikke påvirker hastigheden.

Reaktionshastigheden kan også beskrives med en ratekonstant,  $k$ , den rate hvormed substratet omdannes:

$$v = k \cdot [E] \cdot [S]$$

Den enzymkatalyserede proces omfatter jo imidlertid flere delprocesser som kan beskrives ved hver deres ratekonstanter:



$k_1$  = ratekonstanten for substratets binding til enzymet,  $k_2$  = ratekonstanten for dannelse og frigørelse af produktet og  $k_3$  = ratekonstanten for substratets frigørelse fra enzymet idet bindingen er en reversibel proces.

Hastigheden af de enkelte trin vil være produktet af ratekonstanten og koncentrationen af de molekyler der indgår i reaktionen. En af delprocesserne vil foregå langsommere end de andre, det bliver den ratebegrænsende proces. Proces 3 antages som udgangspunkt ikke for at være ratebegrænsende.

Dvs. at afhængigt af om proces 1 eller 2 er begrænsende, vil reaktionshastigheden kunne beskrives som:

$$v = k_1 \cdot [S] \cdot [E] \text{ (ligning 1) eller } v = k_2 \cdot [ES] \text{ (ligning 2)}$$

### Enzymkoncentrationens betydning, figur 93

Sammenhængen mellem reaktionshastighed,  $v$ , og enzymkoncentration,  $[E]$ , når der er rigeligt substrat, er vist i figur 93. I disse forsøg er enzymkoncentrationen lav i forhold til substratkoncentrationen, og substratet vil hurtigt bindes til ledige enzymmolekyler. Derfor vil proces 2 være ratebegrænsende, og reaktionshastigheden kan beskrives med ligning 2. Da  $k_2$  er konstant, og  $[ES]$  er direkte proportional med  $[E]$ , vil resultatet blive en ret linje.

### Substratkoncentrationens betydning, figur 94

Sammenhængen mellem reaktionshastighed  $v$  og substratkoncentration  $[S]$  er vist på figur 94. Ved lave substratkoncentrationer vil der være rigeligt enzym, men substratmængden, og dermed delreaktion 1, vil være begrænsende. Dvs. at reaktionshastigheden kan beskrives med ligning 1.  $v$  er altså direkte proportional med  $[S]$ , og første del af kurven vil derfor være lineær. Ved højere substratreaktioner vil substratmolekyler bindes til enzymer meget hurtigt. Dermed bliver delproces 2 den begrænsende delreaktion. Da enzymkoncentrationen, og dermed koncentrationen af enzymsubstratkompleks, ikke ændrer sig gennem forsøgene og  $k_2$  er konstant, vil  $v$  blive konstant. Reaktionshastigheden nærmer sig en vandret linje, den maksimale reaktionshastighed,  $v_{\max}$ .

## Enzymets katalytiske kapacitet

$v_{\max}$  vil være forskellig fra enzym til enzym. Det kan angives som enzymets turnover eller katalytiske kapacitet,  $k_{\text{cat}}$ , dvs, hvor mange substratmolekyler der omdannes pr. sekund.  $k_2$  kan også angives i en praktisk regneenhed, International Units (I.U.), dvs. hvor mange enzymmolekyler der skal til for at danne et  $\mu\text{mol}$  produktmolekyler pr. minut. Tabellen angiver nogle eksempler på turnoververdier.

Enzym	$k_{\text{cat}}$ (substratmolekyler/sek.)
Katalase	40.000.000
Kulsyreanhydrase	600.000
Laktatdehydrogenase	1.000
Kymotrypsin	100
DNA-polymerase I	15

Figur 220. Eksempler på turnoververdier,  $k_{\text{cat}}$ , for udvalgte enzymer ved 20 °C. (Kilder: Berg, J.M., Tymoczko, J.L. og Stryer, L.: *Biochemistry*, 6. udg., W.H. Freeman, 2006; Bremer, J.: *Biokemi og molekylærbiologi*, Nucleus, 2000).

## Betydningen af temperatur og pH, figur 95 og 96

Som figur 95 og 96 viser, er  $v$  imidlertid også afhængig af temperatur og pH.

Figur 95: Når temperaturen øges, stiger ratekonstanterne eksponentielt som det ses på figur 95. Enzym- og substratmolekylerne bevæger sig hurtigere og støder oftere sammen, og de kemiske reaktioner forløber hurtigere. Ved højere temperaturer sker der imidlertid en denaturering af enzymerne hvorved enzymkoncentrationen,  $[E]$ , falder. Kurven flader ud hvorefter  $v$  falder, til trods for at ratekonstanterne i princippet fortsat stiger.

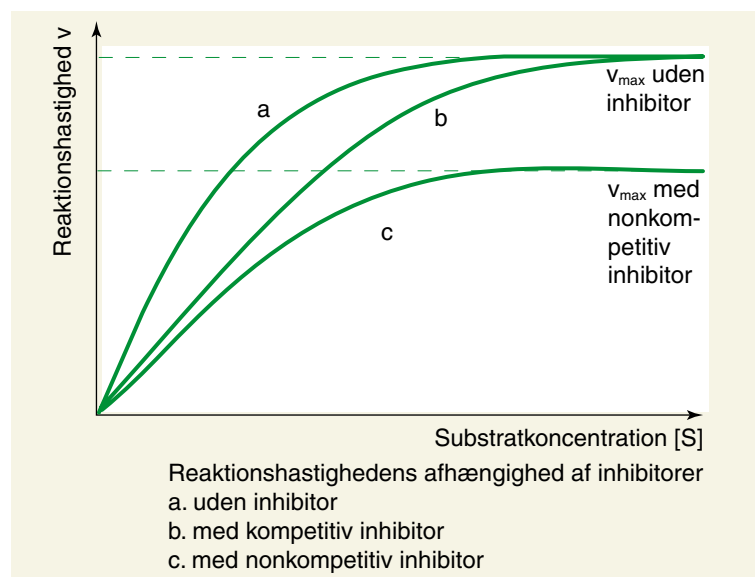
Figur 96: Enzymernes struktur påvirkes af koncentrationen af syrer og baser. Dvs. at enzymkoncentrationen falder når pH ændres i forhold til enzymets pH-optimum. Hermed falder  $v$  tilsvarende.

## Betydningen af inhibitorer, side 87-88

Enzymhæmmere, inhibitorer, kan påvirke reaktionshastigheden som kompetitive hæmmere eller som non-kompetitive hæmmere:

Kompetitive hæmmere bindes til enzymets aktive område og konkurrerer med substratet om enzymet, se eksempler på side 87-88. Deres virkning svarer altså til at der bindes mindre substrat ved proces 1. Virkningen af en kompetitiv hæmmer vil afhænge af koncentrationen af hæmmeren i forhold til substratkoncentrationen. Figur 221 (b) viser forsøg hvor substratkoncentrationen hæves, mens der tilsættes samme koncentration af kompetitiv hæmmer. Når substratkoncentrationen er meget højere end koncentrationen af hæmmer, vil reaktionshastigheden være stort set den samme som uden hæmmer.

Nonkompetitive hæmmere eller modulatorer, bindes andre steder på enzymet og nedsætter dets effektivitet enten til at binde eller omdanne substratet. Dvs. at enten  $k_1$  eller  $k_2$  bliver lavere. Dermed sænkes  $v_{\max}$  tilsvarende. Figur 221 (c) viser virkningen af en nonkompetitiv inhibitor. Figur 204, side 179 viser glukose som en nonkompetitiv inhibitor, eller modulator. Modulatorer spiller også en vigtig rolle i regulering af enzymerne i stofskiftet, se appendiks 4. I glykolysen gælder det proces 3 og 10, i citronsyrecyklus proces 1, 4 og 5.

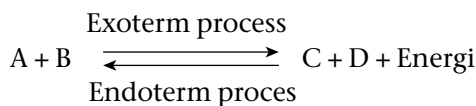


Figur 221.

## Enzymernes inddeling

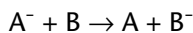
Se oversigten i figur 92, side 84.

Side 27-31 og 81-82 opsummerer energiforholdene ved kemiske og enzymkatalyserede processer. Grundlæggende påvirker enzymet processen ved at fremskynde at ligevægten mellem reaktanter og produkter indstiller sig. Denne ligevægt vil i exoterme processer være forskudt til produktsiden, i endoterme processer til reaktantsiden. Når nogle enzymer kan forskyde en ligevægt i endoterm retning, sker det ved at processen kobles til en exoterm proces som frigør et energioverskud.



### Oxidoreduktaser

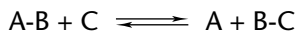
Oxidoreduktaser katalyserer redox-processer, dvs. overførsel af elektroner mellem molekyler, se side 29.



Oxidoreduktaser kobler altså grundlæggende en exoterm oxidation med en endoterm reduktion. Sammen med elektronerne overføres  $\text{H}^+$  ofte. Det sker vha. coenzymer som  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$  og  $\text{FAD}$ , se henholdsvis side 30 og 127. De tre coenzymer spiller en helt central rolle i opbygning og nedbrydning af organiske stoffer, ikke mindst i fotosyntese og respiration, se kapitel 5.

### Transferaser

Transferaser katalyserer overførsel af en funktionel gruppe fra et molekyle til et andet:

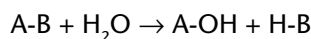


Transferaserne spiller en vigtig rolle i forbindelse med syntese af cellens molekyler ved at overføre bestemte funktionelle grupper. Fx katalyserer aminotransferaser transaminering af aminosyrer, se side 164.

Fosforylaser overfører  $\text{P}_i$  fra ATP til molekyler som derved oplades til næste reaktion, dvs. der sker en fosforylering. Herved kobles spaltningen af ATP til en efterfølgende endoterm proces.

### Hydrolaser

Hydrolaser spaltes molekyler ved samtidig at spalte vand og addere  $\text{H}^+$  og  $-\text{OH}$  til bindingen:



Hydrolyse spiller en særlig stor rolle i første del af fordøjelsesprocessen hvor polymererne spaltes til monomerer, som kan optages gennem tarmvæggen.

Kulhydrater spaltes ved hydrolyse af glykosidbindinger. Stivelse, amylose, spaltes af amylaser og de forskellige disakkarider af fx sukrase, laktase og maltase.

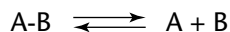
Proteaser spaltes proteiner ved hydrolyse af peptidbindinger.

Lipaser spaltes lipider ved hydrolyse af esterbindinger.

En hydrolyse er normalt exoterm, dvs. at der frigøres energi ved processen, og processen forløber derfor kun i en retning. Den modsat rettede reaktion kræver energi fra spaltning af fx ATP. Den katalyseres derfor af en ligase, eller molekylet lades energimæssigt op inden reaktionen, typisk ved at en transferase overfører  $\text{P}_i$  til molekylet.

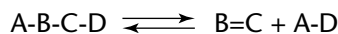
### Lyaser

Lyaser katalyserer reaktioner hvor molekyler spaltes ved andre reaktionstyper end oxidation eller hydrolyse. Ofte fjernes en funktionel gruppe:



Da reaktionen er reversibel, kan der tilsvarende adderes en funktionel gruppe. Enzymer der forbindes med en sådan reaktion, navngives ofte en syntase.

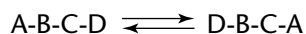
Ofte fraspaltes to grupper eller atomer, og der dannes i stedet en dobbeltbinding, eller to grupper adderes til en dobbeltbinding:



Decarboxylaser er lyaser som fraspalter  $\text{CO}_2$  fra en syregruppe. Der er flere eksempler på dette i citronsyrecyklus, se side 125 og appendiks 4.

### Isomeraser

Isomeraser katalyserer isomeriseringsreaktioner, dvs. reaktioner hvor funktionelle grupper flyttes inden for molekylet:

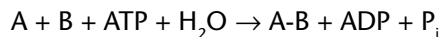


Enzymet ændrer altså ikke molekylets bruttoformel, men kun dets struktur.

Appendiks 4 uddyber isomerasernes rolle i glykolyse og citronsyrecyklus. Se fx glykolysens proces 5 og citronsyrecyklus proces 3. Begge processer er reversible, og omdannelsen er afhængig af at produktet forbruges i næste proces.

### Ligaser

Ligaser katalyserer reaktioner hvor to molekyler bindes sammen.



Reaktionen koster energi, som kommer fra hydrolyse af en energirig binding, typisk spaltning af ATP.

Ligaser kaldes også syntetaser.

DNA-ligase, side 44-45 sætter DNA-stykker sammen.

Carboxylaser katalyserer flere af stofskifteprocesserne hvor der sættes  $\text{CO}_2$  på et molekyle, se appendiks 4. Enzymet rubisco, se side 116, er af særlig vigtig betydning for hastigheden hvormed Calvins cyklus kan forløbe i fotosyntesens mørkeproces.

Citratsyntetase overfører en acetylgruppe fra acetyl-CoA til oxaloacetat så der dannes citrat i citronsyrecyklus, side 125 samt appendiks 4.