

5.GAIA: ZINETIKA ENTZIMATIKOA

Lehen ideiak: ENTZIMA-SUBSTRATU KONPLEXUA (ES)

XIX. Mendearen bukaeran parametro zinetikoen lehen azterketak.

- Ez ziren entzima puruak erabiltzen, hau da, entzima estraktuak erabiltzen zituzten. Nahaste bat zen zeinetan beste ehu, zelula eta substantzia asko zeuden.
- Ez zen pHa indargetzaile bidez indargetzen. Beraz pH aldaketak ematen ziren neurketetan. Gainera ikertzaile bakoitzak datu ezberdinak eskuratzen zituen, pH ez baitzen egonkor mantentzen, eta horrek entzimaren aktibitateari eragiten zion.
- Erreakzioa denbora tarte zabal batean jarraitzen zen → gaur egun hasierako momentuan. Gaur egun hasierako abiadura neurtzen dugu.
- Hartziduran parte hartzen zuten entzimak aztertu zituzten O'Sullivan eta Tomson-ek 1890an → "Invertasa" aztertu zuten.

Sakarosa+Ura → Glukosa+Fruktosa

Erreakzio abiadura:

- Entzima kontzentrazioarekiko proportzionala
- Substratu kontzentrazioarekiko proportzionala: Substratu kontzentrazioa handituz, erreakzioaren abiadura handitu.
- Ikusi zuten, tenperatura handitzean erreakzioa azkartu egiten zela puntu batetara

arte. Izan ere, erreakzioak "tenperatura optimoa" du, hortik igoz gero, abiadura jaisten da.

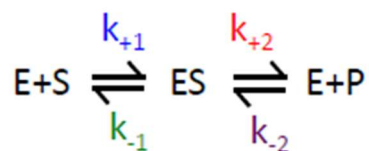
- Gainera ohartu ziren, Invertasa-ren egonkortasun termikoa haunditzen zen sakarosaren presentzian. Sakarosa Invertasa-ri batzen zaio eta ES eratzen da, eta hau, entzima askea baino egonkortasun termiko handiagoa dauka, tenperatura altuagoak jasan ditzake desnaturializatu gabe. Horrela konturatu ziren ES konplexuaren existentziaz.
- Wurtz (1880) → ideia berdina proposatu zuen → papaina-fibrina erreakzio bitartekaria deskribatuz.

Brown-ek 1892an, ES ikuspuntu zinetiko batetik aztertu zuen, ondorioztatuz:

- ES-k ezartzen du erreakzioaren aktibitate maximoa.
- ES denbora tarte labur batetan existitzen da.
- Erreakzioaren abiadura maximoa izango da E guztia ES moduan egoteko S nahikoa dagoenean. Gaur egun honi Asetze edo Saturatze efektua deritzogu → E bakoitzak S kantitate desberdin bat beharko du asetzeko.

Substratu bakarreko entzimak

Substratu baterako batura gune bakarra duen entzima bat. Erreakzio horretarako ekuazio orokorra:

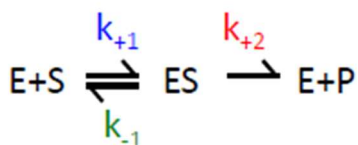


k_{+1} , k_{-1} , k_{+2} eta k_{-2} abiadura konstanteak dira.

Gauza bat onartu beharra daukagu, hasierako denboran, P-ren kontzentrazioa oso txikia izango da, izan ere, ez baitu izan denbora nahikorik hori eratzeko, beraz:

$$v_{-2} = k_{-2} [E][P] \approx 0$$

hau da, v_{-2} (abiadura) ia zero izango da, oso balio baxua izango du, hortaz arbuigarria da, ekuazio orokorra honela utziz:



Abiadurak:

$$v_{+1} = k_{+1} [E][S]$$

2. Ordeneko erreakzioa → erreakzioaren abiadura bi erreaktiboaren kontzentrazioarekiko proportionala: $[E]$ eta $[S]$ → **Eraketa abiadura**

$$v_{-1} = k_{-1} [ES]$$

1. Ordeneko erreakzioa → erreakzioaren abiadura erreaktibo baten kontzentrazioarekiko proportionala: $[ES]$ → **Disoziazio abiadura**

$$v_{+2} = k_{+2} [ES]$$

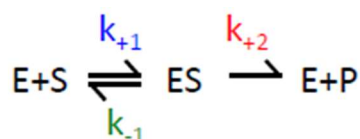
1. Ordeneko erreakzioa → erreakzioaren abiadura erreaktibo baten kontzentrazioarekiko proportionala: $[ES]$ → **Benetako abiadura entzimatikoa**

Konstante katalitikoa

$$v = k [ES] \rightarrow \text{P emango du}$$

k_{+2} hartuko dugu konstante katalitikotzat, izan ere, honek emango baitigu erreakzioaren benetako abiadura, hau da, produktuaren eraketaren maila.

Zinetika substratu bakar batentzat abiadura ekuazioa



$$v = k[ES]$$

BRIGGS-HALDANE (1925)

-Egoera geldikorra \rightarrow $[ES]$ kte.

Denboran zehar \rightarrow $d[ES]/dt=0$

$$v_{+1}=v_{-1}+v_{+2}$$

- $[S]_0 \gg [E]_0$

-ES konplexuaren disoziazioa E+P-ra oso azkarra izango da

HENRI-MICHAELIS-MENTEN (1913)

-Oreka azkarra \rightarrow $[E]$ $[S]$ eta $[ES]$

artean \rightarrow $v_{+1}=v_{-1}$.

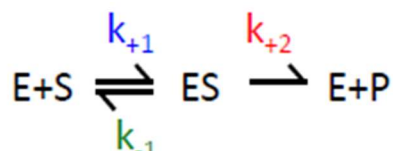
-Oreka egoera oso azkar lortzen da eta mantendu egiten da.

-ES konplexuaren disoziazioa E+P-ra oso prozesu geldoa da.

- Erreakzio itzulezinak

Egoera gehienetan bi trataerek abiadura ekuazio berak ematen dituzte baina zenbait faktoreren definizioak aldatzen dira

BRIGGS-HALDANE (1925)



Oinarria

Hainbat suposizio edo hurbilketa egin zituzten beraien ondorioak atera ahal izateko.

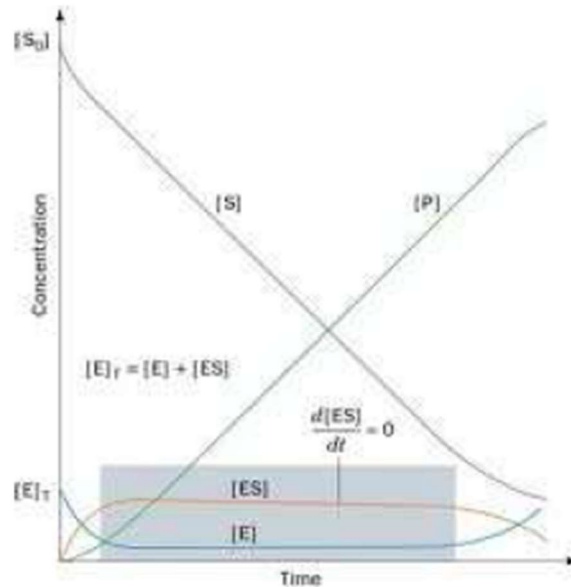
- $[E]$ eta beraz $[ES]$ oso txikia $[S]$ rekin alderatuta, horrenbestez

$$[S]_0 \gg [E]_0$$

- Horrela **EGOERA GELDIKOR** batetan egongo gara, hau da, suposatzen dugu $[ES]$ kontzentrazioak ez duela aldaketarik jasoko erreakzioan zehar. **ES konstante** mantenduko da. Soilik oso hasierako momentuan izango da kontzentrazio ezberdina, ES eratzen den momentuan, hala ere, orduan ere S_0 kontzentrazioarekin alderatuz oso baxua izango denez, ez du inongo eraginik izango.

$$dES/dt=0 \rightarrow v_{+1}=v_{-1}+v_{+2}$$

- [P]ren agerpen abiadura egoera geldikorreko [ES]ren araberakoa izango da.



Beraz, Briggs eta Haldanek, oinarritzko hiru kontzeptu onartu zituzten:

1. [ES] oso txikia eta kte mantenduko da, beraz $\rightarrow dES/dt=0$
 2. Edozein momentutan $[E]_{TOTALA}=[E]+[ES]$
 3. $[S]_0 \gg [E]_0$, ES-ren sorrerak ez du [S] aldatzen.
- } Egoera geldikorra

$$V_{ES \text{ SORRERA}} = V_{ES \text{ DESAGERPENA}}$$

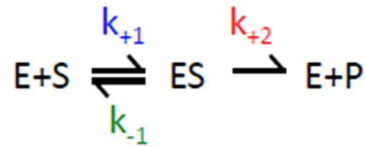
Egoera geldikorrean, abiaduren arteko erlazioa ondokoa izango da:

$$v_{+1} = v_{-1} + v_{+2}$$

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

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

BRIGGS-HALDANE-ren EKUAZIOA: 3 PAUSUTAN



1- $\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} = K_m \rightarrow$ Abiadura kteen arteko erlazioa K_m -ren berdina da \rightarrow Egoera geldikorreko ktea

2- $\frac{([E]_{TOT} - [ES])[S]}{[ES]} = K_m \rightarrow [E]_{TOT}[S] - [ES][S] = K_m[ES]$

$$[E]_{TOT}[S] = [ES](K_m + [S]) \rightarrow [ES] = \frac{[E]_{TOT}[S]}{K_m + [S]}$$

3- 2. Erreakzioan abiadura ordezkatzuz: $v = k_{+2}[ES]$

$$v = \frac{k_{+2}[E]_{TOT}[S]}{K_m + [S]} \rightarrow \text{Entzima bat substratuz saturatuta dagoenean: } v = V_{max} = k_{+2}[E]_{TOT}$$

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

Briggs-Haldane ekuazioa \rightarrow entzimak katalizatutako erreakzioaren abiadura kalkulatu daiteke S-ren edozein kontzentrazioarako

Briggs-Haldane-ren ekuazioa: 3 egoera

0. $[S] \ll K_m$: $[S]$ ia arbuigarria izango da. Ekuazioaren izendatzailetik $+ [S]$ adierazpena kenduko da. Horrela, abiadura $[S]$ -rekiko zuzenki proportzionala izango da, ikuspuntu kimikotik 1. ordeneko ekuazioa bihurtuko delarik:

1. Orden mistoko erreakzioa. $K_m = [S]$

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} = \frac{V_{max}}{2}$$

$$v = \frac{V_{max}}{K_m} [S]$$

$[S]$ ak ekuaziotik ezabatuz lortzen dugu K_m eta $[S]$ -ren balioak berdinak diren puntuan abiadura maximoaren erdia izango dela. Izan ere, puntu horretan

$V_{max} = 2v$ -gatik ekuazio orokorrean ordezkatzuz gero ondorio berdinerira iritsiko gara:

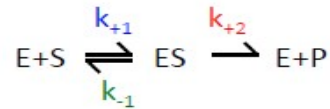
$$v = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_m} \rightarrow v = \frac{V_{max}[S]}{K_m}$$

$$v = \frac{V_{max}}{2} \rightarrow vK_m + v[S] = 2v[S]$$

$$vK_m = v[S] \rightarrow K_m = [S]$$

2. $[S] \gg K_m$ bada, $[S]$ hain da handia ezen K_m arbuigarria izango den. K_m ekuazio orokorretik ezabatuz gero, $[S]$ ak sinplifikatzeko gai izango gara, eta $V=V_{max}$ izango da egoera honetan. Izan ere, substratuaren kontzentrazioa saturatzailea izango da eta hortaz E guztia ES moduan egongo da. V $[S]$ -rekiko guztiz independentea izango da eta 0 ordeneko ekuazio baten aurrean egongo gara.

$$v = \frac{V_{max} [S]}{[S]} \rightarrow v = V_{max}$$



MICHAELIS-MENTEN (1910)

Michaelis eta Menten-ek haien hurbilketa egiteko **oreka azkarraren** egoera erabili zuten.

Oinarria:

- Oreka egoeran $[E]$, $[S]$ eta $[ES]$ artean oso azkar lortu eta mantendu egiten da.
- ESren disoziazioa $E+P$ emateko oso geldoa da. Pausu mugatzailea dela esan daiteke, eta hortaz oreka ez da apurtuko. Horren eraginez V_{+2} arbuigarria dela onartzen da.
 - Izan ere, oso azkar lortuko da ES, baina honetatik produktuak lortzeko erreakzioa askoz motelagoa da Esaren sorrera baino, eta beraz pausu mugatzailea dela esan daiteke.
- V_{+1} eta V_{-1} berdinak izango dira beraz, V_{-2} arbuigarria izanik hasierako momentuan oraindik P sortu ez delako.
 - $[ES]$ konstante izateko, ES konplexuaren disoziazio eta asoziazio abiadurak berdinak izango dira.

Onartuz:

$$V_{+1} = k_{+1} [E][S] \quad V_{-1} = k_{-1} [E][S]$$

$$V_{+1} = V_{-1} \rightarrow k_{+1} [E][S] = k_{-1} [ES]$$

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = K_s$$

DISOZIAZIO
OREKA-
KONSTANTEA

Michaelis-Menten ekuazioa 3 pausutan

1- $\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = K_S$  Abiadura kteen arteko erlazioa K_S -ren berdina da \rightarrow Disoziazio oreka ktea

$$2- \frac{([E]_{TOT} - [ES])[S]}{[ES]} = K_s \rightarrow [E]_{TOT}[S] - [ES][S] = K_s[ES]$$

$$[E]_{TOT}[S] = [ES](K_s + [S]) \rightarrow [ES] = \frac{[E]_{TOT}[S]}{K_s + [S]}$$

3- 2. Erreakzioan abiadura ordezkatzuz: $v = k_2 [ES]$

$v = \frac{k_{+2} [E]_{TOT} [S]}{K_S + [S]}$ Entzima bat substratuz saturatuta dagoenean: $v = V_{max} = k_{+2} [E]_{TOT}$

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_S + [S]}$$

Michaelis-Menten ekuazioa → entzimak katalizatutako erreazioaren abiadura kalkulatu daiteke S-ren edozein kontzentrazioarako

Briggs-Haldane vs Michaelis-Menten $\rightarrow K_m$ vs K_s

BRIGGS-HALDANE:
Egoera geldikorra

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

MICHAELIS-MENTEN:
Oreka egoera

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

Antzeko ekuazioak lortzen dira eta K_m eta K_s hurrengo moduan daude erlazionatuta:

$$\begin{aligned} K_m &= \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} \\ K_S &= \frac{k_{-1}}{k_{+1}} \end{aligned} \quad \Rightarrow \quad K_m = K_S + \frac{k_{+2}}{k_{+1}}$$

Noiz izango dira K_m eta K_s baliokideak? K_{-1} eta $K_{+1} \gg \gg \gg \gg \gg \gg K_{+2}$ direnean. Izan ere, erreakzio hauetan K_{+1} eta K_{-1} , K_{+2} baino askoz handiagoak direnez, hau arbuia garria izango da, eta K_m eta K_s erlazioatzen dituen ekuaziotik K_{+2}/K_{+1} batukaria kendu egin daiteke. Kasu honetan K_m eta K_s baliokidetzat har daitezke:

$$K_m = K_s$$

Orokorrean, Briggs-Haldaneren ekuazioa orokorragoa da.

Asetze funtzioa

[S]-rentzako asetze funtzioa:

Onartuz:

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

$$K_{+2} = \frac{[E][P]}{[ES]}$$

$$V = K_{+2} \cdot [ES]$$

$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

$$V_{\text{max}} = K_{+2} [E]_{\text{Tot}}$$

$$V = \frac{[ES]}{[E] + [ES]} = \frac{[ES]}{\frac{K_s [ES]}{[S]} + [ES]} = \frac{[ES][S]}{[ES] \cdot (K_s + [S])} = \frac{[S]}{K_s + [S]} = \frac{[ES]}{[E]_{\text{Tot}}} \cdot \frac{K_{+2}}{K_{+2}} = \frac{V}{V_{\text{max}}}$$

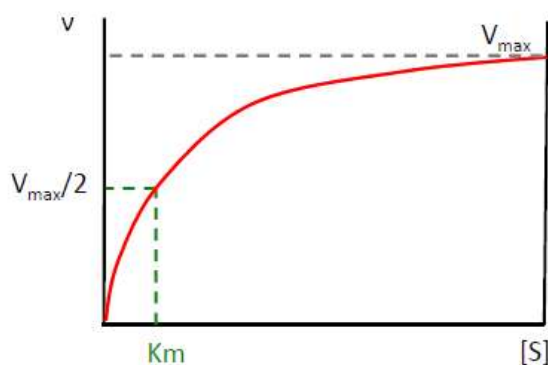
Beste modu batean askatuz:

ASETZE-FUNTZIOA eta ABIADURA EKUAZIOA

$$v_s = \frac{[ES]}{[E]_{\text{TOT}}} = \frac{[ES]}{[ES] + [E]} = \frac{\frac{[S]}{K_s} [E]}{\frac{[S]}{K_s} [E] + [E]} = \frac{\frac{[S]}{K_s}}{\frac{[S]}{K_s} + 1} = \frac{[S]}{K_s + [S]} = \frac{v}{V_{\text{max}}}$$

IRUDIKAPEN GRAFIKOAK

- 1) **ZUZENA**: Abiadura (V) vs. Substratu kontzentrazioak [S]



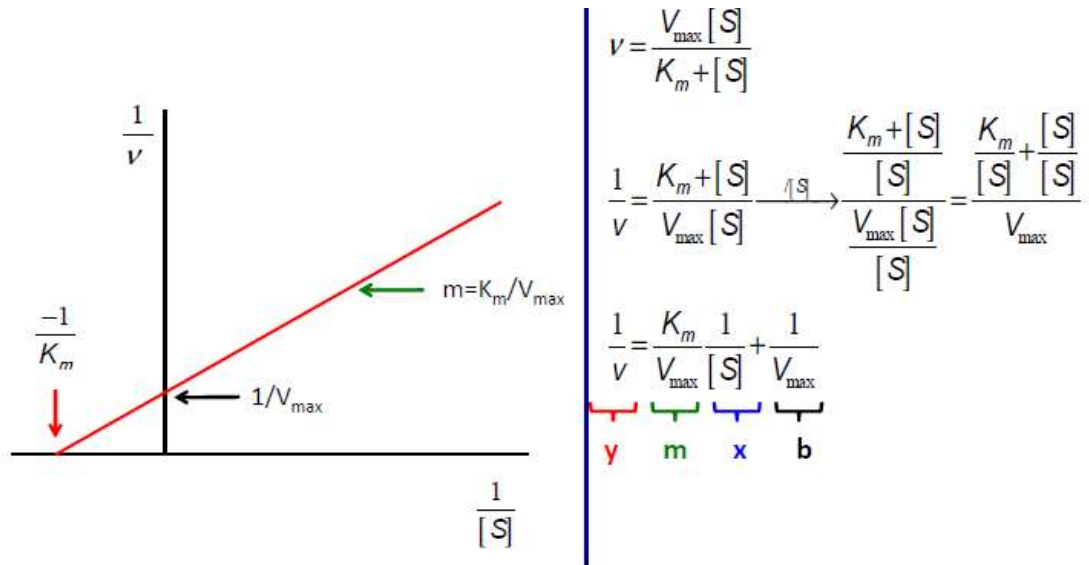
1-
$$v = \frac{V_{\text{max}}}{2} \rightarrow vK_m + v[S] = 2v[S]$$

$$vK_m = v[S] \rightarrow K_m = [S]$$

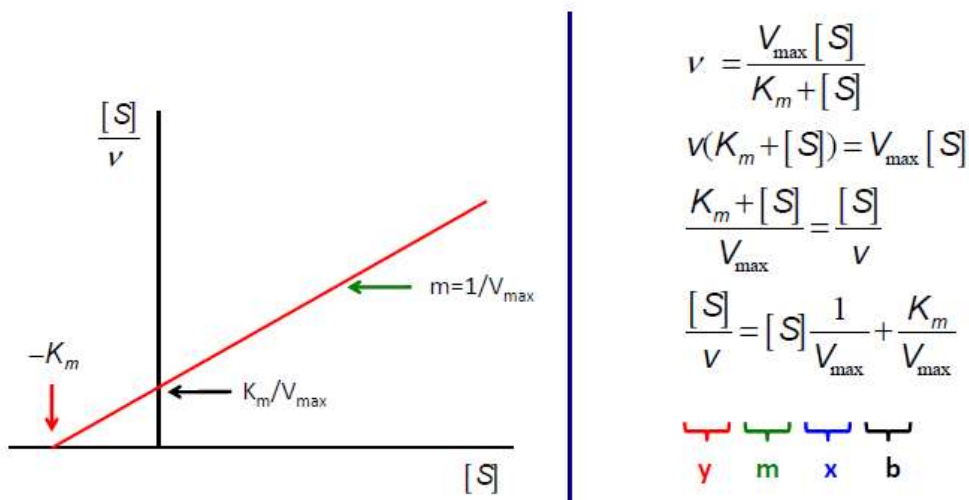
2- $[S] \gg K_m \rightarrow$ Substratuaren kontzentrazioa saturantea da

$$v = \frac{V_{\text{max}} [S]}{[S]} \rightarrow v = V_{\text{max}}$$

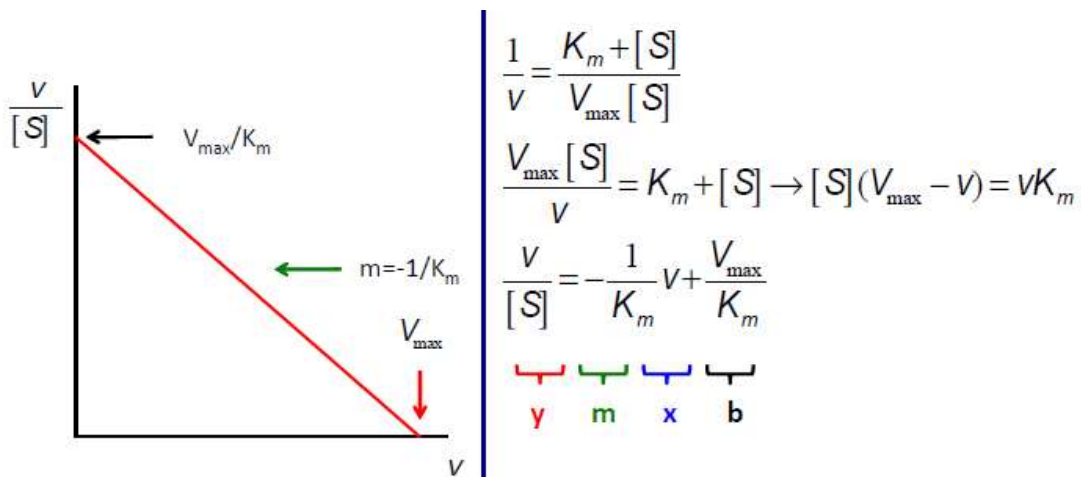
- 2) **ALDERANTZIZKO BIKOITZA (LINEWEAVER-BURK) IRUDIKAPENA:** abiaduraren inbertsioa ($1/V$) vs. Substratu kontzentrazioaren alderantzizkoa ($1/[S]$) (zehatzagoa)



- 3) **DIXON IRUDIKAPENA:** $[S]/V$ vs. Substratu kontzentrazioa $[S]$ → Inhibizio kasuen azterketarako erabiltzen da batez ere.



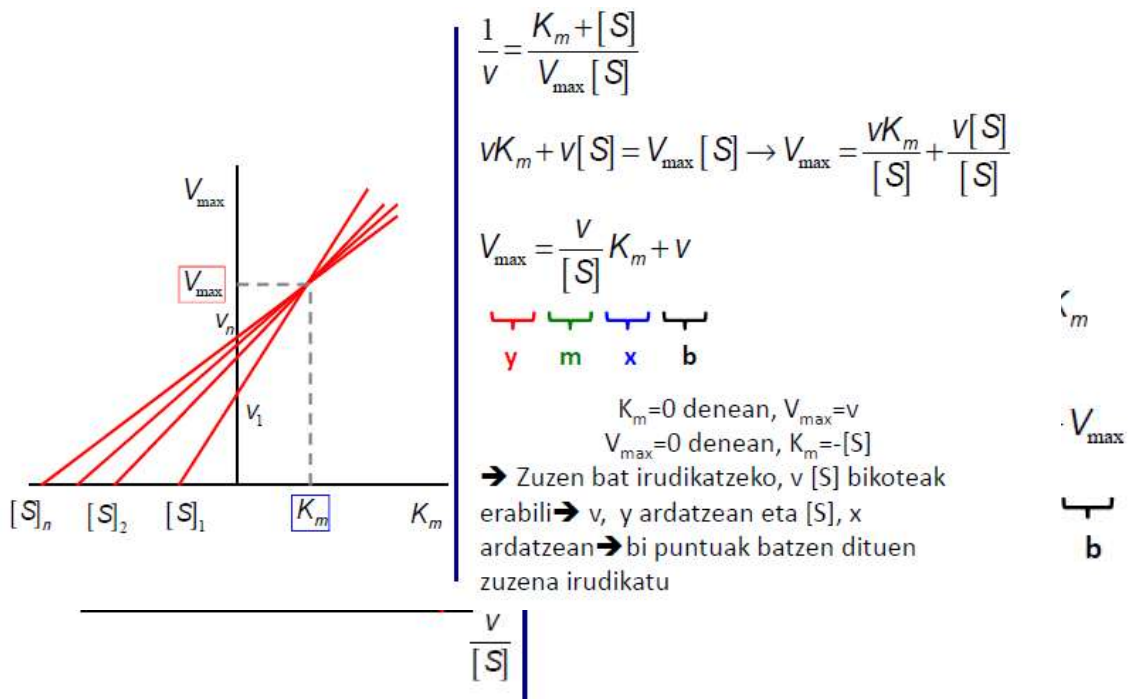
- 4) **EADI IRUDIKAPENA:** $V/[S]$ VS. Abiadura (V)



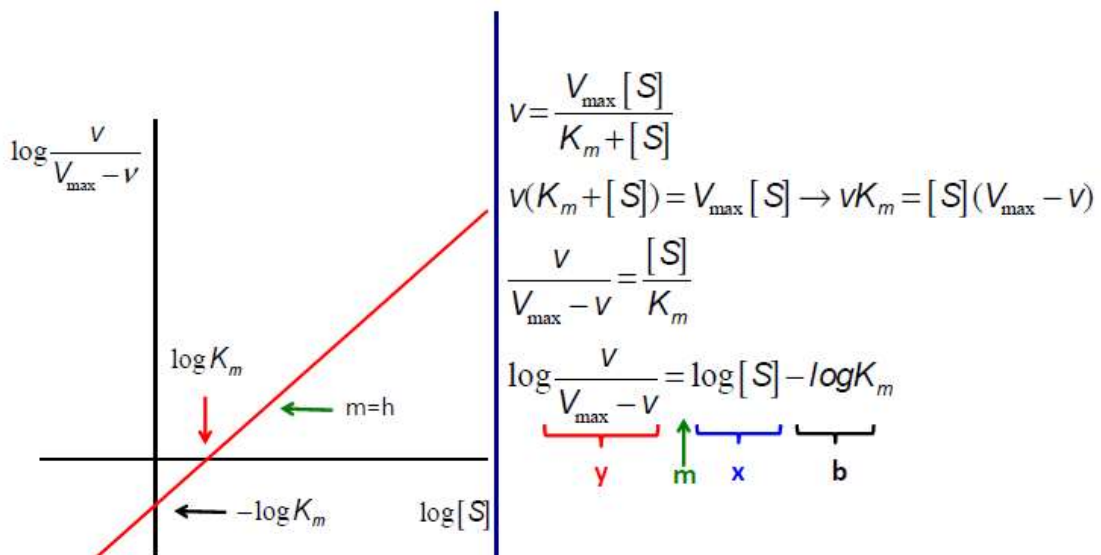
- 5) **EADOE-HOFSTEE IRUDIKAPENA:** abiadura (V) vs V/[S] . Eadiren irudikapenaren berdina da baina alderantziz.
- 6) **EISENTHAL ETA CORNISH-BOWDEN IRUDIKAPENA:** Vmax vs. Km irudikatzen da. [S] desberdinetan egiten dira neurketak.

[S] ezberdinetan V_k kalkulatu dira. Beraz, grafikoa eratzean [S] eta V ezagunak izango dira eta V_{max} eta K_m kalkulatzeko erabiliko ditugu. Bi puntu erabiliko dira zuzena irudikatzeko: k_m=0 denean (V=V_{max}) eta V_{max}=0 (K_m=-[S]) denean.

Zuzen guztiak batzen diren puntuak emango digu sistemaren K_m eta V_{max} zein diren. Izan ere, sistema guztiek, nahiz eta [S] desberdinak izan, K_m eta V_{max} balio berdinak izan behar dituzte.



- 7) **HILL IRUDIKAPENA:** log(V/V_{max}-v) vs. Log [S] → bereziki alosterismoan erabiltzen den irudikapena da.



EFIZENTZIA KATALITIKOA

$K_m \rightarrow$ **Espezifitate** entzimatoarekin dago erlazionatuta. Konstante zinetikoen arteko erlazioa ezartzen du gainera. Entzimak bere substratuarekin nolako elkarrekintzak dituen esango digu. Bere balio fisiologikoa normalean 10^{-1} eta 10^{-7} M artean egon ohi da (kontzentrazio unitateekin)

$K_{cat} \rightarrow$ **Konstante katalitiko edo ordezkapen zenbakia** $\rightarrow K_{+2}$. Denbora unitateko, zentro aktibo bakoitzak katalizatzen dituen erreakzio prozesu kopuru maximoa adierazten du.

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]_{TOT}}$$

Efizientzia katalitiko eta espezifitate katalitikoaren neurketa eta haien arteko erlazioa:

$$\frac{k_{cat}}{K_m}$$

Efizientzia balio hau zenbat eta handiagoa izan orduan eta entzima EFIZIENTEAGOA dela esango digu. Izan ere, K_m txikia dela adierazten du horrek, hau da, entzimaren eta substratuaren afinitatea handia dela, eta gainera, K_{cat} handia dela, hau da, ordezkapen azkarra (denbora unitateko ziklo asko burutuko ditu).

PERFEKZIO KATALITIKOA

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}$$

Efizientzia katalitiko = $k_{cat} / K_m = k_{+2} / K_m = \frac{k_{+2}}{\frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}} = \frac{k_{+2} k_{+1}}{k_{-1} + k_{+2}}$

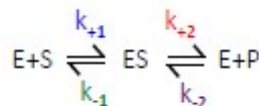
Perfekzio katalitiko: entzima baten efizientzia katalitikoaren balio maximo teorikoa da. Hau emango da, ES konplexu gehiena P bilakatzen denean. Momentu horretan, ez da ia ezer $E+S$ ra disoziatuko, eta beraz, $K_{+2} \gg \gg \gg \gg \gg K_{-1}$ izango da.

Beraz, K_{-1} arbuigarria izango da, eta ondorengo ekuazioa lortuko dugu:

$$k_{+2} \gg \gg \gg \gg \gg k_{-1}$$
$$\frac{k_{cat}}{K_m} = k_{+1}$$

ERREAKZIO ITZULGARRI ETA AZKARRAK

Ahal den kasu gehienetan hasierako abiadurarekin egingo dugu lan, eta kasu horietan produktuaren kontzentrazioa arbuigarria izango da. Hala ere, badaude zenbait kasu zeintzuetan $[P] \neq 0$ izango den, normalean erreakzioak oso azkarrak direlako.



Beraz, kasu hauetan ezin izango dugu K_{-2} arbuia. Entzima mota hauen azterketa egiteko, eta haien erreakzio abiadura kalkulatzeko erabil daitezke:

- Haldane-ren erlazioa
- Michaelis-Menten forma integratua (erabiliena)

Haldaneren erlazioa:

- Konstante zinetikoak (egoera geldikorreko ekuazioa eta Michaelis-Menten-en disoziazio konstantearen ekuazioa) eta oreka konstantea erlazionatzen ditu:
 - Egoera geldikorra (Haldane):

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}$$

- Oreka egongo da [E] + [S] eta [ES] artean (Michaelis-Menten-en ideia, disoziazio konstantea)
- [P]≠0 oreka kimikoaren konstante orokorra:

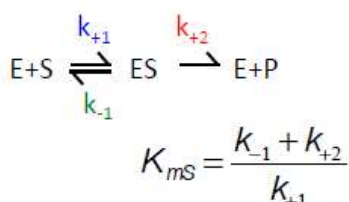
$$K_{orek} = \frac{[P]_{orek}}{[S]_{orek}} = K_1 K_2 = \frac{k_{+1}}{k_{-1}} \frac{k_{+2}}{k_{-2}}$$

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

- K_m , K_s eta K_{orek} entzimaren kontzentrazioarekiko independenteak izango dira
- Muturreko bi egoera definitzen dira Haldaneren erlazioa ezartzeko:

A) [S] asetzailea da. $[S] \rightarrow \text{inf.}$

Erreakzioa P aldera egongo da bultzatua, eta horrenbestez, K_2 arbuigarria izango da.



K_{mS} izena emango zaio [S] asetzailea denean dugun kteari.

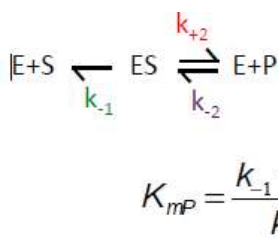
Erreakzioa P+E-runtz

Substratuz saturatuta dagoenean:

$$\bar{V}_{\max} = k_{+2} [E]_{TOT}$$

B) [P] asetzailea da. $P \rightarrow \text{inf.}$

Substratuaren agerpenaren aldera bideratuta egongo da erreakzio osoa. K_{+1} arbuigarria izango da.



Erreakzioa S+E-runtz

Produktuz saturatuta dagoenean:

$$\bar{V}_{\max} = k_{-1} [E]_{TOT}$$

ES kte mantendu nahi dugunez, aztertuko dugun erlazioa izango da ES desagerpena/ES agerpena

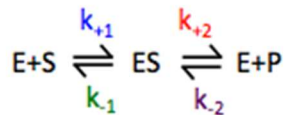
K_{mP} izena emango zaio [P] asetzailea denean dugun kteari.

$$V_{ES\ desag} = V_{ES\ agerp}$$

$$V_{-2} = V_{+2} + V_{-1} \rightarrow [E][P]K_{-2} = K_{+2}[ES] + K_{+1}[ES]$$

$$[E][P]K_{-2} = (K_{+2} + K_{-1})[ES] \rightarrow \frac{[E][P]}{[ES]} = \frac{K_{+2} + K_{-1}}{K_{-2}} = K_{mP}$$

Haldaneren erlazioa 3 pausutan:



1- Produktu eraketa:

$$\frac{\vec{V}_{\max}}{K_{mS}} = \frac{k_{+2}[E]_{TOT}}{\frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}} = \frac{k_{+1}k_{+2}[E]_{TOT}}{k_{-1} + k_{+2}}$$

2- E+S eraketa:

$$\frac{\vec{V}_{\max}}{K_{mP}} = \frac{k_{-1}[E]_{TOT}}{\frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{-2}}} = \frac{k_{-1}k_{-2}[E]_{TOT}}{k_{-1} + k_{+2}}$$

Kte zinetikoak, oreka ktearekin erlazionatzeko → 1 ekuazioa/2 ekuazioa

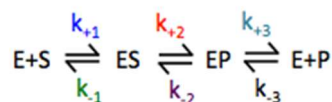
$$\frac{\frac{\vec{V}_{\max}}{K_{mS}}}{\frac{\vec{V}_{\max}}{K_{mP}}} = \frac{k_{+1}k_{+2}}{k_{-1}k_{-2}} = K_1K_2 = K_{orek} = \frac{[P]_{orek}}{[S]_{orek}} = \frac{\vec{V}_{\max} K_{mP}}{\vec{V}_{\max} K_{mS}}$$

Prozesu honetatik Haldaneren erlazioa lortzen da:

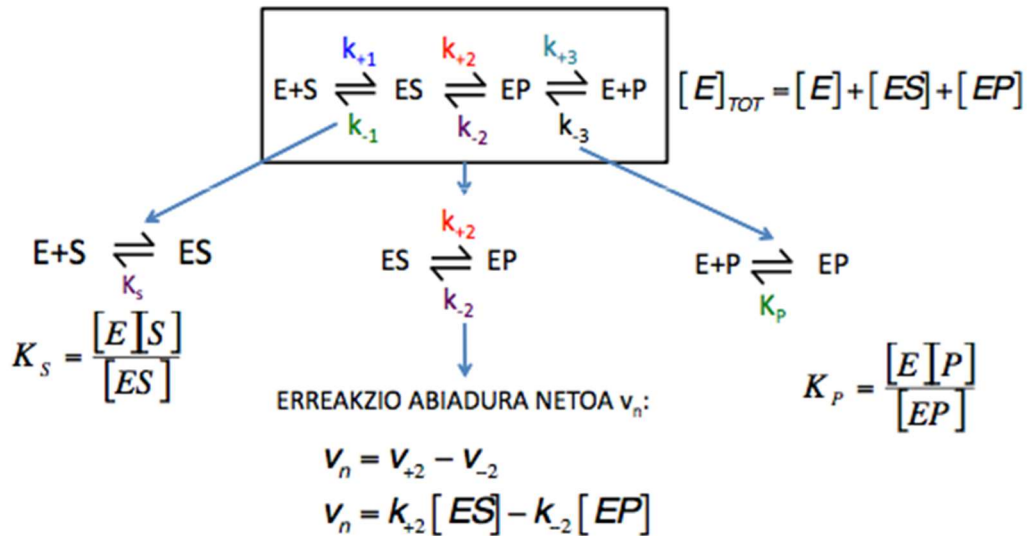
$$K_{orek} = \frac{k_{+1}k_{+2}}{k_{-1}k_{-2}} = \frac{\vec{V}_{\max} K_{mP}}{\vec{V}_{\max} K_{mS}}$$

$$K_{orek} = \frac{[P]_{orek}}{[S]_{orek}}$$

K_{orek} -ren balioak, erreakzioaren norantza esaten digu. P eratzeak efektu bat edukiko du erreakzioaren abiaduran. Izan ere, erreakzioa itzulgarria denez, P erreaktibo moduan jokatu du eta beste bitartekari bat izendatu beharko da: EP



Momentu honetan erreakzioa 3 pausutan banatu daiteke:



Alde batetik, ES eta EP konplexuen disoziazio konplexuak izango ditugu eta bestetik erreakzioaren abiadura netoa, pausu katalizatzaileak ($ES \leftrightarrow EP$) ematen duena eta eskuineko eta ezkerreko erreakzioen balantzea dena.

1- Abiadura netoa zati $[E]_{TOT}$

$$\frac{v_n}{[E]_{TOT}} = \frac{k_{+2}[ES] - k_{-2}[EP]}{[E] + [ES] + [EP]}$$

$$K_S = \frac{[E][S]}{[ES]} \\
 K_P = \frac{[E][P]}{[EP]}$$

Ondoren ES eta EP entzima askearen baitan adieraziko ditugu eta sinplifikatu:

2- $[ES]$ eta $[EP]$ ordezkatu

$$\frac{v_n}{[E]_{TOT}} = \frac{k_{+2} \frac{[S]}{K_S} - k_{-2} \frac{[P]}{K_P}}{1 + \frac{[S]}{K_S} + \frac{[P]}{K_P}} \rightarrow v_n = \frac{k_{+2}[E]_{TOT} \frac{[S]}{K_S} - k_{-2}[E]_{TOT} \frac{[P]}{K_P}}{1 + \frac{[S]}{K_S} + \frac{[P]}{K_P}}$$

3- Ordezkatu

$$\begin{aligned}
 \tilde{V}_{max} &= k_{+2}[E]_{TOT} \\
 \tilde{V}_{max} &= k_{-2}[E]_{TOT}
 \end{aligned}$$

$$v_n = \frac{\tilde{V}_{max} \frac{[S]}{K_S} - \tilde{V}_{max} \frac{[P]}{K_P}}{1 + \frac{[S]}{K_S} + \frac{[P]}{K_P}}$$

- Haldaneren erlazioa kontutan hartuz,

$$\frac{\frac{\vec{V}_{\max}}{K_{mS}}}{\frac{\vec{V}_{\max}}{K_{mP}}} = K_{eq} \rightarrow \frac{\vec{V}_{\max}}{K_{mP}} = \frac{\vec{V}_{\max}}{K_{mS} K_{eq}} \rightarrow \frac{\vec{V}_{\max}}{K_{mS}} = K_{eq} \frac{\vec{V}_{\max}}{K_{mP}}$$

Oreka azkarrean, $K_{mS}=K_S$ eta $K_{mP}=K_P$. Konstante hauek berdinduz, haldanaren erreakzioaren ordezkatu daitezke

[S] saturatzailea denean $v_{+2} \ll v_{-1}$

[P] saturatzailea denean $v_{+2} \gg v_{-1}$

$$K_{mS} = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = K_S$$

$$K_{mP} = \frac{k_{+2}}{k_{-2}} = K_P$$

$$K_{mS} = \frac{K_{-1} \cdot K_{+2}}{K_{+1}} \rightarrow K_{mS} = \frac{K_{-1}}{K_{+1}} \rightarrow K_{mS} = K$$

$$K_{mP} = \frac{K_{-2} \cdot K_{+3}}{K_{-3}} \rightarrow K_{mP} = \frac{K_{+3}}{K_{-3}} \rightarrow K_{mP} = K_P$$

$$\frac{\vec{V}_{\max}}{K_{mS}} = K_{eq} \frac{\vec{V}_{\max}}{K_{mP}} \rightarrow \frac{\vec{V}_{\max}}{K_S} = K_{eq} \frac{\vec{V}_{\max}}{K_P}$$

4.- Haldanaren erlazioa 3. erreakzioan ordezkatzuz:

$$\frac{\frac{\vec{V}_{\max}}{K_S}}{\frac{\vec{V}_{\max}}{K_P}} = K_{oreka} \rightarrow \frac{\vec{V}_{\max}}{K_S} = \frac{K_{oreka}}{K_P} \vec{V}_{\max} \rightarrow \frac{\vec{V}_{\max}}{K_S K_{oreka}} = \frac{\vec{V}_{\max}}{K_P} \rightarrow$$

$$\rightarrow v_n = \frac{\vec{V}_{\max} \cdot \frac{[S]}{K_S} - \frac{\vec{V}_{\max} \cdot [P]}{K_S \cdot K_{oreka}}}{1 + \frac{[S]}{K_S} + \frac{[P]}{K_P}} = \frac{\vec{V}_{\max} ([S] - \frac{[P]}{K_{oreka}})}{K_S [S] + \frac{K_S}{K_P} [P]} = \frac{\vec{V}_{\max} ([S] - \frac{[P]}{K_{oreka}})}{K_S (1 + \frac{[P]}{K_P}) + [S]}$$

$$v_n = \frac{\vec{V}_{\max} ([S] - \frac{[P]}{K_{eq}})}{K_S (1 + \frac{[P]}{K_P}) + [S]}$$

Produktuaren kontzentrazioa 0 denean, ekuazio hau sinplifikatu eta Michaelis-Menten ekuazioa lortuko da:

$$V = \frac{V_{max} \left([S] - \frac{[P]}{K_{orek}} \right)}{K_s \left(1 + \frac{[P]}{K_p} \right) + [S]} = \frac{V_{max} [S]}{K_s + [S]}$$

Beraz, produktuak eragina du erreakzioaren abiaduran. Batzuetan inhibitzaile lehiakor moduan jokatzen du aktibitate entzimatikoa inhibituz. Inhibizioetan:

$$K_s \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

Michaelis-Menten-en forma integratua:

Ekuazio diferentzial bat planteatzen da eta erreakzioaren abiadura substratu kontzentrazioaren desagerpena denborarekiko matematikoki idatziz. Helburua hasierako momentua ez den baldintzetan K_m eta V_{max} kalkulatzeko da.

- Substratuaren desagerpen abiadura:

$$v = \frac{-d[S]}{dt} = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \rightarrow V_{max} dt = - \frac{K_m + [S]}{[S]} d[S]$$

- $t=0$ eta $t=t$ tartean integratzen badugu:

$$V_{max} \int_{t_0}^t dt = - \int_{[S]_0}^{[S]} \frac{K_m + [S]}{[S]} d[S]$$

Konstanteak integraletik ateratzen dira eta integrala banatu:

$$V_{max} \int_{t_0}^t dt = -K_m \int_{[S]_0}^{[S]} \frac{d[S]}{[S]} - \int_{[S]_0}^{[S]} d[S]$$

$$V_{max} (t - t_0) = -K_m (\ln[S] - \ln[S]_0) - ([S] - [S]_0)$$

$t_0=0$ dela onartuko da

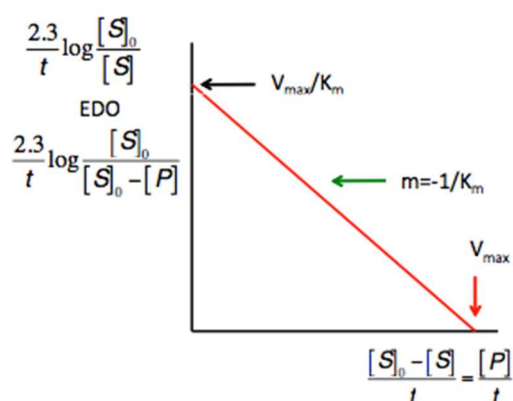
$$V_{max} \cdot \ln \frac{[S]_0}{[S]} + ([S]_0 - [S])$$

$$V_{max} \cdot \ln \frac{[S]_0}{[S]} + ([S]_0 - [S]) \rightarrow \frac{2.3}{t} \cdot \log \frac{[S]_0}{[S]} = \frac{V_{max} - [S]_0 - [S]}{K_m t} \rightarrow$$

→

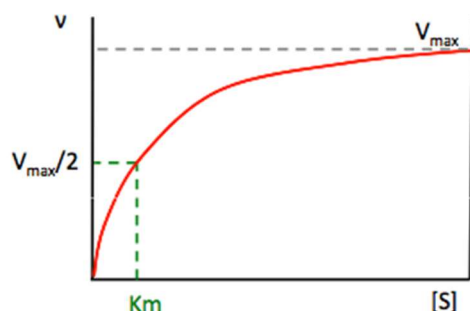
$$\underbrace{\frac{2.3}{t} \log \frac{[S]_0}{[S]}}_y = - \underbrace{\frac{1}{K_m}}_m \underbrace{\frac{([S]_0 - [S])}{t}}_x + \underbrace{\frac{V_{max}}{K_m}}_b$$

Ekuazio honekin hurrengo grafika eraiki daiteke:



Entzima Michaelianoen irudikapen zuzena eginez gero hurrengo grafikako hiperbola angeluzuen aldeakidea lotzen da baina entzima guztiak ez dira Michaelianoak. Adibidez, ligandoen artean kooperatibitate negatiboa ematen denean (adibidez entzimak X ligandoarentzat 4 zentro dituelako), ez da grafika hau lortuko. Nola jakin entzima bat Michaelianoa den?

Irudikapen zuzena:



$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

$$(V_{\max} - v)(K_m + [S]) = K_m V_{\max}$$

$$(a - y)(b + x) = Kte$$

Alde batetik, $(a-y)(b+x) = kste$ ematen badu, Michaelianoa izango da. Bestetik, frogatzeko beste modu bat honakoa da:

Abiadura maximoaren %90 eta %10 lortzeko substratu kontzentrazioak neurtzen dira: $[S]_{0,9}$ eta $[S]_{0,1}$ hurrenez hurren. Haien arteko zatiketak 81 ematen badu, entzima Michaelianoa dela jakingo dugu. Zergatik?

$$[S]_{0,1} \rightarrow v = 0.1 V_{\max} \rightarrow V_{\max} = 10v \quad v = \frac{10v[S]_{0,1}}{K_m + [S]_{0,1}} \rightarrow vK_m + v[S]_{0,1} = 10v[S]_{0,1}$$

$$K_m = 9[S]_{0,1} \rightarrow [S]_{0,1} = \frac{K_m}{9}$$

$$[S]_{0,9} \rightarrow v = 0.9 V_{\max} \quad 0.9 V_{\max} = \frac{V_{\max} [S]_{0,9}}{K_m + [S]_{0,9}} \rightarrow 0.9 K_m + 0.9 [S]_{0,9} = [S]_{0,9}$$

$$0.9 K_m = 0.1 [S]_{0,9} \rightarrow [S]_{0,9} = 9 K_m$$

$$\frac{[S]_{0,9}}{[S]_{0,1}} = \frac{9 K_m}{\frac{K_m}{9}} = 81$$

Erlazioak 81 ematen duenean \rightarrow Hiperbola angeluzuen aldeakidea \rightarrow Zinetika monosubstratu Michaelianoa