

# Stanovení enzymové aktivity

Enzymy jsou v biologickém materiálu obsaženy ve velmi nízkých koncentracích. Pro popis biochemických dějů je navíc užitečnější znát jejich účinnost spíše než samotné množství enzymu. Namísto měření koncentrace enzymu se proto většinou s výhodou využívá substrátové specifčnosti enzymů a jejich značné katalytické účinnosti při **měření aktivity enzymu**. Množství enzymu tedy kvantifikujeme nepřímou na základě **rychlosti**, jakou enzym katalyzuje přeměnu **substrátu na produkt** ve zvoleném **časovém** intervalu. Tato metoda je dostatečně specifická za předpokladu, že na substrát působí v daném materiálu jen jeden enzym. Je i dostatečně citlivá a přesná, je-li zvolena vhodná koncentrace substrátu vzhledem k enzymu a vhodná **metoda stanovení úbytku substrátu nebo přírůstku produktu v čase**, neboli vhodná metoda **stanovení rychlosti přeměny** substrátu na produkt.

## Enzymová aktivita

Abychom mohli snadno porovnávat rychlost úbytku substrátu nebo přírůstku produktu v různých časových intervalech, je účelné, aby tyto rychlosti byly v čase konstantní, tj. aby reakce probíhala podle **kinetiky nultého řádu**. Toho lze dosáhnout, přísně vzato, jen tehdy, je-li veškerý enzym substrátem nasycen, tj. když je veškerý enzym o **celkové koncentraci  $[E]_t$**  vázán v formě **enzym-substrátového komplexu ES**. Taková situace nastává jen při velkém nadbytku substrátu. Pak probíhá enzymová reakce s **maximální rychlostí  $V_{max}$** . Za této situace můžeme snadno definovat i jednotky enzymové aktivity, protože zdvojnásobíme-li koncentraci enzymu, vzroste dvojnásobně i maximální rychlost  **$V_{max}$**  apod.

Za podmínky, že enzym pracuje v prostředí se značným nadbytkem substrátu, můžeme tedy kineticky vyjádřit množství enzymu  **$[E]_t$**  jako rychlost  **$V_{max}$** . Jako jednotka množství enzymu, správněji množství enzymové aktivity, slouží **katal** (1 kat). Je to takové množství enzymové aktivity, které katalyzuje přeměnu 1 molu substrátu za sekundu. Pro praxi je tato jednotka hodně velká, proto většinou pracujeme s jejími zlomky – mikrokataly (1  $\mu$ kat =  $10^{-6}$  kat), nanokataly (1 nkat =  $10^{-9}$  kat) a pikokataly (1 pkat =  $10^{-12}$  kat)

Dříve se podle pravidel Mezinárodní biochemické unie (IUB) z r. 1961 množství enzymové aktivity vyjadřovalo v **enzymových jednotkách (U)**. Enzymová jednotka byla definována jako takové množství enzymu, které katalyzuje přeměnu 1  $\mu$ mol substrátu za minutu za standardních podmínek (tj. nasycení enzymu substrátem, udaná teplota a pH).

Převod enzymových jednotek (U) na kataly (kat) se řídí vztahem:

$$1 \text{ U} = 1 \mu\text{mol/min} = 1/60 \mu\text{mol/s} = 1/60 \mu\text{kat} = 16,67 \text{ nkat}.$$

V předchozím textu jsme předpokládali, že rychlost enzymové reakce sledujeme při maximálním nasycení enzymu substrátem (kinetika nultého řádu), tedy při dosažení maximální rychlosti  **$V_{max}$** . Za těchto podmínek je  **$V_{max}$**  úměrná koncentraci enzymu. Kinetiku nultého řádu lze však aproximativně využít i tehdy, jestliže enzym substrátem nasycen není, tj. i při menších koncentracích substrátu. Je to však možné jen tehdy, pokud se v průběhu měření koncentrace substrátu  **$[S]$**  příliš nemění – tj. příliš se nesnižuje oproti počáteční koncentraci substrátu  **$[S]_0$** . Tato podmínka je naplněna, sledujeme-li průběh reakce jen v prvních minutách, kdy je úbytek koncentrace substrátu menší než zhruba jedna desetina původní hodnoty. Rychlost reakce v této fázi označujeme jako *počáteční rychlost*  **$v_0$** . Rovněž koncentraci enzym-substrátového komplexu  **$[ES]$**  můžeme v této fázi pokládat za stálou (*steady-state*). Při větším úbytku substrátu (poklesu koncentrace  **$[S]$** ) ovšem koncentrace  **$[ES]$**  klesá, takže kinetika nultého řádu přechází do kinetiky prvního, druhého i vyššího řádu.

## Michaelisova konstanta

**Pomocí iniciální rychlosti  $v_0$**  lze sledovat pro určité předpokládané množství enzymové aktivity vztah této rychlosti  **$v_0$**  k určité výchozí koncentraci substrátu  **$[S]_0$** . Můžeme se tedy zabývat chováním enzymové reakce v situacích, kdy není dosaženo maximální rychlosti  **$V_{max}$**  pro celkovou koncentraci enzymu  **$[E]_t$** . U téhož enzymu může být ovšem pojem vysoké a nízké koncentrace substrátu relativní – může totiž záviset na konkrétním typu substrátu a na tom, jakou má enzym k tomuto substrátu afinitu. Využíváme proto veličinu, která je pro danou dvojici enzym-substrát charakteristickou konstantou. Je to tzv. **Michaelisova konstanta ( $K_m$ )**, která označuje takovou látkovou koncentraci substrátu, při níž je rychlost enzymové reakce ( **$v$** ) polovinou rychlosti maximální ( **$V_{max}$** ).

Michaelis a Mentenová odvodili vztah mezi  **$K_m$** ,  **$[S]$** ,  **$v$**  a  **$V_{max}$** :

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_m}{[S]}}$$

Nízká hodnota  **$K_m$**  značí velkou afinitu enzymu k substrátu. Vedle toho, že  **$K_m$**  charakterizuje danou dvojici enzym-substrát, je sledování  **$K_m$**  nezbytné též k odlišení mechanismu inhibice (nejčastěji typu kompetitivního nebo nekompetitivního).

# Stanovení Michaelisovy konstanty

Počáteční rychlost enzymové reakce se snáze měří pro nízké počáteční koncentrace substrátu  $[S]_0$ ; při vysokých koncentracích substrátu je reakční rychlost vysoká, substrát se rychle spotřebovává a reakční rychlost se tak podstatně mění během krátké doby od zahájení reakce. Ovšem vyneseme-li do grafu reakční rychlosti  $v$  proti počátečním koncentracím substrátu  $[S]_0$ , je obtížné přímo z tohoto grafu určit parametry  $V_{max}$  a  $K_m$ , máme-li k dispozici jen měření při nízkých koncentracích substrátu. Vzniklo proto několik postupů, jak tyto parametry určit.

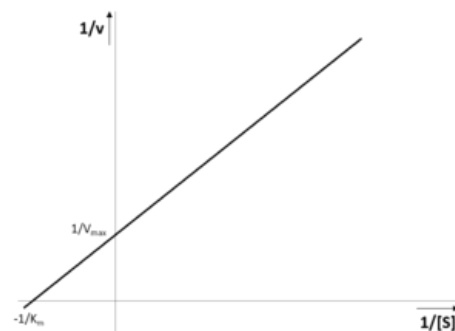
Mezi nejčastěji zmiňované grafické metody patří transformace dat podle Lineweavera a Burka. Hyperbolickou závislost rychlosti  $v$  na koncentraci substrátu  $[S]$

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

můžeme snadno transformovat na lineární funkci – převrácená hodnota rychlosti  $1/v$  totiž lineárně závisí na převrácené hodnotě koncentrace substrátu  $1/[S]$ :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m + [S]}{V_{max} \cdot [S]}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$



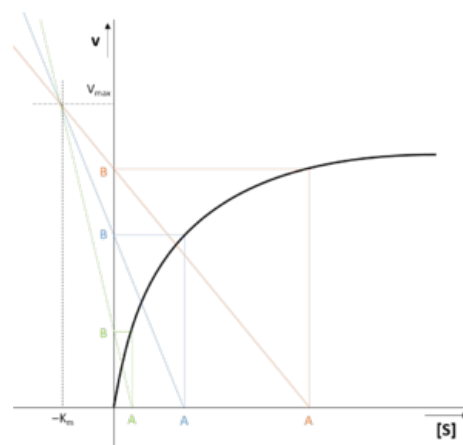
Závislost  $1/v$  na  $1/[S]$  podle Lineweavera a Burka

Vynášíme-li  $1/v$  na svislou osu a  $1/[S]$  na vodorovnou osu, budou za podmínek kinetiky 2. řádu naměřená data ležet v přímce. Tato přímka protíná svislou osu v hodnotě  $1/V_{max}$  a vodorovnou osu v hodnotě  $-1/K_m$ .

Metoda podle Lineweavera a Burka je bohužel citlivá i na relativně malé chyby měření při nízkých koncentracích substrátu. Přesnější grafickou metodou pro stanovení parametrů  $V_{max}$  a  $K_m$  je metoda podle **Eisenthala a Cornishe-Bowdena**. Postupuje se při ní takto:

1. Pro několik koncentrací substrátu  $[S]$  naměříme experimentálně reakční rychlosti  $v$ . Tyto hodnoty vyneseme do grafu jako závislost  $v$  na  $[S]$ .
2. Pro každý vynesení bod vyznačíme hodnotu  $[S]$  na vodorovné ose (bod A) a hodnotu  $v$  na svislé ose (bod B). Sestrojíme přímku, která prochází body A a B.
3. Z polohy průsečíku takto sestavených přímek lze odečíst hodnoty  $K_m$  a  $V_{max}$  (průsečík má souřadnice  $[-K_m, V_{max}]$ ).

Jinou grafickou metodou je vynesení podle **Eadie-Hofsteeho**. Vynáší se  $v$  na svislé ose proti  $v/[S]$  na vodorovné ose a body se proloží přímkou.  $V_{max}$  se vyhledá jako průsečík této přímky se svislou osou,  $V_{max}/K_m$  je průsečík s vodorovnou osou a směrnice přímky je  $-K_m$ .



Vynesení podle Eisenthala a Cornish-Bowdena

Grafické metody jsou sice ilustrativní, v současnosti se ovšem kinetické parametry počítají metodami nelineární regrese.