

Cinetica enzimatica

Funzione e applicazione di enzimi

- Gli enzimi sono **catalizzatori biologici** che permettono lo svolgimento di ogni processo biochimico che ha luogo all'interno della cellula.
- La catalisi enzimatica rende possibile la rottura dei legami chimici dei nutrienti ricavando così **l'energia necessaria allo svolgimento delle funzioni metaboliche** e permettendo la **sintesi dei differenti componenti cellulari**.
- Migliaia di diversi enzimi catalizzano praticamente tutti le reazioni che si svolgono nella cellula. Essi non solo creano blocchi come gli **amminoacidi, acidi e nucleotidi**, ma li assemblano anche in molecole di **DNA base per base, e in proteine amminoacido per amminoacido**, nell'ordine corretto. Cosa molto importante, gli enzimi permettono lo svolgimento di tali processi **con velocità elevate** (es. In Escherichia Coli, una copia completa del genoma composto da circa 4 milioni di basi è prodotta in circa 0.5 h).
- Gli enzimi non solo presenti solo nella cellula ma **possono essere rilasciati anche nell'ambiente esterno** permettendo la conversione di composti in forme che possano essere assimilate (esempi: **cellulasi** che permettono la produzione di glucosio dalla cellulose, **proteasi** che permettono la sintesi di amminoacidi e peptidi da proteine).

Funzione e applicazione di enzimi

- Con la loro versatilità, la capacità catalitica degli enzimi è stata sfruttata dagli uomini, prima **inconsapevolmente nella produzione di alimenti** e, dal secolo scorso, **intenzionalmente in applicazioni industriali**.
- Oggi, gli enzimi vengono utilizzati sistematicamente in tutto il **settore industriale della produzione di alimenti** (esempio: le **amilasi** vengono utilizzate per convertire l'amido in glucosio, la **glucosio isomerasi** viene utilizzata per convertire il glucosio in una miscela di glucosio e fruttosio usata come dolcificante nelle bevande analcoliche)
- Gli enzimi sono utilizzati anche per la **produzione di farmaci**, nonché per **l'uso diretto come medicinali** (esempi: modifica della penicillina prodotta nei bioprocessi mediante sostituzione di un lato della catena della penicillina nativa con un altro gruppo chimico, garantendo migliori caratteristiche cliniche e un diverso spettro antibatterico).
- Gli enzimi vengono utilizzati direttamente nel trattamento dei pazienti. La **DNasi**, ad esempio, è usata per trattare pazienti con **fibrosi cistica**.

Principali caratteristiche degli enzimi 1

- Gli enzimi sono catalizzatori biologici in grado di aumentare la cinetica di una reazione chimica senza subire cambiamenti chimici permanenti o influenzare l'equilibrio della reazione catalizzata;
- la maggior parte degli enzimi catalizza una sola reazione di uno specifico substrato;
- esistono in realtà anche enzimi meno specifici che catalizzano classi di reazioni con più substrati;
- il grado di specificità di un enzima è strettamente connesso al suo ruolo biologico;
- la specificità di un enzima sembra essere la conseguenza della sua elaborata conformazione tridimensionale che permette la formazione di un sito attivo responsabile delle abilità catalitiche dell'enzima.

Principali caratteristiche degli enzimi 2

- Un'altra caratteristica distintiva degli enzimi è il loro frequente bisogno di **cofattori** come attivatori della catalisi.
- I cofattori sono composti non proteici che si combinano con la proteina inattiva (**apoenzima**) per dare un complesso cataliticamente attivo spesso identificato con il termine **oloenzima**.
- Esistono due differenti tipi di cofattori:
 - semplici ioni metallici** (tipo Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} e Fe^{3+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^{+} , Zn^{2+})*
 - complesse molecole organiche chiamate **coenzimi** (NAD, FAD, CoA, ATP).*

Principali caratteristiche degli enzimi 3

- Sia i catalizzatori sintetici che gli enzimi possono perdere gradualmente la loro attività catalitica.
- In generale comunque gli enzimi sono più fragili dei catalizzatori sintetici in quanto ogni fattore ambientale che disturba la conformazione nativa della proteina ne può alterare le proprietà catalitiche.
- Gli enzimi sono generalmente più attivi (determinano un maggior incremento della cinetica) dei catalizzatori sintetici.
- Una misura comune dell'attività catalitica è il **numero di turnover** definito come il numero di molecole di substrato che reagiscono per sito catalitico per unità di tempo.

Confronto tra numeri di turnover di enzimi e catalizzatori sintetici

- A temperatura ambiente (la temperatura a cui è generalmente massima l'attività enzimatica) gli enzimi sono più attivi della maggior parte dei catalizzatori sintetici.
- Tuttavia incrementando la temperatura di reazioni molti catalizzatori di sintesi possono diventare attivi come gli enzimi a temperatura ambiente.
- Viceversa gli enzimi non presentano un incremento continuo di attività col crescere della temperatura.

Confronto tra numeri di turnover di enzimi e catalizzatori sintetici

Enzyme	Reaction	Range of reported <i>N</i> values at 0–37°C	
Ribonuclease	Transfer phosphate of a polynucleotide	$2-2 \times 10^3$	
Trypsin	Hydrolysis of peptides	$3 \times 10^{-3}-1 \times 10^2$	
Papain	Hydrolysis of peptides	$8 \times 10^{-2}-1 \times 10^1$	
Bromelain ¹	Hydrolysis of peptides	$4 \times 10^{-3}-5 \times 10^{-1}$	
Carbonic anhydrase	Reversible hydration of carbonyl compounds	$8 \times 10^{-1}-6 \times 10^5$	
Fumarate hydratase	L-Malate $\rightleftharpoons$ fumarate + H ₂ O	1×10^3 (forward) 3×10^3 (reverse)	

Solid catalyst	Reaction	<i>N</i>	Temp., °C
SiO ₂ -Al ₂ O ₃ (impregnated)	Cumene cracking	3×10^{-8}	25
		2×10^4	420
Decationized zeolite	Cumene cracking	$\sim 10^3$	25
		$\sim 10^8$	325
V ₂ O ₃	Cyclohexene dehydrogenation	7×10^{-11}	25
		10^2	350
Treated Cu ₃ Au	HCO ₂ H dehydrogenation	2×10^7	25
		3×10^{10}	327
AlCl ₃ -Al ₂ O ₃	<i>n</i> -Hexane isomerization (liquid)	1×10^{-2}	25
		1.5×10^{-2}	60

Principali caratteristiche degli enzimi 4

- Per sviluppare ed analizzare un sistema catalizzato da enzimi, è necessario avere a disposizione modello cinetico in grado di descrivere come cambia la velocità di reazione al variare dei parametri operativi:

$$r = f(\textit{composizione}, T, pH)$$

- Una volta disponibile, tale modello può essere utilizzato per risolvere problemi di progetto e controllo.
- Attraverso lo sviluppo di un modello cinetico, è possibile andare ad identificare i meccanismi che governano l'attività catalitica.
- La tecnica di modellazione cinetica di reazioni catalizzate da enzimi è la seguente:
 - 1) identificazione delle reazioni elementari su scala molecolare di uno o più intermedi reattivi
 - 2) determinazione di una velocità globale di reazione mediante semplici manipolazioni matematiche.

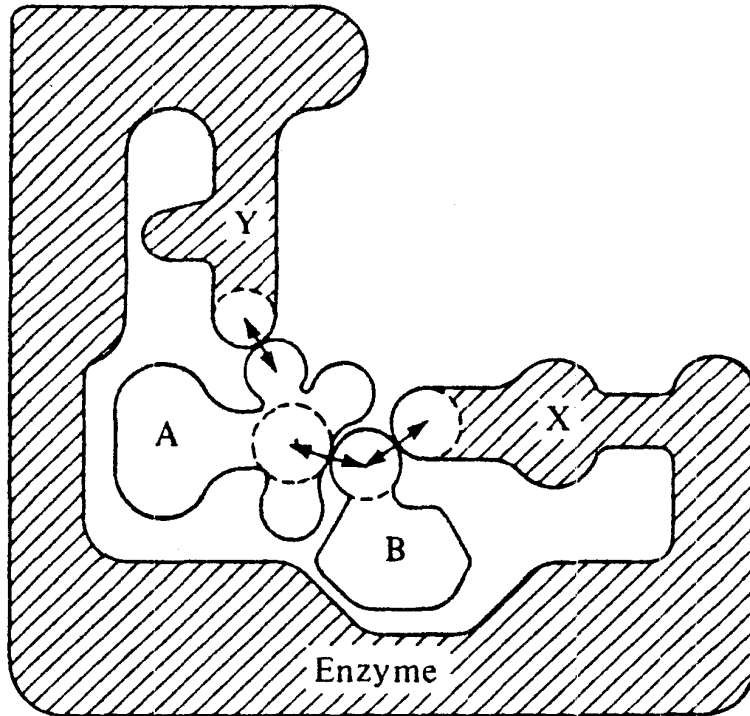
Classi enzimi

ossidoreduttasi (reazioni di ossidoriduzione)	1.1 che agiscono su $>\text{CH-OH}$ 1.2 agiscono su $>\text{C=O}$ 1.3 che agiscono su $>\text{C=CH-}$ 1.4 che agiscono su $>\text{CH-NH}_2$ 1.5 che agiscono su $>\text{CH-NH-}$ 1.6 che agiscono su NADH;NADPH	$\text{A+B} \rightleftharpoons \text{P+Q}$
transferasi (trasferimento di gruppi funzionali)	2.1 gruppi ad un atomo di carbonio 2.2 gruppi aldeidici o chetonici 2.3 gruppi acile 2.4 gruppi glicosilici 2.7 gruppi fosforici 2.8 gruppi contenenti S	
idrolasi (reazioni di idrolisi)	3.1 esteri 3.2 legami glicosidici 3.4 legami peptidici 3.5 altri legami C-N 3.6 anidridi acide	
liasi (addizione a doppi legami)	4.1 $>\text{C=C}<$ 4.2 $>\text{C=O}$ 4.3 $>\text{C=N-}$	$\text{A} \rightleftharpoons \text{P} + \text{Q}$
isomerasi (reazioni di isomerizzazione)	5.1 racemasi	$\text{A} \rightleftharpoons \text{P}$
ligasi (formazione di legami con rottura di ATP)	6.1 C-O 6.2 C-S 6.3 C-N 6.4 C-C	$\text{A+B+C} \rightleftharpoons \text{P+Q+R}$

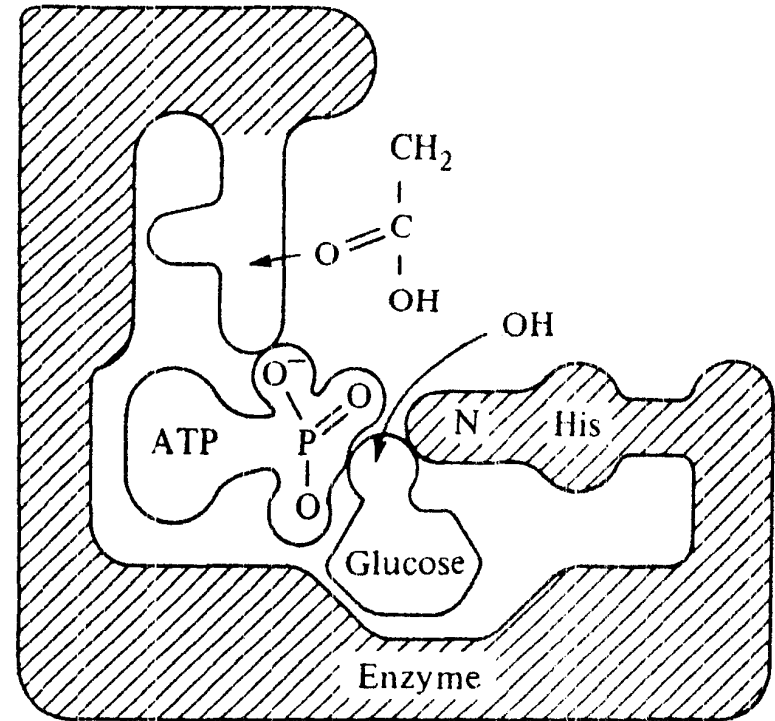
Il complesso enzima-substrato

- La **teoria** dell'esistenza del **complesso enzima-substrato** è avvalorata da numerosi studi sperimentali;
- I legami alla base della formazione del complesso sono spesso deboli forze attrattive anche se sono noti esempi in cui si formano legami covalenti;
- Il complesso si forma quando il substrato interagisce con il sito attivo con una specificità che richiama l'idea della chiave con la serratura;
- La specificità delle interazioni sito attivo-substrato fa sì che gli enzimi possano legare i specifici substrati nel sito attivo in modo tale che le loro zone reattive siano vicine (**effetto di prossimità**) e in più siano orientate nel modo più favorevole possibile (**effetto di orientazione**)

Il complesso enzima-substrato



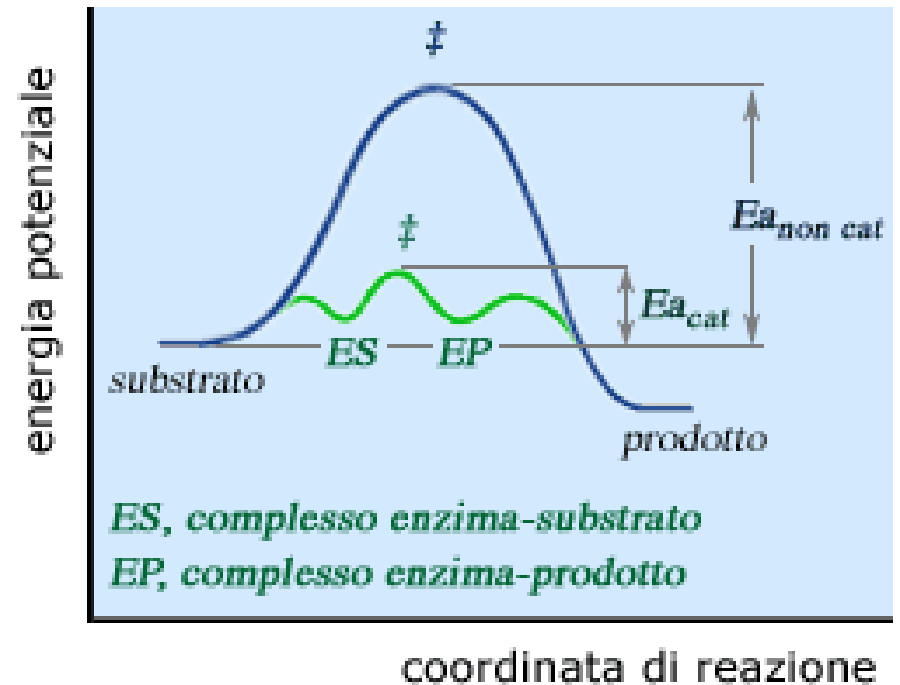
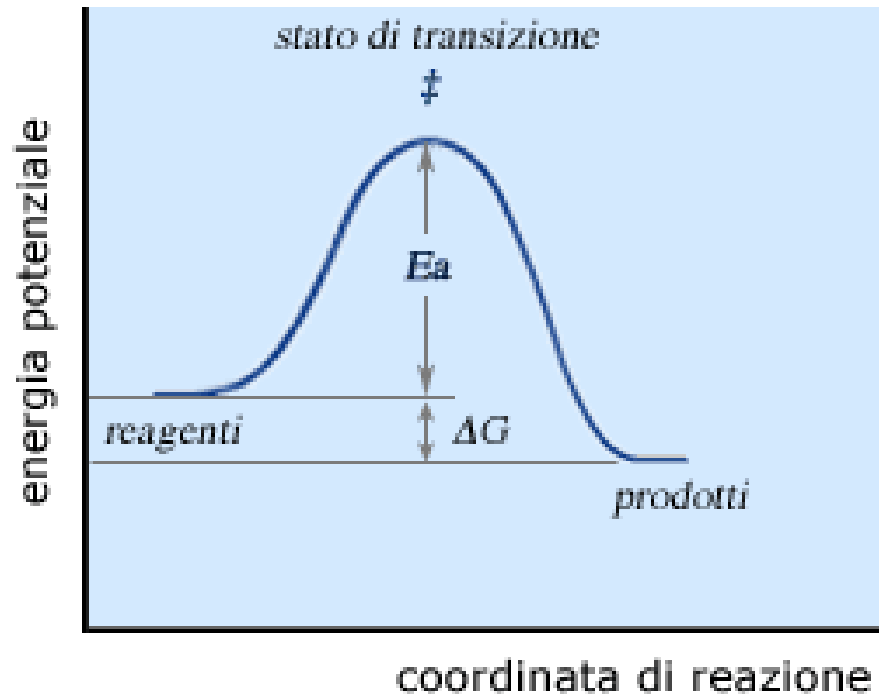
(a)



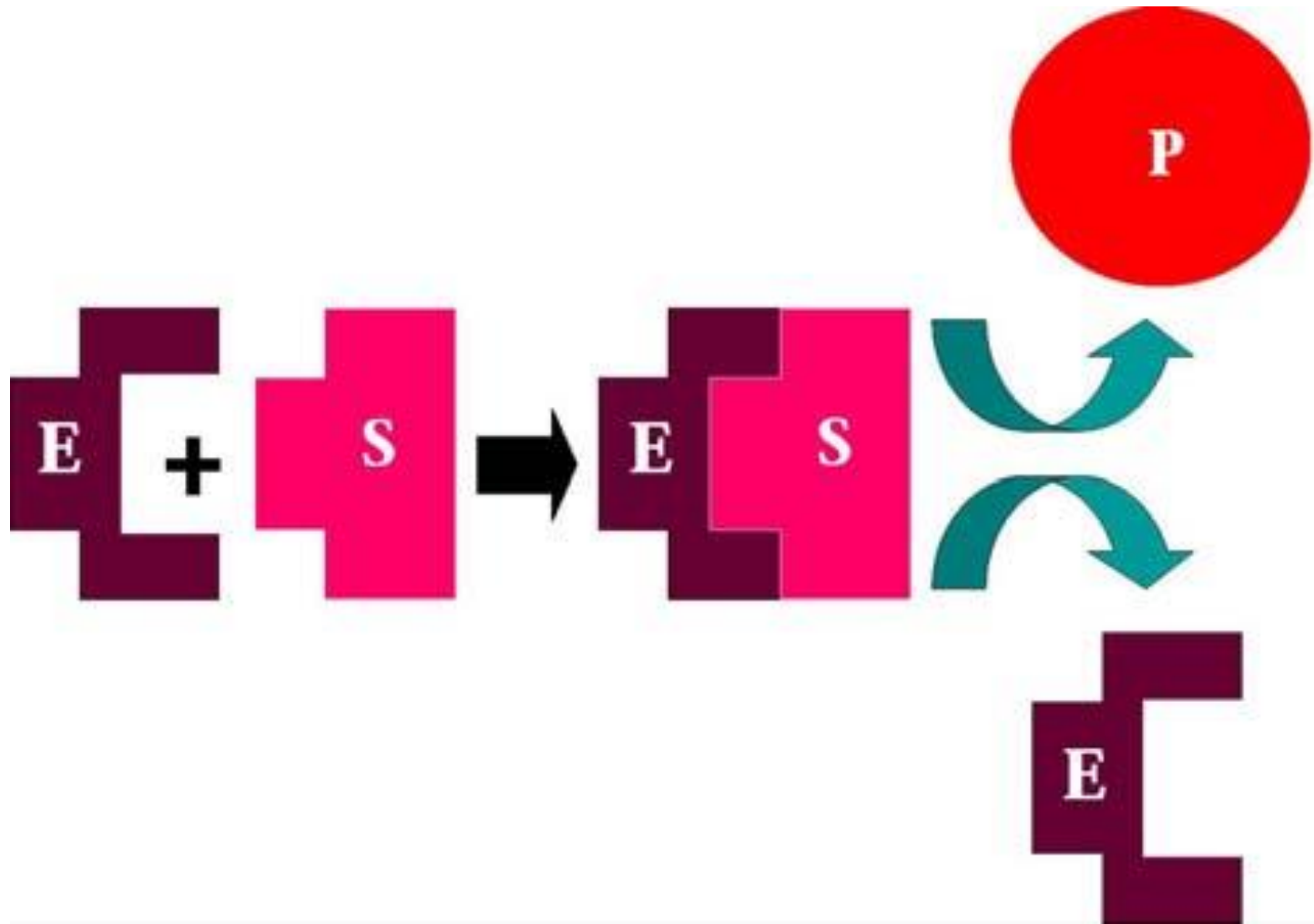
(b)

Schematizzazione dell'interazione enzima-substrato:
(a) effetto di prossimità; (b) effetto di orientazione.

Azione del complesso ES



Dal complesso enzima-substrato al rilascio dei prodotti



Sperimentazione per la caratterizzazione cinetica 1

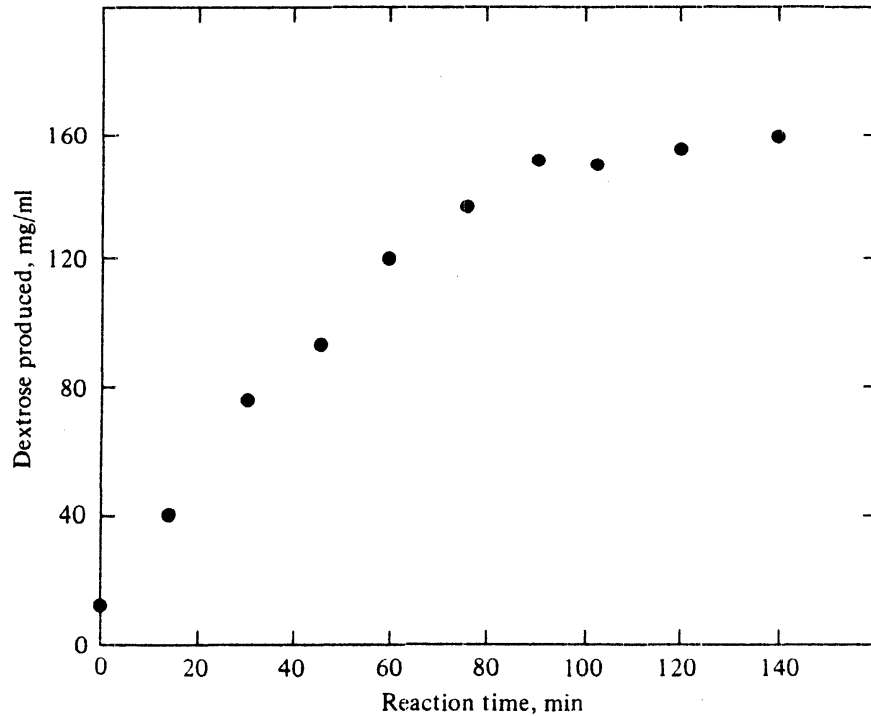
Lo sviluppo di modelli cinetici per reazioni enzimatiche necessita sia nella fase di sviluppo che in quella di convalida del supporto dei dati sperimentali.

La velocità di reazione v , per una reazione del tipo **S** → **P** è definita come

$$v = -\frac{ds}{dt} = \frac{dp}{dt}$$

Un esperimento tipico per la determinazione della cinetica enzimatica consiste nel miscelare al tempo zero una miscela di substrati con una quantità nota di enzima purificato in un reattore agitato, termostato e con controllo del pH. Le concentrazioni di substrato e prodotto sono monitorate nel tempo mediante varie tecniche analitiche.

Sperimentazione per la caratterizzazione cinetica 2



ESEMPIO:
Idrolisi dell'amido da parte della glucosioamilasi in un reattore batch

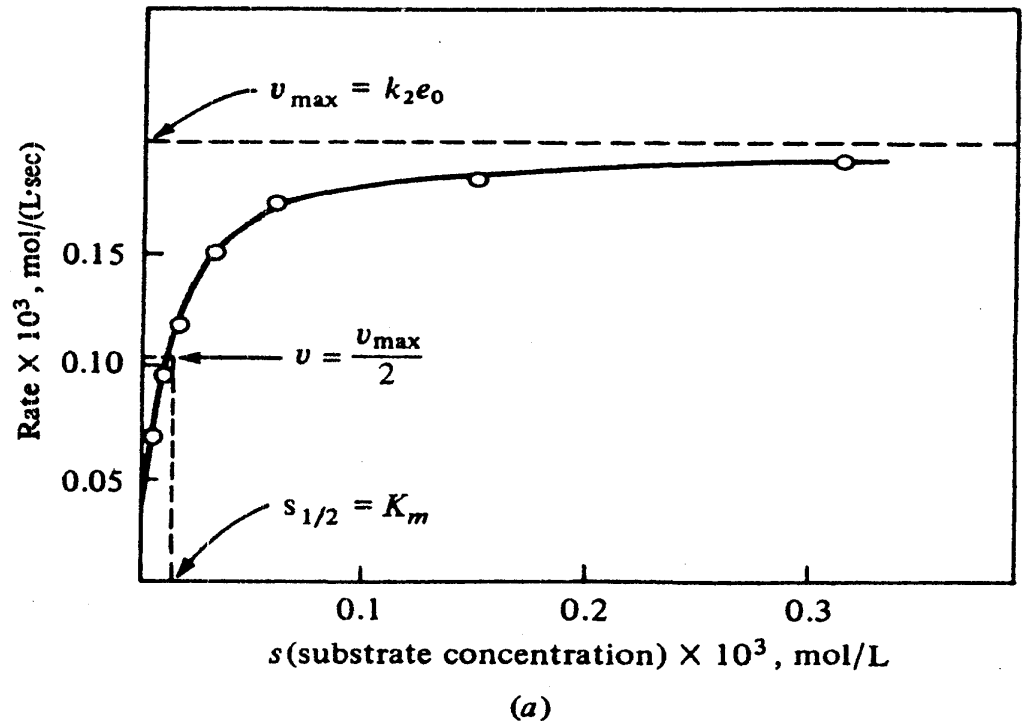
L'analisi dei dati sperimentali mette in evidenza alcune caratteristiche comuni a molte cinetiche enzimatiche:

- la velocità di reazione è del primo ordine per bassi valori della C del substrato
- la velocità di reazione è indipendente dalla C del substrato per alti valori della stessa
- la velocità di reazione è proporzionale alla C di enzima presente

Cinetica di Michaelis-Menten

Il comportamento sperimentale riportato, è stato descritto mediante l'equazione cinetica di Michaelis-Menten

$$v = \frac{v_{\max} S}{K_m + S}$$



con $v_{\max} = \alpha e_0$ (dove e_0 è la concentrazione totale di enzima) è la velocità massima e K_m è nota come costante di Michaelis (è uguale alla concentrazione di substrato per cui $v = v_{\max}/2$)

Derivazione teorica Cinetica di Michaelis-Menten 1



Michaelis and Menten assunsero che la formazione del complesso fosse una reazione all'equilibrio trascurandone la cinetica di formazione (ipotizzata infinita)

$$\frac{s \cdot e}{(es)} = \frac{k_{-1}}{k_1} = K_m \quad (1) \quad \text{Costante di dissociazione}$$

mentre la decomposizione del complesso per dare il prodotto fosse irreversibile

$$v = \frac{dp}{dt} = k_2(es) \quad (2)$$

Il bilancio di materia dell'enzima è

$$e_0 = e + (es) \quad (3)$$

Ricavando **e** dalla (1) si ha

$$e = \frac{K_m}{s}(es)$$

Derivazione teorica Cinetica di Michaelis-Menten 2

Sostituendo nel bilancio dell'enzima (3) l'espressione $e = \frac{K_m}{s}(es)$ si ottiene una espressione di es

$$e_0 = \frac{K_m}{s}(es) + (es) = \left(\frac{K_m}{s} + 1 \right) (es) \quad (4)$$

$$(es) = \frac{e_0}{\frac{K_m}{s} + 1} = \frac{e_0 s}{K_m + s} \quad (5)$$

da sostituirsi in v

$$v = \frac{dp}{dt} = -\frac{ds}{dt} = \frac{k_2 e_0 s}{K_m + s}$$

da cui si può vedere come la costante di Michaelis equivale alla costante di dissociazione del complesso attivato

Stima dei parametri cinetici dell'equazione di Michaelis-Menten 1

La stima dei parametri dell'equazione di Michaelis-Menten può essere effettuata utilizzando una delle seguenti forme linearizzate del modello

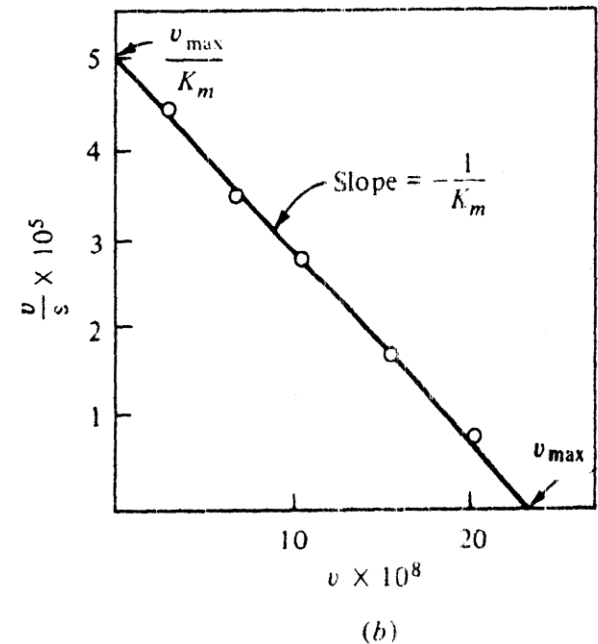
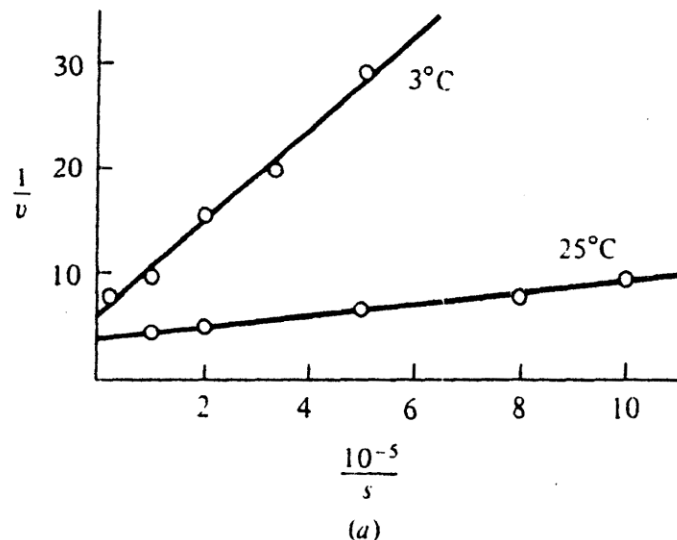
$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{\max}} + \frac{K_m}{v_{\max}} \frac{1}{S}$$

Lineweaver-Burk

$$v = v_{\max} - K_m \frac{v}{S}$$

Eadie-Hofstee

$$\frac{S}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} + \frac{1}{v_{\max}} S$$



Stima dei parametri cinetici dell'equazione di Michaelis-Menten 2

- Nella linearizzazione di Lineweaver-Burk i valori di velocità noti con maggiore accuratezza (prossimi a $v_{\max}$) sono tutti concentrati nell'origine, mentre le velocità maggiormente affette da errori (basse velocità) sono quelli che più lontani dall'origine influenzano la stima della pendenza ($K_m/v_{\max}$).
- Nella linearizzazione di Eadie-Hofstee la variabile maggiormente affetta da errore (v) è contenuta sia nella variabile indipendente che in quella dipendente.
- La terza linearizzazione tende a distribuire i valori ottenuti per alte v , così da ottenere una stima accurata della pendenza ($1/v_{\max}$), mentre l'intercetta è spesso molto vicina all'origine non consentendone una buona stima.
- Queste considerazioni suggeriscono di determinare $v_{\max}$ come intercetta della prima linearizzazione o come pendenza dalla seconda. Utilizzando poi il grafico v vs. s si può determinare K_m dalla concentrazione di substrato per cui $v = v_{\max}/2$

Modello cinetico in presenza di due substrati 1

- La grande maggioranza delle reazioni enzimatiche coinvolge almeno due substrati, di cui però in genere uno è l'acqua la cui concentrazione è pressoché costante nel corso della reazione essendo 1000 o più volte concentrata dell'altro substrato.
- In molte reazioni enzimatiche che coinvolgono due substrati appare un complesso ternario in cui entrambi i substrati sono attaccati all'enzima (ES_1S_2).
- Una possibile sequenza di reazioni con relative costanti di dissociazione dei complessi è



Modello cinetico in presenza di due substrati 2

Da cui

$$v = \frac{dp}{dt} = k(es_1s_2)$$

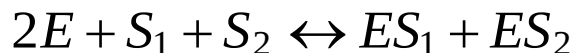
Partendo dal bilancio dell'enzima

$$e_0 = e + (es_1) + (es_2) + (es_1s_2)$$

Si sostituiscono le espressioni di e , (es_1) ed (es_2) ottenute dalle reazioni di equilibrio sopra ipotizzate e si ottiene un'espressione di (es_1s_2) da inserire in v

$$e_0 = \frac{1}{2} \left[\frac{K_1}{s_1} \frac{K_{12}}{s_2} + \frac{K_2}{s_2} \frac{K_{21}}{s_1} \right] (es_1s_2) + \frac{K_{12}}{s_2} (es_1s_2) + \frac{K_{21}}{s_1} (es_1s_2) + (es_1s_2)$$

dove l'espressione ottenuta per e viene ripartita tra le due vie di formazione del complesso (es_1s_2) tramite i complessi (es_1) e (es_2) :



***vedi slides successive per passaggi matematici**

$$S_1 + E \leftrightarrow ES_1 \quad K_1 = \frac{s_1 e}{(es_1)} \quad 1)$$

$$S_2 + E \leftrightarrow ES_2 \quad K_2 = \frac{s_2 e}{(es_2)} \quad 2)$$

$$ES_1 + S_2 \leftrightarrow ES_1 S_2 \quad K_{12} = \frac{s_2 (es_1)}{(es_1 s_2)} \quad 3)$$

$$ES_2 + S_1 \leftrightarrow ES_1 S_2 \quad K_{21} = \frac{s_1 (es_2)}{(es_1 s_2)} \quad 4)$$



Dalla 1

$$e = \frac{K_1}{s_1} (es_1)$$

Dalla 2

$$e = \frac{K_2}{s_2} (es_2)$$

Dalla 3

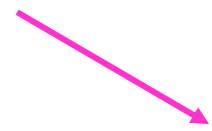
$$(es_1) = \frac{K_{12}}{s_2} (es_1 s_2)$$

Dalla 4

$$(es_2) = \frac{K_{21}}{s_1} (es_1 s_2)$$



$$e = \frac{K_1}{s_1} (es_1) = \frac{K_1}{s_1} \cdot \frac{K_{12}}{s_2} (es_1 s_2)$$



$$e = \frac{K_2}{s_2} (es_2) = \frac{K_2}{s_2} \cdot \frac{K_{21}}{s_1} (es_1 s_2)$$

$$e = \frac{K_1}{s_1}(es_1) = \frac{K_1}{s_1} \cdot \frac{K_{12}}{s_2}(es_1s_2)$$

$$e = \frac{K_2}{s_2}(es_2) = \frac{K_2}{s_2} \cdot \frac{K_{21}}{s_1}(es_1s_2)$$

Quindi

$$e = \frac{1}{2} \left[\frac{K_1}{s_1} \cdot \frac{K_{12}}{s_2} + \frac{K_2}{s_2} \cdot \frac{K_{21}}{s_1} \right] (es_1s_2)$$

$$(es_1) = \frac{K_{12}}{s_2}(es_1s_2) \quad (es_2) = \frac{K_{21}}{s_1}(es_1s_2)$$

Essendo

$$e_0 = e + (es_1) + (es_2) + (es_1s_2)$$

Si ha

$$e_0 = \frac{1}{2} \left[\frac{K_1}{s_1} \frac{K_{12}}{s_2} + \frac{K_2}{s_2} \frac{K_{21}}{s_1} \right] (es_1s_2) + \frac{K_{12}}{s_2}(es_1s_2) + \frac{K_{21}}{s_1}(es_1s_2) + (es_1s_2)$$

Modello cinetico in presenza di due substrati 3

Tuttavia uguagliando le espressioni di es_1s_2 da K_{12} (eq. 3) e (eq.) K_{21} si ottiene

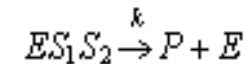
$$\frac{s_2(es_1)}{K_{12}} = \frac{s_1(es_2)}{K_{21}}$$

$$\frac{\frac{s_2}{(es_2)} \cdot 1}{K_{12}} = \frac{\frac{s_1}{(es_1)} \cdot 1}{K_{21}}$$

e sostituendo da K_1 (eq. 1) e K_2 (eq.2)

$$\frac{\frac{K_2}{e} \cdot 1}{K_{12}} = \frac{\frac{K_1}{e} \cdot 1}{K_{21}}$$

$$K_{12}K_1 = K_{21}K_2$$



$$K_{12}K_1 = K_{21}K_2$$

Sostituendo questa relazione nel primo termine a secondo membro del bilancio dell'enzima

$$e_0 = \frac{1}{2} \left[\frac{K_1}{s_1} \frac{K_{12}}{s_2} + \frac{K_2}{s_2} \frac{K_{21}}{s_1} \right] (es_1s_2) + \frac{K_{12}}{s_2} (es_1s_2) + \frac{K_{21}}{s_1} (es_1s_2) + (es_1s_2)$$

Si ottiene

$$e_0 = \left[\frac{1}{2} \left(\frac{K_1K_{12}}{s_1s_2} + \frac{K_1K_{12}}{s_1s_2} \right) + \frac{K_{12}}{s_2} + \frac{K_{21}}{s_1} + 1 \right] (es_1s_2)$$

$$e_0 = \left(\frac{K_1K_{12}}{s_1s_2} + \frac{K_{12}}{s_2} + \frac{K_{21}}{s_1} + 1 \right) (es_1s_2)$$

Modello cinetico in presenza di due substrati 4

Da cui

$$(es_1s_2) = \frac{e_0}{\frac{K_1K_{12}}{s_1s_2} + \frac{K_{12}}{s_2} + \frac{K_{21}}{s_1} + 1} = \frac{e_0s_1s_2}{K_1K_{12} + K_{12}s_1 + K_{21}s_2 + s_1s_2}$$

Il modello cinetico prende quindi la forma $v = \frac{dp}{dt} = k(es_1s_2)$

$$v = \frac{ke_0s_1s_2}{K_1K_{12} + K_{12}s_1 + K_{21}s_2 + s_1s_2}$$

Dividendo numeratore e denominatore per $(s_2 + K_{12})$ e riarrangiando si ottiene

$$v = \frac{\frac{ke_0s_2}{s_2 + K_{12}}s_1}{\frac{K_1K_{12} + K_{12}s_1 + K_{21}s_2 + s_1s_2}{s_2 + K_{12}}} = \frac{\frac{ke_0s_2}{s_2 + K_{12}}s_1}{\frac{s_1(s_2 + K_{12}) + K_{21}s_2 + K_1K_{12}}{s_2 + K_{12}}} = \frac{\frac{ke_0s_2}{s_2 + K_{12}}s_1}{s_1 + \frac{K_{21}s_2 + K_1K_{12}}{s_2 + K_{12}}}$$

Modello cinetico in presenza di due substrati 5

$$v = \frac{\frac{ke_0s_2}{s_2 + K_{12}} s_1}{\frac{K_1K_{12} + K_{12}s_1 + K_{21}s_2 + s_1s_2}{s_2 + K_{12}}} = \frac{\frac{ke_0s_2}{s_2 + K_{12}} s_1}{\frac{s_1(s_2 + K_{12}) + K_{21}s_2 + K_1K_{12}}{s_2 + K_{12}}} = \frac{\frac{ke_0s_2}{s_2 + K_{12}} s_1}{s_1 + \frac{K_{21}s_2 + K_1K_{12}}{s_2 + K_{12}}}$$

che ponendo

$$v_{\max}^* = \frac{ke_0s_2}{s_2 + K_{12}} \quad K_1^* = \frac{K_{21}s_2 + K_1K_{12}}{s_2 + K_{12}}$$

si può semplificare nella forma

$$v = \frac{v_{\max}^* s_1}{K_1^* + s_1}$$

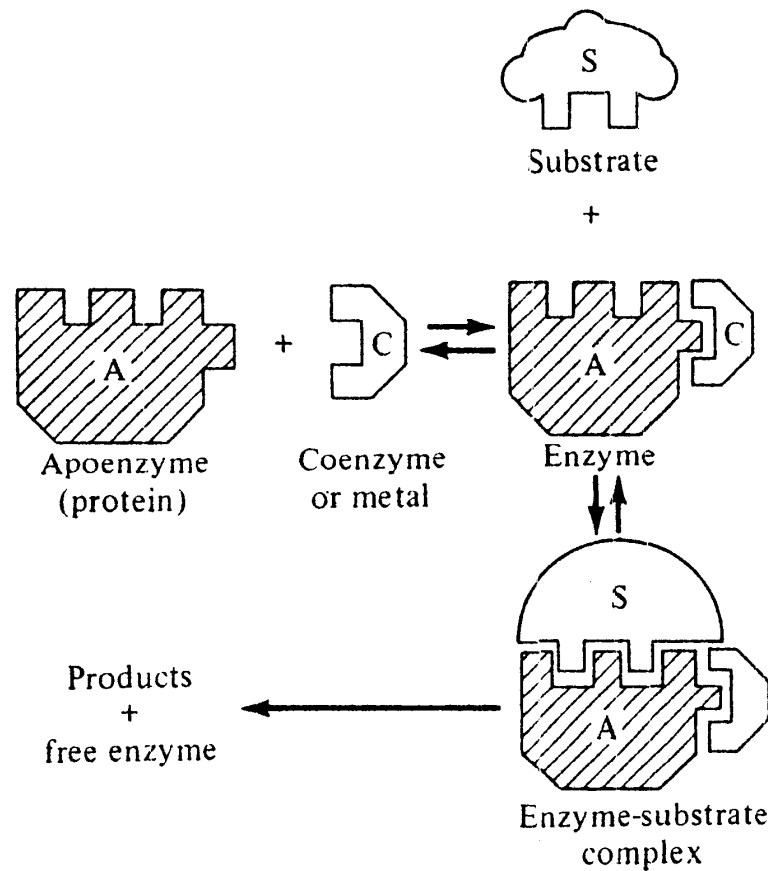
Modello cinetico in presenza di due substrati 6

$$v = \frac{V_{\max}^* S_1}{K_1^* + S_1} \quad \text{con} \quad v_{\max}^* = \frac{ke_0 s_2}{s_2 + K_{12}} \quad K_1^* = \frac{K_{21}s_2 + K_1 K_{12}}{s_2 + K_{12}}$$

- Se la concentrazione di S_2 rimane costante, $v_{\max}^*$ e K_1^* sono costanti apparenti e la cinetica è rappresentabile dal modello di Michaelis-Menten. Viceversa se S_2 varia sostanzialmente nel corso della reazione va considerata la dipendenza di $v_{\max}^*$ e K_1^* dalla concentrazione di S_2 .
- Se il substrato S_2 è in forte eccesso ($s_2 \gg K_{12}$) $v_{\max}^*$ tende a ke_0 e K_1^* a K_{21} , e la cinetica può considerarsi dipendente solo dal primo substrato con una legge di tipo Michaelis-Menten.
- Se i due substrati si devono legare all'enzima in un ordine obbligatorio l'espressione cinetica si ottiene facendo tendere a infinito la costante di dissociazione della reazione proibita.

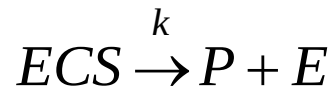
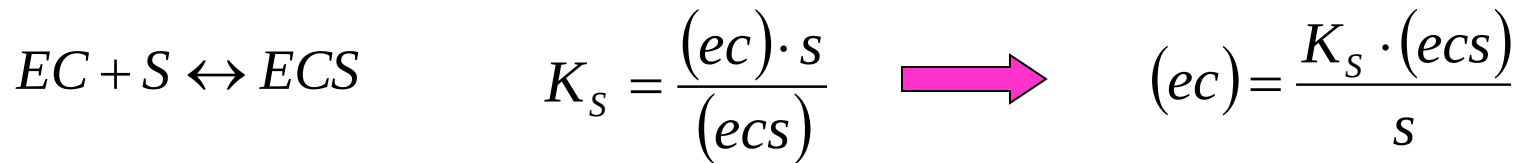
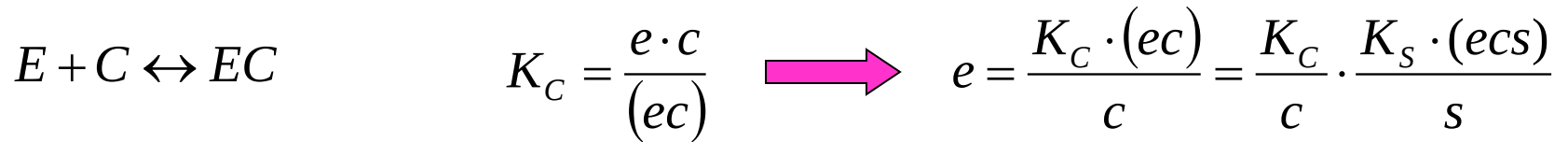
Modello cinetico in presenza di un cofattore attivante 1

- La partecipazione di un cofattore (ione metallico o coenzima) in una reazione enzimatica può essere rappresentata schematicamente



Modello cinetico in presenza di un cofattore attivante 2

- Assumendo che il substrato si leghi solo al complesso apoenzima-cofattore si ottiene il seguente schema di reazione



Da cui

$$v = \frac{dp}{dt} = k(ecs)$$

Modello cinetico in presenza di un cofattore attivante 3

Sostituendo nel bilancio dell'enzima le espressioni di **e** ed **(ec)** ricavati dalle costanti di equilibrio

$$e_0 = e + (ec) + (ecs) = \frac{K_C}{c} \frac{K_S}{s} (ecs) + \frac{K_S}{s} (ecs) + (ecs) = \left(\frac{K_C}{c} \frac{K_S}{s} + \frac{K_S}{s} + 1 \right) (ecs)$$

si ottiene un'espressione di (ecs)

$$(ecs) = \frac{e_0}{\frac{K_C}{c} \frac{K_S}{s} + \frac{K_S}{s} + 1} = \frac{e_0 cs}{K_C K_S + K_S c + cs} = \frac{e_0 cs}{K_S (c + K_C) + cs}$$

Da cui

$$v = \frac{dp}{dt} = \frac{ke_0 cs}{K_S (c + K_C) + cs} = \frac{ke_0 cs}{K_S K_C + (s + K_S) c}$$

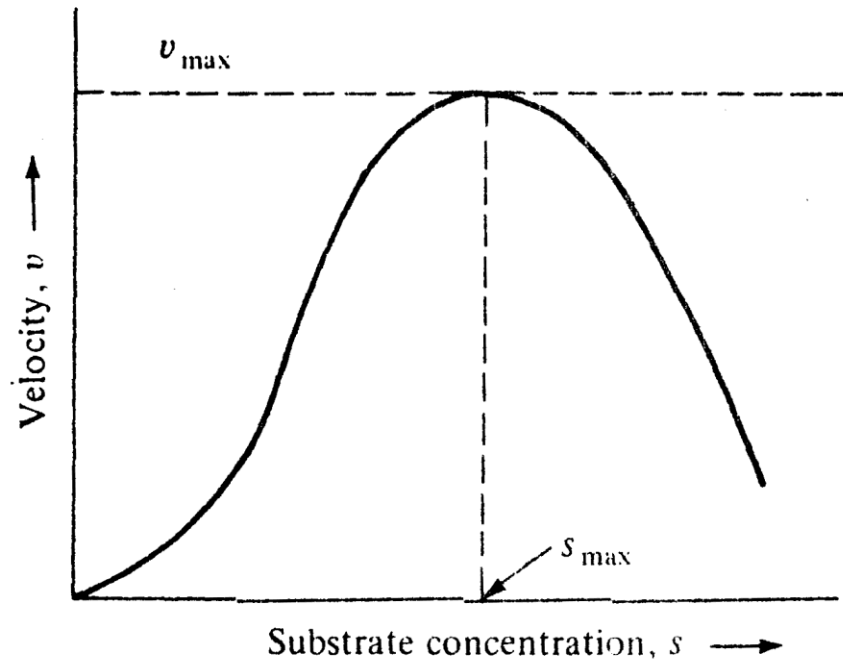
Modello cinetico in presenza di un cofattore attivante 4

$$v = \frac{dp}{dt} = \frac{ke_0cs}{K_S K_C + (s + K_S)c}$$

Se la concentrazione di S è considerata costante, l'espressione precedente mostra una dipendenza di tipo Michaelis-Menten rispetto alla concentrazione del cofattore:

- se la concentrazione di cofattore è bassa ($c \ll K_C$), la velocità è del primo ordine rispetto a c;
- se la concentrazione di cofattore è alta ($c \gg K_C$), la cinetica diventa indipendente dalla sua concentrazione.

Modello cinetico per inibizione da substrato 1

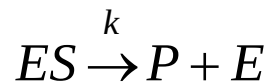
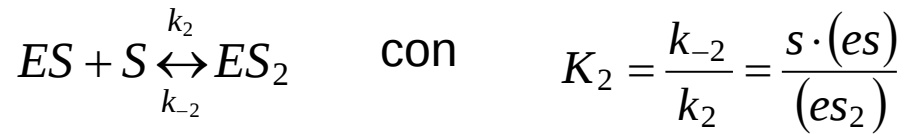


(b) Inhibition

In alcuni casi quando è presente un'elevata concentrazione di substrato la cinetica enzimatica è diminuita per effetto dell'inibizione da substrato: la velocità di reazione passa per un massimo e poi man mano che la concentrazione del substrato aumenta tende a diminuire.

Modello cinetico per inibizione da substrato 2

Si ipotizza che si possa formare un complesso ternario ES_2 che non dà prodotto e che lo step cineticamente limitante sia la degradazione del complesso ES



da cui $v = \frac{dp}{dt} = k(es)$

Considerando il bilancio di materia dell'enzima $e_0 = e + (es) + (es_2)$

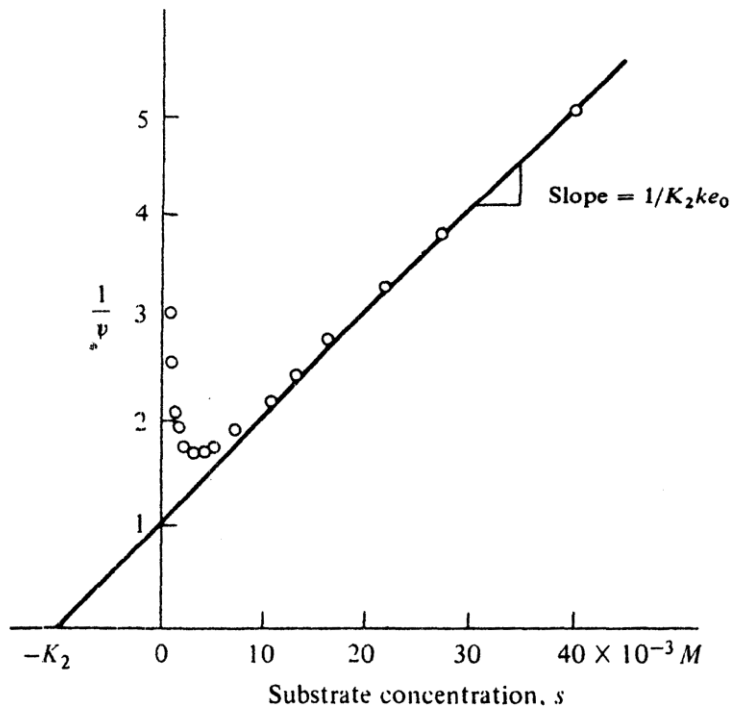
si determinano delle espressioni di e ed (es_2)

$$e_0 = \frac{K_1}{s}(es) + (es) + \frac{s}{K_2}(es) = (es) \left(\frac{K_1}{s} + 1 + \frac{s}{K_2} \right) \quad \longrightarrow$$

$$v = \frac{ke_0}{\frac{K_1}{s} + 1 + \frac{s}{K_2}} = \frac{ke_0 s}{K_1 + s + \frac{s^2}{K_2}}$$

Modello cinetico per inibizione da substrato 3

$$v = \frac{ke_0 s}{K_1 + s + \frac{s^2}{K_2}}$$



I parametri di questa espressione cinetica possono essere determinati come segue:

- k è ottenuto variando la concentrazione di e_0
- K_2 è ottenuto determinando la pendenza ($1/K_2 ke_0$) del grafico ottenuto riportando $1/v$ versus s
- K_1 è ottenuto dalla relazione $s_{\max} = (K_1 K_2)^{1/2}$ dove $s_{\max}$ soddisfa la condizione $dv/ds = 0$