KINETIKA ENZYMOVÝCH REAKCÍ

$$v = \frac{\mathrm{d}c_\mathrm{P}}{\mathrm{d}\tau} = \frac{v_\mathrm{max} \cdot c_\mathrm{S}}{K_\mathrm{M} + c_\mathrm{S}}$$

$$v_\mathrm{max} = c_\mathrm{E0} \cdot k_2$$

$c_\mathrm{S0} \approx K_\mathrm{M}$	$c_\mathrm{E0} \cdot k_2 \cdot \tau = c_\mathrm{S0} \cdot \alpha - K_\mathrm{M} \cdot \ln(1-\alpha)$
$c_\mathrm{S0} >> K_\mathrm{M}$	$\alpha \cdot c_\mathrm{S0} = v_\mathrm{max} \cdot \tau$
$c_\mathrm{S0} << K_\mathrm{M}$	$\ln(1-\alpha) = -\frac{v_\mathrm{max}}{K_\mathrm{M}} \cdot \tau$

1 Stanovení konstant rovnice Michaelise a Mentenové z diferenciálních dat; integrální tvar pro $c_{S0} << K_M$

Pro enzymatickou reakci

$$\mathrm{E} + \mathrm{S} \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftarrows}} \mathrm{ES} \xrightarrow{k_2} \mathrm{E} + \mathrm{P}$$

byly naměřeny hodnoty počátečních rychlostí při dvou koncentracích substrátu

c_S /(mmol dm^{-3})	0,25	76,923
$10^8\, v_0$ / (mol dm^{-3} s^{-1})	1,852	27,78

(a) Odhadněte z těchto dat konstanty rovnice Michaelise a Mentenové

(b) Jak dlouho bude trvat, než zreaguje 25 % substrátu, jehož počáteční koncentrace byla $2 \cdot 10^{-7}$ mol dm^{-3}?

[(a) $v_\mathrm{max} = 2{,}9106 \cdot 10^{-7}$ mol dm^{-3} s^{-1}, $K_\mathrm{M} = 3{,}679 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3}, (b) $\tau = 1{,}01$ h]

2 Stanovení konstant rovnice Michaelise a Mentenové z diferenciálních dat; integrální tvar pro $c_{S0} >> K_M$

Polarimetrickým sledováním enzymatické hydrolýzy opticky aktivního substrátu byla získána závislost počáteční rychlosti na koncentraci substrátu. Některé z naměřených hodnot jsou uvedeny v následující tabulce:

c_S /(mol dm^{-3})	0,062	1,82
$10^6\, v_0$ / (mol dm^{-3} s^{-1})	4,96	5,48

(a) Odhadněte z těchto dat konstanty rovnice Michaelise a Mentenové

(b) Jakého stupně přeměny bude dosaženo po 6 hodinách od přidání enzymu k roztoku opticky aktivního substrátu o počáteční koncentraci byla 2,2 mol dm^{-3}?

[(a) $K_\mathrm{M} = 6{,}754 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3}, $v_\mathrm{max} = 5{,}5 \cdot 10^{-6}$ mol dm^{-3} s^{-1}; (b) $\alpha = 0{,}054$]

3 Kinetická analýza enzymové reakce – integrální data

Stanovte kinetické parametry K_M a v_max pro působení chymotrypsinu, získaného z hovězího pankreasu, na acetyl-L-tyrosinethylester (substrát S) z těchto údajů, zjištěných při 25°C a pH = 7,8:

τ /min	0	17,2	32,5
c_S / mol dm^{-3}	$2{,}0 \cdot 10^{-4}$	$1{,}4 \cdot 10^{-4}$	$1{,}0 \cdot 10^{-4}$

[$K_\mathrm{M} = 6{,}966 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}, $v_\mathrm{max} = 1{,}7933 \cdot 10^{-5}$ mol dm^{-3} s^{-1}]

4 Integrální tvar rovnice Michaelise a Mentenové; $c_{S0} \approx K_M$; výpočet množství enzymu

Kolik μg enzymu má být přidáno k 15 cm^3 roztoku, které obsahují 0,168 mmol substrátu, aby za 40 s od počátku reakce zreagovalo 35 % původně přítomného substrátu? Molární hmotnost enzymu je 38 kg mol^{-1}, jeho katalytická aktivita $k_2 = 8 \cdot 10^5$ μmol substrátu na 1 μmol enzymu za sekundu. Michaelisova konstanta pro tento systém má hodnotu $K_M = 8{,}13$ mmol dm^{-3}.

[$m_{E0} = 1{,}322 \cdot 10^{-10}$ kg =0,132 μg]

5 Integrální tvar rovnice Michaelise a Mentenové; $c_{S0} \approx K_M$; výpočet množství enzymu

Trávení kaseinu trypsinem bylo sledováno při teplotě 0°C, kdy je desaktivace trypsinu zanedbatelná, s roztoky kaseinu o koncentraci $5{,}52 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}, jejichž pH bylo pufrem kyselina boritá-boritan sodný udržováno na hodnotě 7,6. Pro Michaelisovu konstantu byla nalezena hodnota $K_M = 7 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}. Po 28 min klesla koncentrace kaseinu (substrát) na 84 % původní hodnoty. Kolikrát větší koncentrace enzymu bylo použito při dalším pokusu, při němž bylo stejné koncentrace substrátu dosaženo již po 20 minutách?

[$(c_{E0})_2 = 1{,}4\ (c_{E0})_1$]

6 Molární aktivita enzymu

Při působení ribonukleasy z hovězího pankreasu na substrát o počáteční koncentraci 0,18 mol dm^{-3} byla při teplotě 28°C zjištěna hodnota K_M = 0,0087 mol dm^{-3}. Při počáteční koncentraci enzymu $c_{E0} = 3{,}6 \cdot 10^{-7}$ mol dm^{-3} byla naměřena tato časová závislost stupně přeměny koncentrace substrátu

τ / h	1,2	2,35	4,5	6,2
α	0,147	0,287	0,549	0,758

Stanovte molární aktivitu ribonukleasy.

[$k_2 = 16{,}97\ mol_{substrát}\ (mol_{enzym})^{-1}\ s^{-1}$]

7 Integrální tvar rovnice Michaelise a Mentenové; $c_{S0} \approx K_M$; výpočet molární aktivity enzymu

Při sledování působení pepsinu na 1-karboxy-1-glutamyltyrosin byla pro Michaelisovu konstantu zjištěna hodnota $1{,}73 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3}. Jestliže bylo ke 20 cm^3 roztoku, který obsahoval $1{,}24 \cdot 10^{-4}$ molu substrátu, přidáno $8{,}8 \cdot 10^{-8}$ molu pepsinu, bylo po 1,2 min zjištěno, že se rozložilo 50 % původně přítomného substrátu. Vypočítejte molární aktivitu pepsinu.

[$k_2 = 13{,}57\ mol_{substrát}\ (mol_{enzym})^{-1}\ s^{-1}$]

8 Výpočet molární aktivity enzymu z integrálních dat; $c_{S0} << K_M$

Pro enzymovou reakci probíhající podle schematu

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftarrows}} ES \xrightarrow{k_2} E + P_1 + P_2$$

byla z počátečních reakčních rychlostí vyhodnocena Michaelisova konstanta K_M = 226 mmol dm^{-3}. Při sledování časové závislosti koncentrace substrátu S bylo zjištěno, že za 1,2 hodiny klesla jeho koncentrace z počáteční hodnoty 3 μg cm^{-3} (M_S = 150 g mol^{-1}) na 40 % původní hodnoty. Koncentrace enzymu, který uvažovanou reakce katalyzuje, byla při tomto pokusu $2{,}17 \cdot 10^{-6}$ mol dm^{-3}. Jaká je molární aktivita tohoto enzymu?

[$k_2 =$ 22,09 s^{-1}]

9 Integrální tvar rovnice Michaelise a Mentenové; $c_{S0} >> K_M$; výpočet přeměny

Pro působení pepsinu na 1-karboxy-1-glutamyltyrosin (substrát S) při teplotě 38°C a pH = 4 byly stanoveny tyto hodnoty kinetických parametrů

$$K_M = 1{,}73 \cdot 10^{-4}\ \text{mol dm}^{-3} \quad \text{a} \quad v_{max} = 9{,}2 \cdot 10^{-7}\ \text{mol dm}^{-3}\ \text{s}^{-1}.$$

Vypočítejte, kolik procent původně přítomného 1-karboxy-1-glutamyltyrosinu se přemění za 10 hodin, je-li jeho počáteční koncentrace 0,8 mol dm^{-3}.

[4,14 %]