Úloha 9-4 Kinetická analýza enzymové reakce

Při stejných podmínkách jako v předcházejícím příkladu (38°C pH = 4) bylo sledováno působení pepsinu na 1-karboxy-1-glutamyltyrosin:

$\dfrac{c_S}{\text{mmol dm}^{-3}}$	$\dfrac{10^8\, \upsilon_0}{\text{mol dm}^{-3}\text{ s}^{-1}}$	$\dfrac{c_S}{\text{mmol dm}^{-3}}$	$\dfrac{10^8\, \upsilon_0}{\text{mol dm}^{-3}\text{ s}^{-1}}$
0,25	1,16	4,5	6,64
0,62	2,43	8,0	7,55
1,60	4,42	12,4	8,06
2,70	5,60	15,6	8,27

(a) Stanovte hodnoty kinetických parametrů K_M a υ_{max} pro tento případ.

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

[(a) $K_M = 1{,}728 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3}, $\upsilon_{max} = 9{,}1884 \cdot 10^{-8}$ mol dm^{-3} s^{-1}, (b) $\alpha = 4{,}135 \cdot 10^{-3}$]

Řešení:

1. Korelace rovnicí Michaelise a Mentenové linearizované podle Lineweavera a Burka

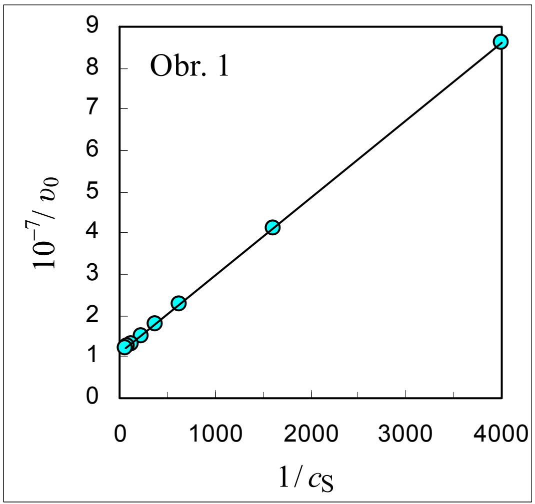
$$\frac{1}{\upsilon_0} = \frac{1}{\upsilon_{max}} + \frac{K_M}{\upsilon_{max}} \cdot \frac{1}{c_S} \qquad (1)$$

Závislost $1/\upsilon_0$ na $1/c_S$ je lineární se směrnicí rovnou podílu K_M / υ_{max} a úsekem $1/\upsilon_{max}$.. Lineární regresí (EXCEL) experimentálních dat v souřadnicích $1/\upsilon_0$ proti $1/c_S$ (obr. 1) byla získána rovnice přímky

$$\frac{1}{\upsilon_0} = 1{,}087267 \cdot 10^7 + 1{,}88252 \cdot 10^4 \cdot \frac{1}{c_S} \qquad (2)$$

Tabulka 1

$10^{-7}/\, \upsilon_0$	$1/c_S$
8,6207	4000,00
4,1152	1612,90
2,2624	625,00
1,7857	370,37
1,5060	222,22
1,3245	125,00
1,2407	80,65
1,2092	64,10



Porovnáním linearizované rovnice (1) s rovnicí (2) získanou zpracováním experimentálních dat dostaneme:

$$\frac{1}{\upsilon_{max1}} = 1{,}087267 \cdot 10^7 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s} \quad \Rightarrow \quad \upsilon_{max1} = \frac{1}{1{,}087267 \cdot 10^7}$$

$$\upsilon_{max1} = 9{,}19737 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}$$

$$\frac{K_{M1}}{\upsilon_{max1}} = 1{,}88252 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1} \quad \Rightarrow \quad K_{M1} = 1{,}88252 \cdot 10^4 \cdot \upsilon_{max1} = 1{,}88252 \cdot 10^4 \cdot 9{,}19737 \cdot 10^{-8}$$

$$K_{M1} = 1{,}73142 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$$

2. Korelace rovnicí Michaelise a Mentenové linearizované podle Eadiea

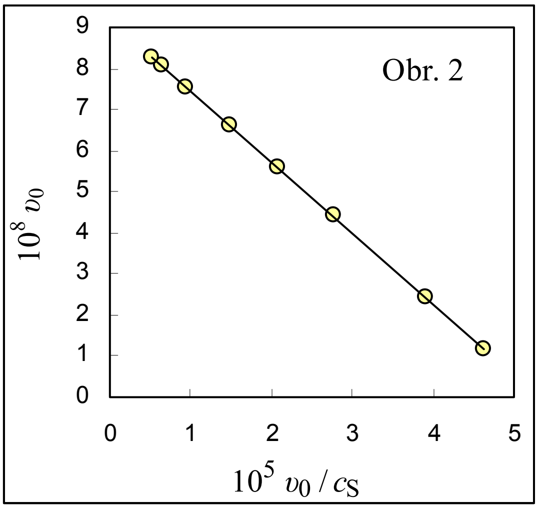
$$\upsilon_0 = \upsilon_{max} - K_M \cdot \frac{\upsilon_0}{c_S} \quad (3)$$

Experimentální data jsou na obr. 2 vynesena v souřadnicích [υ_0°; υ_0/c_S] (tab. 2) a proložena přímkovou závislostí

$$\upsilon_0 = 9{,}18438 \cdot 10^{-8} - 1{,}72665 \cdot 10^{-3} \cdot \frac{\upsilon_0}{c_S} \quad (4)$$

Porovnání rovnic (3) a (4) vede k hodnotám

υ_{max2}.= 9,18438·10^{-8} mol dm^{-3} s^{-1} a K_{M2} = 1,72665·10^{-3} mol dm^{-3}



Tabulka 2

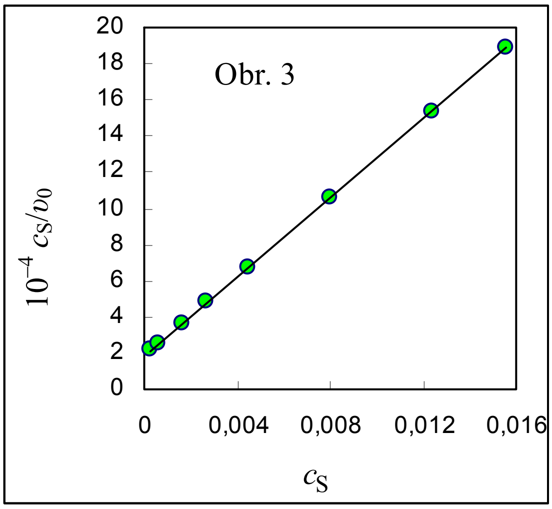
$10^8\ \upsilon_0$	$10^5\ \upsilon_0/c_S$
1,16	4,6400
2,43	3,9194
4,42	2,7625
5,60	2,0741
6,64	1,4756
7,55	0,9438
8,06	0,6500
8,27	0,5301

3. Korelace rovnicí Michaelise a Mentenové linearizované podle Hanese

$$\frac{c_S}{\upsilon_0} = \frac{K_M}{\upsilon_{max}} + \frac{1}{\upsilon_{max}} \cdot c_S \quad (5)$$

Lineární regresí dat (viz tab. 3 a obr. 3) dostaneme:

$$\frac{c_S}{\upsilon_0} = 18797{,}94 + 10889142{,}56 \cdot c_S \quad (6)$$



Tabulka 3

$10^{-4}\ c_S/\upsilon_0$	c_S
2,1552	0,00025
2,5514	0,00062
3,6199	0,0016
4,8214	0,0027
6,7771	0,0045
10,5960	0,008
15,3846	0,0124
18,8634	0,0156

Pak

$$\frac{1}{\upsilon_{max3}} = 10889142{,}56 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s} \Rightarrow \upsilon_{max3} = \frac{1}{10889142{,}56} = 9{,}18346 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}$$

$$\frac{K_{M3}}{\upsilon_{max3}} = 18797{,}94 \ \ s^{-1} \qquad \Rightarrow \quad K_{M3} = 18797{,}94 \cdot 9{,}18346\cdot 10^{-8} = 1{,}72630\cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$$

Průměrné hodnoty konstant rovnice Michaelise a Mentenové:

	1	2	3	Průměr
K_M/(mol dm^{-3})	$1{,}73142\cdot 10^{-3}$	$1{,}72665\cdot 10^{-3}$	$1{,}72630\cdot 10^{-3}$	$1{,}72813\cdot 10^{-3}$
υ_{max}./(mol dm^{-3} s^{-1})	$9{,}19737\cdot 10^{-8}$	$9{,}18438\cdot 10^{-8}$	$9{,}18346\cdot 10^{-8}$	$9{,}18840\cdot 10^{-8}$

(b) $\tau = 10$ h , $c_{S0} = 0{,}8$ mol dm^{-3}

$c_{S0} = 0{,}8$ mol dm^{-3} >> $K_M = 1{,}72813\cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3}

$\upsilon_{max} = 9{,}18840\cdot 10^{-8}$ mol dm^{-3} s^{-1}

$\alpha = ?$

$$r = \frac{dc_P}{d\tau} = \frac{\upsilon_{max}\cdot c_S}{K_M + c_S} \cong \frac{\upsilon_{max}\cdot c_S}{c_S} = \upsilon_{max}$$

$$c_{S0}\cdot\frac{d\alpha}{d\tau} = \upsilon_{max}$$ - reakce probíhá kinetikou nultého řádu

$$c_{S0}\cdot\alpha = \upsilon_{max}\cdot\tau$$

$$\alpha = \frac{\upsilon_{max}\cdot\tau}{c_{S0}} = \frac{9{,}18840\cdot 10^{-8}\cdot 10\cdot 3600}{0{,}8} \qquad \left[\frac{(\text{mol dm}^{-3}\ \text{s}^{-1})\cdot \text{s}}{\text{mol dm}^{-3}} = 1\right]$$

$\alpha = 4{,}135 \cdot 10^{-3}$