

## Úloha 9-2 Kinetická analýza enzymové reakce

Kinetická studie syntézy vycházející z kyseliny valerové a pentanolu, katalyzované PEG lipasou, prováděná za konstantní koncentrace enzymu ( $c_{E0} = 0,45 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $M_E = 250\,000 \text{ g mol}^{-1}$ ) a konstantní koncentrace pentanolu ( $0,75 \text{ mol dm}^{-3}$ ), poskytla tuto závislost počáteční rychlosti  $v_0$  na koncentraci kyseliny valerové (substrátu S)

$\frac{c_S}{\text{mol dm}^{-3}}$	$\frac{10^4 v_0}{\text{mol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}}$	$\frac{c_S}{\text{mol dm}^{-3}}$	$\frac{10^4 v_0}{\text{mol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}}$
0,042	1,80	0,370	6,30
0,083	2,95	0,550	7,11
0,126	3,73	0,760	7,65
0,167	4,50	1,000	7,92
0,238	5,36	1,300	8,06

(a) Nakreslete saturační křivku

(b) Stanovte  $K_M$  ( $\text{mol dm}^{-3}$ ),  $v_{\max}$  ( $\text{mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}$ ) a katalytickou aktivitu lipasy ( $\text{s}^{-1}$ ).

(a) *Saturační křivka: závislost  $v_0$  na  $c_S$*

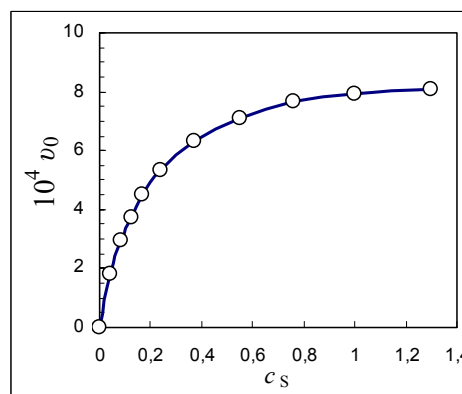
(b)  $K_M = 0,17565 \text{ mol dm}^{-3}$

$$v_{\max} = 9,256 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3} \text{ min}^{-1} = 1,5427 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}$$

$$k_2 = 8,57 \text{ s}^{-1}$$

### Řešení:

(a) Saturační křivka: závislost  $v_0$  na  $c_S$



(b) Konstanty rovnice Michaelise a Mentenové

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

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{v_{\max}} + \frac{K_M}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{c_S} \quad (1)$$

Závislost  $1/v_0$  na  $1/c_S$  je lineární se směrnici rovnou podílu  $K_M/v_{\max}$  a úsekem  $1/v_{\max}$ . Lineární regresi (EXCEL) experimentálních dat v souřadnicích  $1/v_0$  proti  $1/c_S$  (obr. 1) byla získána rovnice přímky

$$\frac{1}{v_0} = 1086,52 + 189,2 \cdot \frac{1}{c_S} \quad (2)$$

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

$$\frac{1}{v_{\max 1}} = 1086,52 \text{ @ } \text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ min} \quad \Rightarrow \quad v_{\max 1} = \frac{1}{1086,52}$$

$$v_{\max 1} = 9,2037 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$$

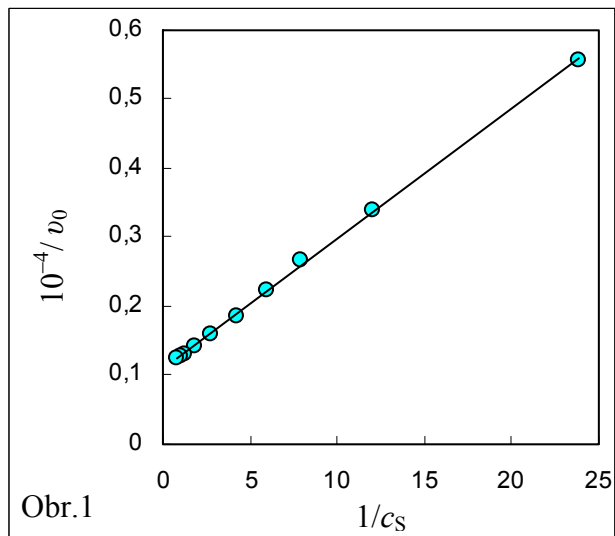
$$\frac{K_{M1}}{v_{\max 1}} = 189,2 \text{ min}^{-1}$$

$$\Rightarrow K_{M1} = 189,2 \cdot v_{\max 1} = 189,2 \cdot 9,2039 \cdot 10^{-4}$$

$$K_{M1} = 0,17414 \text{ mol dm}^{-3}$$

Tabulka 1

$10^{-4}/v_0$	$1/c_S$
0,5556	23,8095
0,3390	12,0482
0,2681	7,9365
0,2222	5,9880
0,1866	4,2017
0,1587	2,7027
0,1406	1,8182
0,1307	1,3158
0,1263	1,0000
0,1241	0,7692



## 2. Korelace rovnic Michaelise a Mentenové linearizované podle Eadiea

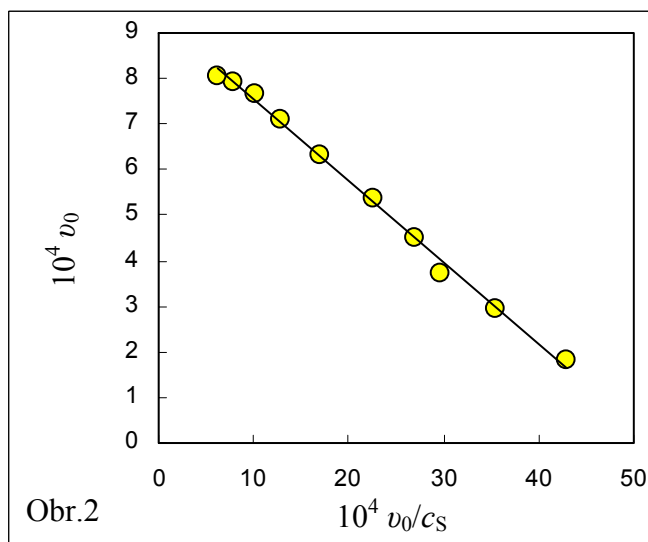
$$v_0 = v_{\max} - K_M \cdot \frac{v_0}{c_S} \quad (3)$$

Experimentální data jsou na obr. 2 vynesena v souřadnicích  $[v_0^\circ; v_0/c_S]$  (tab. 2) a proložena přímkovou závislostí

$$v_0 = 9,3196 \cdot 10^{-4} - 0,17871 \cdot \frac{v_0}{c_S} \quad (4)$$

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

$$v_{\max 2} = 9,3196 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3} \text{ min}^{-1} \text{ a } K_{M2} = 0,17871 \text{ mol dm}^{-3}$$



Tabulka 2

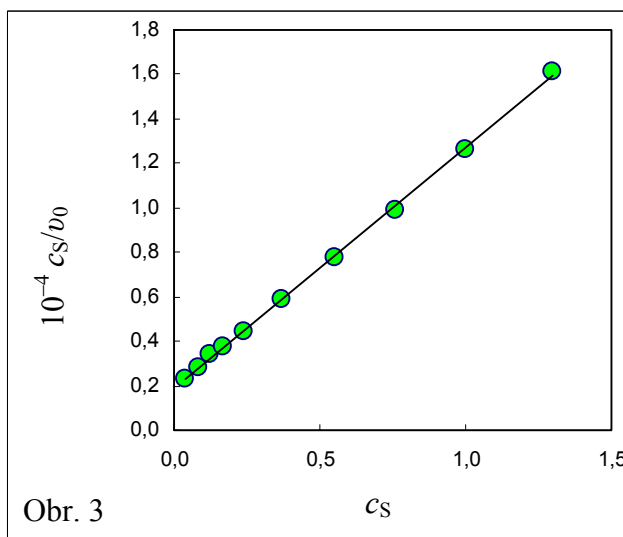
$10^4 v_0$	$10^4 v_0/c_S$
1,800	42,8571
2,950	35,5422
3,730	29,6032
4,500	26,9461
5,360	22,5210
6,300	17,0270
7,110	12,9273
7,650	10,0658
7,920	7,9200
8,060	6,2000

### 3. Korelace rovnicí Michaelise a Mentenové linearizované podle Hanese

$$\frac{c_S}{v_0} = \frac{K_M}{v_{\max}} + \frac{1}{v_{\max}} \cdot c_S \quad (5)$$

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

$$\frac{c_S}{v_0} = 188,3 + 1081,64 \cdot c_S \quad (6)$$



Tabulka 3

$10^{-4} c_S/v_0$	$c_S$
0,0233	0,042
0,0281	0,083
0,0338	0,126
0,0371	0,167
0,0444	0,238
0,0587	0,370
0,0774	0,550
0,0993	0,760
0,1263	1,000
0,1613	1,300

Pak

$$\frac{1}{v_{\max 3}} = 1081,64 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ min} \Rightarrow v_{\max 3} = \frac{1}{1081,6} = 9,24522 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$$

$$\frac{K_{M3}}{v_{\max 3}} = 188,3 \cdot 10^4 \text{ min}^{-1} \Rightarrow K_{M3} = 188,3 \cdot 9,24522 \cdot 10^{-4} = 0,17409 \text{ mol dm}^{-3}$$

**Průměrné hodnoty konstant rovnice Michaelise a Mentenové:**

	1	2	3	Průměr
$K_M/(\text{mol dm}^{-3})$	0,17414	0,17871	0,17409	0,17565
$v_{\max}/(\text{mol dm}^{-3} \text{ min}^{-1})$	$9,2037 \cdot 10^{-4}$	$9,3196 \cdot 10^{-4}$	$9,2452 \cdot 10^{-4}$	$9,2562 \cdot 10^{-4}$

$$v_{\max} = 9,256 \cdot 10^{-4} (\text{mol S dm}^{-3} \text{ min}^{-1}) = \frac{9,2562 \cdot 10^{-4}}{60} = 1,5427 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}$$

**Výpočet katalytické aktivity lipasy**

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

$$M_E = 250\,000 \text{ g mol}^{-1}$$

$$c_{E0} = 0,45 (\text{mg E}) \text{ cm}^{-3} = 0,45 (\text{g E}) \text{ dm}^{-3} = \frac{0,45}{250000} \text{ mol dm}^{-3} = 1,8 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$$

$$k_2 = \frac{v_{\max}}{c_{E0}} = \frac{1,5427 \cdot 10^{-5}}{1,8 \cdot 10^{-6}} = 8,57 \text{ s}^{-1}$$