

Úloha 9-3 Kinetická analýza enzymové reakce

Působení pepsinu na ethylester 1-karboxy-1-glutamyltyrosinu bylo sledováno při teplotě 38°C a pH = 4. Reakce, která představuje hydrolýzu peptidové vazby, byla provedena s komerčním pepsinem v koncentraci $4,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ (molární hmotnost 35500 g mol^{-1}). Reakce byla sledována titrací uvolněné kyseliny. Hodnoty počáteční rychlosti při různých koncentracích substrátu jsou uvedeny v následující tabulce. Stanovte hodnoty Michaelisovy konstanty K_M a maximální rychlosti v_{\max} .

$\frac{c_S}{\text{mmol dm}^{-3}}$	$\frac{10^8 v_0}{\text{mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}}$	$\frac{c_S}{\text{mmol dm}^{-3}}$	$\frac{10^8 v_0}{\text{mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}}$
0,30	2,40	4,00	10,5
0,77	4,88	6,15	11,6
1,52	7,24	8,00	12,1
2,46	8,94	10,34	12,6

$$[K_M = 1,5027 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}, v_{\max} = 1,4413 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}]$$

Řešení:

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

$$\frac{1}{v_0} = 6941925 + 1,042 \cdot 10^4 \cdot \frac{1}{c_S} \quad (2)$$

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

$$\frac{1}{v_{\max 1}} = 6941925 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s} \quad \Rightarrow \quad v_{\max 1} = \frac{1}{6941925}$$

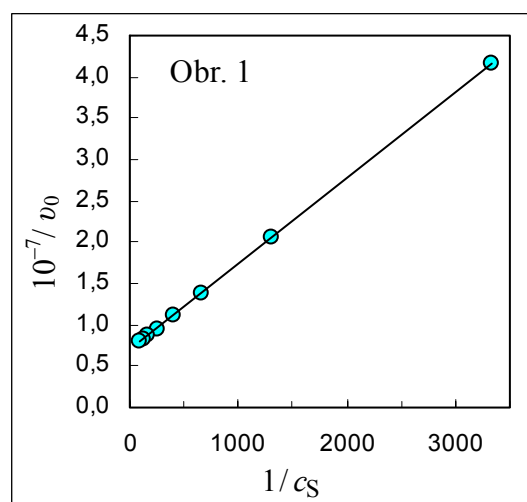
$$v_{\max 1} = 1,44052 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}$$

$$\frac{K_{M1}}{v_{\max 1}} = 10420 \text{ s}^{-1} \quad \Rightarrow \quad K_{M1} = 189,2 \cdot v_{\max 1} = 10420 \cdot 1,44052 \cdot 10^{-7}$$

$$K_{M1} = 1,50102 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$$

Tabulka 1

$10^{-7}/v_0$	$1/c_S$
4,1667	3333,33
2,0492	1298,70
1,3812	657,89
1,1186	406,50
0,9524	250,00
0,8621	162,60
0,8264	125,00
0,7937	96,71



2. Korelace rovnic Michaelise a Mentenové linearizované podle Eadiea

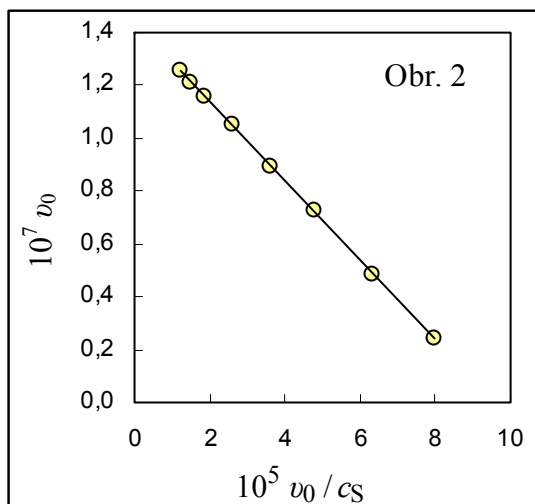
$$v_0 = v_{\max} - K_M \cdot \frac{v_0}{c_S} \quad (3)$$

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

$$v_0 = 1,44163 \cdot 10^{-7} - 1,5035 \cdot 10^{-3} \cdot \frac{v_0}{c_S} \quad (4)$$

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

$$v_{\max 2} = 1,44183 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1} \text{ a } K_{M2} = 1,53035 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$$



Tabulka 2

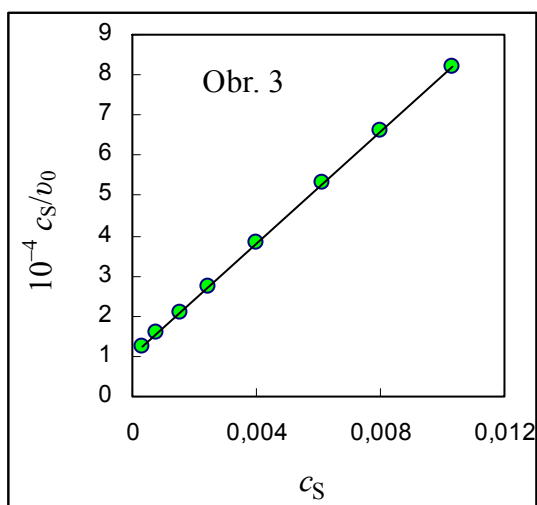
$10^7 v_0$	$10^5 v_0/c_S$
0,240	8,0000
0,488	6,3377
0,724	4,7632
0,894	3,6341
1,050	2,6250
1,160	1,8862
1,210	1,5125
1,260	1,2186

3. Korelace rovnic 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:

$$\frac{c_S}{v_0} = 10429,84 + 6936281,38 \cdot c_S \quad (6)$$



Tabulka 3

$10^{-4} c_S/v_0$	c_S
1,2500	0,0003
1,5779	0,00077
2,0994	0,00152
2,7517	0,00246
3,8095	0,004
5,3017	0,00615
6,6116	0,008
8,2063	0,01034

Pak

$$\frac{1}{v_{\max 3}} = 6936281,38 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s} \Rightarrow v_{\max 3} = \frac{1}{6936281,38} = 1,44169 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}$$

$$\frac{K_{M3}}{v_{\max 3}} = 10429,84 \text{ s}^{-1} \quad \Rightarrow \quad K_{M3} = 10429,84 \cdot 1,441695 \cdot 10^{-7} = 1,50366 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$$

Průměrné hodnoty konstant rovnice Michaelise a Mentenové:

	1	2	3	Průměr
$K_M/(\text{mol dm}^{-3})$	$1,50102 \cdot 10^{-3}$	$1,50350 \cdot 10^{-3}$	$1,50366 \cdot 10^{-3}$	$1,50273 \cdot 10^{-3}$
$v_{\max.}/(\text{mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1})$	$1,44052 \cdot 10^{-7}$	$1,44163 \cdot 10^{-7}$	$1,44169 \cdot 10^{-7}$	$1,44128 \cdot 10^{-7}$