

Úloha 9-5 Kinetická analýza enzymové reakce

Enzymatická hydrolýza jisté opticky aktivní látky (substrátu) byla sledována měřením počáteční rychlosti při různých koncentracích substrátu. Rychlost byla měřena rychlostí změny údaje polarimetru. Byla získána tato data:

$\frac{c_S}{\text{mol dm}^{-3}}$	$\frac{10^6 v_0}{\text{mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}}$	$\frac{c_S}{\text{mol dm}^{-3}}$	$\frac{10^6 v_0}{\text{mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}}$
0,0052	0,608	0,15	5,02
0,012	1,26	0,53	6,18
0,041	2,97	1,32	6,54
0,079	4,07	1,67	6,59

Stanovte z těchto dat Michaelisovu konstantu K_M pro komplex enzym-substrát a hodnotu maximální rychlosti v_{\max} .

$$[K_M = 5,2937 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}, v_{\max} = 6,8015 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}]$$

Řešení:

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

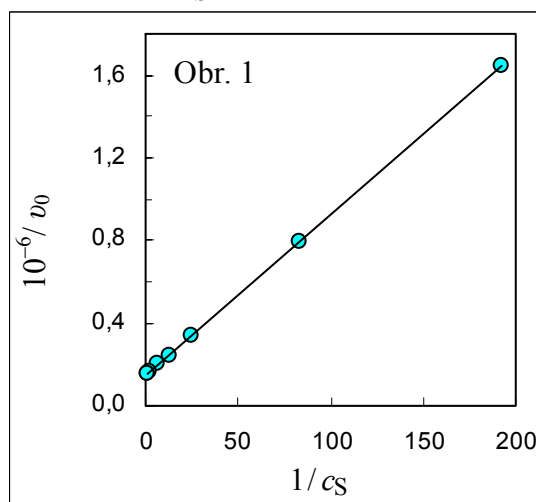
$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{v_{\max}} + \frac{K_M}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{c_S} \quad (1)$$

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

$$\frac{1}{v_0} = 1,468975 \cdot 10^5 + 7,7845 \cdot 10^3 \cdot \frac{1}{c_S} \quad (2)$$

Tabulka 1

$10^{-6}/v_0$	$1/c_S$
1,6447	192,31
0,7937	83,33
0,3367	24,39
0,2457	12,66
0,1992	6,67
0,1618	1,89
0,1529	0,76
0,1517	0,60



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

$$\frac{1}{v_{\max 1}} = 1,468975 \cdot 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s} \quad \Rightarrow \quad v_{\max 1} = \frac{1}{1,468975 \cdot 10^5}$$

$$v_{\max 1} = 6,80747 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}$$

$$\frac{K_{M1}}{v_{\max 1}} = 7,78450 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1} \quad \Rightarrow \quad K_{M1} = 7,78450 \cdot 10^3 \cdot v_{\max 1} = 7,78450 \cdot 10^3 \cdot 6,80747 \cdot 10^{-6}$$

$$K_{M1} = 5,29927 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$$

2. Korelace rovnic Michaelise a Mentenové linearizované podle Eadiea

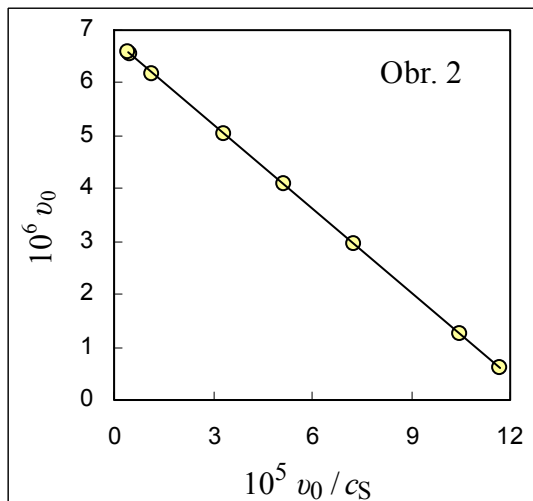
$$v_0 = v_{\max} - K_M \cdot \frac{v_0}{c_S} \quad (3)$$

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

$$v_0 = 6,79689 \cdot 10^{-6} - 5,2855 \cdot 10^{-2} \cdot \frac{v_0}{c_S} \quad (4)$$

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

$$v_{\max 2} = 6,79689 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1} \quad \text{a} \quad K_{M2} = 5,2855 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$$



Tabulka 2

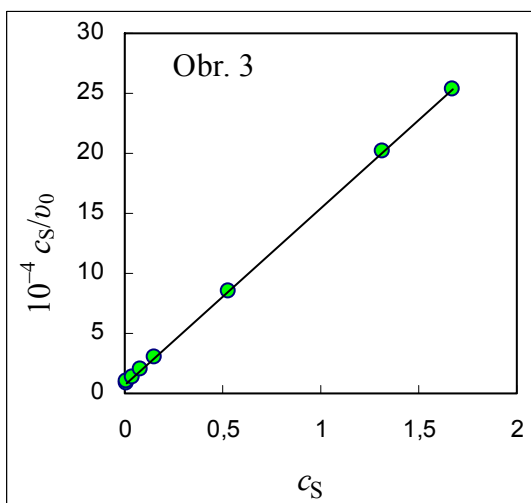
$10^6 v_0$	$10^5 v_0/c_S$
0,608	11,6923
1,260	10,5000
2,970	7,2439
4,070	5,1519
5,020	3,3467
6,180	1,1660
6,540	0,4955
6,590	0,3946

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:

$$\frac{c_S}{v_0} = 7788,43 + 147056,68 \cdot c_S \quad (6)$$



Tabulka 3

$10^{-4} c_S/v_0$	c_S
0,8553	0,0052
0,9524	0,012
1,3805	0,041
1,9410	0,079
2,9880	0,15
8,5761	0,53
20,1835	1,32
25,3414	1,67

Pak

$$\frac{1}{v_{\max 3}} = 147056,68 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s} \quad \Rightarrow \quad v_{\max 3} = \frac{1}{147056,68} = 6,8001 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}$$

$$\frac{K_{M3}}{v_{\max 3}} = 7788,43 \text{ s}^{-1} \quad \Rightarrow \quad K_{M3} = 7788,43 \cdot 6,8001 \cdot 10^{-6} = 5,29621 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$$

Průměrné hodnoty konstant rovnice Michaelise a Mentenové:

Linearizací podle	$v_{\max}/(\text{mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1})$	$K_M/(\text{mol dm}^{-3})$
1. Lineweavera a Burka	$6,80747 \cdot 10^{-6}$	$5,29927 \cdot 10^{-2}$
2. Eadiea	$6,79689 \cdot 10^{-6}$	$5,28550 \cdot 10^{-2}$
3. Hanese	$6,80010 \cdot 10^{-6}$	$5,29621 \cdot 10^{-2}$
Průměr	$6,80149 \cdot 10^{-6}$	$5,29366 \cdot 10^{-2}$