Úloha 9-1 Kinetická analýza enzymové reakce

Hodnoty počáteční rychlosti enzymatické reakce

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

stanovené při různých koncentracích substrátu, jsou uvedeny v následující tabulce:

$\dfrac{c_S}{\text{mol dm}^{-3}}$	$\dfrac{10^8\, v_0}{\text{mol dm}^{-3}\,\text{s}^{-1}}$	$\dfrac{c_S}{\text{mol dm}^{-3}}$	$\dfrac{10^8\, v_0}{\text{mol dm}^{-3}\,\text{s}^{-1}}$
0,0003	0,822	0,012	12,6
0,0005	1,33	0,051	17,6
0,001	2,50	0,074	18,3
0,005	8,33	0,092	18,6

(a) Stanovte konstanty rovnice Michaelise a Mentenové.
(b) Jak dlouho bude trvat, než zreaguje 25 % substrátu, jehož počáteční koncentrace byla
(i) $1{,}35{\cdot}10^{-7}$ mol dm^{-3}, (ii) 1,35 mol dm^{-3}, (iii) $1{,}35{\cdot}10^{-3}$ mol dm^{-3}?

[(a) $K_M = 7{,}0102{\cdot}10^{-3}$ mol dm^{-3} , $v_{max} = 2{,}0002{\cdot}10^{-7}$ mol dm^{-3} s^{-1} ; (b) (i) 2,8 h, (ii) 468,7 h, (iii) 3,2694 h]

Řešení:

(a) Výpočet konstant rovnice Michaelise a Mentenové

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

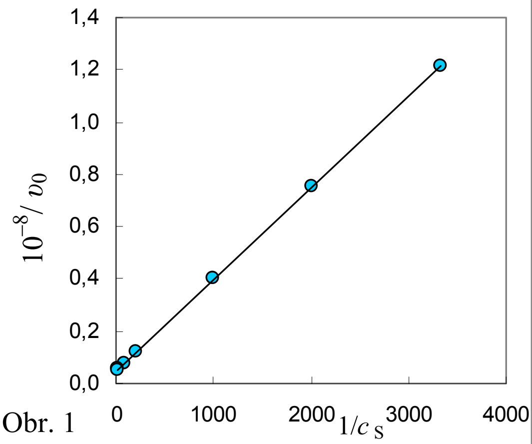
$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{v_{max}} + \frac{K_M}{v_{max}} \cdot \frac{1}{c_S} \qquad (1)$$

Závislost $1/v_0$ na $1/c_S$ je lineární se směrnicí rovnou podílu K_M / v_{max} a úsekem $1/v_{max}$. Na obr. 1 jsou vynesena experimentální data v souřadnicích $1/v_0$ proti $1/c_S$ (tab. 1). Lineární regresí byla získána rovnice přímky

$$\frac{1}{v_0} = 5{,}0084 \cdot 10^6 + 3{,}5017 \cdot 10^4 \cdot \frac{1}{c_S} \qquad (2)$$

Tabulka 1

$10^{-8}/\, v_0$	$1/c_S$
1,21655	3333,33
0,75188	2000,00
0,40000	1000,00
0,12005	200,00
0,07937	83,33
0,05682	19,61
0,05464	13,51
0,05376	10,87



Obr. 1

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

$$\frac{1}{v_{max1}} = 5{,}0084 \cdot 10^6 \text{ dm}^3\,\text{mol}^{-1}\,\text{s} \quad \Rightarrow \quad v_{max1} = \frac{1}{5{,}0084 \cdot 10^6} = 1{,}99665{\cdot}10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}\,\text{s}^{-1}$$

$$\frac{K_{M1}}{v_{max1}} = 3{,}5017 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1} \quad \Rightarrow \quad K_{M1} = 3{,}5017 \cdot 10^4 \cdot v_{max1} = 3{,}5017 \cdot 10^4 \cdot 1{,}99665{\cdot}10^{-7}$$

$$K_{M1} = 6{,}9917 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$$

2. Korelace rovnicí Michaelise a Mentenové linearizované podle Eadiea

$$v_0 = v_{\max} - K_{\mathrm{M}} \cdot \frac{v_0}{c_{\mathrm{S}}} \tag{3}$$

Experimentální data jsou na obr. 2 vynesena v souřadnicích [v_0°; v_0/c_{S}] (tab. 2) a proložena přímkovou závislostí

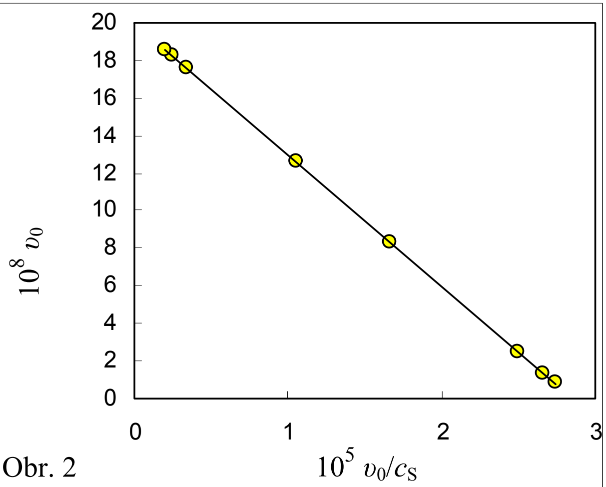
$$v_0 = 2{,}0013 \cdot 10^{-7} - 7{,}0132 \cdot 10^{-3} \cdot \frac{v_0}{c_{\mathrm{S}}} \tag{4}$$

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

$v_{\max 2}$.$= 2{,}0013 \cdot 10^{-7}$ mol dm^{-3} s^{-1} a $K_{\mathrm{M2}} = 7{,}0132 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3}

Tabulka 2

$10^8\, v_0$	$10^5\, v_0/c_{\mathrm{S}}$
0,82	2,740
1,33	2,660
2,50	2,500
8,33	1,666
12,60	1,050
17,60	0,345
18,30	0,247
18,60	0,202



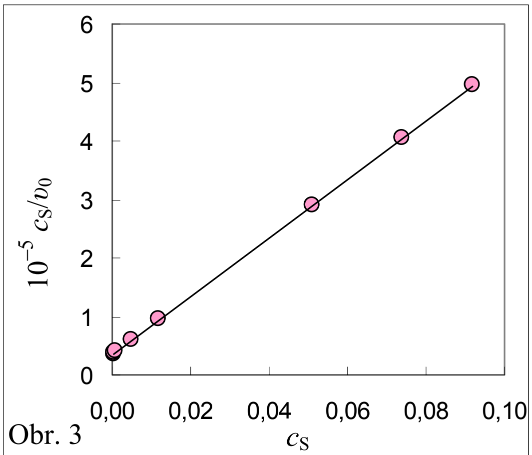
Obr. 2

3. Korelace rovnicí Michaelise a Mentenové linearizované podle Hanese

$$\frac{c_{\mathrm{S}}}{v_0} = \frac{K_{\mathrm{M}}}{v_{\max}} + \frac{1}{v_{\max}} \cdot c_{\mathrm{S}} \tag{5}$$

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

$$\frac{c_{\mathrm{S}}}{v_0} = 35082{,}6 + 4993467{,}13 \cdot c_{\mathrm{S}} \tag{6}$$



Obr. 3

Tabulka 3

$10^{-5}\, c_{\mathrm{S}}/v_0$	c_{S}
0,3650	0,0003
0,3759	0,0005
0,4000	0,001
0,6002	0,005
0,9524	0,012
2,8977	0,051
4,0437	0,074
4,9462	0,092

Pak

$$\frac{1}{v_{\max 3}} = 4{,}99347 \cdot 10^{6}\ \mathrm{dm^3\ mol^{-1}\ s} \quad \Rightarrow \quad v_{\max 3} = \frac{1}{4{,}993467 \cdot 10^{6}} = 2{,}00262 \cdot 10^{-7}\ \mathrm{mol\ dm^{-3}\ s^{-1}}$$

$$\frac{K_{M3}}{\upsilon_{max3}} = 35082{,}6 \ \ \mathrm{s}^{-1} \qquad \Rightarrow \qquad K_{M3} = 35082{,}6 \cdot 2{,}00262 \cdot 10^{-7} = 7{,}0257 \cdot 10^{-3}\ \mathrm{mol\ dm}^{-3}$$

Průměrné hodnoty konstant rovnice Michaelise a Mentenové:

	1	2	3	Průměr
K_M/(mol dm^{-3})	$6{,}9917\cdot10^{-3}$	$7{,}0132\cdot10^{-3}$	$7{,}0257\cdot10^{-3}$	$7{,}0102\cdot10^{-3}$
υ_{max}./(mol dm^{-3} s^{-1})	$1{,}9966\cdot10^{-7}$	$2{,}0013\cdot10^{-7}$	$2{,}0026\cdot10^{-7}$	$2{,}0002\cdot10^{-7}$

(b) $r = \dfrac{dc_P}{d\tau} = \dfrac{\upsilon_{max}\cdot c_S}{K_M + c_S}$

bilance: $c_S = c_{S0} - c_{S0}\cdot\alpha$

$c_P = c_{S0}\cdot\alpha \quad , \quad dc_P = c_{S0}\cdot d\alpha$

τ = ? zreaguje 25 % S $\Rightarrow$ $c_{S0}\cdot\alpha = 0{,}25\, c_{S0}$, $\alpha = 0{,}25$

(i) $c_{S0} = 1{,}35\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3} << $K_M = 7{,}0102\cdot10^{-3}$ mol dm^{-3}

$\upsilon_{max} = 2{,}0002\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3} s^{-1}

$r = \dfrac{dc_P}{d\tau} = \dfrac{\upsilon_{max}\cdot c_S}{K_M + c_S} \cong \dfrac{\upsilon_{max}\cdot c_S}{K_M}$ - reakce probíhá kinetikou prvého řádu

$$c_{S0}\cdot\frac{d\alpha}{d\tau} = \frac{\upsilon_{max}\cdot c_{S0}\cdot(1-\alpha)}{K_M}$$

$$\int_0^\alpha \frac{d\alpha}{(1-\alpha)} = \frac{\upsilon_{max}}{K_M}\int_0^\tau d\tau$$

$$\ln(1-\alpha) = -\frac{\upsilon_{max}}{K_M}\cdot\tau$$

$$\tau = -\frac{K_M}{\upsilon_{max}}\cdot\ln(1-\alpha) = -\frac{7{,}0102\cdot10^{-3}}{2{,}0002\cdot10^{-7}}\cdot\ln(1-0{,}25) = 10082{,}536 \text{ s} = 2{,}8 \text{ h}$$

(ii) $c_{S0} = 1{,}35$ mol dm^{-3} >> $K_M = 7{,}0102\cdot10^{-3}$ mol dm^{-3}

$\upsilon_{max} = 2{,}0002\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3} s^{-1}

$\alpha = 0{,}25$

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

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

$$\tau = \frac{c_{S0}}{\upsilon_{max}}\cdot\alpha = \frac{1{,}35}{2{,}0002\cdot10^{-7}}\cdot0{,}25 = 1687331{,}267 \text{ s} = 468{,}7 \text{ h}$$

(iii) $c_{S0} = 1{,}35\cdot10^{-3}$ mol dm^{-3} srovnatelná s $K_M = 7{,}0102\cdot10^{-3}$ mol dm^{-3}

$\upsilon_{max} = 2{,}0002\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3} s^{-1}

$\alpha = 0{,}25$

$$c_{S0}\cdot\frac{d\alpha}{d\tau} = \frac{\upsilon_{max}\cdot c_{S0}\cdot(1-\alpha)}{K_M + c_{S0}\cdot(1-\alpha)}$$

$$\upsilon_{max}\cdot d\tau = \frac{K_M}{(1-\alpha)}d\alpha + c_{S0}\cdot d\alpha$$

$$\tau = -\frac{K_M}{\upsilon_{max}}\cdot\ln(1-\alpha) + \frac{c_{S0}}{\upsilon_{max}}\cdot\alpha = -\frac{7{,}0102\cdot10^{-3}}{2{,}0002\cdot10^{-7}}\cdot\ln(1-0{,}25) + \frac{1{,}35\cdot10^{-3}}{2{,}0002\cdot10^{-7}}\cdot0{,}25$$

$$= 10082{,}536 + 1687{,}3313 = 11769{,}8673 \text{ s}$$

$\tau = 3{,}2694$ h