

9. KINETIKA ENZYMATICKÝCH REAKCÍ

9.1 ENZYMOVÁ KATALÝZA	2
9.1.1 Mechanismus enzymových reakcí	2
9.1.2 Vyhodnocení experimentálních dat	5
Příklad 9-1 Zpracování kinetických dat metodou počátečních reakčních rychlostí	6
Příklad 9-2 Zpracování kinetických dat pomocí integrované formy rovnice Michaelise a Mentenové.....	8
Příklad 9-3 Zpracování kinetických dat pomocí integrované formy rovnice Michaelise a Mentenové při nízkých koncentracích substrátu.....	9
Příklad 9-4 Zpracování kinetických dat pomocí integrované formy rovnice Michaelise a Mentenové při vysokých koncentracích substrátu	10
9.2 INHIBICE	11
9.2.1 Mechanismus inhibice.....	11
9.2.2 Kinetické parametry inhibovaných reakcí	14
9.2.3 Diagnostika inhibovaných reakcí.....	14
Příklad 9-5 Kinetika a mechanismus inhibice. Diagnostika inhibovaných reakcí.....	18

9.1 ENZYMOVÁ KATALÝZA

Velmi početné a rozmanité katalytické děje probíhají v organismech, při kterých jako katalyzátor působí organické sloučeniny, z nichž nejdůležitější jsou *enzymy*. Jsou to poměrně složité organické sloučeniny, produkované živými organismy. Všechny enzymy patří mezi bílkoviny - některé mezi bílkoviny jednoduché, jiné mezi bílkoviny složené, jež obsahují ještě nebílkovinnou "prostetickou složku" (bílkovinná část se nazývá apoenzym, nebílkovinná koenzym a celek holoenzym). Koenzym může být na bílkovině vázán pevně a trvale, nebo jen labilně a pak ho lze oddělit např. dialýzou. Katalytickou funkci může vykonávat jen celistvý holoenzym. Velikost těchto molekul je důvodem, že vytvářejí koloidní roztoky a enzymovou katalýzu lze tak zařadit mezi katalýzu homogenní a heterogenní.

Typickou vlastností enzymů je jejich specifita - schopnost enzymu katalyzovat pouze určitou reakci daného substrátu (reagující látky). Tato specifita bývá velmi vyhraněná, což dovoluje buňce přesně „rozhodovat“ o tom, které reakce daného substrátu budou v určitou chvíli preferovány; na druhou stranu to znamená, že pro každou reakci daného substrátu musí buňka syntetizovat jiný enzym. Specifita je v podstatě dvojitá: substrátová a funkční. Tzv. *substrátová specifita* spočívá v tom, že enzym působí pouze na jeden substrát nebo skupinu substrátů. Enzymy s maximální substrátovou specifitou působí na jedinou sloučeninu nebo dokonce na jediný z jejích izomerů. Většina enzymů však působí na několik blízkých příbuzných látek a některé i na velkou skupinu sloučenin téhož typu (např. na řadu různých esterů, alkoholů apod.). Substrátová specifita je určována bílkovinnou složkou (apoenzymem). *Funkční specifita* znamená, že enzym z několika možných přeměn substrátu katalyzuje pouze jedinou. Tak např. dekarboxyláza mění aminokyseliny na aminy, ne však na oxokyseliny, jiné aminokyseliny, amidy, estery a pod. - tyto přeměny uskutečňují opět jiné enzymy. Funkční specifita je určována především koenzymem (je-li přítomen), podílí se však na ní i složka bílkovinná. Jsou klasifikovány podle reakce, kterou katalyzují (oxidoreduktázy, transferázy, hydrolázy, lyázy, izomerázy, ligázy).

Pro enzymy je charakteristická vysoká katalytická účinnost. Např. jedna molekula enzymu je schopna při 20 až 38°C přeměnit 10 až 10⁵ molekul substrátu za jedinou sekundu. To odpovídá značným rychlostem, které o mnoho řádů převyšují rychlosti dějů urychlovaných katalyzátory vyráběnými chemiky.

9.1.1 MECHANISMUS ENZYMOVÝCH REAKCÍ

Vysvětlení katalytického účinku enzymů je třeba hledat v jejich molekulární stavbě. Za katalytickou aktivitu je vesměs odpovědná relativně malá oblast molekuly, nazývaná *aktivní centrum*. Toto místo obsahuje skupinu nebo skupiny, schopné reagovat s molekulou substrátu. Srazí-li se molekula enzymu a molekula substrátu ve vhodné orientaci, je substrát v aktivním místě vázán a vzniká tzv. komplex enzym-substrát (ES). Existence komplexu byla prokázána pomocí elektronové mikroskopie a rentgenostrukturální analýzou; v některých případech byl i izolován z reakční směsi. Samo aktivní místo tvoří obvykle prohloubeninu povrchu bílkovinné molekuly a substrát do něj zapadá jako do určité "formy". Tím je zabráněno vazbě jiných látek a zaručena přesná orientace substrátové molekuly. Vazbou substrátu se současně mění struktura aktivního místa i substrátu samotného. Vzniká labilní konfigurace, která vyvolává další strukturální změnu, tj. právě příslušnou katalyzovanou reakci. Jakmile je substrát chemicky změněn na produkt, ztrácí schopnost vazby na enzym, uvolňuje se a aktivní místo se vrací do původního stavu. Studium mechanismů enzymových reakcí se zabývali Leonor Michaelis a Maud Mentenová již v r.1913. Např. pro vysvětlení pozorované kinetiky enzymových reakcí typu $S \rightarrow P$ (S = substrát, P = produkt reakce) navrhli toto schéma:



Uvedený model je zjednodušení, v němž je zanedbána zpětná přeměna produktu na ES, která je obvykle tak pomalá, že ji lze zanedbat; zanedbatelná je také ve všech případech kdy koncentrace produktu P je velmi nízká. Dovoluje však experimentálně získat kinetické parametry enzymové re-

akce, *Michaelisovu konstantu* a *limitní rychlost* (viz dále) ze závislosti počáteční reakční rychlosti na koncentraci substrátu. Na počátku reakce totiž (po smíchání enzymu a substrátu) není ve směsi obsažen žádný produkt a je tedy zajištěno, že zpětná reakce nemůže probíhat a veškeré parametry vypovídají pouze o přeměně substrátu na produkt. Mechanismus enzymatických reakcí se vždy řídí obecnými principy katalýzy - reakční cesta vede opět přes nestabilní meziprodukty. Protože na jedné molekule bývá zpravidla jen jedno aktivní místo, v kinetické rovnici používat místo neznámé veličiny L (v heterogenní katalýze celková koncentrace aktivních center) známou koncentraci enzymu.

Rychlost reakce (v enzymologii je zvykem používat označení v), tj. rychlost tvorby produktu, která je rovna rychlosti úbytku substrátu, je úměrná koncentraci komplexu ES:

$$v = \frac{dc_P}{d\tau} = -\frac{dc_S}{d\tau} = k_2 \cdot c_{ES} \quad (9.2)$$

Neměřitelná koncentrace meziprojektu c_{ES} může být vyjádřena různými způsoby:

1. *Princip předřazené rovnováhy*. Jestliže je možno předpokládat, že se v prvním kroku ustaví rovnováha a rychlost vzniku produktu P z komplexu ES je proti rychlosti jeho zpětnému rozkladu na E + S zanedbatelně malá, tedy že platí $k_2 \ll k_{1-}$ (tento předpoklad je základem teorie Michaelise a Mentenové), je koncentrace ES dána rovnovážnou konstantou prvního kroku

$$K = \frac{k_{1+}}{k_{1-}} = \frac{c_{ES}}{c_E \cdot c_S} \quad (9.3)$$

$$c_{ES} = K \cdot c_E \cdot c_S \quad (9.4)$$

kde c_S je koncentrace výchozí látky – substrátu a c_E koncentrace enzymu ve volné formě. Ta není známa, ale platí, že součet koncentrací volného enzymu a enzymu v komplexu je konstantní a je roven celkové výchozí koncentraci enzymu c_{E0} , takže

$$c_E = c_{E0} - c_{ES} \quad (9.5)$$

$$a \quad c_{ES} = \frac{K \cdot c_{E0} \cdot c_S}{1 + K \cdot c_S} = \frac{c_{E0} \cdot c_S}{\frac{k_{1-}}{k_{1+}} + c_S} \quad (9.6)$$

Po dosazení do rovnice (9.2) dostaneme vztah pro rychlost enzymové reakce

$$v = \frac{k_2 \cdot c_{E0} \cdot c_S}{\frac{k_{1-}}{k_{1+}} + c_S} \quad (9.7)$$

2. *Aproximace stacionárním stavem* předpokládá, že celková rychlost vzniku komplexu enzym-substrát je rovna rychlosti jeho zániku a jeho koncentrace je dána Bodensteinovým principem:

$$\frac{dc_{ES}}{d\tau} = k_{1+} \cdot c_E \cdot c_S - k_{1-} \cdot c_{ES} - k_2 \cdot c_{ES} = 0 \quad (9.8)$$

odkud s přihlédnutím k bilanci (9.5) pro koncentraci ES plyne

$$c_{ES} = \frac{k_{1+} \cdot c_{E0} \cdot c_S}{k_{1-} + k_2 + k_{1+} \cdot c_S} \quad (9.9)$$

Rychlostní rovnice má pak tvar

$$v = \frac{k_2 \cdot c_{E0} \cdot c_S}{\frac{k_{1-}}{k_{1+}} + k_2 + c_S} \quad (9.10)$$

3. Je-li rychlost rozkladu komplexu na produkt mnohem větší než zpětný rozklad na enzym a substrát, $k_2 \gg k_{1-}$, platí pro výslednou rychlost vztah:

$$\frac{dc_{ES}}{d\tau} = k_{1+} \cdot c_E \cdot c_S - k_{1-} \cdot c_{ES} - k_2 \cdot c_{ES} = 0 \quad (9.11)$$

$$v = \frac{k_2 \cdot c_{E0} \cdot c_S}{\frac{k_2}{k_{1+}} + c_S} \quad (9.12)$$

Ve všech případech může být tedy rychlost vyjádřena stejným typem vztahu, v němž jsou rychlostní konstanty nahrazeny novými kinetickými parametry, tzv. Michaelisovou konstantou K_M a limitní rychlostí v_{\max}

$$v = \frac{v_{\max} \cdot c_S}{K_M + c_S} \quad (9.13)$$

který se v enzymologii nazývá *rovnice Michaelise a Mentenové*:

Uvedený model je zjednodušení, v němž je zanedbána zpětná přeměna produktu na ES, která je obvykle tak pomalá, že ji lze zanedbat; zanedbatelná je také ve všech případech kdy koncentrace produktu P je velmi nízká. Dovoluje však experimentálně získat kinetické parametry enzymové reakce, *Michaelisovu konstantu a limitní rychlost* ze závislosti počáteční reakční rychlosti na koncentraci substrátu. Na počátku reakce totiž (po smíchání enzymu a substrátu) není ve směsi obsažen žádný produkt a je tedy zajištěno, že zpětná reakce nemůže probíhat a veškeré parametry vypovídají pouze o přeměně substrátu na produkt.

Michaelisova konstanta je důležitá charakteristika enzymových reakcí. Její hodnoty se pohybují v širokém rozmezí 0,1 až 10^{-6} mol dm⁻³. Michaelisova konstanta má dvojí význam

1. Jak je patrné z rovnice (9.13), pro $v = v_{\max}/2$ je $K_M = c_S$. Michaelisova konstanta je tedy rovna koncentraci substrátu (proto má rozměr koncentrace), při níž je dosaženo polovičního nasycení enzymu a tím i poloviny limitní rychlosti. Hodnota K_M rozděluje křivku závislosti rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu (*saturační křivku*, obr. 9-1) na dvě oblasti, v nichž nastávají dva mezní případy:

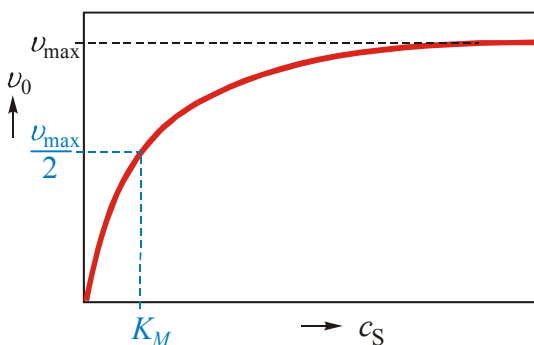
- ▶ Při nízké koncentraci substrátu ($c_S \ll K_M$)

$$v_0 = \frac{v_{\max} \cdot c_S}{K_M} = k \cdot c_S \quad (9.14)$$

je časový průběh enzymové reakce vystižen *kinetickou rovnicí 1.řádu*

- ▶ Při relativně vysokých koncentracích substrátu ($c_S \gg K_M$) je reakční rychlost konstantní a enzymová reakce probíhá jako *reakce nultého řádu*:

$$v_0 = \frac{v_{\max} \cdot c_S}{c_S} = v_{\max} \quad (9.15)$$



Obr. 9-1 Saturační křivka
Závislost počáteční rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu za konstantní koncentraci enzymu

2. Michaelisova konstanta je ve vztahu k rychlostním konstantám jednotlivých reakcí ve schématu (9.1):
 - ▶ Je-li disociace komplexu ES na E + S mnohem rychlejší než tvorba P a regenerace enzymu, ($k_{1-} \gg k_2$), je K_M rovna disociační konstantě komplexu ES

$$K_M = K_{ES} = \frac{k_{1-}}{k_{1+}} \quad (9.16)$$

a je nepřímou mírou pevnosti komplexu; vysoké K_M ukazuje na slabou vazbu mezi enzymem a substrátem, nízké K_M na vazbu silnou. Tato veličina tedy umožňuje odhadnout, zda je substrát štěpen enzymem dobře nebo špatně (tj. rychle nebo pomalu).

- ▶ V případě, že je možno použít aproximace ustáleného stavu, je Michaelisova konstanta dána výrazem

$$K_M = \frac{k_{1-} + k_2}{k_{1+}} \quad (9.17)$$

- ▶ Ve třetím případě, kdy $k_2 \gg k_{1-}$, platí

$$K_M = \frac{k_2}{k_{1+}} \quad (9.18)$$

Symbolem v_{\max} je označován součin $k_2 c_{E0}$. Má význam **limitní rychlosti**, které dosáhne reakce tehdy, je-li enzym nasycen substrátem, a je tedy prakticky úplně přítomen jako komplex ES. Známe-li celkovou koncentraci enzymu c_{E0} (v mol dm⁻³), je možno vypočítat rychlostní konstantu k_2 ,

$$k_2 = \frac{v_{\max}}{c_{E0}} \left[\frac{\text{mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}}{\text{mol dm}^{-3}} = \text{s}^{-1} \right] \quad (9.19)$$

kteřá udává *molekulární aktivitu enzymu* (dříve číslo přeměny), vyjadřující počet molekul substrátu přeměněných za jednu sekundu jednou molekulou enzymu nebo veličinu stejného významu, *molekulární aktivitu*, tj. počet molů substrátu přeměněných jedním molem enzymu za jednu sekundu. Vysoká hodnota molekulární aktivity znamená, že katalyzovaná reakce probíhá velmi rychle. Nejčastěji se její hodnoty pohybují mezi několika sty až tisíci molekul substrátu na molekulu enzymu za sekundu.

9.1.2 VYHODNOCENÍ EXPERIMENTÁLNÍCH DAT

Kinetické parametry rovnice Michaelise a Mentenové K_M a v_{\max} , jak z počátečních reakčních rychlostí, tak z integrálních dat.

Metoda počátečních reakčních rychlostí

Známe-li počáteční rychlosti (tj. rychlosti, při nichž stupeň přeměny nepřekročí hodnotu 0,05) pro sérii reakčních směsí obsahujících konstantní koncentraci enzymu a různé koncentrace substrátu, lze kinetické parametry získat

- Nelineární regresí s využitím počítače
- Pomocí linearizovaných tvarů rovnice Michaelise a Mentenové ([Příklad 9-1](#)):
Podle *Linweavera a Burka* do grafu vynášíme $1/v_0$ proti $1/c_S$. Získáme přímkou, jejíž směrnice je K_M/v_{\max} , úsek na svislé ose je roven $1/v_{\max}$ a úsek na vodorovné ose hodnotě $-1/K_M$.

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{v_{\max}} + \frac{K_M}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{c_S} \quad (9.20)$$

Podle *Eadiea* z lineární závislosti v_0 na v_0/c_S získáme K_M jako směrnici a v_{\max} jako úsek na svislé ose (úsek na vodorovné ose je v_{\max}/K_M):

$$v_0 = v_{\max} - K_M \cdot \frac{v_0}{c_S} \quad (9.21)$$

Podle *Hanese* je poměr c_S/v_0 lineární funkcí koncentrace c_S . Úsek na svislé ose je roven poměru K_M/v_{\max} , úsek na vodorovné ose $-K_M$ a směrnice je $1/v_{\max}$.

$$\frac{c_S}{v_0} = \frac{K_M}{v_{\max}} + \frac{1}{v_{\max}} \cdot c_S \quad (9.22)$$

Výpočet z integrálních dat

Známe-li časovou závislost množství vznikajícího produktu P při konstantní koncentraci enzymu, je možno vyjádřit okamžitou koncentraci substrátu bilancí

$$c_S = c_{S0} - c_{S0} \cdot \alpha = c_{S0} - x \quad , \quad dc_S = -c_{S0} \cdot d\alpha = -dx$$

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

Po dosazení do diferenciální rovnice (9.13) dostaneme

$$\frac{dx}{d\tau} = v_{\max} \cdot \frac{c_{S0} - x}{K_M + c_{S0} - x} \quad (9.23)$$

$$v_{\max} \cdot d\tau = \frac{K_M + c_{S0} - x}{c_{S0} - x} dx = \left(\frac{K_M}{c_{S0} - x} + 1 \right) dx \quad (9.24)$$

$$v_{\max} \cdot \tau = \int_0^x \left(\frac{K_M}{c_{S0} - x} + 1 \right) dx = K_M \cdot \ln \frac{c_{S0}}{c_{S0} - x} + x \quad (9.25)$$

Ze směrnice linearizovaného tvaru této integrální rovnice,

$$\frac{1}{\tau} \cdot \ln \frac{c_{S0}}{c_{S0} - x} = \frac{v_{\max}}{K_M} - \frac{1}{K_M} \cdot \frac{x}{\tau} \quad (9.26)$$

dostaneme Michaelisovu konstantu, úsek na svislé ose je roven poměru v_{\max}/K_M ([Příklad 9-2](#)).

V oblasti *nízkých koncentrací substrátu*, kde $c_S \ll K_M$, probíhá reakce kinetikou prvního řádu ([Příklad 9-3](#)). Časovou závislost koncentrace substrátu dostaneme integrací rovnice (9.14)

$$\ln \frac{c_{S0}}{c_{S0} - x} = k \cdot \tau, \quad \text{kde } k = \frac{k_2 \cdot c_{E0}}{K_M} \quad (9.27)$$

Při relativně *vysokých koncentracích substrátu* ($c_S \gg K_M$) je reakční rychlost konstantní a enzymová reakce probíhá jako *reakce nultého řádu*, popsaná diferenciální rovnicí (9.15). Množství vznikajících produktů se mění lineárně s časem; směrnice této přímky je rovna v_{\max} ([Příklad 9-4](#)):

$$x = v_{\max} \cdot \tau \quad (9.28)$$

Příklad 9-1 Zpracování kinetických dat metodou počátečních reakčních rychlostí

Tryptofanosa katalyzuje reakci



Při studiu aktivity částečně přečištěného preparátu enzymu byly získány hodnoty počátečních rychlostí při různých koncentracích L-tryptofanu (substrát S). Vyhodnoťte Michaelisovu konstantu a limitní rychlost.

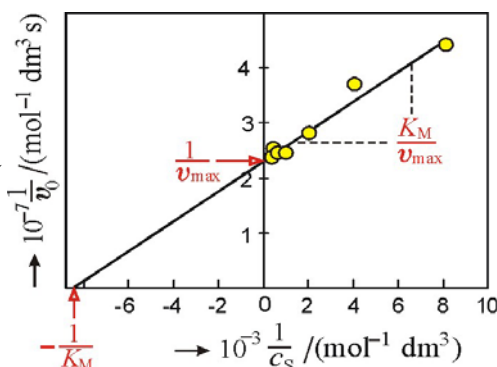
Řešení:

$10^4 c_S$ mol dm ⁻³	$10^8 v_0$ mol dm ⁻³ s ⁻¹
1,22	2,267
2,45	2,703
4,90	3,575
9,79	4,098
14,69	4,098
19,59	3,974
24,48	4,211

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

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

Obr. 9-2
Linearizace
podle
Lineweavera
a Burka



$10^{-3} 1/c_S$ dm ³ mol ⁻¹	$10^{-7} 1/v_0$ dm ³ mol ⁻¹ s
8,197	4,411
4,082	3,700
2,041	2,797
1,021	2,440
0,681	2,440
0,510	2,516
0,408	2,375

Lineární regresi experimentálních dat:

$$\frac{1}{v_0} = 2,2952 \cdot 10^7 + \frac{2723}{c_S}$$

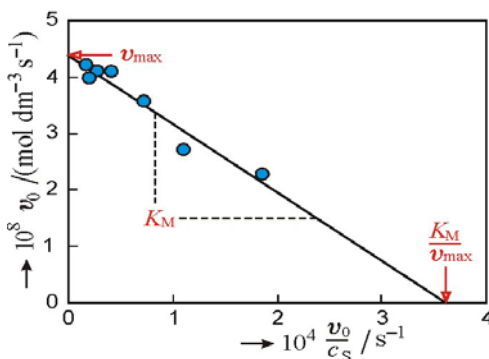
Porovnáním obou rovnic dostaneme

$$v_{\max} = \frac{1}{2,2952 \cdot 10^7} = 4,357 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}$$

$$\frac{K_M}{v_{\max}} = 2723 \Rightarrow K_M = 2723 \cdot 4,357 \cdot 10^{-8} = 1,1864 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$$

2. Korelace rovnicí Michaelise a Mentenové linearizované podle Eadiea

Obr. 9-3
Linearizace
podle
Eadiea



$\frac{10^8 v_0}{\text{mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}}$	$\frac{10^4 v_0 / c_S}{\text{s}^{-1}}$
2,267	1,858
2,703	1,103
3,575	0,730
4,098	0,419
4,098	0,279
3,974	0,203
4,211	0,172

$$v_0 = v_{\max} - K_M \cdot \frac{v_0}{c_S}$$

Lineární regresí:

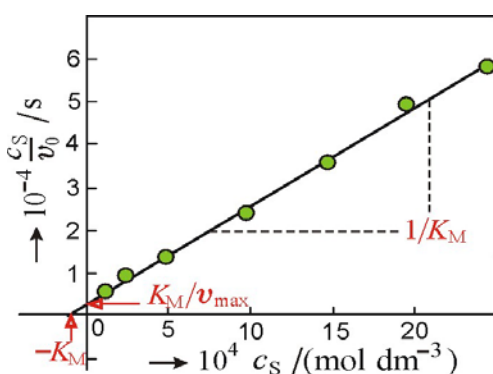
$$v_0 = 4,386 \cdot 10^{-8} - 1,2125 \cdot 10^{-4} \cdot \frac{v_0}{c_S}$$

$$v_{\max} = 4,386 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}$$

$$K_M = 1,2125 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$$

3. Korelace rovnicí Michaelise a Mentenové linearizované podle Hanese

Obr. 9-4
Linearizace
podle
Hanese



$\frac{10^4 c_S}{\text{mol dm}^{-3}}$	$\frac{10^{-4} c_S / v_0}{\text{s}}$
1,22	0,538
2,45	0,906
4,90	1,371
9,79	2,389
14,69	3,585
19,59	4,930
24,48	5,813

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

Lineární regresí:

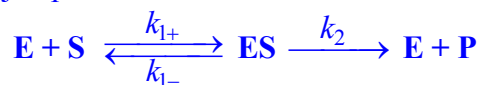
$$\frac{c_S}{v_0} = 2624,9 + 2,2944 \cdot 10^7 \cdot c_S$$

$$v_{\max} = \frac{1}{2,2944 \cdot 10^7} = 4,358 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}$$

$$\frac{K_M}{v_{\max}} = 2624,9 \Rightarrow K_M = 2624,9 \cdot 4,358 \cdot 10^{-8} = 1,144 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$$

Příklad 9-2 Zpracování kinetických dat pomocí integrované formy rovnice Michaelise a Mentenové

Pro enzymovou reakci, probíhající podle schématu



byla při počáteční koncentraci substrátu $c_S = 0,122 \text{ mmol dm}^{-3}$ a konstantní koncentraci enzymu zjištěna závislost koncentrace vznikajícího produktu P na čase, uvedená v následující tabulce. Stanovte hodnoty Michaelisovy konstanty a limitní rychlosti v_{\max} .

$\frac{\tau}{\text{s}}$	$\frac{c_P}{\text{mmol dm}^{-3}}$	$\frac{\tau}{\text{s}}$	$\frac{c_P}{\text{mmol dm}^{-3}}$
580	0,0122	1856	0,0366
883	0,0183	2207	0,0427
1195	0,0244	2575	0,0488
1520	0,0305	2963	0,0549

Řešení:

Ze známé časové závislosti množství vznikajícího produktu P při konstantní koncentraci enzymu, je možno vyjádřit okamžitou koncentraci substrátu bilancí

$$\begin{aligned} c_S &= c_{S0} - x & , & & d c_S &= -d x \\ c_P &= x & , & & d c_P &= d x \end{aligned}$$

Po dosazení z hmotnostní bilance do diferenciální rovnice Michaelise a Mentenové (9.13) dostaneme vztah

$$\frac{d x}{d \tau} = v_{\max} \cdot \frac{c_{S0} - x}{K_M + c_{S0} - x} \quad [1]$$

který po integraci a úpravě vede k rovnici

$$\frac{1}{\tau} \cdot \ln \frac{c_{S0}}{c_{S0} - c_P} = \frac{v_{\max}}{K_M} - \frac{1}{K_M} \cdot \frac{c_P}{\tau} \quad [2]$$

která představuje rovnici přímky, jejíž směrnice je rovna $(-1/K_M)$ a úsek na svislé ose je poměru v_{\max}/K_M . Ze zadaných hodnot vypočteme hodnoty levé strany rovnice [2] a hodnoty výrazu c_P/τ .

$\frac{\tau}{\text{s}}$	$\frac{10^5 c_P}{\text{mol dm}^{-3}}$	$\frac{Y \equiv 10^4 \frac{1}{\tau} \cdot \ln \frac{c_{S0}}{c_{S0} - c_P}}{\text{s}^{-1}}$	$\frac{X \equiv 10^8 \frac{c_P}{\tau}}{\text{mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}}$
0	12,2		
580	1,22	1,81656	2,10345
883	1,83	1,84053	2,07248
1195	2,44	1,86731	2,04184
1520	3,05	1,89265	2,00658
1856	3,66	1,92174	1,97198
2207	4,27	1,95189	1,93475
2575	4,88	1,98379	1,89515
2963	5,49	2,01767	1,85285

Obr. 9-5 ukazuje, že závislost je skutečně lineární. Porovnáním vztahu [2] s rovnicí přímky, získanou lineární regrese experimentálních dat

$$Y = 3,5058 - 0,80323 \cdot X \quad [3]$$

dostaneme

$$\frac{1}{\tau} \cdot \ln \frac{c_{S0}}{c_{S0} - c_P} = 3,5058 \cdot 10^{-4} - 8032,3 \cdot \frac{c_P}{\tau}$$

odkud $\frac{1}{K_M} = 8032,3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$

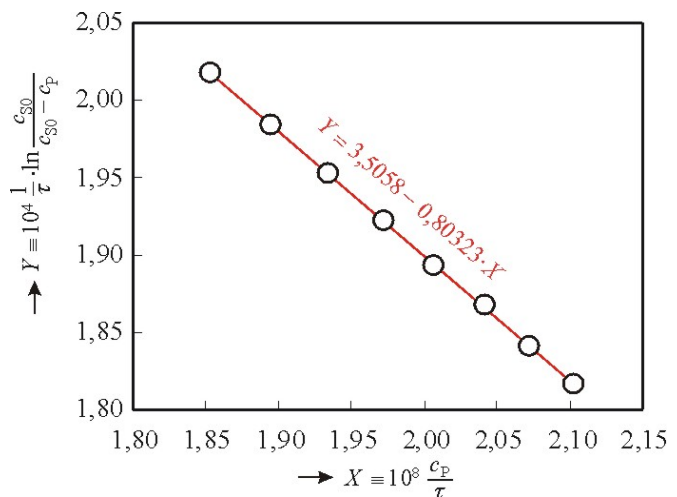
$$K_M = 1,245 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$$

a $\frac{v_{\max}}{K_M} = 3,5058 \cdot 10^{-4}$

odkud

$$v_{\max} = 3,5058 \cdot 10^{-4} \cdot 1,245 \cdot 10^{-4}$$

$$v_{\max} = 4,365 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}$$



Obr. 9-5 Grafické znázornění integrované rovnice Michaelise a Mentenové

Příklad 9-3 Zpracování kinetických dat pomocí integrované formy rovnice Michaelise a Mentenové při nízkých koncentracích substrátu

Enzym o molární hmotnosti 90 kg mol^{-1} a molární aktivě $k_2 = 2 \cdot 10^3 \text{ min}^{-1}$ působí v roztoku na substrát, který je na počátku přítomen v koncentraci $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Roztok obsahuje $0,27 \text{ mg}$ enzymu v 1 cm^3 . Pro tento systém byla zjištěna hodnota Michaelisovy konstanty $K_M = 0,48 \text{ mol dm}^{-3}$. Je možno předpokládat, že enzymová reakce probíhá podle schématu (9.1).

- (a) Co můžete předpokládat o kinetice uvažované enzymové reakce v této koncentrační oblasti?
 (b) Odhadněte, za jak dlouho klesne koncentrace substrátu na 50 % původní hodnoty.

Řešení:

- (a) Ze zadaných hodnot je patrné, že $c_{S0} \ll K_M$. Jsme tedy v koncentrační oblasti, v níž enzymová reakce probíhá kinetikou prvního řádu.
 (b) V této koncentrační oblasti přechází rovnice Michaelise a Mentenové (9.13) na tvar.

$$v = -\frac{dc_S}{d\tau} = \frac{v_{\max} \cdot c_S}{K_M + c_S} \doteq \frac{v_{\max}}{K_M} \cdot c_S \quad , \quad \text{kde } v_{\max} = k_2 \cdot c_{E0}$$

Integrací dostaneme

$$\ln \frac{c_{S0}}{c_S} = \frac{k_2 \cdot c_{E0}}{K_M} \cdot \tau$$

Dosadíme zadané hodnoty: $k_2 = 2 \cdot 10^3 \text{ min}^{-1}$, $c_{S0} = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $K_M = 0,48 \text{ mol dm}^{-3}$
 $c_S = 0,5 c_{S0}$

$$m_{E0} / V = 0,27 \text{ mg cm}^{-3} = 0,27 \text{ g dm}^{-3}, \quad M_E = 90 \text{ kg mol}^{-1}$$

$$c_{E0} = \frac{m_{E0}}{M_E \cdot V} = \frac{0,27}{9 \cdot 10^4} = 3 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$$

$$\tau = \frac{K_M}{k_2 \cdot c_{E0}} \cdot \ln \frac{c_{S0}}{c_S} = \frac{0,48}{2 \cdot 10^3 \cdot 3 \cdot 10^{-6}} \cdot \ln \frac{1 \cdot 10^{-5}}{0,5 \cdot 1 \cdot 10^{-5}} = 55,45 \text{ min}$$

Příklad 9-4 Zpracování kinetických dat pomocí integrované formy rovnice Michaelise a Mentenové při vysokých koncentracích substrátu

Při působení xanthinoxidasy ($K_M = 1,7 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) na xanthin (substrát), jehož počáteční koncentrace byla $0,7 \text{ mol dm}^{-3}$, se množství vznikajícího produktu měnilo lineárně s časem. Z výsledků tří pokusů při různých počátečních koncentracích enzymu stanovte molární aktivitu xanthinoxidasy. Enzymovou reakci je možno vystihnout schématem (9.1).

I. $c_{E0} = 3,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$		II. $c_{E0} = 6,8 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$		III. $c_{E0} = 1,4 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$	
τ	c_P	τ	c_P	τ	c_P
s	mol dm^{-3}	s	mol dm^{-3}	s	mol dm^{-3}
500	0,017	237	0,016	540	0,076
1200	0,042	1670	0,113	1980	0,277
3800	0,138	5400	0,368	2880	0,403
4500	0,157	6500	0,441	3900	0,547

Řešení:

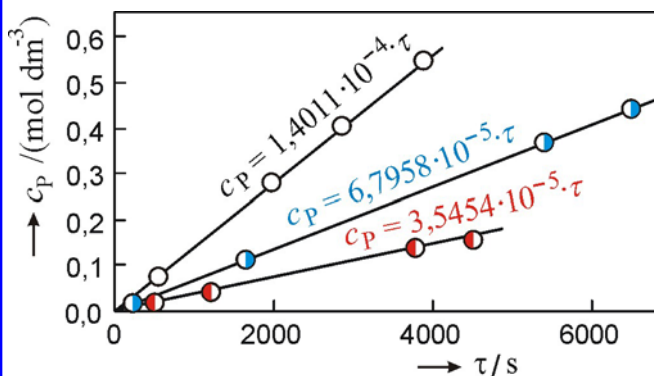
Jsme v koncentrační oblasti, kde $c_{S0} \gg K_M$ a reakce tedy probíhá kinetikou nultého řádu, která je popsána diferenciální rychlostní rovnicí (9.15):

$$v = -\frac{dc_S}{d\tau} = \frac{dc_P}{d\tau} = \frac{v_{\max} \cdot c_S}{K_M + c_S} \doteq v_{\max} = k_2 \cdot c_{E0}$$

Po integraci dostaneme lineární závislost koncentrace produktu na čase

$$c_P = k_2 \cdot c_{E0} \cdot \tau$$

Vynesením c_P proti času získáme pro jednotlivé pokusy svazek přímek procházejících počátkem (obr. 9-6), jejichž směrnice jsou rovny součinům $k_2 \cdot c_{E0}$.



Obr. 9-6 Časová závislost koncentrace produktu

Směrnice jednotlivých přímek mají hodnoty

I. \bullet $c_{E0} = 3,7 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$

$$k_2 \cdot c_{E0} = 3,5454 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1} \Rightarrow (k_2)_I = \frac{3,5454 \cdot 10^{-5}}{3,7 \cdot 10^{-7}} = 95,82 \text{ s}^{-1}$$

II. \bullet $c_{E0} = 7,1 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$

$$k_2 \cdot c_{E0} = 6,7958 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1} \Rightarrow (k_2)_{II} = \frac{6,7958 \cdot 10^{-5}}{7,1 \cdot 10^{-7}} = 95,72 \text{ s}^{-1}$$

III. \circ $c_{E0} = 14,6 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$

$$k_2 \cdot c_{E0} = 1,4011 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1} \Rightarrow (k_2)_{III} = \frac{1,4011 \cdot 10^{-5}}{14,6 \cdot 10^{-6}} = 95,97 \text{ s}^{-1}$$

Průměr hodnot $(k_2)_I$, $(k_2)_{II}$ a $(k_2)_{III}$ je

průměrná hodnota molární aktivity xanthinoxidasy : $k_2 = 95,84 \text{ s}^{-1}$

9.2 INHIBICE

Inhibice je děj, při němž je schopnost enzymu katalyzovat reakci snížena vazbou určité látky, *inhibitoru*.

9.2.1 MECHANISMUS INHIBICE

Podle mechanismu působení rozlišujeme několik typů inhibice:

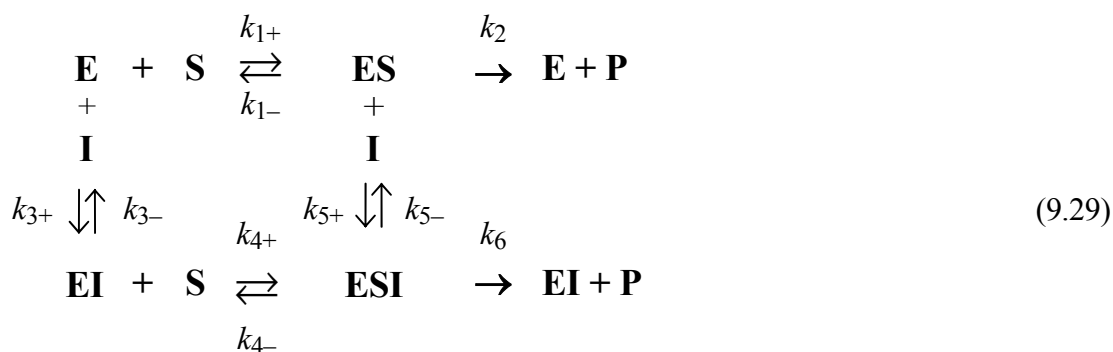
- Při *nevratné inhibici* je enzym nevratně modifikován chemickou reakcí s inhibitorem. Obvykle dochází ke změně chemické struktury vazebných nebo katalytických skupin v aktivním centru enzymu.
- *Vratnou inhibici* vyvolává inhibitor, který může být z (nekovalentní) vazby na enzym odstraněn a enzym tak může nabýt své původní aktivity; při analýze reversibilní inhibice vycházíme obvykle z modelu Michaelise a Mentenové a rozlišujeme tzv. *čisté inhibice* - *kompetitivní*, *nekompetitivní* a *akompetitivní* - a *inhibice smíšené*, které nelze popsat jednoduchým kinetickým modelem.

U každého typu můžeme rozlišit ještě

plnou inhibici - rychlost enzymové reakce při dostatečné koncentraci inhibitoru klesá při každém zvýšení koncentrace substrátu k nule, a

částečnou inhibici - rychlost neklesá k nule, ale blíží se ke konečné asymptotě.

Různé typy inhibice je možno vyjádřit obecným schématem



Symbol E znamená opět enzym, S substrát, P produkt reakce. Symbol I značí inhibitor. Za nepřítomnosti inhibitoru existuje enzym pouze ve volné formě E a ve formě komplexu ES, za přítomnosti inhibitoru tvoří ještě komplexy EI, případně ESI*.

Získání nejobecnějšího výrazu pro veškeré typy jednoduché inhibice bez zjednodušujících předpokladů je značně pracné. V mnoha případech lze však vycházet z předpokladu, že mezi substrátem, enzymem a inhibitorem se ustavuje rychle rovnováha, kterou je možno popsat disociačními konstantami:

$$\frac{c_E \cdot c_S}{c_{ES}} = K_S = \frac{k_{1-}}{k_{1+}} \quad (9.30), \quad \frac{c_{EI} \cdot c_S}{c_{ESI}} = K'_S = \frac{k_{4-}}{k_{4+}} \quad (9.31)$$

$$\frac{c_E \cdot c_I}{c_{EI}} = K_I = \frac{k_{3-}}{k_{3+}} \quad (9.32), \quad \frac{c_{ES} \cdot c_I}{c_{ESI}} = K'_I = \frac{k_{5-}}{k_{5+}} \quad (9.33)$$

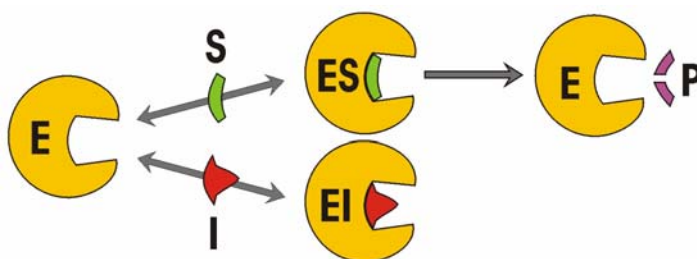
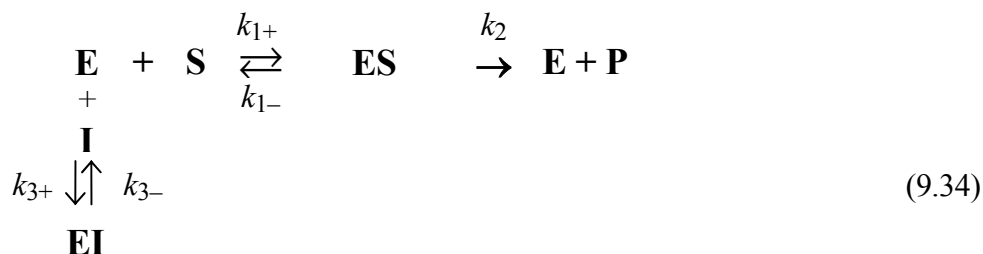
Substrátová konstanta K_S je mírou pevnosti komplexu vytvořeného mezi enzymem a substrátem. Analogicky definovaných inhibičních konstant K_I a K'_S lze použít jako kvantitativní míry účinku inhibitorů.

* Předpokládáme, že komplex vznikající z ES a I je stejný jako komplex vznikající z EI a S.

9.2.1.1 Kompetitivní inhibice

Inhibitor a substrát soutěží o volný enzym. Struktura inhibitoru je natolik podobná struktuře substrátu, že se může vázat na totéž vazebné místo. Zvýší-li se však koncentrace substrátu natolik, že je vyšší než koncentrace inhibitoru, dojde k vytěsnění inhibitoru a navázání substrátu.

Při **plně kompetitivní inhibici** místo komplexu ES vzniká inaktivní komplex EI, který se nepřeměňuje na produkt. Tím je enzym blokován. Uskutečňují se tedy pouze tyto dílčí reakce obecného schématu:

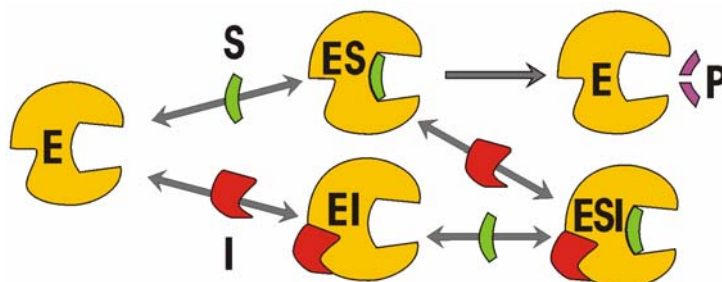
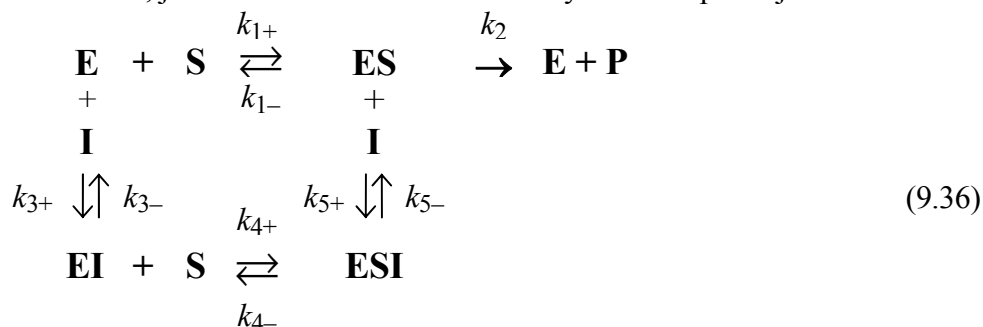


Při **částečně kompetitivní inhibici** se inhibitor opět váže na místo blízké vazebnému místu, ale vznikající komplex ESI se rozkládá na produkt a inaktivní komplex EI, v němž zůstává vázána část enzymu. Inhibice je popsána schématem (9.29). Rychlostní konstanty rozpadu komplexů ES a ESI jsou stejné, $k_2 = k_6$. Protože vazba inhibitoru ovlivňuje vazbu substrátu, platí pro poměr disociačních konstant (označíme α)

$$\frac{K'_I}{K_I} = \frac{K'_S}{K_S} = \alpha > 1
 \quad (9.35)$$

9.2.1.2 Nekompetitivní inhibice

Při **plně nekompetitivní inhibici** neovlivňuje vazba inhibitoru vazbu substrátu, ale snižuje rychlost jeho přeměny na produkt. Z kinetického hlediska se systém chová tak, jako by bylo přítomno menší množství enzymu, neboť část je ho inaktivována vazbou inhibitoru; hodnota Michaelisovy konstanty není tímto typem inhibice ovlivněna, je však snížena hodnota limitní rychlosti. Uplatňují se reakce:



9.2.2 KINETICKÉ PARAMETRY INHIBOVANÝCH REAKCÍ

Řešením reakčních schémat pro jednotlivé typy inhibice získáme závislost rychlosti inhibované reakce v_i na koncentraci substrátu c_S za přítomnosti konstantního množství inhibitoru c_I , kterou je možno zapsat stejnou formou, jakou má rovnice Michaelise a Mentenové:

$$v_i = \frac{v'_{\max} \cdot c_S}{K'_M + c_S} \quad (9.40)$$

Kinetické parametry, zdánlivá maximální rychlost v'_{\max} a zdánlivá Michaelisova konstanta K'_M platí vždy pro určitou koncentraci inhibitoru (viz tabulka 1)

Tabulka 1
Kinetické parametry inhibovaných enzymových reakcí

$$\alpha = \frac{K'_I}{K_I} = \frac{K'_S}{K_S} \quad , \quad \beta = \frac{k_6}{k_2} \quad , \quad v_{\max} = k_2 \cdot c_{E0}$$

typ inhibice		v'_{\max}	K'_M
kompetitivní	plně	v_{\max}	$K_M \cdot \frac{K_I + c_I}{K_I}$
	částečně	v_{\max}	$K_M \cdot \frac{K_I + c_I}{K_I + c_I / \alpha}$
nekompetitivní	plně	$v_{\max} \cdot \frac{K_I}{K_I + c_I}$	K_M
	částečně	$v_{\max} \cdot \frac{K_I + \beta \cdot c_I}{K_I + c_I}$	K_M
akompetitivní	plně	$v_{\max} \cdot \frac{K'_I}{K'_I + c_I}$	$K_M \cdot \frac{K'_I}{K'_I + c_I}$
	částečně	$v_{\max} \cdot \frac{K'_I + \beta \cdot c_I}{K'_I + c_I}$	$K_M \cdot \frac{K'_I}{K'_I + c_I}$
typicky smíšená		$v_{\max} \cdot \frac{K'_I}{K'_I + c_I / \alpha}$	$K_M \cdot \frac{K'_I + c_I}{K'_I + c_I / \alpha}$

9.2.3 DIAGNOSTIKA INHIBOVANÝCH REAKCÍ

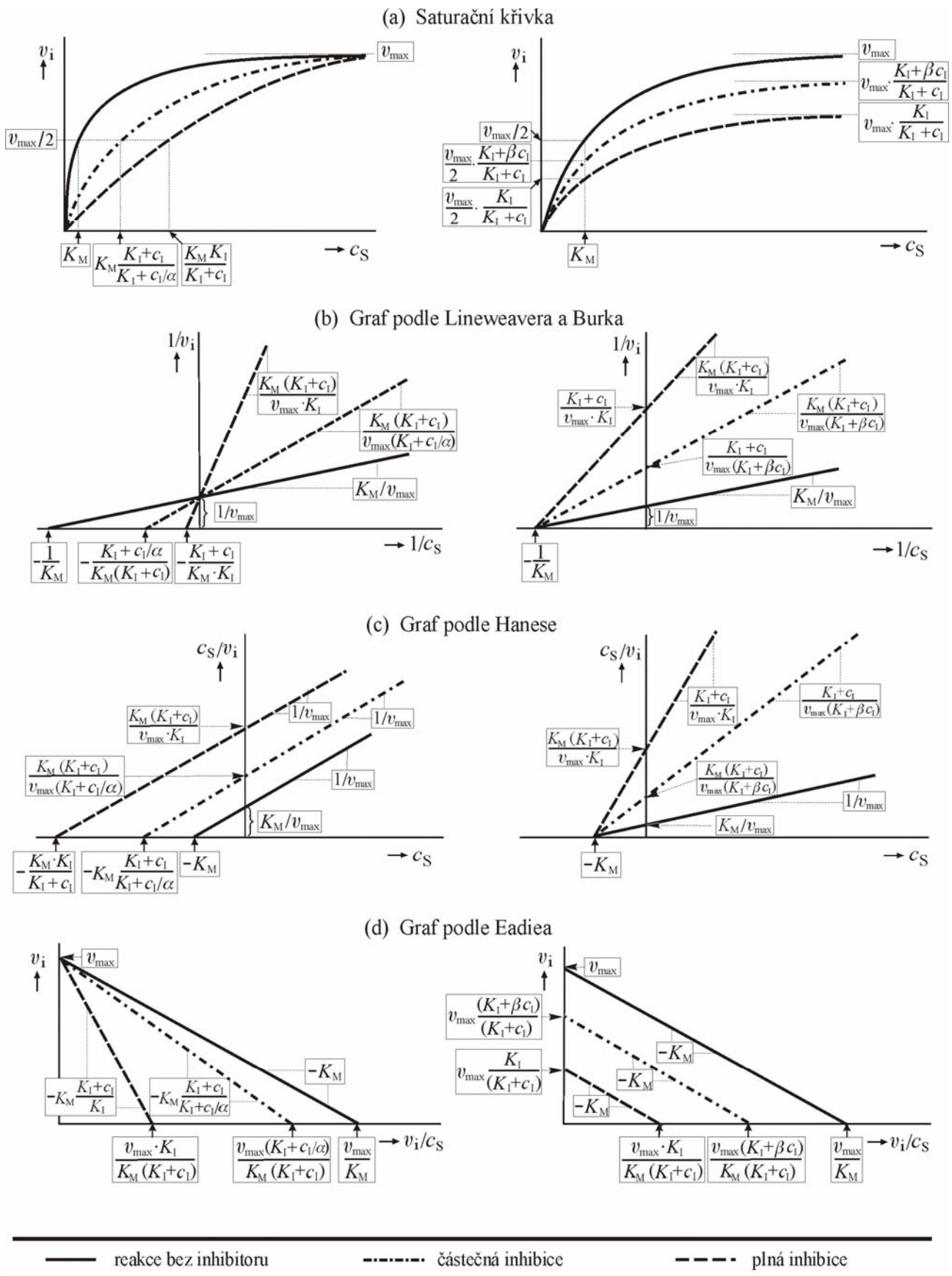
Při **diagnostice** inhibovaných reakcí se obvykle používá hodnot počátečních reakčních rychlostí, naměřených při různých koncentracích inhibitorů a substrátů. Využíváme grafických nebo numerických metod popsanych pro stanovení v_{\max} a K_M neinhibovaných reakcí:

- vynesení ▶ $1/v_i$ proti $1/c_S$ (Lineweaver a Burk),
 ▶ c_S/v_i proti c_S (Hanes)
 nebo ▶ v_i proti v_i/c_S (Eadie)

a dále speciálních grafů pro inhibované reakce

- vynesení ▶ $1/v_i$ proti c_I za konstantní koncentrace substrátu (Dixonův graf),
 ▶ $\frac{c_I \cdot v_i}{v - v_i}$ proti c_S za konstantní koncentrace inhibitoru (graf podle Huntera a Downse)

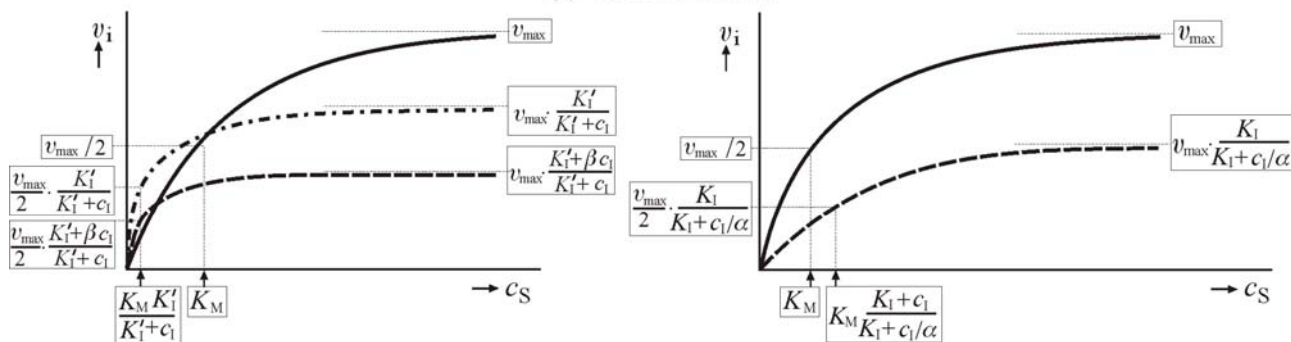
Typické tvary jednotlivých závislostí jsou shrnuty na obr. 9-7 až 9-12



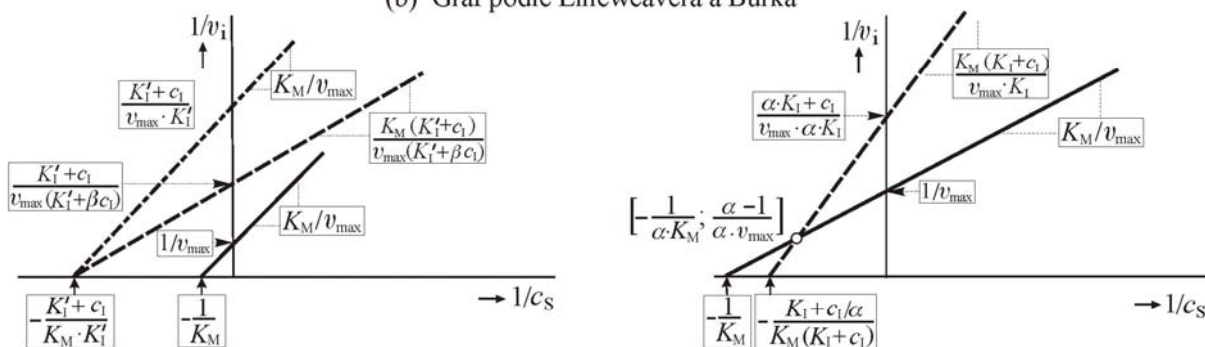
Obr. 9-7 Kompetitivní inhibice

Obr. 9-8 Nekompetitivní inhibice

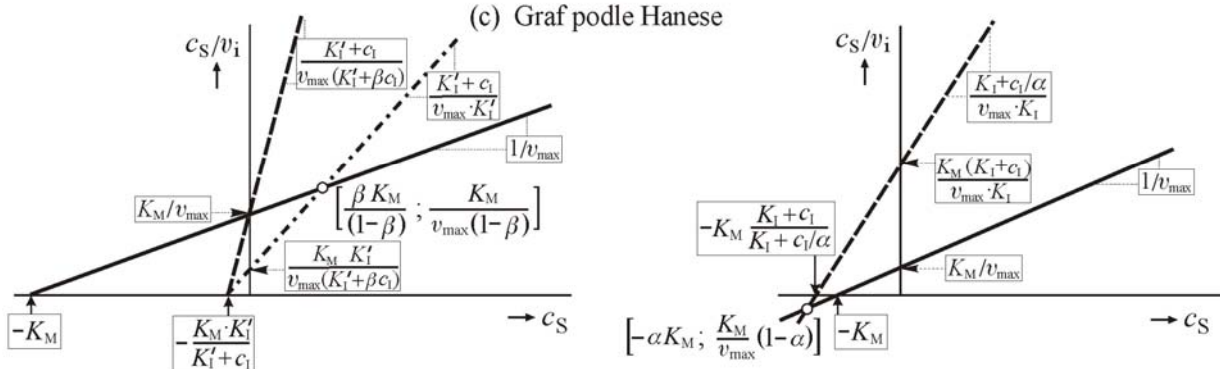
(a) Saturační křivka



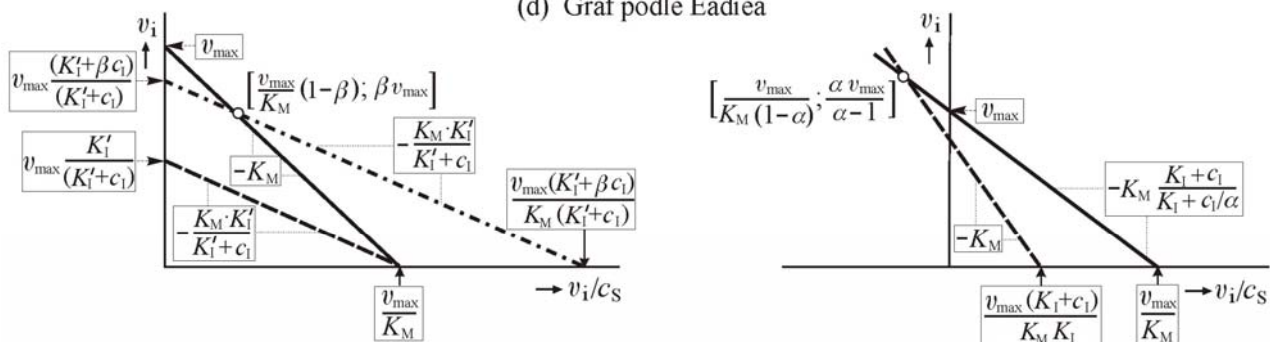
(b) Graf podle Lineweavera a Burka



(c) Graf podle Hanese



(d) Graf podle Eadie

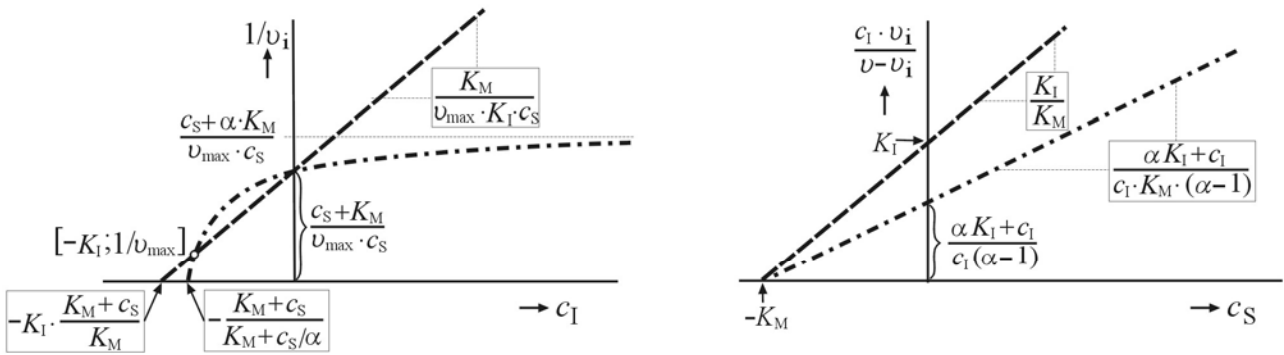


— reakce bez inhibitoru - - - - - částečná inhibice - - - - - plná inhibice

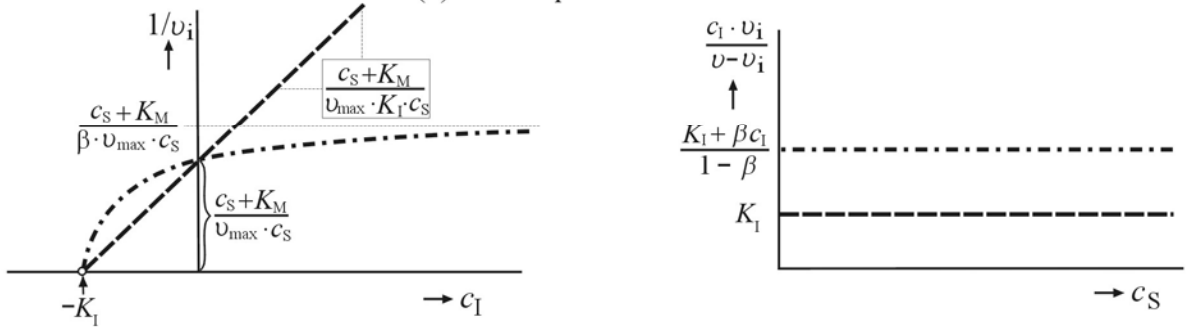
Obr. 9-9 Akompetitivní inhibice

Obr. 9-10 Typicky smíšená inhibice

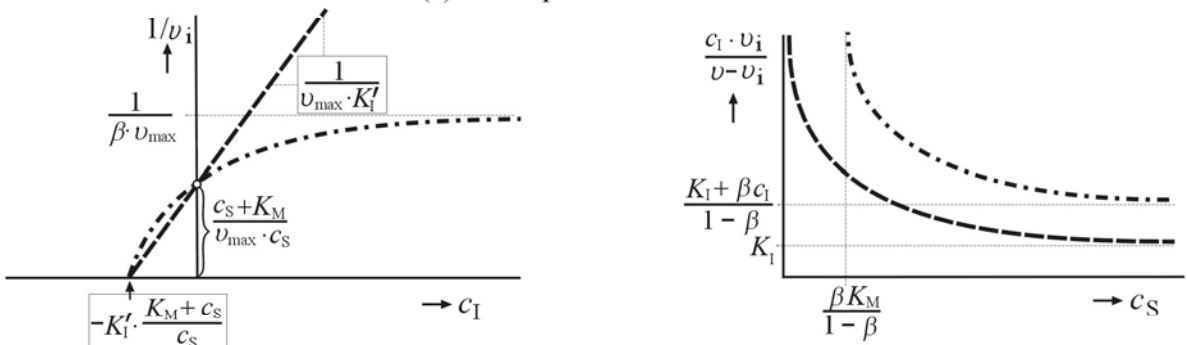
(a) Kompetitivní inhibice



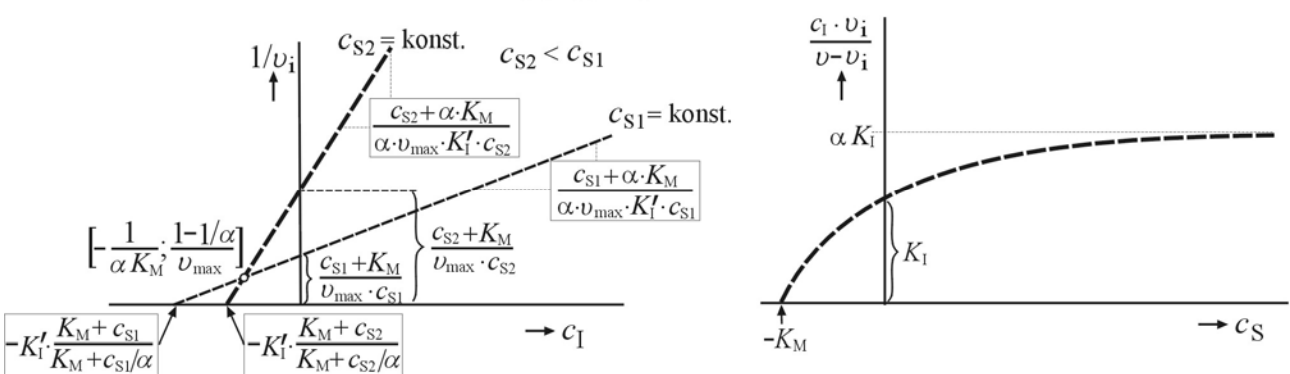
(b) Nekompetitivní inhibice



(c) Akompetitivní inhibice



(d) Typicky smíšená inhibice



----- částečná inhibice

----- plná inhibice

Obr. 9-11 Dixonův graf

Obr. 9-12 Graf podle Huntera a Downse

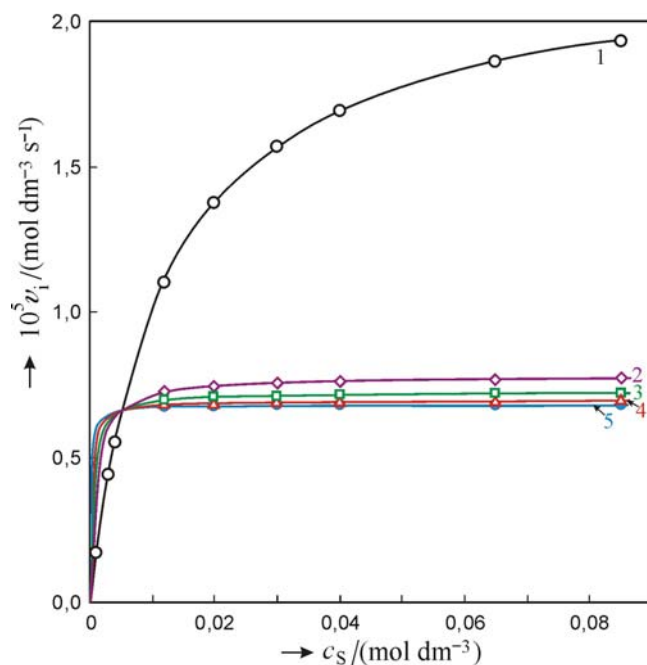
Příklad 9-5 Kinetika a mechanismus inhibice. Diagnostika inhibovaných reakcí

Pro jistou enzymovou reakci, o níž se předpokládá, že za přítomnosti inhibitoru probíhá podle schematu (9.39), byly naměřeny hodnoty počátečních reakčních rychlostí při různých koncentracích substrátu jednak za nepřítomnosti inhibitoru a jednak pro různé koncentrace inhibitoru. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce. Ověřte navrhovaný mechanismus a stanovte hodnoty konstant v rovnicích, popisujících závislost rychlosti reakce na koncentraci substrátu a inhibitoru.

c_S mol dm ⁻³	$10^5 v_i / (\text{mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1})$				
	$c_I = 0$	$c_I = 0,05$	$c_I = 0,10$	$c_I = 0,18$	$c_I = 0,32$
0,001	0,169	0,403	0,487	0,546	0,589
0,003	0,440	0,595	0,622	0,637	0,646
0,004	0,550	0,630	0,644	0,651	0,654
0,005	0,647	0,657	0,658	0,659	0,659
0,012	1,100	0,723	0,694	0,680	0,671
0,020	1,375	0,745	0,705	0,686	0,674
0,030	1,570	0,756	0,710	0,689	0,676
0,040	1,690	0,762	0,713	0,690	0,677
0,065	1,860	0,768	0,717	0,692	0,678
0,085	1,930	0,771	0,718	0,693	0,678

Řešení:

Na obr. 9-13 jsou vyneseny saturační křivky. Z porovnání průběhu závislosti počáteční rychlosti na koncentraci substrátu pro enzymovou reakci bez přítomnosti a za přítomnosti inhibitoru je patrné, že nejpravděpodobnější je předpoklad, že jde o akompetitivní inhibici (srovnej obr. 9-9a).



Obr. 9-13 Saturační křivky

- Křivka 1: $c_I = 0$
(neinhibovaná reakce)
- ◇ Křivka 2: $c_I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$
- Křivka 3: $c_I = 0,10 \text{ mol dm}^{-3}$
- △ Křivka 4: $c_I = 0,18 \text{ mol dm}^{-3}$
- Křivka 5: $c_I = 0,32 \text{ mol dm}^{-3}$

Rychlost neinhibované reakce je popsána rovnicí Michaelise a Mentenové (9.13).

$$v = \frac{v_{\max} \cdot c_S}{K_M + c_S} \quad [1]$$

Při odvození výrazu pro *rychlost inhibované reakce* předpokládáme, že mezi substrátem, enzymem a inhibitorem se rychle ustavuje rovnováha, popsána disociačními konstantami K_S a K_I' (konstanta $K_S = K_M$ neinhibované reakce) a rychlost reakce je dána vztahem

$$v_i = k_2 \cdot c_{ES} + k_6 \cdot c_{ESI} \quad [2]$$

Koncentrace komplexů ES a ESI vyjádříme z rovnic (9.30) a (9.33):

$$c_{ES} = \frac{c_E \cdot c_S}{K_S}, \quad c_{ESI} = \frac{c_{ES} \cdot c_I}{K_I'} = \frac{c_E \cdot c_S \cdot c_I}{K_S \cdot K_I'} \quad [3], [4]$$

Pro celkovou koncentraci enzymu platí bilance

$$c_{E0} = c_E + c_{ES} + c_{ESI} = c_E \cdot \left(1 + \frac{c_S}{K_S} + \frac{c_S \cdot c_I}{K_S \cdot K_I'} \right) \quad [5]$$

Z rovnic [3] až [5] dosadíme do rychlostní rovnice [2]:

$$v_i = k_2 \cdot \frac{c_E \cdot c_S}{K_S} + k_6 \cdot \frac{c_E \cdot c_S \cdot c_I}{K_S \cdot K_I'} = \left(1 + \frac{k_6 \cdot c_I}{k_2 \cdot K_I'} \right) \cdot \left(\frac{k_2 \cdot c_{E0} \cdot c_S}{1 + \frac{c_S}{K_S} + \frac{c_S \cdot c_I}{K_S \cdot K_I'}} \right) \quad [6]$$

Poměr rychlostních konstant k_6/k_2 označíme jako β a rovnici [6] upravíme do tvaru rovnice Michaelise a Mentenové:

$$v_i = \frac{v'_{\max} \cdot c_S}{K'_M + c_S} \quad [7]$$

kde

$$v'_{\max} = k_2 \cdot c_{E0} \cdot \frac{K_I' + \beta \cdot c_I}{K_I' + c_I} \cdot K_S = v_{\max} \cdot \frac{K_I' + \beta \cdot c_I}{K_I' + c_I} \quad [8]$$

($k_2 \cdot c_{E0} = v_{\max}$ neinhibované reakce; protože $\beta < 1$, je $v'_{\max} < v_{\max}$) a

$$K'_M = \frac{K_I'}{K_I' + c_I} \cdot K_S = \frac{K_I'}{K_I' + c_I} \cdot K_M \quad [9]$$

Abychom mohli ověřit platnost navrhovaného mechanismu, převedeme rovnici [7] na lineární tvar

1. podle [Lineweavera a Burka](#)

$$\frac{1}{v_i} = \frac{1}{v'_{\max}} + \frac{K'_M}{v'_{\max}} \cdot \frac{1}{c_S} = \frac{K_I' + c_I}{v_{\max} \cdot (K_I' + \beta \cdot c_I)} + \frac{K_S \cdot K_I'}{v_{\max} \cdot (K_I' + \beta \cdot c_I)} \cdot \frac{1}{c_S} \quad [10]$$

2. podle [Hanese](#)

$$\frac{c_S}{v_i} = \frac{K'_M}{v'_{\max}} + \frac{1}{v'_{\max}} \cdot c_S = \frac{K_S \cdot K_I'}{v_{\max} \cdot (K_I' + \beta \cdot c_I)} + \frac{K_I' + c_I}{v_{\max} \cdot (K_I' + \beta \cdot c_I)} \cdot c_S \quad [11]$$

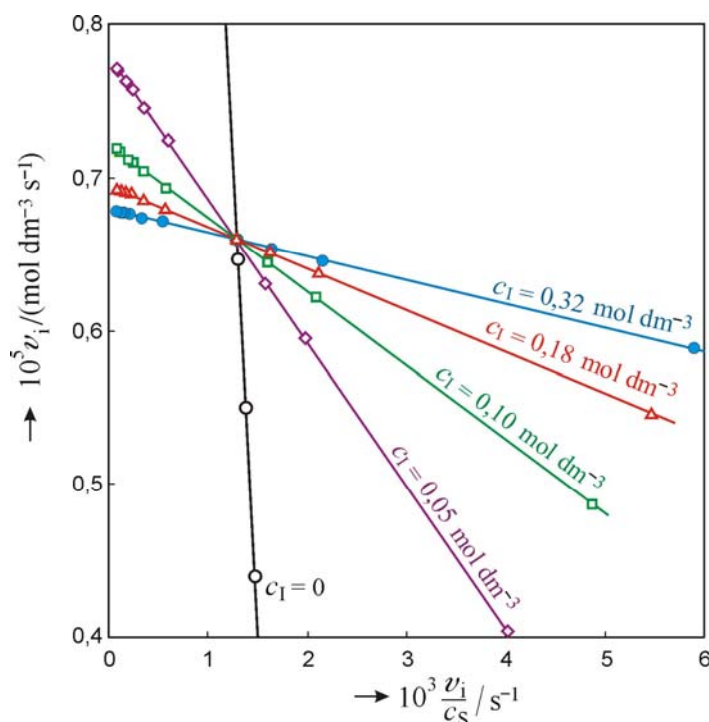
3. nebo podle [Eadiea](#)

$$v_i = v'_{\max} - K'_M \cdot \frac{v_i}{c_S} = v_{\max} \cdot \frac{K_I' + \beta \cdot c_I}{K_I' + c_I} - \frac{K_I' \cdot K_S}{K_I' + c_I} \cdot \frac{v_i}{c_S} \quad [12]$$

Zvolíme např. třetí způsob. Do grafu ([obr. 9-14](#)) vyneseme hodnoty rychlostí v_i (v mol dm⁻³ s⁻¹) proti poměru v_i/c_S (s⁻¹) pro různé koncentrace inhibitoru.

Korelace pomocí rovnice [12]

$c_1 = 0$		$c_1 = 0,05$		$c_1 = 0,10$		$c_1 = 0,18$		$c_1 = 0,32$	
$10^5 v_i$	$10^3 \frac{v_i}{c_S}$	$10^5 v_i$	$10^3 \frac{v_i}{c_S}$	$10^5 v_i$	$10^3 \frac{v_i}{c_S}$	$10^5 v_i$	$10^3 \frac{v_i}{c_S}$	$10^5 v_i$	$10^3 \frac{v_i}{c_S}$
0,169	1,6900	0,403	4,0300	0,487	4,8700	0,546	5,4600	0,589	5,8900
0,440	1,4667	0,595	1,9833	0,622	2,0733	0,637	2,1233	0,646	2,1533
0,550	1,3750	0,630	1,5750	0,644	1,6100	0,651	1,6275	0,654	1,6350
0,647	1,2940	0,657	1,3140	0,658	1,3160	0,659	1,3180	0,659	1,3180
1,100	0,9167	0,723	0,6025	0,694	0,5783	0,680	0,5667	0,671	0,5592
1,375	0,6875	0,745	0,3725	0,705	0,3525	0,686	0,3430	0,674	0,3370
1,570	0,5233	0,756	0,2520	0,710	0,2367	0,689	0,2297	0,676	0,2253
1,690	0,4225	0,762	0,1905	0,713	0,1783	0,690	0,1725	0,677	0,1693
1,860	0,2862	0,768	0,1182	0,717	0,1103	0,692	0,1065	0,678	0,1043
1,930	0,2706	0,771	0,0907	0,718	0,0845	0,693	0,0815	0,678	0,0798



Obr. 9-14 Korelace pomocí rovnice (12)

Souřadnice průsečíku všech přímek, $[1,28 \cdot 10^{-3}; 0,66 \cdot 10^{-5}]$ souhlasí s teoretickými hodnotami $[v_{\max} (1-\beta)/K_M; \beta v_{\max}]$ pro částečně akompetitivní inhibici (viz obr. 9-9d)

Z obr. 9-14 je patrné, že rovnice [12] velmi dobře vyhovuje experimentálním datům a charakter závislostí odpovídá *částečně akompetitivní inhibici* (srovnej obr. 9-9d).

Lineární regresí byly pro jednotlivé koncentrace inhibitoru zjištěny tyto rovnice přímkových závislostí v_i na v_i/c_S :

pro $c_1 = 0$ (neinhibovaná reakce) $v_i = 2,2179 \cdot 10^{-5} - 1,2145 \cdot 10^{-2} \cdot (v_i/c_S)$ [13]

pro $c_1 = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ $v_i = 7,7934 \cdot 10^{-6} - 9,3451 \cdot 10^{-4} \cdot (v_i/c_S)$ [14]

pro $c_1 = 0,10 \text{ mol dm}^{-3}$ $v_i = 7,2184 \cdot 10^{-6} - 4,8237 \cdot 10^{-4} \cdot (v_i/c_S)$ [15]

pro $c_1 = 0,18 \text{ mol dm}^{-3}$ $v_i = 6,9515 \cdot 10^{-6} - 2,7313 \cdot 10^{-4} \cdot (v_i/c_S)$ [16]

pro $c_1 = 0,32 \text{ mol dm}^{-3}$ $v_i = 6,7937 \cdot 10^{-6} - 1,5371 \cdot 10^{-4} \cdot (v_i/c_S)$ [17]

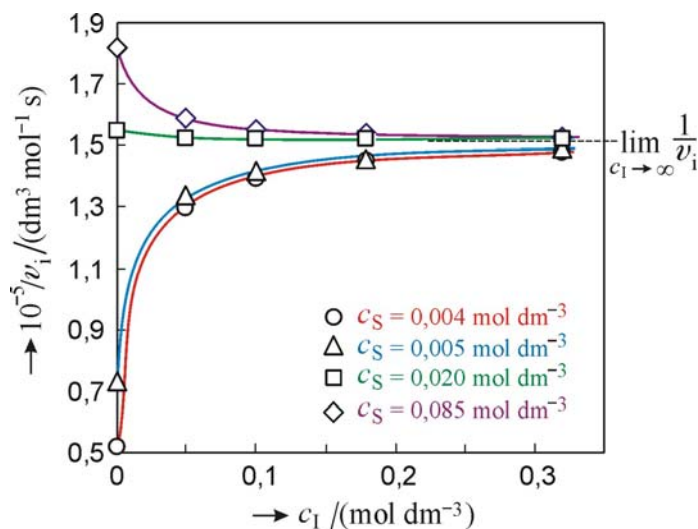
Tento předpoklad potvrdíme ještě konstrukcí Dixonova grafu (tj. vynesení hodnot $1/v_i$ proti c_1 pro různé hodnoty c_S) – obr. 9-15).

Obr. 9-15 Dixonův graf

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K'_I \cdot (K_M + c_S) + c_I \cdot c_S}{v_{\max} \cdot c_S \cdot (K'_I + \beta \cdot c_I)} \quad [18]$$

$$\lim_{c_I \rightarrow 0} \frac{1}{v_i} = \frac{1}{v_{\max} \cdot \beta} = \frac{1}{0,3 \cdot 2,2 \cdot 10^{-5}} = 1,515 \cdot 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}$$

Hyperbolický tvar závislosti potvrzuje, že jde o *inhibici částečně akompetitivní*. Pro plně akompetitivní inhibici by závislost byla lineární.



Kinetické parametry K_M , v_{\max} a K'_M , v'_{\max}

zjistíme porovnáním rovnice Michaelise a Mentenové linearizované podle Eadie (rovnice [12]) s rovnicemi [13] až [17], jejichž směrnice jsou rovny K_M , resp. K'_M a úseky na svislé ose jsou rovny v_{\max} , resp. v'_{\max} :

Pro $c_I = 0$ (neinhibovaná reakce) tak dostaneme

$$v_{\max} = 2,2179 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1} \quad \text{a} \quad K_M = 1,2145 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$$

Pro reakce za přítomnosti inhibitoru v různých koncentracích mají kinetické parametry tyto hodnoty:

c_I mol dm ⁻³	v'_{\max} mol dm ⁻³ s ⁻¹	K'_M mol dm ⁻³
0,05	$7,7934 \cdot 10^{-6}$	$9,3451 \cdot 10^{-4}$
0,10	$7,2184 \cdot 10^{-6}$	$4,8237 \cdot 10^{-4}$
0,18	$6,9515 \cdot 10^{-6}$	$2,7313 \cdot 10^{-4}$
0,32	$6,7937 \cdot 10^{-6}$	$1,5371 \cdot 10^{-4}$

Konstantu K'_I

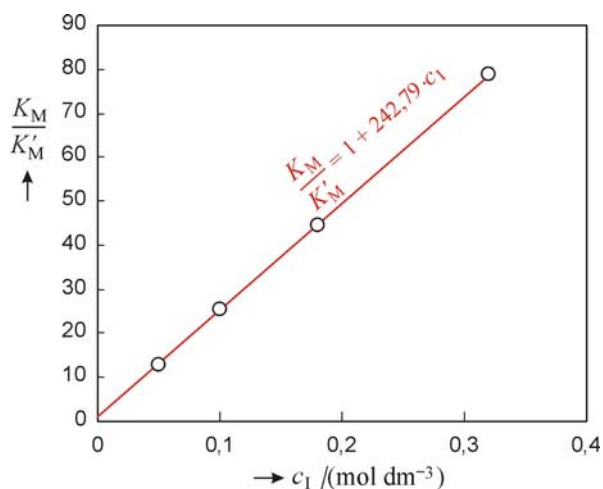
vypočítáme ze známých hodnot K_M a K'_M při různých koncentracích inhibitoru. Vztah [9] upravíme do lineárního tvaru

$$\frac{K_M}{K'_M} = 1 + \frac{1}{K'_I} \cdot c_I \quad [19]$$

a konstantu K'_I určíme jako reciprokou hodnotu směrnice přímky (obr. 9-16)

$$\frac{K_M}{K'_M} = 1 + 242,79 \cdot c_I \quad [20]$$

$$K'_I = 4,19 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$$



Obr. 9-16 Stanovení K'_I

Poměr rychlostních konstant, $k_6/k_2 = \beta$

vyjádříme ze vztahu [8]:

$$\beta = \frac{v'_{\max}}{v_{\max}} \cdot \left(\frac{K'_I}{c_I} + 1 \right) - \frac{K'_I}{c_I} \quad [21]$$

Průměrná hodnota poměru rychlostních konstant, vypočtená z hodnot v_{\max} a v'_{\max} pro jednotlivé koncentrace inhibitoru (viz předcházející tabulku) je

$$\beta = 0,35$$