



KINETYKA REAKCJI ENZYMATYCZNYCH

Wyznaczenie stałej Michaelisa i maksymalnej szybkości reakcji hydrolizy sacharozy katalizowanej przez inwertazę.

(Chemia Fizyczna I)

Maria Bełtowska-Brzezinska, Karolina Michalska

Wydział Chemii UAM



Poznań 2010

Zagadnienia: Podstawowe pojęcia kinetyki chemicznej (szybkość reakcji, reakcje elementarne, cząsteczkowość i rząd reakcji). Równania kinetyczne prostych reakcji zerowego i pierwszego rzędu oraz reakcji następczych, z etapem odwracalnym poprzedzającym etap nieodwracalny. Energia aktywacji. Mechanizm i kinetyka mikroheterogenicznych reakcji katalitycznych.

1. Wprowadzenie.

Rolę katalizatora w szeregu reakcji chemicznych, w tym w układach biologicznych, pełnią enzymy. Działanie enzymów, tak jak i wszystkich innych katalizatorów, polega na obniżeniu energii aktywacji, w wyniku czego szybkość przejścia od substratów do produktów jest wielokrotnie większa niż przy braku katalizatora. Nie zmienia się przy tym stan równowagi w reakcjach odwracalnych, gdyż enzym przyspiesza w jednakowym stopniu reakcje biegnące w obu kierunkach.

Warunkiem katalizy enzymatycznej jest związanie substratu (S) w tak zwanym miejscu aktywnym enzymu (E) poprzez oddziaływania będące kombinacją wiązań wodorowych, sił elektrostatycznych oraz sił van der Waalsa. Istotne jest przy tym wzajemne dopasowanie struktury miejsca aktywnego i cząsteczek substratu.

Stężenie enzymu pozostaje niezmiennie stałe podczas reakcji. W wielu enzymach nie zmieniają się też właściwości ich miejsc aktywnych po związaniu cząsteczek substratu. W miarę zwiększania stężenia substratu, w warunkach jego nadmiaru w stosunku do stężenia enzymu, stwierdza się początkowo liniowy wzrost szybkości katalizowanej reakcji, po czym szybkość reakcji dąży do wartości maksymalnej – patrz rys.1. Takiej charakterystyce kinetycznej odpowiada modelowy mechanizm Michaelisa-Menten, przedstawiony za pomocą następującego schematu:



gdzie k_1 , k_{-1} , k_2 – stałe szybkości odpowiednich reakcji.

W pierwszym etapie enzym (E) przyłącza substrat (S) w miejscu aktywnym tworząc ze stałą szybkości k_1 kompleks przejściowy enzym-substrat (ES). Kompleks ten dysocjuje częściowo do enzymu i substratu, ze stałą szybkości k_{-1} i jednocześnie ulega nieodwracalnemu przekształceniu w produkt (P) ze stałą szybkości k_2 , przy czym uwalnia się enzym. Uwolnione miejsce aktywne enzymu może ponownie wiązać i aktywować następne cząsteczki substratu. Zatem szybkość reakcji enzymatycznej (v), równa szybkości tworzenia (przyrostu stężenia) produktu reakcji ([P]), jest wprost proporcjonalna do chwilowego stężenia kompleksu substratu z enzymem ([ES]):

$$v = d[P]/dt = k_2 \cdot [ES] \quad (2)$$

Związek między stężeniem kompleksu enzym-substrat [ES] a stężeniem wolnego enzymu ([E]) i wolnego substratu ([S]) można określić stosując przybliżenie stanu stacjonarnego, to jest przyjmując założenie o jednakowej szybkości tworzenia i rozpadu takiego kompleksu. Oznacza to bliską zeru szybkość zmiany stężenia kompleksu enzym-substrat, a więc stałe (stacjonarne) jego stężenie w czasie reakcji:

$$d[ES]/dt = k_1 \cdot [E] \cdot [S] - k_{-1} \cdot [ES] - k_2 \cdot [ES] = 0 \quad (3)$$

Jeżeli całkowite stężenie enzymu ($[E]_0$) jest znacznie mniejsze od całkowitego stężenia substratu ($[S]_c$), $[E]_0 \ll [S]_c$, to stężenie substratu związanego z enzymem jest znacznie mniejsze od stężenia wolnego substratu: $[ES] \ll [S]$. W rezultacie stężenie wolnego substratu w trakcie reakcji praktycznie nie różni się od całkowitego stężenia substratu: $[S] \approx [S]_c$. Natomiast większość miejsc aktywnych enzymu zostaje związana w kompleks z substratem i stężenie wolnego enzymu [E] jest równe różnicy między całkowitym stężeniem enzymu i stężeniem kompleksu enzym-substrat:

$$[E] = [E]_0 - [ES] \quad (4)$$

Podstawienie prawej strony wyrażenia (4) do równania (3) daje:

$$k_1 \cdot [S] \cdot ([E]_0 - [ES]) - k_{-1} \cdot [ES] - k_2 \cdot [ES] = 0 \quad (5)$$

skąd wynika następująca zależność między stężeniem kompleksu enzym-substrat a całkowitym stężeniem enzymu i substratu w rozważanym układzie:

$$[ES] = [E]_0 \frac{k_1 \cdot [S]}{k_1 \cdot [S] + k_{-1} + k_2} \quad (6)$$

Po podzieleniu licznika oraz mianownika przez k_1 i po wprowadzeniu stałej Michaelisa: $K_M = (k_{-1} + k_2) / k_1$, wzór (6) ulega przekształceniu do postaci:

$$[ES] = [E]_0 \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (6a)$$

Z kombinacji równań (2) (6) i (6a) otrzymujemy ostatecznie równanie Michaelisa-Menten opisujące zależność między szybkością reakcji enzymatycznej a całkowitym stężeniem substratu i enzymu:

$$v = k_2 \cdot [E]_0 \frac{k_1 \cdot [S]}{k_1 \cdot [S] + k_{-1} + k_2} = k_2 \cdot [E]_0 \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (7)$$

Należy oczekiwać, że jeżeli całkowite stężenie substratu będzie znacznie większe od wartości stałej Michaelisa ($[S] \gg K_M$) i tym samym $[S]/([S] + K_M) \approx 1$, to wszystkie miejsca aktywne enzymu będą zajęte przez substrat i szybkość reakcji enzymatycznej osiągnie wartość maksymalną ($v_{\max}$), niezależną od stężenia substratu:

$$v_{\max} = k_2 \cdot [E]_0 \quad (8)$$

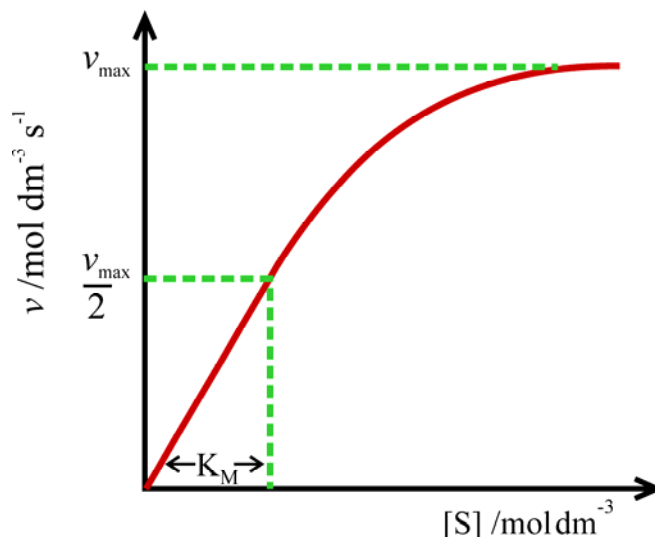
Oznacza to, że o maksymalnej wartości szybkości reakcji enzymatycznej decyduje całkowite stężenie enzymu i stała szybkości rozpadu kompleksu enzym-substrat do produktu. Wartość $v_{\max}$ ujawnia tak zwaną liczbę obrotów enzymu. Pojęciem tym przyjęto określać liczbę cząsteczek substratu przekształconych w produkt reakcji w jednostce czasu przez enzym o jednostkowym stężeniu, w warunkach pełnego wysycenia enzymu przez substrat. Liczba obrotów enzymu jest równa wartości stałej szybkości $k_2 = v_{\max} / [E]_0$. Dla większości enzymów w środowisku fizjologicznym jest ona zawarta w granicach 1 do 10^4 s^{-1} . Jest oczywiste, że każdy cykl katalizy następuje w czasie równym $1 / k_2$.

Przy uwzględnieniu zależności (8), równanie Michaelisa-Menten (7) przyjmuje postać:

$$v = v_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (9)$$

Z ostatniego równania (9) wynika sens fizyczny stałej Michaelisa, K_M . Zauważamy, że jeżeli $[S] = K_M$, to wtedy $v = v_{\max} / 2$. Zatem stała K_M jest liczbowo równa takiemu stężeniu substratu, przy którym szybkość reakcji enzymatycznej osiąga połowę wartości maksymalnej, charakterystycznej dla danej wartości stężenia $[E]_0$. Pokazuje to wyraźnie rys.1. Jeżeli natomiast stężenie substratu jest małe, $[S] \ll K_M$, to tylko część miejsc aktywnych enzymu uczestniczy w tworzeniu kompleksu z substratem. Reakcja przebiega wtedy jako pierwszego rzędu względem substratu, przy czym eksperymentalnie wyznaczona stała szybkości (k_{eksp}) jest określona przez wartość ilorazu (k_2 / K_M) i przez stężenie całkowite enzymu $[E]_0 = \text{const}$:

$$v = v_{\max} \cdot [S] / K_M = \frac{k_2}{K_M} \cdot [E]_0 \cdot [S] = k_{\text{eksp}} [S] \quad (10)$$

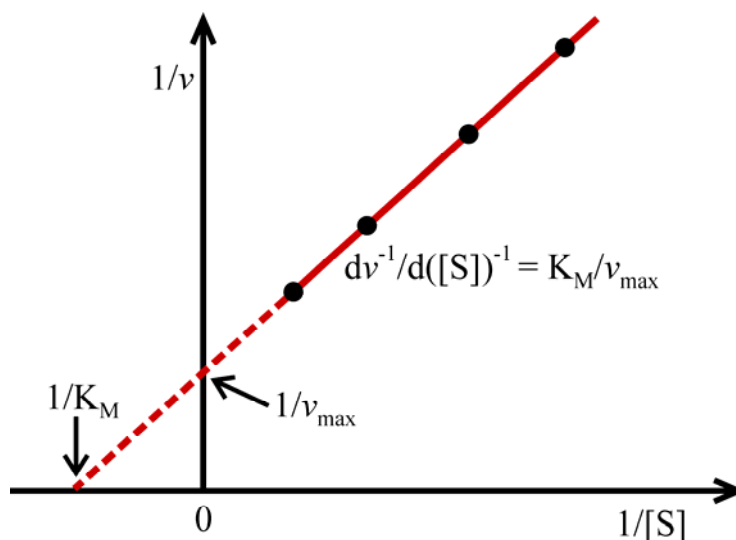


Rys. 1. Zależność szybkości reakcji enzymatycznej (v) od stężenia substratu ($[S]$) przy stałym stężeniu enzymu, $[E]_0 \ll [S]$ (według równania Michaelisa-Menten (9)) [1].

Analizę danych doświadczalnych, zgodnie z propozycją Lineweavera-Burka, przeprowadza się po przedstawieniu równania Michaelisa-Menten (9) w postaci odwrotności, skąd wynika liniowa zależność ($y = ax + b$) między odwrotnością szybkości tworzenia produktu ($y = 1/v$) a odwrotnością stężenia substratu ($x = 1/[S]$):

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{\max}} + \frac{K_M}{v_{\max}} \frac{1}{[S]} \quad (11)$$

Jak widać na rys. 2, punkt przecięcia prostej z osią rzędną ($y = 1/v$) przy $1/[S] = 0$ wyznacza wartość odwrotności maksymalnej szybkości reakcji przy $[E]_0 = \text{const}$: $b = 1/v_{\max}$ [$\text{dm}^3 \text{s mol}^{-1}$]. Z kolei ze współczynnika kierunkowego prostej względem osi odciętych: $a = K_M/v_{\max}$ [s] można obliczyć wartość stałej K_M [mol dm^{-3}].



Rys. 2. Zależność odwrotności szybkości reakcji enzymatycznej od odwrotności stężenia substratu przy stałym stężeniu enzymu (wykres Lineweavera-Burka dla reakcji przebiegających według mechanizmu Michaelisa-Menten) [1].

2. Wykonanie ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest wyznaczenie parametrów kinetycznych (stałej Michaelisa i maksymalnej szybkości) reakcji hydrolizy sacharozy do glukozy i fruktozy, katalizowanej przez inwertazę drożdżową (sacharazę). Inwertaza, należąca do hydrolaz, ułatwia rozerwanie wiązania glikozydowego w sacharozie działając optymalnie przy pH około 4,7. Enzym jest nieaktywny przy $\text{pH} \geq 10$. Zatem przez podwyższenie pH roztworu można przerwać przebieg reakcji hydrolizy sacharozy i oznaczyć stężenie jej produktów.

Katalizowaną enzymatycznie reakcję hydrolizy sacharozy prowadzimy w roztworach tego związku o różnym stężeniu początkowym, jednak zawsze w warunkach dużego nadmiaru substratu w stosunku do enzymu o stałym stężeniu całkowitym, $[E]_0$. W związku z tym stężenie wolnego substratu w trakcie reakcji praktycznie nie różni się od całkowitego stężenia substratu: $[S] \approx [S]_c$. W czasie reakcji (Δt) maleje stężenie sacharozy, a produktami reakcji są glukoza (G) i fruktoza (F) o jednakowym stężeniu. Przy tym przyrost stężenia glukozy (względnie fruktozy) jest równy ubytkowi stężenia sacharozy w danym okresie czasu (patrz równanie reakcji hydrolizy sacharozy w opisie ćwiczenia pt. „Kinetyka inwersji sacharozy”). Dla każdego roztworu wyznaczamy początkową szybkość hydrolizy sacharozy, wyrażając ją przez stosunek skończonych przyrostów stężenia produktu: glukozy (ΔG) lub fruktozy (ΔF) do czasu upływającego od momentu rozpoczęcia reakcji do jej przzerwania (Δt): $v = \Delta[G]/\Delta t = \Delta[F]/\Delta t$.

Korzystamy z metody spektrofotometrycznej do oznaczenie stężenia glukozy, przy zastosowaniu odczynnika dinitrosalicylowego o pH = 13,5 (0,04 mol/dm³ kwas 3,5-dinitrosalicylowy + 0,5 mol/dm³ NaOH + 1,43 mol/dm³ winian sodowo-potasowy). W środowisku zasadowym glukoza redukuje anion 3,5-dinitrosalicylowy (o jasno żółtym zabarwieniu) do anionu 3-amino-5-nitrosalicylowego (o zabarwieniu brunatnym), a sama utlenia się do kwasu glukonowego (bezbarnego). Ponieważ fruktoza w obecności jonów hydroksylowych ulega izomeryzacji do glukozy, to stężenie intensywnie barwnego anionu 3-amino-5-nitrosalicylowego, tworzącego się po dodaniu odczynnika dinitrosalicylowego do mieszaniny glukozy z fruktozą, jest równe sumarycznemu stężeniu obu tych cukrów. Wzorcowa zależność między mierzoną absorbancją a stężeniem cukrów jest określana na podstawie danych eksperymentalnych otrzymanych dla szeregu roztworów o znanym sumarycznym stężeniu glukozy i fruktozy, przy stałym stężeniu odczynnika dinitrosalicylowego.

2.1. Wyznaczenie absorbancji roztworu odczynnika dinitrosalicylowego w obecności glukozy i fruktozy o znanym stężeniu.

Odczynniki:

1. Roztwór wzorcowy: 0,005 mol/dm³ glukozy + 0,005 mol/dm³ fruktozy w wodzie.
2. Bufor o pH = 4,78 według Brittona i Robinsona.
3. Odczynnik dinitrosalicylowy (0,04 mol/dm³ kwas 3,5-dinitrosalicylowy + 0,5 mol/dm³ NaOH + 1,43 mol/dm³ winian sodowo-potasowy), pH = 13,5.

Metodyka:

W probówkach 1 do 8 sporządzamy kolejne roztwory wzorcowe o objętości 2 cm³ zawierające rosnące stężenie glukozy ($[G]_{wz}$) i fruktozy ($[F]_{wz}$). Probówka 9 będzie zawierać roztwór odniesienia niezbędny w pomiarach absorbancji. Objętości odczynników wlewanych do kolejnych probówek podane są w tabeli 1.

Tabela 1

nr próbówki	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Ilości odczynników w cm ³								
roztwór wzorcowy	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	-
woda	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	1,0
bufor o pH = 4,78	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
sumaryczne stężenie glukozy i fruktozy $[G]_{wz} + [F]_{wz}$ [mol dm ⁻³] w próbach wzorcowych o objętości 2 cm ³									
$A_{\lambda=550nm}^{wz}$									

Następnie do wszystkich probówek dodajemy po 2 cm³ odczynnika dinitrosalicylowego i po dokładnym wymieszaniu wstawiamy na 10 minut do łaźni wodnej o temperaturze bliskiej 100° C. W tej temperaturze odpowiednio szybko zachodzi reakcja między anionem 3,5-dinitrosalicylowym a glukozą, jak również transformacja fruktozy do glukozy.

Po wyjęciu z łaźni wodnej i oziębieniu do temperatury pokojowej (około 20 minut) wszystkie roztwory uzupełniamy wodą destylowaną do 8 cm³ i ponownie dokładnie mieszamy. Po tej czynności, przy długości fali $\lambda = 550$ nm wykonujemy pomiar absorbancji ($A_{\lambda=550nm}^{wz}$) dla kolejnych roztworów (1 do 8) względem roztworu odniesienia (9). (Alternatywą jest wykonanie pomiarów absorbancji roztworów 1 do 9 względem wody).

Sporządzamy wykres, przedstawiający zależność zmierzonej absorbancji ($A_{\lambda=550\text{nm}}^{\text{wz}}$) od sumarycznego stężenia glukozy i fruktozy ($[G]_{\text{wz}} + [F]_{\text{wz}}$) w roztworach wzorcowych (1 do 8) o objętości 2 cm³ (przed rozcieńczeniem do objętości 8 cm³, poprzedzającym pomiar absorbancji). Zgodnie z prawem Lamberta-Beera i prawem addytywności absorbancji otrzymaną liniową zależność wzorcową opisuje równanie $y = a_{\text{wz}}x + b_{\text{wz}}$, gdzie $y = A_{\lambda=550\text{nm}}^{\text{wz}}$; $x = ([G]_{\text{wz}} + [F]_{\text{wz}})$.

Wyznaczamy współczynnik kierunkowy regresji liniowej: $a_{\text{wz}} = A_{\lambda=550\text{nm}}^{\text{wz}} / ([G]_{\text{wz}} + [F]_{\text{wz}})$ [mol⁻¹ dm³] oraz wyraz wolny b_{wz} , określony przez wartość absorbancji roztworu odniesienia.

Uwaga: Kuwety stosowane w pomiarach absorbancji należy umieszczać w komorze spektrofotometru w taki sposób, aby na drodze promieniowania znajdowała się ściana kuwety oznaczona strzałką. Po wprowadzeniu kuwety z roztworem odniesienia (lub z wodą) należy aparat wyzerować (przycisk „zero” na płycie czołowej). Następnie na drodze promieniowania umieszczamy kuwetę z badanym roztworem (np. 1) i odczytujemy wartość absorbancji. Czynności powtarzamy - zawsze mierzymy absorbancję roztworów wzorcowych po wyzerowaniu spektrofotometru dla roztworu odniesienia (lub dla wody). Trzeba pamiętać, że wprawdzie w komorze jednowiązkowego spektrofotometru znajduje się kilka stanowisk dla kuwet, lecz zawsze tylko jedno z nich znajduje się na drodze promieniowania.

2.2. Wyznaczenie parametrów kinetycznych (stałej Michaelisa i maksymalnej szybkości) reakcji hydrolizy sacharozy katalizowanej przez invertazę.

Odczynniki:

1. Roztwór 0,1 mol/dm³ sacharozy rozpuszczonej w buforze o pH = 4,78 (należy przygotować 25 cm³).
2. Bufor o pH = 4,78 według Brittona i Robinsona (0,03 mol/dm³ H₃BO₃ + 0,03 mol/dm³ H₃PO₄ + 0,03 mol/dm³ CH₃COOH + 0,049 NaOH mol/dm³).
3. Odczynnik dinitrosalicylowy (0,04 mol/dm³ kwas 3,5-dinitrosalicylowy + 0,5 mol/dm³ NaOH + 1,43 mol/dm³ winian sodowo-potasowy), pH = 13,5.
4. Roztwór invertazy (nr. kat.14504 f-my Sigma).

Metodyka:

W próbkach 1a do 8a przygotowujemy kolejne roztwory sacharozy, w których będzie przeprowadzana reakcja hydrolizy w obecności invertazy. Objętości odczynników wprowadzanych do próbek podane są w tabeli 2.

Tabela 2

	1a	2a	3a	4a	5a	6a	7a	8a
	Ilości odczynników w cm ³							
roztwór 0,1 mol/dm ³ sacharozy w buforze o pH 4,78	0,1	0,15	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,8
bufor o pH 4,78	0,9	0,85	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,2
początkowe stężenie sacharozy [S] _c w roztworach o objętości 2 cm ³ [mol dm ⁻³]								
1/[S] ₀ [mol ⁻¹ dm ³]								
$A_{\lambda=550\text{nm}}$								
sumaryczne stężenie produktów po hydrolizie sacharozy w roztworach o objętości 2 cm ³ $\Delta[G] + \Delta[F]$ [mol dm ⁻³]								
stężenie glukozy po hydrolizie w roztworach o objętości 2 cm ³ $\Delta[G]$ [mol dm ⁻³]								
$v = (\Delta[G] / \Delta t)$ [mol dm ⁻³ s ⁻¹]								
(1/v) [mol ⁻¹ dm ³ s ¹]								

Ponadto w próbówce oznaczonej jako 9a sporządzamy roztwór odniesienia (niezbędny w pomiarach absorbancji po zakończeniu reakcji hydrolizy sacharozy) wlewając do niej 1 cm³ roztworu buforowego, 2 cm³ odczynnika dinitrosalicylowego i 5 cm³ wody.

W osobnym naczyniu przygotowujemy roztwór enzymu w ilości potrzebnej do wykonania doświadczenia (uwaga: pobrany z lodówki roztwór inwertazy o stężeniu 0,004 mg/cm³ rozcieńczamy, np. w stosunku 2,5 cm³ roztworu enzymu i 7,5 cm³ wody, po czym dokładnie mieszamy).

Zawartość próbek 1a do 8a zawierających sacharozę oraz próbkę 9a z roztworem odniesienia, a także naczynie z rozcieńczonym roztworem enzymu termostatujemy w temperaturze 37°C przez 15 minut. Po tym czasie, w próbkach 1a do 8a inicjujemy katalizowaną enzymatycznie reakcję hydrolizy sacharozy dodając w jednakowych odstępach czasu (np. co 1 minutę) po 1 cm³ roztworu inwertazy (1 cm³ enzymu dodajemy do próbki 1a, po 1 minucie dodajemy 1 cm³ roztworu enzymu do próbki 2a, po następnej 1 minucie do próbki 3a, itd.). Po dodaniu enzymu należy każdy roztwór dokładnie wymieszać i pozostawić w termostacie. Zauważamy, że hydroliza sacharozy zachodzi w roztworach o objętości 2 cm³.

Reakcję hydrolizy sacharozy w obecności inwertazy prowadzimy przez 10 minut ($\Delta t = 600$ s). Oznacza to, że po upływie 10 minut od dodania enzymu do próbki 1a należy dodać do niej 2 cm³ odczynnika dinitrosalicylowego i roztwór dokładnie wymieszać, po czym kolejno, co 1 minutę, należy dodawać 2 cm³ tego odczynnika do pozostałych próbek (do 8a włącznie) i zawartość dokładnie wymieszać. W ten sposób przerywamy reakcję hydrolizy i jednocześnie inicjujemy reakcję glukozy z anionem 3,5-dinitrosalicylowym oraz izomeryzację fruktozy do glukozy.

Następnie roztwory zawierające sacharozę (1a do 8a) oraz roztwór odniesienia (9a) przenosimy do łaźni wodnej i ogrzewamy przez 10 minut w temperaturze około 100°C, co zapewnia odpowiednią szybkość reakcji między anionem 3,5-dinitrosalicylowym a glukozą, jak również reakcji transformacji fruktozy do glukozy.

Po wyjęciu z łaźni wodnej i oziębieniu do temperatury pokojowej (około 20 minut) wszystkie roztwory (1a do 9a) uzupełniamy wodą destylowaną do 8 cm³. Zawartość próbek dokładnie mieszamy i przy długości fali $\lambda = 550$ nm wykonujemy pomiar absorbancji ($A_{\lambda=550\text{nm}}$), zawsze względem roztworu odniesienia zawartego w próbce 9a. (Alternatywą jest wykonanie pomiarów absorbancji wszystkich roztworów, 1a do 9a, względem wody).

Korzystając ze spektrofotometru jednowiązkowego należy aparat wyzerować po umieszczeniu kuwety z roztworem odniesienia (lub z wodą) na drodze promieniowania. Następnie na drogę promieniowania wprowadzamy kuwetę z odpowiednim roztworem badanym (np. 1a) i odczytujemy wartość jego absorbancji. Czynności powtarzamy dla kolejnych roztworów badanych (2a; 3a itd.) pamiętając o konieczności zerowania spektrofotometru.

Uwaga: Zastosowanie takiego samego roztworu odniesienia, zawierającego odczynnik dinitrosalicylowy bez sacharozy, w pomiarach absorbancji kolejnych roztworów (1a do 8a) po hydrolizie sacharozy katalizowanej przez inwertazę przy pH = 4,78 jest możliwe dzięki temu, że stała szybkości hydrolizy sacharozy przy tym samym pH lecz bez enzymu jest o kilka rzędów wielkości mniejsza.

Opracowanie wyników:

Określamy sumaryczny przyrost stężenia glukozy i fruktozy ($\Delta([G] + \Delta[F])$) tworzących się w czasie (Δt) hydrolizy sacharozy katalizowanej przez inwertazę w roztworach 1a do 8a o objętości 2 cm³. Korzystamy przy tym z wcześniej wyznaczonej (dla danego spektrofotometru) liniowej zależności między absorbancją ($A_{\lambda=550\text{nm}}^{\text{wz}}$) roztworów wzorcowych (1 do 8) a sumarycznym stężeniem glukozy i fruktozy w tych roztworach ($[G]_{\text{wz}} + [F]_{\text{wz}}$) o objętości 2 cm³ (przed rozcieńczeniem do objętości 8 cm³).

Ponieważ pomiar absorbancji roztworów badanych po katalizowanej enzymatycznie hydrolizie sacharozy ($A_{\lambda=550\text{nm}}$) jest poprzedzony takim samym ich rozcieńczeniem jak w przypadku roztworów wzorcowych, to zatem sumaryczne stężenie glukozy i fruktozy w próbach 1a do 8a można obliczyć wyrażenia:

$$(\Delta[G] + \Delta[F]) = \frac{(A_{\lambda=550\text{nm}} - b_{\text{wz}})}{a_{\text{wz}}} \quad (12)$$

gdzie a_{wz} oznacza współczynnik kierunkowy w liniowej zależności wzorcowej zaś b_{wz} to wyraz wolny w tej zależności (patrz rozdział 2.1).

Jest oczywistym, że zarówno przyrost stężenia glukozy jak i fruktozy jest równy połowie sumarycznego stężenia tych cukrów:

$$\Delta[G] = \Delta[F] = \frac{(\Delta[G] + \Delta[F])}{2} = \frac{(A_{\lambda=550\text{nm}} - b_{\text{wz}})}{2 \cdot a_{\text{wz}}} \quad (13)$$

Biorąc ten fakt pod uwagę, obliczamy szybkość katalizowanej enzymatycznie hydrolizy sacharozy w kolejnych badanych roztworach, definiowaną przez przyrost stężenia jednego z produktów w jednostce czasu:

$$v = \Delta[G]/\Delta t = \Delta[F]/\Delta t \quad (14)$$

Uwaga: Jeżeli wartość $A_{\lambda=550\text{nm}}$ będzie znacznie większa niż b_{wz} , to nie popełnimy większego błędu pomijając ten ostatni wyraz w obliczeniach wykonywanych przy użyciu równań 12 do 14.

W ostatnim etapie przeprowadzamy analizę danych zestawionych w tabeli 2 na podstawie równanie Lineweaver-Burka (11) i sporządzamy wykres we współrzędnych: $1/v$ od $1/[S]$. Korzystając z regresji liniowej, z parametru $b = 1/v_{\text{max}}$ [$\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}$] określonego przez punkt przecięcia linii prostej (przechodzącej przez punkty pomiarowe) z osią $y = 1/v$ przy $1/[S]_0 = 0$, wyznaczamy maksymalną szybkość reakcji enzymatycznej: $v_{\text{max}} = 1/b$ [$\text{mol dm}^{-3} \text{s}^{-1}$]. Z kolei ze współczynnika kierunkowego $a = K_M / v_{\text{max}}$ [s] obliczamy stałą Michaelisa:

$$K_M = a \cdot v_{\text{max}} = a/b \text{ ([s]/[mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s)] = [mol dm}^{-3}\text{]}).$$

Niepewność oznaczeń wynosi:

$$\Delta v_{\text{max}} = \left| \frac{\partial v_{\text{max}}}{\partial b} \right| \Delta b = \left| \frac{-1}{b^2} \right| \Delta b \text{ [mol dm}^{-3} \text{s}^{-1}] \text{ i } \Delta K_M = \left| \frac{\partial K_M}{\partial a} \right| \Delta a + \left| \frac{\partial K_M}{\partial b} \right| \Delta b = \left| \frac{1}{b} \right| \Delta a + \left| \frac{-a}{b^2} \right| \Delta b \text{ [mol dm}^{-3}\text{]}.$$

Literatura:

1. M. Bełtowska-Brzezinska - „Podstawy kinetyki chemicznej”, www.wbc.poznan.pl/publication/116021