

Soluzione preliminare del problema 10

Problema 10) Cinetica enzimatica



Domanda A)

(i) velocità di formazione di ES $v_1 = k_1 [E] [S]$

(ii) velocità di formazione di P $v_2 = k_2 [ES]$

Domanda B) Trovare un'espressione per [ES]

Dato che $[E_0] = [E] + [ES]$ e dato $K_m = (k_{-1} + k_2) / k_1$

Il sistema si trova in stato stazionario, quindi [ES] è costante nel tempo, cioè la velocità di formazione di [ES] è uguale alla sua velocità di distruzione.

$$v_1 = v_{-1} + v_2$$

$$k_1 [E] [S] = k_{-1} [ES] + k_2 [ES] \quad \text{dato che } [E] = [E_0] - [ES] \text{ si ha:}$$

$$k_1 ([E_0] - [ES]) [S] = [ES] (k_{-1} + k_2)$$

$$k_1 [E_0] [S] - k_1 [ES] [S] = [ES] (k_{-1} + k_2)$$

$$k_1 [E_0] [S] = [ES] (k_{-1} + k_2 + k_1 [S])$$

$$[ES] = \frac{k_1 [E_0] [S]}{k_{-1} + k_2 + k_1 [S]} \quad \text{Dividendo per } k_1 \text{ numeratore e denominatore:}$$

$$[ES] = \frac{[E_0] [S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]} \quad [ES] = \frac{[E_0] [S]}{K_m + [S]}$$

Domanda C) Trovare un'espressione per la velocità di formazione di P

Data l'espressione trovata prima $v_2 = k_2 [ES]$ sostituendo [ES] si ottiene:

$$v_2 = \frac{k_2 [E_0] [S]}{K_m + [S]}$$

Domanda D) dato che quando tutto l'enzima è legato al substrato si ottiene la massima velocità di reazione $v_{\max} = k_2 [E_0]$ si ha quindi

$$v_2 = \frac{v_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad \text{che rappresenta l'equazione di Michaelis Menten}$$

Domanda E)

la velocità di reazione iniziale è calcolata considerando lineare l'andamento della velocità nei primi secondi e calcolando un coefficiente di estinzione molare di $9 \cdot 10^{-3} \text{ Abs}/\mu\text{M}$

(200 μM) 86,0 $\Delta\text{Abs/s}$ $v = 9,56 \cdot 10^{-2} \mu\text{M/s}$

(150 μM) 75,5 $\Delta\text{Abs/s}$ $v = 8,39 \cdot 10^{-2} \mu\text{M/s}$

(100 μM) 67,3 $\Delta\text{Abs/s}$ $v = 7,48 \cdot 10^{-2} \mu\text{M/s}$

(80 μM) 63,0 $\Delta\text{Abs/s}$ $v = 7,00 \cdot 10^{-2} \mu\text{M/s}$

(60 μM) 55,0 $\Delta\text{Abs/s}$ $v = 6,11 \cdot 10^{-2} \mu\text{M/s}$

(40 μM) 39,3 $\Delta\text{Abs/s}$ $v = 4,37 \cdot 10^{-2} \mu\text{M/s}$

(20 μM) 31,5 $\Delta\text{Abs/s}$ $v = 3,50 \cdot 10^{-2} \mu\text{M/s}$

Domanda F) Trasformare l'equazione D) nella forma $y = mx + q$

$$v_2 = \frac{v_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad \text{trasformando questa equazione nel reciproco si ottiene:}$$

$$\frac{1}{v_2} = \frac{K_m + [S]}{v_{\max} [S]} \quad \text{da cui:}$$

$$\frac{1}{v_2} = \frac{K_m}{v_{\max} [S]} + \frac{[S]}{v_{\max} [S]} \quad \text{si ottiene infine:}$$

$$\frac{1}{v_2} = \frac{K_m}{v_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}} \quad \text{questa equazione è conosciuta come equazione dei doppi reciproci}$$

Domanda G) Determinare K_m e v_{\max}

Si devono calcolare i reciproci di ogni concentrazione e di ogni velocità date al punto E) e si devono porre in un grafico.

Il campione più diluito si discosta lievemente nei valori e fornisce $v_{\max} = 11,8 \cdot 10^{-2} \mu\text{M/s}$

Utilizzando per il calcolo i valori di $40 \mu\text{M}$ e $200 \mu\text{M}$ tra i quali l'andamento è più lineare, si ottiene $v_{\max} = 12,8 \cdot 10^{-2} \mu\text{M/s}$ e $K_m = 69,2 \mu\text{M}$

Il valore di velocità è espresso così per poterlo più facilmente confrontare con quelli dati al punto E)

Soluzione proposta da
prof. Mauro Tonellato
ITIS Natta di Padova