

TÉMA	ENZÝMY
<b>Úloha 30:</b>	<b>Vplyv koncentrácie substrátu na počiatočnú rýchlosť reakcie: určenie <math>V_{max}</math> a <math>K_m</math> pre štiepenie močoviny ureázou</b>
<b>Princíp:</b>	<p>Enzým ureáza (EC 3.5.1.5, <math>M_r = 480\,000</math> g/mol) katalyzuje hydrolytický rozklad močoviny. Vznikajúci amoniak vytvára vo vodnom prostredí amónne katióny, čo zvyšuje alkalitu roztoku:</p> $\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}_2 + 3 \text{H}_2\text{O} \xrightleftharpoons{\text{ureáza}} \text{CO}_2 + 2 \text{NH}_4^+ + 2 \text{OH}^-$ <p>Ak sa stitujú vznikajúce hydroxylové anióny kyselinou, možno po určitom čase pôsobenia enzýmu stanoviť začiatočnú rýchlosť reakcie. Pretože rýchlosť enzýmovej reakcie značne závisí od koncentrácie vodíkových iónov, <b>je potrebné pracovať pri konštantnom pH</b>. Stálosť pH sa dosiahne tlmivým roztokom a titrovaním nadbytočného amoniaku v priebehu reakcie na indikátor s pH prechodom okolo 6,8 (pH optimum enzýmu). Vo vhodnej dobe sa reakcia zastaví prídavkom roztoku ortuťnatých iónov, ktoré inhibujú enzým. Aby sa zabránilo vyzrážaniu bielkovín ortuťnatými iónmi, a tým zakaleniu titrovaného roztoku, pridávajú sa ortuťnaté ióny v prítomnosti chloridu amónneho. Titruje sa na indikátor prechodu 4,4 až 5,4 (pH roztoku chloridu amónneho). Rýchlosť reakcie katalyzovanej ureázou so stúpajúcou koncentráciou močoviny najskôr stúpa, pri vysokých koncentráciách však dochádza k poklesu reakčnej rýchlosti vplyvom inhibície enzýmu substrátom. Enzýmová reakcia sa robí pri laboratórnej teplote; je však potrebné vylúčiť akúkoľvek možnosť zmeny teploty roztoku (napr. zahriatie dotykom ruky).</p>
<b>Reagencie:</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1,44 % roztok močoviny</li> <li>2,5 % roztok močoviny</li> <li>roztok chloridu ortuťnatého s chloridom amónnym (0,2 % roztok <math>\text{HgCl}_2</math> zmiešať s rovnakým objemom nasýteného roztoku <math>\text{NH}_4\text{Cl}</math>. Pri pipetovaní používať bezpečnostnú pipetu s guľôčkou nad značkou!)</li> <li>roztok enzýmu (1 g čistenej ureázy – 150 jednotiek na 1 g – rozotrieť s malým množstvom rovnakých dielov glycerolu a 0,1 M fosforečnanového roztoku s pH 6,8. Doplniť zmesou glycerolu a fosforečnanového roztoku (1:1) do 100 ml a sfiltrovať cez skladaný filter. Roztok uchovávať v chladničke.)</li> <li>0,04 % roztok brómtymolovej modrej v etanole (pK 7,1; oblasť farebnej zmeny pH: 6,0 – 7,6)</li> <li>0,02 % roztok metylčervene v 50 % etanole (pK 4,95; oblasť farebnej zmeny pH: 4,2 – 6,3)</li> <li>0,04 % roztok brómkrezolovej zelenej v etanole (pK 4,68; oblasť farebnej zmeny pH: 3,8 – 5,4)</li> <li>0,03 M roztok kyseliny chlorovodíkovej</li> </ol>
<b>Materiál:</b>	byreta s objemom 25 ml, titračné banky (7 ks), sklenené pipety s nastavcom
<b>Postup:</b>	Najskôr byretu naplníme 0,03 M kyselinou chlorovodíkovou. Potom do troch titračných baniek označených S <sub>1</sub> (slepý pokus na prvé farebné porovnanie), S <sub>2</sub> (slepý pokus na druhé farebné porovnanie) a V (vzorka) napipetujeme po 2 ml roztoku ureázy a pridáme po 10 kvapiek brómtymolovej modrej. Do titračných baniek S <sub>1</sub> a S <sub>2</sub> pridáme po 10 ml destilovanej vody a obsah premiešame. Potom do titračnej banky V rýchlo pripipetujeme 10 ml 1,44 % roztoku močoviny, obsah premiešame a súčasne zaznamenáme čas. Keďže sa obsah titračnej banky

<p>V v priebehu reakcie farbí na modro (dochádza k zvyšovaniu pH vznikajúcimi amóniovými kationmi), pH udržiavame konštantné dotitrovaním pomocou HCl za stáleho miešania tak, aby obidva roztoky (<b>S<sub>1</sub></b> a <b>V</b>) mali rovnaké svetlozelené sfarbenie. <b>Presne po 6 minútach</b> čo najrýchlejšie pripipetujeme do titračnej banky <b>V</b> 1 ml roztoku chloridu ortuťnatého, čím zastavíme enzýmovú reakciu. Zaznamenáme spotrebu HCl počas enzýmovej reakcie (spotreba <b>v<sub>1</sub></b>). Potom pridáme ten istý objem chloridu ortuťnatého do banky <b>S<sub>2</sub></b>. Do oboch baniek ďalej prikvapneme po 9 kvapiek metylčervene a 6 kvapiek brómkrezolovej zelenej a obsah banky <b>S<sub>2</sub></b> titrujeme do červeného sfarbenia. Odčítame spotrebu (spotreba <b>s</b>) a pokračujeme v titrácii obsahu banky <b>V</b> do rovnakého červeného sfarbenia (spotreba <b>v<sub>2</sub></b>).</p> <p>Vyššie uvedený postup je stručne načrtnutý v nasledujúcej tabuľke.</p>					
<b>TABUĽKA 4.7</b>		<b>S<sub>1</sub></b>	<b>S<sub>2</sub></b>	<b>V</b>	poznámky k V
ureáza	[ml]	2	2	2	
brómtymolová modrá		10 kv.	10 kv.	10 kv.	
destilovaná H <sub>2</sub> O	[ml]	10	10	–	
<b>1,44 % močovina</b>	[ml]	–	–	10	rýchlo pripipetovať, zamiešať a zaznamenať čas
				titrovať <b>6 minút</b> na svetlozelené sfarbenie v <b>S<sub>1</sub></b>	zaznamenať spotrebu <b>v<sub>1</sub></b>
HgCl <sub>2</sub>	[ml]	–	1	1	rýchlo pripipetovať po 6 minútach
metylčereveň		–	9 kv.	9 kv.	
brómkrezolová zelená		–	6 kv.	6 kv.	
			titrovať do červeného sfarbenia	titrovať na červené sfarbenie v <b>S<sub>2</sub></b>	zaznamenať spotrebu <b>v<sub>2</sub></b>
			zaznamenať spotrebu <b>s</b>		
<p>Množstvo rozštiepenej močoviny je úmerné objemu spotrebovanej HCl:</p> $V_{\text{HCl}} = v_1 + v_2 - s \quad (1)$ <p>Hodnota <math>V_{\text{HCl}}</math> pre <b>1,44 % močovinu</b> má byť v rozmedzí <b>3,5 – 5,5 ml</b>. Ak je vyššia, reakciu necháme prebiehať len <b>3 minúty</b>. Naopak, ak je nižšia, reakciu necháme prebiehať <b>12 minút</b>.</p> <p>Rovnakým spôsobom uskutočníme sériu stanovení s roztokmi močoviny s koncentraciami <b>2,5 %; 2,0 %; 1,0 %; 0,72 %; 0,36 %; 0,18 % a 0,09 %</b>. Hodnota <math>V_{\text{HCl}}</math> pri týchto koncentráciách už môže byť mimo spomínaný rozsah 3,5 – 5,5 ml. Slepé pokusy (<b>S<sub>1</sub></b> a <b>S<sub>2</sub></b>) slúžia pre farebné porovnanie aj pri ďalších koncentráciách močoviny (<b>nie je nutné</b> opakovať ich pre každú koncentráciu osobitne).</p>					
<b>Vyhodnotenie:</b>	<p><b>Výpočet koncentrácie ureázou rozštiepenej močoviny</b>          Koncentráciu rozštiepenej močoviny vypočítame podľa vzťahu:</p> $c_{\text{močovina}} = \frac{c_{\text{OH}^-}}{2} = \frac{1}{2} \cdot \frac{c_{\text{HCl}} V_{\text{HCl}}}{V_{\text{OH}^-}} \quad (2)$ <p>kde <math>c_{\text{HCl}} = 0,03 \text{ M}</math>, <math>V_{\text{OH}^-} = 10 \text{ ml}</math> a <math>V_{\text{HCl}}</math> predstavuje objem spotrebovanej HCl,</p>				

vyčíslený zo vzťahu (1).

Počiatočnú rýchlosť reakcie ( $v$ ) vypočítame ako podiel koncentrácie rozštiepenej močoviny a času:

$$v = \frac{c_{\text{močovina}}}{t} \quad (3)$$

kde  $t = 6$  min, resp. 3 alebo 12 min.

#### Príklad výpočtu molárnej koncentrácie 2,5 % močoviny

$$w = 2,5 \text{ g}/100 \text{ ml} = 25 \text{ g}/\text{dm}^3$$

$$M_r(\text{močovina}) = 60,1 \text{ g}/\text{mol}$$

$$c_{2,5\%} = \frac{w}{M_r} = \frac{25 \text{ g}/\text{dm}^3}{60,1 \text{ g}/\text{mol}} = 0,42 \text{ M}$$

#### Určenie $V_{\max}$ a $K_m$ pre štiepenie močoviny ureázou

Z Michaelisovej teórie je možné odvodiť základnú kinetickú rovnicu pre enzýmové reakcie, rovnicu **Michaelisa a Mentenovej**:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (4)$$

kde  $v$  je počiatočná rýchlosť enzýmovej reakcie pri danej koncentrácii substrátu  $S$ ,

$V_{\max}$  je maximálna rýchlosť, akou môže reakcia prebiehať pri danej koncentrácii enzýmu a

$K_m$  je Michaelisova konštanta, ktorá je mierou afinity enzýmu k substrátu.

Ak v rovnici (4) dosadíme  $v = \frac{1}{2} V_{\max}$ , získame vzťah:

$$K_m = S \quad (5)$$

z ktorého vyplýva, že  $K_m$  má rozmer koncentrácie ( $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , resp. M) a rovná sa takej koncentrácii substrátu, pri ktorej sa počiatočná rýchlosť reakcie rovná práve polovici maximálnej rýchlosti. Týmto spôsobom možno vypočítať Michaelisovu konštantu z merania reakčnej rýchlosti pri rôznych koncentráciách substrátu. Problematické je určenie konštanty  $V_{\max}$ , pretože mnoho enzýmov je inhibovaných koncentraciou substrátu, takže teoretickú hodnotu  $V_{\max}$  prakticky vôbec nemožno dosiahnuť. Preto bolo navrhnutých niekoľko iných spôsobov stanovenia konštanty, z ktorých najbežnejšia je metóda podľa **Lineweavera** a **Burka**, ktorá vychádza z prevrátenej formy rovnice (4):

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (6)$$

Závislosť  $\frac{1}{v}$  od  $\frac{1}{[S]}$  je lineárna, preto ak sa nanesú výsledky uvedenej série meraní v tomto súradnicovom systéme a získanými bodmi sa preloží priamka, po-

tom úsek na osi  $\frac{1}{v}$  sa rovná  $\frac{1}{V_{\max}}$  a úsek na osi  $\frac{1}{[S]}$  sa rovná  $-\frac{1}{K_m}$ .

Recipročné hodnoty rýchlosti ( $\frac{1}{v}$ ; vid' rovnica 3) vynesieme do grafu oproti recipročným hodnotám pôvodnej koncentrácie močoviny ( $\frac{1}{[S]}$ ; vid' vzorový

	výpočet molárnej koncentrácie 2,5 % močoviny). Zistíme priesečníky priamky s osami $x$ a $y$ a vypočítame hodnoty $V_{\max}$ a $K_m$ .
<b>Záver:</b>	Uvedieme hodnoty $V_{\max}$ a $K_m$ pre štiepenie močoviny ureázou pri daných podmienkach (laboratórna teplota, neutrálna pH).