

Ćwiczenie nr 3 – Kinetyka enzymatyczna

Celem ćwiczenia jest:

- omówienie peroksydaz i metod oznaczania katalitycznej aktywności peroksydaz
- omówienie procesu odwracalnej i nieodwracalnej denaturacji i renaturacji białek
- analiza kinetyki reakcji katalizowanej działaniem peroksydazy chrzanowej
 - obliczanie szybkości początkowej (v_0) reakcji I rzędu z parametrów stycznej do krzywej kinetycznej dla kilku stężeń nadtlenu wodoru ($[H_2O_2]$), przy stałym stężeniu gwajakolu (drugiego substratu reakcji), przy stałym stężeniu enzymu oraz w stałych warunkach reakcji (temperatura, pH i skład buforu)
 - model Michaelisa-Menten i równanie hiperboli; stała powinowactwa enzym-substrat Michaelisa (K_m) dla nadtlenu wodoru, przy stałym stężeniu gwajakolu i enzymu oraz szybkość maksymalna reakcji (V_{max}) w danych warunkach
 - obliczanie stałych katalitycznych z równania Lineweavera-Burka: K_m i V_{max} oraz liczby obrotów ($k_{kat} = V_{max}/[E]_0$) i katalitycznej skuteczności enzymu (k_{kat}/K_m), przy znanym stężeniu peroksydazy

Wprowadzenie:

1. Definicja katalizatora IUPAC

- substancja, której mała ilość przyspiesza reakcję chemiczną i która nie ulega przy tym zużyciu

Katalizator

- bierze udział w reakcji katalizowanej, tworząc kompleks typu kowalencyjnego lub niekowalencyjnego, o niższej energii aktywacji niż dla reakcji bez katalizatora
- nie zużywa się w trakcie reakcji katalizowanej
- nie może przeprowadzić reakcji termodynamicznie niemożliwej
- nie zaburza równowagi reakcji katalizowanej (nie zmienia stałej równowagi reakcji, K)
- skraca czas osiągnięcia równowagi reakcji

2. Biokatalizatory

- Enzymy – białka naturalne lub modyfikowane
- Rybozomy – RNA
- Abzomy – przeciwciała posiadające aktywność katalityczną
- Synzomy – związki syntetyczne (takie biopolimery jak: oligonukleotydy i oligopeptydy, syntetyczne makrocząsteczki)

3. Enzymy, czyli białkowe biokatalizatory

Enzymy są białkami zdolnymi do katalizowania reakcji chemicznych. **Miarą katalitycznej aktywności enzymu** jest szybkość reakcji katalizowanej. Możliwości katalityczne enzymów wynikają ze zdolności do specyficznego wiązania cząsteczki substratu i stabilizacji stanu przejściowego.

Enzymy mogą być zbudowane z pojedynczego łańcucha polipeptydowego (np. rybonukleaza) lub z kilku łańcuchów polipeptydowych (chymotrypsyna, fosforylaza glikogenowa), połączonych kowalencyjnie lub niekowalencyjnie. Mogą wymagać obecności koenzymów, tak jak aminotransferazy wymagają obecności fosforanu pirydoksalu, dehydrogenazy – NAD⁺ lub FAD, zaś kinazy - cząsteczki ATP. Niekiedy powstaje multienzymatyczny kompleks zbudowany z wielu enzymów i ich koenzymów, wspólnie katalizujących reakcję (np. kompleks dehydrogenazy pirogronianowej zbudowany z trzech rodzajów białek, każdy ze swoim koenzymem, z dwoma dodatkowymi koenzymami i dwoma białkami enzymatycznymi regulującymi katalityczną aktywność kompleksu). Enzym może mieć kilka centrów aktywnych w jednym łańcuchu polipeptydowym (polimeraza DNA z *E. coli*, syntetaza kwasów tłuszczowych ssaków).

Centrum aktywne enzymu to fragment powierzchni zbudowany z kilku reszt aminokwasowych. Związany może być w tym miejscu koenzym lub inny niebiałkowy kofaktor współpracujący z częścią białkową, np. jon metalu.

Enzymy są niezwykle **skutecznymi katalizatorami**, w porównaniu do katalizatorów niebiałkowych: **katalizują w warunkach umiarkowanych** (ciśnienie atmosferyczne, temperatura umiarkowana poniżej 473 K, obojętne pH) i **przyspieszają reakcję 10⁶ do 10¹⁸ razy!** Wykazują **specyficzność** względem substratu reakcji, **specyficzność geometryczną** oraz **stereospecyficzność**. **Nie powstają produkty uboczne**.

Katalityczna aktywność enzymów może być **hamowana** działaniem inhibitorów lub **aktywowana** działaniem aktywatorów. **Aktywatory i inhibitory** dzielimy na odwracalne i nieodwracalne. **Inhibitory odwracalne** dzielimy na kompetycyjne, niekompetycyjne i analogi stanu pośredniego. **Inhibitory nieodwracalne** dzielimy na niespecyficzne i specyficzne, a te ostatnie na skierowane na centrum aktywne i substraty-samobójcy.

Katalityczna aktywność niektórych enzymów może być regulowana w wyniku **modyfikacji kowalencyjnej** (np. fosforylacja/defosforylacja) lub **niekowalencyjnej** (kooperacja i allosteria).

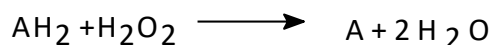
4. Denaturacja

Denaturacja białka to **obniżenie właściwości biologicznych białka**. Proces odwrotny, czyli odzyskanie/zwiększenie właściwości biologicznych nazywamy **renaturacją**. Denaturacja, jak i renaturacja, mogą być procesami odwracalnymi, jak i nieodwracalnymi. Czynniki powodujące denaturację to czynniki denaturujące. **Do czynników denaturujących należą** czynniki chemiczne: środowisko kwaśne lub środowisko alkaliczne (denaturacja kwaśna lub alkaliczna), mocznik i chlorowodorek guanidyny, detergenty, sole metali ciężkich, alkohol, aceton oraz czynniki fizyczne: wysoka temperatura (denaturacja termiczna), promieniowanie, ultradźwięki.

Na **aktywność enzymu** (czyli szybkość reakcji katalizowanej) mają wpływ czynniki: temperatura, pH i skład buforu, siła jonowa roztworu, obecność aktywatorów i inhibitorów.

5. Peroksydazy

Peroksydazy (EC 1.11.1.1-14) to grupa enzymów należących do **klasy oksydoreduktaz** (klasa 1) przenoszących 2 atomy wodoru, czyli katalizujących **utlenianie (odwodnienie)** niektórych **związków organicznych (AH₂)**, takich jak aminy aromatyczne, fenole, indol i kwas moczowy, z równoczesną **redukcją nadtlenu wodoru do wody**, według schematu:

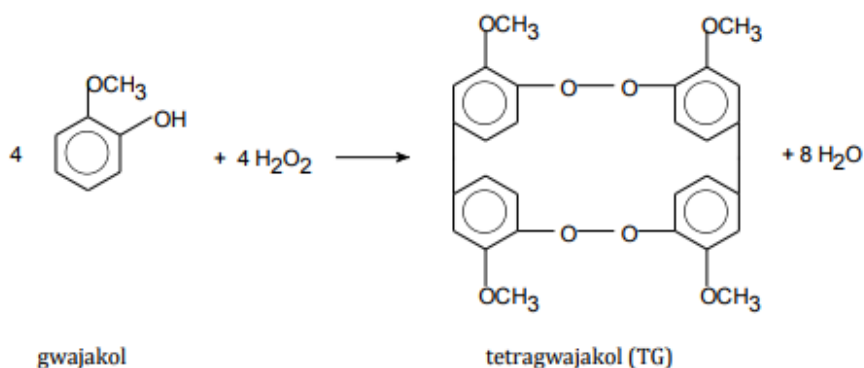


Donorem wodoru (elektronów) jest cząsteczka substratu (AH₂), zaś **akceptorem wodoru** (elektronów) - cząsteczka nadtlenu wodoru (H₂O₂).

Peroksydazy niespecyficzne (np. HRP - ang. horseradish peroxidase - peroksydaza chrzanowa - o masie cząsteczkowej 44 kDa) są hemoproteinami z jonem Fe⁺³ hemu, nie zmieniającym stopnia utlenienia. **Peroksydazy specyficzne** wybierają donor wodoru (np. peroksydaza cytochromowa, glutationowa, NADH, NADPH). **Roślinnym źródłem peroksydazy** jest sok chrzanowy, natomiast **u zwierząt**, enzym ten występuje w wątrobie oraz w krwinkach białych.

6. Peroksydaza chrzanowa

Podczas ćwiczeń, **peroksydaza chrzanowa** katalizuje reakcję **utleniania** bezbarwnego gwajakolu do **barwnego tetragwajakolu** ($\lambda_{\text{max}} = 470 \text{ nm}$), z równoczesną redukcją nadtlenu wodoru do wody:



Obecność **katalitycznej aktywności peroksydazy chrzanowej** w badanej próbce **wykazuje się jakościowo** poprzez obserwację pojawienia się produktu reakcji, tetragwajakolu (TG) o **barwie ciemnośniowej**, zgodnie z powyższą reakcją.

7. Denaturacja peroksydazy soku chrzanowego

Katalityczną aktywność peroksydazy znajdującej się w soku chrzanowym można obniżyć działaniem czynników chemicznych i fizycznych. Wynik jakościowego testu aktywności peroksydazowej (powstanie barwnego TG) pozwoli określić czy dany czynnik powoduje częściową, czy też całkowitą utratę zdolności katalitycznych enzymu.

8. Oznaczania katalitycznej aktywności peroksydazy

Miarą **katalitycznej aktywności enzymów** jest **prędkość reakcji katalizowanej**

Pomiar **katalitycznej aktywności peroksydazy chrzanowej** opiera się na ciągłym (kinetycznym) spektrofotometrycznym pomiarze absorpcji powstającego TG przy długości fali 470 nm. Stężenie **utworzonego barwnego tetragwajakolu (TG)** oblicza się w oparciu o prawo **Lamberta-Beera**. **Współczynnik absorpcji molowej tetragwajakolu (ϵ)** przy długości fali 470 nm wynosi $26,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

9. Prawo Lamberta-Beera

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

gdzie: ϵ - współczynnik absorpcji molowej ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), A - absorpcja próby, c - stężenie próby (M), l - grubość kuwety ($l = 1 \text{ cm}$)

10. Reakcja chemiczna i jej prędkość

dla reakcji $A \longrightarrow P$

prędkość reakcji (v) - zmiana stężenia reagentów (substratów lub produktów) w czasie, wyrażona w $[\text{M}\cdot\text{s}^{-1}]$; k_{+1} – stała szybkości reakcji (s^{-1})

$$v = d[P]/dt = - d[A]/dt = - k_{+1} \cdot [A]$$

11. Prędkość reakcji chemicznej zależy od

- temperatury T

(k - stała szybkości reakcji, zależy od temperatury zgodnie z równaniem Arrheniusa: $k = B \cdot e^{-E_a/RT}$; E_a - energia aktywacji; B - współczynnik proporcjonalności)

- stężenia reagujących substancji (c)

$$v = k(T) \cdot f(c)$$

W warunkach **izotermicznych** ($T = \text{const}$), **prędkość reakcji** chemicznej, jest jedynie funkcją **stężenia substratów**:

$$v = k \cdot f(c)$$

Prędkość reakcji jest proporcjonalna **do iloczynu stężeń substratów, podniesionych do odpowiednich potęg (n)**, wynikających z **liczby cząsteczek** danego związku biorących udział w tym procesie:

$$v = k \cdot c^n \quad (n - \text{rzęd reakcji})$$

Dla **reakcji 0-go rzędu** obserwuje się **poziomą** krzywą zależności prędkości początkowej reakcji v_0 od początkowego stężenia substratu $[A]_0$:

$$v = k \cdot c^0 = k$$

Dla **reakcji I-rzędu** zależność prędkości początkowej reakcji v_0 od początkowego stężenia substratu reakcji $[A]_0$ jest **wprost proporcjonalna**:

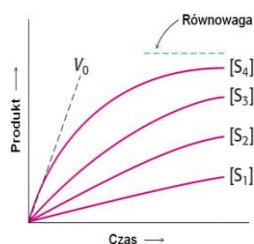
$$v = k \cdot c_A$$

12. Obliczanie prędkości początkowej (v_0) reakcji I-rzędu

Prędkość reakcji I rzędu zmienia się w czasie przebiegu reakcji: prędkość spada w trakcie przebiegu reakcji, na skutek zużywania się reagentów. **Najwyższa prędkość**, nazywana **prędkością początkową (v_0)**, jest w czasie $t = 0$.

Prędkość początkowa reakcji I rzędu (v_0) jest obliczana jest matematycznie z parametrów stycznej do krzywej kinetycznej w punkcie, gdy $t = 0$. Jest równa tangensowi kąta między styczną a osią czasu (y/x) w tym punkcie. **Jedynie w czasie $t=0$ znamy stężenia substratów reakcji.** Prędkość ta jest różna od wyznaczonej wprost z krzywej kinetycznej i dlatego nie powinno się jej tak wyznaczać.

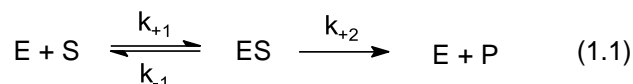
Procedura obliczeń v_0 dla każdej mieszaniny inkubacyjnej przygotowana jest w programie Excel.



Krzywe kinetyczne zmian stężeń produktu P w funkcji czasu reakcji I rzędu, dla 4 stężeń początkowych substratu ($[S_1]$ do $[S_4]$). Widoczna jest styczna do krzywej 4-tej, pozwalająca na obliczenie v_0 , przy tym stężeniu substratu.

13. Kinetyka reakcji katalizowanej enzymatycznie

Poniższy schemat opisuje reakcję zachodzącą pomiędzy 1 cząsteczką enzymu i 1 cząsteczką substratu, z utworzeniem kompleksu ES, który następnie rozpada się z utworzeniem cząsteczki produktu i odtworzeniem cząsteczki enzymu:



gdzie **S, E, P i ES** oznaczają kolejno reagenty reakcji: **substrat, enzym, produkt i kompleks enzym-substrat** (kompleks przejściowy lub aktywny), zaś **k_{+1} , k_{-1} i k_{+2}** to **stałe szybkości reakcji** w prawo lub w lewo.

Enzym jest zdolny do specyficznego wiązania reagentów (substratów) w centrum aktywnym. Umożliwia on substratom zbliżenie i ułożenie się w optymalnej orientacji, zwiększając prawdopodobieństwo utworzenia stabilnego, kowalencyjnego lub niekowalencyjnego, **kompleksu pośredniego ES (stanu przejściowego)**.

Leonor Michaelis i Maude Menten (1913) założyli, że reakcja enzymatyczna przebiega z **utworzeniem kompleksu pośredniego enzym-substrat ES**, który znajduje się w stanie szybko ustalającej się **równowagi** z substratem. Ten stan równowagi nie jest zaburzany przez dużo **powolniejszy rozpad kompleksu ES na enzym i produkt**. **W warunkach początkowych reakcji enzymatycznej**, gdy stężenie produktu jest niewielkie, można pominąć odtwarzanie kompleksu ES z produktu, i **uważać reakcję za nieodwracalną**. **Rozwiązując układ równań różniczkowych**, określających szybkość zmian stężenia reagentów i wszystkich form enzymu, uzyskujemy **wzór na szybkość początkową reakcji (v_0) w prawo** w stanie stacjonarnym (gdy ubywa S, przybywa P, przy zachowaniu $[ES] = \text{const.}$), nazywane **równaniem Michaelisa-Menten (1.2)**, opisujące **hiperboliczną krzywą wysycenia enzym-substrat**, która jest przedstawiona graficznie na rysunku poniżej.

Równanie Michaelisa-Menten (1.2) wyraża **zależność** między **prędkością początkową** reakcji katalizowanej enzymatycznie (v_0), a początkowymi **stężeniami reagentów: substratu $[S]_0$ oraz enzymu $[E]_0$** :

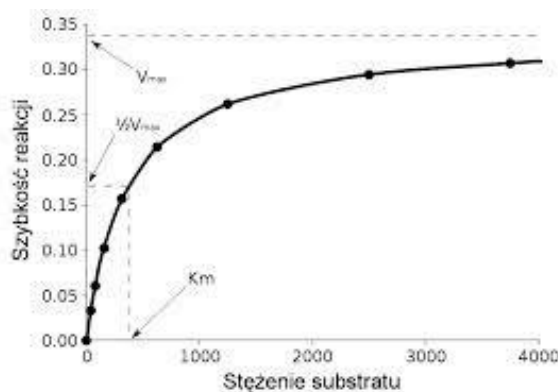
$$v_0 = \frac{V_{\max} \cdot [S]_0}{[S]_0 + K_m} = \frac{k_{\text{kat}} \cdot [E]_0 \cdot [S]_0}{K_m + [S]_0} \quad (1.2)$$

- A. **Prędkość początkowa reakcji katalizowanej enzymatycznie (v_0) jest wprost proporcjonalna** (reakcja I-rzędu) **do stężenia enzymu**, przy wysokim stężeniu substratu (czyli gdy stężenie substratu jest co najmniej 5 razy wyższe niż K_m):

$$v_0 \approx k \cdot [E]_0$$

- B. **Prędkość początkowa reakcji katalizowanej (v_0) zależy hiperbolicznie od początkowego stężenia substratu ($[S]_0$)**, przy stałym stężeniu enzymu.

Hiperbola Michaelisa-Menten lub krzywa wysycenia enzymu-substratem (izoterma sorpcji Langmuira) przedstawia graficznie równanie **Michaelisa-Menten**.



Krzywa Michaelisa-Menten lub krzywa wysycenia enzymu-substratem

Wartości prędkości początkowych reakcji (v_0) wzrastają asymptotycznie do wartości V_{max} , gdy początkowe stężenie substratu ($[S]_0$) zmierza do nieskończoności; równocześnie rząd reakcji zmienia się z I-go (gdy $[S]_0 \approx 0$) do 0-go (gdy $[S]_0 \approx \infty$).

W równaniu Michaelisa-Menten (1.2) występują dwie **stałe katalityczne reakcji**:

- stała Michaelisa K_m
- stała katalityczna k_{kat} (liczba obrotów)

Stała Michaelisa K_m jest miarą powinowactwa enzymu do substratu.

Wartość liczbowa stałej Michaelisa (K_m) odpowiada takiemu **stężeniu substratu (M)**, przy którym początkowa szybkość reakcji katalizowanej jest równa połowie szybkości maksymalnej, $v_0 = \frac{1}{2} V_{max}$. **Stała Michaelisa K_m wyrażana jest w M , czyli mol/l.**

Wartość stałej Michaelisa (K_m) obliczamy matematycznie z parametrów hiperboli Michaelisa-Menten (1.2), lub z parametrów prostej Lineawevera-Burka.

Stała katalityczna k_{kat} (liczba obrotów) określa maksymalną **reaktywność enzymu**, czyli określa ilość cząsteczek substratu przetwarzanych przez 1 cząsteczkę enzymu (lub 1 centrum aktywne enzymu) **w ciągu 1 sekundy**, w warunkach gdy enzym jest całkowicie wysycony substratem (czyli, gdy stężenie substratu ($[S]_0$) jest co najmniej pięciokrotnie wyższe niż wartość stałej Michaelisa (K_m)). **Stała katalityczna (k_{kat})** wyrażona jest w s^{-1} dla czystych homogennych enzymów, o znanym stężeniu molowym.

Wartość stałej katalitycznej (k_{kat}), liczby obrotów, obliczamy ze wzoru (1.3), jako iloraz wyznaczonej wartości **prędkości maksymalnej reakcji V_{max}** wyrażoną w $M \cdot s^{-1}$ (która nie jest stałą, gdyż jest proporcjonalna do stężenia enzymu w próbce) i molowego **stężenia enzymu $[E]$**

$$k_{kat} = V_{max}/[E] \quad (1.3)$$

Katalityczna skuteczność enzymu (wyrażona w $M^{-1} \cdot s^{-1}$), lub **wydajność katalityczna enzymu (enzyme catalytic efficiency - ang.)** określa **perfekcję katalityczną enzymu** i oblicza przez podzielenie obu stałych: k_{kat} i K_m :

$$\text{Katalityczna skuteczność} = k_{kat}/K_m$$

Perfekcję kinetyczną osiągają enzymy, gdy wartość **skuteczności** mieści się w granicach od 10^8 do $10^9 M^{-1} \cdot s^{-1}$. Wielkość ta ograniczona jest jedynie szybkością dyfuzji cząsteczek substratu do cząsteczek enzymu.

Katalityczna aktywność enzymu przy danym stężeniu substratu zależy zatem od:

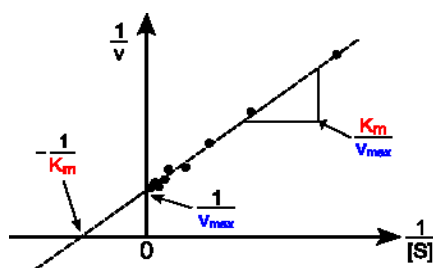
- **powinowactwa enzymu do substratu**, które liczbowo określa **stała Michaelisa K_m**
- **reaktywności**, którą liczbowo wyraża liczba obrotów, **stała katalityczna k_{kat}**

14. Obliczanie stałych katalitycznych reakcji katalizowanej działaniem enzymów

Z hiperbolicznego wykresu Michaelisa-Menten nie można graficznie wyznaczyć wartości stałej Michaelisa K_m oraz prędkości maksymalnej reakcji enzymatycznej V_{max} , a z nich k_{kat} i katalitycznej skuteczności enzymu. Należy natomiast zastosować jedną z metod obliczeń matematycznych:

- dopasowanie hiperboli do punktów eksperymentalnych (par wartości v_0 i $[S]_0$), z użyciem programu komputerowego (SigmaPlot, Simfit, EzFit i inne)
- matematyczne obliczanie parametrów prostej **metodą najmniejszych kwadratów** (z użyciem kalkulatora lub programu Excel) po **linearyzacji** równania **hiperboli** (metodą **Lineweavera-Burka**, Eadie-Hofstee, Haynesa, Scatcharda lub Hilla)

Najczęściej stosowaną w enzymologii **metodą linearyzacji równania Michaelisa-Menten**, pozwalającą na wyznaczenie V_{max} oraz stałych K_m , k_{kat} i **katalitycznej skuteczności**, jest metoda **Lineweavera-Burka**. Metoda polega na matematycznym przekształceniu (odwróceniu) równania hiperboli Michaelisa-Menten (1.2) z utworzeniem równania Lineweavera-Burka, opisującego linię prostą $y = a \cdot x + b$.



Prosta Lineweavera-Burka

Część doświadczalna

I. Denaturacja peroksydazy soku chrzanowego

Procedura

- Przygotuj 5 małych probówek szklanych, podpisz (1-5) i napełnij według tabeli poniżej.

Nr próby	Nazwa próby	Sok chrzanowy [ml]	0,9% NaCl [ml]	2M NaOH [ml]	2M HCl [ml]	Mocznik [ml]
1	Ślepa	0	1	0	0	0
2	Kontrolna	0.5	0.5	0	0	0
3	Działanie temperatury	0.5	0.5	0	0	0
4	Działanie zasady	0.5	0	0.5	0	0
5	Działanie kwasu	0.5	0	0	0.5	0
6	Działanie mocznika	0,5	0	0	0	0,5

- Probówkę nr 3 umieść na ok. 10 min we wrzącej łaźni wodnej.
- Sprawdź aktywność katalityczną roztworów (1-5), wykonując dla każdego z nich (1'-5') **test na aktywność peroksydazową**:

Próba	3% H ₂ O ₂ [cm ³]	0,02 M Gwajakol [ml]	Obj. próby 1 [cm ³]	Obj. próby 2 [cm ³]	Obj. próby 3 [cm ³]	Obj. próby 4 [cm ³]	Obj. próby 5 [cm ³]	Obj. próby 6 [cm ³]
1'	0,5	0,1	0,1					
2'	0,5	0,1		0,1				
3'	0,5	0,1			0,1			
4'	0,5	0,1				0,1		
5'	0,5	0,1					0,1	
6'	0,5	0,1						0,1

- W sprawozdaniu przedstaw wyniki i ich interpretacje.
- Jakie czynniki denaturujące znalazłeś?

II. Wyznaczenie stałych katalitycznych reakcji katalizowanej działaniem peroksydazy chrzanowej

Procedura

A. Przygotowanie mieszanin inkubacyjnych

Tabela A

Mieszanina inkubacyjna	0.01 M bufor fosforanowy pH 6.5 [ml]	0.02 M gwajakol w buforze [ml]	1 mM H ₂ O ₂ w buforze [ml]	Stężenie H ₂ O ₂ w mieszaninie [mM]
M1	2.4	3	0.6	
M2	1.8	3	1.2	
M3	1.2	3	1.8	
M4	0.6	3	2.4	
M5	0.0	3	3	

- W 5 probówkach przygotuj mieszaniny inkubacyjne M1 do M5, według tabeli A (i podpisz je) o identycznym stężeniu gwajakolu, ale różniące się początkowym stężeniem H₂O₂ ([H₂O₂]_o). Będziemy wyznaczać v₀ reakcji mieszanin M1 do M5, przy różnym stężeniu [H₂O₂]_o, celem uzyskaniu zależności Michaelisa- Menten oraz wyznaczenia stałej powinowactwa peroksydazy do nadtlenu wodoru, Km.
- Uzupełnij tabelę A **wpisując** w ostatniej kolumnie **obliczone stężenie nadtlenu wodoru** w każdej z mieszanin inkubacyjnych, czyli początkowe stężenie tego substratu reakcji katalizowanej ([H₂O₂]_o).
- Odpipetuj po 2.5 ml każdej mieszaniny inkubacyjnej M5 do M1 do dwu kuwet, dla pomiaru absorbancji tetragwajakolu (TG) powstającego w czasie reakcji katalizowanej, w spektrofotometrze dwuwiązkowym.

B. Spektrofotometryczny pomiar stężenia produktu reakcji tetragwajakolu (TG) przeprowadzony podczas reakcji katalizowanej enzymatycznie, kolejno w mieszaninach M5 do M1 (w tej kolejności!)

- Przygotuj spektrofotometr do pomiarów kinetyki reakcji (przez 3 minuty, przy długości fali 470 nm i odczycie co 30 sekund)
- Do spektrofotometru **wstaw** parę kuwet („pomiarową” i „ślepa”) z jedną z mieszanin inkubacyjnych (**zaczynj od M5!**) i „wyzeruj” spektrofotometr
- Aby rozpocząć **reakcję enzymatyczną**, do mieszaniny w kuwecie **dodaj 50 μl roztworu enzymu** (peroksydazy chrzanowej), **NATYCHMIAST wymieszaj** mieszadłem, **zamknij** klapę aparatu i przyciskiem **START** rozpocznij pomiar absorbancji (staraj się te czynności wykonać jak najszybciej)
- Po zakończeniu pomiaru, odczytane **wartości absorbancji TG** dla próby M5 **wpisz na brudno do tabeli w zeszycie**, a następnie po odjęciu wartości próby o czasie „0” :
- **wpisz do Tabeli 1** w sprawozdaniu
- Przeprowadź reakcję** z pozostałymi 4 mieszaninami inkubacyjnymi (M4, M3, M2,

M1) i wpisz odczytane wartości absorbancji najpierw **na brudno**, a następnie po odjęciu wartości próby w czasie 0, postępuj jak z próbą M5

- C. **Wykonaj obliczenia prędkości początkowej** reakcji katalizowanej (v_0) dla 5 mieszanin inkubacyjnych M1 do M5, o różnym stężeniu nadtlenu wodoru, ale stałym stężeniu gwajakolu i enzymu (Tabela 1 lub 1A do 1E) i **wpisz do tabeli Michaelisa-Menten**, a następnie przelicz je i **wpisz do Tabeli Linaewevera-Burka**.
- D. **Oblicz stałe katalityczne reakcji katalizowanej**, metodą najmniejszych kwadratów, z równania prostej Linaewevera-Burka: **stałą Michaelisa K_m dla H_2O_2 oraz stałą k_{cat} i katalityczną skuteczność peroksydazy, przy stałym stężeniu gwajakolu oraz enzymu.**

Sposoby wyrażania katalitycznej aktywności enzymu

1961: U (jednostka standardowa aktywności) to taka ilość enzymu, która katalizuje przemianę 1 mikromola substratu w temperaturze 30°C w ciągu 1 minuty w warunkach optymalnych (pH, skład buforu) przy wysyceniu enzymu substratem

1972: katal to aktywność enzymu przekształcająca 1 mol substratu w temp 30°C w ciągu 1 sekundy w warunkach optymalnych (pH, skład buforu) przy wysyceniu enzymu substratem

Stężenie enzymu

dla enzymów czystych: **stężenie molowe ($M = \text{mol/l}$)**

dla enzymów nieoczyszczonych: **U/l lub katal/l**

Aktywność właściwa

U/mg lub katal/kg