

EXCEL 在酵素動力學之應用

Enzyme 一字源自希臘文，原意為“in yeast”；描述在酵母菌中，含有某種神奇的催化活力，可以把糖轉變為酒精，故名為酵素。Sumner 在 1926 年首先結晶出尿素酶 (urease)，並證實酵素為一種蛋白質。一般而言，酵素具有下列特性：

- a. 酵素可催化生化反應，增加其反應速率，是最有效率的催化劑。
- b. 酵素種類非常多，每一種都能催化所賦與的專一性反應，其它的酵素不易干擾；不過，可能會有酵素間的協同或抑制作用。
- c. 酵素的催化反應是可調節的，反應可受許多因子影響而加快或減緩。
- d. 通常酵素為蛋白質，但部份 RNA 也具專一性的催化能力 (ribozyme)。

總之，生物體藉著種種酵素的催化作用與調節，才能有效地完成他所需要的許多生理活動。若細胞內的酵素活動受到抑制或干擾，整個生物體就可能出現異狀。

酵素動力學：

動力學是如何進行的？改變基質濃度，再看酵素如何活動。

基本概念：

酵素動力學的形成，是根基於『過渡狀態濃度恆定』的概念。早在 1913 年，Michaelis 及 Menten 就以轉化酶 (invertase) 系統為研究對象，發現有關酵素與基質反應的一些行為模式，他們提出：

- a. Steady state 理論：酵素催化時，基質先與酵素結合，生成過渡狀態，再轉變成產物；而酵素與基質的結合是可逆的 ($E + S \rightarrow ES$)；而當反應達穩定狀態 (steady state) 時，其中的 [ES] 濃度不變 (因為 ES 生成量等於其消失量)。
- b. 酵素行為的數學描述：反應速率 (v) 與酵素或基質的關係，可以數學式表示；在固定的酵素量下，反應速率 v 與基質濃度 [S] 成雙曲線關係 (但只有雙曲線一股)，可用公式表之，即 Michaelis-Menten (M-M) 動力學公式。

酵素動力學大綱

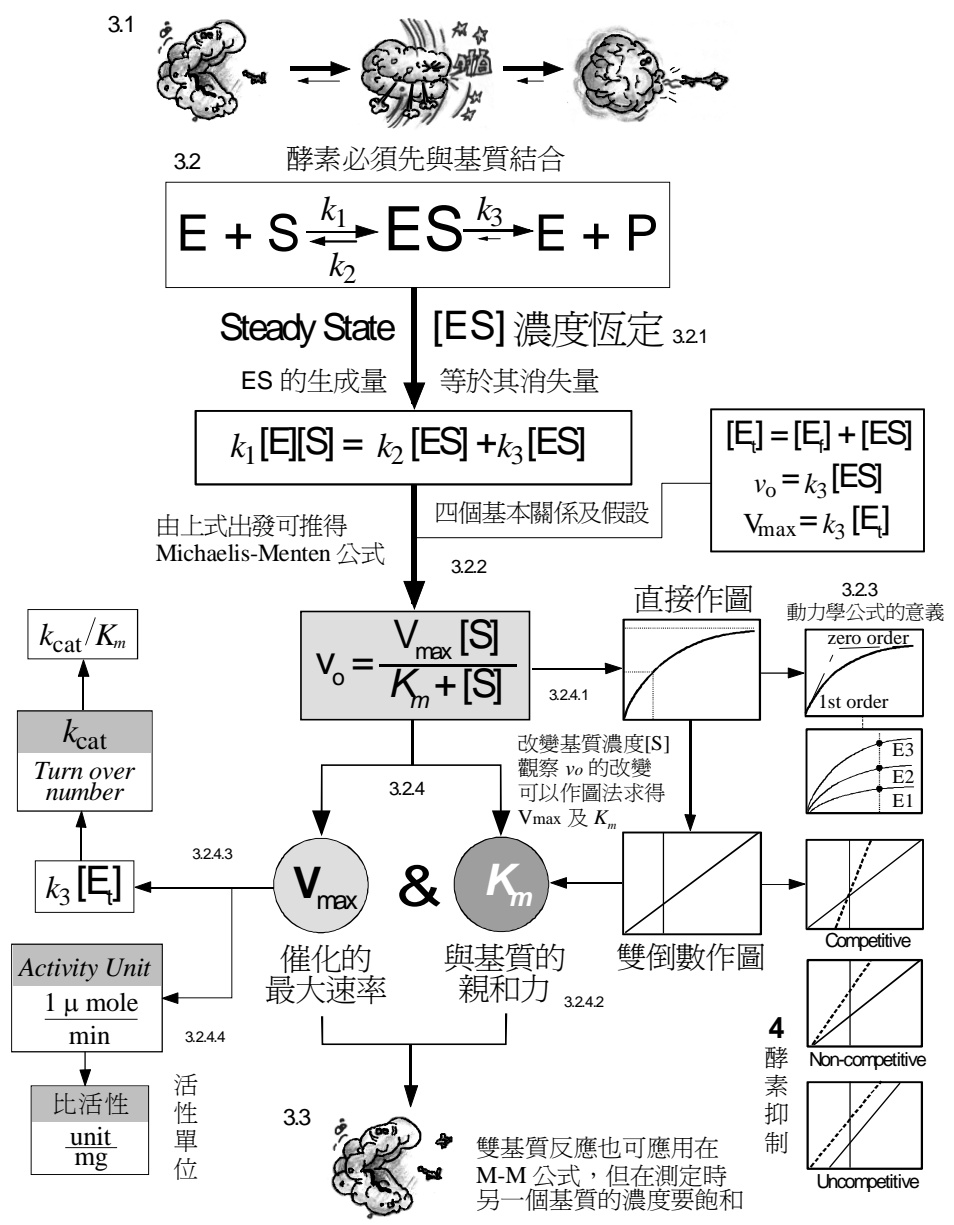
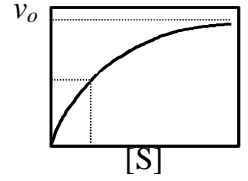


圖 1 酵素動力學公式的推演及其應用

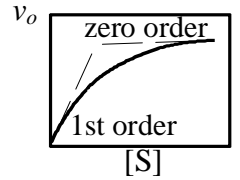
Michaelis-Menten 公式的意義：

M-M 公式可以求得 V_{\max} 及 K_m ，求得 V_{\max} 及 K_m 有何意義？

a. M-M 公式是雙曲線公式。若固定酵素量，改變其基質量 $[S]$ ，則可得到不同的反應初速 v_o ，再以 $[S]$ 為 x 軸， v_o 為 y 軸作圖，可得到一股雙曲線，其漸近點為 V_{\max} 。

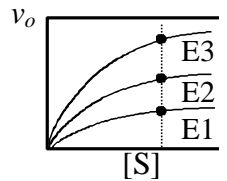


b. 低濃度 $[S]$ 時反應速率 v_o 與 $[S]$ 成正比，即 $v_o \sim [S]^1$ ，是為一級反應 (first order reaction)；當 $[S]$ 增大， v_o 接近漸近線時， v_o 的改變很小，不受 $[S]$ 變化的影響，即 $v_o \sim [S]^0$ ，稱為零級反應 (zero order)。



c. 若基質量 $[S]$ 也固定，則 M-M 公式變為：

$$v_o = \frac{V_{\max} (\text{常數 } [S])}{(\text{常數 } K_m) + (\text{常數 } [S])} \sim V_{\max} (\text{常數})$$



由 (IV) $V_{\max} = k_3 [E_t]$ ，故 $v_o \sim [E_t]$ ，即反應速率與酵素量成正比。

d. 事實上 $ES \rightarrow E + P$ 的反應為可逆，但此逆反應可忽略，因 M-M 公式的測定，是反應初期所測的反應初速 (v_o)，此時生成物 $[P]$ 的濃度很低，逆反應幾乎無從發生。

◆ 練習以紙筆自行推演 M-M 公式及上述各種情況下的變化。

3.2.4 V_{\max} 及 K_m 的測定與意義：

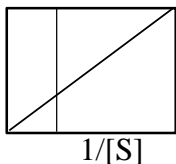
V_{\max} 及 K_m 是每一個酵素極重要的性質指標，可以顯示其催化特性。

3.2.4.1 V_{\max} 及 K_m 測定法：

步驟相當單純，但隨著各種酵素活性測定方法的難易有別。動力學實驗的基本資料，為在一系列 $[S]$ 濃度下所測得的反應初速 (v_o)，依法作圖即可求出 V_{\max} 及 K_m 。有以下數種作圖求法：

a. 直接作圖法：是最基本的數據作圖。以 $[S]$ 為橫軸 v_o 為縱軸，所得漸近線的最高處為 V_{\max} ， K_m 為 50% V_{\max} 時的 $[S]$ 。

$1/v_o$

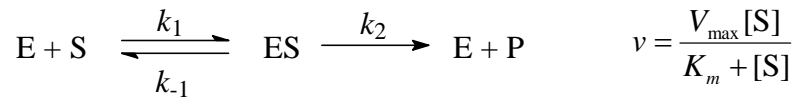


b. Lineweaver-Burk 雙倒數作圖法：是最常用的作圖方式；因直接作圖法只能以漸近估計求得 V_{\max} ，若 x 及 y 軸分別改為 $1/[S]$ 及 $1/v_o$ ，則可作出一條直線來，由 x 軸上的交點求出 $1/K_m$ ，由 y 軸交點求出 $1/V_{\max}$ 。

- ◆ 循一實例練習畫出動力學測定的直接作圖及其雙倒數作圖。並請注意 V_{\max} 及 K_m 的單位是什麼，為何會得到此種單位？

c. Eadie-Hofstee 作圖法：雙倒數圖的直線，在接近 y 軸處，打點太密，求得直線稍有困難。若分別以 $v_o/[S]$ 及 v_o 為 x, y 軸，亦可畫出直線，且各點的分佈較平均。

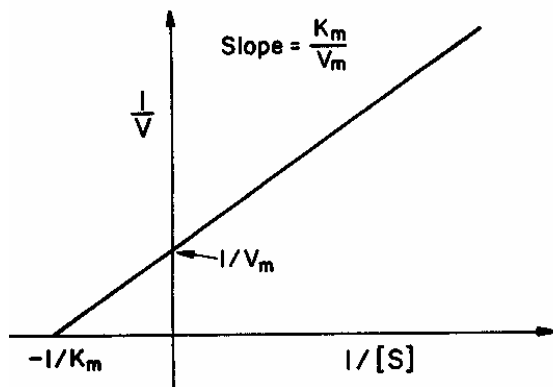
ENZYME KINETICS : DETERMINATION OF K_m AND V_{\max}



v : initial rate (to avoid product inhibition effect)

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt}$$

A. Lineweaver-Burk Plot: $\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$



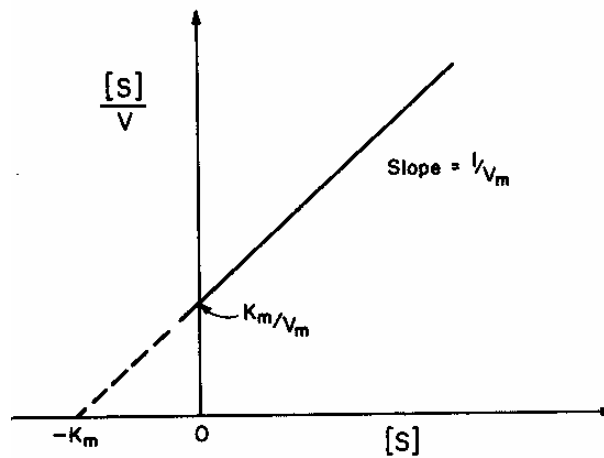
x-axis intercept:

$$0 = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

$$\therefore \frac{1}{[S]} = -\frac{1}{K_m}$$

B. Hanes-Woolf Plot

$$\frac{[S]}{v} = \frac{1}{V_{\max}} [S] + \frac{K_m}{V_{\max}}$$

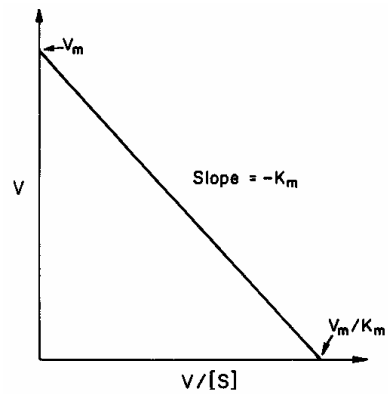


C. Eadie-Hofstee Plot

$$vK_m + v[S] = V_{\max}[S]$$

$$v[S] = V_{\max}[S] - vK_m$$

$$\text{or } v = V_{\max} - K_m \frac{v}{[S]}$$

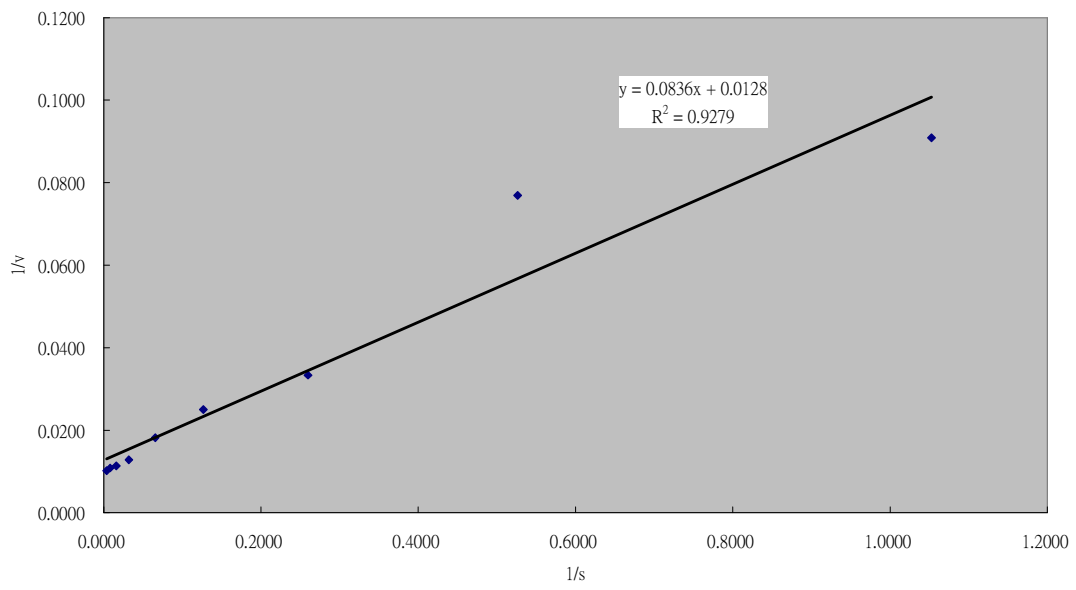


※作業二：根據酵素動力學實驗結果：請利用 EXCEL 繪出(1)產率—時間曲線，並分別以(2)Linearweaver-Burk 及(3)Eadie-Hofstee (4) Hanes-Woolf Plot 方法計算其 K_m 、 V_{\max} 值。並列表整理計算結果。

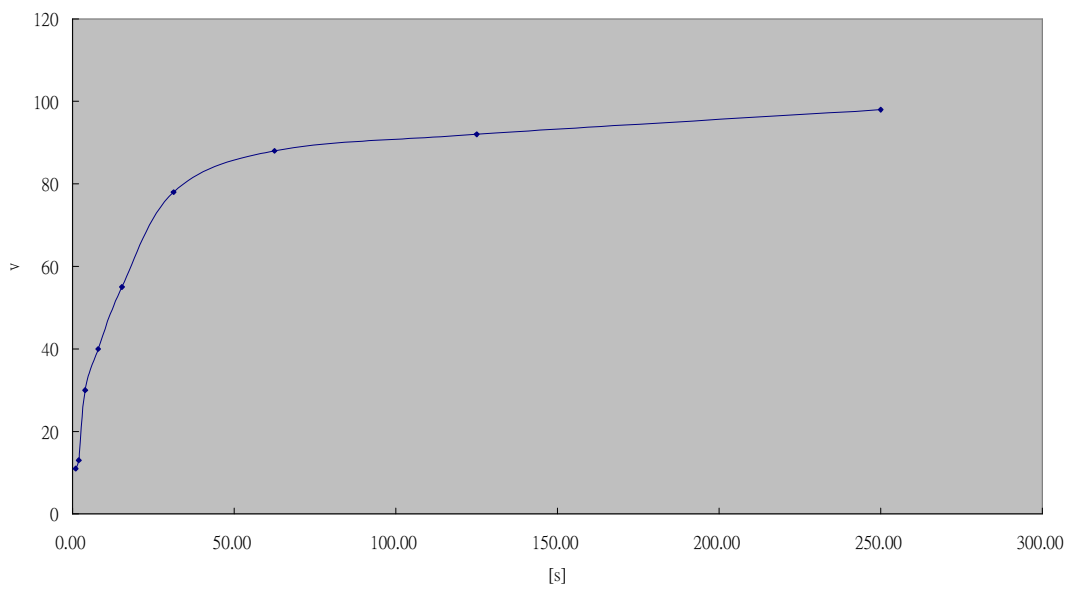
| | | | | | | | | | |
|-----------------------------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-----|
| [S] (μM) | 0.95 | 1.90 | 3.85 | 7.90 | 15.25 | 31.25 | 62.50 | 125.0 | 250 |
| v (μMS^{-1}) | 11 | 13 | 30 | 40 | 55 | 78 | 88 | 92 | 98 |

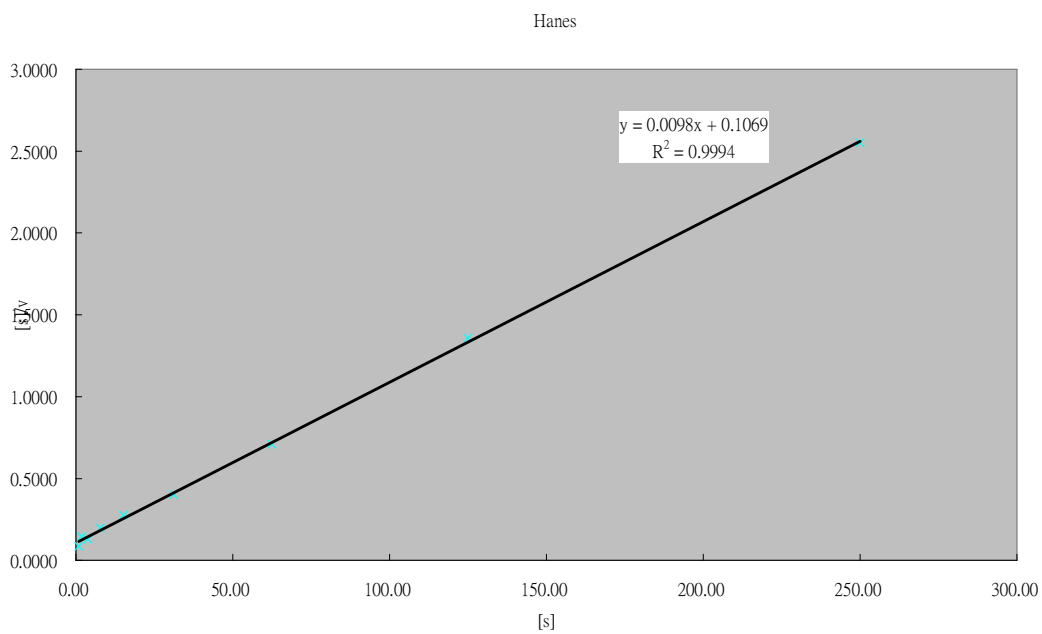
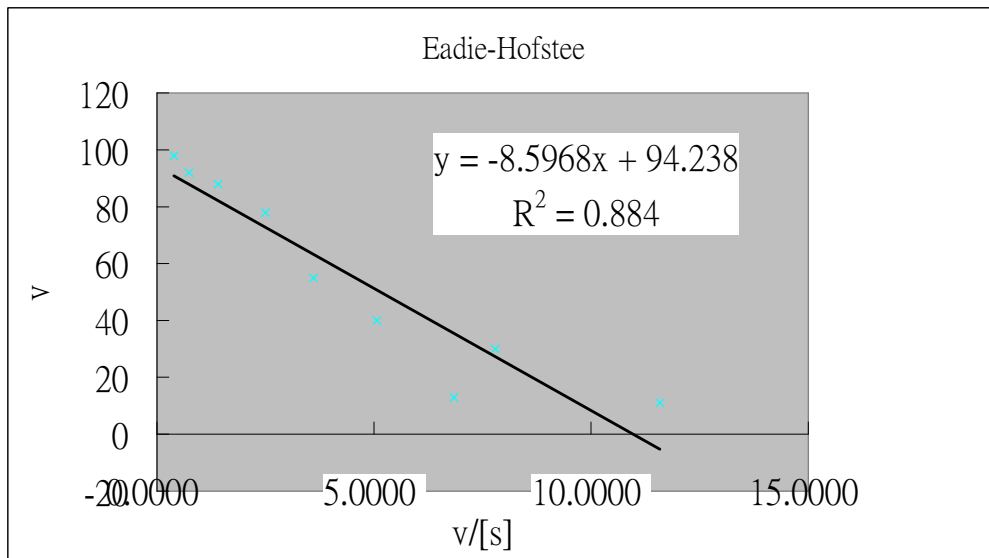
| [S] (μM) | v (μMS^{-1}) | $1/[S]$ | $1/v$ | $[S]/v$ | $v/[S]$ |
|-----------------------|-----------------------------|---------|--------|---------|---------|
| 0.95 | 11 | 1.0526 | 0.0909 | 0.0864 | 11.5789 |
| 1.90 | 13 | 0.5263 | 0.0769 | 0.1462 | 6.8421 |
| 3.85 | 30 | 0.2597 | 0.0333 | 0.1283 | 7.7922 |
| 7.90 | 40 | 0.1266 | 0.0250 | 0.1975 | 5.0633 |
| 15.25 | 55 | 0.0656 | 0.0182 | 0.2773 | 3.6066 |
| 31.25 | 78 | 0.0320 | 0.0128 | 0.4006 | 2.4960 |
| 62.50 | 88 | 0.0160 | 0.0114 | 0.7102 | 1.4080 |
| 125.0 | 92 | 0.0080 | 0.0109 | 1.3587 | 0.7360 |
| 250 | 98 | 0.0040 | 0.0102 | 2.5510 | 0.3920 |

Lineweaver-Burk



反應速率對濃度曲線





| | 公式 | X座標 | Y座標 | 斜率 | 截據 | V_{max} | K_M |
|------------------------|---|-------|-------|----------|--------|-----------|--------|
| Lineweaver-Burk | $1/V = 1/V_{max} + K_M/V_{max} * 1/[S]$ | 1/[S] | 1/V | 0.083579 | 0.0128 | 78.13 | 6.53 |
| Eadie-Hofstee | $V = V_{max} - K_M * V/[S]$ | V/[S] | V | -0.1028 | 10.205 | 10.205 | 0.1028 |
| Hanes | $[S]/V = [S]/V_{max} + K_M/V_{max}$ | [S] | [S]/V | 0.0098 | 0.1069 | 102.04 | 10.9 |