

## 6. GAIA: pH-aren EFEKTUA ZINETIKA

### ENTZIMATIKOAN

Entzimak proteinak dira, eta beraien propietateak pH-aren arabera aldatzen dira. Protoiek ligando unibertsal gisa jokatzeko gaitasuna dute entzimekin, hauen efektore orokorrak dira. Entzima gehienek pH 5-9ko tartean egiten dute lan organismoko pH-a tarte horretakoa izan ohi delako, salbuespenak kenduta, pepsina eta fosfatasa alkalinoa. pH optimo horretatik aldentzen goazen heinean, aktibitatea galtzen joango dira.

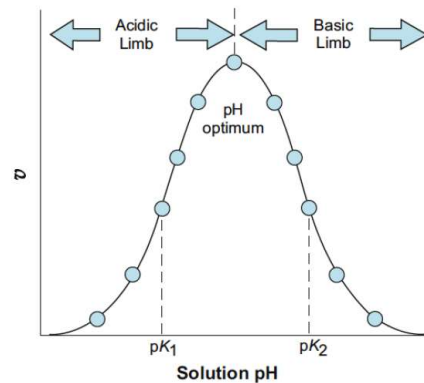
pH-ak eragin ezberdinak ditu, entzimarekin batura eragotziz edo erraztuz. Substratua entziman finkatzeko aminoazidoak izango ditugu, aminoazido hauek lotura ahulen bidez elkar ekiten dute, eta lotura honetan eragin handia du pH eta protonatze-desprotonatzeak.

Entzimaren aktibitate katalitikoan ere eragin dezake, eta proteina bera ere izan daiteke ionizazioa jasaten duena.

Proteinek egitura tertziarioa behar dute aktibitate egokia izateko, beraz muturreko pH-tan proteina desagituratu edo desnaturalizatzen da, gune aktiboaren desagertzea eraginez. Beraz, pH-ak modu desberdinetan eragin dezake aktibitatearen galtzearekin.

#### pH-arekiko menpekotasuna Michaelis-Menten mekanismoa duten entzimetan

Erreakzio entzimatikoa askotan,  $V_0$ -ak pH-aren funtzioan kanpai itsurako kurbak ematen dituzte, hau da, baldintza guztiak berdin mantenduz, pH bakarrik aldatuz eta hasierako abiadura neurtuz, ondoko kurba hau agertzen da. Bertan, pH optimoa zein den agertzen zaigu, eta lehen esan bezala, bertatik aldentuz aktibitate galera bat dagoela ikus daiteke, zeina protonazio/desprotonazioen arabera izango den.

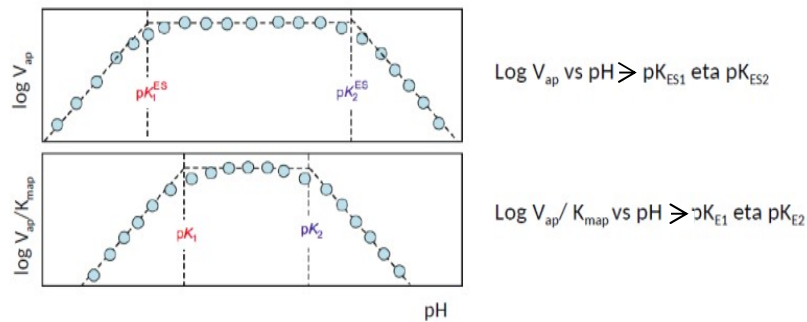


Kurba hauek, entzimaren gune aktiboan dauden aminoazidoen ionizazio egoera islatzen dute, ionizazio egoera hori aldatzen goazen heinean, aktibitate ideal hori galduz doa. Entzimak aktibitate maximoa lortzeko, ionizazio konkretu bat izango du, eta hemendik aldentuz gero, aktibitate hori galduz joango da, esan bezala. Katalitikoki aktiboa den espeziea, erdi disoziatua dela suposatuko dugu ( $EH^-$  eta  $EHS^-$ ).

$EH^- \rightarrow$  Entzimaren espezie erdi disoziatu askea.

$EHS^- \rightarrow$  Substratuari batuta dagoen entzimaren espezie erdi disoziatua.

Entzimen Ionizazio Konstanteak ezagutu behar ditugu, gune aktiboko aminoazido garrantzitsuen informazioa ematen baitute. Ionizazio horrek aktibitatean eragiten badu, konstante batzuk analizatu, aminoazidoa zein den jakin dezakegu. Konstante hauek, bi adierazpen grafiko erabiliz lortuko ditugu.



Substratua ionizatzen ez dela suposatuko dugu, beraz entzimaren ionizazio mailari bakarrik emango diogu garrantzia.

### pH-aren efektua zinetika entzimatikoa

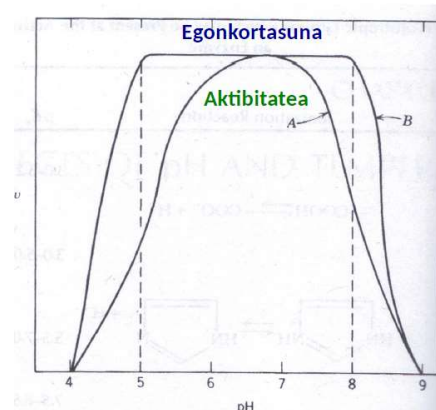
1. pH-ak erreakzio entzimatikoa baten abiadura eragiten du.
2. Protoia erreakzio entzimatikoa baten efektore orokorra da, hau da, ligando unibertsal moduan jokatuko du.
3. Entzimen gune aktiboak talde ionizagarriak osatuta daude, horregatik lotu daitezke protoiak entzima gehienetara. Egoera ioniko konkretu batean egon behar dira zentro aktiboaren egitura mantendu, substratua batu eta katalizatzeke.
4. Substratu batek ionizagarriak diren taldeak izan ditzake, baina horietako forma bakarra lotuko da entzimara.

### pH-aren efektua entzimaren aktibitate eta egonkortasunean

Entzimaren konformazioa muturreko pH-ekiko oso sentikorra da, eta honek aktibitatearen galera eragingo du. Entzimaren karga globalaren aldaketa eman eta desnaturalizazioa emango da. Entzimaren aktibitatea konformazioari dago lotua.

Entzimek normalean aktibitateerako pH optimo bat izango dute, normalean balio zehatza izango dena edo tarte oso txiki bat, baina baita egonkortasun pH optimo bat ere. Egonkortasunari dagokionez, entzimak egonkortasun tarte zabal bat izango du, ez balio zehatz bat.

Kurba hauek ezagutzea garrantzitsua da, aktibitate eta egonkortasunaren inguruko informazioa lortzeko.



pH optimoan, entzimak gune aktiboko aminoazidoak forma ioniko optimoan izango ditu, baita substratuak ere. pH optimo hori abiadura maximoaren bidez lortzen da, eta bertatik aldentuz aktibitatea galtzen joango da.

Egonkortasun pH optimoak menpekotasun desberdinak ditu. Egonkortasun kurbak ditugunean, **tenperatura** aldatuz gero kurba hori aldatzen dela hartu behar dugu kontuan, hau da, tenperaturak eragina duela. Disoluzio indargetzailearen izaera kimikoak ere eragina izango du, baita ioi kontzentrazioak ere (entzimak bere aktibitateerako beharrezkoak ditu  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  ...). Entzimaren kontzentrazioa ere garrantzitsua izango da, kontzentrazioa asko murrizten

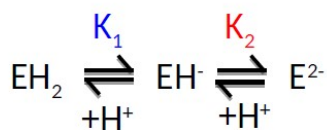
bada (oso diluitua badago azpiunitateen disoziazioa), aktibitate eta egonkortasunaren galera emango da.

Balioak zein unitatetan eman diren jakitea garrantzitsua izango da.

### Michaelis-Menten-en pH funtzioak

Bi talde ionizagarri dituen entzima bat:

Hiru egoeratan egon daiteke, eta hauen kontzentrazioa izan beharko dugu kontuan entzimaren kontzentrazio totala jakiteko.



EH<sub>2</sub>: Disoziatu gabeko forma  
EH<sup>-</sup>: Forma erdi-disoziatua  
E<sup>2-</sup>: Forma disoziatua

$$[E]_{TOT} = [EH_2] + [EH^-] + [E^{2-}]$$

- Disoziazio Kte.-ak:

$$K_1 = \frac{[EH^-][H^+]}{[EH_2]} \rightarrow \frac{[EH^-]}{[EH_2]} = \frac{K_1}{[H^+]}$$

$$K_2 = \frac{[E^{2-}][H^+]}{[EH^-]} \rightarrow \frac{[E^{2-}]}{[EH^-]} = \frac{K_2}{[H^+]} \rightarrow \frac{[E^{2-}]}{[EH_2]} = \frac{K_1 K_2}{[H^+]^2}$$

Funtzioak entzimaren espezie bakoitzerako definitzen dira, forma bakoitzak berea izango du. Frakzio molarraren alderantzizkoak erabiliko ditugu.

- Disoziatu gabeko espeziearen kasuan:

$$f = \frac{[E]_{TOT}}{[EH_2]} = \frac{[EH_2] + [EH^-] + [E^{2-}]}{[EH_2]} = 1 + \frac{[EH^-]}{[EH_2]} + \frac{[E^{2-}]}{[EH_2]} = 1 + \frac{K_1}{[H^+]} + \frac{K_2 [EH^-]}{[H^+][EH_2]} =$$

$$= 1 + \frac{K_1}{[H^+]} + \frac{K_2}{[H^+]} + \frac{K_1}{[H^+]} = 1 + \frac{K_1}{[H^+]} + \frac{K_2 K_1}{[H^+]^2}$$

- Espezie erdi disoziatuaren kasuan:

$$f = \frac{[E]_{TOT}}{[EH^-]} = \frac{[EH_2] + [EH^-] + [E^{2-}]}{[EH^-]} = \frac{[H^+]}{K_1} + 1 + \frac{K_2}{[H^+]}$$

- Espezie disoziatuaren kasuan:

$$f = \frac{[E]_{TOT}}{[E^{2-}]} = \frac{[EH_2] + [EH^-] + [E^{2-}]}{[E^{2-}]} = \frac{[EH_2]}{[E^{2-}]} + \frac{[EH^-]}{[E^{2-}]} + 1 = \frac{[EH^-][H^+]}{K_1[E^{2-}]} + \frac{[H^+]}{K_2} + 1 =$$

$$= \frac{[H^+]^2}{K_1 K_2} + \frac{[H^+]}{K_2} + 1$$

Ekuazio hauek abiadura ekuazioak errazteko baliagarriak dira, baita entzima totala ezagutzeko ere. Eta esan bezala, funtzioak frakzio molarren inbertsoak dira, beraz:

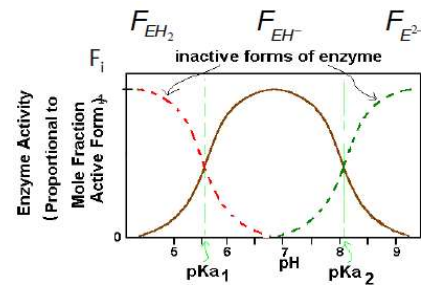
$$[E]_{TOT} = f[EH_2] = f^{-}[EH^-] = f^{2-}[E^{2-}]$$

Frakzio molarrak kalkulatz, irudikapena egin ahal izango dugu:

$$F_{EH_2} = \frac{[EH_2]}{[E]_{TOT}} = \frac{1}{1 + \frac{K_1}{[H^+]} + \frac{K_1 K_2}{[H^+]^2}}$$

$$F_{EH^-} = \frac{[EH^-]}{[E]_{TOT}} = \frac{1}{1 + \frac{[H^+]}{K_1} + \frac{K_2}{[H^+]}}$$

$$F_{E^{2-}} = \frac{[E^{2-}]}{[E]_{TOT}} = \frac{1}{1 + \frac{[H^+]}{K_2} + \frac{[H^+]^2}{K_1 K_2}}$$



- Ebaki puntuak:

$F_{EH^-}$	$F_{E^{2-}}$	
$[H^+] = K_1$	$[H^+] = \sqrt{K_1 K_2}$	$F_{EH_2}$
	$[H^+] = K_2$	$F_{EH^-}$

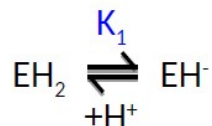
Frakzio molarrak jakinik goiko irudikapena lortzen da, disoziazio konstantea ezagutzea baimenduko diguna, eta baita alderantziz ere. Muturreko pH-tan frakzio molarrak ia arbuigarriak dira.

Aktibitate pH optimoa kalkulatzeko entzimaren forma erdi disoziatua hartzen dugu kontuan, entzimaren forma aktiboa.

$$F_{EH^-} = \frac{[EH^-]}{[E]_{TOT}} = \frac{1}{1 + \underbrace{\frac{[H^+]}{K_1} + \frac{K_2}{[H^+]}}_{f^-}} = \frac{1}{f^-}$$

Frakzio molar hau garrantzitsua da, erreakzionatuko duen forma izango delako, beraz abiadura nola aldatzen den jakin dezakegu ere. Forma erdi disoziatuaren forma molarra hartuta, bi hurbilketa egin daitezke; pH oso azidoa denekoa eta oso basikoa denekoa.

- pH oso azidoan (pH = 2):



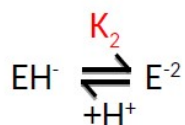
pH oso baxua denean, oreka protonatutako alderuntz bultzatuko du entzimak, disoziatu gabeko eta erdi disoziatutakoaren arteko oreka bat izango dugu, azken produktua arbuigarria izango baita ( $E^{2-}$ ). Entzima kontzentrazio totalean bi espezie bakarrik izango ditugu.

pH honekin, protoi kontzentrazioa oso handia dela esaten ari gara, beraz beste hurbilketa bat egin dezakegu:

$$F_{EH^-} = \frac{1}{f^-} = \frac{1}{\frac{[E^-]_{TOT}}{[EH^-]}} = \frac{1}{\frac{[EH_2] + [EH^-]}{[EH^-]}} = \frac{1}{\frac{[EH_2]}{[EH^-]} + 1} = \frac{1}{1 + \frac{[H^+]}{K_1}} = \frac{K_1}{K_1 + [H^+]} \approx 0$$

Oreka honetan, entzima guztia disoziatu gabeko forman egongo da. Erdiko egoera ere arbuigarria izan daiteke ( $EH^-$ ).

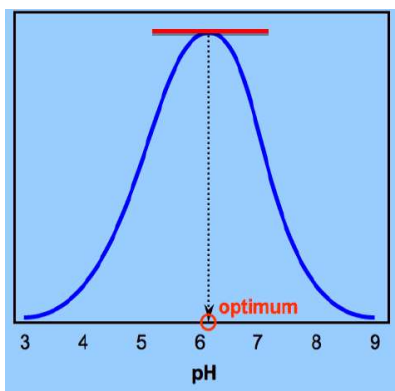
- pH oso basikoan (pH = 9):



Kasu honetan antzera gertatuko da, oraingoan sistemak protoiak askatzeko joera izango duenez, hasierako produktua izango da arbuigarria ( $EH_2$ ).

Protoi kontzentrazioa oso baxua bada:

$$F_{EH^-} = \frac{1}{f^-} = \frac{1}{\frac{[EH^-] + [E^{2-}]}{[EH^-]}} = \frac{1}{1 + \frac{[E^{2-}]}{[EH^-]}} = \frac{1}{1 + \frac{K_2}{[H^+]}} = \frac{[H^+]}{[H^+] + K_2} \approx 0$$



pH optimoa funtzioa deribatuz lortuko dugu. Kurba honetan, forma erdi disoziatuaren funtzioa adierazten ari bagara, hau deribatuz bere pH optimoa jakin ahalko dugu.

$$f = 1 + \frac{[H^+]}{K_1} + \frac{K_2}{[H^+]} \rightarrow f' = \frac{1}{K_1} - \frac{K_2}{[H^+]^2} = 0$$

$$[H^+] = \sqrt{K_1 K_2}$$

Deribatua zerorekin berdinduta, protoi kontzentrazioa jakin dezakegu. Baina –logaritmoak hartuta, entzimaren aktibitate pH optimoa lortuko dugu.

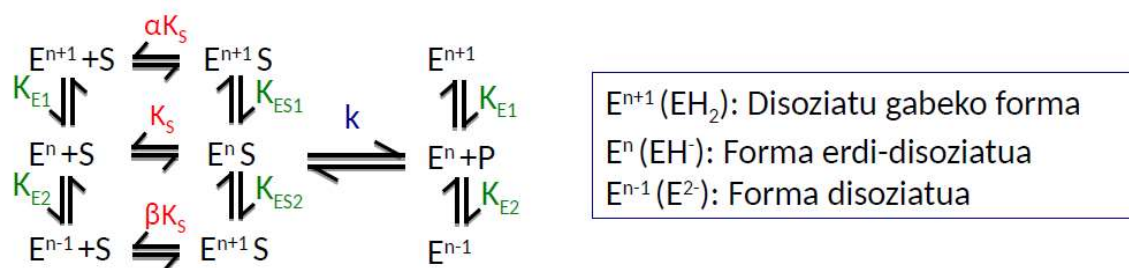
$$pH_{op} = \frac{pK_1 + pK_2}{2} \quad \begin{array}{l} \text{Entzimaren Aktibitate} \\ \text{pH Optimoa} \end{array}$$

### Ionizazio maila anitzeko entzimak

Substratuak sartzen hasiko gara, hemendik aurrera entzimak ionizazio maila desberdinak dituela kontsideratuko dugu.

Gune aktiboan dauden aminoazidoetatik, gehiengoek egitura funtzioan parte hartzen dute, gutxi batzuk bakarrik erreakzio katalitikoa. Aminoazido horien forma ionizatuak lortu behar ditugu, eta entzimek substratuari batzeko ionizazio forma desberdinak dituztela kontsideratu behar dugu. Honek ez du substratuaren batura ekidingo, baina afinitatea alda dezake, eta bakar batek eragingo du produktuaren eraketa.

Hiru espezie lortu daitezkeela kontsideratuko dugu, eta hauek substratuarekin lotzeko gaitasuna izango dute, oreken bidez. Ionizazio egoera desberdinek, ez dakigu afinitatean eraginik duten, beraz hiru konstante desberdin definitzen dira.



$E^{n+1} + S \rightarrow E^n + S$  erreakzioa protoi bat askatuz eman daiteke.  $E^n$ -k protoi bat gutxiago izango du, eta honi beste protoi bat kenduz gero,  $E^{n-1}$  izango dugu.  $E^nS$ , aktibitate katalitiko duen espeziea izango da, eta bertatik  $E^n$  ionizazio maila duen entzima lortuko dugu. Hau berriro disoziatu edo asoziatu daiteke protoiekin. Forma molekular guztiak batuko dira substratura, baina ez afinitate berdinarekin, horregatik ditugu  $\alpha$  eta  $\beta$ .

Eskema horretatik ondorengo ekuazioak atera daitezke:

$$\begin{aligned}
 K_{E_1} &= \frac{[E^n][H^+]}{[E^{n+1}]} & \alpha K_S &= \frac{[E^{n+1}][S]}{[E^{n+1}S]} \\
 K_{E_2} &= \frac{[E^{n-1}][H^+]}{[E^n]} & K_S &= \frac{[E^n][S]}{[E^nS]} \\
 K_{ES_1} &= \frac{[E^nS][H^+]}{[E^{n+1}S]} & \beta K_S &= \frac{[E^{n-1}][S]}{[E^{n-1}S]} \\
 K_{ES_2} &= \frac{[E^{n-1}S][H^+]}{[E^nS]}
 \end{aligned}$$

Eta ekuazio hauetatik ondorengo berdinketak atera ditzakegu, zeinak oso erabilgarriak izango diren hainbat ordezkatze eta sinplifikatze egiteko, hain zuzen ere abiadura ekuazioa definitzeko.

$$\begin{aligned}
 K_{E_1} \cdot \alpha K_S &= K_S \cdot K_{ES_1} \\
 K_{E_2} \cdot K_S &= \beta K_S \cdot K_{ES_2}
 \end{aligned}$$

### Abiadura ekuazioa

Suposatuko dugu protonazio/desprotonazio erreakzioak erreakzio katalitikoak baino azkarragoak direla. Eta  $[EnS]$  izango da erreakzioa emango duen espeziea (aktibitate katalitikoa duena), beraz,  $v=k[E^nS]$ .

Entzimaren kontzentrazio totala zein den jakin beharko dugu abiadura definitzeko:

$$[E]_{TOT} = [E^{n+1}] + [E^n] + [E^{n-1}] + [E^{n+1}S] + [E^nS] + [E^{n-1}S]$$



Espezie guztien kontzentrazioak  $[E^*]$ ren baitan jarriko dugu, eta azkenik  $\alpha$  eta  $\beta$  parametroak ordezkatuko ditugu zentroen arteko berdintzak erabiliz:

$$\begin{aligned}
 [E]_{TOT} &= \frac{[E^n][H^+]}{K_{E1}} + [E^n] + \frac{K_{E2}[E^n]}{[H^+]} + \frac{[E^{n+1}][S]}{\alpha K_S} + \frac{[E^n][S]}{K_S} + \frac{[E^{n+1}][S]}{\beta K_S} = \\
 &= \frac{[E^n][H^+]}{K_{E1}} + [E^n] + \frac{K_{E2}[E^n]}{[H^+]} + \frac{[E^n][H^+][S]}{K_{E1} \cdot \alpha K_S} + \frac{[E^n][S]}{K_S} + \frac{K_{E2}[E^n][S]}{\beta K_S [H^+]} \\
 [E]_{TOT} &= [E^n] \cdot \left[ \frac{[H^+]}{K_{E1}} + 1 + \frac{K_{E2}}{[H^+]} + \frac{[H^+][S]}{K_{E1} \cdot \alpha K_S} + \frac{[S]}{K_S} + \frac{K_{E2}[S]}{\beta K_S [H^+]} \right] \\
 [E]_{TOT} &= [E^n] \cdot \left[ \frac{[H^+]}{K_{E1}} + 1 + \frac{K_{E2}}{[H^+]} + \frac{[H^+][S]}{K_{E1} \cdot \alpha K_S} + \frac{[S]}{K_S} + \frac{K_{E2}[S]}{K_S [H^+]} \right]
 \end{aligned}$$

Behin substratu, protoi eta disoziazio konstanteen menpeko entzima totalaren ekuazioa izanik, abiadura ekuazio defini dezakegu:

$$\frac{v}{V_{max}} = \frac{K[E^n S]}{K[E]_{TOT}} \rightarrow \frac{v}{V_{max}} = \frac{[E^n S]}{[E]_{TOT}}$$

$$\begin{aligned}
 \frac{v}{V_{max}} &= \frac{[E^n][S] / K_S}{[E^n] \cdot \left[ \frac{[H^+]}{K_{E1}} + 1 + \frac{K_{E2}}{[H^+]} + \frac{[H^+][S]}{K_{E1} \cdot \alpha K_S} + \frac{[S]}{K_S} + \frac{K_{E2}[S]}{K_S [H^+]} \right]} \\
 \frac{v}{V_{max}} &= \frac{[S]}{\underbrace{K_S \left[ \frac{[H^+]}{K_{E1}} + 1 + \frac{K_{E2}}{[H^+]} \right]}_{fE} + \underbrace{[S] \cdot \left[ \frac{[H^+]}{K_{E1} \cdot \alpha K_S} + 1 + \frac{K_{E2}}{[H^+]} \right]}_{fES}}
 \end{aligned}$$

$fE^-$  entzima erdidisoziatuaren Michaelisen pH funtzioa izango da, eta  $fES^-$  aldiz substratuari batutakoo entzimarena.



$$v = \frac{V_{max} [S]}{(k_s \cdot f_E^-) + ([S] \cdot f_{ES}^-)} = \frac{\frac{V_{max}}{f_E^-} [S]}{k_s \frac{f_E^-}{f_{ES}^-} + [S]}$$

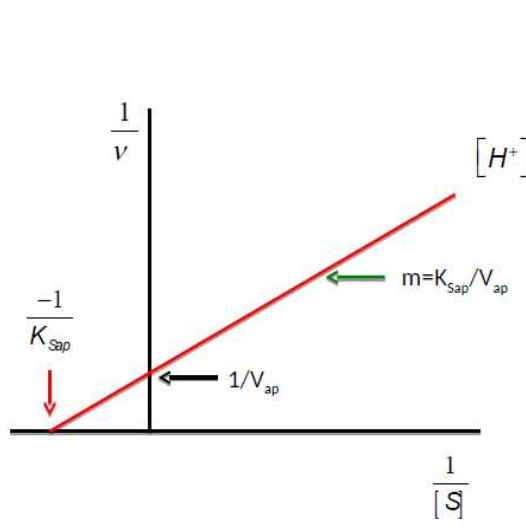
$= V_{maxap} = V_{ap}$   
"K<sub>sap</sub>"

V<sub>maxap</sub> abiadura maximo aparentea da, eta K<sub>sap</sub> aldiz konstante aparentea. Ordezkapena eginez, azkenik abiaduraren definizioa lortuko dugu:

$$v = \frac{V_{maxap} [S]}{K_{sap} + [S]}$$

### Adierazpen grafikoak

Lehenik alderantzizko bikoitza irudikapena egingo da, aurretik kalkulaturako adierazpenez baliatuz. Hemen pH ezberdinetan egingo dira neurketak, eta bakoitzean malda eta ebaki puntua ezberdinak izango dira, pH-aren menpekoak baitira.



$$\frac{1}{v} = \frac{K_{sap}}{V_{ap}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{ap}}$$

y m x b

$$m = \frac{K_{sap}}{V_{ap}} = \frac{K_s f_E^- / f_{ES}^-}{V_{max} / f_{ES}^-} = \frac{K_s}{V_{max}} f_E^-$$

$$b = \frac{1}{V_{ap}} = \frac{1}{V_{max} / f_{ES}^-} = \frac{f_{ES}^-}{V_{max}}$$

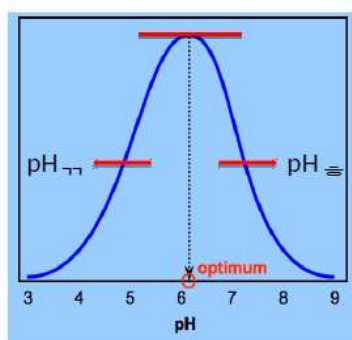
$\alpha$  eta  $\beta$  parametroek balio berdin zein ezberdinak izan ditzakete, eta kasu bakoitzean eragina ezberdina izango da:

### 1-Substratuaren baturak ez duenean eraginik protonizazio eta desprotonizazio Kteetan:

$$\alpha = \beta = 1 \quad \Rightarrow \quad \begin{matrix} K_{ES1} = K_{E1} \\ K_{ES2} = K_{E2} \end{matrix} \quad \Rightarrow \quad \begin{matrix} f_E^- = f_{ES}^- \\ K_{Sap} = K_S \end{matrix}$$

### 2-Substratuaren entzimari protonizazio eta desprotonizazio Kteetan eragiten duenean:

$$\alpha \neq \beta \neq 1 \quad \Rightarrow \quad \begin{matrix} K_{ES1} \neq K_{E1} \\ K_{ES2} \neq K_{E2} \end{matrix} \quad \Rightarrow \quad \begin{matrix} f_E^- \neq f_{ES}^- \\ K_{Sap} \neq K_S \end{matrix}$$



$$K_{Sap} = K_S \frac{f_E^-}{f_{ES}^-} = K_S \frac{1 + \frac{[H^+]}{K_{E1}} + \frac{K_{E2}}{[H^+]}}{1 + \frac{[H^+]}{K_{ES1}} + \frac{K_{ES2}}{[H^+]}}$$

Goikoa konstante aparentearen kasu orokorra da, baina konstante aparenteak muturreko bi pH baliotan neurtuko dira:

- pH baxua,  $[H^+]$  altua

$$K_{Sap} = K_S \cdot \frac{\cancel{1} + \frac{[H^+]}{K_{E1}} + \cancel{\frac{K_{E2}}{[H^+]}}}{\cancel{1} + \frac{[H^+]}{K_{ES1}} + \cancel{\frac{K_{ES2}}{[H^+]}}} = K_S \cdot \frac{\frac{[H^+]}{K_{E1}}}{\frac{[H^+]}{K_{ES1}}} = K_S \cdot \frac{K_{ES1}}{K_{E1}} = \alpha K_S$$

Honegatik, eskema begiratzean ikus daiteke  $\alpha K_S$  entzima espeziea guztiz protonatuta dagoenean azaltzen dela, hau da, protoi kontzentrazioa altua denean.

- pH altua,  $[H^+]$  baxua

$$K_{SAP} = K_S \cdot \frac{1 + \frac{[H^+]}{K_{E1}} + \frac{K_{E2}}{[H^+]}}{1 + \frac{[H^+]}{K_{ES1}} + \frac{K_{ES2}}{[H^+]}} = K_S \cdot \frac{\frac{K_{E2}}{[H^+]}}{\frac{K_{ES2}}{[H^+]}} = K_S \cdot \frac{K_{E2}}{K_{ES2}} = \beta K_S$$

Honegatik, eskema begiratzea ikus daiteke  $\beta K_S$  entzima espeziea guztiz desprotonatua dagoenean azaltzen dela, hau da, protoi kontzentrazioa baxua denean.

Jarraian bi irudikapen egingo dira, bata pH baxuetarako eta bestea pH altuetarako. Hauetako bakoitzean, pH bakoitzerako lerro ezberdin bat izango dugu, eta hurbilketak egingo dira.

- pH baxua (2-6)

$$f_{E^-} = 1 + \frac{[H^+]}{K_{E1}} + \frac{K_{E2}}{[H^+]}$$

$$f_{ES^-} = 1 + \frac{[H^+]}{K_{ES1}} + \frac{K_{ES2}}{[H^+]}$$

Kasu honetan 1 ez da arbuizaten pH-a ez delako hain muturrekoa.

### Adierazpen grafikoak

Alderantzizko bikoitza egitean abiaduraren inbertsoa ( $1/v$ ) eta substratu kontzentrazioaren inbertsoa ( $1/[S]$ ) egin behar dira. Hasier batean abiaduraren inbertsoa honakoa izango da:

$$V = \frac{[S] \cdot V_{max}}{K_S \left( 1 + \frac{[H^+]}{K_{E1}} + \frac{K_{E2}}{[H^+]} \right) + [S] \left( 1 + \frac{[H^+]}{K_{ES1}} + \frac{K_{ES2}}{[H^+]} \right)}$$

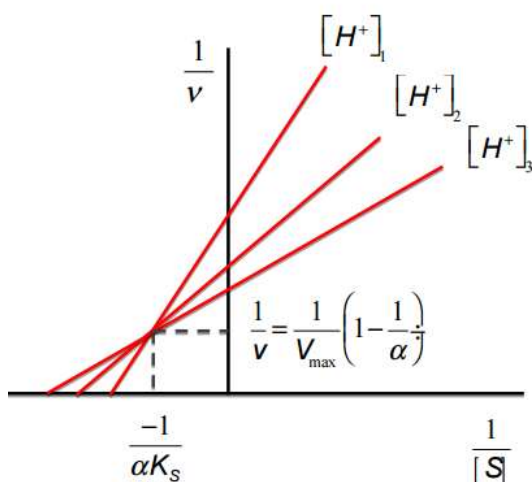
$$\frac{1}{V} = \frac{K_S}{V_{max}} \cdot \left( 1 + \frac{[H^+]}{K_{E1}} + \frac{K_{E2}}{[H^+]} \right) \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \left( 1 + \frac{[H^+]}{K_{ES1}} + \frac{K_{ES2}}{[H^+]} \right)$$

Bi motako irudikapenak egingo dira, bat pH altuei dagokiona eta bestea pH baxuei dagokiona.

- pH baxua:  $[H^+]$  altua

$[H^+]$  izendatzailean badago, arbuaitu egingo da zatiketa hori ekuazioan. Irudikapena egiteko pH desberdinetan alderantzizko bikoitzarekin zuzen bat osatuko da ( $1/v$  vs.  $1/[S]$ ).

#### a) pH baxuetan (pH 2-6): $[H^+]^{77}$



$$v = \frac{V_{ap} [S]}{\alpha K_s + [S]}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{\alpha K_s}{V_{ap}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{ap}}$$

$$\underbrace{\quad}_{y} \quad \underbrace{\quad}_{m} \quad \underbrace{\quad}_{x} \quad \underbrace{\quad}_{b}$$

-Ebaki-puntuak:

$$\frac{1}{[S]} = -\frac{1}{\alpha K_s}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \left( 1 - \frac{1}{\alpha} \right) = \frac{1}{V_{max}} \left( 1 - \frac{K_{E1}}{K_{ES1}} \right)$$

3 ebaki puntu izan ditzazkete:

- 2.kuadrantean
- 3.kuadrantean
- abzisa ardatz negatiboan

Ebaki puntuak emango digun informazioa honakoa izango da: x ardatzetik  $-1/\alpha K_s$  eta Y ardatzetik  $1/v = 1/V_{max} (1 - 1/\alpha)$ . Horren frogapena jarraian dago azalduta:

$$\begin{aligned} \frac{1}{v} &= \frac{K_s}{V_{max}} \left( 1 + \frac{[H^+]}{K_{E1}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \left( 1 + \frac{[H^+]}{K_{ES1}} \right) \\ \frac{K_s}{V_{max}} \left( 1 + \frac{[H^+]}{K_{E1}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \left( 1 + \frac{[H^+]}{K_{ES1}} \right) &= \frac{K_s}{V_{max}} \left( 1 + \frac{[H^+]}{K_{E1}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \left( 1 + \frac{[H^+]}{K_{ES1}} \right) \\ \frac{K_s}{[S]} \left( 1 + \frac{[H^+]}{K_{E1}} \right) - \frac{1}{K_{E1}} &= \frac{[H^+]}{K_{ES1}} - \frac{[H^+]}{K_{ES1}} \\ \frac{K_s}{[S]} \left( \frac{[H^+]}{K_{E1}} - \frac{[H^+]}{K_{E1}} \right) &= \frac{[H^+]}{K_{ES1}} - \frac{[H^+]}{K_{ES1}} \\ \frac{K_s}{[S]} &= \frac{[H^+]}{K_{ES1}} - \frac{[H^+]}{K_{E1}} = \frac{-( [H^+]_1 - [H^+]_2 ) / K_{ES1}}{([H^+]_1 - [H^+]_2) / K_{E1}} = \frac{-K_{E1}}{K_{ES1}} \Rightarrow \frac{K_s}{[S]} = \frac{-1}{\alpha} \\ \frac{1}{[S]} &= \frac{-1}{\alpha K_s} \end{aligned}$$

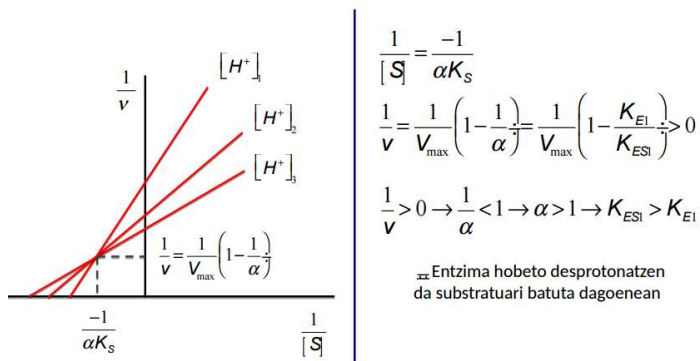
$1/[S]$ -ren balio jakinda,  $1/V$ -ren balioa atera daiteke:

$$\begin{aligned} \frac{1}{v} &= \frac{K_s}{V_{max}} \left( 1 + \frac{[H^+]}{K_{E1}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \left( 1 + \frac{[H^+]}{K_{ES1}} \right) \\ \frac{1}{v} &= \frac{K_s}{V_{max}} \left( 1 + \frac{[H^+]}{K_{E1}} \right) \frac{1}{\alpha K_s} + \frac{1}{V_{max}} \left( 1 + \frac{[H^+]}{K_{ES1}} \right) = \frac{1}{V_{max}} \left( \frac{-1}{\alpha} - \frac{[H^+]}{\alpha K_{E1}} + 1 + \frac{[H^+]}{K_{ES1}} \right) = \\ &= \frac{1}{V_{max}} \left( 1 - \frac{1}{\alpha} \right) \end{aligned}$$

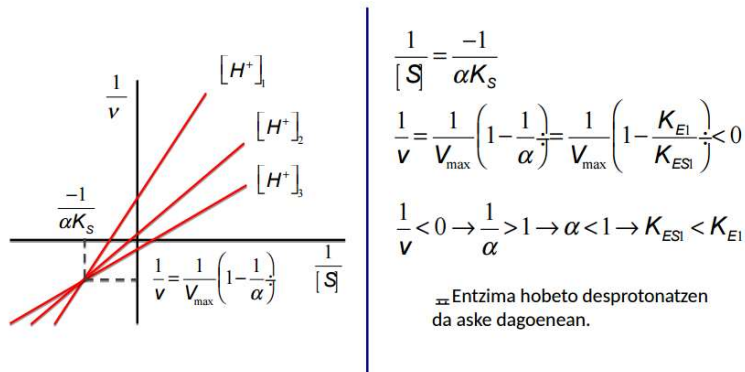
pH desberdinak errepresentatzen dituzten zuzenak koadrante ezberdinetan moztu dezakete elkar:

- 2. Koadrantean: desprotonatzeko joera handiago izango da substantziari batuta egotekoa baino.  $\alpha > 1$  izango da,  $K_{ES1} > K_{E1}$  baita.

1.-Ebaki puntua 2. kuadrantean:

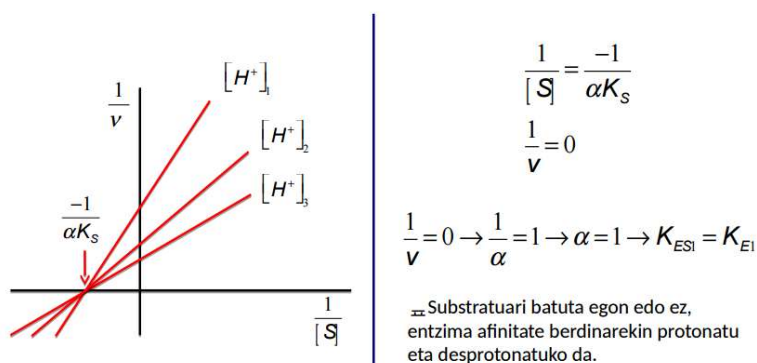


- 3. Koadrantean: protonatuta egoteko joera handiago izango du desprotonatuta egoteko baino.  $\alpha < 1$  izango da,  $K_{ES1} < K_{E1}$  baita.



- X ardatzaren gainean eta balio negatiboetan moztzen bada esan nahi du  $\alpha$ -ren balioa 1-ekoa dela eta  $K_{ES1} = K_{E1}$ .

1.-Ebaki puntua abzisa ardatz negatiboan:

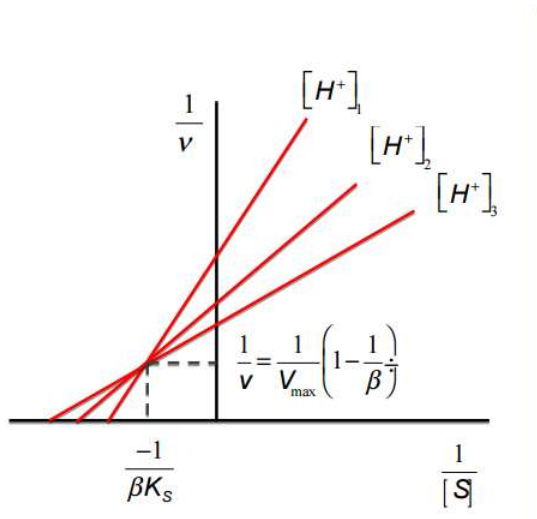


- pH altuak:  $[H^+]$  baxua

Kasu honetan arbuaituko direnak  $[H^+]$  zenbakitzailean dutenak izango dira, kontzentrazio hori oso baxua baita.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_s}{V_{max}} \left( 1 + \frac{K_{E2}}{[H^+]} \right) + \frac{1}{V_{max}} \left( 1 + \frac{K_{ES2}}{[H^+]} \right)$$

b) pH altuetan (pH 8-9):  $[H^+]^{\text{xx}}$



$$v = \frac{V_{ap} [S]}{\beta K_s + [S]}$$

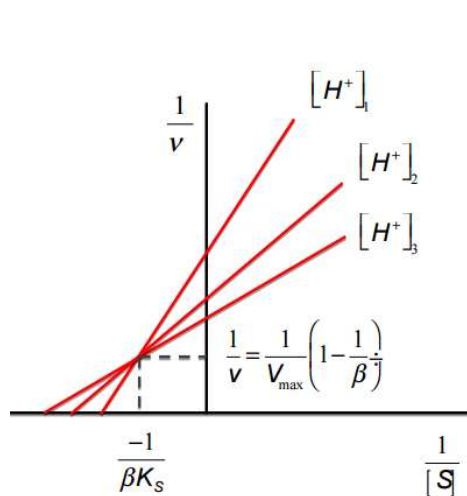
$$\frac{1}{v} = \frac{\beta K_s}{V_{ap}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{ap}}$$

y   m   x   b

Beraz, ebaki puntuaren Y ardatzeko balioak  $(1/V_{max}) \times (1 - 1/\beta)$  emango digu eta X ardatzekoak  $-1/\beta K_s$ .

$\beta$ -ren balioaren arabera, ebaki puntua koadrante ezberdinetan egongo da:

- 2. Koadrantean:  $\beta > 1$  izango da eta  $K_{E2} > K_{ES2}$ . Desprotonatzeko joera handiagoa izango du substraturik gabe.



$$\frac{1}{[S]} = \frac{-1}{\beta K_s}$$

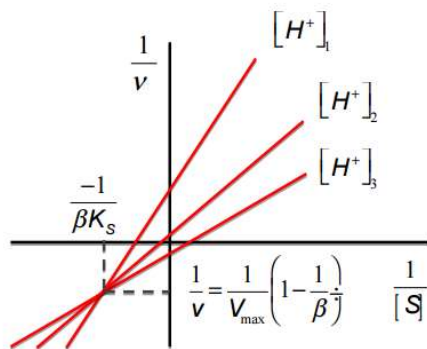
$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \left( 1 - \frac{1}{\beta} \right) = \frac{1}{V_{max}} \left( 1 - \frac{K_{ES2}}{K_{E2}} \right) > 0$$

$$\frac{1}{v} > 0 \rightarrow \frac{1}{\beta} < 1 \rightarrow \beta > 1 \rightarrow K_{E2} > K_{ES2}$$

xx Entzima hobeto desprotonatzen da aske dagoenean

- 3. Koadrantean:  $\beta < 1$  izango da eta  $K_{E2} < K_{ES2}$ . Errazago desprotonatuko da substratuari lotuta.





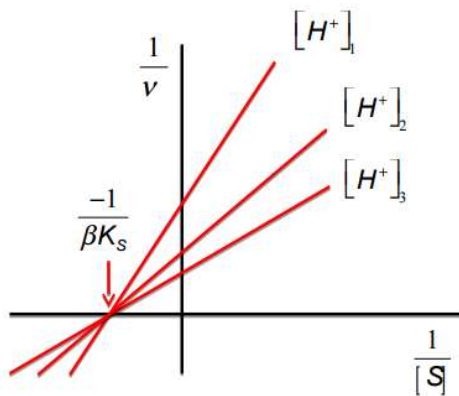
$$\frac{1}{[S]} = \frac{-1}{\beta K_S}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} \left( 1 - \frac{1}{\beta} \right) = \frac{1}{V_{\max}} \left( 1 - \frac{K_{ES2}}{K_{E2}} \right) < 0$$

$$\frac{1}{v} < 0 \rightarrow \frac{1}{\beta} > 1 \rightarrow \beta < 1 \rightarrow K_{E2} < K_{ES2}$$

Entzima hobeto desprotonatzen da substratura batuta dagoenean.

- X ardatzean ebaki-puntua:  $\beta=1$  izango da eta  $K_{E2}=K_{ES2}$ . Substratuari batuta egon edo ez, entzima afinitate berdinarekin protonatu eta desprotonatuko da.



$$\frac{1}{[S]} = \frac{-1}{\beta K_S}$$

$$\frac{1}{v} = 0$$

$$\frac{1}{v} = 0 \rightarrow \frac{1}{\beta} = 1 \rightarrow \beta = 1 \rightarrow K_{E2} = K_{ES2}$$

Substratuari batuta egon edo ez, entzima afinitate berdinarekin protonatu eta desprotonatuko da

Horrela, irudikapen primarioek  $\alpha$  eta  $\beta$  balioak emango dizkigute, baina konstanteak ezagutzeko irudikapen sekundarioak egin beharko ditugu.

Bi irudikapen egingo dira eta bakoitza pH altu nahiz baxuetarako egingo da. Malda vs.  $[H^+]$  irudikapenek  $K_{E1}$  eta  $K_{E2}$ -ren informazioa emango digute eta b vs.  $[H^+]$  irudikapenek  $K_{ES1}$  eta  $K_{ES2}$ -rena.



**IRUDIKAPEN SEKUNDARIOAK :** Aurreko irudikapena erabiliz. Beti kurbak ematen dituzte.

m vs  $[H^+]$   
b vs  $1/[H^+]$

== Kalkulatzeko  $K_{E1}$ ,  $K_{E2}$ ,  $K_{ES1}$ ,  $K_{ES2}$

$$\left. \begin{array}{l} K_{E1} \\ K_{E2} \\ K_s/V_{max} \end{array} \right\} m \quad \left. \begin{array}{l} K_{ES1} \\ K_{ES2} \\ K_s/V_{max} \end{array} \right\} b$$

$$\frac{1}{v} = \underbrace{\frac{K_{Sap}}{V_{ap}}}_{y} \underbrace{\frac{1}{[S]}}_m + \underbrace{\frac{1}{V_{ap}}}_{b}$$

y      m      x      b

$$m = \frac{K_{Sap}}{V_{ap}} = \frac{K_s \frac{f_E^-}{f_{ES}^-}}{V_{max}} = \frac{K_s}{V_{max}} + \frac{K_s}{V_{max}} \frac{[H^+]}{K_{E1}} + \frac{K_s}{V_{max}} \frac{K_{E2}}{[H^+]}$$

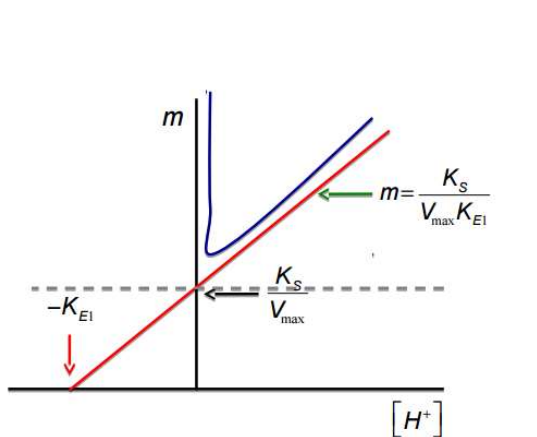
$$m = \frac{K_s}{V_{max}} \left( 1 + \frac{[H^+]}{K_{E1}} + \frac{K_{E2}}{[H^+]} \right)$$

$$b = \frac{1}{V_{ap}} = \frac{1}{V_{max}} = \frac{f_{ES}^-}{f_E^-} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{1}{V_{max}} \frac{[H^+]}{K_{ES1}} + \frac{1}{V_{max}} \frac{K_{ES2}}{[H^+]}$$

$$b = \frac{1}{V_{max}} \left( 1 + \frac{[H^+]}{K_{ES1}} + \frac{K_{ES2}}{[H^+]} \right)$$

- pH baxuetan:  $[H^+]$  altua:

b) pH baxuetan:  $[H^+]^{??}$

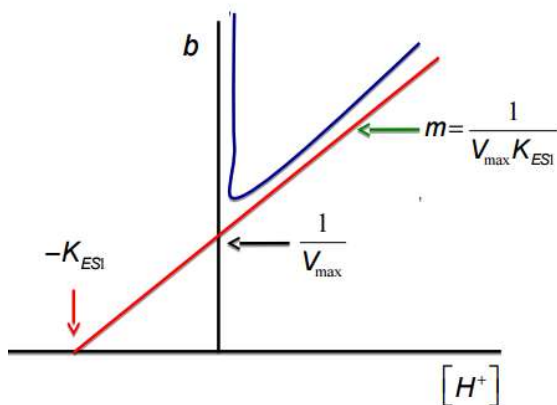


$$m = \frac{K_s}{V_{max}} \frac{[H^+]}{K_{E1}} + \frac{K_s}{V_{max}}$$

y      m      x      b

Hemendik Y ardatzeko ebaki-puntuak  $K_s/V_{max}$  emango digu eta X ardatzekoak  $-K_{E1}$ .

Malda azido eta basikoak irudikatuko bagenitu grafiko berean, irudiko kurba urdina lortuko genuke, informaziorik ematen ez diguna. Horregatik, bi irudikapen desberdin egin behar dira.



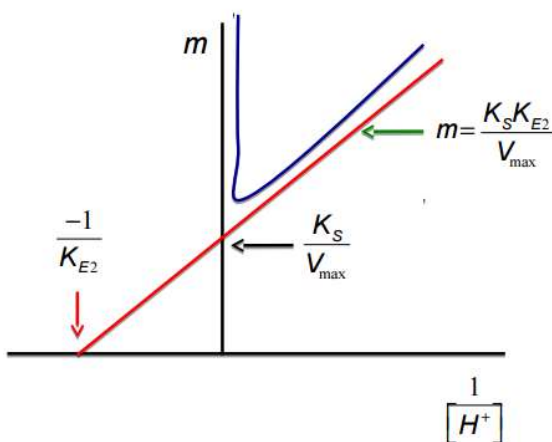
$$b = \frac{1}{V_{\max} K_{ES1}} [H^+] + \frac{1}{V_{\max}}$$

┌ ┌ ┌ ┌  
y m x b

Irudikapen honen ebaki-puntuek  $-K_{ES1}$  eta  $V_{\max}$ -en informazioa emango digute.

- pH altuetan:  $[H^+]$  baxua

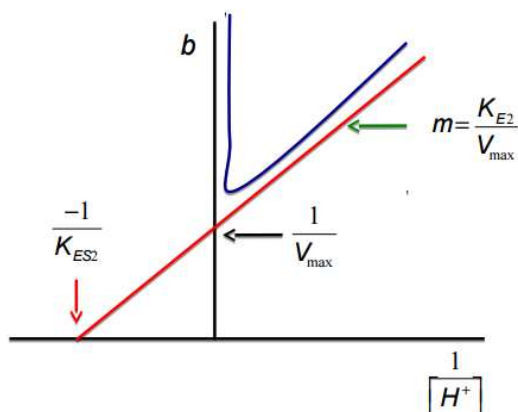
a) pH altuetan:  $[H^+]^{\text{ce}}$



$$m = \frac{K_S K_{E2}}{V_{\max}} \frac{1}{[H^+]} + \frac{K_S}{V_{\max}}$$

┌ ┌ ┌ ┌  
y m x b

pH altuetan malden balioetatik  $K_{E2}$  ezagutu dezakegu.



$$b = \frac{K_{ES2}}{V_{\max}} \frac{1}{[H^+]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

┌ ┌ ┌ ┌  
y m x b

b-ren balioak berriz  $K_{ES2}$  eta  $V_{max}$ -en balioak emango dizkigu.

$\alpha$  eta  $\beta$  balioak ere atera ahal izango dira irudikapen skeundarioen bidez:

▬ Kalkulatzeko  $K_{E1}$ ,  $K_{E2}$ ,  $K_{ES1}$ ,  $K_{ES2}$  eta  $V_{max}$

▬  $K_S$  kalkulatzeko  $K_S/V_{max}$  erabiliko dugu

▬  $\alpha$  eta  $\beta$  kalkulatzeko:

$$\alpha = \frac{K_{ES1}}{K_{E1}} \rightarrow \alpha K_S$$

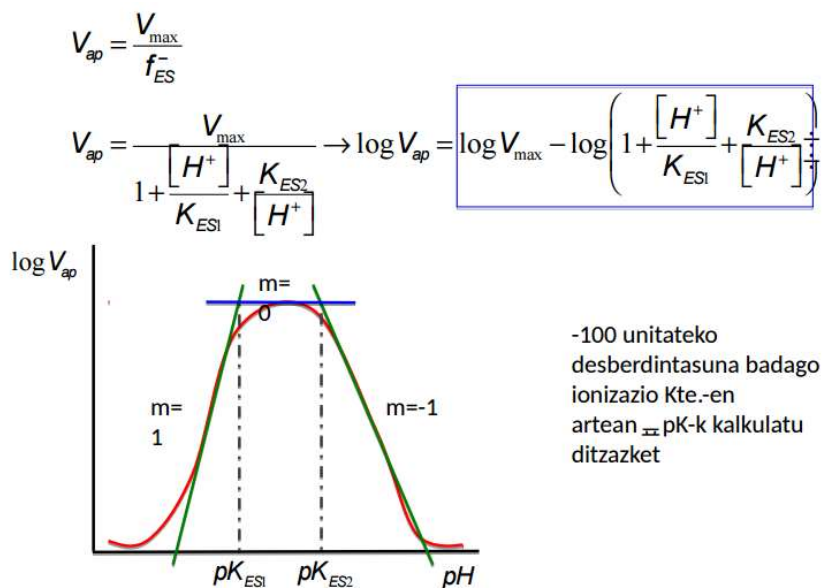
$$\beta = \frac{K_{E2}}{K_{ES2}} \rightarrow \beta K_S$$

➡ Afinitateak kalkulatzeko

▬ Nola eragiten dio pH-ak parametro zinetikoei?

### pH-aren eragina parametro zinetikoengan

#### 1. pH-aren efektua $V_{max}$ -en:



Log  $V_{ap}$  vs. pH irudikapenetik  $pK_{ES}$ -en balioak atera daitezke. Kurbak hiru alde izango ditu: pH azidoetan malda 1-ekoa izango da, malda 0 deneko puntua pH neutroetan eta malda 1 deneko puntua pH basikoetan. pH azidoek  $pK_{ES1}$ -ekin izango dute lotura eta basikoek  $pK_{ES2}$ -ekin, malda 0 deneko zuzenarekin moztzen duten puntuko pH-a izango delarik.

### 1-pH BAXUETAN $[H^+]^{77}$ :

$$\log V_{ap} = \log V_{max} - \log \left( 1 + \frac{[H^+]}{K_{ES1}} + \frac{K_{ES2}}{[H^+]} \right)$$

$$\log V_{ap} = \log V_{max} - \log [H^+] + \log K_{ES1}$$

$$\log V_{ap} = \underbrace{pH}_{\text{y}} + \underbrace{\log V_{max}}_{\text{x}} - \underbrace{pK_{ES1}}_{\text{b}} \quad m=1$$

Abiadura maximora iristean  $V_{ap} = V_{max}$

$$\log \frac{V_{ap}}{V_{max}} = pH - pK_{ES1}$$

$$\log 1 = 0 \quad pH = pK_{ES1}$$

$$m=0 \quad [H^+] = K_{ES1}$$

### 2-pH altuetan: $[H^+]^{cc}$

$$\log V_{ap} = \log V_{max} - \log \left( 1 + \frac{[H^+]}{K_{ES1}} + \frac{K_{ES2}}{[H^+]} \right)$$

$$\log V_{ap} = \log V_{max} + \log [H^+] - \log K_{ES2}$$

$$\log V_{ap} = \underbrace{-pH}_{\text{y}} + \underbrace{\log V_{max}}_{\text{x}} + \underbrace{pK_{ES2}}_{\text{b}} \quad m=-1$$

Abiadura maximora iristean  $V_{ap} = V_{max}$

$$\log \frac{V_{ap}}{V_{max}} = pK_{ES2} - pH$$

$$\log 1 = 0 \quad pH = pK_{ES2}$$

$$m=0 \quad [H^+] = K_{ES2}$$

pH optimoan  $V_{max} = V_{ap}$  izango da.

pH azidoetan, pH optimoa  $pK_{ES1}$ -en berdina izango da:

$$\log V_{max} = \log V_{ap} \rightarrow \log V_{max} - \log V_{ap} = 0 \rightarrow pH - pK_{ES1} = 0 \rightarrow pH = pK_{ES1} \rightarrow [H^+] = K_{ES1}$$

pH basikoetan, berriz, pH optimoa  $pK_{ES2}$ -ren berdina izango da:

$$\log V_{max} = \log V_{ap} \rightarrow \log V_{max} - \log V_{ap} = 0 \rightarrow pH - pK_{ES2} = 0 \rightarrow pH = pK_{ES2} \rightarrow [H^+] = K_{ES2}$$

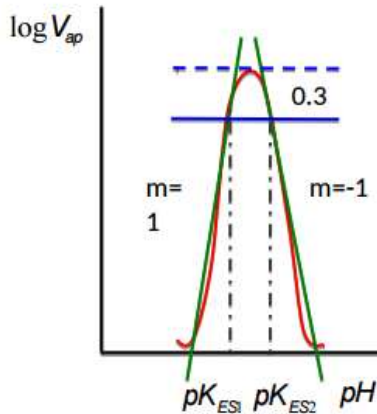
$K_{ES}$  parametroen kalkulurako egiten den hurbilketak baldintza bat bete behar du,  $K_{ES1}$  eta  $K_{ES2}$ -ren artean 100 unitateko desberdintasuna egon behar du, hau da,  $K_{ES1} - K_{ES2} > 100$  izan behar da. Hala ez bada,  $pK$ -k oso gertu egongo dira eta  $V_{max}$  kalkulatzeko zaila izango da. Kasu horretan,  $m = 0$  zuzena 0,3 unitate jaitsiko da eta ebaki puntu berrietatik kalkulatu dira konstanteak:

### 1-pH-AREN EFEKTUA ABIADURA MAXIMOAN:

100 unitateko desberdintasuna ez dagoenean ionizazio Kte.-en artean pK-k oso gertu Abiadura maximoa kalkulatzeko zaila da

Kasu hauetan pK 0.3 unitate beherago kalkulatuko dira.

0.3 unitateen jatorria:



$$\log V_{ap} = \log V_{max} - \log \left( 1 + \frac{[H^+]}{K_{ES1}} \right)$$

$$\log V_{ap} = -\log(1+1) + \log V_{max}$$

$$\log V_{ap} = \log V_{max} - 0.3$$

pK-k oso gertu daude berain artean eta pH optimoarekin

### Nola eraqiten dio pH-ak parametro zinetikoei?

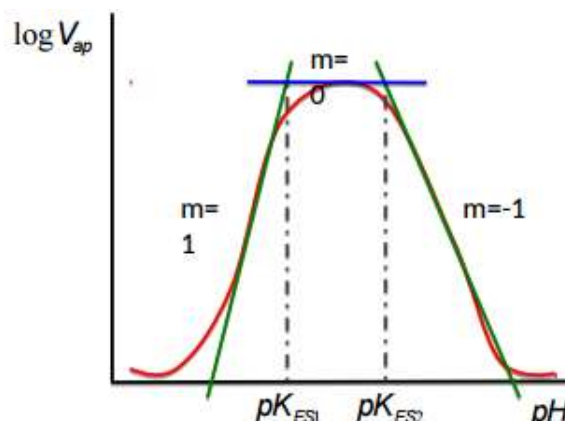
#### 1. pH-aren efektua abiadura maximoan:

Intereseko parametroen balioak lortzeko bi irudikapen egin daitezke: bata abiadura aparentearen logaritmoa eta pH-a erlazioatuko ditu eta besteak aldiz, abiadura aparente eta Ks aparentearen arteko zatiketaren logaritmoa eta pH-a.

#### Log Vap vs. pH:

Kurban hiru puntu kritiko egongo dira, zeintzuetatik 0,1 eta -1 baliodun maldak dituzten zuzenak lortu daitezkeen. Beraz, kurbatik abiatuta malda horiek dituzten hiru lerro eraikiko ditugu, izan ere, zuzen hauen arteko ebaki puntuak izango dira gure intereseko parametroen adierazgarri.

Malda = 0 eta malda = 1 duten lerroek mozten duten puntuan protoi kontzentrazioa  $K_{ES1}$ -ren berdina izango da. Aldiz, malda = 0 eta malda = -1 duten lerroek ebakitzen duten puntuan protoi kontzentrazioa  $K_{ES2}$ -ren berdina izango da. Hori, horrela izanik eta kontuan hartuta X ardatzean pH-a daukagula eta ez protoi kontzentrazioa, mozte puntu horietatik  $pK_{ES1}$  eta  $pK_{ES2}$  parametroak eskura ditzakegu.



Kontuan hartu irudikapen honi erlazionaturik dagoen ekuazioa jarraian azaldutakoa dela, zeinak pH-aren efektua abiadura eta konstante aparentean erlazionatzen dituen.

$$V_{ap} = \frac{V_{max}}{f_{ES}^-}$$

$$V_{ap} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{[H^+]}{K_{ES1}} + \frac{K_{ES2}}{[H^+]}} \rightarrow \log V_{ap} = \log V_{max} - \log \left( 1 + \frac{[H^+]}{K_{ES1}} + \frac{K_{ES2}}{[H^+]} \right)$$

Hala ere, honek soilik konstanteak elkarrengandik nahiko urrun dauden egoeretarako balio du, hau da, 100 unitateko desberdintasuna badago ionizazio konstanteen artean kalkula daitezke pK-ak.

Gertuegi badaude beste hurbilketa bat egin behar da akatsak murrizteko: malda zero duen zuzena 0,3 unitate jeitsiko da Y ardatzean. Baina zergatik 0,3 unitate?

Izan ere, protoi kontzentrazioa eta  $K_{ES1}$ -en balioa oso antzekoa izango denez hauen arteko zatiketa 1 izango da. Beraz, aurretik planteaturiko ekuazioa honela geratuko litzateke:

$$\log V_{ap} = \log V_{max} - \log \left( 1 + \frac{[H^+]}{K_{ES1}} \right)$$

Log (1+1) = log 2 izango da, 0,3-ko balioa ematen duena.

$$\log V_{ap} = -\log(1+1) + \log V_{max}$$

$$\log V_{ap} = \log V_{max} - 0.3$$

Behin malda zero duen zuzena 0,3 unitate jeistean, malda 1 eta -1 duten lerroak irudikatzen dira, eta aurreko kasuan bezala hauen ebaki puntuetatik intereseko konstanteak lortzen dira.

#### Log $V_{ap}/K_{s_{ap}}$ vs. pH:

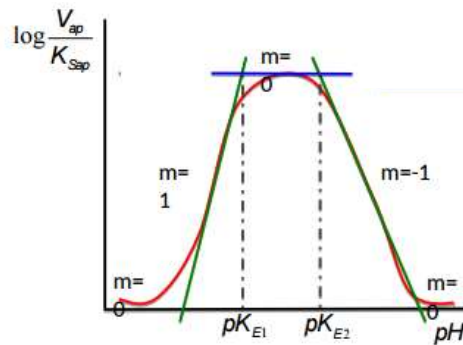
Kasu honetan ere intereseko konstanteak lortu ahal izateko malda 0,1 eta -1 direneko zuzenak marrazten dira eta lerroak mozten diren puntuetatik  $K_{E1}$  eta  $K_{E2}$  parametroak lortzen dira.

Kasu honetan ere posible da behar izanez gero malda zero duen lerroa 0,3 unitate jeistea Y ardatzean.

Lortuko den irudikapena eta irudikapen hau eskuratzeko beharrezko ekuazioa jarraian azaldutakoak izango dira.

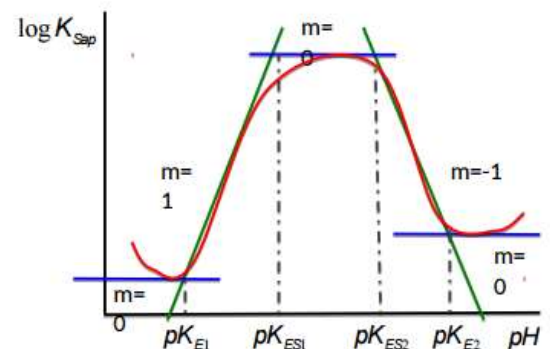
$$\frac{V_{ap}}{K_{Sap}} = \frac{\frac{V_{max}}{f_{ES}^-}}{K_S \frac{f_E^-}{f_{ES}^-}} \rightarrow \frac{V_{ap}}{K_{Sap}} = \frac{V_{max}}{K_S} \frac{1}{1 + \frac{[H^+]}{K_{E1}} + \frac{K_{E2}}{[H^+]}}$$

$$\log \frac{V_{ap}}{K_{Sap}} = \log \frac{V_{max}}{K_S} + \log f_E^-$$



Klasean horrenbeste aipatu ez bada ere, posible da  $K_S$  aparentearen logaritmoa eta pH-a eralzionatuko dituen irudikapena lortzea eta nahiz eta informazio nahikoa lortu daitekeen ez da horrenbeste erabiltzen errore gehiegi ematen dituelako.

$$K_{Sap} = K_S \frac{f_E^-}{f_{ES}^-} = K_S \frac{1 + \frac{[H^+]}{K_{E1}} + \frac{K_{E2}}{[H^+]}}{1 + \frac{[H^+]}{K_{ES1}} + \frac{K_{ES2}}{[H^+]}} \rightarrow \log \frac{K_{Sap}}{K_S} = pf_E^- - pf_{ES}^-$$



**Gogoratu!** pH baxuetan, malda = 1 eta malda = 0 duten lerroak eskuratuko ditugu eta hauek erlazionatuz dagokion parametroak eskura ditzakegu.

$$\log V_{ap} = \log V_{max} - \log \left( 1 + \frac{[H^+]}{K_{ES1}} + \frac{K_{ES2}}{[H^+]} \right)$$

Abiadura maximora iristean  $V_{ap} = V_{max}$

$$\log V_{ap} = \log V_{max} - \log [H^+] + \log K_{ES1}$$

$$\log V_{ap} = pH + \log V_{max} - pK_{ES1} \quad m=1$$

$$\underbrace{\log V_{ap}}_y = \underbrace{pH}_x + \underbrace{\log V_{max} - pK_{ES1}}_b$$

$$\log \frac{V_{ap}}{V_{max}} = pH - pK_{ES1}$$

$$\log 1 = 0$$

$$m=0$$

$$pH = pK_{ES1}$$

$$[H^+] = K_{ES1}$$

Aldiz, pH altuetan malda = -1 eta malda = 0 duten lerroak lortuko ditugu.



$$\log V_{ap} = \log V_{max} - \log \left( 1 + \frac{[H^+]}{K_{ES1}} + \frac{K_{ES2}}{[H^+]^2} \right)$$

$$\log V_{ap} = \log V_{max} + \log [H^+] - \log K_{ES2} \quad \log \frac{V_{ap}}{V_{max}} = pK_{ES2} - pH$$

$$\log V_{ap} = -pH + \log V_{max} + pK_{ES2} \quad m = -1$$

$\underbrace{\quad}_{y} \quad \underbrace{\quad}_{x} \quad \underbrace{\quad}_{b}$

$\log 1 = 0$   
 $m = 0$

$pH = pK_{ES2}$   
 $[H^+] = K_{ES2}$

### ARIKETETARAKO GOMENDIOAK

1-5 ariketetan  $V_{max}$  eta  $K_s$  balioak ematen dira pH desberdinetarako, abiadura apartentea eta  $K_s$  aparentea alegia. Honen logaritmoak lortu eta grafikoki erlazionatuko dira eta malda jakineko (0,1 eta -1) lerroak identifikatu hauen ebaki puntuetatik konstanteak lortzeko. Ondoren eskatzen diren parametroen balioak apunteetan ikusitako formuletatik ateratakoak dira. Hona hemen horietako batzuk:

$$\alpha = K_{ES1} / K_{E1}$$

$$\theta = K_{ES2} / K_{E2}$$

$$V_{max} = K [E]_{tot}$$

2. ariketan eskatzen da zein talde ionizagarri egon daitekeen katalisian inplikaturik. Gogoratu,  $K_{ES2}$ -ak substratuari loturiko entzima desprotonatzen deneko pH-a adierazten duela eta hain zuzen ere, pH hori dela aktibitatearen erregulazioa jokoan dagoeneko puntua. Beraz, konstantearen balioa lortu eta taulan ikusi behar da ea zein aa egon daitekeen protonatzen edo desprotonatzen.

6. ariketan hasierako abiaduren inguruko datuak dauzkagu, pH desberdinetan eta substratu kontzentrazio desberdinetarako. Bi irudikapen egin behar dira pH baxu eta altuetarako: azidoak alde batetik (pH 7a barne) eta basikoak bestetik. Y ardatzean  $1/v$  eta X ardatzean  $1/[S]$  jarriko da. Horrela, azidoen kasuan Y ardatzaren ebaki puntua  $\alpha K_s$  izango da eta basikoetan aldiz,  $\theta K_s$ . Irudikapen sekundariotik  $V_{max}$  eta konstanteen balioak lortu daitezke.