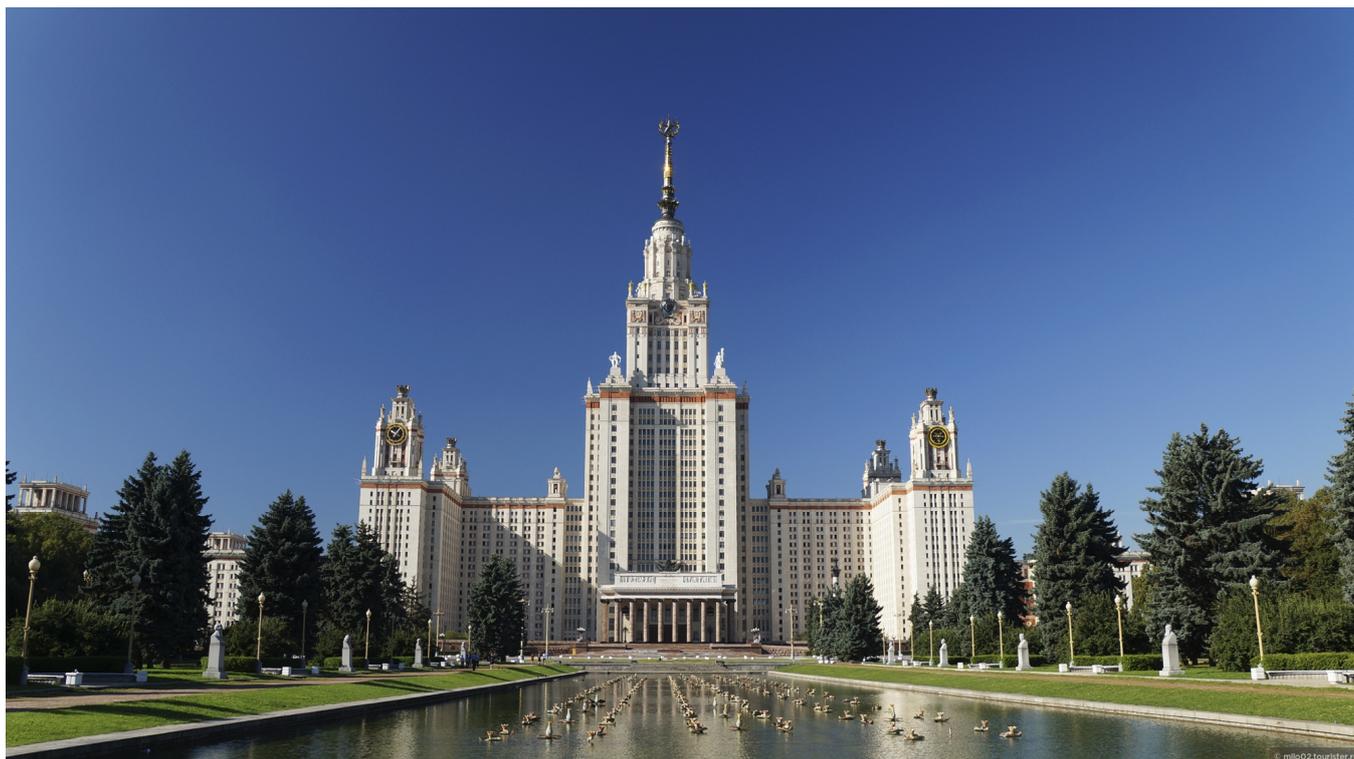


**Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова  
Химический факультет**



***М.В. Жирякова, Л.А. Тифлова,  
В.М. Белова, Е.В. Скокан***

***Задачи практикума по физической химии  
Исследование кинетики ферментативной  
реакции. Определение параметров уравнения  
Михаэлиса–Ментен***

**МОСКВА 2020**

**Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова**  
**Химический факультет**

***М.В. Жирякова, Л.А. Тифлова,  
В.М. Белова, Е.В. Скокан***

**Задачи практикума по физической химии**  
***Исследование кинетики ферментативной  
реакции. Определение параметров уравнения  
Михаэлиса–Ментен***

Методическая разработка для студентов,  
выполняющих лабораторные работы в практикуме по физической химии

Утверждено методической комиссией кафедры физической химии

**МОСКВА 2020**

## СОДЕРЖАНИЕ

I. Теоретическое введение .....	4
Строение и свойства ферментов .....	4
Кинетика ферментативных реакций .....	7
Механизм и кинетика пероксидазного окисления иодид-ионов .....	12
II. Экспериментальная часть .....	17
Работа 1. Определение эффективных значений максимальной скорости реакции и константы Михаэлиса по иодиду калия .....	18
Работа 2. Определение эффективных значений максимальной скорости реакции и константы Михаэлиса по пероксиду водорода .....	20
Приложение. Статистическая обработка экспериментальных данных .....	24
Литература .....	30

# І. Теоретическое введение

## Строение и свойства ферментов

**Ферменты**, или **энзимы** (от лат. *fermentum*, греч. ζυμη, ενζυμων – дрожжи, закваска) – обычно белковые молекулы или молекулы РНК (рибозимы) или их комплексы, катализирующие химические реакции в живых системах. Термины «фермент» и «энзим» используются как синонимы (первый в основном в русской и немецкой научной литературе, второй – в англо- и франкоязычной). Реагенты в реакции, катализируемой ферментами, называются субстратами, а получающиеся вещества – продуктами.

Как и все белки, ферменты синтезируются в виде линейной цепочки аминокислот (первичная структура), которая скручивается или складывается определённым образом (вторичная структура) за счёт образования водородных связей. Под третичной структурой понимают расположение полипептидной цепи в пространстве в результате дальнейшего сворачивания цепи. Стабилизация двух последних структур осуществляется водородными и дисульфидными связями, силами Ван-дер-Ваальса и различного рода электростатическими взаимодействиями. Третичная структура может разрушаться при нагревании или воздействии некоторых химических веществ. Несколько белковых цепей могут нековалентно объединяться в белковый комплекс (четвертичная структура). Количество субъединиц в таком комплексе может быть от 2 до 3000. Молярная масса ферментов составляет от  $10^4$  до  $10^{10}$  г·моль<sup>-1</sup> и более. Чаще всего встречаются ферменты с молекулярной массой 20-60 тысяч.

В каталитическом акте принимает участие не вся белковая молекула в целом, а лишь определённые участки на её поверхности или располагающиеся в специальном углублении активные центры. Они представляют собой совокупность функциональных групп аминокислотных остатков, непосредственно взаимодействующих с субстратом. Некоторые ферменты выполняют каталитическую функцию сами по себе, безо всяких дополнительных компонентов. Однако есть ферменты, которым для осуществления катализа необходимы компоненты небелковой природы – коферменты. Коферментами могут быть как неорганические молекулы (ионы металлов, железосерные кластеры и др.), так и органические (например, флавин или гем).

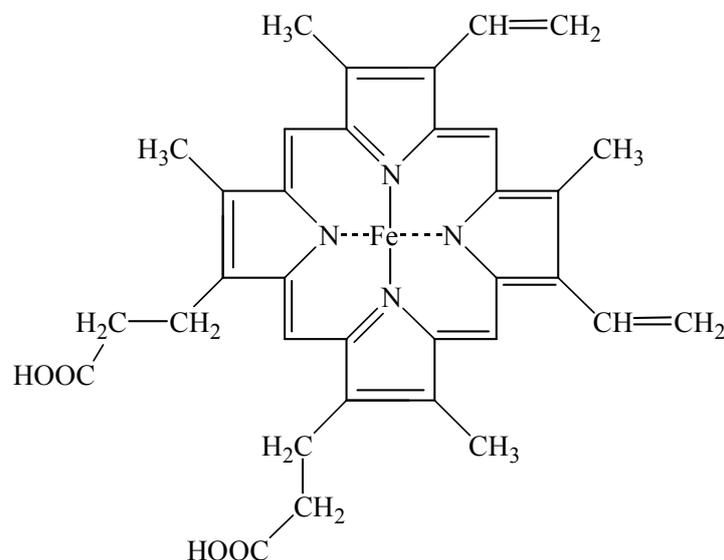
Из особых каталитических свойств ферментов в первую очередь следует упомянуть их уникальную *специфичность* и очень высокую *активность*. Для того чтобы катализировать реакцию, фермент связывается только с одним или несколькими определёнными субстратами. Это достигается частичной комплементарностью формы, распределения зарядов и гидрофобных областей на молекуле субстрата и в центре связывания субстрата на ферменте. Ферментативные реакции протекают со скоростями нередко в  $10^8$ – $10^{15}$  раз большими, чем соответствующие некаталитические процессы. По сравнению с неорганическими искусственными катализаторами ферменты обычно более эффективны в  $10^8$ – $10^9$  раз. Например, константы скорости гидролиза мочевины в присутствии соляной кислоты и уреазы различаются на тринадцать порядков, составляя соответственно  $7.4 \cdot 10^{-7}$  и  $5 \cdot 10^6 \text{ с}^{-1}$ . Активность фермента, определённая с использованием разных субстратов, может различаться в несколько раз. Зависит она также от температуры, pH, степени очистки фермента и других факторов.

По типу катализируемых реакций ферменты подразделяют на 6 классов согласно иерархической классификации ферментов, которая была предложена Международным союзом биохимии и молекулярной биологии (International Union of Biochemistry and Molecular Biology):

- **оксидоредуктазы**, катализирующие окисление или восстановление (например, каталаза, алкогольдегидрогеназа);
- **трансферазы**, катализирующие перенос химических групп с одной молекулы субстрата на другую (например, РНК-полимеразы, транскетолаза, аспартат-карбамолитрансфераза);
- **гидролазы**, катализирующие гидролиз химических связей (например, эстеразы, пепсин, трипсин, амилаза);
- **лиазы**, катализирующие разрыв химических связей без гидролиза с образованием двойной связи в одном из продуктов, а также обратные реакции – присоединения по двойным связям (например, карбокси-лиазы, гидро-лиазы, аммиак-лиазы);
- **изомеразы**, катализирующие структурные или геометрические изменения в молекуле субстрата (например, малеинатизомераза);

- **лигазы**, катализирующие образование химических связей между субстратами за счёт гидролиза АТФ (например, глутамин-синтетаза, ДНК-полимераза).

**Пероксидазы** – ферменты класса оксидоредуктаз, катализирующие окисление с помощью перекиси водорода ( $H_2O_2$ ) или органических перекисей, которые действуют как акцепторы водорода различных веществ (полифенолов, алифатических и ароматических аминов, а также жирных кислот, цитохрома, глутатиона и др.). Пероксидазы присутствуют преимущественно в растениях, их также можно обнаружить в лейкоцитах крови и в молоке; они участвуют в фотосинтезе, энергетическом обмене, в трансформации пероксидов и веществ, чужеродных организму. Пероксидазы, выделенные из различных источников, различаются молярной массой и субстратной специфичностью. Наиболее подробно изучена растительная пероксидаза из корней хрена (молярная масса  $\approx 44100 \text{ г}\cdot\text{моль}^{-1}$ ), молекула которой состоит из одной полипептидной цепи (308 аминокислотных остатков), связанной ковалентно с 8 олигосахаридными цепями. Молекула содержит также нековалентно связанную простетическую группу (рис. 1), которая близка гему гемоглобина (последний обладает слабой пероксидазной активностью):

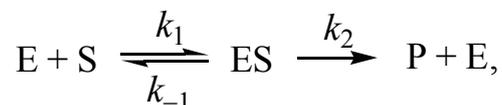


**Рис. 1.** Схема простетической группы пероксидазы

Пероксидазу применяют в экспериментальной и практической медицине для иммуноферментного анализа, а также в аналитических целях, например, для определения загрязнений в окружающей среде.

## Кинетика ферментативных реакций

В основе кинетического анализа ферментативных процессов лежит предположение о том, что между ферментом E и субстратом S обратимо образуется промежуточный продукт – фермент-субстратный комплекс ES, который необратимо превращается в продукт P с константой скорости первого порядка:



где  $k_1$ ,  $k_{-1}$  и  $k_2$  – константы скоростей элементарных реакций.

Обычно ферментативные реакции проводят в избытке субстрата по сравнению с ферментом. Поэтому фермент практически полностью входит в состав фермент-субстратного комплекса ES. Благодаря этому концентрация ES практически постоянна в ходе реакции, т.е. не зависит от времени (квазистационарна). В этом случае можно записать, что

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES] = 0.$$

Учтём тот факт, что фермент, изначально существовавший только в свободной форме, в процессе реакции находится как в виде фермент-субстратного комплекса, так и в виде молекул свободного фермента:

$$[E]_0 = [E] + [ES].$$

Выразим отсюда концентрацию фермента

$$[E] = [E]_0 - [ES]$$

и подставим её в уравнение квазистационарности:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1([E]_0 - [ES])[S] - (k_{-1} + k_2)[ES] = k_1[E]_0[S] - (k_1[S] + k_{-1} + k_2)[ES] = 0.$$

Тогда концентрация фермент-субстратного комплекса

$$[ES] = \frac{k_1[E]_0[S]}{k_1[S] + k_{-1} + k_2}.$$

Скорость ферментативной реакции в целом, т.е. скорость образования продукта, представляет собой скорость распада фермент-субстратного комплекса с константой  $k_2$ :

$$r = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] = \frac{k_1 k_2 [E]_0 [S]}{k_1 [S] + k_{-1} + k_2}.$$

Разделим числитель и знаменатель на  $k_1$  и получим уравнение

$$r = \frac{k_2 [E]_0 [S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]} = \frac{k_2 [E]_0 [S]}{K_M + [S]},$$

в котором выражение  $\frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$  называется константой Михаэлиса  $K_M$ . Это кинетическая константа с размерностью концентрации, равная такой концентрации субстрата, при которой скорость ферментативной реакции составляет половину от максимального значения и половина исходного количества фермента оказывается связанной в фермент-субстратный комплекс. Численное значение  $K_M$  зависит от многих факторов (рН, температуры, присутствия ингибиторов или активаторов) и изменяется в довольно широких пределах – примерно от 1 до  $10^{-8}$  моль·л<sup>-1</sup>.

Для начальной стадии реакции (без учёта количества образующегося продукта,  $[P] \rightarrow 0$ ), проводимой в условиях избытка субстрата по сравнению с ферментом ( $[S]_0 \gg [E]_0$ ), уменьшением концентрации субстрата можно пренебречь, и уравнение материального баланса для субстрата можно записать следующим образом:

$$[S]_0 = [S] + [ES] + [P] \approx [S].$$

Тогда выражение для начальной скорости реакции приобретает вид:

$$r_0 = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0}{K_M + [S]_0}. \quad (1)$$

Если  $k_{-1} \gg k_2$ , то на первой стадии ферментативной реакции с течением времени устанавливается квазиравновесие, и в выражение для скорости ферментативной реакции входит уже не константа Михаэлиса, а субстратная константа  $K_S$ , характеризующая взаимодействие фермента с субстратом в равновесных условиях:

$$r_0 = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0}{\frac{k_{-1}}{k_1} + [S]_0} = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0}{K_S + [S]_0}, \text{ где } K_S = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]}.$$

Проанализируем уравнение (1) для начальной скорости реакции при различных начальных концентрациях субстрата.

1) В случае, когда начальная концентрация субстрата мала по сравнению с константой Михаэлиса,  $[S]_0 \ll K_M$ , то  $r_0 = \frac{k_2[E]_0[S]_0}{K_M}$  и ферментативная реакция имеет первый порядок как по ферменту, так и по субстрату.

2) При больших концентрациях субстрата,  $[S]_0 \gg K_M$ , начальная скорость реакции  $r_0 = k_2[E]_0$  не зависит от концентрации субстрата (реакция имеет нулевой порядок по субстрату) и называется максимальной скоростью ферментативной реакции  $r_{\max}$ . Этот эффект так называемого субстратного насыщения обусловлен практически полным связыванием всего имеющегося в системе фермента в фермент-субстратный комплекс, поэтому его концентрация, а, следовательно, и наблюдаемая скорость реакции перестают зависеть от концентрации субстрата.

Тогда уравнение для начальной скорости реакции можно записать в виде:

$$r_0 = \frac{r_{\max}[S]_0}{K_M + [S]_0}. \quad (2)$$

Это уравнение было получено Бриггсом и Холдейном в 1925 г., но названо ими **уравнением Михаэлиса–Ментен**<sup>1</sup> в честь классических исследований этих учёных, предложивших возможную схему ферментативной реакции и заложивших основы современной энзимологии.

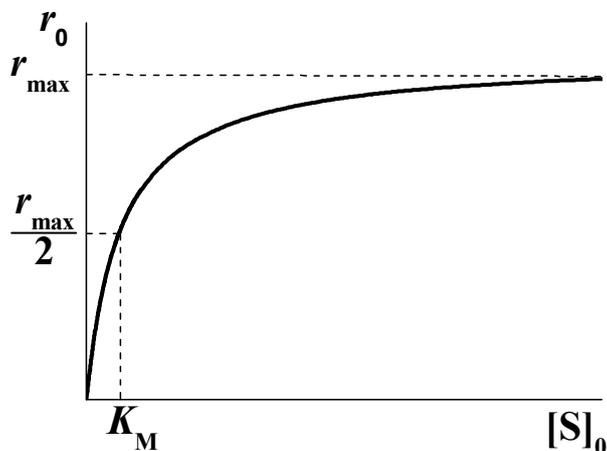
Из известной величины максимальной скорости реакции можно определить  $k_2 = \frac{r_{\max}}{[E]_0}$  – «частоту оборотов», ТОФ, ферментативной реакции, которая определяет молекулярную активность фермента и представляет собой число молей субстрата, превращаемых в продукт одним молем фермента за единицу времени в условиях субстратного насыщения, т. е. когда весь фермент находится только в форме ES.

На рис. 2 представлена зависимость начальной скорости ферментативной реакции от начальной концентрации субстрата. Однако построение такого графика не используется для экспериментального определения максимальной скорости реакции и константы Михаэлиса, т. к. в эксперименте нередко сложно достичь субстратного насыщения (и даже если оно достигнуто, то определить параметры из кривой с

---

<sup>1</sup> Леонор Михаэлис (1875-1949) – немецкий биохимик, физикохимик и физик. Мод Леонора Ментен (1879-1960) – канадский биохимик и гистохимик. Одни из основоположников теории кинетики ферментативных реакций.

насыщением бывает довольно трудно). Величины  $r_{\max}$  и  $K_M$  обычно находят одним из трёх способов, основанных на преобразовании уравнения Михаэлиса–Ментен к линейному виду, удобному для обработки экспериментальных данных.

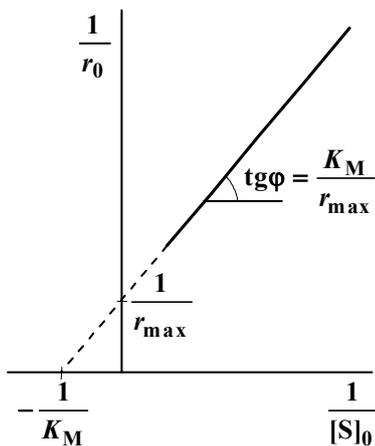


**Рис. 2.** Зависимость начальной скорости ферментативной реакции от начальной концентрации субстрата

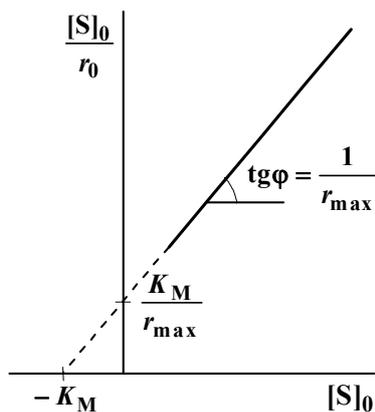
1) *Координаты Лайнуивера–Берка, или двойные обратные координаты.* Линейное уравнение получается из уравнения (2) при замене рассматриваемых величин на обратные:

$$\frac{1}{r_0} = \frac{K_M + [S]_0}{r_{\max} [S]_0} = \frac{K_M}{r_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]_0} + \frac{1}{r_{\max}}. \quad (3)$$

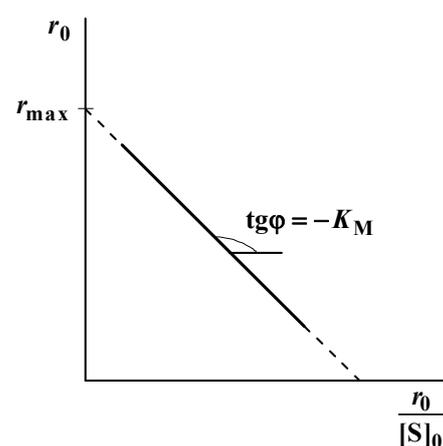
Графически эта форма зависимости приведена на рис. 3. Максимальную скорость можно определить по отрезку, отсекаемому на оси ординат,  $\frac{1}{r_{\max}}$ , а константу Михаэлиса можно вычислить либо по тангенсу угла наклона прямой, равному  $\frac{K_M}{r_{\max}}$ , либо по отрицательному отрезку, отсекаемому на оси абсцисс. Эти координаты наиболее часто используются на практике, несмотря на то, что подчас это наименее точный метод определения параметров уравнения Михаэлиса–Ментен: если начальную концентрацию субстрата  $[S]_0$  варьируют с постоянным шагом, то координаты Лайнуивера–Берка приводят к весьма неравномерному распределению экспериментальных точек на прямой, что снижает точность определения кинетических параметров.



**Рис. 3.** Графическое определение  $K_M$  и  $r_{\max}$  в координатах Лайнуивера-Берка



**Рис. 4.** Графическое определение  $K_M$  и  $r_{\max}$  в координатах Вульфа-Хэйенса



**Рис. 5.** Графическое определение  $K_M$  и  $r_{\max}$  в координатах Иди-Хофсти

2) *Координаты Вульфа-Хэйенса.* Вторая форма линейного уравнения вытекает из предыдущей при умножении обеих частей уравнения (3) на  $[S]_0$ :

$$\frac{[S]_0}{r_0} = \frac{K_M}{r_{\max}} + \frac{[S]_0}{r_{\max}}. \quad (4)$$

Графическая интерпретация этого уравнения приведена на рис. 4. Отрезок, отсекаемый на оси абсцисс, равен  $-K_M$ ; а отрезок, отсекаемый на оси ординат, соответствует  $\frac{K_M}{r_{\max}}$ . Тангенс угла наклона прямой равен  $\frac{1}{r_{\max}}$ .

3) *Координаты Иди-Хофсти.* После умножения обеих частей уравнения (3) на  $r_{\max} \cdot r_0$  получаем уравнение

$$r_0 = r_{\max} - K_M \cdot \frac{r_0}{[S]_0}. \quad (5)$$

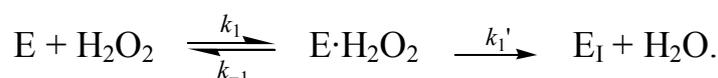
Построение графика в координатах  $r_0 = f\left(\frac{r_0}{[S]_0}\right)$  (рис. 5) даёт прямую линию, тангенс угла наклона которой равен  $-K_M$ , а отрезок, отсекаемый на оси ординат, соответствует  $r_{\max}$ .

Если при обработке опытных данных каким-либо из трёх предложенных способов получена линейная зависимость, это ещё не означает, что реакция протекает по простому механизму, предложенному Михаэлисом и Ментен. Можно показать,

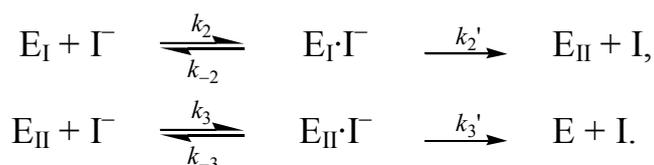
что форма уравнения, аналогичная уравнению (2), может быть получена и для более сложных механизмов реакций, например, при ингибировании.

### Механизм и кинетика пероксидазного окисления иодид-ионов

Окисление иодид-ионов пероксидом водорода в присутствии фермента пероксидазы – сложная двухсубстратная реакция. Для описания этого процесса предложен следующий механизм. Сначала пероксидаза (E) окисляется пероксидом водорода  $H_2O_2$  с образованием комплекса  $E_I$ , в котором атом кислорода связан с ионом железа гема:



Затем следуют две стадии взаимодействия с иодид-ионом, на каждой из которых происходит передача по одному электрону к окисленному активному центру пероксидазы в комплексах  $E_I$  и  $E_{II}$ :



Фактически от активного центра фермента отщепляется продукт реакции  $I_2$ , а не отдельные атомы I. Скорость реакции равна

$$r = \frac{d[I_2]}{dt} = \frac{1}{2} \frac{d[I]}{dt} = \frac{1}{2} (k_2'[E_I \cdot I^-] + k_3'[E_{II} \cdot I^-]).$$

Запишем уравнение материального баланса по ферменту

$$[E]_0 = [E] + [E \cdot H_2O_2] + [E_I] + [E_I \cdot I^-] + [E_{II}] + [E_{II} \cdot I^-]$$

и условия квазистационарности для всех комплексов:

$$\frac{d[E \cdot H_2O_2]}{dt} = k_1[E][H_2O_2] - k_{-1}[E \cdot H_2O_2] - k_1'[E \cdot H_2O_2] = 0, \quad (6)$$

$$\frac{d[E_I]}{dt} = k_1'[E \cdot H_2O_2] - k_2[E_I][I^-] + k_{-2}[E_I \cdot I^-] = 0, \quad (7)$$

$$\frac{d[E_I \cdot I^-]}{dt} = k_2[E_I][I^-] - k_{-2}[E_I \cdot I^-] - k_2'[E_I \cdot I^-] = 0, \quad (8)$$

$$\frac{d[E_{II}]}{dt} = k_2'[E_I \cdot I^-] - k_3[E_{II}][I^-] + k_{-3}[E_{II} \cdot I^-] = 0, \quad (9)$$

$$\frac{d[E_{II} \cdot I^-]}{dt} = k_3[E_{II}][I^-] - k_{-3}[E_{II} \cdot I^-] - k_3'[E_{II} \cdot I^-] = 0. \quad (10)$$

При сложении уравнений (7) и (8) получаем, что

$$k'_2[E_I \cdot I^-] = k'_1[E \cdot H_2O_2] \quad (11)$$

$$\text{и } [E_I \cdot I^-] = \frac{k'_1[E \cdot H_2O_2]}{k'_2}.$$

Аналогично путём сложения уравнений (9) и (10) и с учётом равенства (11) можно показать, что

$$k'_3[E_{II} \cdot I^-] = k'_2[E_I \cdot I^-] = k'_1[E \cdot H_2O_2]$$

$$\text{и } [E_{II} \cdot I^-] = \frac{k'_1[E \cdot H_2O_2]}{k'_3}.$$

Тогда скорость образования иода может быть записана как

$$r = \frac{1}{2} (k'_2[E_I \cdot I^-] + k'_3[E_{II} \cdot I^-]) = k'_1[E \cdot H_2O_2].$$

Из уравнений (6), (8) и (10) получаем, что

$$[E] = \frac{(k_{-1} + k'_1)[E \cdot H_2O_2]}{k_1[H_2O_2]} = \frac{K_1[E \cdot H_2O_2]}{[H_2O_2]}, \text{ где } K_1 = \frac{k_{-1} + k'_1}{k_1};$$

$$[E_I] = \frac{(k_{-2} + k'_2)[E_I \cdot I^-]}{k_2[I^-]} = \frac{K_2[E_I \cdot I^-]}{[I^-]} = \frac{K_2 k'_1[E \cdot H_2O_2]}{k'_2[I^-]}, \text{ где } K_2 = \frac{k_{-2} + k'_2}{k_2};$$

$$[E_{II}] = \frac{(k_{-3} + k'_3)[E_{II} \cdot I^-]}{k_3[I^-]} = \frac{K_3[E_{II} \cdot I^-]}{[I^-]} = \frac{K_3 k'_1[E \cdot H_2O_2]}{k'_3[I^-]}, \text{ где } K_3 = \frac{k_{-3} + k'_3}{k_3}.$$

Подставляем все полученные выражения для концентраций в уравнение материального баланса по ферменту

$$[E]_0 = \frac{K_1[E \cdot H_2O_2]}{[H_2O_2]} + [E \cdot H_2O_2] + \frac{K_2 k'_1[E \cdot H_2O_2]}{k'_2[I^-]} + \frac{k'_1[E \cdot H_2O_2]}{k'_2} + \frac{K_3 k'_1[E \cdot H_2O_2]}{k'_3[I^-]} + \frac{k'_1[E \cdot H_2O_2]}{k'_3}$$

и выражаем концентрацию комплекса  $[E \cdot H_2O_2]$ :

$$[E \cdot H_2O_2] = \frac{[E]_0}{1 + \frac{K_1}{[H_2O_2]} + \frac{K_2 k'_1}{k'_2[I^-]} + \frac{K_3 k'_1}{k'_3[I^-]} + \frac{k'_1}{k'_2} + \frac{k'_1}{k'_3}} = \frac{[E]_0}{1 + \frac{K_1}{[H_2O_2]} + \frac{K_2 k'_1 k'_3 + K_3 k'_1 k'_2}{k'_2 k'_3 [I^-]} + \frac{k'_1}{k'_2} + \frac{k'_1}{k'_3}}.$$

Тогда скорость накопления иода

$$r = \frac{k'_1[E]_0}{1 + \frac{K_1}{[H_2O_2]} + \frac{K_2k'_1k'_3 + K_3k'_1k'_2}{k'_2k'_3[I^-]} + \frac{k'_1}{k'_2} + \frac{k'_1}{k'_3}}$$

Умножим числитель и знаменатель полученного выражения на  $\frac{k'_3}{k'_1}$ :

$$r = \frac{k'_3[E]_0}{\frac{k'_3}{k'_1} + \frac{K_1k'_3}{k'_1[H_2O_2]} + \frac{K_2k'_3 + K_3k'_2}{k'_2[I^-]} + \frac{k'_3}{k'_2} + 1}$$

и введём обозначения:  $\frac{k'_3}{k'_1} = \beta$  и  $\frac{k'_3}{k'_2} = \alpha$ . Тогда

$$r = \frac{k'_3[E]_0}{1 + \frac{\beta K_1}{[H_2O_2]} + \frac{\alpha K_2 + K_3}{[I^-]} + \alpha + \beta}$$

Учитывая тот опытный факт, что  $\alpha \ll 1$  и  $\beta \ll 1$ , их величинами по сравнению с 1 в знаменателе пренебрегаем и, таким образом, получаем выражение для скорости накопления  $I_2$  в реакции пероксидазного окисления иодид-ионов:

$$r = \frac{k'_3[E]_0}{1 + \frac{\beta K_1}{[H_2O_2]} + \frac{\alpha K_2 + K_3}{[I^-]}} \quad (12)$$

При больших («насыщающих») концентрациях обоих субстратов скорость реакции перестаёт зависеть от их концентраций и приобретает максимальное значение  $r_{\max} = k'_3[E]_0$ . Так, реакция имеет первый порядок по пероксиду водорода в диапазоне концентраций 0.003–0.02 мМ, после превышения которого постепенно уменьшается до нулевого. Порядок реакции по иодид-иону близок к 1 вплоть до концентрации 6 мМ.

Полученному уравнению (12) можно придать вид уравнения Михаэлиса–Ментен (2) с эффективными параметрами  $r_{\max, \text{эфф}}$  и  $K_{M, \text{эфф}}$ . Для двухсубстратной реакции можно получить два эффективных значения для максимальной скорости и два эффективных значения для константы Михаэлиса (по  $I^-$  и по  $H_2O_2$ ).

1) При постоянной концентрации пероксида водорода зависимость скорости от концентрации иодид-ионов имеет вид:

$$r^{\Gamma} = \frac{k'_3[E]_0}{1 + \frac{\beta K_1}{[H_2O_2]} + \frac{\alpha K_2 + K_3}{[I^-]}} = \frac{k'_3[E]_0[I^-]}{\left(1 + \frac{\beta K_1}{[H_2O_2]}\right)[I^-] + \alpha K_2 + K_3} =$$

$$= \frac{k'_3[E]_0[I^-]}{\left(1 + \frac{\beta K_1}{[H_2O_2]}\right) \left([I^-] + \frac{\alpha K_2 + K_3}{1 + \frac{\beta K_1}{[H_2O_2]}}\right)} = \frac{r_{\max, \text{эфф}}^{\Gamma} \cdot [I^-]}{K_{M, \text{эфф}}^{\Gamma} + [I^-]}, \quad (13)$$

где  $r_{\max, \text{эфф}}^{\Gamma} = \frac{k'_3[E]_0}{1 + \frac{\beta K_1}{[H_2O_2]}}$  и  $K_{M, \text{эфф}}^{\Gamma} = \frac{\alpha K_2 + K_3}{1 + \frac{\beta K_1}{[H_2O_2]}}$ .

В случае «насыщающей» концентрации  $H_2O_2$   $\frac{\beta K_1}{[H_2O_2]} \ll 1$ , и выражения для

эффективных параметров приобретают более простой вид:  $r_{\max, \text{эфф}}^{\Gamma} \rightarrow k'_3[E]_0$  и  $K_{M, \text{эфф}}^{\Gamma} \rightarrow \alpha K_2 + K_3$ .

Построив графическую зависимость в линейных координатах одним из трёх описанных выше способов (см. рис. 3-5), можно получить значения эффективных параметров  $r_{\max, \text{эфф}}^{\Gamma}$  и  $K_{M, \text{эфф}}^{\Gamma}$ . Анализ зависимости эффективных параметров реакции от концентрации пероксида водорода позволяет найти и другие кинетические параметры. Для этого рассмотрим величины, обратные  $r_{\max, \text{эфф}}^{\Gamma}$  и  $K_{M, \text{эфф}}^{\Gamma}$ :

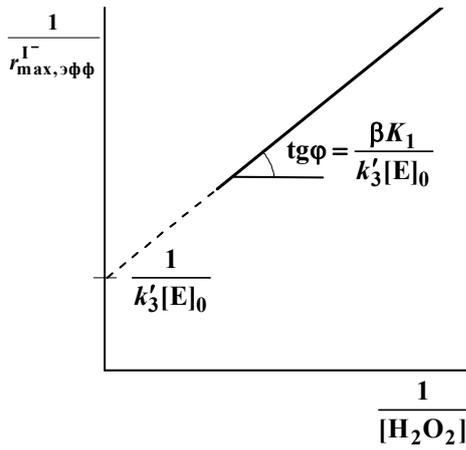
$$\frac{1}{r_{\max, \text{эфф}}^{\Gamma}} = \frac{1}{k'_3[E]_0} + \frac{\beta K_1}{k'_3[E]_0} \cdot \frac{1}{[H_2O_2]}, \quad (14)$$

$$\frac{1}{K_{M, \text{эфф}}^{\Gamma}} = \frac{1}{\alpha K_2 + K_3} + \frac{\beta K_1}{\alpha K_2 + K_3} \cdot \frac{1}{[H_2O_2]}. \quad (15)$$

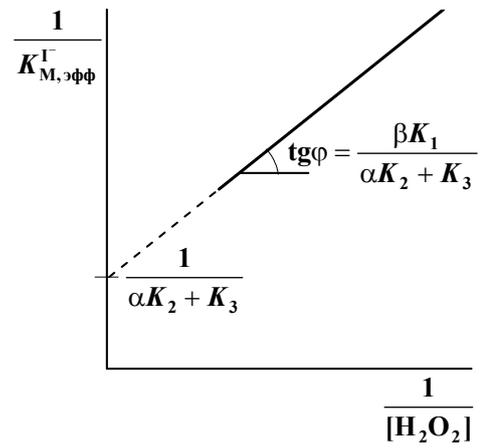
Так, из графика (рис. 6), построенного в координатах уравнения (14)

$\frac{1}{r_{\max, \text{эфф}}^{\Gamma}} = f\left(\frac{1}{[H_2O_2]}\right)$ , находим  $\frac{1}{k'_3[E]_0}$  как отрезок, отсекаемый на оси ординат, и

$\frac{\beta K_1}{k'_3[E]_0}$  как тангенс угла наклона. Из этих величин можно определить истинную



**Рис. 6.** График, построенный в координатах уравнения (14)



**Рис. 7.** График, построенный в координатах уравнения (15)

максимальную скорость реакции  $r_{\max} = k'_3[E]_0$  и  $\beta K_1$ . Из графика (рис. 7), построенного в координатах уравнения (15)

$\frac{1}{K_{M, \text{эфф}}^-} = f\left(\frac{1}{[H_2O_2]}\right)$ , находим  $\frac{1}{\alpha K_2 + K_3}$

(отрезок, отсекаемый на оси ординат) и  $\frac{\beta K_1}{\alpha K_2 + K_3}$  (тангенс угла наклона). Это

позволяет рассчитать  $\alpha K_2 + K_3$ .

2) При постоянной концентрации иодид-ионов зависимость скорости от концентрации пероксида водорода следующая:

$$r_{H_2O_2} = \frac{k'_3[E]_0}{1 + \frac{\beta K_1}{[H_2O_2]} + \frac{\alpha K_2 + K_3}{[I^-]}} = \frac{k'_3[E]_0[H_2O_2]}{\left(1 + \frac{\alpha K_2 + K_3}{[I^-]}\right)[H_2O_2] + \beta K_1} =$$

$$= \frac{k'_3[E]_0[H_2O_2]}{\left(1 + \frac{\alpha K_2 + K_3}{[I^-]}\right) \left([H_2O_2] + \frac{\beta K_1}{1 + \frac{\alpha K_2 + K_3}{[I^-]}}\right)} = \frac{r_{\max, \text{эфф}}^{H_2O_2} \cdot [H_2O_2]}{K_{M, \text{эфф}}^{H_2O_2} + [H_2O_2]}, \quad (16)$$

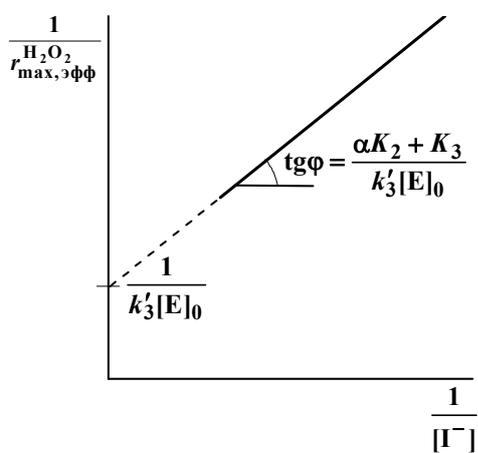
где  $r_{\max, \text{эфф}}^{H_2O_2} = \frac{k'_3[E]_0}{1 + \frac{\alpha K_2 + K_3}{[I^-]}}$  и  $K_{M, \text{эфф}}^{H_2O_2} = \frac{\beta K_1}{1 + \frac{\alpha K_2 + K_3}{[I^-]}}$ .

Можно проанализировать величины, обратные эффективным параметрам, аналогично тому, как это было сделано в предыдущем случае:

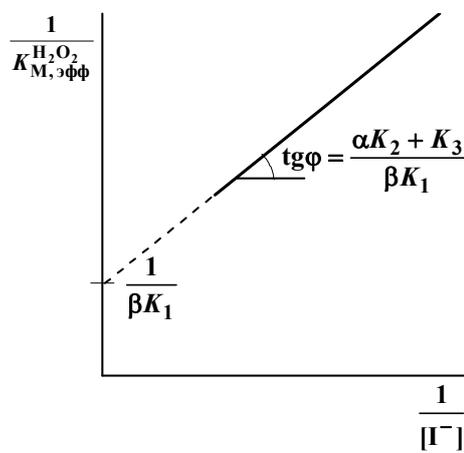
$$\frac{1}{r_{\max, \text{эфф}}^{\text{H}_2\text{O}_2}} = \frac{1}{k'_3[\text{E}]_0} + \frac{\alpha K_2 + K_3}{k'_3[\text{E}]_0} \cdot \frac{1}{[\text{I}^-]}, \quad (17)$$

$$\frac{1}{K_{\text{M, эфф}}^{\text{H}_2\text{O}_2}} = \frac{1}{\beta K_1} + \frac{\alpha K_2 + K_3}{\beta K_1} \cdot \frac{1}{[\text{I}^-]}. \quad (18)$$

Из графика (рис. 8), построенного в координатах уравнения (17), можно определить  $\frac{1}{k'_3[\text{E}]_0}$  как отрезок, отсекаемый на оси ординат, и  $\frac{\alpha K_2 + K_3}{k'_3[\text{E}]_0}$  как тангенс угла наклона прямой. Из графика (рис. 9), построенного в координатах уравнения (18), находят  $\frac{1}{\beta K_1}$  как отрезок, отсекаемый на оси ординат, и  $\frac{\alpha K_2 + K_3}{\beta K_1}$  как тангенс угла наклона. Из этих величин можно определить истинную максимальную скорость реакции  $r_{\max} = k'_3[\text{E}]_0$  и  $\alpha K_2 + K_3$  и сравнить их со значениями, полученными с применением уравнений (14) и (15).



**Рис. 8.** График, построенный в координатах уравнения (17)



**Рис. 9.** График, построенный в координатах уравнения (18)

## II. Экспериментальная часть

**Цель работы** – исследовать кинетику окисления иодида калия пероксидом водорода в присутствии фермента пероксидазы и определить эффективные кинетические параметры ферментативной реакции: максимальную скорость  $r_{\max, \text{эфф}}$  и константу Михаэлиса  $K_{\text{M, эфф}}$ .

## Методика эксперимента

Ферментативное окисление иодид-ионов пероксидом водорода осуществляют в кислой среде при  $\text{pH} = 4-5$ , когда вклад неферментативной реакции в суммарный процесс не превышает 1-2%.

Растворы пероксидазы и субстратов – иодида калия и пероксида водорода – готовят в 0.1 М ацетатном буфере. Концентрации исходных растворов составляют  $6 \cdot 10^{-2}$  М для иодида калия и  $4 \cdot 10^{-3}$  М для пероксида водорода. Рабочие растворы получают путём разбавления исходных буферным раствором.

Препарат фермента представляет собой светло-коричневый порошок, хорошо растворимый в ацетатном буферном растворе. Как уже отмечалось, молярная масса пероксидазы составляет примерно  $44100 \text{ г} \cdot \text{моль}^{-1}$ .

Ацетатный буферный раствор с  $\text{pH} = 4.6-4.7$  готовят следующим образом: к 100 мл 1 М раствора уксусной кислоты добавляют 50 мл 1 М раствора гидроксида натрия и доводят до 500 мл дистиллированной водой. Значение  $\text{pH}$  контролируют с помощью  $\text{pH}$ -метра.

Исследование кинетики реакции проводят с использованием фотоэлектрического концентрационного колориметра или спектрофотометра. Реакцию проводят непосредственно в измерительной кювете толщиной 1 см. Изменение концентрации выделившегося иода определяют по поглощению при длине волны 400 нм.

Работа может быть выполнена в двух вариантах:

- 1) Определение эффективных параметров реакции – максимальной скорости и константы Михаэлиса – по иодиду калия.
- 2) Определение эффективных параметров реакции – максимальной скорости и константы Михаэлиса – по пероксиду водорода.

### ***Работа 1. Определение эффективных значений максимальной скорости реакции и константы Михаэлиса по иодиду калия***

Необходимо провести измерение начальной скорости ферментативной реакции с различными концентрациями иодида калия при постоянных концентрациях фермента и второго субстрата – пероксида водорода. Объёмы исходных

растворов, необходимые для приготовления реакционных смесей, приведены в таблице 1. Суммарный объём смеси постоянен и составляет 4 мл.

**Таблица 1.** Объёмы исходных растворов (мл)  
для приготовления реакционных смесей

КI	Ацетатный буфер	Пероксидаза	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
0.1	3.3	0.1	0.5
0.2	3.2	0.1	0.5
0.3	3.1	0.1	0.5
0.5	2.9	0.1	0.5
1.0	2.4	0.1	0.5
1.5	1.9	0.1	0.5

Перед началом опыта проведите (в соответствии с инструкцией к измерительному прибору) подготовительные операции, необходимые для измерения оптической плотности исследуемых растворов.

Залейте в кювету буферный раствор, растворы иодида калия и пероксидазы (в соответствии с табл. 1) и поместите её в кюветное отделение спектрофотометра (фотоколориметра). Запустите ферментативную реакцию путём внесения с помощью дозатора раствора пероксида водорода. Проведите измерения оптической плотности реакционной смеси (запись кинетической кривой накопления I<sub>2</sub>) в соответствии с инструкцией к используемому измерительному прибору.

Рассчитайте концентрацию I<sub>2</sub> из значений оптической плотности растворов в соответствии с законом Бугера–Ламберта–Бера:  $D = \varepsilon \cdot l \cdot C$ , где  $D$  – оптическая плотность,  $\varepsilon$  – коэффициент молярного поглощения ( $\varepsilon_{400}(I_2) = 725 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ),  $l$  – толщина кюветы (1 см). Полученные результаты запишите в таблицу 2.

Продолжительность одного кинетического опыта составляет примерно 5-10 минут. После окончания опыта промойте кювету водой и залейте в неё новые растворы для следующего опыта.

Проведите кинетические опыты при шести различных концентрациях КI (концентрация H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> сохраняется постоянной!) и заполните шесть таблиц типа 2.

**Таблица 2.** Экспериментальные данные

№ опыта ...	Объём раствора субстрата, концентрация которого изменяется, ... мл						
Время опыта, с	0						
Оптическая плотность							
Концентрация I <sub>2</sub> , М	0						

**Работа 2. Определение эффективных значений максимальной скорости реакции и константы Михаэлиса по пероксиду водорода**

Необходимо провести измерение начальной скорости ферментативной реакции с различными концентрациями пероксида водорода при постоянных концентрациях фермента и второго субстрата – иодида калия. Объёмы исходных растворов, необходимые для приготовления реакционных смесей, приведены в таблице 3. Суммарный объём смеси постоянен и составляет 4 мл.

Залейте в кювету буферный раствор, растворы иодида калия и пероксидазы (в соответствии с табл. 3) и поместите её в кюветное отделение спектрофотометра (фотоколориметра). Запустите ферментативную реакцию внесением необходимого объёма раствора пероксида водорода. Дальнейший порядок измерений при выполнении данной работы такой же, как при выполнении работы 1. Данные всех шести экспериментов запишите в таблицы типа 2.

**Таблица 3.** Объёмы исходных растворов (мл)  
для приготовления реакционных смесей

KI	Ацетатный буфер	Пероксидаза	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
1.5	2.3	0.1	0.1
1.5	2.2	0.1	0.2
1.5	2.1	0.1	0.3
1.5	1.9	0.1	0.5
1.5	1.6	0.1	0.8
1.5	1.4	0.1	1.0

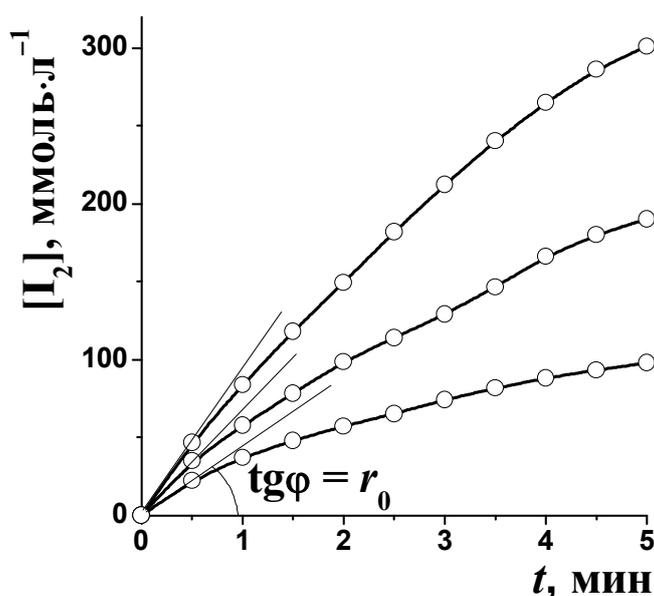
## Запись и обработка результатов эксперимента. Представление результатов работы

По результатам измерений постройте кинетические кривые (зависимость концентрации выделившегося иода от времени) и по наклону *начальных* линейных участков (по первым двум точкам, включая точку (0, 0) кинетической кривой) определите начальные скорости реакции. Пример определения начальных скоростей показан на рис. 10. Полученные значения занесите в таблицу 4, укажите их размерности.

Рассчитайте начальные концентрации субстрата в каждом опыте. Также запишите их в табл. 4 с указанием размерности.

*Пример расчёта концентрации субстрата.* Исходная концентрация иодида калия  $[KI]_0 = 6 \cdot 10^{-2}$  М. Объём рабочего раствора составляет 4 мл, в нём содержится, например, 1 мл KI (работа 1). Следовательно, исходный раствор KI разбавлен в 4 раза, концентрация KI в реакционной смеси равна  $6 \cdot 10^{-2} : 4 = 1.5 \cdot 10^{-2}$  М.

Исходная концентрация раствора  $H_2O_2$  равна  $4 \cdot 10^{-3}$  М. Общий объём раствора равен 4 мл, в нём содержится 0.1 мл  $H_2O_2$  (работа 2), т. е. исходный раствор разбавлен в 40 раз. Таким образом, концентрация  $H_2O_2$  в реакционной смеси составляет  $4 \cdot 10^{-3} : 40 = 1 \cdot 10^{-4}$  М.



**Рис. 10.** Кинетические кривые накопления продукта реакции ( $I_2$ ) при трёх различных начальных концентрациях  $H_2O_2$

**Таблица 4.** Зависимость начальной скорости реакции от начальной концентрации субстрата – ...

Номер опыта	Начальная концентрация субстрата $[S]_0$	Начальная скорость реакции $r_0$

Расчёт кинетических параметров ферментативной реакции ( $r_{\max, \text{эфф}}$  и  $K_{M, \text{эфф}}$ ) можно выполнить тремя способами, описанными в теоретическом введении (см. стр. 10-11 и рис. 3-5). Для этого в столбцы компьютерной программы «Excel» (или другой, используемой для построения графиков) внесите значения начальных концентраций субстрата  $[S]_0$  и соответствующие им значения начальных скоростей реакции  $r_0$  и проведите соответствующие расчёты.

1) *Определение кинетических параметров из графика в координатах Лайн-увера–Берка.* Для обработки экспериментальных данных используйте уравнение

(3). С помощью компьютерной программы рассчитайте величины  $\frac{1}{r_0}$  и  $\frac{1}{[S]_0}$  и

постройте график в координатах  $\frac{1}{r_0}$  от  $\frac{1}{[S]_0}$  (см. рис. 3), из которого определите

эффективные константу Михаэлиса и максимальную скорость реакции.

2) *Определение кинетических параметров из графика в координатах Вульфа–Хэйна.* Для обработки экспериментальных данных используйте уравнение (4). Для

этого постройте график в координатах  $\frac{[S]_0}{r_0}$  от  $[S]_0$  (предварительно рассчитав

необходимые величины), из которого определите  $K_{M, \text{эфф}}$  и  $r_{\max, \text{эфф}}$  реакции (см. рис. 4).

3) *Определение кинетических параметров из графика в координатах Иди–Хофсти.* Для обработки экспериментальных данных используйте уравнение (5). Для

этого постройте график в координатах  $r_0$  от  $\frac{r_0}{[S]_0}$  (предварительно рассчитав

необходимые величины), из которого определите  $K_{M, \text{эфф}}$  и  $r_{\max, \text{эфф}}$  реакции (см. рис. 5).

Полученные тремя разными методами значения эффективной константы Михаэлиса и эффективной максимальной скорости реакции занесите в табл. 5.

**Таблица 5.** Экспериментальные значения эффективных константы Михаэлиса и максимальной скорости реакции

Кинетический параметр	Способ обработки экспериментальных данных		
	Координаты Лайнуивера–Берка	Координаты Вульфа–Хэйенса	Координаты Иди–Хофсти
$K_{M, \text{эфф}}$ , ммоль·л <sup>-1</sup>			
$r_{\text{max, эфф}}$ , ммоль·л <sup>-1</sup> ·мин <sup>-1</sup>			
Коэффициент корреляции $R^2$			

После выполнения работы письменно ответьте на следующие вопросы и выполните следующие задания.

1. Выведите уравнение Михаэлиса–Ментен для простой ферментативной реакции.
2. Каковы размерности константы Михаэлиса и максимальной скорости реакции?
3. Как меняется порядок реакции по субстрату и порядок реакции в целом при увеличении концентрации субстрата?
4. Что такое «частота оборотов» ферментативной реакции?
5. На основании сопоставления коэффициентов корреляции  $R^2$  выберите координаты, которые являются наиболее удачными для определения параметров уравнения Михаэлиса–Ментен.

## Приложение

### Статистическая обработка экспериментальных данных

Результатом экспериментальных измерений часто является набор пар значений (например, при изучении кинетики ферментативной реакции такими парами являются значения скорости реакции и концентрации субстрата). Для определения значений величин из такого рода экспериментальных данных часто удобно перейти к координатам, в которых зависимость будет линейной, а искомые значения величин будут соответствовать коэффициентам прямой.

В случае обработки данных по кинетике ферментативной реакции в координатах Лайнуивера–Берка такими линеаризующими координатами являются

$\frac{1}{r_0}$  и  $\frac{1}{[S]_0}$ :  $\frac{1}{r_0} = A + \frac{B}{[S]_0}$ . При этом по значению коэффициента  $A$  можно определить

максимальную скорость реакции  $r_{\max} = \frac{1}{A}$ , а по значению коэффициента  $B$  наклона

прямой – значение константы Михаэлиса  $K_M = B \cdot r_{\max}$ , т.к. уравнение зависимости

скорости от концентрации в линейной форме имеет вид  $\frac{1}{r_0} = \frac{1}{r_{\max}} + \frac{K_M}{r_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]_0}$ .

Допустим, имеются  $n$  пар значений  $(x_i, y_i)$ , между которыми предполагается существование линейной зависимости  $y = A + Bx$ . Для нахождения констант  $A$  и  $B$  с одновременной оценкой их погрешностей обычно применяют метод наименьших квадратов. Согласно этому методу константы  $A$  и  $B$  рассчитывают исходя из условия

минимума суммы квадратов  $\sum_{i=1}^n (y_i - Y_i)^2$ , где  $y_i$  – экспериментальные значения, а

значения  $Y_i$  рассчитаны по уравнению  $Y_i = A + Bx_i$ . В таком случае константы  $A$  и  $B$

находят по формулам

$$B = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}, \quad A = \bar{y} - B\bar{x},$$

где  $\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$ ,  $\bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^n y_i}{n}$  – средние значения  $x$  и  $y$ .

Все результаты измерений нужно приводить с их погрешностями. Знание погрешностей необходимо для сравнения результатов разных опытов. Отклонение экспериментальных точек от рассчитанной прямой характеризуют дисперсией  $S^2$ , которая может быть определена по формуле

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - Y_i)^2}{n - 2}$$

при  $f = n - 2$  степенях свободы.

Дисперсии коэффициентов  $A$  и  $B$  вычисляют по формулам

$$S_B^2 = \frac{S^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}, \quad S_A^2 = \frac{S^2}{n}.$$

Дисперсию рассчитанного по уравнению значения  $Y_i$  определяют как

$$S_{Y_i}^2 = S_A^2 + S_B^2 (x_i - \bar{x})^2$$

при  $f = n - 2$  степенях свободы.

Доверительные интервалы (погрешности) параметров  $A$  и  $B$  и значений  $Y_i$  рассчитывают по формулам

$$\Delta B = \pm \tau_S(P, f) \cdot S_B, \quad \Delta A = \pm \tau_S(P, f) \cdot S_A, \quad \Delta Y_i = \pm \tau_S(P, f) \cdot S_{Y_i},$$

где  $\tau_S(P, f)$  – коэффициент (квантиль) Стьюдента, значения которого табулированы для разных чисел степеней свободы  $f$  и вероятностей  $P$ . На практике обычно ограничиваются рассмотрением 95%-го доверительного интервала. Значения коэффициента Стьюдента для доверительной вероятности 0.95 и числа степеней свободы  $f$  приведены в таблице.

Значения коэффициента Стьюдента  $\tau_S(P, f)$   
для доверительной вероятности  $P = 0.95$  и числа степеней свободы  $f$

$f$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
$\tau_S$	12.7	4.30	3.18	2.78	2.57	2.45	2.36	2.31	2.26	2.23	2.20	2.18	2.16	2.14	2.13

Значения коэффициента Стьюдента можно также вычислить с помощью функций «Excel»: в «Microsoft Excel 2010» в окне «Мастер функций» ( $f_x$ ) среди

предложенных вариантов выберите категорию «Статистические» и функцию «СТЮДЕНТ.ОБР.2Х» (в более ранних версиях «Excel» «СТЮДРАСПОБР»), нажмите «ОК». В открывшемся окне «Аргументы функции» задайте в строке «Вероятность» значение, равное  $1 - P = 0.05$ , и в строке «Степени свободы» количество степеней свободы  $f$ . В этом же окне появится значение коэффициента Стьюдента  $\tau_S(P, f)$ .

Сравнив экспериментальные значения  $y_i$  с вычисленными значениями  $Y_i$  и зная  $\Delta Y_i$ , можно определить, лежит ли каждая из экспериментальных точек внутри интервала  $[Y_i \pm \Delta Y_i]$ . Если какая-либо из точек лежит вне 95%-го доверительного интервала, то следует рассмотреть целесообразность её исключения из повторного расчёта. Для этого необходимо оценить абсолютную ошибку значения  $Y_i$  ( $\Delta y_i$ ), связанную с ограниченной точностью исходных данных (ошибка шкалы прибора и систематические ошибки).

Если различие между экспериментальным значением  $y_i$  и рассчитанным  $Y_i$  с коридором ошибок  $\pm \tau_S \cdot S$  укладывается в абсолютную ошибку  $\Delta y_i$ , то отбрасывать указанную точку не имеет смысла. В противном случае точку необходимо отбросить, а расчёт провести вновь.

Погрешности обычно округляют до одной значащей цифры. Последняя значащая цифра в любом приводимом результате обычно должна быть того же порядка, что и погрешность. Однако в промежуточных расчётах, пока ещё не получен окончательный результат, имеет смысл оставлять на одну значащую цифру больше. Это уменьшает неточности, возникающие при округлении чисел.

### **Линеаризация методом наименьших квадратов с использованием программы «Microsoft Excel»**

Программа «Excel» является одним из вариантов так называемых электронных таблиц. В этой программе предусмотрено проведение различных математических операций над содержимым ячеек, построение графика и аппроксимация его прямой линией с определением параметров прямой.

Для *построения графика* выполните следующие шаги:

- 1) Внесите данные в две соседние колонки на листе «Excel» (например, значения  $\frac{1}{[S]_0}$  (т.е.  $x$ ) в колонку А, а значения  $\frac{1}{r_0}$  ( $y$ ) в колонку В), а затем выделите эти значения, нажав и удерживая левую клавишу мыши. (Значения обратных величин концентрации и скорости можно рассчитать непосредственно в «Excel» из данных по  $[S]_0$  и  $r_0$ , внося эти данные в две колонки и задав в ячейках двух других колонок соответствующие формулы для расчёта  $\frac{1}{[S]_0}$  и  $\frac{1}{r_0}$ .)
- 2) Выберите в меню «Вставка», «Диаграмма», среди предложенных типов диаграмм выберите «Точечная», вид «Без проведения линий»; нажмите кнопку «Далее».
- 3) В нескольких последующих окнах, которые будут последовательно открываться при нажатии «Далее», задайте область построения графика, названия и вид осей, подпись графика и т.д. В принципе, на любой из этих стадий можно выбрать «Готово», в результате чего будет построен график. Если какие-либо из указанных выше параметров не были определены, программа задаст их автоматически.

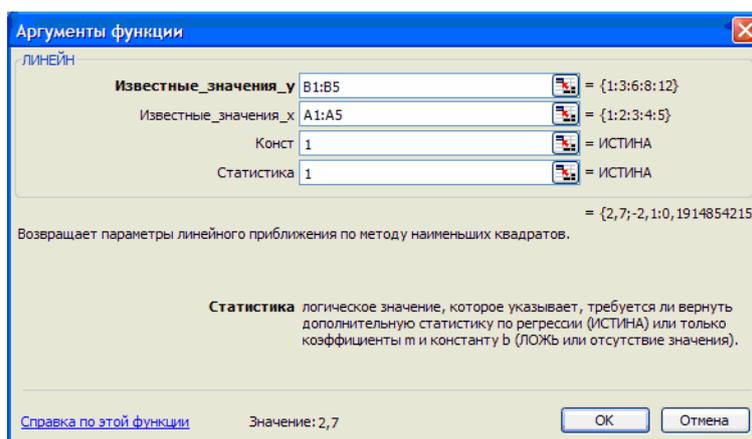
Для *аппроксимации полученной зависимости прямой линией* выполните следующее.

- 1) Наведите курсор на любую из точек на графике и нажмите правую кнопку мыши; в результате появится меню, в котором нужно выбрать «Добавить линию тренда».
- 2) В появившемся окне «Линия тренда», в закладке «Тип» выберите «Линейная», а в закладке «Параметры» отметьте «показывать уравнение на диаграмме» и «поместить на диаграмму величину достоверности аппроксимации», нажмите «ОК» (или «Заккрыть» для некоторых версий «Excel»).

В результате проведённых действий на графике появится аппроксимационная прямая, а также уравнение прямой и значение коэффициента корреляции  $R^2$ . Нажмите правой клавишей мыши на уравнение прямой. Задайте «Формат подписей данных»: в закладке «Число» выберите числовой формат «Числовой» и укажите необходимое число десятичных знаков с учётом количества значащих цифр в полученных экспериментальных данных.

Для **вычисления дисперсий параметров прямой линии** выполните следующие действия:

- 1) Выделите на листе «Excel» шесть свободных ячеек в формате  $2 \times 3$  (два столбца и три строки), в эти ячейки впоследствии будут записаны все статистические данные.
- 2) Выберите в меню программы «Вставка», «Функция» и в открывшемся окне «Мастер функций» ( $f_x$ ) среди предложенных вариантов выберите категорию «Статистические» и функцию «ЛИНЕЙН», нажмите «ОК».
- 3) Определите значения переменных. Для этого поставьте курсор в поле «Известные\_значения\_y», а затем выделите левой кнопкой мыши на листе «Excel» все значения соответствующей колонки. Затем переведите курсор в поле «Известные\_значения\_x» и выделите в таблице соответствующие значения. В поле «Конст» поставьте 1, в поле «Статистика» – тоже 1.



- 4) После этого (не нажимая кнопку «ОК»!) нажмите комбинацию клавиш «Ctrl» + «Shift» + «Enter». В результате в выделенных ячейках будут отображены значения  $A$ ,  $B$ ,  $R^2$ , а также корни квадратные из дисперсий коэффициентов  $A$  и  $B$  и значения  $Y_i$ .

	$B$		$A$
		2,7	-2,1
$S_B$		0,191485	0,635085
		0,985135	0,60553
$R^2$			$S_Y$

Если из определённых коэффициентов прямой линии определены не сами искомые величины, а функции от них, то для расчёта погрешностей воспользуйтесь данными таблицы 6.

Таким образом, в приведённом выше примере по зависимости  $\frac{1}{r_0}$  от  $\frac{1}{[S]_0}$  значение максимальной скорости рассчитывается как  $r_{\max} = \frac{1}{A}$ , а её погрешность как  $\Delta r_{\max} = \pm \frac{\tau_S \cdot S_A}{A^2}$ ; значение константы Михаэлиса рассчитывается как  $K_M = B \cdot r_{\max}$ , а её погрешность как  $\Delta K_M = \pm (B \cdot \Delta r_{\max} + r_{\max} \cdot \Delta B) = \pm (B \cdot \Delta r_{\max} + r_{\max} \cdot \tau_S \cdot S_B)$ .

**Таблица 6.** Вычисление абсолютных погрешностей косвенных измерений

Функция вида $f(x...)$	Абсолютная погрешность $\Delta f$	Функция вида $f(x...)$	Абсолютная погрешность $\Delta f$
$Cx$	$C \cdot \Delta x$	$\exp\left(\frac{x}{C}\right)$	$\frac{\Delta x}{C} \cdot \exp\left(\frac{x}{C}\right)$
$\frac{C}{x}$	$\frac{C}{x^2} \cdot \Delta x$	$\ln x$	$\frac{\Delta x}{x}$
$x^n$	$nx^{n-1} \Delta x$	$\ln\left(\frac{x}{y}\right)$	$\frac{\Delta x}{x} + \frac{\Delta y}{y}$
$\sqrt[n]{x}$	$\frac{1}{nx} \sqrt[n]{x} \cdot \Delta x$	$\frac{x}{1 \pm x}$	$\frac{\Delta x}{(1 \pm x)^2}$
$x \pm y$	$\Delta x + \Delta y$	$\sin\left(\frac{x}{C}\right)$	$\cos\left(\frac{x}{C}\right) \cdot \frac{\Delta x}{C}$
$x \cdot y$	$x \cdot \Delta y + y \cdot \Delta x$	$\cos\left(\frac{x}{C}\right)$	$\sin\left(\frac{x}{C}\right) \cdot \frac{\Delta x}{C}$
$\frac{x}{y}$	$\frac{x \cdot \Delta y + y \cdot \Delta x}{y^2}$	$\operatorname{tg}\left(\frac{x}{C}\right)$	$\frac{\Delta x}{C \cdot \cos^2\left(\frac{x}{C}\right)}$
$\frac{1}{x} + \frac{1}{y}$	$\frac{\Delta x}{x^2} + \frac{\Delta y}{y^2}$	$\operatorname{ctg}\left(\frac{x}{C}\right)$	$\frac{\Delta x}{C \cdot \sin^2\left(\frac{x}{C}\right)}$

Примечание:  $C$  – постоянная величина.

## Литература

### Основная:

1. Б.В. Романовский. Основы химической кинетики. М.: «Экзамен», 2006, 415 с.
2. Б.В. Романовский. Основы катализа. М.: «Бином», 2014, 172 с.
3. В.М. Байрамов. Основы химической кинетики и катализа. М.: «Академия», 2003, 256 с.
4. И.В. Березин, А.А. Клёсов. Практический курс химической и ферментативной кинетики. М.: изд-во Моск. ун-та, 1976, 320 с.

### Дополнительная:

5. С.Д. Варфоломеев, К.Г. Гуревич. Биокинетика. М.: «Фаир-пресс», 1999, 720 с.
6. Э. Корниш-Боуден. Основы ферментативной кинетики. М.: «Мир», 1979, 280 с.
7. О.М. Полторак, Е.С. Чухрай. Физико-химические основы ферментативного катализа. М.: «Высшая школа», 1971, 312 с.
8. Практикум по физической химии. Кинетика и катализ. Электрохимия. Под ред. Лунина В.В., Агеева Е.П. М.: «Академия», 2012, 304 с.