

Effect of temperature on enzymatic activity

Exercise 1:

The binding of di-N-acetylglucosamine (GlcNAc)₂ to lysozyme was studied using difference spectroscopy. The inhibition constants were determined at various temperatures:

<i>Temperature (°C)</i>	<i>K_i</i>
15	1,3.10 ⁻⁴ M
20	1,8.10 ⁻⁴ M
25	2,5.10 ⁻⁴ M
30	3,4.10 ⁻⁴ M

Determine ΔG^0 , ΔH^0 and ΔS^0 corresponding to the binding of the inhibitor to the enzyme.

Solution

$$\Delta H_0 = -11,4 \text{ Kcal/mole}$$

$$\Delta S_0 = -21,5 \text{ ue}$$

$$\Delta G_0 = -5,2 \text{ Kcal/mole à } 15^\circ\text{C}$$

$$= -5,1 \text{ Kcal/mole à } 20^\circ\text{C}$$

$$= -5 \text{ Kcal/mole à } 25^\circ\text{C}$$

$$= -4,9 \text{ Kcal/mole à } 30^\circ\text{C}$$

Exercise 2

The thermal denaturation of a protein was studied using absorption spectrophotometry by measuring the difference in absorbance between a protein solution at a variable temperature and the same solution at 25°C.

<i>Temperature (°C)</i>	<i>Absorbance</i>
40	0,01
42,5	0,028
45	0,063
47,5	0,125
50	0,19
52,5	0,25
55	0,26
57,5	0,27
60	0,28
70	0,28

- 1) What is the melting temperature (or half-transition temperature)? Calculate the thermodynamic parameters at this temperature.

Solution

$$T_m = 48^\circ\text{C}$$

$$\Delta G_0 = 0$$

$$\Delta H_0 = +82 \text{ Kcal/mole}$$

$$\Delta S_0 = +6,5 \text{ Kcal/mole}$$

Exercice 3

The rate constants for the thermal denaturation of lactoglobulin were determined at several temperatures. The following values were obtained:

<i>temperature (°C)</i>	<i>k (M⁻¹.s⁻¹)</i>
69,3	3,5
74,3	10,9
76,8	21,8
78,8	37,9
79,7	45,5

1. Determine the experimental activation energy of the reaction.
2. Determine the various thermodynamic quantities at each temperature.

Note: $R = 1,98 \text{ cal/ mole/ degré}$; $kT/h = 6,25 \cdot 10^{-12} \text{ s}^{-1}$ à 25°C .

Solution :

$$E^* = 61 \text{ Kcal/mole}$$

$$\Delta H^* = +60 \text{ Kcal/mole}$$

$$\Delta S^* = +120 \text{ ue}$$

$$\Delta G^* = 19,3 \text{ Kcal/mole à } 69,3$$

$$18,8 \text{ Kcal/mole à } 74,3$$

$$18,4 \text{ Kcal/mole à } 76,8$$

$$18,2 \text{ Kcal/mole à } 78,8$$

$$18 \text{ Kcal/mole à } 79,7$$

Chapitre 7 : Enzymes de régulation (Allostérie)

Exercice 1

Une enzyme possède 4 sous-unités et se comporte de façon michaelienne vis-à-vis de son substrat. Peut-il s'agir d'une enzyme allostérique, qui présente par ailleurs des phénomènes coopératifs ? Quelle sera l'allure de la courbe de saturation de cette enzyme par un activateur

allostérique ? par un inhibiteur allostérique ? Quelle sera l'allure de la courbe de saturation par le substrat en présence d'activateur ? d'inhibiteur ?

Solution :

Il peut s'agir d'une enzyme allostérique appartenant au modèle V ou au modèle K dont l'équilibre est complètement déplacé vers la forme R.

On peut avoir donc différents cas :

1- modèle V :

- fixation d'un activateur allostérique : saturation coopérative
- fixation d'un inhibiteur allostérique : saturation coopérative
- saturation michaelienne, même K_m ; V_m augmentée.
- saturation par le substrat en présence d'inhibiteur : saturation michaelienne, même K_m ; V_m diminuée.

2- modèle K déplacé vers R :

- fixation d'un activateur allostérique : saturation michaelienne
- fixation d'un inhibiteur allostérique : saturation coopérative
- saturation par le substrat en présence d'activateur
- saturation par le substrat en présence d'inhibiteur : saturation coopérative.

Exercice 2

On a étudié un enzyme tétramérique qui obéit au modèle de M.W.C.

Le tableau suivant donne les vitesses initiales (exprimées en variation d'absorbance/mn) quand on travaille avec $(E_t) = 10^{-7} M$, et en présence d'inhibiteur (5 fois K_I) ou d'activateur (5 fois K_A).

$S \cdot 10^4 M$	$I = 0, A = 0$	$I = 5 K_I$	$A = 5 K_A$
0,5	0,022	0	0,273
0,75	0,039	0	0,385
1,0	0,061	0	0,485
2,5	0,29	0	0,9
5,0	0,84	0,002	1,26
7,5	1,24	0,008	1,46
10	1,47	0,02	1,58
15	1,68	0,07	1,72
20	1,79	0,2	1,8
25	1,85	0,4	1,85

Solution : Tracez les 3 courbes v en fonction de (S) . Vous obtenez des formes hyperboliques,

vous pouvez donc utiliser la méthodes des doubles-inverses pour retracer les 3 courbes.

A : $V_m = 5$; $K_m = 7 \cdot 10^{-5} M$

B : $V_m = 0,8$; $K_m = 7 \cdot 10^{-5} M$

C : $V_m = 3$; $K_m = 7 \cdot 10^{-5} M$.

Les 3 courbes ont le même K_m ; il s'agit donc du modèle V (V_m change), $L_o = 0,9$.

