

## 2. Del: Præsentation og diskussion af resultater.

### **I.**

Reaktionshastighed til tiden 1, 2, 3, og 4 minutter på progresskurverne svarende til 1 U/mL og 0,064 mM.

$$\Delta A = c \cdot \varepsilon \cdot l \Leftrightarrow c = \frac{\Delta A \cdot l}{\varepsilon} \quad \varepsilon = 18.500 M^{-1} \cdot cm^{-1}$$

$$t: 1,0 \text{ min.}: c = \frac{\Delta A \cdot l}{\varepsilon} \Leftrightarrow c = \frac{(0,35 - 0,24) \cdot 1cm}{18.500 M^{-1} \cdot cm^{-1}} = 5,95 \cdot 10^{-6} M \Rightarrow \underline{\underline{V_0 = 5,95 \mu M / min}}$$

$$t: 2,0 \text{ min.}: c = \frac{\Delta A \cdot l}{\varepsilon} \Leftrightarrow c = \frac{(0,44 - 0,38) \cdot 1cm}{18.500 M^{-1} \cdot cm^{-1}} = 3,24 \cdot 10^{-6} M \Rightarrow \underline{\underline{V_0 = 3,24 \mu M / min}}$$

$$t: 3,0 \text{ min.}: c = \frac{\Delta A \cdot l}{\varepsilon} \Leftrightarrow c = \frac{(0,48 - 0,45) \cdot 1cm}{18.500 M^{-1} \cdot cm^{-1}} = 1,62 \cdot 10^{-6} M \Rightarrow \underline{\underline{V_0 = 1,62 \mu M / min}}$$

$$t: 4,0 \text{ min.}: c = \frac{\Delta A \cdot l}{\varepsilon} \Leftrightarrow c = \frac{(0,51 - 0,49) \cdot 1cm}{18.500 M^{-1} \cdot cm^{-1}} = 1,08 \cdot 10^{-6} M \Rightarrow \underline{\underline{V_0 = 1,08 \mu M / min}}$$

Efter tilsætning af substrat:

$$t: 1,0 \text{ min.}: c = \frac{\Delta A \cdot l}{\varepsilon} \Leftrightarrow c = \frac{(0,69 - 0,60) \cdot 1cm}{18.500 M^{-1} \cdot cm^{-1}} = 4,86 \cdot 10^{-6} M \Rightarrow \underline{\underline{V_0 = 4,86 \mu M / min}}$$

$$t: 2,0 \text{ min.}: c = \frac{\Delta A \cdot l}{\varepsilon} \Leftrightarrow c = \frac{(0,77 - 0,72) \cdot 1cm}{18.500 M^{-1} \cdot cm^{-1}} = 2,70 \cdot 10^{-6} M \Rightarrow \underline{\underline{V_0 = 2,70 \mu M / min}}$$

$$t: 3,0 \text{ min.}: c = \frac{\Delta A \cdot l}{\varepsilon} \Leftrightarrow c = \frac{(0,82 - 0,79) \cdot 1cm}{18.500 M^{-1} \cdot cm^{-1}} = 1,62 \cdot 10^{-6} M \Rightarrow \underline{\underline{V_0 = 1,62 \mu M / min}}$$

$$t: 4,0 \text{ min.}: c = \frac{\Delta A \cdot l}{\varepsilon} \Leftrightarrow c = \frac{(0,84 - 0,82) \cdot 1cm}{18.500 M^{-1} \cdot cm^{-1}} = 1,08 \cdot 10^{-6} M \Rightarrow \underline{\underline{V_0 = 1,08 \mu M / min}}$$

Årsager til at hastigheden falder kan være:

1. Enzymets mætning med substrat aftager med faldende substratkoncentration
2. Enzymet hæmmes af reaktionsproduktet
3. Reaktionens reversibilitet gør sig gældende
4. Enzymet denatureres i måleperioden

Ud af disse er det kun punkt 1. der influerer på den aktuelle kurve. Dvs. at der er en "øvre" grænse for hvor mange substratmolekyler, der kan sidde på enzymet, da enzymet har et begrænset antal aktive centre. Når enzymet således er mættet, vil hastigheden af forsøget ikke længere være afhængig af enzymkoncentration.

Vi kan også se, at enzymet ikke hæmmes af reaktionsproduktet. I så fald vil vi få en progresskurve, der vil illustrere, at der stadigvæk er noget substrat tilbage i opløsning. Produktkoncentration, som kan aflæses af progresskurven vil ikke svare fuldstændigt til substratkoncentration.

Hvad angår reaktionens reversibilitet, så er den heller ikke aktuell, da reaktionen er stærkt forskudt mod højre. Reaktionerne sker fuldstændigt.

Da et enzym er et protein, vil en denaturering også kun forekomme ved ændring af temperatur og pH. Ingen af disse faktorer blevet ændret under forsøgets udførelse.

## 2.

Beregning af  $[S]$  i reaktionsblanding:

For hver måleserie blandes:	Buffer	1000,00 $\mu\text{L}$
	Substrat	500,00 $\mu\text{L}$
	Enzym	+ 100,00 $\mu\text{L}$
	<u>Total</u>	<u>1600,00 <math>\mu\text{L}</math></u>

Vi har:

$$C_{\text{substratopl.,Før}} \cdot V_{\text{substratopl.,Før}} = C_{\text{substratopl.,Efter}} \cdot V_{\text{Total,Efter}} \Leftrightarrow$$

$$C_{\text{substratopl.,Efter}} = \frac{C_{\text{substratopl.,Før}} \cdot V_{\text{substratopl.,Før}}}{V_{\text{Total,Efter}}}$$

Eksempel:

$$C_{\text{substratopl.,Før}} = 0,064 \text{ mM} \quad V_{\text{substratopl.,Før}} = 500 \cdot 10^{-6} \text{ L} \quad V_{\text{Total,Efter}} = 1600 \cdot 10^{-6} \text{ L}$$

$$C_{\text{substratopl.,Efter}} = \frac{C_{\text{substratopl.,Før}} \cdot V_{\text{substratopl.,Før}}}{V_{\text{Total,Efter}}} \Leftrightarrow C_{\text{substratopl.,Efter}} = \frac{0,064 \text{ mM} \cdot 500 \cdot 10^{-6} \text{ L}}{1600 \cdot 10^{-6} \text{ L}} = \underline{\underline{0,02 \text{ mM}}}$$

Se tabel 1 for andre resultater.

Beregning af  $[E]$  i reaktionsblanding:

Enzymopløsning:	0,25 units/ml	$[E] = 0,01 \mu\text{M}$
	0,50 units/ml	$[E] = 0,02 \mu\text{M}$
	1,00 units/ml	$[E] = 0,04 \mu\text{M}$

$$C_{\text{enzym,Før}} \cdot V_{\text{enzym,Før}} = C_{\text{enzym,Efter}} \cdot V_{\text{enzym,Efter}} \Leftrightarrow C_{\text{enzym,Efter}} = \frac{C_{\text{enzym,Før}} \cdot V_{\text{enzym,Før}}}{V_{\text{enzym,Efter}}}$$

Eksempel:

$$C_{\text{enzym,Før}} = 0,01 \mu\text{M} \quad V_{\text{enzym,Før}} = 100 \cdot 10^{-6} \text{ L} \quad V_{\text{Total,Efter}} = 1600 \cdot 10^{-6} \text{ L}$$

$$C_{\text{enzym,Efter}} = \frac{C_{\text{enzym,Før}} \cdot V_{\text{enzym,Før}}}{V_{\text{Total,Efter}}} \Leftrightarrow C_{\text{enzym,Efter}} = \frac{0,01 \mu\text{M} \cdot 100 \cdot 10^{-6} \text{ L}}{1600 \cdot 10^{-6} \text{ L}} = \underline{\underline{6,25 \cdot 10^{-4} \mu\text{M}}}$$

Se tabel 1 for andre resultater.

Beregning af  $V_0$  ( $\mu\text{M}/\text{min}$ ) i reaktionsblanding:

$$\text{Vi bruger formlen: } \Delta A = c \cdot \varepsilon \cdot l \Leftrightarrow c = \frac{\Delta A \cdot l}{\varepsilon} \quad \varepsilon = 18.500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

Vi kan så beregne de forskellige hastigheder, idet:  $\Delta A/\text{min} \Rightarrow c/\text{min} = V_0$ .

$1/[S]$ ,  $1/[v_0]$  og  $[S]/v_0$  kan så udregnes ud fra de beregnede størrelser.

Vi kan på bilag 10 se, at der er en lineær sammenhæng mellem initialhastighed og enzymkoncentration. Dog må man sige, at ved lave substratkoncentrationer er den relative stigning i initialhastighed er lille i forhold til den relative stigning i initialhastighed ved en høj substratkoncentration.

På grafen har vi med stiplede linier tilstræbt den lineære sammenhæng, som ikke er helt tydelig ud fra de målte værdier.

### 3.

Se bilag 11.

Denne kurve viser, at processen har tre faser. I begyndelsen en ret linie (1' ordens kinetik), derefter en afbøjning (blanding af 0'ordens og 1'ordens kinetik) og så en vandret del (0'ordens kinetik). Denne kurveform forklares ved dannelse af et enzym-substrat-kompleks ( $E+S \leftrightarrow ES \rightarrow P+E$ ), idet reaktionshastigheden ved lav substratkoncentration vil være afhængig af antallet af de sammenstød mellem enzym- og substratmolekyler, der fører til dannelse af enzymsubstratkompleks. Ved konstant enzymkoncentration, men stigende substratkoncentration, vil antallet af sammenstød vokse med koncentrationen af substrat, indtil der er opnået så høj en substratkoncentration, at alle enzymmolekyler er omgivet af så mange substratmolekyler, at der kun er mulighed for dannelse af nye enzymsubstratkomplekser, efterhånden som disse komplekser spaltes til frit enzym og reaktionsprodukter. Den hastighed, hvormed denne reaktion foregår, er uafhængig af substratkoncentrationen og er karakteristisk for enzymet.

### 4.

Se bilag 12.

Vi kan på kurven aflæse  $V_{\max}$  og  $k_m$ . Som det fremgår af grafen, så er  $k_m$  er den samme for alle enzymkoncentrationer, mens  $V_{\max}$  er ændret. Det passer fint med vores teori om, at affiniteten er upåvirket ved forskellige enzymkoncentrationer; derfor samme  $k_m$ .

Det kan faktisk sammenlignes med et forsøg, hvor der forekommer *non-kompetitiv hæmning*. Ved non-kompetitiv hæmning giver dannelse mellem enzym og inhibitor som bekendt anledning til ændring i enzymets konformation. Noget af enzym bliver derfor gjort inaktiv, eller sagt på en anden måde: koncentration af (det aktive) enzym bliver ændret.

Vi kan også se, at jo større enzymkoncentration vi har, jo større  $V_{\max}$  har vi også.

### 5.

$$1,0 \text{ Units/mL} = 1,0 \mu\text{mol substrat omsat pr. min. pr. mL}$$

$$c_{\text{enzym}} = 0,04 \mu\text{M}$$

$$k_{\text{cat}} = \frac{1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol pr. min.}}{0,04 \cdot 10^{-6} \text{ M} \times 0,001 \text{ L}} \Leftrightarrow \underline{\underline{k_{\text{cat}} = 25.000 \text{ min}^{-1}}}$$

Tabel 1.

Substrat- opløsning mM	Enzym- opløsning Units/ mL	Reaktionsblanding						
		[S] (mM)	[E] ( $\mu\text{M}$ )	$\Delta A / \text{min.}$	$v_0$ ( $\mu\text{M}/\text{min}$ )	$1/[\text{S}]$	$1 / v_0$	$[\text{S}] / v_0$
0,064	0,25	0,02	$6,25 \cdot 10^{-4}$	0,03	1,57	50,0	$6,38 \cdot 10^{-1}$	12,74
	0,50		$1,25 \cdot 10^{-3}$	0,06	3,24		$3,08 \cdot 10^{-1}$	6,17
	1,00		$2,50 \cdot 10^{-3}$	0,13	7,03		$1,42 \cdot 10^{-1}$	2,84
0,128	0,25	0,04	$6,25 \cdot 10^{-4}$	0,05	2,70	25,0	$6,17 \cdot 10^{-1}$	14,80
	0,50		$1,25 \cdot 10^{-3}$	0,12	6,49		$1,54 \cdot 10^{-1}$	6,16
	1,00		$2,50 \cdot 10^{-3}$	0,30	16,2		$6,17 \cdot 10^{-2}$	2,47
0,256	0,25	0,08	$6,25 \cdot 10^{-4}$	0,09	5,08	12,5	$1,97 \cdot 10^{-1}$	15,75
	0,50		$1,25 \cdot 10^{-3}$	0,23	12,4		$8,04 \cdot 10^{-2}$	6,45
	1,00		$2,50 \cdot 10^{-3}$	0,34	18,1		$5,52 \cdot 10^{-2}$	4,42
0,512	0,25	0,16	$6,25 \cdot 10^{-4}$	0,14	7,73	6,25	$1,29 \cdot 10^{-1}$	20,70
	0,50		$1,25 \cdot 10^{-3}$	0,38	20,3		$4,93 \cdot 10^{-2}$	7,88
	1,00		$2,50 \cdot 10^{-3}$	1,11	60,0		$1,67 \cdot 10^{-2}$	2,67
1,024	0,25	0,32	$6,25 \cdot 10^{-4}$	0,25	13,5	3,12	$7,40 \cdot 10^{-2}$	23,70
	0,50		$1,25 \cdot 10^{-3}$	0,66	35,7		$2,80 \cdot 10^{-2}$	8,96
	1,00		$2,50 \cdot 10^{-3}$	1,33	71,9		$1,39 \cdot 10^{-2}$	4,45
4,00	0,25	1,25	$6,25 \cdot 10^{-4}$	0,38	20,3	0,80	$4,93 \cdot 10^{-2}$	61,58
	0,50		$1,25 \cdot 10^{-3}$	0,80	43,2		$2,31 \cdot 10^{-2}$	28,94
	1,00		$2,50 \cdot 10^{-3}$	1,50	81,1		$1,23 \cdot 10^{-2}$	15,41
8,00	0,25	2,50	$6,25 \cdot 10^{-4}$	0,32	17,0	0,40	$5,87 \cdot 10^{-2}$	147,06
	0,50		$1,25 \cdot 10^{-3}$	0,86	46,5		$2,15 \cdot 10^{-2}$	53,76
	1,00		$2,50 \cdot 10^{-3}$	1,60	86,48		$1,39 \cdot 10^{-2}$	28,91

## Diskussion af reaktionshastighedens afhængighed af temperaturen.

### 6.

Undersøgelse af temperaturafhængigheden af en enzymatisk proces støder på den vanskelighed, at enzymer, ligesom andre proteiner, denaturerer ved opvarmning, hvorved enzymaktiviteten forsvinder. Vanskeligheden kan delvis undgås ved, at man bestemmer hastigheden i så kortvarig forsøg, at der ikke når at ske nogen væsentlig nedsættelse af enzymkoncentrationen på grund af varmedenaturering. Man får da en kurve for sammenhængen mellem reaktionshastighed og temperatur, som skitseret på bilag 13.

### 7.

Se bilag 13.

Det fremgår heraf, at reaktionshastigheden stiger eksponentielt med stigende temperatur. Den nedadgående del af kurven skyldes en irreversibel varmedenaturering af enzymet. Faldet er meget brat, hvilket hænger sammen med den abnormt høje temperaturkoefficient for proteinernes varmedenaturering.

Man kan, som det fremgår af kurven ikke på entydig måde tillægge et enzym eller en enzymatisk reaktion et bestemt temperaturoptimum, idet dette bl.a. vil afhænge af forsøgstiden. Jo kortere forsøgstid, jo højere vil man finde det tilsyneladende temperaturoptimum.

### 8.

Temperatur	Absorbans	$v_0$ ( $\mu\text{M}/\text{min}$ )	Absorbans	$v_2$ ( $\mu\text{M}/\text{min}$ )	%
10° C	---	---	---	---	4
37° C	---	---	---	---	12
50° C	---	---	---	---	23
60° C	---	---	---	---	23

Se bilag 14.

## 3. Del: Reaktionshastighedens afhængighed af pH.

### 9.

Glas	Enzym	Buffer	Absorbans	$v_0$ ( $\mu\text{M}/\text{min}$ )
7 A	0,2 (U/mL)	0,1 M Tris HCl, pH 7,0	0,104	1,12
8 A	0,2 (U/mL)	0,1 M Tris HCl, pH 8,0	0,178	1,92
9 A	0,2 (U/mL)	0,1 M glycinbuffer, pH 9,0	0,266	2,88
10 A	0,2 (U/mL)	0,1 M glycinbuffer, pH 10,0	0,687	7,43
11 A	0,2 (U/mL)	0,1 M CAPS-buffer, pH 11,0	0,792	8,56
12 A	0,2 (U/mL)	0,1 M CAPS-buffer, pH 12,0	0,397	4,29

Undersøgelse af pH-afhængigheden af en enzymatisk proces giver et resultat som vist på bilag 15. Kurven viser nærmest et symmetrisk fald i reaktionshastighed til begge sider for optimumværdien.

Glas	Enzym	Buffer	Absorbans	$v_0$ ( $\mu\text{M}/\text{min}$ )
7 B	0,2 (U/mL)	0,1 M Tris HCl, pH 7,0	0,066	0,71
8 B	0,2 (U/mL)	0,1 M Tris HCl, pH 8,0	0,070	0,76
9 B	0,2 (U/mL)	0,1 M glycinbuffer, pH 9,0	0,065	0,70
10 B	0,2 (U/mL)	0,1 M glycinbuffer, pH 10,0	0,070	0,76
11 B	0,2 (U/mL)	0,1 M CAPS-buffer, pH 11,0	0,062	0,67
12 B	0,2 (U/mL)	0,1 M CAPS-buffer, pH 12,0	0,070	0,76

**10.**

Kontinuerlig registrering af produkt dannelse i det givne tilfælde ikke mulig, hvilket skyldes at produktets absorptionskoefficient er pH-afhængig. Man er derfor nød til at standse reaktionen til en defineret tid og måle til en defineret alkalisk pH.

**11.**

Forsøget udføres på følgende måde:

- Vi tilsætter noget substrat til en opløsning med enzym. Reaktionen starter.
- Reaktionen stoppes med natriumhydroxid, der har en høj pH, hvorfor enzymet denatureres og reaktionen stopper øjeblikkeligt.
- Absorbansen måles i de forskellige prøver.

Til forsøget har vi i øvrigt valgt nogle forsøgsbetingelser, der tilgodeser netop vores formål med øvelsen:

- Substratkonzentration: høj  $\Rightarrow v_0 = v_{\max}$ . Konstant 0'ordens kinetik.
- Temperatur: holdes konstant.
- Reaktionsid: 5 min.
- Enzymmængde: 100  $\mu\text{L} \Rightarrow 0,2 < \text{absorbans} < 0,8$
- pH: buffre med forskelligt pH

**Kvantitering af alkalisk phosphatase i ukendt prøve.**

Glas	Enzym	Absorbans	$C_{\text{substrat}}/\text{min.}$ ( $\mu\text{M}/\text{min}$ )	Enzymkonc. ( $\mu\text{M}/\text{min}$ )	Units	Katal.
1 A	1 x	1,540	16,6			
1 A	1 x	1,680	18,2			
				17,40	17,40	$2,9 \cdot 10^{-7}$
2 A	2 x	0,775	8,38			
2 A	2 x	0,790	8,54			
				16,92	16,92	$2,8 \cdot 10^{-7}$
4 A	4 x	0,412	4,45			
4 A	4 x	0,411	4,44			
				17,78	17,78	$3,0 \cdot 10^{-7}$
0,2 A	5 x	0,762	8,24			
0,2 A	5 x	0,794	8,58			
				(42,05) !!	---	
Gennemsnit				17,36	17,36	$2,9 \cdot 10^{-7}$

Glas	Enzym	Absorbans
1 B	1 x	0,080
1 B	1 x	0,085
2 B	2 x	0,058
2 B	2 x	0,071
4 B	4 x	0,050
4 B	4 x	0,040
0,2 B	5 x	0,059
0,2 B	5 x	0,062

**12.**

Enzymkoncentration og specifik aktivitet i den ukendte prøve:

$$c_{\text{protein,tabel}} = 4,0 \text{ mg / mL}$$

Gobind S. Kalsi & Shahid Q. Manan  
5. semester 1998