



Studieretningsprojekt 2013/14

Elevens navn: Caroline Klitdal	Klasse: 3x 03
--------------------------------	---------------

	Fag:	Vejleder:
Studieretningsfag på A-niveau	MA	TV Thomas Korup Virkus
Fag på mindst B-niveau	Ke	JK Jørgen Kloch

Område
(udfyldes af eksaminator)
Enzymkinetik

Opgaveformulering
(udfyldes af eksaminator)

Enzymkinetik for enzymet 'alkalisk fosfatase'.

Gør rede for hvordan matematiske modeller kan bruges til at opklare kemiske reaktioners kinetik og forklar specielt, hvilken model simple 0., 1. og 2. ordens reaktioner følger. Opstil og løs herunder de aktuelle differentialligninger.

Gør endvidere rede for enzyms betydning for hastigheden af biokemiske reaktioner og beskriv opbygningen af et enzym samt de faktorer som har betydning for enzymkatalyserede reaktioner.

Beskriv trinene i en enzymreaktion, og benyt definitionen på reaktionshastigheden, initialhastigheden samt steady-state tilnærmelsen til at opstille Michaëlis-Menten modellen.

Du skal gennemføre et eksperiment, hvor du undersøger om enzymet alkalisk fosfatases reaktion med para-nitrophenylphosphat (pNPP) følger Michaëlis-Menten kinetik. Reaktionen kan følges spektrofotometrisk. Du skal i forbindelse med øvelsen bestemme Michaëlis-Menten parametrene, $V_{\max}$ og K_m . Beskriv principperne i forsøget – herunder UV-vis-spektroskopi – og analyser og diskuter resultaterne af forsøget.

Det forventes, at opgaven har et omfang svarende til 15 - 20 normalsider.
(Indholdsfortegnelse, noter, litteraturliste, grafer, illustrationer etc. medregnes ikke i sidetallet).

Vejleders underskrift:

Jørgen Kloch

Vejleders underskrift:

Thomas Virkus

Jeg bekræfter herved med min underskrift, at opgavebesvarelsen er udarbejdet af mig. Jeg har ikke anvendt tidligere bedømt arbejde uden henvisning hertil, og opgavebesvarelsen er udfærdiget uden anvendelse af uretmæssig hjælp og uden brug af hjælpemidler, der ikke har været tilladt under prøven

Elevens underskrift

Caroline Klitdal

Opgaven udleveres d. 5/12 2013 kl. 14.00 i kantinen

Opgaven afleveres d. 19/12 2013 kl. 14.00 i 4 eksemplarer i adm. 2

Husk dette ark som forside i alle 4 eksemplarer

Enzymkinetik for enzymet 'alkalisk fosfatase'

SRP

Caroline Klitdal, 3.x, 19/12/2013

Indholdsfortegnelse

Abstract	2
Indledning	3
Differentialligninger	3
Løsninger	3
Vækstmodeller	4
Differentialligningsmodeller	4
Reaktionskinetik	4
Hastighedsudtryk	5
Førsteordensreaktion	6
Andenordensreaktion med ens reaktanter	8
Andenordensreaktion med forskellige reaktanter	10
Nulteordensreaktion	12
Enzymer	14
Enzymers opbygning	14
Proteiner og aminosyrer	14
Proteiners struktur	15
Det aktive site	17
Enzymkinetik	18
Michaelis-Menten	18
Initialhastigheden	19
Steady State	19
Udledning af Michaelis-Menten-ligningen	20
K_M og V_{max}	22
Enzymers reaktionshastighed	23
Enzymkoncentration	24
Substratkoncentrationen	24
Temperatur	25
pH	26
Enzymhæmmere (inhibitorer)	26
Spektroskopi	26
UV-vis-spektroskopi	27
Spektrofotometer	27
Transmittans og absorbans	27

Lambert-Beers lov	28
Alkalisk fosfatase (AP)	28
Forsøg til bestemmelse af K_M og V_{max}	29
Fremgangsmåde for AP forsøg	30
Resultater for AP forsøg	30
Fremgangsmåde for standardkurve	32
Resultater for standardkurve	33
Regression til Michaelis-Menten	35
Lineweaver-Burk-plot	36
Resultater ud fra Lineweaver-Burk	37
Diskussion	38
Konklusion	38
Perspektivering	39
Appendiks 1 – Udlledning af Lineweaver-Burk	39
Litteraturliste	40
Bøger	40
Hjemmesider	40
Billeder	41

Abstract

This study investigates the reaction rate of enzymes in a chemical reaction and how differential equations can express the zeroth, first and second order reactions. The reaction rate is influenced by the concentration of substrate and enzyme, pH-value, temperature and inhibitors. Enzyme kinetics can be studied by the Michaelis-Menten equation and other models. Michaelis-Menten is simplified by focusing on the part of the reaction where the concentration of substrate is maximal. The constants K_M and V_{max} of the Michaelis-Menten equation describe the reaction rate. By performing a spectrophotometric experiment with varying amount of substrate, the reaction rate of the enzyme alkaline phosphatase (AP) is determined. Fitting the data to the Michaelis-Menten equation reveals the values of K_M and V_{max} to $K_M = 1764 \mu\text{M}$ and $V_{max} = 4476 \mu\text{M}/\text{min}$. The double reciprocal plot of the equation gives the Lineweaver-Burk plot. The values of K_M and V_{max} are discussed by comparing Lineweaver-Burk ($K_M = 708,2 \mu\text{M}$ or $825,2 \mu\text{M}$ and $V_{max} = 764,5 \mu\text{M}/\text{min}$) to Michaelis-Menten. It is hypothesized that the values calculated by Lineweaver-Burk are more precise, since V_{max} is not determined asymptotic, but by using linear regression.

Indledning

I hverdagen kendes enzymer fra bl.a. vaskepulver, industrien og reaktioner i vores krop. De spiller en vigtig rolle biologien – livet ville faktisk ikke være muligt uden enzymer. Inden for matematikken er differentialligninger et godt redskab til analyse af enzymkinetik. Med enzymet alkalisk fosfatase som eksempel belyses i denne opgave betydningen af matematiske modeller for fastlæggelse af enzyms aktivitetskarakteristika.¹

Differentialligninger

En differentialligning er en ligning, hvor der indgår en eller flere differentialkvotienter (afledede funktioner) af en ukendt funktion samt en funktion $y(x)$. Ved løsning af differentialligninger er løsningerne funktioner. Dette skyldes, at både y' og y indgår.

Differentialligninger er af forskellige ordener. Ordenen angiver, hvor mange gange ligningen skal differentieres. En differentialligning er lineær, hvis der kun indgår led i ligningen med y i første og nulte potens (led uden y). Der er ingen led med y i andre potenser eller specielle funktioner af y som f.eks. $\sin(y)$. Hvis der indgår led med y i mere end første potens, kaldes differentialligningen for ikke-lineær.

En lineær 1. ordens differentialligning kan generelt skrives:

$$y' + a(x)y = b(x)$$

hvor $a(x)$ og $b(x)$ kaldes koefficienter, der kan være funktioner (ikke-konstante) eller reelle tal (konstante). Hvis $b(x)$ er nul, kaldes differentialligningen homogen. I en inhomogen differentialligning er funktionen $b(x)$ forskellig fra nul.²

Løsninger

Den fuldstændige løsning betegner alle mulige funktioner til differentialligningen. En partikulær løsning er en funktion, der opfylder differentialligningen. Hvordan differentialligninger løses, afhænger af differentialligningens form. Nogle kan løses ved stamfunktionsbestemmelse, mens andre løses ved brug af bestemte modeller.³

En metode til analytisk (eksakt) løsning af differentialligninger er separation af variable, hvor man, som navnet antyder, separerer de variable på hver sin side af lighedstegnet. Derefter kan differentialligningen løses ved at integrere. Separation af variable kan bruges til løsning af differentialligninger på formen:

$$\frac{dy}{dx} = f(x) \cdot g(y)$$

¹ Gasbjerg, Peder K., Gunnar Søgaard Jensen og Anette Balle Sørensen: *Bioteknologi – en basisbog*, 2011. S. 63

² <http://www.kennethhansen.net/MatMyst/3-Differentialligninger.pdf>

³ Clausen, Flemming, Gert Schomacker og Jesper Tolnø: *Gyldendals Gymnasie matematik*, 2007. S. 33

Højre siden skal altså være et produkt af to funktioner, hvor den ene funktion kun afhænger af x og den anden kun af y . På den måde kan x og y separeres, så de står på hver sin side af lighedstegnet.⁴

Vækstmodeller

Differentialkvotienten $y'(t)$ angiver væksthastigheden for $y(t)$ til tidspunktet t . Ved opstilling af vækstmodeller tages der ofte udgangspunkt i hypoteser omkring væksthastigheden. Man kigger på, hvordan y' afhænger af y . Tre simple vækstmodeller og deres løsninger:

Differentialligning	Løsning	Betegnelse
$y' = k$	$y(t) = kt + c$	Lineær vækst
$y' = ky$	$y(t) = ce^{kt}$	Ekspontiel vækst
$y' = b - ay$	$y(t) = \frac{b}{a} + ce^{-at}$	Begrænset eksponentiel vækst

5

Differentialligningsmodeller

Differentialligninger er et vigtigt værktøj til beskrivelse og analysering af problemer inden for mange videnskabelige discipliner.⁶ En differentialligningsmodel består af en differentialligning og dens løsning samt forskellige variable og parametre. Ofte bygger modeller på en antagelse eller en tilnærmelse. Der indgår en væksthastighed, der kan udtrykkes som en differentialkvotient. Modellen kan f.eks. kontrolleres ved at udføre forsøg eller ved at sammenligne med data.⁷

Reaktionskinetik

Reaktionskinetik er studiet af, hvor hurtigt kemiske reaktioner forløber, og hvilke faktorer der påvirker reaktionshastigheden. Kinetik kommer af det græske *kinetikos*, der betyder bevægelse. Reaktionshastigheden beskriver, hvor hurtigt reaktanter omdannes til produkter ved en kemisk reaktion. Forløbet af en kemisk reaktion kan følges ved at måle koncentrationen af en (eller flere) af reaktanterne som funktion af tiden.⁸

Der ses på et simpelt eksempel, hvor reaktanterne A og B omdannes til produktet C:



$[C]$ er koncentrationen af produktet C i molær (mol/L). $[C]$ dannes pr. tidsændring, og reaktionshastigheden v udtrykkes ved:

$$v = \frac{\Delta[C]}{\Delta t}$$

⁴ <http://www.kennethhansen.net/MatMyst/3-Differentialligninger.pdf>

⁵ Clausen, Flemming, Gert Schomacker og Jesper Tolnø: *Gyldendals Gymnasiematematik*, 2007. S. 39-41

⁶ <http://www.springer.com/mathematics/dynamical+systems/book/978-1-4419-5782-5>

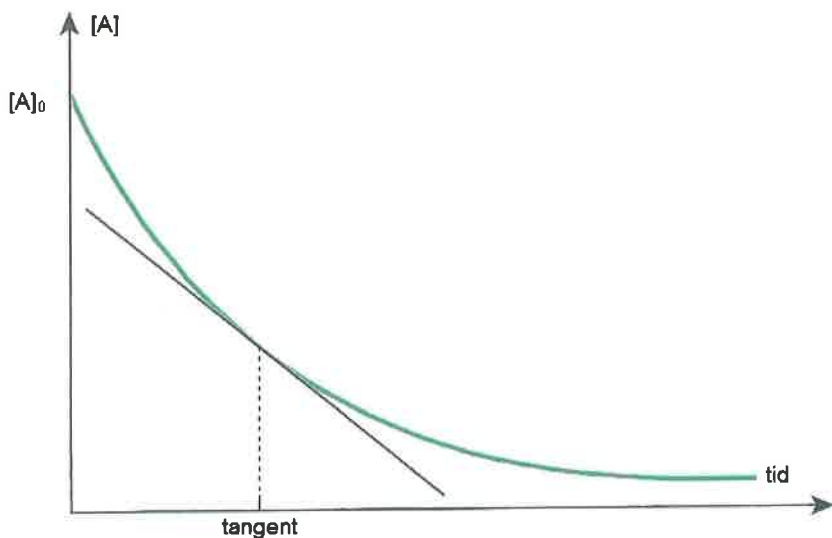
⁷ Clausen, Flemming, Schomacker, Gert & Tolnø, Jesper: *Gyldendals Gymnasiematematik*, 2007. S. 65-66

⁸ Kristiansen, Kim Rongsted: *Aurum – kemi for gymnasiet 3*, 2008. S. 6

Tilsvarende kan reaktionshastigheden for omdannelsen af reaktanterne A og B udtrykkes ved:

$$v = -\frac{\Delta[A]}{\Delta t} = -\frac{\Delta[B]}{\Delta t},^9$$

Grafen for koncentrationen af reaktanten A som funktion af tiden:



Kurven er stejlest i starten, dvs. at $[A]$ falder hurtigst i starten. Efterhånden som reaktionen forløber, flader kurven mere og mere ud, dvs. at $[A]$ falder langsommere og langsommere. For at finde ud af hvor hurtigt reaktionen forløber til et bestemt tidspunkt indtegnes en tangent til kurven for $[A]$ til det tidspunkt, reaktionshastigheden ønskes bestemt, og derefter bestemmes tangentens hældningskoefficient. Tangentens hældningskoefficient kaldes differentialkvotienten og skrives som $y'(t)$ eller $\frac{dy}{dt}$. Differentialkvotienten $y'(t)$ angiver væksthastigheden for funktionen y i punktet t . Tangenthældningen er altså ændringen af A's koncentration pr. tid, dvs. reaktionshastigheden. Idet differentialkvotienten angiver væksthastigheden, kan reaktionshastigheden v udtrykkes ved:

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

dt beskriver det korte tidsrum, hvor ændringen af $[A]$ netop er $d[A]$. Da reaktanten A omdannes under reaktionen, dvs. $[A]$ falder, er ændringen af $[A]$ negativ. Reaktionshastigheden regnes altid numerisk - som en positiv størrelse.¹⁰

Hastighedsudtryk

Reaktionshastigheden kan også beskrives ud fra hastighedsudtrykket, der afhænger af reaktanternes koncentration. Ud fra ovenstående eksempel opstilles følgende hastighedsudtryk:

$$v = k \cdot [A]^m \cdot [B]^n$$

⁹ Gasbjerg, Peder K., Gunnar Søgaard Jensen og Anette Balle Sørensen: *Bioteknologi – en basisbog*, 2011. S. 103-104

¹⁰ Kristiansen, Kim Rongsted: *Aurum – kemi for gymnasiet 3*, 2008. S. 6

Hastighedskonstanten k kan afhænge af temperaturen. Hastighedsudtrykket for en kemisk reaktion kan kun findes eksperimentelt. Et reaktionsskema viser nemlig forholdet mellem reaktanternes og produkternes stofmængder – og viser ikke hvordan reaktionen foregår. Til gengæld viser hastighedsudtrykket, hvilken sammenhæng der er mellem reaktionshastigheden og reaktantkoncentrationerne – altså hvordan reaktionen foregår.

EkspONENTERNE, som koncentrationerne opløftes til, angiver reaktionens orden. I ovenstående hastighedsudtryk er reaktionen af m 'te orden med hensyn til A, og af n 'te orden med hensyn til B. Den totale reaktionsorden er $m + n$. De fleste reaktioner er enten af 0., 1. eller 2. orden.¹¹

Førsteordensreaktion

For en førsteordensreaktion:



opstilles hastighedsudtrykket:

$$v = k \cdot [A]$$

Definitionen af reaktionshastigheden ud fra tangenthældningen er $v = -\frac{d[A]}{dt}$. Sættes de to udtryk lig hinanden, fås:

$$-\frac{d[A]}{dt} = k \cdot [A]$$

Dette er en homogen 1. ordens lineær differentialligning på formen $y' = -k \cdot y$. Ligningens fuldstændige løsning beskriver koncentrationen af A som funktion af tiden. Reaktionshastigheden er ligefrem proportional med $[A]$.

Differentialligningens løsning skal opfylde begyndelsesbetingelsen $[A] = [A]_0$ for $t = 0$. Denne betingelse er startkoncentrationen for $[A]$. Differentialligningen kan løses ved separation af de variable, idet variableerne $[A]$ og t kan skrives på hver sin side af lighedstegnet:

$$-\frac{d[A]}{dt} = k \cdot dt$$

Venstre side omskrives:

$$-\frac{1}{[A]} \cdot d[A] = k \cdot dt$$

Koncentrationen $[A]$ til et vilkårligt tidspunkt t kan opstilles som punkt: $(t, [A])$. Ud fra begyndelsesbetingelsen kan følgende punkt opstilles: $(0, [A]_0)$.¹² Der integreres fra $(0, [A]_0)$ til $(t, [A])$, da ændringen af $[A]$ netop er udtryk for reaktionshastigheden¹³ og for at fjerne $d[A]$ og dt :

¹¹ Parbo, Henrik og Annette Nyvad: *Kend Kemien 3*, 2010. S. 15

¹² Kristiansen, Kim Rongsted: *Aurum – kemi for gymnasiet 3*, 2008. S. 10-11

¹³ http://chemwiki.ucdavis.edu/Physical_Chemistry/Kinetics/Reaction_Rates/Second-Order_Reactions

$$-\int_{[A]_0}^{[A]} \frac{1}{[A]} d[A] = \int_0^t k dt$$

Ligningerne løses ved brug af stamfunktionerne:

$$\int \frac{1}{x} dx = \ln(x), \text{ hvor } x > 0$$

$$\int k dx = k \cdot \int 1 dx = k \cdot x$$

Ovenstående stamfunktioner medfører:

$$-\ln([A]) \Big|_{[A]_0}^{[A]} = k[t]_0^t$$

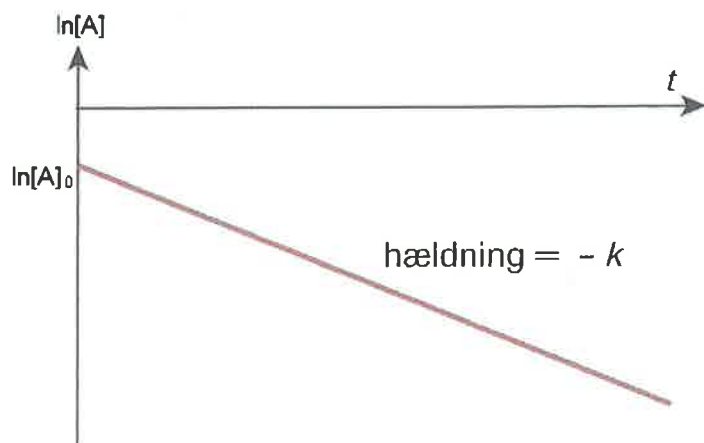
Grænserne indsættes og udregnes:

$$-\ln[A] + \ln[A]_0 = k \cdot t$$

Udtrykket omskrives ved at trække $k \cdot t$ fra og lægge $\ln[A]$ til på begge sider:

$$\ln[A] = -k \cdot t + \ln[A]_0$$

Udtrykket er en lineær funktion på formen $y = ax + b$. Det kaldes det integrerede hastighedsudtryk for en førsteordensreaktion. Hvis $\ln[A]$ afbildes som funktion af t , fås en ret linje med hældningskoefficienten $-k$. Linjen skærer 2. akse i punktet $(0, \ln[A]_0)$.



Idet den oprindelige differentialligning beskriver reaktionshastigheden, ønskes et udtryk, der direkte giver koncentrationen af A som funktion af tiden. Den naturlige logaritme, $\ln$, med grundtal e opfylder: $\ln(x) = y \Leftrightarrow e^y = x$. Af definitionen fremgår det, at $\ln(e^x) = x$ og $e^{\ln(x)} = x$. Ved at indsætte grundtallet e i alle led fås:

$$[A] = [A]_0 \cdot e^{-k \cdot t}$$

¹³ http://chemwiki.ucdavis.edu/Physical_Chemistry/Kinetics/Reaction_Rates/Second-Order_Reactions

Det ses, at udtrykket er en eksponentiel funktion på formen $y = b \cdot a^x$. For en førsteordensreaktion aftager koncentrationen af A altså eksponentielt med tiden.¹⁴

Andenordensreaktion med ens reaktanter

For en andenordensreaktion:



opstilles hastighedsudtrykket:

$$v = k \cdot [A] \cdot [A] = k \cdot [A]^2$$

Definitionen på reaktionshastigheden $v = -\frac{d[A]}{dt}$ sættes lig med hastighedsudtrykket:

$$-\frac{d[A]}{dt} = k \cdot [A]^2$$

Dette er en 1. ordens homogen ikke-lineær differentialligning på formen $y' = -k \cdot y^2$.

Ligningen løses ved separation af variable, hvor der ganges med dt og divideres med $[A]^2$:

$$-\frac{1}{[A]^2} \cdot d[A] = k \cdot dt$$

Der integreres fra begyndelsesbetingelsen $(0, [A]_0)$ til et vilkårligt tidspunkt t med koncentrationen $[A]$; $(t, [A])$, så d[A] og dt kan fjernes:

$$-\int_{[A]_0}^{[A]} \frac{1}{[A]^2} d[A] = \int_0^t k dt$$

For at løse ligningen benyttes stamfunktionen:

$$\int \frac{1}{x^2} dx = -\frac{1}{x}$$

Ligningens løsning er:

$$-\left[-\frac{1}{[A]}\right]_{[A]_0}^{[A]} = k[t]_0^t$$

Grænserne indsættes, og ligningen forkortes:

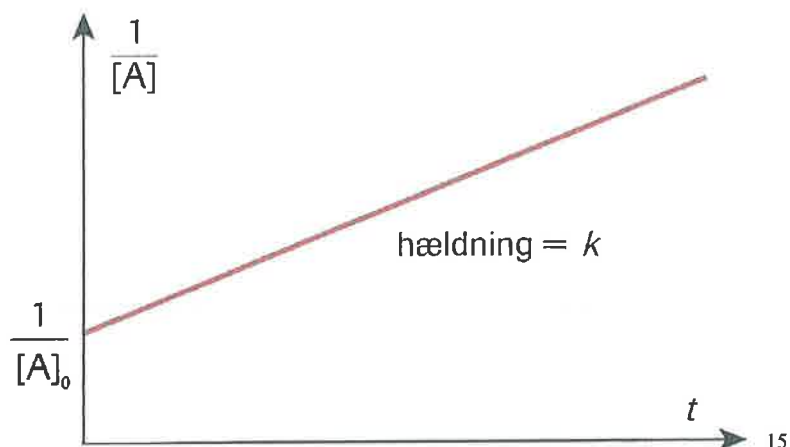
$$\frac{1}{[A]} - \frac{1}{[A]_0} = k \cdot t$$

$\frac{1}{[A]_0}$ lægges til på begge sider:

¹⁴ Kristiansen, Kim Rongsted: *Aurum – kemi for gymnasiet 3*, 2008. S. 10-11

$$\frac{1}{[A]} = k \cdot t + \frac{1}{[A]_0}$$

Denne ligning er på formen for en lineær funktion $y = ax + b$. Hvis $\frac{1}{[A]}$ plottes som funktion af t , fås en ret linje med hældningen k , hastighedskonstanten, og en skæring med 2. akse i $\frac{1}{[A]_0}$:



Et udtryk for halveringstiden for en andenordensreaktion kan udledes ud fra ligningen:

$$\frac{1}{[A]_t} = k \cdot t + \frac{1}{[A]_0}$$

hvor $[A]$ er koncentrationen til et vilkårligt tidspunkt t , og $[A]_0$ er startkoncentrationen til tiden $t = 0$. Ved halveringstiden er $t = t_{1/2}$, hvilket medfører:

$$[A]_{t_{1/2}} = \frac{1}{2} [A]_0$$

Ligningen kan derfor omskrives til:

$$\frac{1}{\frac{1}{2} \cdot [A]_0} = k \cdot t_{1/2} + \frac{1}{[A]_0}$$

Hvis $\frac{1}{[A]_0}$ trækkes fra fås:

$$\frac{1}{\frac{1}{2} \cdot [A]_0} - \frac{1}{[A]_0} = k \cdot t_{1/2}$$

Da:

$$\frac{1}{\frac{1}{2} \cdot [A]_0} = \frac{2}{[A]_0}$$

¹⁵ Kristiansen, Kim Rongsted: *Aurum – kemi for gymnasiet 3*, 2008. S. 16-17

kan udtrykket forkortes:

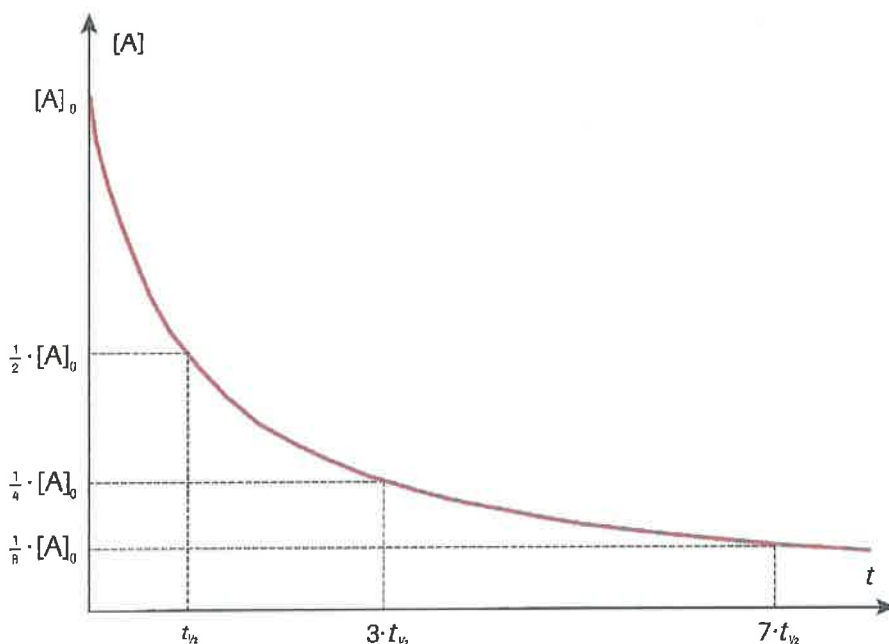
$$\frac{2}{[A]_0} - \frac{1}{[A]_0} = k \cdot t_{1/2} \Leftrightarrow \frac{1}{[A]_0} = k \cdot t_{1/2}$$

Ved at dividere med k fås:

$$t_{1/2} = \frac{1}{k \cdot [A]_0}$$

Dette er et udtryk for halveringstiden for en andenordensreaktion, og differentialligningen er hermed løst.¹⁶

Grafen viser [A] som funktion af tiden t:



Det ses, at halveringstiden er afhængig af startkoncentrationen [A]₀. Koncentrationen [A] aftager, efterhånden som reaktionen forløber, og som det fremgår af grafen, vil der dermed gå længere og længere tid mellem halveringen af [A].¹⁷

Andenordensreaktion med forskellige reaktanter

Hvis reaktionen så således ud:



ville koncentrationen af de to reaktanter ikke være ens, og hastighedsudtrykket $v = k \cdot [A]^2$ ville dermed ikke kunne benyttes. I stedet opstilles:

$$v = k \cdot [A] \cdot [B]$$

¹⁶ http://chemwiki.ucdavis.edu/Physical_Chemistry/Kinetics/Reaction_Rates/Second-Order_Reactions

¹⁷ Kristiansen, Kim Rongsted: *Aurum – kemi for gymnasiet 3*, 2008. S. 17

Reaktionshastigheden beskrives ud fra følgende:

$$-\frac{d[A]}{dt} = k \cdot [A] \cdot [B]$$

Dette er en 1. ordens lineær homogen differentialligning, hvor reaktionshastigheden er ligefrem proportional med reaktantkoncentrationerne $[A]$ og $[B]$ samt en konstant. For at kunne integrere den, skal man vide, hvordan koncentrationerne A og B forholder sig til hinanden. Hvis det antages, at x er koncentrationen for hver af reaktanterne til tiden t , og at $[A]_0$ og $[B]_0$ er startkoncentrationerne, så vil koncentrationerne til tiden t være:

$$[A] = [A]_0 - x \text{ og } [B] = [B]_0 - x$$

Differentialligningen kan derfor skrives som:

$$-\frac{d[A]}{dt} = k \cdot ([A]_0 - x) \cdot ([B]_0 - x)$$

Idet væksthastigheden $-\frac{d[A]}{dt} = \frac{dx}{dt}$ fås:

$$\frac{dx}{dt} = k \cdot ([A]_0 - x) \cdot ([B]_0 - x)$$

Ligningen omskrives ved at gange med dt og dividere med $([A]_0 - x) \cdot ([B]_0 - x)$:

$$\frac{dx}{([A]_0 - x) \cdot ([B]_0 - x)} = k \cdot dt$$

Da $x = 0$ til tidspunktet $t = 0$, kan der integreres mellem de to grænser¹⁸:

$$\int_0^x \frac{1}{([A]_0 - x) \cdot ([B]_0 - x)} dx = \int_0^t k dt$$

Integralet på venstre side løses ved brug af stambrøker, der omskriver udtrykket til formen $\frac{1}{n}$, så ligningen kan løses¹⁹. Derudover bruges også stamfunktionen $\int \frac{1}{x} dx = \ln(x) + k$:

$$\frac{1}{b-a} \cdot \left(\ln\left(\frac{1}{a-x}\right) - \ln\left(\frac{1}{b-x}\right) \right) + k$$

Venstre side omskrives til ovenstående, og højre siden løses også:

$$\frac{1}{[B]_0 - [A]_0} \cdot \left(\ln\left(\frac{1}{[A]_0 - x}\right) - \ln\left(\frac{1}{[B]_0 - x}\right) \right) + k = k \cdot t$$

Konstanten k er et tal og kan derfor samles på højre side. Der ganges med startkoncentrationerne $[A]_0$ og $[B]_0$ i de to udtryk for $\ln$, så $[A]$ og $[B]$ igen kan indføres:

¹⁸ http://chemwiki.ucdavis.edu/Physical_Chemistry/Kinetics/Reaction_Rates/Second-Order_Reactions

¹⁹ <http://www.matnatverdenskklasse.dk/skoler/broek.htm>

$$\frac{1}{[B]_0 - [A]_0} \cdot \left(\ln \left(\frac{[A]_0}{[A]_0 - x} \right) - \ln \left(\frac{[B]_0}{[B]_0 - x} \right) \right) = k \cdot t$$

Ud fra antagelserne $[A] = [A]_0 - x$ og $[B] = [B]_0 - x$ fås:

$$\frac{1}{[B]_0 - [A]_0} \cdot \left(\ln \left(\frac{[A]_0}{[A]} \right) - \ln \left(\frac{[B]_0}{[B]} \right) \right) = k \cdot t$$

Der omskrives ved at bruge logaritme-reglen $\ln(a) - \ln(b) = \ln\left(\frac{a}{b}\right)$:

$$\frac{1}{[B]_0 - [A]_0} \cdot \left(\ln \left(\frac{\frac{[A]_0}{[A]}}{\frac{[B]_0}{[B]}} \right) \right) = k \cdot t$$

Ved at gange med den omvendte $\frac{[B]}{[B]_0}$ fås:

$$\frac{1}{[B]_0 - [A]_0} \cdot \left(\ln \left(\frac{[B] \cdot [A]_0}{[B]_0 \cdot [A]} \right) \right) = k \cdot t$$

Der ganges med $[B]_0 - [A]_0$:

$$\ln \left(\frac{[B] \cdot [A]_0}{[B]_0 \cdot [A]} \right) = ([B]_0 - [A]_0) \cdot k \cdot t$$

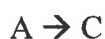
Hermed er differentialligningen løst. Det ses, at udtrykket er på formen $y = ax + b$.

20

Nulteordensreaktion

De fleste reaktioner med kun en reaktant følger enten førsteordens- eller andenordenskinetik, men i nogle tilfælde er reaktionen af nulte orden.²¹

For en nulteordensreaktion:



opstilles hastighedsudtrykket:

$$v = k \cdot [A]^0 = k$$

Reaktionshastigheden er lig med en konstant og er derfor uafhængig af $[A]$.

²⁰ http://chemwiki.ucdavis.edu/Physical_Chemistry/Kinetics/Reaction_Rates/Second-Order_Reactions

²¹ Bugge, Carsten Skovsø: *Bioteknologi 2*, 2010. Appendiks til s. 60-72

Hastighedsudtrykket sættes lig med definitionen på reaktionshastigheden $v = -\frac{d[A]}{dt}$:

$$-\frac{d[A]}{dt} = k$$

Dette er en 1. ordens homogen lineær differentialligning på formen $y' = -k$.

Ved separation af variable fås:

$$-d[A] = k \cdot dt$$

Der integreres fra begyndelsesbetingelsen $t = 0$ og $[A] = [A]_0$ til et vilkårligt tidspunkt t med koncentrationen $[A]$:

$$-\int_{[A]_0}^{[A]} d[A] = \int_0^t k \, dt$$

Grænserne indsættes, og der forkortes:

$$-[A] + [A]_0 = k \cdot t$$

$[A]_0$ trækkes fra på begge sider:

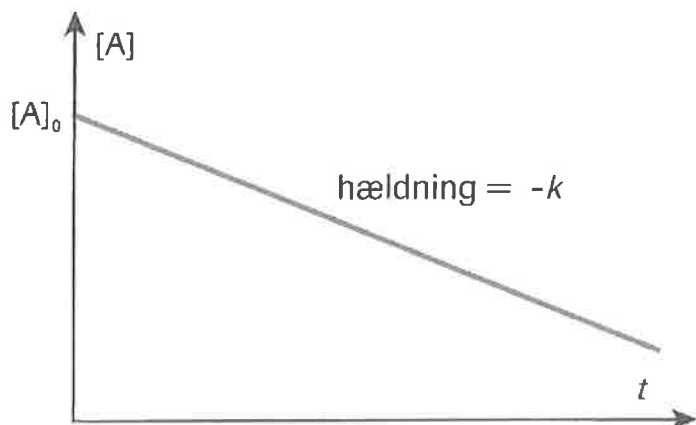
$$-[A] = -[A]_0 + k \cdot t$$

Der divideres med -1 i alle led for at ændre fortegn:

$$[A] = [A]_0 - k \cdot t$$

Dermed er differentialligningen løst.

Ligningen er på formen for en lineær funktion $y = ax + b$. Hvis $[A]$ plottes som funktion af t for en nulteordensreaktion med hensyn til $[A]$, er grafen en ret linje:



[A] aftager lineært med tiden, og hældningskoefficienten er $-k$.²²

Enzymer

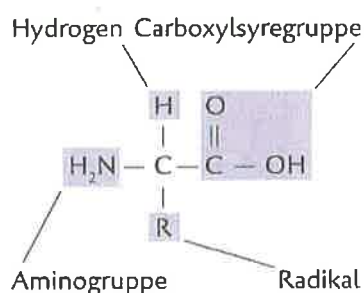
Et enzym er et protein, der virker som en biokemisk katalysator. Enzymer forøger hastigheden af en biokemisk reaktion med en faktor på mere end en million uden selv at blive forbrugt og kræver ikke en ændring i temperatur eller pH.²³ På den måde kan processer, der normalt kræver høje temperaturer, forløbe hurtigt ved lave temperaturer. Biokemiske processer ville ikke kunne forløbe uden enzymer, og de foregår derfor overalt i levende organismer, herunder mennesket.²⁴

Enzymers opbygning

Nogle enzymer består kun af protein, andre skal bruge cofaktorer eller coenzymer for at fungere. En cofaktor er et ikke-proteinopbygget hjælpemolekyle/-ion. Cofaktorer er typisk enkle ioner som Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} eller Cu^{2+} . Det kan også være større organiske stoffer som f.eks. ATP, der kun midlertidigt sidder fast på enzymet. Disse cofaktorer kaldes et coenzym.²⁵ Coenzymer kan bevæge sig fra et enzym til et andet og på den måde bruges i forskellige reaktioner – genbruges ligesom enzymet.²⁶ Hvis et enzym indeholder en hjælpegruppe kaldes proteindelen for et *apoenzym* og hele enzymet for et *holoenzym*. Er hjælpegruppen løst fæstnet til aminosyrekæden, kaldes det en cofaktor. Er hjælpegruppen derimod bundet til proteinet med en elektronparbinding, kaldes den en prostetisk gruppe.²⁷

Proteiner og aminosyrer

Enzymer er opbygget af protein med op til flere tusinde aminosyrer. Aminosyrer indeholder en aminogruppe og en carboxylsyregruppe. Radikalet R gør aminosyrerne forskellige. Den generelle formel for proteiner:



28

²² Kristiansen, Kim Rongsted: *Aurum – kemi for gymnasiet 3*, 2008. S. 19

²³ Stryer, Lubert: *Biochemistry*, 1988. S. 177

²⁴ Gasbjerg, Peder K., Gunnar Søgaard Jensen og Anette Balle Sørensen: *Biotechnologi – en basisbog*, 2011. S. 68

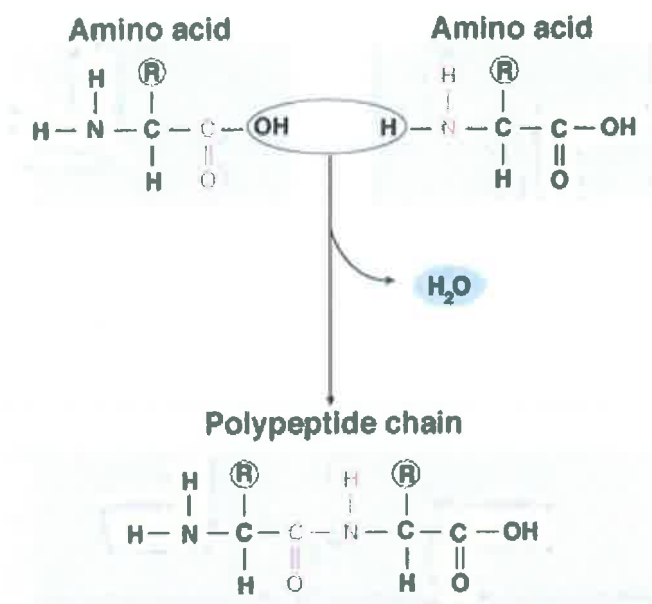
²⁵ Bruun, Kim og Per Godsk Petersen: *Gymnasie BIOS*, 2008. S. 72

²⁶ Borup, Vibeke Diness og Jakob Dal: *Basal Biokemi*, 2012. S.124

²⁷ Bruun, Kim og Per Godsk Petersen: *Gymnasie BIOS*, 2008. S. 72

²⁸ Bugge, Carsten Skovsø, Kresten Cæsar Torp og Stephan Vogelius Wiener: *Biotechnologi 2*, 2011. S. 51

Aminosyrer er bundet sammen med peptidbindinger. En peptidbinding dannes mellem to aminosyrer ved en kondensation mellem aminogruppen og carboxylsyregruppen under fraspaltning af vand. Den røde farve markerer peptidbindingen:



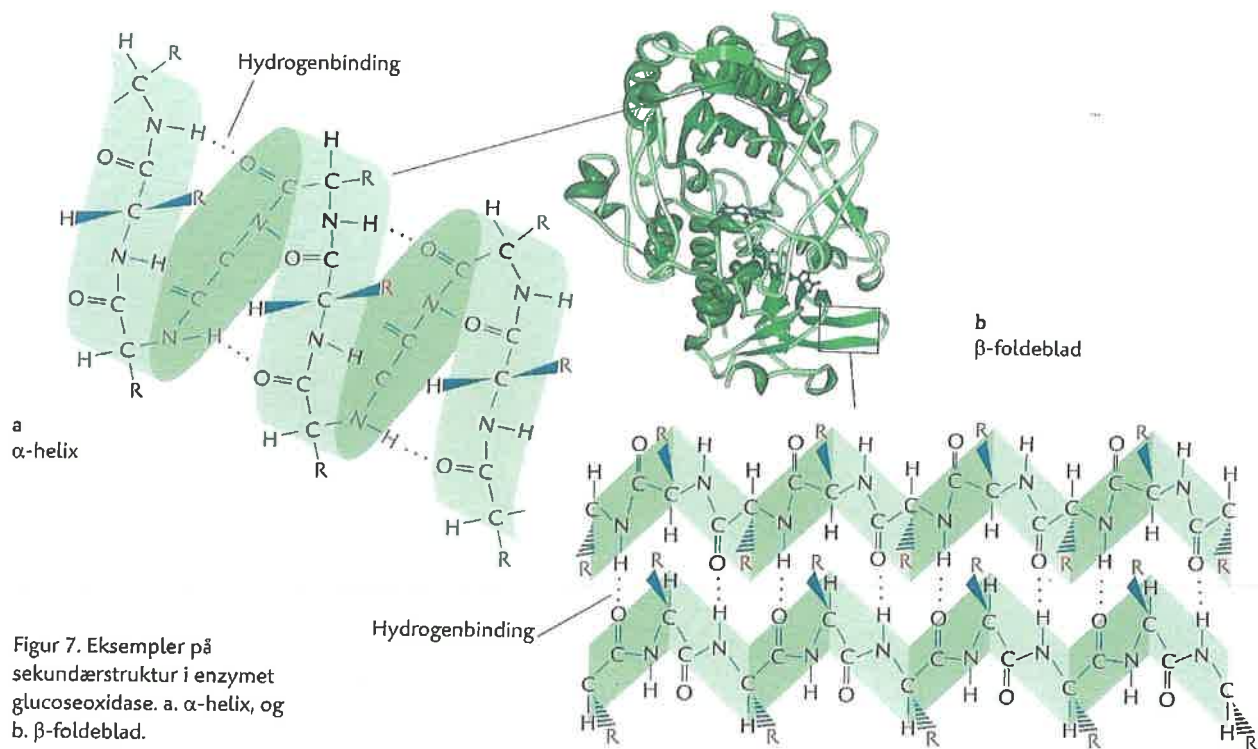
I opbygningen af proteiner i levende organismer indgår tyve forskellige aminosyrer. Disse tyve aminosyrer har forskellige egenskaber pga. radikalernes variation i størrelse, polaritet og ladning.

Proteiners struktur

Proteinernes egenskaber afhænger af molekylestrukturen. Deres struktur inddeles i primær, sekundær, tertiær og kvarternær struktur. Primærstrukturen af et protein angiver rækkefølgen af aminosyrer i proteinet. Den er afgørende for peptidkædens rumlige struktur og dens kemiske egenskaber. Et protein kan godt bestå af flere peptidkæder.²⁹

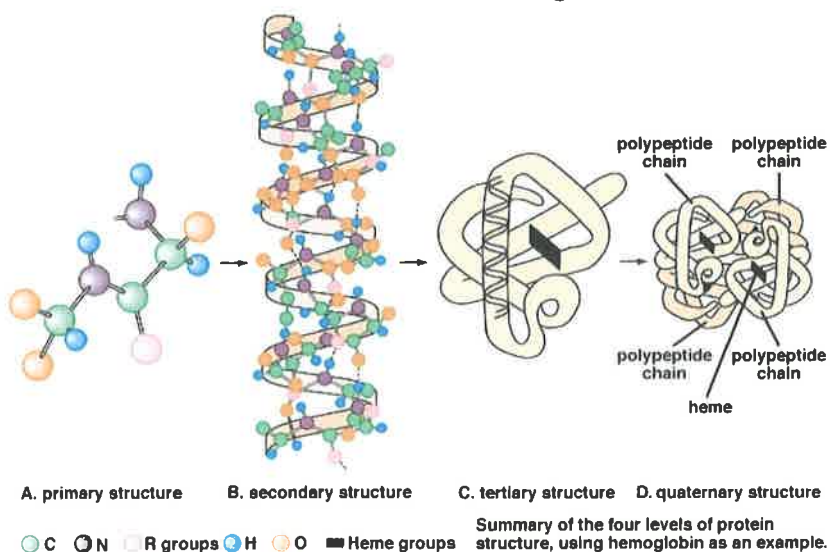
Sekundærstrukturen angiver strukturen af peptidets rygrad – hvordan proteinet er foldet. De to vigtigste strukturer kaldes α -helix og β -foldeblad. α -helixen har en vindeltrappestruktur og er dermed ret kompakt, mens β -foldebladet består af to eller flere fuldt udfoldede polypeptidkæder, der giver en åben struktur (se billede herunder). I α -helixstrukturen fastholdes aminosyrerne af hydrogenbindinger mellem N-H-gruppen på en aminosyre og C=O-gruppen på en anden aminosyre fire aminosyreled væk fra N-H-gruppen. I β -foldebladsstrukturen ligger polypeptidkæderne i en udfoldet zig-zag-form og bindes sammen med hydrogenbindinge på tværs af kæderne.

²⁹ Kristiansen, Kim Rongsted og Gunnar Cederberg: *Aurum – kemi for gymnasiet 2*, 2007. S. 286 og 288-291



Tertiærstrukturen angiver proteinets overordnede struktur – hvordan peptidkæden foldes sammen. I den tertiære struktur er det radikalerne, der danner bindingerne, som enten er disulfidbindinger, hydrogenbindinger eller ionbindinger. Kvarternærstrukturen angiver den samlede struktur sammensat af flere forskellige proteiner med hver sine peptidkæder, der kaldes underenheder. Underenhederne holdes også sammen af bindinger mellem radikalerne.³⁰

Billedet viser alle fire strukturer for hæmoglobin:



31

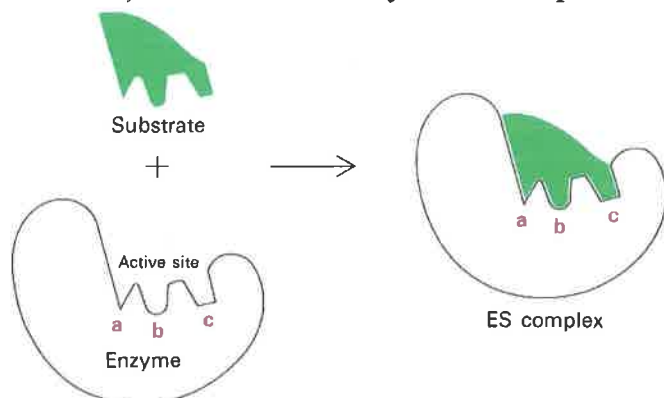
³⁰ Bugge, Carsten Skovsø, Kresten Cæsar Torp og Stephan Vogelius Wiener: *Bioteknologi 2*, 2011. S. 54-55

³¹ <http://deesapbio.blogspot.dk/2010/09/chapter-three.html>

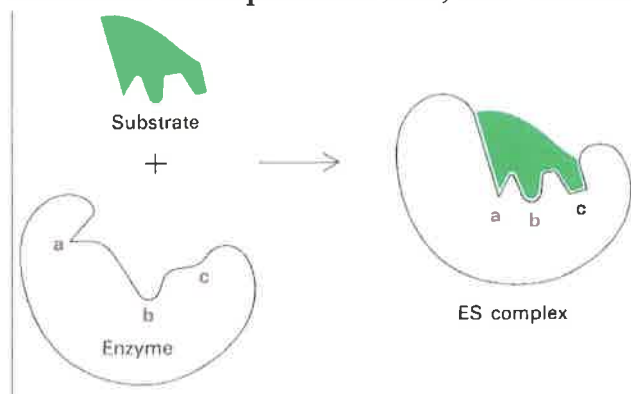
Det aktive site

Når proteinet foldes, danner aminosyrerne en fordybning i proteinet, der kaldes det aktive site.³² Enzymets aktive site indeholder både en bindingsdel og en katalyseringsdel. Bindingsdelen binder substratet (og evt. cofaktorer) til enzymet, mens katalyseringsdelen danner og bryder bindinger, dvs. sørger for at den kemiske reaktion sker. Enzymer er specifikke, hvilket betyder, at de ofte kun katalyserer én bestemt biokemisk reaktion.³³ Trods enzymernes store forskelle i struktur, specificitet og måde at katalysere på, kan der angives en række generelle karakteristika for det aktive site:

1. Det aktive site fylder kun en lille del af enzymet, og de fleste aminosyrer i enzymet er dermed ikke i kontakt med substratet.
2. Det aktive site er en tredimensionel fordybning eller lomme, der er dannet af forskellige aminosyresekvenser i polypeptidkædens primære struktur.
3. Substratet bindes til enzymets aktive site med svage intermolekylære kræfter som dipol-dipol-kræfter, dispersionskræfter og hydrogenbindinger
4. Enzymernes bindingsspecificitet afhænger af rækkefølgen af atomer (/aminosyrer) i det aktive site, dvs. strukturen. For at passe ind i det aktive site skal substratets tredimensionelle struktur matche denne rækkefølge. Denne model, hvor substratet passer perfekt i enzymets aktive site, kaldes lock-and-key. Substratet passer til enzymet, som en nøgle passer til en lås:



Nogle enzymeres aktive site ændres dog markant, når substratet bindes. Den perfekt matchende form opnås altså først, efter substratet er bundet. Denne model kaldes *induced fit*:



34

³² Bugge, Carsten Skovsø, Kresten Cæsar Torp og Stephan Vogelius Wiener: *Bioteknologi 2*, 2011. S. 62

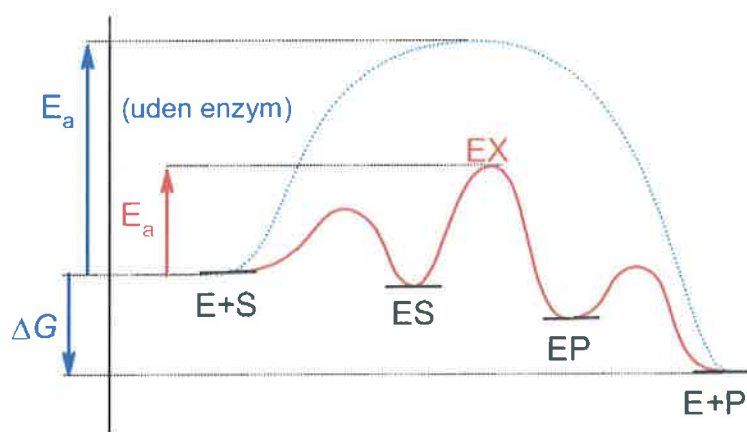
³³ Jensen, Hans Chr., Jakob Schiødt og Ulla Christensen: *Enzymkinetik*, 2009. S. 4

³⁴ Stryer, Lubert: *Biochemistry*, 1988. S. 185-187

Enzymkinetik

Enzymkinetik er studiet af den kemiske reaktion, der katalyseres med et enzym. Man måler reaktionshastigheder ved forskellige substrat- eller enzymhastigheder under kontrollerede forhold for at fastlægge enzymaktiviteten. Enzymkinetik bygger på generel reaktionskinetik.³⁵

Nedenstående billeder viser trinene i en enzymreaktion. Aktiveringsenergien E_A er mindre for reaktionen med enzym end uden enzym. Enzymet forøger reaktionshastigheden ved at nedsætte aktiveringsenergien, mens reaktionens energiafgivelse ΔG er den samme med eller uden enzym.



Enzymet E bindes til substratet S, så der dannes et enzym-substrat-kompleks ES. Derefter katalyseres reaktionen i det aktive center, så der via et mellemtrin (aktiveret kompleks EX) dannes et enzym-produkt-kompleks EP. Det aktiverede kompleks er en overgangstilstand, hvor bindingen mellem ES brydes, og bindingen mellem EP dannes. Komplekset EP splittes herefter op i enzym E og

produkt P. Enzymet er ikke blevet ændret og kan igen reagere med substrat.³⁶

Michaelis-Menten

I 1913 fremsatte tyskeren Leonor Michaelis og canadieren Maud Menten en simpel model for enzymreaktioner, som ses på billedet³⁷:



38

Modellen beskriver, hvordan substratet S bindes til enzymet E for at danne et enzym-substrat-kompleks ES, der enten kan gendanne S og E eller omdannes til produktet P og enzymet E:



³⁵ Bugge, Carsten Skovsø, Kresten Cæsar Torp og Stephan Vogeliuss Wiener: *Bioteknologi 2*, 2011. S. 66

³⁶ Jensen, Hans Chr., Jakob Schiødt og Ulla Christensen: *Enzymkinetik*, 2009. S. 4

³⁷ Gasbjerg, Peder K., Gunnar Søgaard Jensen og Anette Balle Sørensen: *Bioteknologi – en basisbog*, 2011. S. 116

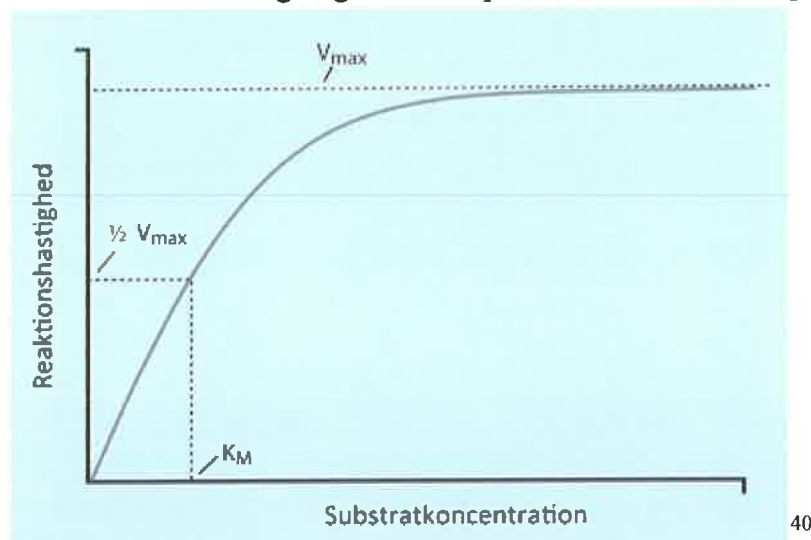
³⁸ <http://www.biotechacademy.dk/Undervisningsprojekter/Grundskoleprojekter/Enzymerfolkeskolen/teori/enzymer>

k_1 er hastighedskonstanten for dannelsen af ES, k_{-1} er hastighedskonstanten for dissociationen af ES (den omvendte reaktion), og k_2 er hastighedskonstanten for dannelsen af E + P.

Michaelis-Menten-ligningen, der beskriver sammenhængen mellem substratkoncentrationen [S] og reaktionshastigheden V, kan opstilles ud fra modellen:

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

Michaelis-Menten-ligningen med V plottet som funktion af [S]³⁹:

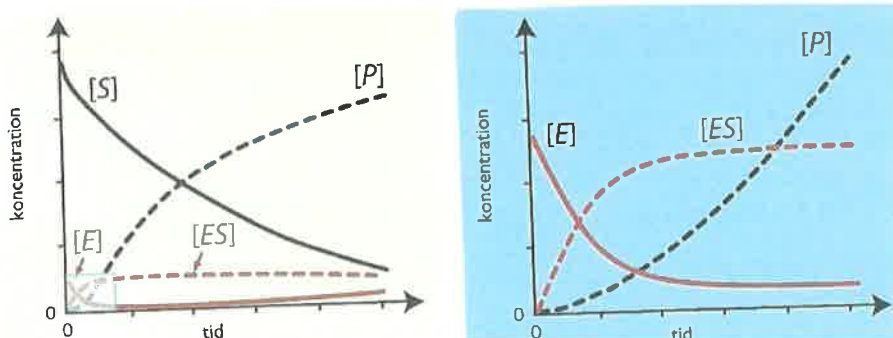


Initialhastigheden

Initialhastigheden er hastigheden i begyndelsen af reaktionen. I Michaelis-Menten-modellen ses der på initialhastigheden – lige når S og E er blandet. Her er der dannet så lidt produkt, at ES-komplekset ikke kan gendannes. Man kan derfor se bort fra hastighedskonstanten k_{-2} , som derfor ikke fremgår ovenfor. Initialhastigheden skrives som v_0 .

Steady State

Koncentrationen af S, E, ES og P plottet som funktion af tiden:



³⁹ Gasbjerg, Peder K., Gunnar Søgaard Jensen og Anette Balle Sørensen: *Bioteknologi – en basisbog*, 2011. S. 116-118

⁴⁰ <http://www.biotechacademy.dk/Undervisningsprojekter/Gymnasiale-projekter/enzymer/teori/enzymer/enzymkinetik>

Den blå graf er en forstørrelse af forholdene meget tidligt i reaktionen, der ses nede i venstre hjørne på den gule graf. Det ses, at $[S] \gg [E]$, hvilket betyder, at selvom S hurtigt bindes til E og danner ES, så bliver koncentrationen af frit substrat ikke ændret. Der er hele tiden et overskud af S, så alle enzymer er mættet med S. Dette betyder, at $[S]$ ikke påvirker ligningen.⁴¹ Når S og E blandes, stiger $[ES]$ hurtigt. Der opstår en tilstand, hvor ES dannes med samme hastighed, som det spaltes, dvs. $[ES]$ er konstant. Denne tilstand kaldes steady state.⁴²

Udledning af Michaelis-Menten-ligningen

Michaelis-Menten-ligningen antager, at $[S] \gg [E]$, hvor reaktionen er i den initiale steady state.

Ud fra definitionen for reaktionshastigheden opstilles:

$$V = k_1 \cdot [E] \cdot [S] = \frac{d[ES]}{dt}$$

$$V = k_2 \cdot [ES] = \frac{d[P]}{dt}$$

Når $[S] \gg [E]$, vil alle enzymer konstant være bundet til et ES-kompleks, dvs. der vil ikke være nogen ledige aktive sites, som S kan bindes til, og dannelsen af produkt sker langsomt. Det nederste hastighedsudtryk er det langsomste og dermed det hastighedsbestemmende, så V kan beskrives derudfra. Steady state antager, at $[ES]$ er konstant. For at $[ES]$ er konstant, skal ES dannes med samme hastighed, som det dissocieres, dvs. $V_{ESdissociation} = V_{ESdannelse}$:

$$V_{ESdannelse} = k_1 \cdot [E] \cdot [S]$$

$$V_{ESdissociation} = k_{-1} \cdot [ES] + k_2 \cdot [ES]$$

De to udtryk sættes lig hinanden:

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

De omskrives ved at sætte $[ES]$ uden for parentes:

$$k_1 \cdot [E] \cdot [S] = (k_{-1} + k_2) \cdot [ES]$$

Derefter divideres der med k_1 og $[ES]$ på begge sider, og Michaelis-konstanten K_M indføres for at forsimple udtrykket:

$$\frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1} = K_M$$

Idet enzymet ikke dissocieres ved processen, er den totale enzymkoncentration lig med begyndelseskonzentrationen af enzymet, hvor substratet endnu ikke er bundet til enzymet. Under reaktionen er enzymet E enten frit eller bundet til substrat i ES-kompleks, og den totale enzymkoncentration er:

⁴¹ Gasbjerg, Peder K., Gunnar Søgaard Jensen og Anette Balle Sørensen: *Bioteknologi – en basisbog*, 2011. S. 118-119

⁴² Jensen, Hans Chr., Jakob Schiødt og Ulla Christensen: *Enzymkinetik*, 2009. S. 8

$$[E_T] = [E] + [ES] \Leftrightarrow [ES] = [E_T] - [E]$$

Dette indsættes i hastighedsudtrykket $V = k_2 \cdot [ES]$:

$$V = k_2 \cdot ([E_T] - [E])$$

$[E]$ isoleres i Michaelis-konstanten $K_M = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]}$ ved at gange med $[ES]$ og dividere med $[S]$:

$$[E] = \frac{K_M \cdot [ES]}{[S]}$$

Dette indsættes i $V = k_2 \cdot ([E_T] - [E])$:

$$V = k_2 \cdot ([E_T] - \frac{K_M \cdot [ES]}{[S]})$$

$[ES]$ isoleres i hastighedsudtrykket $V = k_2 \cdot [ES]$ ved at dividere med k_2 , så der står $[ES] = \frac{V}{k_2}$, og indsættes i ovenstående udtryk:

$$V = k_2 \cdot ([E_T] - \frac{K_M \cdot V}{[S] \cdot k_2})$$

k_2 ganges ind i parentesen, og da $\frac{k_2}{k_2} = 1$ fås:

$$V = k_2 \cdot [E_T] - \frac{K_M \cdot V}{[S]}$$

Den maksimale hastighed V_{max} nås, når alle enzymer er mættet med substrat i ES-kompleks, dvs. når den totale enzymkoncentration $[E_T] = [ES]$. Hastighedsudtrykket $V = k_2 \cdot [ES]$ kan derfor omskrives til $V_{max} = k_2 \cdot [ES]$, som indsættes i ovenstående ligning:

$$V = V_{max} - \frac{K_M \cdot V}{[S]}$$

$\frac{K_M \cdot V}{[S]}$ lægges til på begge sider:

$$V + \frac{K_M \cdot V}{[S]} = V_{max}$$

Reglen $x + ax = x(1 + a)$ bruges:

$$V \cdot (1 + \frac{K_M}{[S]}) = V_{max}$$

Der divideres med $1 + \frac{K_M}{[S]}$:

$$V = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_M}{[S]}}$$

Der ganges med [S] på højre side:

$$V = \frac{[S] \cdot V_{max}}{[S] \cdot (1 + \frac{K_M}{[S]})}$$

[S] ganges ind i parentes:

$$V = \frac{[S] \cdot V_{max}}{[S] + \frac{[S] \cdot K_M}{[S]}}$$

$\frac{[S]}{[S]} = 1$, så der fås:

$$V = \frac{[S] \cdot V_{max}}{[S] + K_M}$$

Dette er Michaelis-Menten-ligningen, så den er hermed bevist.⁴³ Da det er initialhastigheden, der undersøges, skrives ligningen undertiden som:

$$V_0 = \frac{[S] \cdot V_{max}}{[S] + K_M}$$

K_M og V_{max}

K_M og V_{max} er konstanter. Størrelsen på K_M for et enzym afhænger af substratet og af miljøforhold som pH, temperatur og ionbindinger. Michaelis-konstanten K_M udledes fra hastighedskonstanterne i Michaelis-Menten-modellen:

$$K_M = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1}$$

Hvis det antages $k_{-1} \gg k_2$, dissocieres ES til E og S meget hurtigere, end E og P dannes, så vil:

$$K_M = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

da k_2 er så lille i forhold til k_{-1} , at det ikke har nogen betydning, om den lægges til.

Den generelle dissociationskonstant K for reaktionen $E + S \rightarrow ES$:

$$K = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

hvilket er det samme som K_M , der dermed er dissociationskonstanten for ES-komplekset, når k_2 er meget mindre end k_{-1} . Under disse forhold vil K_M beskrive enzymets evne til at binde sig til substratet (kaldes affinitet). En høj K_M medfører, at [ES] er lille i forhold til [E], dvs. at substratbindingen er svag (lav affinitet). En lav K_M medfører omvendt, at [ES] er stor i forhold til [E], dvs. at substratbindingen er stærk (høj affinitet).

⁴³ Gasbjerg, Peder K., Gunnar Søgaard Jensen og Annette Balle Sørensen: *Bioteknologi – en basisbog*, 2011. S. 116-121

$V_{\max}$ er reaktionens maksimale hastighed (faktisk den teoretisk maksimale hastighed, idet $V_{\max}$ kun kan opnås, hvis ALLE enzymer er bundet med substrat i ES-kompleks), dvs. et udtryk for enzymernes aktivitet. $V_{\max}$ kaldes enzymets *turnover number* og er det antal substratmolekyler, som et enzyimmolekyle kan omdanne til produkt pr. tidsenhed, når enzymet er fuldstændig mættet med substrat (dvs. reaktionshastigheden er maksimal). $V_{\max}$ er dermed lig med hastighedskonstanten k_2 for dannelsen af E og P.⁴⁴ $V_{\max}$ afhænger af pH og temperatur.⁴⁵

Ved lav [S], når $[S] \ll K_M$ (så det ikke betyder noget om [S] lægges til i nævneren), er:

$$V = \frac{[S] \cdot V_{\max}}{K_M}$$

Det betyder, at V er ligefrem proportional med [S], og omdannelsen til produkt svarer til en førsteordensreaktion mht. [S], hvilket er det første næsten lineære stykke på Michaelis-Menten-grafen.

Ved høj [S], når $[S] \gg K_M$, er enzymerne mættet med substrat i et ES-kompleks, og:

$$V = V_{\max}$$

da noget meget stort i tælleren ([S]) delt med noget meget stort ([S]) + noget meget småt (K_M) i nævneren (som ift. [S] er ubetydeligt), bliver 1.

Det betyder, at V er maksimal og dermed uafhængig af [S], og omdannelsen til produkt svarer til en nulteordensreaktion mht. [S], hvilket er kurvens udfladning på Michaelis-Menten-grafen.

Når $K_M = [S]$, er:

$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]} = \frac{V_{\max} \cdot K_M}{K_M + K_M} = V_{\max} \cdot \frac{1}{2}$$

K_M er altså den substratkonzentration, hvor hastigheden er det halve af den maksimale værdi.⁴⁶

Enzymers reaktionshastighed

Enzymers aktivitet handler om, hvor effektive enzymer er til at spalte substrater. Enzymaktiviteten kan bestemmes ved at måle hastigheden af den reaktion, som enzymet katalyserer, dvs. aktiviteten afhænger af reaktionshastigheden. Et enzyms reaktionshastighed angives ofte, som hvor mange enzyimmolekyler der skal til for at danne et μM produktmolekyler pr. minut. Reaktionshastigheden afhænger af flere faktorer:

- Enzymets koncentration
- Substratets koncentration

⁴⁴ Stryer, Lubert: *Biochemistry*, 1988. S. 190-191

⁴⁵ <http://www.biotechacademy.dk/Undervisningsprojekter/Gymnasiale-projekter/enzymer/teori/enzymer/enzymkinetik>

⁴⁶ Stryer, Lubert: *Biochemistry*, 1988. S. 189-191

- Temperatur
- pH
- Enzymhæmmere (inhibitorer)

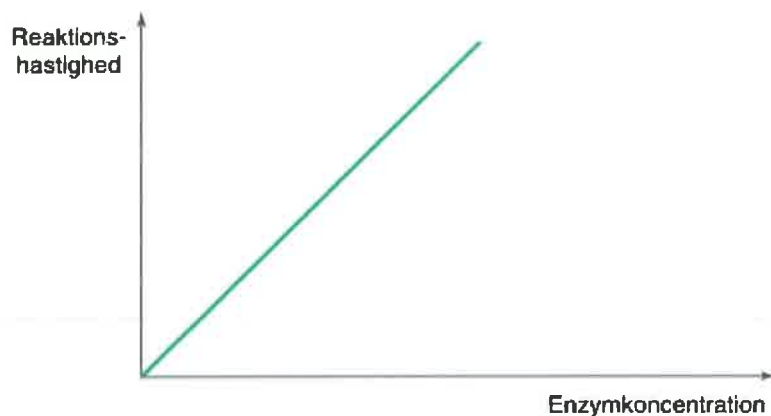
Enzymkoncentration

For at kunne undersøge hvilken effekt det har at øge enzymkoncentrationen, skal der være tilstrækkeligt med substrat. På den måde undgår man, at

reaktionshastigheden afhænger af substratet, men at det kun er enzymkoncentrationen, der undersøges.⁴⁷ Reaktionen er altså af 0. orden og har hastighedsudtrykket $v = k$, der beskriver en lineær sammenhæng.

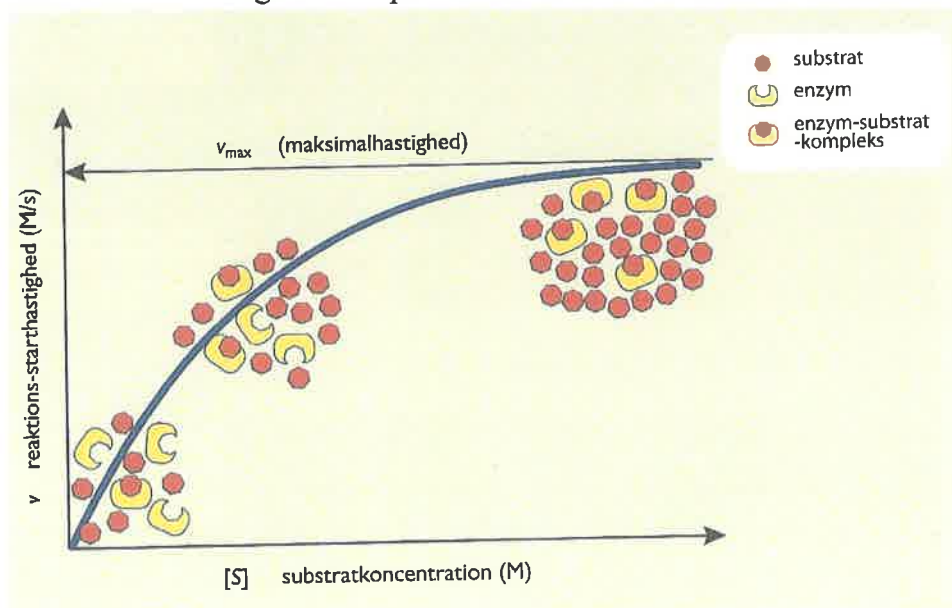
Dette kan ses på grafen til højre, hvor reaktionshastigheden er

plottet som funktion af enzymkoncentrationen. Konstanten k afhænger af hvilket enzym, man undersøger, samt af faktorer som pH og temperatur. Jo højere enzymkoncentrationen er, jo mere substrat vil dannes pr. tid – og jo højere vil reaktionshastigheden være.⁴⁸



Substratkoncentrationen

Ved undersøgelse af substratkoncentrationens betydning opstilles et forsøg, hvor substratkoncentrationen øges, mens alt andet holdes konstant. Grafen beskriver sammenhængen, hvor reaktionshastigheden er plottet som funktion af substratkoncentrationen:



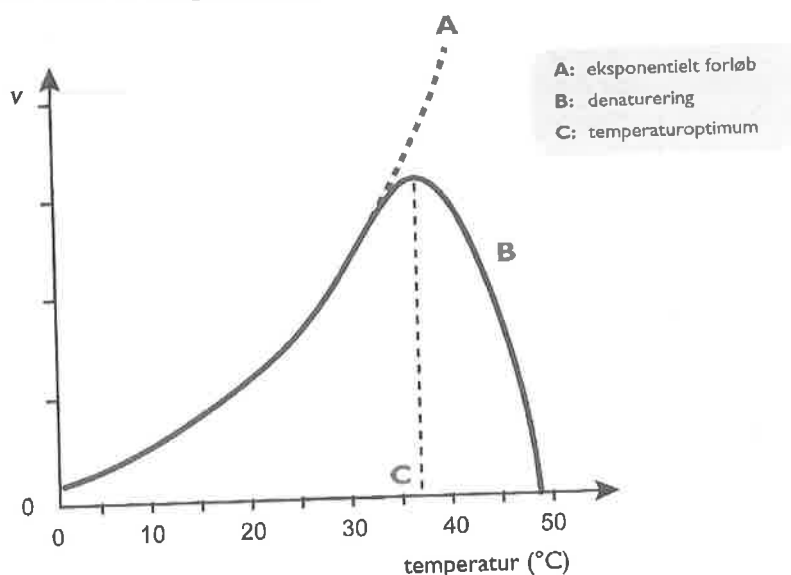
⁴⁷ Torp, Kresten Cæsar: *Biokemibogen*, 2007. S. 85

⁴⁸ <http://www.worthington-biochem.com/introbiochem/substrateConc.html>

Reaktionshastigheden øges i takt med tilsætningen af substrat, indtil man når en bestemt høj substratkoncentration, hvor der næsten ingen hastighedsforøgelse sker. Dette skyldes, at alle ledige enzymer er bundet til substrat, og at omdannelsen til produkt dermed ikke kan ske hurtigere. Man siger, at enzymet er mættet med substrat. Selvom man tilføjer mere substrat, vil reaktionshastigheden ikke øges, da der ikke er nogle ledige enzymer til at binde substrat. Kurven flader derfor ud og opnår en konstant hastighed, der ses som $V_{\max}$ på kurven. Ved lave substratkoncentrationer er der kun nok substrat til, at få af enzymerne kan bindes til substrat. En lille øgning af substratkoncentrationen medfører en tilsvarende øgning af reaktionshastigheden, da der er mange ledige enzymer, som det senest tilførte substrat kan bindes til.⁴⁹

Temperatur

Hastigheden for en kemisk reaktion vokser i takt med, at temperaturen øges. Hastigheden for reaktioner katalyseret med et enzym øges også i takt med stigende temperatur, men kun så længe temperaturen ikke er for høj. Enzymer har et temperaturoptimum og efter dette punkt falder reaktionshastigheden, hvis temperaturen fortsat øges.⁵⁰ Dette hænger sammen med proteinernes egenskaber. Når proteinerne udsættes for høj temperatur over længere tid, vil deres rumlige (tertiære) struktur ødelægges, og enzymet mister deres evne til at binde substratet og fremme dets omdannelse. Man siger, at enzymet denaturerer. Hvis en denatureret enzym nedkøles, kan enzymet ikke få sin enzymvirkning tilbage, da strukturen er ødelagt for altid. Enzymer i levende organismer mister deres virkning ved lidt over 40 °C, hvilket er lige over legemstemperaturen på 37 °C, så cellerne skal hele tiden danne nye enzymer.⁵¹ Grafen viser reaktionshastigheden plottet som funktion af temperaturen:



Hastigheden stiger tæt på eksponentielt ved lavere temperaturer, men støder på en kemisk begrænsning ved enzymets temperaturoptimum, hvor hastigheden herefter falder markant.⁵² Et enzyms temperaturoptimum angiver det tidspunkt, hvor enzymets aktivitet er højest.⁵³

⁴⁹ Gasbjerg, Peder K., Gunnar Søgaard Jensen, og Annette Balle Sørensen: *Biotechnologi – en basisbog*, 2011. S. 92-93

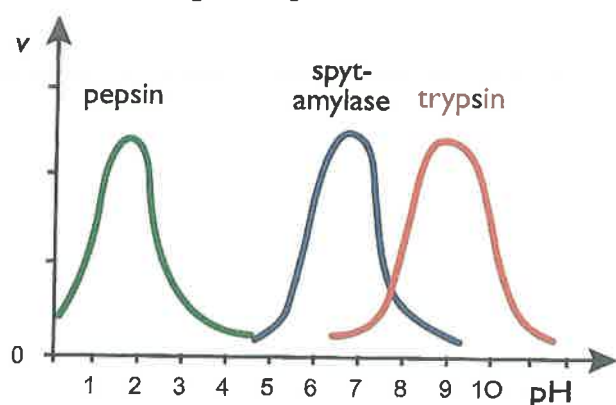
⁵⁰ Gasbjerg, Peder K., Gunnar Søgaard Jensen og Annette Balle Sørensen: *Biotechnologi – en basisbog*, 2011. S. 95-96

⁵¹ Bugge, Carsten Skovsø, Kresten Cæsar Torp og Stephan Vogelius Wiener: *Biotechnologi 2*, 2011. S. 70

⁵² Gasbjerg, Peder K., Gunnar Søgaard Jensen, og Annette Balle Sørensen: *Biotechnologi – en basisbog*, 2011. S. 95-96

pH

Enzymer har et pH-optimum, hvor reaktionshastigheden er højest, og et pH-interval hvor enzymerne kan katalysere reaktionen ved en lavere reaktionshastighed. pH-værdien påvirker enzymerne, da de sure og basiske aminosyrers ladning i enzymet ændres ved forskellige pH-værdier (ved hhv. at afgive og optage en hydron). En ændring af ladningerne medfører en ændring af styrken af de intermolekylære bindinger mellem aminosyrerne, og dette ødelægger enzymets rumlige (tertiære) struktur. Den rumlige struktur i det aktive site påvirkes også, hvilket kan svække bindingen af substratet til det aktive site. Hvis pH-værdien for et enzym altså ændres meget i forhold til dets pH-optimum, vil det, ligesom ved højere temperaturer, blive denatureret. I modsætning til ved opvarmning ændres enzymets struktur dog ikke permanent, og ved en genoprettelse af pH-optimum får enzymet sin struktur og aktivitet tilbage. Grafen viser, reaktionshastigheden plottet som funktion af pH-værdien:



De tre fordøjelsesenzymer pepsin, spytamylase og trypsin har forskellige pH-optimum. Pepsin virker bedst i surt miljø, spytamylase virker bedst i neutralt miljø, og trypsin virker bedst i basisk miljø.⁵⁴

Enzymhæmmere (inhibitorer)

En inhibitor er et hæmmende stof for et enzym. Enzymhæmning kan inddeles i to typer: reversibel og irreversibel. Reversible inhibitorer binder sig ikke-kovalent til enzymet, mens irreversible inhibitorer binder sig kovalent til enzymet. Den reversible hæmning kan derudover inddeles i kompetitiv og non-kompetitiv. Kompetitive inhibitorer bindes i enzymets aktive site og blokerer dermed for substratets binding. Non-kompetitive inhibitorer binder sig til enzymet et andet sted end det aktive site (kaldet regulatorisk center), så enzymet ændres. Dette nedsætter enzymets katalytiske evne.

Spektroskopi

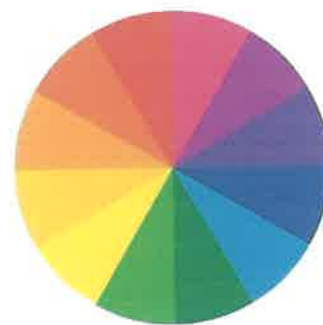
Hvordan stoffer absorberer eller udsender elektromagnetisk stråling i bestemte bølgelængder kan undersøges ved spektroskopi, der er en eksperimentel metode til måling af, hvor meget et stof absorberer lys ved en given bølgelængde. Til måling af dette anvendes et spektrum, der viser, hvor meget lys et stof absorberer eller udsender ved forskellige bølgelængder.

⁵³ Torp, Kresten Cæsar: *Biokemibogen*, 2007. S. 86

⁵⁴ Gasbjerg, Peder K., Gunnar Søgaard Jensen, og Annette Balle Sørensen: *Biotechnologi – en basisbog*, 2011. S. 94-95

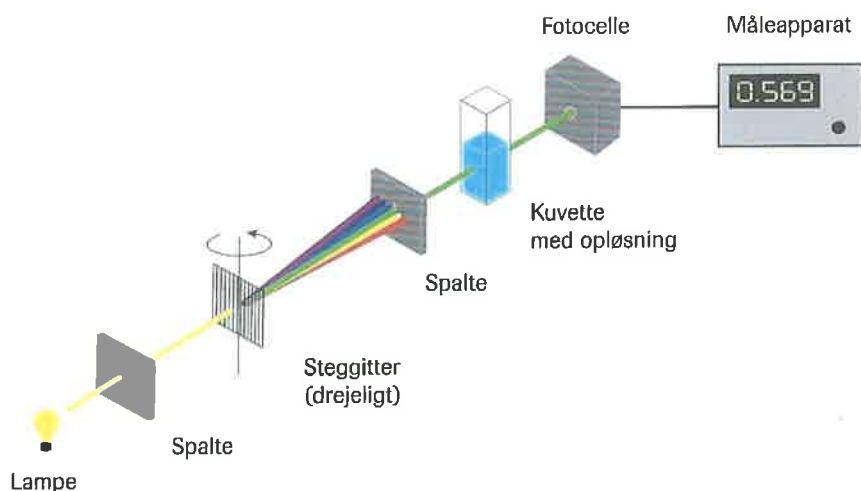
UV-vis-spektroskopi

Farvede stoffer indeholder kemiske forbindelser, der absorberer lys i det synlige område ved bestemte bølgelængder. Dette sker, når elektronerne kommer i en højere energitilstand. Mange elektroniske energispring ligger i det ultraviolette område. Dette kaldes UV-vis-spektroskopi. Bølgelængden af det lys, der absorberes, bestemmer stoffets farve. Vores øjne ser blandingsfarven af de farveområder, der ikke absorberes af stoffet. Blandingsfarverne, vi ser, er komplementærfarven til den farve, stoffet absorberer. De farver, der er over for hinanden, kaldes komplementærfarver (se farvecirkel).



Spektrofotometer

Til UV-vis-spektroskopi bruges et spektrofotometer. Et spektrofotometer måler, hvor meget lys, der ved en bestemt bølgelængde, kan passere igennem en opløsning. Nedenstående billede viser, hvordan et spektrofotometer virker:



En pære sender hvidt lys gennem et streggitter, der spalter lyset i et kontinuert spektrum. Det drejelige gitter kan udvælge en lille del af spektret (*monochromatisk* lys), der sendes gennem en spalte og derefter gennem en kuvette, der indeholder en opløsning af det stof, som ønskes undersøgt. Noget af det udvalgte lys vil (evt.) blive absorberet af stoffet,

hvilket svækker lysintensiteten. Dernæst rammer lyset en fotocelle, der forstærker signalet, så intensiteten kan aflæses på et måleinstrument.

Transmittans og absorptions

Først fyldes kuvetten med det rene opløsningsmiddel (referenceopløsningen), så lysintensiteten I_0 kan måles af det lys, der passerer igennem stoffet. Derefter måles lysintensiteten I af det lys, der passerer igennem det farvede stof (analysen). Forholdet mellem I og I_0 kaldes *transmittansen*:

$$T = \frac{I}{I_0}$$

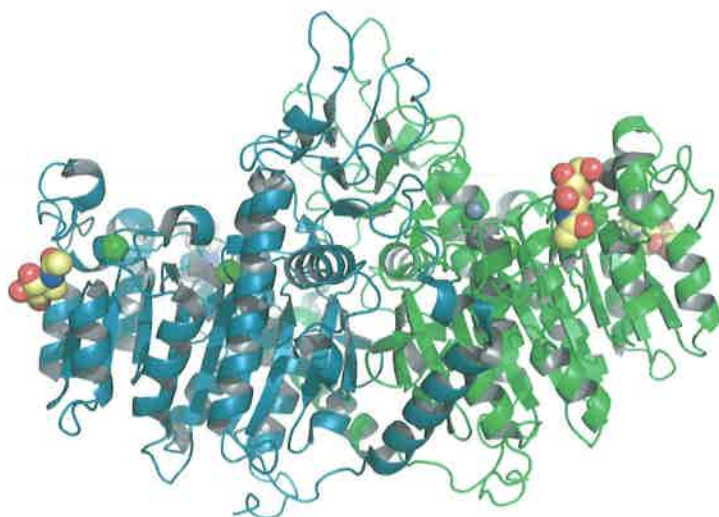
Ved UV-vis-spektroskopi anvendes *absorbansen* i stedet for transmittansen. Absorbansen forkortes med A og har ingen enhed. Den afhænger af bølgelængden af lyset, der sendes igennem stoffet, da den største absorption svarer til stoffets komplementærfarve.⁵⁵

⁵⁵ Kristiansen, Kim Rongsted: *Aurum – kemi for gymnasiet 3*, 2008. S. 78-82

AP kræver to cofaktorer, Zn^{2+} og Mg^{2+} , for at kunne fungere.

AP findes i alle væv, men hos pattedyr (mennesker) findes det især i galde, lever, nyre, knogler og placenta (moderkagen). AP har basisk pH-optimum. Bovint (kalve-) AP (isoenzym fra pattedyr) har pH-optimum ved 9,8. Det er opbygget som hos andre pattedyr med to ens peptidkæder, der indeholder to kulhydratenheder samt Zn^{2+} og Mg^{2+} .⁶⁰

AP fra humant tarmepitel:

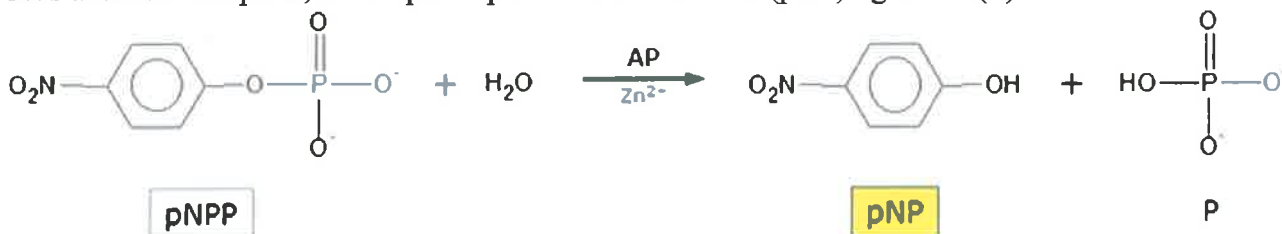


61

De forskellige farver viser de to peptidkæder. De store molekyler er kulhydrat, mens de enkelte molekyler er Zn^{2+} og Mg^{2+} samt markøren Sr^{2+} (til strukturoptklaring).

Forsøg til bestemmelse af K_M og V_{max}

AP er et stabilt enzym og derfor velegnet til laboratorieforsøg. I forsøget anvendes bovint (kalve-) AP med pH-optimum på 9,8. 4-nitrofenylfosfat (pNPP) egner sig godt som substrat til måling af APs aktivitet ved pH 9,8. AP spalter pNPP til 4-nitrofenol (pNP) og fosfat (P):



pNP er gult med absorptionsmaksimum ved 405 nm og derfor kan dannelsen af pNP måles

⁶⁰ Nielsen, Lasse Bjarne, Marianne Schou Nielsen og Marie Eiland: *Alkalisk fosfatase i undervisningen*, 2011. S. 63-64

⁶¹ http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/46/PLAP_1ZEF_dimer.png

spektrofotometrisk ved at følge absorbansændringen ΔA som funktion af tiden ved 405 nm. Det forventes, at APs reaktion med pNPP følger Michaelis-Menten-ligningen.⁶²

Fremgangsmåde for AP forsøg

I kuvetten blandes:

- DEA-buffer: 1 M diethanolamin (DEA), 1 mM MgCl_2 samt HCl, så pH er 9,8
- Demineraliseret vand
- Forskellige koncentrationer af substrat

Følgende skema angiver mængderne:

Prøve nr.	DEA-buffer μL	Vand μL	Substrat, 15 mM μL	Enzym, 5 U/mL μL	[S] μM
1	500	487,5	2,5	10	37,5
2	500	485	5	10	75
3	500	480	10	10	150
4	500	475	15	10	225
5	500	470	20	10	300
6	500	450	40	10	600
7	500	410	80	10	1200
8	500	170	320	10	4800

Vand tilføjes, så det totale volumen er det samme i alle forsøg, og resultaterne derved kan sammenlignes. [S] er beregnet efter formlen:

$$c(S) = \frac{n}{V}$$

hvor n findes ved at gange substratkoncentrationen på 15 mM med voluminet i μL , der tilsættes i hvert forsøg:

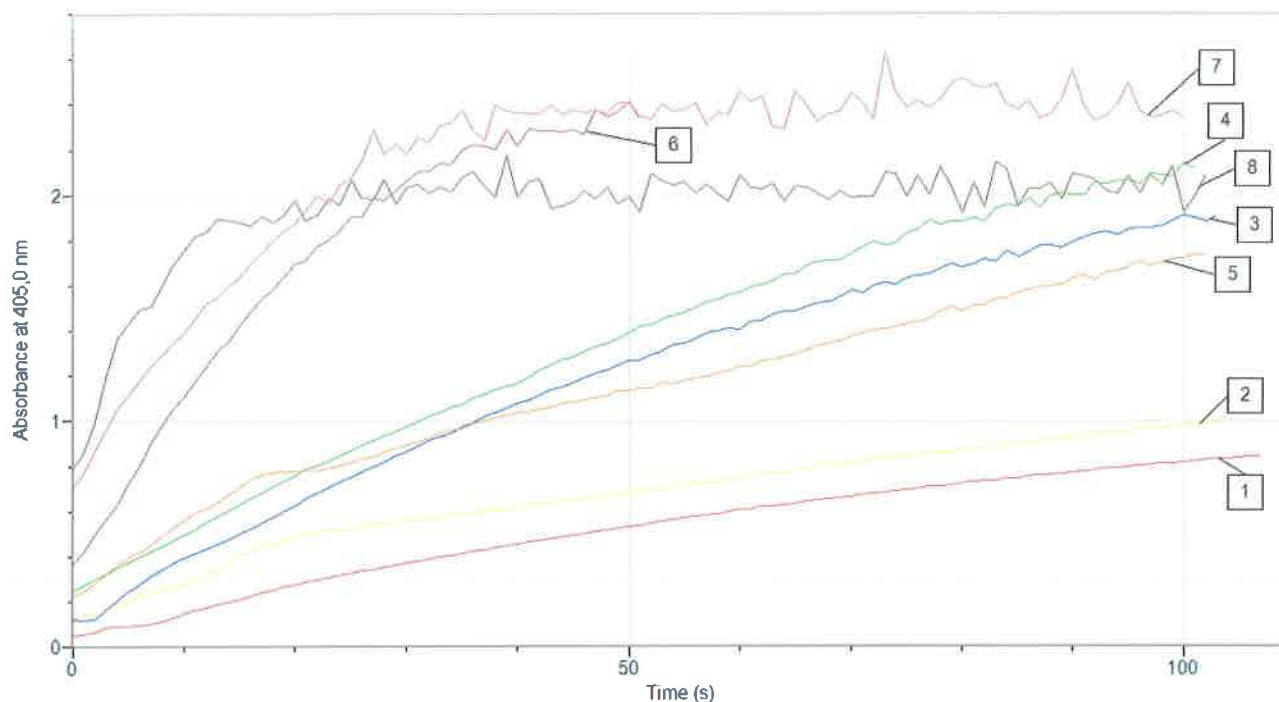
$$c(S) = \frac{c_{15\text{mM}} \cdot V_S}{V_{\text{total}}} = \frac{15 \cdot 10^3 \mu\text{M} \cdot V_S}{1000 \mu\text{L}} = 15 \frac{\mu\text{M}}{\mu\text{L}} \cdot V_S$$

Forsøget udføres ved stuetemperatur på 20 °C. Det er vigtigt, at målingen startes umiddelbart efter, at enzymet er kommet i, da reaktionen jo går i gang. Når enzymet er tilføjet kuvetten, startes spektrofotometrets måling i LoggerPro ved bølgelængden 405 nm, pNPs absorptionsmaksimum.

Resultater for AP forsøg

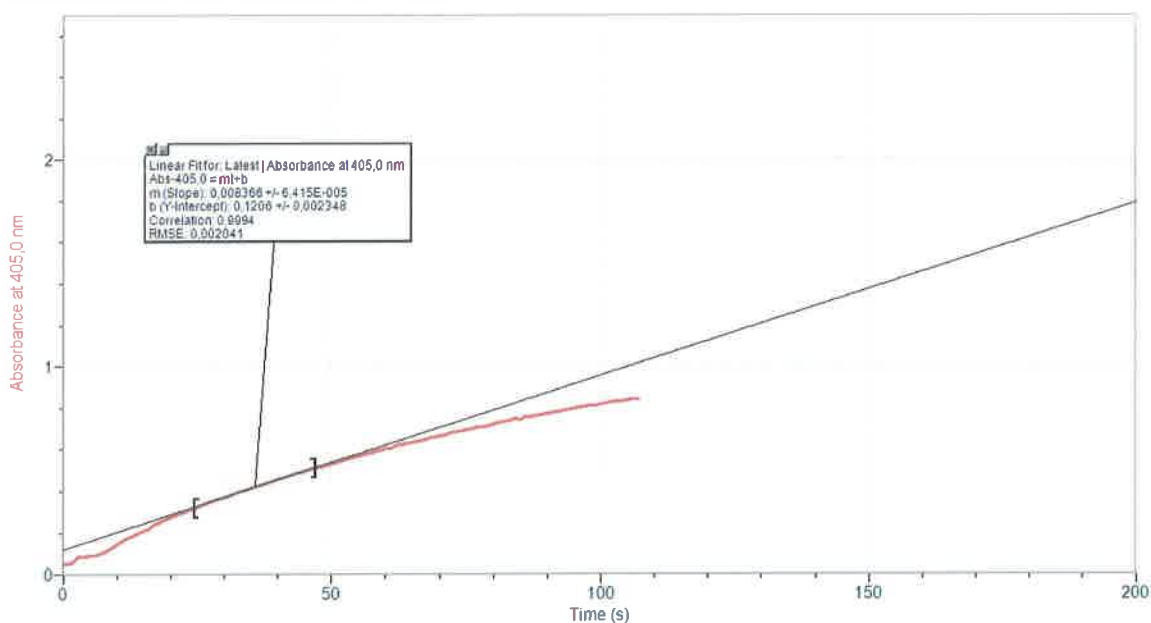
Målingerne samles i et koordinatsystem med absorptionen ved 405 nm som funktion af tiden:

⁶² Nielsen, Lasse Bjarne, Marianne Schou Nielsen og Marie Eiland: *Alkalisk fosfatase i undervisningen*, 2011. S. 63-64



At kurverne i måling 6,7 og 8 efter noget tid bliver ustabile og nærmer sig asymptotisk maksimum skyldes, at alle ledige enzymer er bundet til substrat, og at omdannelsen til produkt dermed ikke kan ske hurtigere.

Der tegnes en tangent til kurvens første lineære stykke, hvor så lidt produkt som muligt er dannet (dvs. $[S]$ er maksimal). Der ses altså på initialhastigheden v_0 (altså starthældningen som er $\frac{\Delta A}{\Delta t}$), hvilket er en af forudsætningerne i Michaelis-Menten-ligningen, der senere skal bruges til beregning af K_M og V_{max} . Nedenstående graf viser kurven fra måling 1 ($[S] = 37,5 \mu M$) med absorbansen som funktion af tiden:



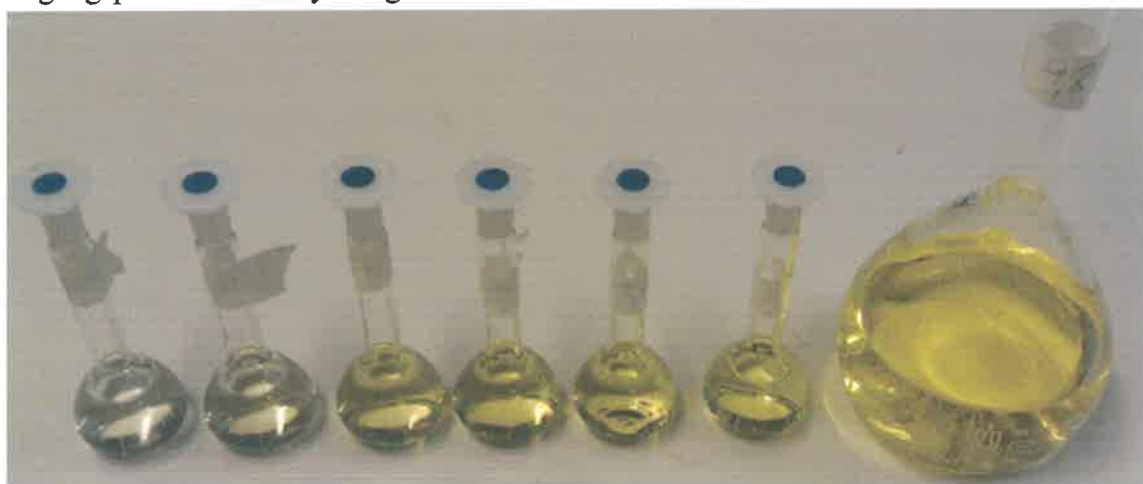
Starthældningen for alle otte målinger tegnes som på ovenstående graf (med en forklaringsgrad r^2 så tæt på 1 som muligt) og noteres i et skema:

Prøve nr.	[S] μM	Initialhastighed v_0 ($\frac{\Delta A}{\Delta t}$) s^{-1}
1	37,5	0,002348
2	75	0,006333
3	150	0,02338
4	225	0,02516
5	300	0,03453
6	600	0,08478
7	1200	0,09379
8	4800	0,193

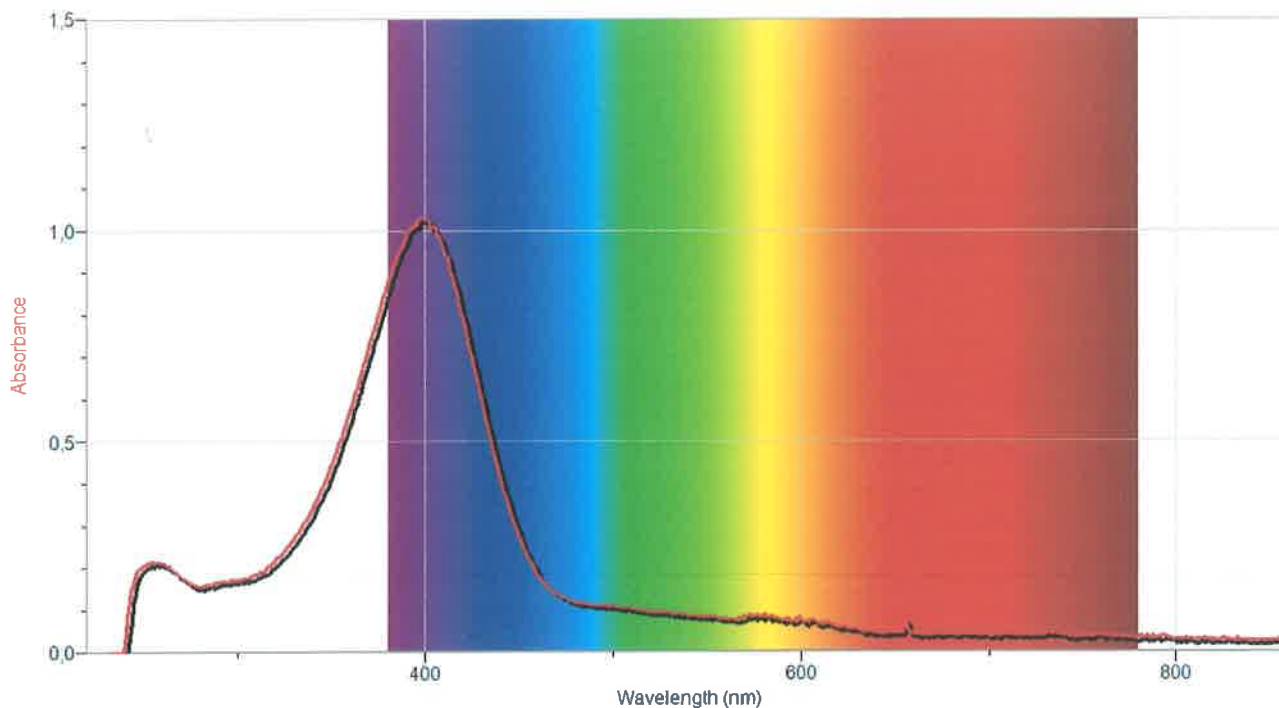
Fremgangsmåde for standardkurve

Der opstilles en standardkurve for pNP, så ekstinktionskoefficienten kan findes og derefter bruges i Lambert-Beers lov til at omregne absorbansændringen pr. tid $\frac{\Delta A}{\Delta t}$ til initialhastigheden v_0 .

Produktet pNP opløses i DEA-bufferen med pH 9,8, og der laves en forsøgsrække med forskellige, kendte koncentrationer. Opløsningen med den højeste koncentration, som ses på billedet til højre, er udgangspunktet for fortyndingerne:



Kuvetten fyldes med de forskellige opløsninger af kendte koncentrationer og placeres i et spektrofotometer, der er forbundet til Logger Pro på computeren. Absorbansen måles som funktion af bølgelængden (nm) for alle opløsningerne:



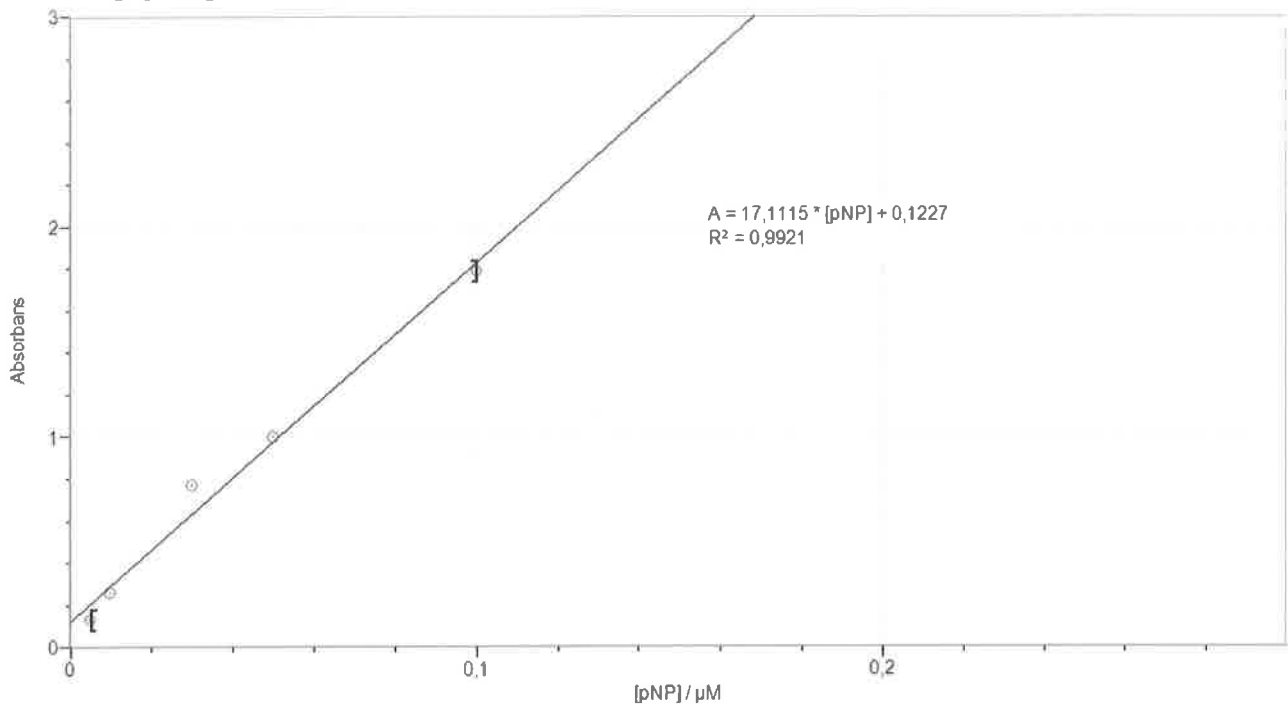
Dette er absorptionsspektret for pNP. Den farve, der absorberes af opløsningen, er lilla, og det er komplementærfarven gul, som ses i opløsningen. På kurven ses, at pNP har absorptionsmaksimum omkring 405 nm, og derfor måles absorbansen ved denne bølgelængde.

Resultater for standardkurve

Skemaet viser forsøgsrækkens koncentrationer og de målte absorbanser:

Koncentration μM	Absorbansen
4,8	2,66
3,6	2,62
1,2	2,48
0,8	2,42
0,4	2,57
0,2	2,38
0,1	1,79
0,05	1,00
0,03	0,77
0,01	0,26
0,005	0,13

Standardkurven for pNP med absorbansen plottet som funktion af [pNP] laves ud fra de fem opløsninger med den laveste koncentration, da dette giver den bedste rette linje med en forklaringsgrad på 0,99, og Lambert-Beers lov er derfor opfyldt:



Ekstinktionskoefficienten ϵ for pNP ved 405 nm bestemmes ud fra standardkurvens hældning, der er $\epsilon \cdot l$. Hældningen er:

$$17111,5 \text{ (M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) \cdot 1 \text{ cm}$$

Lambert-Beers lov kan bruges til at beregne koncentrationen af produktet (pNP) ud fra målinger af absorbansen:

$$A = \epsilon \cdot l \cdot [\text{pNP}] \Leftrightarrow [\text{pNP}] = \frac{A}{\epsilon \cdot l}$$

I dette forsøg er koncentrationsændringen pr. tid interessant, da det er et udtryk for enzymaktiviteten. Koncentrationsændringen pr. tid bestemmes ud fra absorptionsændringen pr. tid, som er det lineære stykke i starten af reaktionsforløbet (starthældningen), dvs. reaktionshastigheden kan beskrives ved differentialligningen:

$$v = \frac{d[\text{pNP}]}{dt} = \frac{\frac{dA}{dt}}{\epsilon \cdot l}$$

Absorptionsændringen pr. tid $\frac{dA}{dt}$ kan ved brug af ekstinktionskoefficienten omregnes til initialhastigheden i $\mu\text{M}/\text{min}$:

$$v = \frac{\frac{dA}{dt}}{\epsilon \cdot l}$$

Der ganges med 60 for at få det i minutter og 10^6 for at få resultatet i μM^{63} :

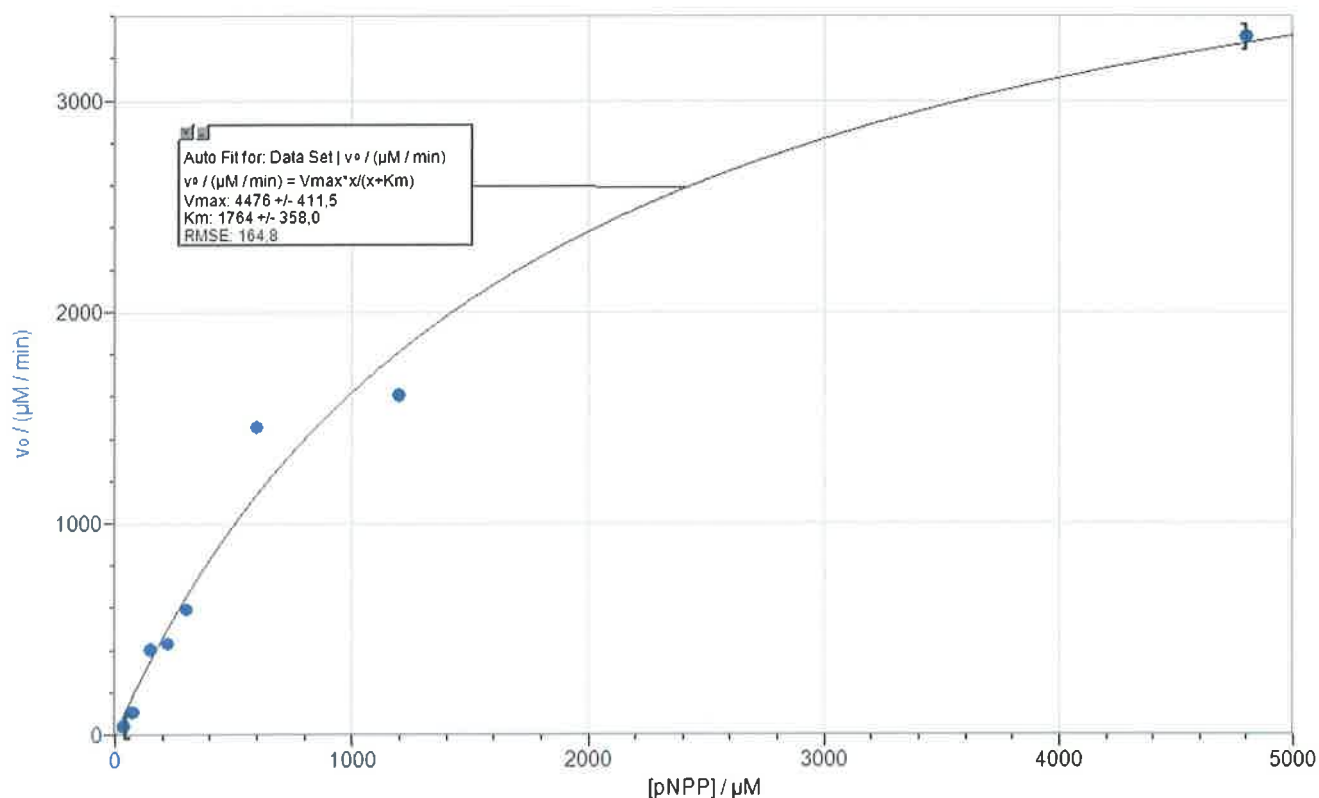
$$v = \frac{\text{starthældning}(\text{s}^{-1}) \cdot 60\left(\frac{\text{s}}{\text{min}}\right) \cdot 10^6\left(\frac{\mu\text{M}}{\text{M}}\right)}{17111,5 (\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) \cdot 1 \text{ cm}} = \text{starthældning} \cdot 3506,41 \frac{\mu\text{M}}{\text{min}}$$

Regression til Michaelis-Menten

Starthældningerne for alle otte målinger med absorptionsændringen pr. tid ganges med omregningsfaktoren $3506,41 \frac{\mu\text{M}}{\text{min}}$ for at få udregnet initialhastigheden v_0 , der ses i kolonnen med blå skrift:

[pNPP] / μM	$\Delta A / \Delta t (\text{s}^{-1})$	$v_0 / (\mu\text{M} / \text{min})$
37,5	0,002348	40,17
75	0,006333	108,36
150	0,02338	400,06
225	0,02516	430,52
300	0,03453	590,86
600	0,08478	1450,71
1200	0,09379	1604,88
4800	0,193	3302,51

Initialhastigheden v_0 plottes som funktion af [pNPP] med regression til Michaelis-Menten-ligningen:



⁶³ Nielsen, Lasse Bjarne, Marianne Schou Nielsen og Marie Eiland: *Alkalisk fosfatase i undervisningen*, 2011. S. 65

Ovenstående graf har samme form som Michaelis-Menten-grafen, hvilket betyder, at AP's reaktion med pNPP følger Michaelis-Menten kinetik. Kurven bruges til at bestemme konstanterne $V_{\max}$ og K_M . $V_{\max}$ aflæses, hvor enzymerne er mættet med substrat, og hastigheden er konstant, dvs. der hvor kurven flader ud. K_M kan aflæses på x-aksen som halvdelen af $V_{\max}$. Ud fra regression til Michaelis-Menten-ligningen i LoggerPro er konstanterne beregnet til:

$$V_{\max} = 4476 \mu\text{M}/\text{min}$$

$$K_M = 1764 \mu\text{M}$$

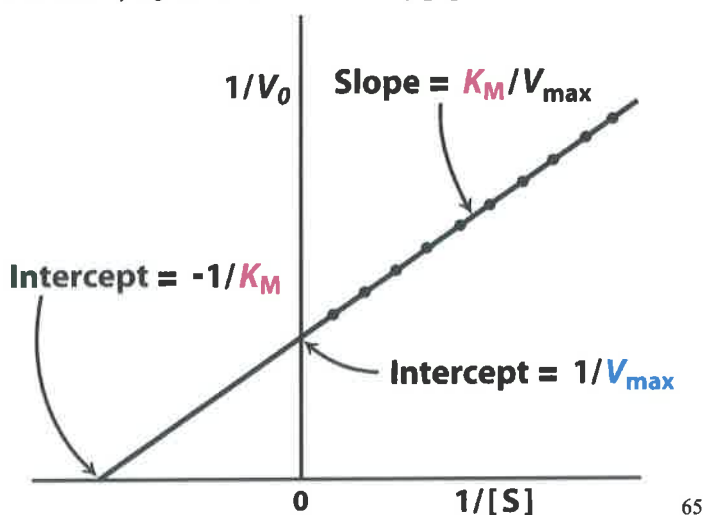
Lineweaver-Burk-plot

Ud fra et Michaelis-Menten-plot kan der ikke findes en endelig værdi for $V_{\max}$, da konstanten findes asymptotisk, dvs. nærmer sig en ret linje uden nogensinde at nå den. Hvis ikke regression kunne bruges til bestemmelse af K_M , skulle værdien findes ud fra den substratkoncentration, der giver $\frac{V_{\max}}{2}$, og ville dermed heller ikke blive nøjagtig. Konstanterne K_M og $V_{\max}$ kan bestemmes præcist ved at transformere Michaelis-Menten-ligningen til en lineær funktion. Ved at tage den reciproke værdi til Michaelis-Menten-ligningen fås (udledning: se appendiks 1):

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Denne ligning kaldes Lineweaver-Burk.⁶⁴

Plottes $1/V_0$ som funktion af $1/[S]$ fås:



Grafens hældning er $K_M/V_{\max}$. Skæringen med 1.-aksen er $-1/K_M$, og skæringen med 2.-aksen er $1/V_{\max}$. K_M kan enten findes ud fra hældningen $K_M/V_{\max}$ (hvis $V_{\max}$ kendes) eller ved at ekstrapolere grafen, så dens skæring med 1.-aksen kan aflæses som $-1/K_M$.

⁶⁴ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22557/>

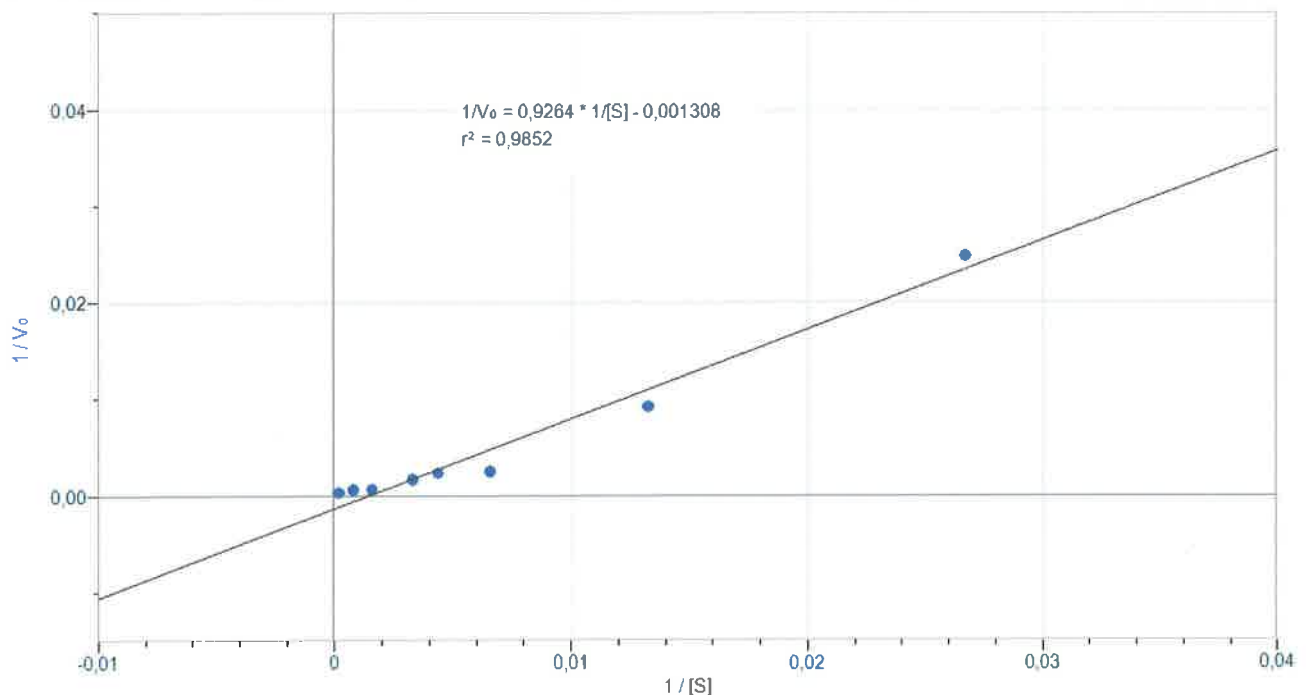
⁶⁵ http://oregonstate.edu/instruct/bb450/spring13/stryer7/8/figure_08_12.jpg

Resultater ud fra Lineweaver-Burk

I skemaet ses x-værdierne $1/[S]$ og y-værdierne $1/V_0$, der er udregnet fra forsøgets data, hhv. $[S]$ og initialhastigheden V_0 :

$1/[S]$	Initialhastighed V_0	$1/V_0$
0,0267	40,177802	0,024889
0,0133	108,3671295	0,009228
0,0066	400,06687	0,002500
0,0044	430,52534	0,002323
0,0033	590,860095	0,001692
0,0016	1450,71297	0,000689
0,0008	1604,887585	0,000623
0,0002	3302,5195	0,000303

De udregnede x- og y-værdier plottes med $1/V_0$ som funktion af $1/[S]$:



Enheden på 1.-aksen er $1/\mu\text{M}$ og $1/(\mu\text{M}/\text{min})$ på 2.-aksen. Lineær regression til Lineweaver-Burk-plottet giver en forklaringsgrad r^2 på 0,99. Forskriften for funktionen er:

$$\frac{1}{V_0} = 0,9264 \cdot \frac{1}{[S]} - 0,001308$$

$V_{\max}$ udregnes som $1/\text{skæringen med 2.-aksen}$, og den numeriske værdi tages, da hastigheden ikke kan være negativ:

$$\frac{1}{|-0,001308|} = 764,5 \mu\text{M}/\text{min}$$

K_M kan findes ved at beregne skæringen med 1.-aksen, hvor y-værdien er 0:

$$0 = 0,9264 \cdot \frac{1}{[S]} - 0,001308 \Leftrightarrow \frac{0,001308}{0,9264} = \frac{1}{[S]} \Leftrightarrow \frac{1}{[S]} = 0,001412$$

På grafen skærer linjen 1.-aksen i $1/K_M$ i stedet for i $-1/K_M$, og K_M er derfor:

$$\frac{1}{0,001412} = 708,2 \mu\text{M}$$

Ud fra hældningen er K_M :

$$\frac{764,5}{K_M} = 0,9264 \Leftrightarrow \frac{764,5}{0,9264} = K_M \Leftrightarrow K_M = 825,2 \mu\text{M}$$

Konstanternes værdi ud fra Lineweaver-Burk:

$$\begin{aligned} V_{\max} &= 764,5 \mu\text{M}/\text{min} \\ K_M &= 708,2 \mu\text{M} \text{ eller } 825,2 \mu\text{M} \end{aligned}$$

Konstanternes værdi ud fra Michaelis-Menten:

$$\begin{aligned} V_{\max} &= 4476 \mu\text{M}/\text{min} \\ K_M &= 1764 \mu\text{M} \end{aligned}$$

Diskussion

Lineweaver-Burk-plottets værdier er mere præcise end i Michaelis-Menten, da $V_{\max}$ ikke aflæses asymptotisk. Der findes dog en ulempe ved plottet, idet punkterne med lave substratkonzentrationer (hvor værdierne for $1/[S]$ og $1/V_0$ er højest) ikke vægtes ligeligt i den lineære regression. Ved disse punkter er præcisionen for bestemmelse af reaktionshastigheden lavest, da den mindste mængde produkt er dannet.

Lineweaver-Burk er den mest anvendte metode til linearisering af data. Andre metoder til linearisering er Hanes-plottet og Eadie-Hofstee-plottet, som begge undgår problemet om uligevægt i den lineære regression. Til gengæld findes der andre ulemper. Hanes plottes som $([S], [S]/V)$. Da $[S]$ findes på begge akser, medfører plottet en usikkerhed i pipettemåling (og dermed $[S]$), hvilket betyder lavere præcision i bestemmelse af K_M og $V_{\max}$. Eadie-Hofstee plottes som $(V/[S], V)$. Her findes V på begge akser, og usikkerheder i målingen af reaktionshastigheden er dermed større, som også medfører lavere præcision til bestemmelse af K_M og $V_{\max}$.⁶⁶

Konklusion

Enzymkinetik er baseret på generel reaktionskinetik, hvor differentiaalligninger opstilles for 0., 1. og 2. ordens reaktioner til beskrivelse/undersøgelse af reaktionshastigheden. Enzymers reaktionshastighed er et mål for enzymaktiviteten og påvirkes af enzym- og

⁶⁶ <http://www.ucl.ac.uk/~ucbcdab/enzass/substrate.htm>

substratkoncentrationen, temperaturen, pH og inhibitorer. Enzymer katalyserer reaktioner med en faktor på mere end en million og er opbygget af protein, der indeholder lange kæder af aminosyrer, og det aktive site, hvor substratet bindes, og reaktionen sker. Forsøget med alkalisk fosfatase viser, at reaktionen følger Michaelis-Menten kinetik. Ud fra regression til Michaelis-Menten-ligningen, der bygger på antagelsen om, at en enzymreaktion forløber i initial steady state, bestemmes konstanterne K_M og V_{max} , hvor $K_M = 1764 \mu\text{M}$ og $V_{max} = 4476 \mu\text{M}/\text{min}$.

Perspektivering

Enzymet alkalisk fosfatase har forskellige anvendelser. Den fysiologiske funktion af AP kendes ikke helt præcist, men i pattedyr har det bl.a. betydning for dannelsen af knoglestrukturer, idet det fjerner pyrofosfat, der ellers hæmmer denne dannelse. Inden for bioteknologien bruges det f.eks. til at fjerne fosfat fra proteiner og DNA, så der undgås ringslutning. I medicinsk sammenhæng er AP et markørenzym, hvor det bl.a. kobles til antistoffer i blodet ved brug af kovalente bindinger. AP er blodmarkør for bl.a. galdesten og kræftsygdomme som knogle- og prostatakraft.⁶⁷ I medicinsk anvendelse er det vigtigt at anvende den bedste modelleringsmodel, der tager højde for de forhold, der findes i kroppen, og som analysen udføres under. Dermed fås de mest præcise resultater, hvilket er af stor betydning i forbindelse med sygdomsbehandling. Vigtigheden af at vælge den rette model er anskueliggjort i denne opgave, hvor resultaterne i Lineweaver-Burk-plottet og Michaelis-Menten-ligningen er meget forskellige.

Appendiks 1 – Udledning af Lineweaver-Burk

Lineweaver-Burk udledes af Michaelis-Menten-ligningen:

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

Der står egentlig $\frac{V}{1}$ på venstre side. Tages den reciprokke værdi på begge sider, fås:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M + [S]}{V_{max} \cdot [S]}$$

Udtrykket omskrives ved at gange $K_M + [S]$ uden for brøken:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max} \cdot [S]} \cdot (K_M + [S])$$

$\frac{1}{V_{max} \cdot [S]}$ ganges ind i parentesen:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{max} \cdot [S]} + \frac{[S]}{V_{max} \cdot [S]}$$

Da $\frac{[S]}{[S]} = 1$, fås:

⁶⁷ Nielsen, Lasse Bjarne, Marianne Schou Nielsen og Marie Eiland: *Alkalisk fosfatase i undervisningen*, 2011. S. 63-64

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{max} \cdot [S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Derefter deles første brøk på højre side i to led:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Dette er Lineweaver-Burk-plottet på formen $y = ax + b$, så ligningen er dermed udledt.⁶⁸

Litteraturliste

Bøger

- ✚ Borup, Vibeke Diness og Jakob Dal: *Basal Biokemi*. FADL's Forlag, 2012.
- ✚ Bruun, Kim og Per Godsk Petersen: *Gymnasie BIOS*. Gyldendal, 2008.
- ✚ Bugge, Carsten Skovsø: *Bioteknologi 2*, Nucleus, 2010.
- ✚ Bugge, Carsten Skovsø, Kresten Cæsar Torp og Stephan Vogelius Wiener: *Bioteknologi 2*. Nucleus, 2011.
- ✚ H.C. Ørsted Ungdomslaboratorium – Kemisk Institut: *Enzymkemi – alkalisk phosphatase*. Københavns Universitet, 2006.
- ✚ Kristiansen, Kim Rongsted: *Aurum – kemi for gymnasiet 3*. L&R Uddannelse, 2008.
- ✚ Kristiansen, Kim Rongsted og Gunnar Cederberg: *Aurum – kemi for gymnasiet 2*. Forlag Mallings Beck, 2007.
- ✚ Nielsen, Lasse Bjarne, Marianne Schou Nielsen og Marie Eiland: *Alkalisk fosfatase i undervisningen*. LMFK-bladet 4, 2011.
- ✚ Parbo, Henrik og Nyvad, Annette: *Kend Kemien 3*. Gyldendal, 2010.
- ✚ Petrucci, Ralph H.: *General Chemistry – Fifth Edition*. Macmillan Publishing Company, 5. udgave, 1989.
- ✚ Stryer, Lubert: *Biochemistry*. W. H. Freeman and Company, 3. udgave, 1988.
- ✚ Torp, Kresten Cæsar: *Biokemibogen*. Nucleus, 2007.

Hjemmesider

- ✚ Bender, A. David: *The effect of substrate concentration on enzyme activity*. 2010. Besøgt d. 17.12.2013: <http://www.ucl.ac.uk/~ucbcdab/enzass/substrate.htm>
- ✚ Berg, Jeremy M., John L. Tymoczko og Lubert Stryer: *Biochemistry*, 5. udgave. W. H. Freeman, 2002. Besøgt d. 17.12.2013: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22557/>
- ✚ Hansen, Kenneth: *Matematikkens mysterier – Differentialligninger*. 2005. Besøgt d. 16.12.2013: <http://www.kennethhansen.net/MatMyst/3-Differentialligninger.pdf>
- ✚ Kelley, Walter G. og Allan C. Peterson: *The Theory of Differential Equations*. Springer, 2010. Besøgt d. 10.12.2013: <http://www.springer.com/mathematics/dynamical+systems/book/978-1-4419-5782-5>

⁶⁸ <http://teaching.drnickmorris.com/2009/01/cmb10057-bgm1001-deriving-lineweaver.html>

- ✚ Kristiansen, Luise C.: *Michaelis-Menten modellen*. 2012. Besøgt d. 18.12.2013:
<http://www.biotechacademy.dk/Undervisningsprojekter/Gymnasiale-projekter/enzymer/teori/enzymer/enzymkinetik>
- ✚ Lua, Lannah, Ciara Murphy og Victoria Blanchard: *Second-order Reactions*. Chemwiki. Besøgt d. 16.12.2013:
http://chemwiki.ucdavis.edu/Physical_Chemistry/Kinetics/Reaction_Rates/Second-Order_Reactions
- ✚ Morris, Nick: *Deriving Lineweaver-Burk*. 2009. Besøgt d. 09.12.2013:
<http://teaching.drnickmorris.com/2009/01/cmb10057-bgm1001-deriving-lineweaver.html>
- ✚ Thomsen, H.C.: *Et matematikforløb om brøkgregning*. 2001. Besøgt d. 17.12.2013:
<http://www.matnatverdensklasse.dk/skoler/broek.htm>
- ✚ Worthington Biochemical Corporation: *Introduction to Enzymes*. 2013. Besøgt d. 13.12.2013: <http://www.worthington-biochem.com/introbiochem/substrateConc.html>

Billeder

- ✚ Deebounyavout: *AP Biology*. 2010. Besøgt d. 07.12.2013:
<http://deesapbio.blogspot.dk/2010/09/chapter-three.html>
- ✚ Kristiansen, Kim Rongsted: *Aurum – kemi for gymnasiet 3*. L&R Uddannelse, 2008.
- ✚ The McGraw-Hill Companies: *Online Learning Center*. 2000. Besøgt d. 07.12.2013:
http://www.mhhe.com/cgi-bin/netquiz_get.pl?qfooter=/usr/web/home/mhhe/biosci/genbio/maderinquiry9/student/olc/art_quizzes/0037fq.htm&afooter=/usr/web/home/mhhe/biosci/genbio/maderinquiry9/student/olc/art_quizzes/0037fa.htm&test=/usr/web/home/mhhe/biosci/genbio/maderinquiry9/student/olc/art_quizzes/0037q.txt&answers=/usr/web/home/mhhe/biosci/genbio/maderinquiry9/student/olc/art_quizzes/0037a.txt
- ✚ Thomas, Cecilia Engel: *Enzymer – naturens værktøj*. 2012. Besøgt d. 18.12.2013:
<http://www.biotechacademy.dk/Undervisningsprojekter/Grundskoleprojekter/Enzymerfolkeskolen/teori/enzymer>