

STUDIERETNINGSOPGAVE

2.g

2012

Navn: Amalie Avnborg

Klasse: 2.y

Studieretningsfag og -niveau: mat A, biotek A, fys B

Opgaven skrives i fagene: 1. Matematik 2. Bioteknologi

Vejledernes underskrift:

fag 1) [Signature] (fag 2) [Signature]

Opgaveformulering (fastlagt af vejlederne):

Enzymkinetik

Mindste kvadraters metode

Elevens underskrift Amalie Avnborg

SRO for 2. y 2012

Opgaveformulering:

Med udgangspunkt i enzymet catecholase, som du har lavet to forsøg med, skal du lave enzymkinetiske undersøgelser.

Du skal redegøre for centrale begreber i enzymkinetik, idet du, i den udstrækning det er muligt, både redegør for den biokemiske og den matematiske betydning af begreberne.

Du skal beskrive den teoretiske baggrund for den enzymatiske proces og herunder komme ind på enzyms opbygning og funktion, temperatur og pH afhængighed samt inhibitorer.

Efterfølgende skal du opstille en matematisk model der kan beskrive de fundne data.

Denne model skal efterprøves med brug af regression.

Modellens beregninger og de fundne data skal sammenlignes og du skal prøve at redegøre for evt. forskelle.

Du skal redegøre for de anvendte eksperimentelle metoder, herunder hvorfor de er valgt og for fejlkilder, og du skal vise de relevante beregninger.

Du skal forklare princippet i mindste kvadraters rette linje. Du skal herunder give en redegørelse/bevis for, hvorledes stigningstal og konstantled i en lineær regression beregnes. Illustrer med et lille selvvalgt datasæt bestående af tre talsæt metoden ved håndkraft og sammenlign med resultatet ved brug af IT-værktøj.

MJ/Be

Indhold

Opgaveformulering:	2
Abstract	4
Indledning	5
Enzymer og enzymkinetik	5
Forsøg med catecholase	8
Analyse af forsøgsdata	11
Lineær regression ved mindste kvadraters metode	11
Mindste kvadraters metode på forsøgsdata	12
Konklusion	14
Kildehenvisning	15
Bilag 1: Forsøgsdata	16
Bilag 2: Lineweaver-Burk plot over forsøgsdata	17
Bilag 3: Michaelis-Menten plot over forsøgsdata	18
Bilag 4: Graf over absorbans per tid med inhibitor	19
Bilag 5: Graf over absorbans per tid uden inhibitor	20
Bilag 6: Forsøgsvejledning	20

Abstract

This paper combines mathematics and biotechnology in the attempt to shed light on how mathematical methods can be useful in the analysis of information from a biotechnical experiment. The paper describes the function and structure of enzymes and how enzymes are influenced by temperature, acidity and inhibitors. The paper will furthermore account for enzyme kinetics and the important concepts $V_{\max}$ and K_M , and how these are connected in Michealis-Menten's equation and Lineweaver-Burk's equation. The paper will include an example of how these two equations are being used to find $V_{\max}$ og K_M . Additionally the paper illustrates how to do linear regression and determine the best straight line by using the least squares method. The least squares method will be used to find the best linear expression for the graph made by the Lineweaver-Burke equation. At last the paper sums up what have been examined and concludes that IT-tools are probably using the least squares method and that the inhibitor used in the experiment is an uncompetitive inhibitor.

Indledning

Denne opgave vil beskæftige sig med emnerne enzymkinetik, og hvorledes mindste kvadraters metode benyttes i arbejdet med lineær regression.

Der vil være et redegørende afsnit, hvor der især lægges vægt på enzyms opbygning og funktion, samt hvilke faktorer der påvirker enzymer.

Dernæst vil det vises, hvorledes lineær regression kan benyttes til at analysere biokemiske forsøgsdata. Da mindste kvadraters metode kan bruges forskelligt, vil her blive fokuseret på sumformler. Herunder vil også være en forklaring af mindste kvadraters metode samt en kort gennemgang af et forsøg med enzymet catecholase.

Til arbejdet med forsøgsdataene vil Michaelis-Mentens ligning og Lineweaver-Burks ligning blive brugt.

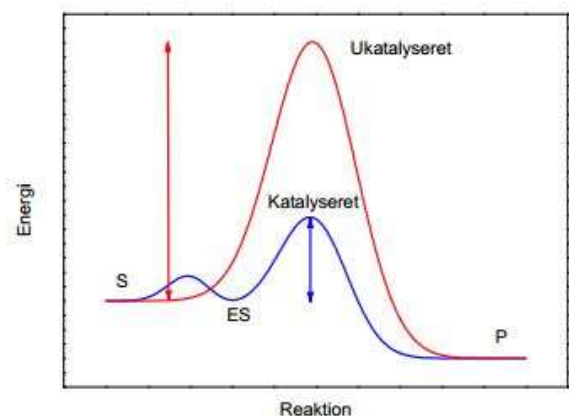
Enzymer og enzymkinetik

Overalt i og omkring os sker der biokemiske reaktioner.

Mange af disse biokemiske processer forløber meget langsomt eller slet ikke, hvis ikke de katalyseres af en katalysator, som oftest et enzym.

Når en proces katalyseres af et enzym nedsættes den mængde energi, der kræves for at processen forløber, kaldet aktiveringsenergien. På denne måde kan enzymer øge hastigheden af kemiske reaktioner med faktorer fra 50 til 10^{24} .

Hvad der er i stand til at øge hastigheden i så stor grad, vil det næste afsnit fortælle om.



Enzymer er proteiner der er sammensat af to dele. Det samlede enzym kaldes holoenzym og består af en cofaktor og et apoenzym.

Apoenzymet er selve proteindelen og har i sig selv ingen katalytisk evne.

En cofaktor er en ikke-protein forbindelse, der er nødvendig for at enzymet kan fungere. Cofaktorer kan være flere forskellige ting blandt andet metalioner eller vitaminer. Er cofaktoren en organisk forbindelse, kaldes det et coenzym. (Bruun & m.fl., 2010)

Når man beskriver enzyms struktur, gøres det på fire niveauer: primær, sekundær, tertiær og kvartær struktur.

Enzymer er som alle andre proteiner opbygget af aminosyrer, der danner polypeptidkæder, og aminosyresekvensen er det, der kaldes den primære struktur. Aminosyresekvensen er unik for hvert enzym og bestemmes af generne.

Polypeptidkædernes form, som α -helixer eller β -foldebladsstruktur, er den sekundære struktur. Den sekundære struktur bestemmes af hvilke aminosyrer, der indgår i aminosyreskeven.

Den tertiære struktur er måden disse polypeptidkæder ligger placeret i forhold til hinanden.

Den kvartære struktur er ikke at finde hos alle enzymer, da det er hvorledes enzymets subunits er placeret i forhold til hinanden. Denne struktur afhænger af om enzymet indeholder flere undergrupper. (Bruun & m.fl., 2010)

Når et enzym skal katalysere en proces, foregår det i to trin.

Først skal enzymet (E) genkende substratet (S), binde sig hertil og danne et enzymsubstratkompleks (ES).

Substratet binder til enzymets aktive center, der i de fleste tilfælde vil ændre form, når det bindes til substratet. Dette gøres for at sikre, at komplekset er lukket tæt sammen, så der ikke kan komme vand ind. Modellen kaldes induced fit.

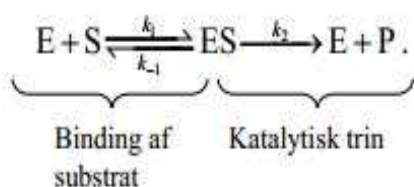
Alle enzymer er specifikke for en bestemt proces, da deres struktur passer til netop ét substrat.

Derefter går selve katalysen i gang, og substratet omdannes til et produkt (P).

Efterhånden som enzymet omdanner substratet til produkt, vil mængden af substrat blive mindre og mængden af produkt blive større, men enzymerne forbruges ikke.

Processen ses her som en reaktionsligning:

Kilde: Sigurdskjold side 1



Her er k_1 , k_{-1} og k_2 hastighedskonstanter der beskriver, hvor hurtigt enzym og substrat bindes (k_1) og spaltes igen (k_{-1}), og hvor hurtigt katalysen foregår (k_2).

Da k_1 og k_{-1} som regel er større end k_2 , vil det katalytiske trin være det hastighedsbegrænsende trin. Den maksimale hastighed afhænger altså af k_2 . (Sigurdskjold)

Da enzymer er biologiske molekyler, er der forskellige faktorer, der påvirker enzymeres arbejde, heriblandt temperatur og surhedsgrad.

Da enzymer er proteiner, vil de denaturere og udfoldes, hvis de befinder sig i det forkerte miljø. Dette resulterer i det, der kaldes temperatur- og pH-optimum.

De fleste enzymer har temperaturoptimum omkring kropstemperatur, altså ved 35-40°C, men der findes også termofile og psykrofile enzymer, der kan arbejde ved henholdsvis langt højere temperaturer og lavere.

Er temperaturen lavere end det optimale, sænkes reaktionshastigheden uden at ødelægge enzymet, mens enzymet vil miste sin tredimensionale struktur ved for høje temperaturer.

Hvis enzymet befinder sig i et miljø, der er for surt eller basisk, vil nogle af aminosyrerne skifte ladning, og det vil påvirke enzymets rumlige struktur. (Blicher, Proteinstruktur, 2011)

En anden faktor, der kan påvirke enzymeres arbejde, er inhibitorer. Der findes tre forskellige slags inhibitorer, der virker på hver sin måde, men fælles for dem er, at de hæmmer enzymaktiviteten ved at binde sig til enzymet uden at blive omsat.

Den mest udbredte form for inhibering er kompetitive inhibitorer. De konkurrerer så at sige med substratet om pladsen i enzymet, ved at binde sig til samme aktive center som substratet, og hermed forhindre binding af substrat.

Ved kompetitiv inhibering forøges K_M , mens $V_{\max}$ forbliver det samme. Hvad K_M og $V_{\max}$ er, vil jeg komme ind på senere i opgaven.

I modsætning til kompetitive inhibitorer, vil nonkompetitive inhibitorer ikke binde samme sted som substratet. En non-kompetitiv inhibitor vil altså ikke konkurrere med substratet, men i stedet hæmme ved at forplante sin virkning gennem proteinstrukturen, ofte med deformation til følge. Dette vil nedsætte den katalytiske hastighed. Nonkompetitive inhibitorer kan derfor genkendes på at $V_{\max}$ sænkes, mens K_M er uændret.

Den sidste form for hæmning er den ukompetitive inhibitor, der ligesom den nonkompetitive inhibitor binder sig til et andet sted end substratet, og sænker den katalytiske hastighed. Ukompetitive inhibitorer kan dog først binde sig til enzymet, efter at substratet er bundet og har åbnet for bindingen af inhibatoren.

Ved ukompetitiv inhibering sænkes K_M dog også, da der kræves mindre substrat at nå det halve af den maksimale hastighed. (Sigurskjold)

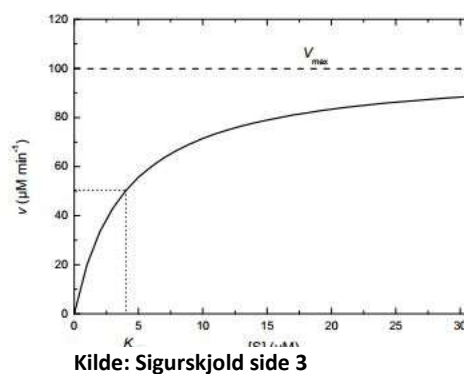
I arbejdet med enzymer er det også væsentlig at have kendskab til enzymkinetik, altså læren om enzymeres bevægelse og deres reaktionshastigheder.

Indenfor enzymkinetik beskæftiger man sig især med de to størrelser K_M og $V_{\max}$.

$V_{\max}$ er den maksimale hastighed hvormed enzymer kan omdanne substrat til produkt, og da k_2 er en konstant, og som sagt er det hastighedsbegrænsende trin, vil den maksimale hastighed være proportional med mængden af enzym $V_{\max} = k_2 \cdot [E]$.

Hastigheden hvormed enzym omdanner substrat til produkt vil stige, når substratkoncentrationen stiger, og nærme sig den maksimale hastighed. Den maksimale hastighed nås, når alle enzymer er "mættet" af substrat.

På billedet ses hastigheden afbilledet ved Michaelis-Mentens ligning, som jeg vil komme ind på senere, hvor $V_{\max}$ dog er en asymptote, så hastigheden vil kun nærme sig $V_{\max}$, men aldrig nå $V_{\max}$.



K_M er en konstant kaldet Michaelis-konstanten. Den er sammensat af hastighedskonstanterne k_1 , k_{-1} og k_2 i sammenhængen $K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$.

K_M er et udtryk for enzymets evne til at binde substrat. Jo mindre K_M er, jo bedre er enzymet til at genkende substratet. Dette ses ved, at K_M er den substratkonzentration, hvor enzymet arbejder med halvdelen af den maksimale hastighed. Det vil sige, at hvis $v = \frac{1}{2} V_{max}$ vil $[S] = K_M$. Enzymet vil altså hurtigere nå den maksimale hastighed, jo mindre K_M er, og grafen vil da være stejlere i begyndelsen.

Er enzymet påvirket af en inhibitor der sænker K_M og/eller V_{max} , skrives dette som K_M^{app} og V_{max}^{app} , da det er den tilsyneladende K_M og V_{max} .

Der er følgende sammenhæng mellem V_{max} og K_M at $v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$. Dette kaldes Michaelis-Menten

ligningen. Ved at benytte Michaelis-Menten ligningen fås en hastighedsgraf, der viser hastigheden som funktion af substratkonzentrationen.

Michaelis-Menten ligningen kan matematisk omskrives til en ret linje, ved at bruge de reciprokke værdier.

Dette kaldes et Lineweaver-Burke plot og fås ved ligningen $\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$.

Man kan da aflæse $\frac{K_M}{V_{max}}$ som grafens hældning og $\frac{1}{V_{max}}$ som konstantleddet, skæringspunktet med y-aksen.

Lineweaver-Burks plot anvendes ofte til at analysere eksperimentelle data, da det er nemt at aflæse data herfra. Michaelis-Mentens plot er dog mere præcist, da eventuelle små usikkerheder vil blive mere udtalte ved den reciprokke værdi. (Sigurskjold)

Forsøg med catecholase

Catecholase er et enzym, der findes naturligt i alle planter og indgår i plantens forsvarssystem. Catecholases substrat er catechol, der omdannes til det beskyttende og antibakterielle o-benzoequinon.

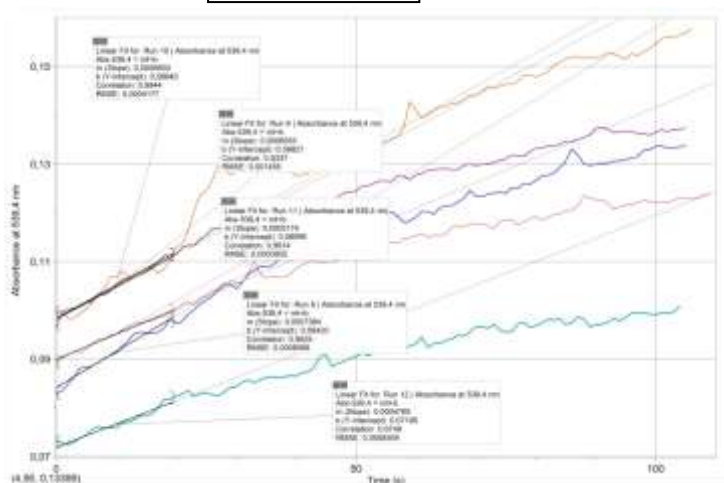
I forsøget med catecholase, blev enzymaktiviteten undersøgt både med og uden inhibitor. Dette er gjort ved at opstille to fortyndingsrækker, for at finde hastigheden ved forskellige substratkonzentrationer. Inhibitoren benyttet i dette forsøg er phenylthiocarbamid (PTC). Herefter er der målt på enzymaktiviteten ved hjælp af et spektrofotometer. Dette kan lade sig gøre, idet substratet catechol er farveløst, mens produktet o-benzoequinon har en gulbrun farve. Ved forsøg med forskellig bølgelængde, er det blevet bestemt, at lys med bølgelængden 540 nm absorberes bedst af o-benzoequinon.

Enzymaktiviteten kan altså nu måles som ændring i absorbans per tid, da en stigning i produkt vil resultere i en stigning i absorbans. Ved undersøgelse af enzymaktivitet benyttes ofte spektrofotometri, da det er en nem, billig og sikker metode at måle aktiviteten præcist.

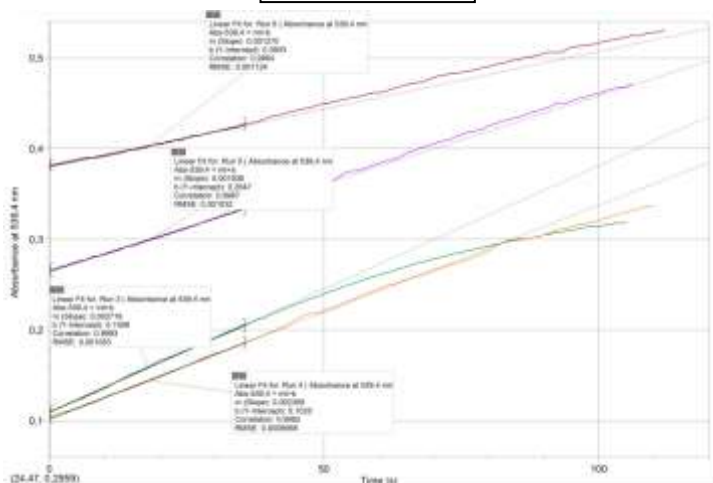
Der skal dog tages højde for, at da enzymopløsningen i dette forsøg er kartoffelekstrakt, kan opløsningen indeholde en smule catechol i sig selv, hvilket der ikke tages højde for i substratkonzentrationerne.

Endvidere kan der som i alle former for eksperimentelle øvelser ske fejl ved afvejning og afmåling.

Med inhibitor



Uden inhibitor



Ved at udføre lineær regression på disse grafer fås hastighed som ændring i absorbans per tid som hældning,

$v = \frac{\Delta A}{\Delta t}$. Disse værdier kan ved hjælp af Lambert-Beers lov omregnes til hastighed i ændring af

substratkoncentration per tid, der kan benyttes til at lave en hastighedsgraf med Michealis-Menten ligningen.

Lambert-Beers lov foreskriver, at absorbansen er proportional med stoffets absorptionskoefficient (ϵ) ved den givne bølgelængde, i dette forsøg 540 nm, stoffets molære koncentration (c) og lysvejens længde, tykkelsen af kuvetterne, (l), altså $A = \epsilon \cdot c \cdot l$

For at få udtrykt hastigheden som ændring i koncentration per tid omregnes således:

$$v = \frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{\Delta A}{\Delta t \cdot l} \cdot \frac{1}{\epsilon}$$

Da lysvejens længde er 1 cm, er det muligt at se bort fra at gange med l , og man kan da omregne ved at gange hældningerne fra graferne med $\frac{1}{\epsilon}$. De resterende enheder vil da være mM, mM⁻¹, cm, cm⁻¹ og sekunder, hastigheden vil derfor automatisk komme ud i sekunder, derfor regnes her uden enheder. (Forsøgsvejledning)

Absorptionskoefficienten findes ved:

$$\epsilon = \frac{A}{c \cdot l} = \frac{0,834}{7} = 0,1158333$$

Hastighederne i ændring i substratkoncentration per tid beregnes således:

$$\text{Run 3: } = \frac{\Delta A}{\Delta t \cdot l} \cdot \frac{1}{\epsilon} = 0,002719 \cdot \frac{1}{0,1158333} = 0,023$$

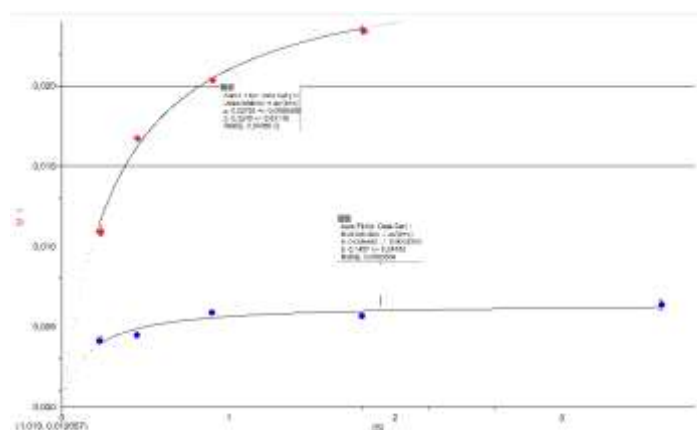
Fravær af inhibitor

Run	[S]	$\Delta A/\Delta t$	$\Delta c/\Delta t$
	mM	s ⁻¹	mM s ⁻¹
3	1,800	0,002719	0,02347338130
4	0,900	0,002358	0,02035683454
5	0,450	0,001936	0,01671366907
6	0,225	0,001270	0,01096402878

Tilstedeværelse af inhibitor

Run	[S]	$\Delta A/\Delta t$	$\Delta c/\Delta t$
	mM	s ⁻¹	mM s ⁻¹
8	3,600	0,0007384	0,006374676261
9	1,800	0,0006553	0,005657266189
10	0,900	0,0006803	0,005873093527
11	0,450	0,0005174	0,004466762591
12	0,225	0,0004765	0,004113669066

Ud fra disse oplysninger tegnes nu to hastighedsgrafer med hastigheden i ændring af koncentration per tid op af andenaksen, og substratkoncentrationen hen af førsteaksen.



Michealis-Menten plot der viser $v = \frac{\Delta c}{t}$
 Rød (øverst) uden inhibitor Blå (nederst) med inhibitor

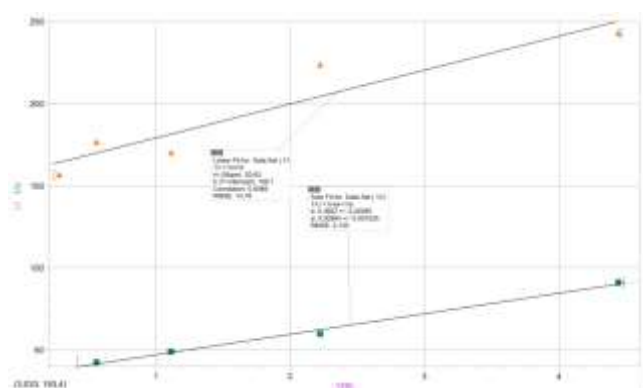
Ved at udføre non-lineær regression med Michaelis-Menten ligningen fås at

$$K_M = 0,3240 \text{ mM} \quad v_{\max} = 0,02781 \frac{\text{mM}}{\text{sek}}$$

$$K_M^{\text{app}} = 0,1457 \text{ mM} \quad v_{\max}^{\text{app}} = 0,0064 \frac{\text{mM}}{\text{sek}}$$

Både K_M og $V_{\max}$ sænkes altså af inhibitoren, der derfor må være en ukompetitiv inhibitor.

Denne hastighedsgraf kan som tidligere omtalt omskrives til en lineariseret form, Lineweaver-Burk plottet:



Lineweaver-Burk plot
 Orange (øverst) med inhibitor Grøn (nederst) uden inhibitor

Også her kan $V_{\max}$ og K_M aflæses, men der vil være en smule usikkerhed i disse værdier, da Lineweaver-Burk plot som tidligere omtalt ikke er ligeså præcist som Michaelis-Menten plot.

$$K_M = 0,3602 \text{ mM} \quad V_{\max} = 0,02884 \frac{\text{mM}}{\text{sek}}$$

$$K_M^{\text{app}} = 0,1300 \text{ mM} \quad V_{\max}^{\text{app}} = 0,006303 \frac{\text{mM}}{\text{sek}}$$

Analyse af forsøgsdata

Ved analyse af forsøgsdata, er det ofte en god idé at bruge regression. På den måde kan man få et udtryk, der kan forudsige udfald, samt en mulighed for at undersøge, om der er en sammenhæng mellem forsøgsdataene. Ved arbejde med enzymkinetik kan man som tidligere omtalt komme frem til et lineært Lineweaver-Burk plot, derfor vil kun lineær regression blive omtalt her.

Ud over lineær regression findes der forskellige former for nonlinear regression, blandt andet eksponentiel regression og potens regression.

Lineær regression ved mindste kvadraters metode

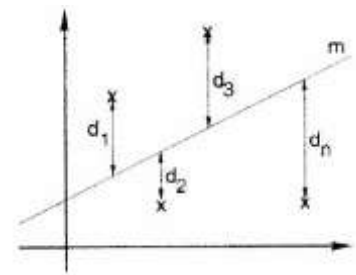
Ved lineær regression undersøger man om en række punkter ligger på en ret linje og dermed har sammenhængen $y = ax + b$.

En række punkter kan godt have en lineær sammenhæng uden at ligge præcis på en ret linje, men hvis dette er tilfældet, hvordan skal linjen så lægges?

Det kan man finde ud af ved hjælp af mindste kvadraters metode.

Ved mindste kvadraters metode laver man et kvadrat fra hvert punkt lodret op eller ned til den rette linje, og den bedste rette linje er da den, hvor summen af kvadraternes areal er mindst.

Grunden til, at man benytter arealet af kvadrater og ikke bare afstanden, er, at man da undgår problemer med negative værdier, der ellers vil fremkomme, eftersom punkterne ligger både over og under linjen. (Carstensen & Frandsen, MAT 1, 1997)



Afstandskvadratet findes da ved:

$$D = d_1^2 + d_2^2 + \dots + d_n^2.$$

Eller ved at benytte sumformler:

$$\sum_{i=1}^n (a \cdot x_i + b - y_i)^2$$

Hvor n er antallet af værdier, her punkter, i løber fra 1 til n , a er hældningskoefficienten og b er konstantleddet, skæringspunktet med y -aksen.

Ud fra denne definition på afstandskvadratet, kan a og b isoleres til følgende formler:

$$a = \frac{n \cdot \sum_{i=1}^n x_i \cdot y_i - \sum_{i=1}^n x_i \cdot \sum_{i=1}^n y_i}{n \cdot \sum_{i=1}^n x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n x_i \right)^2}$$

$$b = \frac{\sum_{i=1}^n y_i - a \cdot \sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Hvordan a og b beregnes ved hjælp af disse to formler vil her demonstreres med datasættene fra forsøget med catecholase.

Mindste kvadraters metode på forsøgsdata

Ved at kigge på Lineweaver-Burk plottet ses det tydeligt, at punkterne ikke ligger præcist på de to rette linjer, der er tegnet. Om den valgte linje så er den bedste rette linje, kan undersøges ved at bruge mindste kvadraters metode.

Jeg får brug for at kende summen af x-værdierne, summen af y-værdierne, summen af x- og y-værdiernes produkt og summen af x-værdierne kvadreret.

Uden inhibitor:

	x	y	x·y	x ²
	0,556	42,6014466	23,66747033	0,308642
	1,111	49,12355101	54,58172335	1,234568
	2,222	59,8312672	132,9583716	4,938272
	4,44444	91,20734906	405,3659958	19,753086
Sum	8,333	242,7636139	616,573561	26,234568

Her benyttes 4 punkter, altså er:

$$n = 4$$

Det ses i skemaet at:

$$\sum_{i=1}^4 x_i \cdot y_i := 616.573561$$

$$\sum_{i=1}^4 x_i = 8.333$$

$$\sum_{i=1}^4 y_i = 242.7636139$$

$$\sum_{i=1}^4 x_i^2 = 26.234568$$

Tallene kan nu indsættes i formlerne, og hældningskoefficienten og konstantleddet kan beregnes.

$$a = \frac{4 \cdot 616.573561 - 8.333 \cdot 242.7636139}{4 \cdot 26.234568 - 8.333^2} \quad a = 12.48880999$$

$$b = \frac{242.7636139 - 12.48880999 \cdot 8.333}{4} \quad b = 34.67359008$$

Den bedste rette linje for disse tal har altså følgende forskrift:

$$y = 12,49 \cdot x + 34,67$$

For at kunne sammenligne med hældningen og konstantleddet fra grafen, må disse værdier først omregnes, da LoggerPro viser K_M og $V_{\max}$ og ikke hældningen og konstantled.

Hældningen i Lineweaver-Burke plottet er som tidligere nævnt $\frac{K_M}{V_{\max}} = \frac{0,3602mM}{0,02884\frac{mM}{sek}} = 12,49$.

Konstantleddet i Lineweaver-Burk plotter findes som tidligere nævnt ved

$$\frac{1}{V_{\max}} = \frac{1}{0,02884\frac{mM}{sek}} = 34,67.$$

Forskriften fundet ved hjælp af mindste kvadraters metode er altså magen til forskriften fundet af LoggerPro, og herfra kan det konkluderes, at den af LoggerPro valgte linje er den bedste rette linje.

De samme beregninger kan gøres på Lineweaver-Burke plottet for enzymaktivitet med inhibitor.

Med inhibitor:

	x	y	x·y	x ²
	0,277778	156,8707	43,5752	0,07716
	0,555556	176,7638	98,20212	0,308642
	1,111111	170,268	189,1867	1,234568
	2,222222	223,8758	497,5018	4,938272
	4,444444	243,092	1080,409	19,75309
Sum	8,611111	970,8703	1908,875	26,31173

Da der her er et talsæt mere, er $n = 5$

Ellers udføres beregningerne på nøjagtig samme måde:

$$\sum_{i=1}^5 x_i = 8,611111 \quad \sum_{i=1}^5 y_i = 970,8703 \quad \sum_{i=1}^5 x_i \cdot y_i := 1908,875 \quad \sum_{i=1}^5 x_i^2 = 26,31173$$

$$a = \frac{5 \cdot 1908,875 - 8,611111 \cdot 970,8703}{5 \cdot 26,31173 - 8,611111^2} \quad a = 20,62630814$$

$$b = \frac{970,8703 - 20,62630814 \cdot 8,611111}{5} \quad b = 158,6509742$$

Forskriften for den bedste rette linje bliver da $y = 20,3 \cdot x + 158,65$.

For at sammenligne med den af LoggerPro fundne linje må værdierne K_M og $V_{\max}$ igen omregnes til hældning og konstantled:

$$\text{Hældning} = \frac{K_M^{app}}{V_{max}^{app}} = \frac{0,13 \text{ mM}}{0,006303 \frac{\text{mM}}{\text{sek}}} = 20,63$$

$$\text{Konstantled} = \frac{1}{V_{max}^{app}} = \frac{1}{0,006303 \frac{\text{mM}}{\text{sek}}} = 158,65$$

LoggerPro har altså igen fundet den bedste rette linje.

Konklusion

Efter besvarelse af den givne opgaveformulering kan en række konklusioner drages. Ved hjælp af matematiske værktøjer som Michaelis-Mentens ligning, Lineweaver-Burks ligning og lineær regression kan enzymkinetiske værdier bestemmes. Ved at bestemme K_M og $V_{\max}$ for enzymet catecholase, har det været muligt at bestemme, at PTC er en ukompetitiv inhibitor. Det må formodes, at IT-værktøjer benytter mindste kvadraters metode til bearbejdning af data ved lineær regression, da der opnås de samme resultater ved at bruge IT-værktøjer og beregne hældningskoefficient og konstantled ved mindste kvadraters metode.

Kildehenvisning

Blicher, T. (13. Juni 2011). *Proteinstruktur*. Hentede 16. Marts 2012 fra Biotech Academy: <http://www.biotechacademy.dk/undervisningsprojekter/amp/teori/proteinstruktur.aspx>

Blicher, T. (13. Juni 2011). *Enzymer*. Hentede 17. Maj 2012 fra Biotechacademy: <http://www.biotechacademy.dk/undervisningsprojekter/enzymer/teori/enzymer.aspx>

Bruun, K., & m.fl. (2010). Enzymer. I K. Bruun, & m.fl., *Bioteknologi 1* (s. 134-151). Gyldendal.

Carstensen, J., & Frandsen, J. (1997). *MAT 1*. Viborg: Systime.

Carstensen, J., Frandsen, J., & Sutdsgaard, J. (2006). *MAT A2*. Viborg: Systime.

Forsøgsvejledning. (u.d.). Enzymkinetik med catecholase.

Sigurskjold, B. W. (u.d.). Kompendie: Enzymkinetik.

Vaiana, M. (10. Oktober 2010). *4.2 Summation Formulas and Sigma Notation*. Hentede 15. Marts 2012 fra Youtube: <http://www.youtube.com/watch?v=oSgTjkr8o8A&feature=related>

Wolf, T., & m.fl. (2008). *Biologi C+B*. Århus: Systime.

Bilag 1: Forsøgsdata

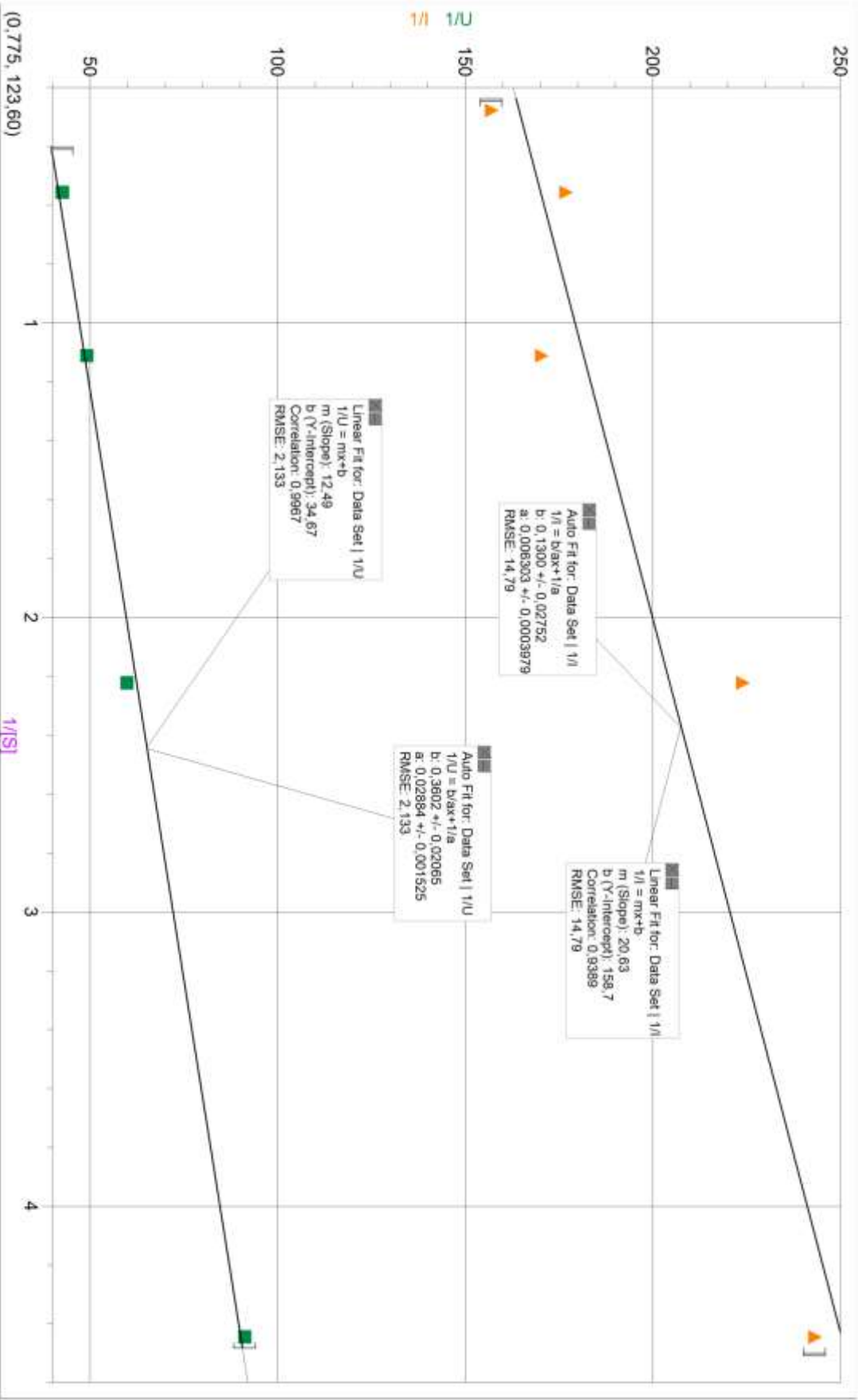
[S]	U	I	1/[S]	1/U	1/I
3,6		0,006375	0,277778		156,8707
1,8	0,023473	0,005657	0,555556	42,60145	176,7638
0,9	0,020357	0,005873	1,111111	49,12355	170,268
0,45	0,016714	0,004467	2,222222	59,83127	223,8758
0,225	0,010964	0,004114	4,444444	91,20735	243,092

[S] = substratkoncentration

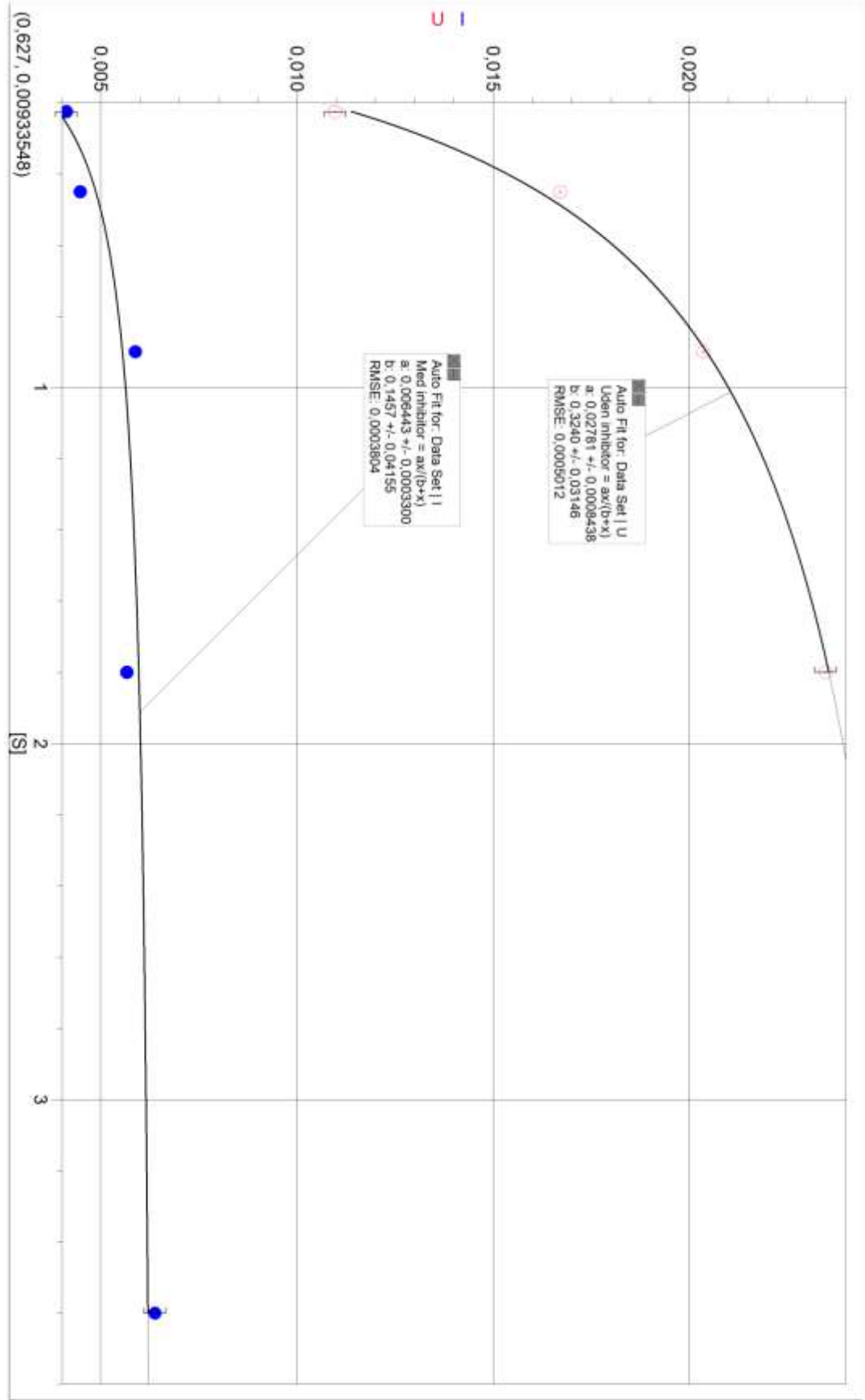
U = uden inhibitor

I = med inhibitor

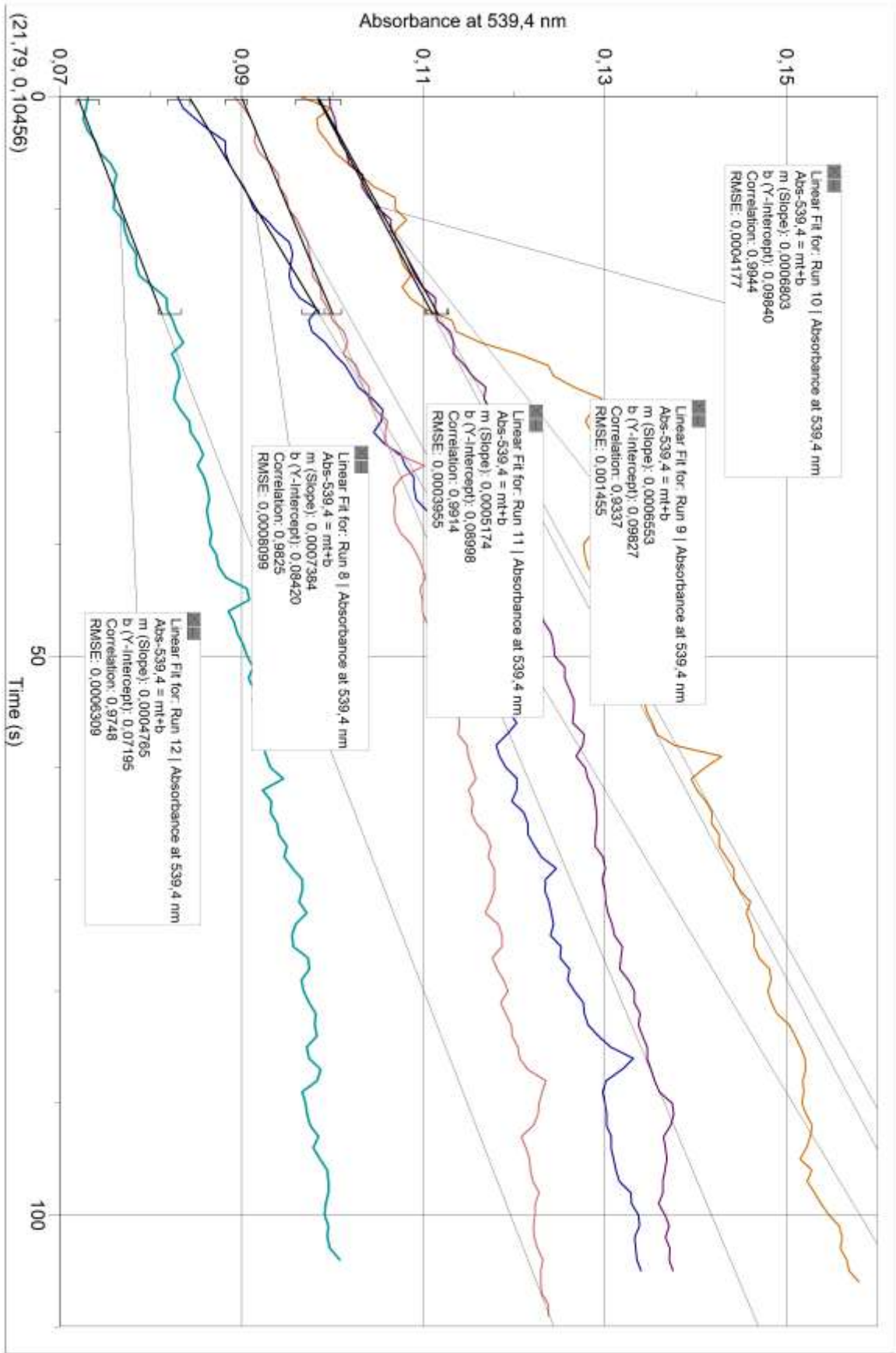
Bilag 2: Lineweaver-Burk plot over forsøgsdata



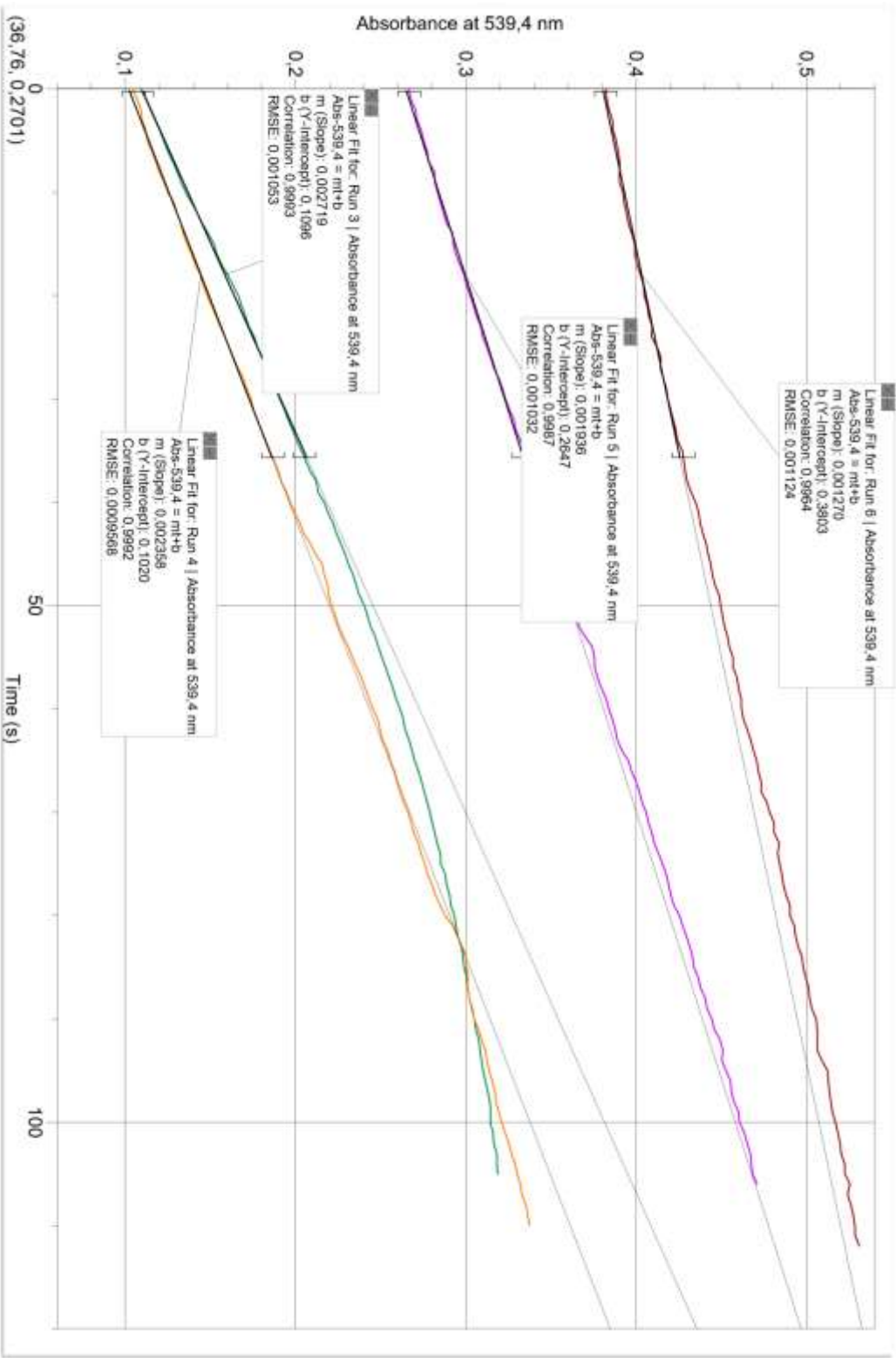
Bilag 3: Michaelis-Menten plot over forsøgsdata



Bilag 4: Graf over absorbans pertid med inhibitor



Bilag 5: Graf over absorbans per tid uden inhibitor

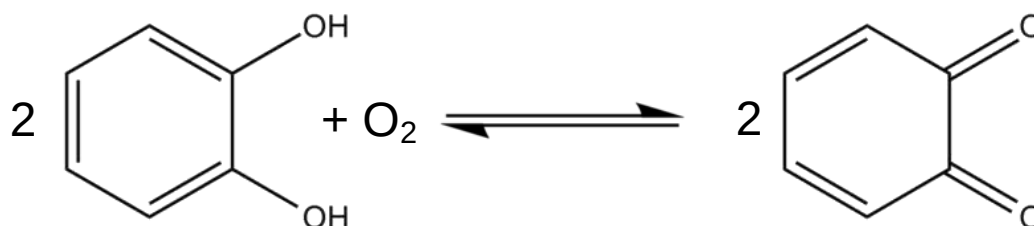


6:

Bilag

Enzymkinetik med catecholase

I denne øvelse skal vi arbejde med enzymet catecholase (også kaldet catechoxidase eller polyphenoloxidase). Enzymet forekommer almindeligt i planterceller i små vesikler og kan udvindes fra f. eks. frisk kartoffelsaft. Enzymet er en del af plantens forsvarssystem. Enzymets substrater er catechol (også kaldet pyrocatechol eller 1,2-dihydroxybenzen) og dioxygen fra luften. Produktet er *o*-benzoequinon. Ligevægten er forskudt helt mod højre.



Substraterne er farveløse, mens *o*-benzoequinon har en gulbrun farve, som kan måles med et spektrofotometer.

Formål:

I dette forsøg undersøges enzymkinetikken for catecholase. Desuden undersøger vi den hæmmende virkning af phenylthiocarbamid.

Materialer:

- Friske mellemstore kartofler
- Kartoffelskræller og kniv
- Blender
- Filter, sugekolbe og Büchnertragt
- Vægt
- 13 Reagensglas
- 500 mL og 250 mL koniske kolber
- 10 mL, 100 mL og 250 mL måleglas
- Prop
- Reagensglasstativ
- Is og isbad
- 1,2-Dihydroxybenzen (catechol)
- Phenylthiocarbamid (PTC)
- Demineraliseret vand
- Pipetter og pipettespidser
- Spektrofotometer

- Kuvette
- Computer med LoggerPro til dataopsamling

Fremgangsmåde:

1. Spektrofotometret tændes, og bølgelængden indstilles til 540 nm.
2. Der skal fremstilles 2 fortyndingsserier. To rækker reagensglas med 6 i hver sættes op i et stativ. Glassene i hver serie mærkes 1-6. Den ene serie mærkes yderligere med PTC. I hver række bliver koncentrationen i et reagensglas halvdelen af koncentrationen i det foregående.
3. I glas 2-6 i hver serie påfyldes 5 mL vand.
4. Afvej 159 mg catechol og opløs det i 200 mL vand i en konisk kolbe. Denne opløsning har en koncentration på 7,2 mM.
5. Afvej 230 mg PTC og opløs det i 100 mL vand i en konisk kolbe. Denne opløsning har en koncentration på 15,0 mM.
6. 10 mL af catecholoopløsningen hældes i hver af de to glas nr. 1.
7. I begge serier overføres 5 mL fra glas nr. 1 til glas nr. 2, og der blandes. Derefter gentages proceduren med 5 mL fra glas nr. 2 til glas nr. 3 osv., indtil glas nr. 6 indeholder 10 mL. Hermed har vi en to fortyndingsserier, hvor koncentrationen i et glas er to gange mindre end i det foregående.
8. Tilsæt 20 µL PTC-opløsning til hvert glas 1-5 i serien mærket PTC og 40 µL til glas nr. 6 og bland.
9. En kartoffel skrælles, skæres i små stykker og blendes med en smule isvand. Kartoffelsaften filtreres på en Büchnertragt og sugekolbe. Kartoffelekstraktet (= enzymopløsningen) sættes straks i et tilproppet reagensglas på is. Der skal være mindst muligt luft i glasset.
10. Tilsæt 1 mL fra glas nr. 1 (uden PTC) til et reagensglas mærket Abs. Tilsæt 2 mL vand og 100 µL enzymopløsning til dette glas, rør rundt, og lad det stå.
11. Tilsæt 3 mL vand og 100 µL enzymopløsning til en kuvette, og bland ved at vende kuvetten et par gange. Sæt kuvetten i spektrofotometret og nulstil apparatet. Kartoffelekstraktet har en lille absorbans, som vi automatisk korrigerer for ved at nulstille apparatet med en prøve med enzymopløsning uden substrat.
12. Tag kuvetten op, og hæld indholdet ud. Overfør 3 mL fra glas nr. 1 (uden PTC) til den samme kuvette. Tilsæt 100 µL enzymopløsning til kuvetten, og bland. Sæt kuvetten i spektrofotometret, og start dataopsamlingen (3 min., 30-60 målinger pr. min.).
13. Gentag punkt 12 med glas nr. 2, og fortsæt, indtil alle glas er målt i begge serier.
14. Mål til sidst absorbansen af indholdet i glasset mærket Abs.

Resultater og databehandling:

Find hastigheden af omsætningen for hver måling i den første del af kurven, som er retlinet. Hastigheden kan udtrykkes som ændringen i absorbans ΔA pr. ændring i tid Δt :

$$v = \frac{\Delta A}{\Delta t}. \quad (1)$$

Ifølge Lambert-Beers lov er absorbansen proportional med stoffets absorptionskoefficient ϵ ved den givne bølgelængde, stoffets molære koncentration c og lysvejens længde l :

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l. \quad (2)$$

Ligning (2) kan omskrives til

$$c = \frac{A}{\varepsilon \cdot l} \quad (3)$$

Hvis man har målt en ændring i absorbans, ΔA , vil det svare til en ændring i stofmængdekonzentration:

$$\Delta c = \frac{\Delta A}{\varepsilon \cdot l} \quad (4)$$

Absorbansen A har ingen enhed, ε har enheden $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$, c har enheden M (molær = mol/L), og l har enheden cm. Kuvettens bredde er 1 cm, så $l = 1 \text{ cm}$. Hvis absorptionskoefficienten ε for *o*-benzoquinon kendes, så kan hastigheden udtrykt i koncentration pr. tidsenhed kan findes som

$$v = \frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{\Delta A}{\Delta t \cdot 1 \text{ cm}} \cdot \frac{1}{\varepsilon} \quad (5)$$

For at bestemme ε har vi lavet en prøve, der får lov til at reagere fuldstændigt til *o*-benzoquinon (punkt 14). Omskrivning af ligning (1) giver

$$\varepsilon = \frac{A}{c \cdot l} \quad (6)$$

Absorbansen A er målt under punkt 14, $c = 7,2 \text{ mM}$ ($= 0,0072 \text{ M}$), og $l = 1 \text{ cm}$. Den fundne værdi for ε anvendes efterfølgende til at beregne hastighederne som ændring i koncentration pr. tidsenhed.

Både dataopsamling og dataanalyse foregår i LoggerPro. De rå data består af absorbans som funktion af tiden. I LoggerPro finder man og markerer lineære stykker i begyndelsen af kurverne og fitter rette linjer. Hældningerne af disse rette linjer er $\Delta A / \Delta t$, som omregnes til $\Delta c / \Delta t$ ved at dividere med ε ifølge ligning (5).

Fremstil ved hjælp af LoggerPro både Michaelis-Menten plots og Lineweaver-Burk plots for begge serier og bestem henholdsvis K_M og $V_{\max}$ (uden PTC) og K_M^{app} og $V_{\max}^{\text{app}}$ (med PTC). Som substratkonzentrationer bruges værdierne for koncentrationen af catechol i fortyndingsserierne.

Ved beregningerne af substratkonzentrationerne skal du huske fortyndingen med enzym- og PTC-opløsningerne.

Spørgsmål til rapporten:

1. Eftersis beregningerne af koncentrationerne af catechol og PTC.
2. Hvilke plots er mest pålidelige – Michaelis-Menten eller Lineweaver-Burk? Begrund dit svar.
3. Hvilken type plot er bedst til at afgøre hvilken type hæmmer, der er tale om?
4. Hvilken type hæmmer er phenylthiocarbamid?
5. Beregn inhiberingskonstanten K_i .
6. Vurder, om PTC er en god, middelmådig eller dårlig hæmmer?