

## Enzymkinetik med en spektrofotometrisk analysemetode

---

### Teori:

Øvelsen benytter samme metode som kroppen anvender til nedbrydning af alkohol i leveren, hvor coenzymet  $\text{NAD}^+$  reduceres til  $\text{NADH}$  samtidig med at ethanol oxideres til ethanal efter følgende reaktionsskema:



Processen katalyseres af enzymet alkohol-dehydrogenase (pH-maximum = 9,0).

Denne ligevægt er ved normale betingelser forskudt mod venstre, hvorved denne reaktion ikke umiddelbart kan benyttes til bestemmelse af ethanol-koncentrationer. Dette problem løses ved at tilsætte enzymet aldehyd-dehydrogenase, som katalyserer den videre oxidation af ethanal til ethansyre:



Dette tvinger ifølge Le Chateliers princip ligevægten (I) mod højre, hvorved alt ethanol omdannes til ethansyre, hvis man sørger for at tilsætte enzymer og anvende  $\text{NAD}^+$  i overskud.

Den forbrugte mængde  $\text{NAD}^+$  bestemmes spektrofotometrisk. Da alle reaktionsdeltagere er farveløse måler man i det ultraviolette område, hvor det viser sig, at  $\text{NADH}$  har et absorptionsmaximum ved ca. 340 nm, hvorimod ingen andre reaktionsdeltagere absorberer i dette område.

Ifølge Michaelis-Menten modellen (for teori se f.eks. Kemi Forlagets hæfte Hans Chr. Jensen et al: Enzymkinetik) er der for en enzymkatalyseret proces følgende sammenhæng mellem initialhastigheden  $v$  og substratkoncentrationen  $[\text{S}]$ :

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

hvor  $V_{max}$  er  $\lim_{[\text{S}] \rightarrow \infty} v$  og  $K_M$  er den såkaldte *Michaelis*-konstant, som er mål for hvor stærk bindingen er mellem substratet og enzymet – jo mindre  $K_M$  jo mere effektiv er substratbindingen.

I øvelsen måles sammenhængende værdier af initialhastigheden og substratkoncentrationer, hvorefter der i Logger-Pro tilpasses til den bedst mulige Michaelis-Menten kurve.

### Apparatur og kemikalier:

UV-spektrofotometer med tilhørende kuvetter

Computer med Logger-Pro installeret.

Vægt, diverse pipetter med tilhørende sugesbold, bægerglas.

Ethanol.

Analysesæt til ethanolbestemmelse indeholdende pufferopløsning (pH = 9,0), opløsning af alkohol-dehydrogenase og tabletter, som indeholder aldehyd-dehydrogenase og NAD<sup>+</sup> (Boehringer Mannheim kat. nr. 176290 – bestilles på tlf. 42912266).

### **Eksperimentelt:**

For at få brugelige resultater er det nødvendigt at arbejde meget omhyggeligt og renligt! Af økonomiske grunde vil det være rimeligt at dele arbejdet, så hvert hold kun laver en enkelt måling.

Forbind spektrofotometret til computeren, opstart Logger Pro og lad spektrofotometret varme op.

Da analysemetoden er meget følsom skal vi arbejde med meget fortyndede opløsninger. Man starter laver først en stamopløsning i en 1 liters målekolbe, som indeholder 5,00 g ethanol pr. liter – sørg for at ethanolen overføres kvantitativt og at målekolben rystes grundigt efter blandingen. Denne opløsning benyttes til at lave nye fortyndinger (100-300 gange), som skal bruges til at lave en standardkurve, der viser sammenhængen mellem ethanolconcentration og absorbans. Disse standardopløsninger fremstilles i henhold til skemaet nedenfor – find selv ud af, hvordan dette gøres mest præcist (husk: brug pipetter og målekolber!)

Der fremstilles en reagensopløsning fra analysesættet ved at opløse 24 tabletter i 40 mL pufferopløsning.

Til at kalibrere spektrometret laves i en kuvette en opløsning bestående af 3,00 mL reagensopløsning, 100 µL dem. vand og 50 µL enzymesuspension (alkohol-dehydrogenase). Lad prøven stå i 8-13 min. Spektrometret indstilles til at måle ved 340 nm, hvorefter der kalibreres på denne prøve.

Oversigtsskema:

Opløsning	Fortyndingsfaktor	Absorbans	Ethanolindhold - fortyndet	Ethanolindhold - ufortyndet
stamopløsning	100		0,0500 g/L	5,00 g/L
stamopløsning	200			
stamopløsning	300			

For hver af ovenstående standard-opløsninger gøres følgende:

- Overfør 3,00 mL reagensopløsning til en kuvette og tilsæt 100 µL standard-opløsning (ifølge skema)
- Lad kuvetten stå ca. 3 min.
- Tilsæt 50 µL enzymesuspension og rør forsigtigt med en lille spatel.
- Lad stå 5-10 min.
- Mål absorbansen ved 340 nm

Til at bestemme initialhastighederne laves nedenstående forsøgsrække. I Logger-Pro vælges Time Based Datacollection , og der måles i 200 sekunder – 2 målinger pr. sekund. Bølgelængden er fortsat 340 nm.

Forsøgsnr.	Fortyndingsfaktor	C <sub>ethanol</sub> (mM)	Tangenthældning (s <sup>-1</sup> )	Initialhastighed (mM/s)
1	5			
2	10			
3	15			
4	20			
5	30			
6	50			
7	100			
8	200			

I hvert forsøg gøres følgende:

- Overfør 3,00 mL reagensopløsning til en kuvette og tilsæt 100 µL af den fortyndede ethanolopløsning (ifølge skema)
- Lad kuvetten stå ca. 3 min.
- Sæt kuvetten i spektrofotometret
- Start dataopsamlingen samtidig med, at der tilsættes 50 µL enzymsuspension og der røres hurtigt med en spatel.

#### Efterbehandling:

1. Anvend de første 5 målinger til at tegne en standardkurve – benyt ligefrem regression i Logger Pro. Kommenter resultatet – Er det i overensstemmelse med Lambert-Beers lov?
2. I hvert af de 8 forsøg bestemmes så godt som muligt tangenthældningen ved forsøgets start – brug Logger Pro til at tilnærme den bedste tangent.
3. Under 1. har I fundet sammenhængen mellem absorbansen og ethanol-koncentrationen. Benyt dette til at bestemme initialhastigheden i de 8 forsøg.
4. Indtast sammenhørende værdier af c<sub>ethanol</sub> ([S]/mM) og initialhastighed (v/mM\*s<sup>-1</sup>) i Logger Pro. Vælg derefter *Analyze/Curve Fit/Define Function*, hvorefter følgende funktion defineres:

$$f(S) = A / (1 + \frac{B}{S})$$

hvor S er substratkoncentrationen (c<sub>ethanol</sub>) og A og B er konstanterne i Michaelis-Menten ligningen – henholdsvis V<sub>max</sub> og K<sub>M</sub>. Vælg *Automatic Fit Type / Try Fit*. Bestem på denne måde V<sub>max</sub> og K<sub>M</sub>.

5. Vurder metoden