

Forsøg med enzymer

Metabolismen er de levende cellers stofomsætning. De mange processer er oftest katalyseret af enzymer. Nogle af processerne er nedbrydende (biolytiske eller kataboliske), andre er opbyggende (biosyntetiske, anaboliske). Enzymerne er derfor afgørende for organismernes livsytringer. Derudover har enzymer fundet en vigtig plads i industriel produktion.

Eksperimenterne på de følgende sider kan bruges til at belyse disse forskellige sider af enzymernes rolle.

Oversigt

1. Forsøg med *amylase*

Simpelt, klassisk forsøg til eftervisning af stivelsesnedbrydning og diskussion af begrebet diffusion.

2. Forsøg med *catecholase* (1)

Simpelt forsøg med et enzym udvundet fra kartoffel. Forsøget kan bruges til at illustrere enzymeres specificitet samt eftervise sammenhæng mellem enzymaktivitet og temperatur, pH og betydningen af co-faktoren.

Forsøget kan bruges i sin helhed eller skaleres til et mindre omfattende, hurtigt udført forsøg.

3. Forsøg med *catecholase* (2)

Forsøg hvor enzymaktivitet følges spektrofotometrisk. Der laves forsøg med hæmning. Forsøgsresultaterne indsættes i et Lineweaver-Burk diagram.

4. Forsøg med biosyntese

Simpelt og hurtigt forsøg til påvisning af stivelsesopbygning hos kartofler. Der kan evt. anvendes spektrofotometer til påvisning af stivelsesdannelsen.

5. *Amylases* nedbrydning af stivelse

Forsøg til påvisning af stivelsesnedbrydning. Anvendelse af spektrofotometer, fastlæggelse af måleområde, standardkurve. Træning i pipettering. Stivelsesnedbrydning med og uden iod.

6. Kinetisk undersøgelse af enzymet *lactase*

Enzymkinetik belyst ved *lactases* nedbrydning af ONPG. En mindre udbygning giver anledning til at eftervise enzymhæmning.

7. *Sweetzyme*

Forsøg med omdannelse af glucose til fructose ved hjælp af et immobiliseret enzym.

Stikordsregister

<i>α-amylase</i>	2;14	K_M	9;18
<i>β-galactosidase</i>	18	<i>Lactase</i>	18
ADP-glucose	10	Lineweaver-Burk diagram.....	9
<i>AGPase</i>	10;13	Lugols – iodopløsning (opskrift).....	14
<i>Aspergillus oryzae</i>	2;14;18	Novozymes <i>Sweetzyme IT</i>	22
biosyntese	10	Novozymes <i>Termamyl 120 L</i>	2;14
<i>catecholase</i>	4	Selivanoffs reagens (opskrift)	22
<i>Dialyseforsøg</i>	2	Standardkurve (grundprincip)	15
<i>diastase</i>	2	<i>Stivelsesprøve</i>	2
<i>Enzylac</i>	18	<i>Sweetzyme</i>	22
inhibitor	7;20	V_{max}	9;18
<i>Kluyveromyces lactis</i>	18		

Forsøg med *amylase*

α -*amylase* er et enzym, der katalyserer spaltning af α -glycosid bindinger i stivelse.

Enzymet kan ikke katalysere en fuldstændig nedbrydning. Bindinger, der er terminale (dvs. placeret ude i "enden" af molekylet), eller sådanne, der støder op til en α -1,6 binding bliver ikke spaltet.

Enzymet dannes af mange forskellige organismer inklusiv *Homo sapiens*.

Sigma A 6211 er en α -*amylase* (=diastase) fra *Aspergillus oryzae* (en svamp).

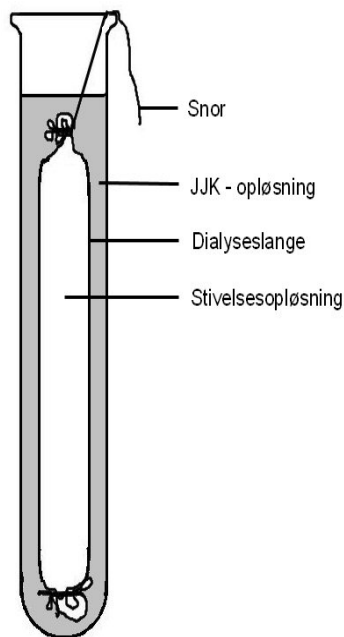
(2004: Pris 250.000 units 27,20 €), pH optimum 6,9.

α -*amylase* kan også fås hos Erhvervsakademiet Roskilde Novozymes *Termamyl 120 L* (2004: pris 105 kr.)

Mennesker har α -*amylase* bl.a. i spytet, men koncentrationerne er varierende fra person til person og fra situation til situation, så forsøg med spyt falder ikke altid ens ud.

Formål

I dette forsøg belyses bl.a. stivelses nedbrydning ved hjælp af α -*amylase*.



Stivelse er en væsentlig bestanddel af de fleste organismers føde.

Stivelse syntetiseres af planterne, og er en af de væsentligste energikilder for både planter og dys metabolisme.

I dette forsøg skal vi undersøge, hvorfor stivelse må fordøjes, før det kan udnyttes af cellerne.

Materialer:

3 stykker dialyseslange, ca. 10 cm lange og 1,5 - 2 cm i diameter.

Snor (fx kinesertråd).

3 store reagensglas (evt. propper, til at fastholde snor).

Pipetter.

Saks.

0,5 g opløselig stivelse opløses i vand til 100 mL (koges).

Maltose opløsning ($c = 0,1$ M).

Diastase-opløsning (75 mg enzym opløses til 10 mL).

Lugol's iodopløsning.

JJK-opl. laves umiddelbart før forsøget (1 del Lugol's iodopl blandes med 4 dele vand).

Forsøgsopstilling til fordøjelse af stivelse (dialyseslangen har porer med diameter ca. 20 Å).

Fremgangsmåde

Foretag stivelsesprøver på hvert af følgende materialer:

Stivelsesopløsning, maltoseopløsning, diastase-opløsning, vand. Noter resultaterne i tabellen (se næste side).

Stivelsesprøve. Tilføj nogle få dråber Lugol's iodopløsning til en smule af den opløsning, der skal prøves. Blandingen vil antage en kraftig blå farve, såfremt den indeholder stivelse (prøven kan foretages med Lugol's iodopløsning og et par dråber testopløsning i de små fordybninger på en porcelænsplade (et farvekar)).

Dialyseforsøg

Opstil reagensglas m.m. som vist på figuren ovenfor.

(Illustrationen viser opstillingen med de materialer, der anvendes i forsøg A).

Der tilsættes opløsninger til dialyseslange og reagensglas, som angivet i tabellen (se resultat- og opstillingsark på næste side). Dialyseslangen fugtes først og åbnes forsigtigt. Den ene ende snøres til, det ønskede materiale tilsættes (et par mL), hvorpå den anden ende ligeledes snøres til.

Husk ved hvert forsøg skal ydersiden af dialysesækken skylles i rindende vand, før den anbringes i reagensglasset.

Studiespørgsmål

1. Hvilken enzym-hovedgruppe skal enzymet α -amylase placeres i?
2. Forudsig hvilke stoffer, man vil vente at finde i og udenfor dialysesækken efter kort tids forløb.
3. Efter et stykke tids forløb iagttages indholdet af dialysesæk og reagensglas i forsøgene **A** og **B**. Disse iagttagelser noteres i kolonnen til forsøgsresultater. Forklar de iagttagne resultater. Hvilke slutninger kan man drage med hensyn til partikelstørrelserne i stivelsesopløsningen og Lugol's iodopløsning?
4. Var det nødvendigt at have begge forsøg (**A** og **B**)? Forklar.
5. Hvilket resultat vil du forvente, hvis vi tester indholdet af reagensglasset i forsøg **C** for maltose?

Bemærkninger

I forsøg **C** foretages på sædvanlig vis stivelsestest (den resterende prøve (både dialysesæk og reagensglas) kan forsigtigt hældes op i et lille reagensglas og testes for indhold af reducerende sukker vha. Benedicts eller Fehlings reagens).

Vær opmærksom på at både kortkædet opløselig stivelse og enzymopløsning kan give en reducerende reaktion. Kontrolforsøg er derfor ikke altid mulige.

Resultatskemaer

Opløsning	Stivelsesprøve (pos. el neg.)
Stivelse	
Maltose	
Diastase	
Vand	

Forsøg	Indhold i dialysesæk	Indhold i reagensglas	Resultater	
			Dialysesæk	Reagensglas
A	Stivelsesopl.	JJK-opl.		-
B	JJK-opl.	Stivelsesopl.		
C	½ stivelsesopl. + ½ diastaseopl.	Destilleret vand		

Forsøg med *catecholase* (1)

I dette forsøg skal vi arbejde med enzymet *catecholase* (også kaldet *catechol oxidase*, eller *polyphenol oxidase*).

Enzymet forekommer almindeligt i planter. Her spiller det en vigtig rolle bl.a. som i plantens forsvar mod angreb af mikroorganismer.

Enzymet kan udvindes fra frisk kartoffelsaft.

Enzymets substrater er catechol (pyrocatechol, = 1,2 dihydroxybenzen) og oxygen.

Substraterne reagerer med hinanden i enzymets bindingslomme (= "active site") og danner benzoquinon (brungul farve). Benzoquinon hæmmer mikroorganismer og forhindrer derved angreb.

I ikke beskadigede celler er *catecholasen* placeret isoleret fra omgivelserne inde i små vesikler.

Formål

At påvise enzymaktivitet, samt at eftervise forskellige faktoreres indvirkning på denne (f.eks. pH og temperatur).

Materialer

Friske kartofler (mellemstørrelse), blender, kaffefilter, Büchnertragt, reagensglas, propper, bægerglas, termometre, kogende vand, is og isbad, sug, en serie pufferopløsninger (pH 2, 4, 6, 8, 10, 12), 1,2 dihydroxybenzen (1% opløsning) Sigma C 9510 (2004: Pris 100g 21,70 €), hydroquinon (1,4 dihydroxybenzen) 1% opløsning Sigma H 9003 (2004: Pris 100g 26,30 €), PTU N-phenylthiourinstof (Phenylthiocarbamid, PTC) Sigma P 7629 (2004: Pris 10 g 33,70 €), destilleret vand, pipetter.

Bemærk mærkningen af kemikalierne!

Fremgangsmåde

En kartoffel skrælles, skæres i små stykker og blendes (tilføj evt. en smule isvand). Sug straks kartoffelsaften igennem et kaffefilter klippet til, så det passer i en Büchnertragt. Kartoffelekstraktet sættes straks i et tilproppet reagensglas på isbad (der skal være så lidt luft som muligt i glasset).

I. Dannelse og bestemmelse af benzoquinon

I denne del af forsøget ser vi enzymets virkning på 1,2 dihydroxybenzen (=catechol).

Bland	Start farve	Slut farve (efter 5 min.)
10 dråber kartoffel-ekstrakt og 10 dråber 1% catechol opl.		
10 dråber kartoffel-ekstrakt og 10 dråber H ₂ O		
10 dråber 1% catechol opl. og 10 dråber H ₂ O		

II. Enzym specificitet

I dette forsøg undersøger vi om enzymet også kan omdanne hydroquinon til benzoquinon.

Bland	Start farve	Slut farve (efter 5 min.)
10 dråber kartoffelekstrakt og 10 dråber 1% cathecol		
10 dråber kartoffelekstrakt og 10 dråber 1% hydroquinon		
10 dråber 1% hydroquinon og 10 dråber H ₂ O		

III. Temperatur effekt

Sæt 6 par bægerglas op. I hvert bægerglas placeres 2 reagensglas. I det ene kommes 10 dråber kartoffelekstrakt, i det andet 10 dråber 1% catechol opløsning. Bægerglassene fyldes med vand, således at temperaturen kan holdes nogenlunde konstant. Lad reagensglassene stå, til væsken og glasset har samme temperatur som vandet (ca. 3 min.). Bland indholdet sammen og lad det reagere i 5 minutter.

Temperatur °C	Start farve	Slut farve (5 min. efter sammenblandingen)
0 °C		
20 °C		
40 °C		
60 °C		
80 °C		
100 °C		

IV. Betydningen af pH

Opstil 7 reagensglas. I hvert glas kommes 40 dråber pH puffer-opløsning. Derpå tilsættes 10 dråber kartoffelekstrakt (bland) og endelig 10 dråber 1% catechol (bland)

pH	Start farve	Slut farve (5 min. efter tilsætning af catechol)
2		
4		
6		
7		
8		
10		
12		

V. Cofaktor

Phenylthiocarbamid (PTC) har en meget høj affinitet for kobberioner - større end *catecholases*, og phenylthiocarbamidet "snupper" enzymets kobberion.

Bland	Start farve	Slut farve (5 min. efter at catechol er tilføjet)
Reagensglas A 10 dråber kartoffelekstrakt og 5 PTC krystaller blandes. Efter 5 minutter tilsættes 10 dråber 1% catechol.		
Reagensglas B 10 dråber kartoffelekstrakt. Efter 5 minutter tilsættes 10 dråber 1% catechol		

Studiespørgsmål

1. Skriv formelen for 1,2 dihydroxybenzen.
2. Opskriv et afstemt reaktionsskema, hvor 1,2 dihydroxybenzen + oxygen bliver til benzoquinon
3. Hvorfor er de 2 sidste test i afsnit I. taget med?
4. Hvilken konklusion kan vi træffe på baggrund af II. ?
5. Forklar resultaterne i III.
6. Hvordan kan man forklare, at pH har betydning for enzymets aktivitet?
7. Gør rede for resultatet i forsøg V.

Forsøg med *catecholase* (2)

Formål

I dette forsøg undersøger vi *catechecolasens* aktivitet. Desuden efterviser vi, hvorledes phenylthio-carbamid virker som inhibitor (hæmmer).

Materialer

Friske kartofler (mellemstørrelse), blender, kaffefilter, Büchnertragt, reagensglas, prop, reagensglasstativ, is og isbad, sug, 1,2 dihydroxybenzen (1% opløsning) Sigma C 9510 (2004: Pris 100g 21,70 €), PTU N-phenylthiourinstof (Phenylthiocarbamid, PTC) Sigma P 7629 (2004: Pris 10 g 33,70 €), destilleret vand, pipetter (5 mL, 3 mL, 20 μ L, 100 μ L), spektrofotometer helst med mulighed for dataopsamling, kuvetter, evt. centrifuge og centrifugeglas.

Bemærk oplysningssedler på kemikalierne!

Fremgangsmåde

- 1) Spektrofotometeret tændes. Der skal måles ved 540 nm, i 3-5 minutter.
- 2) Gør parat til at fremstille 2 fortyndingsserier.
2 rækker reagensglas, 5 i hver, sættes op i et stativ (reagensglassene skal have en dimension, så man bekvemt og hurtigt kan afpipettere 5 mL og 3 mL (alternativt skal man have bægerglas parat til ophældning og efterfølgende afpipettering).
Glassene mærkes 1-5, den ene række mærkes tillige + PTC.
- 3) Glas 2, 3, 4 og 5 i begge rækker påfyldes 5 mL vand.
- 4) Afvej: a) 1,2 dihydroxybenzen til fremstilling af i alt 20 mL opløsning, $c = 4,8$ mM
b) Phenylthiocarbamid til fremstilling af 1 mL opløsning, $c = 10$ mM
- 5) En kartoffel skrælles, skæres i små stykker, og blendes (tilføj evt. en smule isvand). Sug straks kartoffelsaften igennem et kaffefilter klippet til, så det passer i en Büchnertragt. Kartoffelekstraktet (=enzymopløsningen) sættes straks i et tilproppet reagensglas på isbad (der skal være mindst muligt luft i glasset).
Ønsker man en klarere kartoffelekstrakt, kan ekstraktet centrifugeres et par minutter ved 8-10.000 omdrejninger/min, hvorpå supernatanten anvendes som enzymopløsning.
- 6) Spektrofotometeret nulstilles.
Tilsæt 3 mL vand til en kuvette. Overfør 100 μ L enzymopløsning og bland.
- 7) Tilsæt vand til phenylthiocarbamidet og overfør 20 μ L til hvert enkelt reagensglas i den PTC-mærkede række.
- 8) Tilsæt vand (20 mL) til det afvejede 1,2 dihydroxybenzenen.
Del de 20 mL i 2 x 10 mL, der ophældes i de to "glas nr. 1".
- 9) I begge rækker overføres nu 5 mL fra glas 1 til glas 2. Der blandes og proceduren fortsættes indtil glas 5 indeholder 10 mL blandet opløsning; de øvrige glas har hver 5 mL.
- 10) Overfør 3 mL fra glas 1 (uden PTC) til en kuvette, der sættes i spektrofotometeret.
Tag 100 μ L enzymopløsning i en pipette. Start dataopsamlingen (5 min., 30-60 målinger/min.) og tilsæt de 100 μ L enzymopløsning til kuvetten (denne forbliver i spektrofotometeret). Bland ved at suge væske frem og tilbage et par gange (**PAS PÅ** stød ikke luft ned i kuvetten).

Når målingen er slut gemmes resultaterne.

Nu gentages måleproceduren blot med glas 2.

Fortsæt indtil alle glas i begge rækker er målt.

Resultater

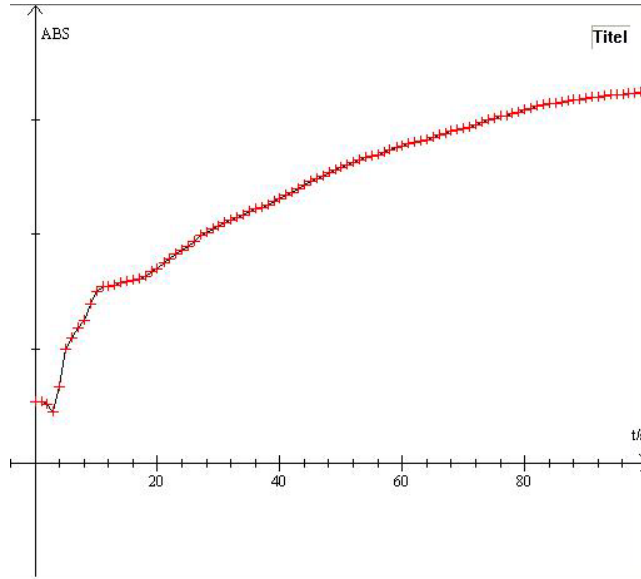
Find initialomsætningshastigheden i de forskellige måleserier.

Reaktionshastigheden (v) kan udtrykkes ved absorbanskurvens hældning, lige efter enzymtilsætningen, $v = \frac{\Delta A}{\Delta t}$

(Hvis målingerne er gode nok, kan man lave en standardkurve og finde v i enheden mM/min..

Ud fra målinger ved forskellige substratkoncentrationer, kan man skønne den absorbansværdi som kurven asymptotisk nærmer sig til. Denne værdi svarer til en total omsætning af det tilstedeværende substrat til benzoquinon.)

Eksempel på resultat:



Figuren viser en måleserie (uden hæmning).

Resultatskema (uden PTC)

	Glas 1	Glas 2	Glas 3	Glas 4	Glas 5
$[S]^*$					
$1/[S]$					
$v = \frac{\Delta A}{\Delta t}$					
$1/v$					

Resultatskema (med PTC)

	Glas 1	Glas 2	Glas 3	Glas 4	Glas 5
$[S]$					
$1/[S]$					
$v = \frac{\Delta A}{\Delta t}$					
$1/v$					

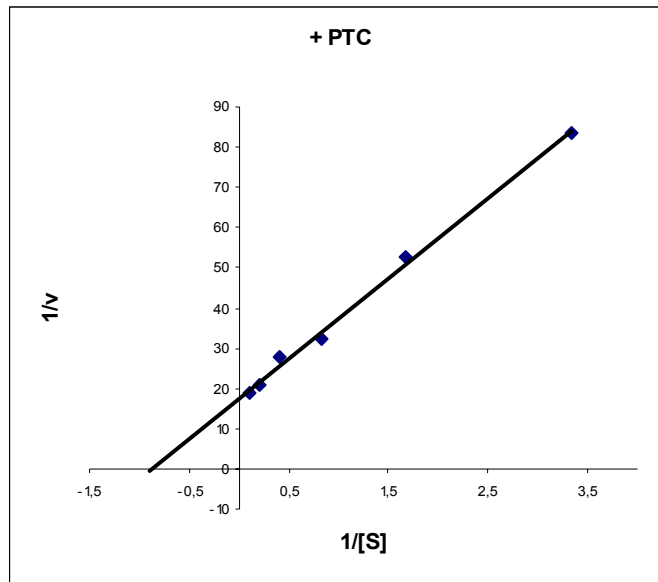
* Ved beregningen af substratkoncentration kan man se bort fra fortyndingen med enzym og PTC.

Studiespørgsmål

1. Hvilken rolle spiller *cathecholoxidase* for planten (se forgående øvelse)
2. Forklar hvorfor phenylthiocarbamid virker som inhibitor på enzymaktiviteten (se foregående øvelse).
3. Fremstil (brug regneark) to grafer, der viser resultaterne af de to forsøgsrækker. Afbildningen skal vise $1/v$ som funktion af $1/[S]$

Denne afbildning kaldes et **Lineweaver-Burk** diagram.

Grafens skæring af y-aksen er lig med $1/V_{\max}$, skæringen med x-aksen angiver $= 1/K_M$



Lineweaver-Burk diagram. Afbildning af $1/v$ som funktion af $1/[S]$

4. Gør rede for hvilken type hæmning der er fundet i forsøget (ændres V_{\max} eller K_M ?)

Forsøg med biosyntese hos kartoffel

Forsøget kan gennemføres [med](#) eller uden [spektrofometer](#).

Ved fotosyntesen danner planter carbohydrat.

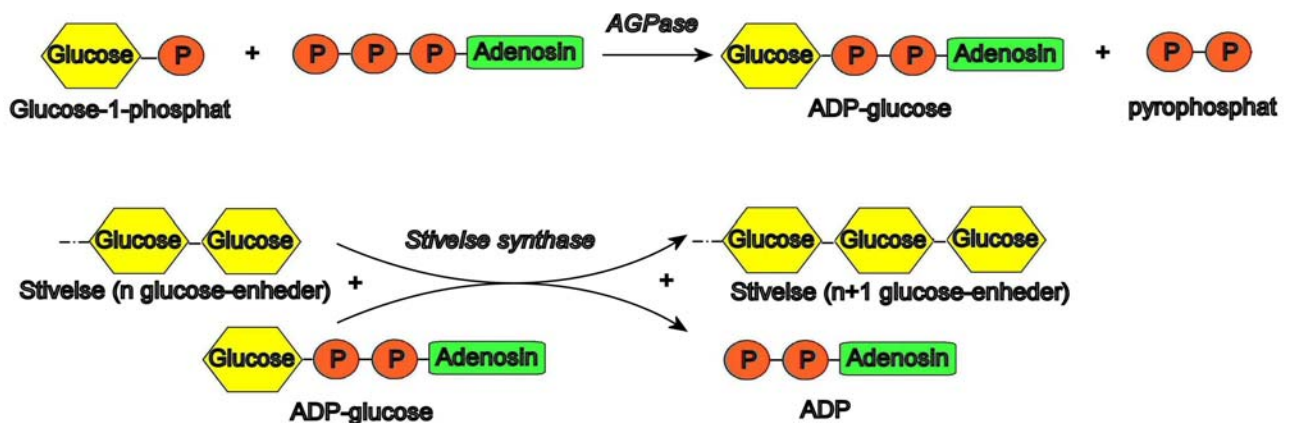
Carbohydraterne oplagres bl.a som stivelse.

Stivelsen i kartofler er placeret i stivelseskorn (se figuren til højre). Stivelseskornene, der er ret tunge og kan centrifugeres fra i et kartoffelekstrakt. I kartofler er stivelsen påhæftet fosfat, med en fosfat-ester binding pr. 200-400 glucoseenheder.

Rent teknisk er disse stivelses-fosfatgrupper vigtige, idet stivelsen derved opnår nogle bedre egenskaber med hensyn til stabilitet og anvendelighed i fødevarerindustrien. Derfor arbejder man med at gensplejse kartofler, sådan at man kan få sorter, der i højere grad end normalt sætter fosfat til stivelse.



Stivelsen i kartofler syntetiseres næsten som glycogen hos mennesket, der dannes dog ikke UDP-glucose men ADP-glucose.



Figur 1. Syntesen af amylose (uforgrenet stivelse)

Formål

At påvise at kartoflers enzymsystem opbygger stivelse.

Materialer

Friske kartofler (mellemstørrelse), blender, kaffefilter, Büchnertragt, reagensglas, prop, reagensglasstativ, målekolber, pipetter (5mL, 20µL, 50 µL, 100µL), sug, glucose, maltose, glucose-1-P (α -D-glucose-1-phosphat di Kalium salt; Sigma G 6875 (Pris: 2004 5 g 43,50 €), stopur, centrifuge og centrifugeglas (helst med skruelåg), **frisk** Lugol's iodopløsning (til 5 mL vand tilsættes 0,127 g I₂ (afvej iodkrystaller) og 0,5 g KI, der fyldes op til 10 mL, opløsningen opbevares mørkt (brun flaske)).

[I et udbygget forsøg kan man anvende spektrofotometer, kuvetter, kartoffelmel.](#)

Fremgangsmåde

Vandet til fremstilling af opløsninger skal have stuetemperatur.

- 1) [Spektrofotometer tændes \(måling ved 560nm\)](#)
- 2) Opløs 0,5 g glucose i 50 mL vand.
- 3) Opløs 0,5 g maltose i 50 mL vand.
- 4) Afvej 0,5 g glucose-1-P, sukkeret placeres i en tom målekolbe (50 mL).
- 5) Opstil 3 reagensglas i reagensglasstativ (glassene mærkes: G-1-P, G og M)

- 6) Overfør 5 mL glucose opløsning til glas G, og 5 mL maltose til glas M
- 7) Et "farvekar" (porcelænsplade med små fordybninger) gøres parat med en række dråber til stivelsespåvisning (Lugol's iodopløsning)
- 8) Et par kartofler (stuetemperatur) skrælles og skæres i små stykker, hvorpå de blendes evt. sammen med lidt vand (der skal bruges i alt 20 mL ekstrakt).
Sug straks kartoffelsaften igennem et kaffefilter klippet til, så det passer i en Büchnertragt. Kartoffelekstraktet (=enzymopløsningen) hældes straks i centrifugeglas gerne med låg (der skal være mindst muligt luft i glasset).
PAS PÅ, at de forskellige centrifugeglas har præcis samme vægt.
Der centrifugeres i ca. 3 min. ved 10.000 omdrejninger/min.
- 9) Test supernatant (topvæsken) i centrifugeglasset for stivelsesreaktion (det forberedte farvekar).
Hvis reaktionen er negativ **forsættes** forsøget.
(- er testen derimod positiv centrifugeres yderligere 3 min.).
- 10) **Spektrofotometeret nulstilles.**
En kuvette påfyldes 3 mL vand, 20 μ L Lugols iodopløsning, 50 μ L vand og 50 μ L enzymopløsning.
- 11) Tilsæt 50 mL vand til det afvejede glucose-1-P
- 12) Overfør 5 mL glucose-1-P til glas G-1-P

Uden spektrofotometer

- 13) Overfør 5 mL enzymekstrakt til hver af glassene G-1-P, G og M og bland.
Samtidigt startes et stopur
- 14) Hvert minut tages en dråbe fra hvert af de 3 glas til stivelsesprøve (klargjort "farvekar").
Notér evt. farveændring.

Med spektrofotometer

- 13) Overfør 5 mL enzymekstrakt til hver af glassene G-1-P, G og M og bland.
Samtidigt startes et stopur
- 14) En kuvette gøres parat med 3 mL vand og 20 μ L Lugols iodopløsning.
- 15) Efter 2 minutter udtages 100 μ L fra glas G-1-P. Prøven blandes med indholdet i kuvetten.
Absorbtionen aflæses og noteres.
- 16) Der tages et par dråber fra glasset G og M til stivelsesprøve (klargjort "farvekar").
- 17) Efter yderligere 2 minutter gentages punkterne 14-16
Forsæt med i alt ca. 10 målinger
Notér evt. farveændring ved glas G og M
- 18) 0,2 g kartoffelmel opløses i ca. 80 mL vand. Opløsningen koges, der fyldes op til 100 mL.
- 19) En kuvette gøres klar med 3 mL vand, 20 μ L Lugols iodopløsning, 50 μ L vand og 50 μ L enzymopløsning. Tilsæt 100 μ L kartoffelmelopløsning. Mål absorbtionen
- 20) På tilsvarende måde måles med tilsætning af 75-, 50-, og 25 μ L tilsat kartoffelmelopløsning.
Fremstil standardkurve.

Resultater

Tid (min.)	G-1-P	G	M
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			

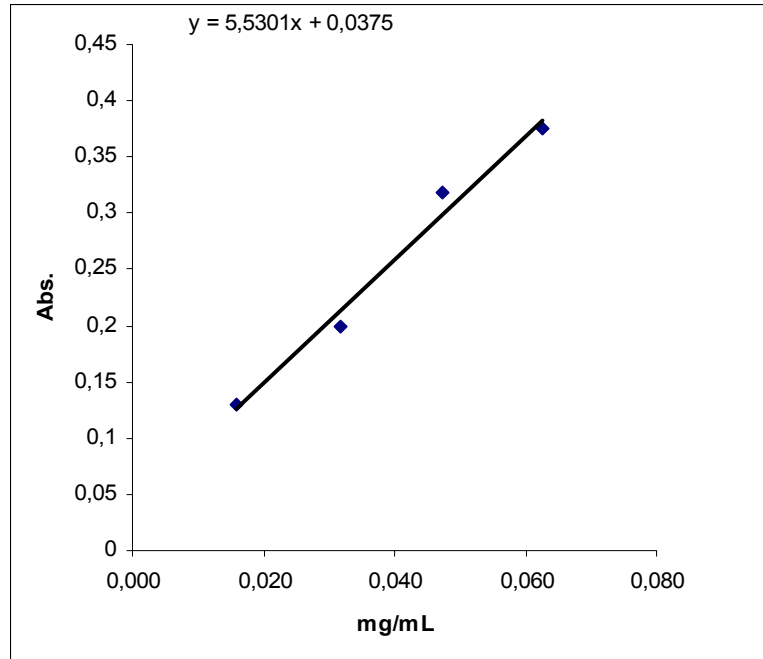
Resultater

Tid (min.)	G-1-P Abs.	G Evt. stivelsesreaktion	M Evt. stivelsesreaktion
2			
4			
6			
8			
10			
12			
14			
16			
18			
20			

Standardkurve

Stivelses konc. (mg/mL)	Abs.
0,063	
0,047	
0,032	
0,016	

Eksempel på standardkurve:



Studiespørgsmål

1. Hvorfor kan det være nødvendigt for planter at omlægge monosaccharider til polysaccharider?
2. Hvilken betydning har stivelsen for kartofflen?
3. Opskriv formelen for glucose-1-P samt ADP-glucose (ADP angives ved forkortelse)
4. *AGPase* (se Fig. 1) kaldes også *ADP-glucose Pyrophosphorylase*. Hvorfor det?
5. Hvilken hovedgruppe skal enzymet placeres i?
6. Beskriv (anvend formler) hvordan stivelse er opbygget.
7. Kan man være sikker på, at processen forløber ved hjælp af enzymer?
Skitser et udbygget forsøg, som kan vise at enzymer er afgørende.
8. Hvor mange mg G-1-P er oprindeligt tilstede i vores testvolumen (de udtagne 100 μ L), hvor mange mg/mL bliver det i kuvetten?
(vi antager, at enzymopløsningen oprindeligt er uden G-1-P).
9. Hvor store stivelsesmængder er fundet (mg/mL i kuvetten)?
10. Hvordan ville forsøget være gået, hvis vi havde brugt glucose-6-P? (se i biokemi-bogen)
11. Hvorfor må man formode, at kartofflens størrelse og alder er af betydning?

Amylases nedbrydning af stivelse

Polysaccharidet stivelse kan nedbrydes af α -amylase.

Enzymet kan ikke foretage en fuldstændig nedbrydning. Bindinger, der er terminale (dvs. placeret ude i "enden" af molekylet), eller sådanne, der støder op til en α -1,6 binding bliver ikke spaltet.

Enzymet dannes af mange forskellige organismer inklusiv Homo sapiens.

Sigma A 6211 er en α -amylase (=diastase) fra *Aspergillus oryzae* (en svamp).

(2004: Pris 250.000 units 27,20 €), pH optimum 6,9.

α -amylase kan også fås hos Erhvervsakademiet Roskilde Novozymes *Termamyl 120 L* (2004: pris 105 kr.)

Mennesker har α -amylase bl.a. i spytet, men koncentrationerne er varierende fra person til person og fra situation til situation, så forsøg med spyt falder ikke altid heldigt ud.

Formål

I forsøgene undersøger vi stivelsesnedbrydning ved α -amylase, derudover belyses nogle metoder, der kan bruges ved målinger af enzymaktiviteter.

Materialer

Spektrofotometer med dataopsamling, kuvetter, målekolber, pipetter (3mL, 20 – 200 μ L)

Stivelse-stamopløsning: 0,5 g opløselig stivelse (Sigma S 2630; : Pris 2004 100 g 19,20 €) opløses til 100 mL. Opløsningen koges

OBS! afkøles før afpipettering (den varme stivelsesopløsning vil tvinge luft ud af pipettespidsen og gøre afmålingen ukorrekt)

Lugols – iodopløsning: Laves umiddelbart før forsøget. Opbevares i brun, lukket flaske. Til 5 mL vand tilsættes 0,127 g I₂ (iodkrystaller afvejes) og 0,5 g KI (kaliumiodid). Der fyldes op til 10 mL.

α -amylase opløsning: Laves umiddelbart før brug. 75 mg α -amylase* (Sigma A 6211) opløses til 10 mL

Fastlæggelse af måleområde

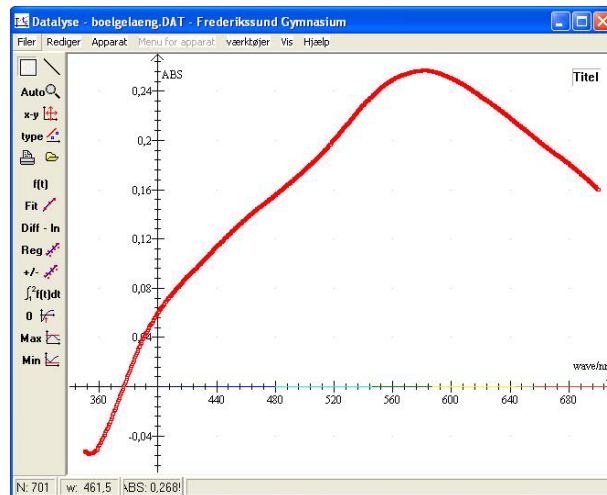
- 1) Basislinie, bølgelængdeskan (med 0-prøve)
(Hvad skal vi bruge som reference (= 0-prøve)? se evt. pkt. 2)
- 2) Spektrum bølgelængdeskan
3 mL vand + 20 μ L stivelse-stamopløsning + 20 μ L Lugols – iodopløsning blandes i en kuvette.

Hvilken bølgelængde vil være optimal til et forsøg, hvor vi måler på koncentration af stivelse, når det er blandet med Lugol's iodopløsning?

(eksempel på resultat: Se næste side)

*75 mg diastase opløses til 10 mL. 1mg = 42 U. Fra *Aspergillus oryzae*. 1U = frigør 1 mg maltose på 3 min.

Eksempel på resultat:



Standardkurve - sammenhæng mellem koncentration og farveintensitet

Et stort hold kan opdeles i et passende antal grupper, f.eks. 5.

Hver gruppe forbereder 3 mærkede bægerglas, indeholdende 10 mL vand. Bægerglasset tilsættes stivelsesstamopløsning (evt. bortpipettere først et volumen svarende til det volumen stivelsesopløsning, der skal tilsættes). Til sidst tilføjes 20 μL Lugol's iodopløsning (evt. kan man blot lave en fælles fortyndingsserie og måle på den).

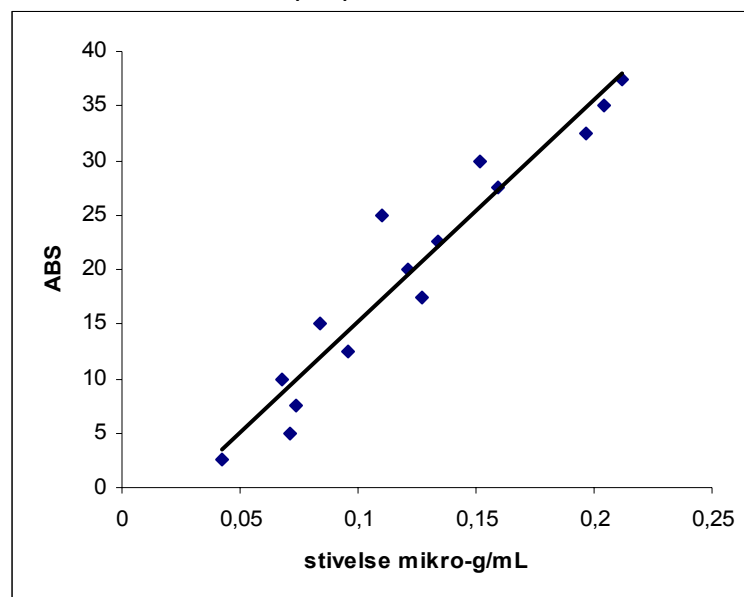
Farveintensiteterne iagttages og måles i spektrofotometer.

Fremstil et regneark til beregning af stivelseskoncentrationen $\mu\text{g/mL}$ og afbildning af absorbans som funktion af stivelseskoncentration $\mu\text{g/mL}$ (standardkurve)

Tilsat μL stivelsesstamopløsning

Glas	1	2	3
Hold 1	5	10	15
Hold 2	20	25	30
Hold 3	35	40	45
Hold 4	50	55	60
Hold 5	65	70	75

Eksempel på standardkurve



Enzymaktivitet (1)

Stil 2 stk. 50 mL bægerglas på et stykke hvidt papir.

I begge glas kommer 10 mL H₂O, 50 µL stivelses-stamopløsning og 5 µL Lugol's iodopløsning.

Til det ene glas tilsættes 200 µL vand, til det andet 200 µL enzymopløsning.

lagttag udviklingen i de 2 bægerglas.

Planlæg, hvordan vi kan foretage en spektrofotometrisk måling af den iagttagne reaktion

Hvilken reference (0-prøve) skal anvendes?

Hvilken bølgelængde skal spektrofotometeret indstilles på?

Materialer og fremgangsmåde (en råskitse)

10 mL H₂O tilsættes 5 µL JJK og 50 µL stivelsesstamopløsning.

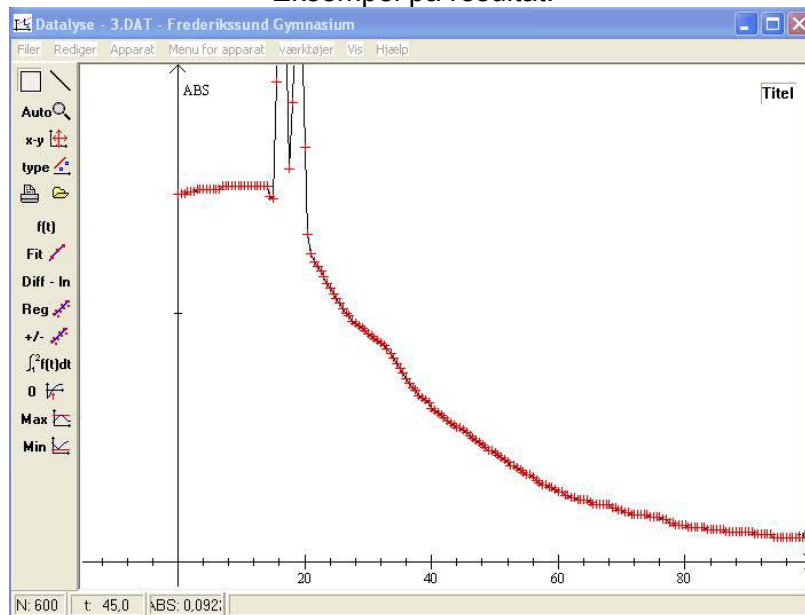
Pipetter 3 mL til en kuvette.

Indstil spektrofotometert til at måle i 10 minutter (en måling pr. sekund)

Start måling

Tilsæt 75 µL enzymopløsning. Sug straks efter indholdet op i en 3 mL engangspipette og ned i kuvetten igen. Herved blandes indholdet.

Eksempel på resultat:



Studiespørgsmål

1. Hvordan forklarer I det fundne kurveforløb?
2. Hvor meget stivelse er til stede i henholdsvis bægerglas og kuvette?
3. Hvordan kan vi bestemme ændringen i stivelsesmængden pr. tidsenhed? (Hvad udtrykker dette mål?)
4. Hvor meget maltose kan maksimalt dannes ved nedbrydningen af stivelsen?
5. Hvor lang tid er *diastasen* om, at nedbryde stivelsen?
6. Hvordan vil I beregne enzymets aktivitet?

Enzymaktivitet (2)

Opstil **et** bægerglas som angivet under "**Enzymaktivitet (1)**", dog **UDEN** Lugol's iodopløsning. Forbered en porcelænsplade (farvekar) med en dråbe Lugol's iodopløsning i hver af de små fordybninger.

Tilsæt 50 μL enzymopløsning samtidig med at et stopur startes.

Hvert 15. sekund udtages et par dråber til test for stivelse.

Hvordan forløber forsøget, sammenlignet med forsøget "**Enzymaktivitet (1)**"?

Bemærkninger

Forsøget kan nu udbygges som følger:

Volumenet i forsøg (2) ganges op til i alt 50 mL.

Der forberedes en række kuvetter (skal kunne indeholde 3 mL). I hver kuvette placeres 5 μL Lugol's iodopløsning.

Hvert 15. sekund udtages 3 mL prøve. Prøven tilsættes til glasset med Lugol's iodopløsning.

Stivelseskoncentrationen bestemmes ved standardkurve og spektrofotometermåling.

Beregn enzymets aktivitet

Studiespørgsmål

Hvordan kan vi forklare eventuelle forskelle mellem de målte reaktionshastigheder i de 2 forskellige forsøg? (find oplysninger på nettet om iods indfyldelse på enzymatiske procesforløb).

Kinetisk undersøgelse af enzymet *Lactase*

Lactase er en β -galactosidase som katalyserer hydrolyse af lactose til D-glucose og D-galactose. β -galactosidase produceres af mange forskellige organismer. De enzymer, der er i handlen, er oftest produceret af bakterier eller svampe. Til forsøg kan man f.eks. købe enzymet Sigma G 5160 fra *Aspergillus oryzae*, (2004: Pris 25.000 U 34,40 €) pH opt. 4,5, temp. opt. 30 °C. Billigere er *Enzylac** fra apoteket.

Formål

i dette forsøg er at bestemme Michaelis-Menten konstanterne V_{\max} og K_M for *lactase*.

Lactose-intolerans (eller malabsorption)

Evnen til at spalte lactose (mælkesukker) er hos nogle nedsat pga. mangel på enzymet lactase i tyndtarmen. Problemet er mest udbredt i asiatiske lande og i lande, hvor indtagelsen af mælkeprodukter er lav.

For de fleste børn med lactose-intolerans aftager evnen til selv at nedbryde lactose i 3-4 års alderen, hvilket betyder, at lactosen primært nedbrydes af bakterier i tyktarmen til organiske syrer og CO_2 . Det kan give ubehag i form af mavekrampe, luft i maven og i visse tilfælde diarré. I Danmark har 3-6 procent af befolkningen laktose-intolerans. Det ses især hos mennesker med anden etnisk baggrund end dansk.

Til at afhjælpe problemet kan man købe "*lactasedråber*" og behandle laktoseholdig føde med *lactase*, inden den spises.

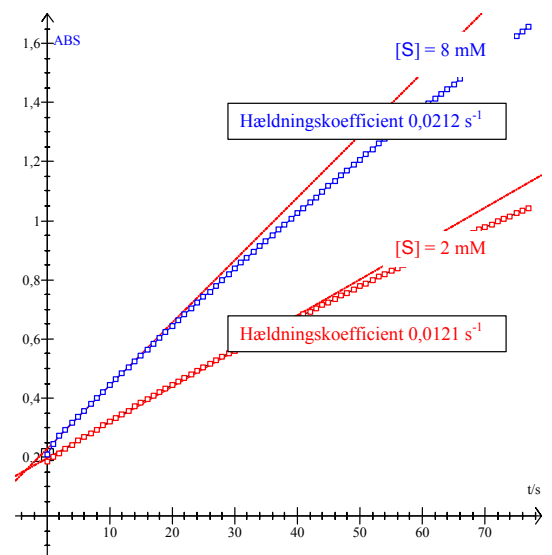


I dette forsøg vil vi bruge et syntetisk substrat: Ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG)

Hydrolyse af ONPG giver β -galactose og ortho-nitrophenolat (ONP), som er gult.

Der skal gennemføres en række forsøg med forskellige koncentrationer af substratet ONPG. Dannelsen af ONP følges ved at måle reaktionsblandingens absorbans ved 420 nm, hvor det dannede ONP absorberer mere end andre stoffer i reaktionsblandingen.

Absorbans ved 420 nm afbildes som funktion af tiden. Initialhastigheden i hvert forsøg ud fra tangentens hældningskoefficient.



* Information om Enzylac: <http://www.apotekernes.dk/Helium.dll?ID=959>

Enzylac produceres af gærsvampen *Kluyveromyces lactis*. Enzymet har $K_M = 2,5$ [mM] (der findes flere isomere former af enzymet med forskellige K_M -værdier), temp. opt. 35 °C, pH opt. 7

Materialer

Ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG, MW 301,3). Opløsning i vand, $c = 20\text{mM}$. Opløsningen er holdbar nogle dage i køleskab. Længere holdbarhed i dybfryser.

ONPG Sigma N 1127. (2004: Pris 500 mg 13,80 €)

(Ved at anvende halvmikro kuvetter kan man skære ned på mængderne og spare på det ret dyre substrat)

Phosphatpuffer pH = 7 (Anvendes en anden β -galactosidase, skal pufferen ændres, f.eks. vil en acetat puffer med pH 4,5 være passende til lactase fra *Aspergillus oryzae*)

Lactasedråber *Enzylac* kan købes på apoteker. Produktet kan opbevares i årevis i køleskab. Enzylac fortyndes med vand for at opnå en passende reaktionshastighed: 5 dråber i 5 mL vand som udgangspunkt, justeres efter produktets alder.

Spektrofotometer, PC, programmet Datalyse eller andet program til dataopsamling.

Automatpipetter 100 μL , 1000 μL , 5000 μL .

Fremgangsmåde

Spektrofotometer indstilles til 420 nm og nulstilles på opløsning nr. 5 dog **uden** tilsat enzym, se blandeskema nedenfor.

Stamopløsning af substrat S og pufferopløsning P afmåles med pipetter direkte i kuvetter, se blandeskema nedenfor. Umiddelbart før måling tilsættes 100 μL enzymopløsning og der blandes, hvorefter absorbansen straks måles som funktion af tiden. Efter 100 sekunder skulle der være tilstrækkeligt med data og målingen kan gemmes.

Blandeskema til 3 mL kuvetter fra regnearket enzymkinetik_onpg.xls *

Enzymkinetik med lactase og ONPG

konc. ONPG stamopløsning	20 mM
samlet volumen	
analyse	3000 μL
molar absorbans ONP v. 420 nm	4500 1/(M cm)

nr	S-stam / μL	puffer/ μL	Enzym/ μL	[S] / mM	Absorbans hældning Datalyse	[S] / mM	v / $\mu\text{M}/\text{min}$
1	30	2870	100	0,2	0,00200	0,2	27
2	90	2810	100	0,6	0,00682	0,6	91
3	150	2750	100	1,0	0,00793	1,0	106
4	300	2600	100	2,0	0,01317	2,0	176
5	450	2450	100	3,0	0,01427	3,0	190
6	600	2300	100	4,0	0,01588	4,0	212
7	900	2000	100	6,0	0,01853	6,0	247
8	1200	1700	100	8,0	0,02018	8,0	269
9	1500	1400	100	10,0	0,02190	10,0	292

* Regnearket kan findes på adressen <http://www.emu.dk/gym/tvaers/biotek/uv/uv.html>

Databehandling

Steady state initialhastighed bestemmes ud fra tangentens hældningskoefficient. Sammenhørende værdier af substratkoncentration og steady state initialhastighed afbildes. Konstanterne K_M og V_{max} bestemmes ved at tilpasse en Michaelis-Menten kurve til eksperimentelle data vha. et regneark (se fodnote side 20)

Studiespørgsmål

1. Opskriv hydrolysereaktionen med strukturformler
2. Giv en begrundelse for at der dannes o-nitrophenolat (ikke o-nitrophenol)
3. Gennemfør et gennemregnet eksempel på databehandling (foruden anvendelse af regneark)
4. Forklaring af betydningen af konstanterne K_M og V_{max}
5. Lactase er klassificeret med nummeret EC 3.2.1.23
Forklar hvad der ligger i nummeret
6. Et alternativt navn for lactase er "Exo-(1-4)-beta-D-galactanase".
Forklar hvad der ligger i dette navn.

Bemærkning

Forsøget "**Kinetisk undersøgelse af enzymet Lactase**" kan udbygges, idet vi introducerer en enzymhæmning.

Man kan benytte methyl β -D-thiogalactosid (TMG, konc. i reaktionsblanding $c = 15$ mM) eller/og methyl β -D-galactopyranosid (MPG, konc. i reaktionsblanding $c = 3$ mM)

TMG; Sigma M 8146 (2004: Pris 250 mg 63,50 €)

MPG, Sigma M 1379 (2004: Pris 1 g 25,90 €)

-eller den noget billigere løsning β - lactose. Sigma L 1768 (2004: Pris 1 kg. 34,80 €)

Sammenlignet med ONPG binder Lactose væsentlig svagere til enzymet.

Formål

I dette forsøg undersøges introduktionen af en hæmmer (inhibitor) i et enzymatisk procesforløb.

Materialer

Lactose stamopløsning. Bemærk ved afvejning om der benyttes lactose eller lactose monohydrat.

Der laves 10 mL, $c = 1,2$ M

(se i øvrigt forsøget "**Kinetisk undersøgelse af enzymet Lactase**")

Enzymkinetik med lactase, ONPG og lactose

conc. lactose stamopløsning	1,2 M
conc. ONPG stamopløsning	20 mM
samlet volumen	
analyse	3000 μ L
molar absorbans ONP v. 420 nm	4500 1/(M cm)

Der tilsættes 500 μ L lactose pr. glas (puffer-volumen nedsættes tilsvarende 500 μ L pr. glas)

Proceduren er som tidligere anført.

Bestem K_M og V_{max} .

Databehandling

Steady state initialhastighed bestemmes ud fra tangentens hældningskoefficient. Sammenhørende værdier af substratkoncentration og steady state initialhastighed afbildes. Konstanterne K_M og V_{max} bestemmes ved et regneark (se fodnote p. 20. Regnearket tilpasses svarende til dette forsøg).

Studiespørgsmål

1. Hvilken lactose koncentration har vi i kuvetterne?
2. Sammenlign koncentration af ONPG og lactose i kuvetterne.
Hvorfor har vi valgt disse forskellige niveauer?
3. Forklar de ændrede værdier af K_M og V_{max} .
Hvilken type hæmning er der tale om?

Sweetzyme

Sweetzyme (handelsnavn) er et enzym, der omdanner glukose til fructose.

I industrien bruges *sweetzyme* som et redskab i omdannelsen af stivelse til fruktosesirup.

I levnedsmiddelindustrien anvendes HFCS (high fructose corn syrup) f.eks. til at søde læskedrikke.

Enzymet kan fås hos Erhvervsakademiet Roskilde: Novozymes *Sweetzyme IT* (2004: pris 105 kr.)

Enzymet er immobiliseret, og leveres som små cylinderformede granula, der kan pakkes i en søjle.

Enzymet stammer fra *Streptomyces murinus* (en svamp). Det har pH-optimum ved ca. 7,5 og temperaturoptimum ved 55-60° C.

Industrielt får man en ligevægtsblanding hvor ½ er fructose, men det er ved meget højere koncentrationer end vi arbejder med, i dette forsøg skal vi nok forvente en lavere omdannelsesgrad.

Formål

Formålet med forsøget er at bestemme effektivitetsgraden af enzymet *Sweetzymes* omdannelse af glucose til fructose.

Materialer

Varmeplade, peristaltikpumpe med slange, diverse målebægre, termometer, kolonne (injektions-sprøjte 10 mL + filterskive), stativ med holder, pH-meter, spektrofotometer, kuvetter, reagensglas, målekolber (200 mL), pipetter (3 mL, 20 µL).

Glucoseopløsning, $c = 200\text{mM}$: (7,93 g Glucosemonohydrat, 44,56 mg MgSO_4 ($\approx 9\text{ mg Mg}^{2+}$), 10 mL Pufferopløsning pH 7,5, demineraliseret vand op til 200 mL).

Fructoseopløsning, $c = 220\text{mM}$: (Samme blandingsforhold som ved glucoseopløsningen, blot med fructose i stedet for glucosemonohydrat).

Selivanoffs reagens: (50 mg 1,3-benzendiol i 100 mL 4M HCl). Holdbar få dage i køleskab. Selivanoffs test bruges til at skelne mellem aldo- og ketohexoser. Ketohexoser og Selivanoffs reagens giver en rødlig farve ved opvarmning.

Fremgangsmåde

Dagen før forsøget:

Pufferopløsning pH 7,5 fremstilles.

Fructose- og glucoseopløsninger fremstilles og sættes på køl.

Der afmåles ca. 5 mL enzym. Enzymet sættes i blød i pufferopløsningen og stilles i køleskab.

Forsøgsdag

Opløsningerne: Selivanoffs reagens fremstilles efter anvisningerne i kemikalieafsnittet.

Bølgelængdescan og standardkurve:

Spektrofotometeret 0-stilles på en ren Selivanoffs reagens (3 mL).

20µL fructoseopløsning tilsættes 3 mL Selivanoff og placeres i kogende vandbad i 5 min. Farven har nu skiftet fra klar til rødlig. På denne opløsning foretages et bølgelængdescan, ud fra hvilken, vi kan fastlægge måleområdet. Dette forventes at ligge i nærheden af 486nm.

Der fremstilles en *standardkurve*. Brug fructoseopløsningen til at fremstille en fortyndingsserie.

20µL af de forskellige nye fructoseopløsninger tilsættes hver 3 mL Selivanoffs reagens. Der opvarmes igen 5 min. Absorbansen for hver opløsning bestemmes. Målingerne afbildes med absorbansen som funktion af fructosekoncentrationen.

Forsøgsopstillingen: Kolonnen pakkes med ca. 5 mL "afdryppet" enzym. Glucoseopløsningen opvarmes og placeres i vandbad til ca. 60° C, herfra pumpes glucosen gennem kolonnen. Pumpen indstilles til en passende gennemstrømningshastighed (flow på 3-4 mL/min.). Fra kolonnen opsamles "gennemstrømningsvæsken" i et bægerglas. Den opsamlede væske testes med Selivanoffs reagens.

OBS! Det første produkt, der drypper ud, kan være misfarvet af farve fra "enzymgranula" – det kasseres da.

Når en passende mængde glucose er løbet igennem kolonnen (20 mL er nok), opvarmes 3 mL Selivanoff tilsat 20 μ L produkt i ca. 5 min., og absorbansen måles.

Databehandling

Ud fra standardkurven kan man finde, hvor meget fructose, der er dannet, og derved bestemme enzymets omdannelseseffektivitet.

Studiespørgsmål

1. Opskriv reaktionsskema (strukturformler) for enzymets omdannelse af glucose til fructose
2. Hvorfor kan man, i levnedsmiddelindustrien, have et ønske om at omdanne glucose til fructose?
3. Skriv formler for de 2 saccharider på kædeform, og gør rede for deres indhold af funktionelle grupper.
4. Angiv det systematiske navn for enzymet "Sweetzyme"
5. Hvorfor tilsætter vi Mg^{2+} -ioner til sukkeropløsningen?
6. Sammenlign den fundne omdannelseseffektivitet med den af Novozymes angivne (anfør samtlige beregninger).