

TBT4102 Biokjemi 2

Oppgave 3: Enzymkinetikk for β -galaktosidase

Gruppe 20

Katrine Bringe, Lene Brattsti Dypås og Ove Øyås

NTNU, 29. februar 2012

Innhold

Sammendrag	3
1. Teori	3
1.1. β -galaktosidase	3
1.2. Enzymkinetikk	3
1.3. Enzymaktivitet som funksjon av temperatur og pH	5
2. Eksperimentelt	6
3. Resultater	6
3.1. K_M og V_{max} for β -galaktosidase	6
3.2. Temperatureffekt for β -galaktosidase	9
3.3. pH-optimum for β -galaktosidase	9
4. Diskusjon	10
5. Konklusjon	11
A. Bestemmelse av K_M og V_{max} for β-galaktosidase	13
B. Bestemmelse av temperatureffekt for β-galaktosidase	18
C. Bestemmelse av pH-optimum for β-galaktosidase	19
D. B-spørsmål	25

Sammendrag

I dette forsøket ble enzymkinetikken til β -galaktosidase fra *Escherichia coli*, stamme K12, undersøkt. ONPG ble brukt som substrat og enzymaktiviteten ble målt ved forskjellige temperaturer, pH og substratkonsentrasjoner. Temperatur- og pH-optimum, og parametrene K_M (Michaelis-Menten-konstanten) og V_{max} (maksimal initiell reaksjonshastighet) ble bestemt.

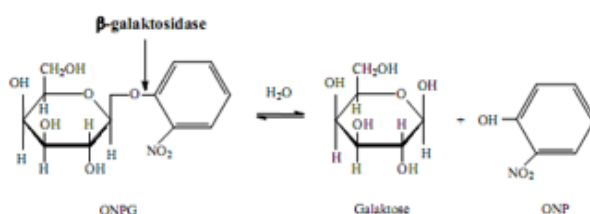
Temperaturoptimum ble funnet til å være 40 °C og pH-optimum ble funnet til å være 7,4. Beregnet verdi for K_M ble ca. 0,22 $\mu\text{mol/mL}$ og beregnet verdi for V_{max} ble ca. 0,75 $\mu\text{mol/min}$.

1. Teori

1.1. β -galaktosidase

All teori er hentet fra kursheftet [1].

Enzymet som brukes i denne oppgaven er β -galaktosidase, et enzym som katalyserer hydrolyse av β -galaktosider. Menneskers analog til dette enzymet er laktase, som katalyserer spalting av β -galaktosidet laktose. I forsøket brukes β -galaktosidet o-nitrophenyl- β -D-galaktopyranoside (ONPG). Ved hydrolyse med β -galaktosidase blir ONPG spaltet til galaktose og o-nitro-phenol (ONP). ONP omdannes til en kromofor slik at mengden kan måles ved spektrofotometri. Figur 1.1.1 viser reaksjonsligningen for hydrolyse av ONPG.



Figur 1.1: β -galaktosidase-katalysert hydrolyse av ONPG til galaktose og ONP.

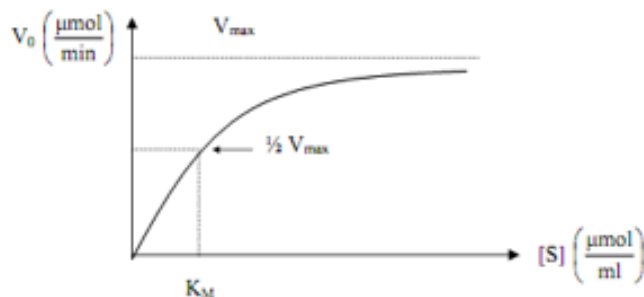
1.2. Enzymkinetikk

Michaelis-Menten-ligningen er gitt i ligning (1.1) og gir sammenhengen mellom initiell reaksjonshastighet, V_0 , og substratkonsentrasjonen, $[S]$.

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{\frac{k_2+k_{-1}}{k_1} + [S]} = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad (1.1)$$

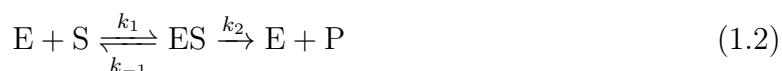
Ligningen bruker initiell reaksjonshastighet fordi mengden substrat vil endre seg etter hvert som reaksjonen går og slik påvirke hastigheten. Helt i starten derimot, er substratmengden kjent.

I ligning (1.1) er k_1 , k_{-1} , og k_2 hastighetskonstanter for reaksjonen i ligning (1.2). V_{max} er maksimal initiell reaksjonshastighet. Denne hastigheten inntreffer når enzymet er fullstendig "mette" med substrat, slik at det ikke kan jobbe raskere. K_M kalles Michaelis-Menten-konstanten og er substratkonsentrasjonen som gir halvparten av den maksimale initielle reaksjonshastigheten. Figur 1.2 viser et plot for Michaelis-Menten ligningen, hvor initiell reaksjonshastighet er plottet som en funksjon av substratkonsentrasjonen.



Figur 1.2: Initiell reaksjonshastighet plottet som funksjon av substratkonsentrasjon. Grafen er gjeldende for enzym-katalyserte reaksjoner som følger Michaelis-Menten ligningen.

En forutsetning for Michaelis-Menten-ligningen er at katalysereaksjonen følger ligning (1.2). Enzym (E) og substrat (S) danner først et enzym-substrat kompleks (ES), som så omdannes til produkt (P) og fritt enzym:



En annen forutsetning er at systemet er ved "steady-state", hvor konsentrasjonen av ES er konstant. Det er også antatt at det hastighetsbestemmende steget er reaksjonen fra ES-komplekset til produkt og fritt enzym.

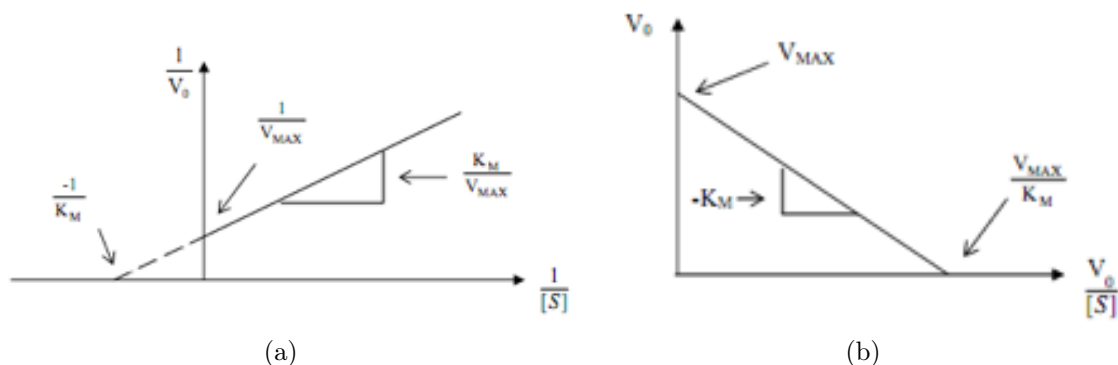
Omskriving av Michaelis-Menten ligningen gir den på former som gjør det lettere å bestemme V_{max} og K_M grafisk. Ligning (1.3) gir en lineær utgave som kalles et Lineweaver-Burk plott.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} \quad (1.3)$$

Et plott av $1/V_0$ som funksjon av $1/[S]$ vil gi en lineær graf som skjærer y-aksen i $1/V_{max}$ og har stigningstall lik den negative verdien av $1/K_M$. Figur 1.3a viser et Lineweaver-Burk-plott.

En annen mulighet er å bruke et Eadie-Hofstee-plott. Ligningen for dette plottet er funnet ved å multiplisere ligning (1.3) med $V_0 V_{max}$:

$$V_0 = V_{max} - \frac{K_M V_0}{[S]} \quad (1.4)$$

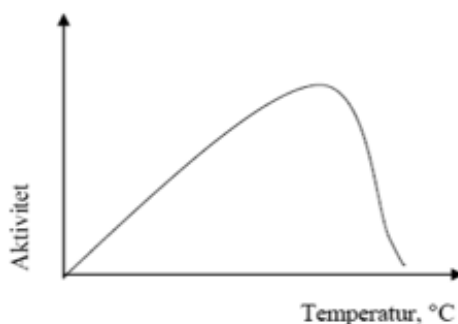


Figur 1.3: (a) Lineweaver-Burk-plott og (b) Eadie-Hofstee-plott for grafisk bestemmelse av V_{max} og K_M

Et plott av V_0 som funksjon av $V_0/[S]$ gir en lineær graf som skjærer y-aksen i V_{max} og har stigningstall lik den negative verdien av K_M . Et Eadie-Hofstee-plott er vist i Figur 1.3b.

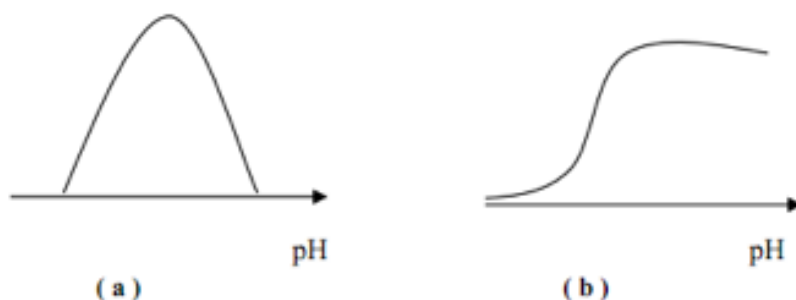
1.3. Enzymaktivitet som funksjon av temperatur og pH

Temperatures innvirkning på enzymaktiviteten avhenger av blant annet pH, buffersystem og substratkonsentrasjon. I hovedsak vil økende temperatur øke enzymaktiviteten, opp til en bestemt temperatur. Dette skyldes at økende temperatur fører til at substrat kolliderer med aktivt sete på enzymet oftere [2], og flere substratmolekyler blir omdannet til produkt per tidsenhet. Ved en bestemt temperatur vil enzymet begynne å denatureres, slik at den totale aktiviteten nedsettes. Denatureringen skyldes at de svake interaksjonene som opprettholder enzymets tertiærstruktur brytes. Det temperaturområdet hvor den maksimale reaksjonshastigheten oppnås, kalles enzymets optimumtemperatur. Et eksempel på temperatures innvirkning på enzymets aktivitet er vist i Figur 1.4.



Figur 1.4: Enzymaktivitet som funksjon av temperatur.

De fleste enzymer har et pH-optimum, hvor enzymaktiviteten er høyest. Virkningen av pH avhenger av hvilket enzym det er snakk om, og av reaksjonsbetingelsene. pH virker



Figur 1.5: Innvirkning av pH på enzymene (a) trypsin og (b) cholinesterase.

inn på ioniseringen av enzymet, noe som kan endre de ioniske bindingene som er med på å bestemme enzymets tertiærstruktur [3]. pH-optimum er ofte i det fysiologiske området. Innvikning av pH på enzymene trypsin og cholinesterase er vist i Figur 1.5.

2. Eksperimentelt

Forsøket ble utført som beskrevet i kursheftet [1] med unntak av at utdelt enzymløsning ble fortynnet 1:25 i destillert vann.

3. Resultater

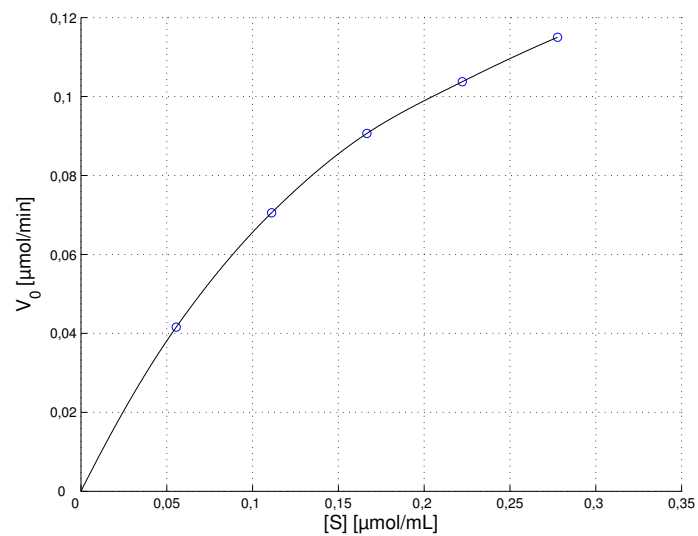
3.1. K_M og V_{max} for β -galaktosidase

Initiell reaksjonshastighet, V_0 , ble bestemt fra absorpsjonsmålinger for fem ulike ONPG-konsentrasjoner ved hjelp av dataprogrammet Reaction Kinetics. Et Michaelis-Menten-plott av initiell reaksjonshastighet mot substratkonsentrasjon er vist i Figur 3.1. I Figur 3.2 og Figur 3.3 vises henholdsvis Lineweaver-Burk- og Eadie-Holstee-plott basert på målte data for enzymkinetikk.

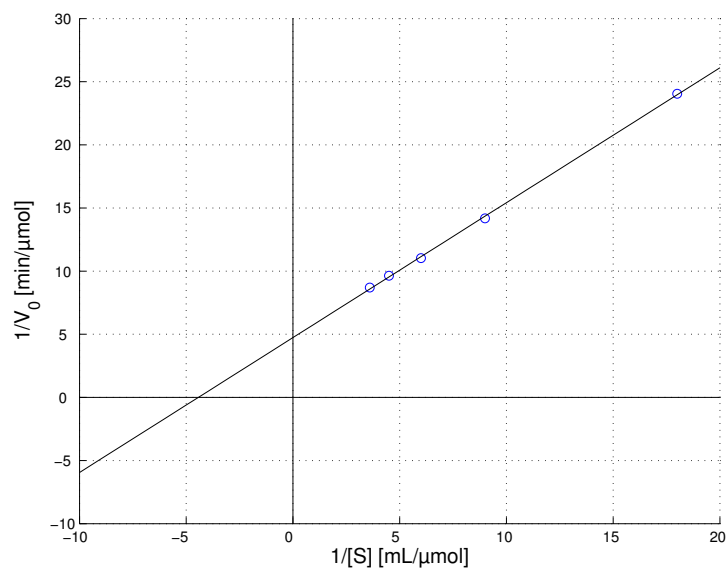
Verdier for K_M og V_{max} ble bestemt fra Lineweaver-Burk- og Eadie-Hofstee-plottene og er oppgitt i Tabell 3.1.

Tabell 3.1: Verdier for K_M og V_{max} funnet fra Lineweaver-Burk- og Eadie-Hofstee-plott.

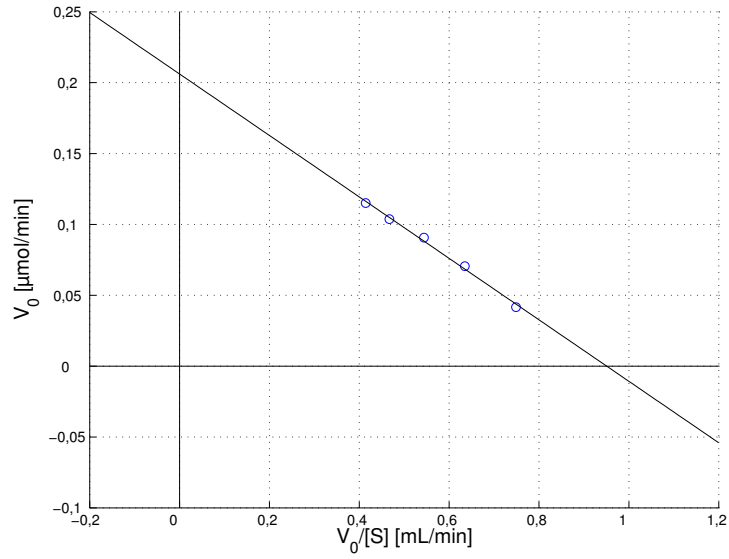
Metode	K_M [$\mu\text{mol/mL}$]	V_{max} [$\mu\text{mol/min}$]
Lineweaver-Burk	0,2256	0,2112
Eadie-Hofstee	0,2168	0,2061
Gjennomsnitt	0,2212	0,2087



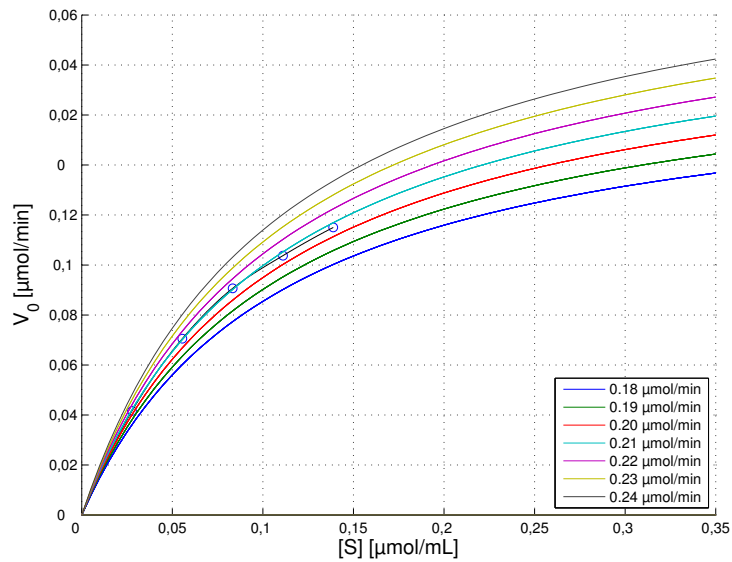
Figur 3.1: Michaelis-Menten-plott av initiell reaksjonshastighet, V_0 , mot substratkonsentrasjon, $[S]$, med interpolert kurve.



Figur 3.2: Lineweaver-Burk-plott. $1/[S]$ er plottet mot $1/V_0$ og kurve funnet ved lineær regresjon.



Figur 3.3: Eadie-Hofstee-plott. $V_0/[S]$ er plottet mot V_0 og kurve funnet ved lineær regresjon.

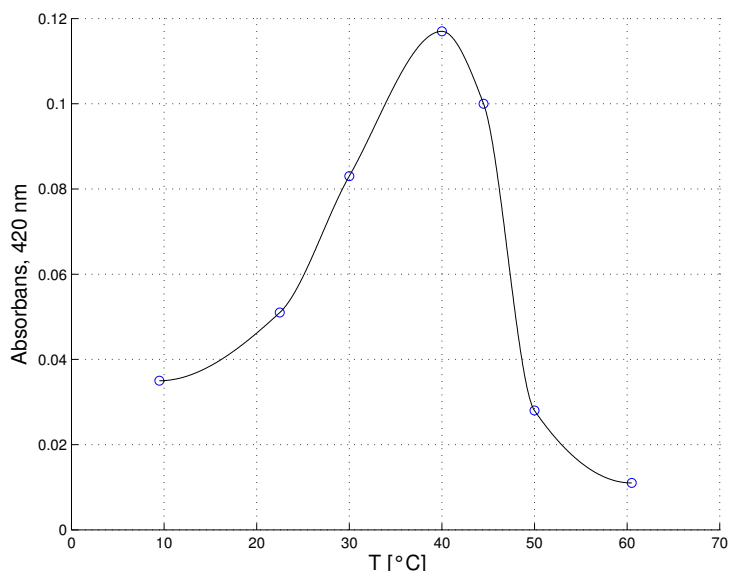


Figur 3.4: Michaelis-Menten-kurver for $K_M = 0,2212 \mu\text{mol/mL}$ og ulike verdier av V_{max} . Michaelis-Menten-kurve basert på målte data er også inkludert for sammenligning.

Michaelis-Menten-kurver beregnet ved innsetting av ulike verdier av V_{max} i ligning (1.1) viste godt samsvar mellom Michaelis-Menten-kurven som ble framstilt fra målte data og en kurve med $V_{max} = 0,21 \mu\text{mol/min}$. Dette er vist i Figur 3.4. Gjennomsnittsverdien for K_M gitt i Tabell 3.1 ble benyttet i framstillingen av samtlige kurver.

3.2. Temperatureffekt for β -galaktosidase

Absorbans ved 420 nm ble målt for syv ulike temperaturer med fast konsentrasjon av ONPG. Dette ga en sammenheng mellom enzymaktivitet og temperatur. Temperaturavhengighet for enzymaktiviteten til β -galaktosidase er vist i et plott av absorbans ved 420 nm mot reaksjonstemperatur i Figur 3.5.



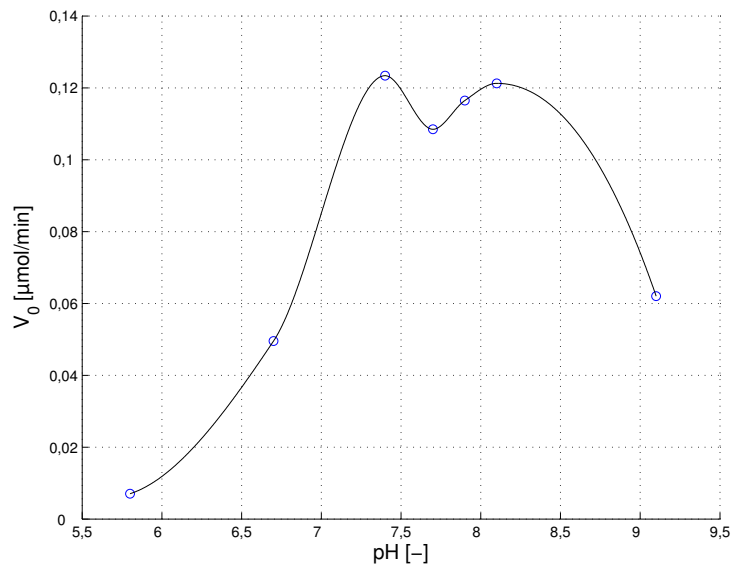
Figur 3.5: Plott av absorbans ved 420 nm mot reaksjonstemperatur, T , med kurve bestemt ved interpolasjon.

Av grafen kan det ses at absorbansen, og dermed enzymaktiviteten, var høyest for målingen som ble utført ved 40 °C.

3.3. pH-optimum for β -galaktosidase

Initiell reaksjonshastighet, V_0 , ble bestemt fra absorbansmålinger for syv ulike pH-verdier ved hjelp av dataprogrammet Reaction Kinetics. Innvirkning av pH på reaksjonshastigheten er vist i et plott av pH mot initiell reaksjonshastighet i Figur 3.6.

Målingen utført ved $\text{pH} = 7,4$ ga høyest initiell reaksjonshastighet, noe som indikerer maksimal enzymaktivitet omkring denne pH-verdien. En noe lavere absorbanstopp ved målepunktet for $\text{pH} = 8,1$ kan også observeres.



Figur 3.6: Plott av pH mot initiell reaksjonshastighet, V_0 .

4. Diskusjon

Litteraturverdien for temperaturoptimum er på 37 °C [4], mens verdien funnet fra forsøket er 40 °C. Disse verdiene samsvarer svært bra, tatt i betraktning at 40 °C er målepunktet som ligger nærmest 37 °C. Bruk av flere målinger i dette temperaturområdet ville gitt et mer nøyaktig resultat.

pH-optimum funnet fra forsøket er 7,4 og litteraturverdien er 7,2-7,3 [4]. Verdien fra forsøket ligger svært nær faktisk verdi for enzymet. Litteraturverdien gjelder for 30 °C, mens temperaturen under forsøket ikke ble målt. Denne temperaturforskjellen vil kunne gi utslag i enzymaktiviteten og gi avvik. pH = 7,4 er det målepunktet som ligger nærmest litteraturverdien, så bruk av flere målepunkter i dette området kunne gitt et annet resultat.

Beregnete verdier for K_M ble 0,2256 $\mu\text{mol}/\text{mL}$, 0,2168 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ og 0,2212 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ved bruk av henholdsvis Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee og Michaelis-Menten. De tre metodene gav meget likt resultat. Litteraturverdien er på 0,95 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ [4] og stemmer dårlig overens med resultatene fra forsøket. Den eneste reaksjonsbetingelsen som er oppgitt for litteraturverdien er at reaksjonen kjøres i fravær av NaCl, og kan derfor gjelde for andre betingelser enn forsøket ble utført ved.

Beregnete verdier for V_{max} ble 0,2112 $\mu\text{mol}/\text{min}$, 0,2061 $\mu\text{mol}/\text{min}$ og 0,21 $\mu\text{mol}/\text{min}$ ved bruk av henholdsvis Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee og Michaelis-Menten. De tre metodene gav svært like verdier for V_{max} . Litteraturverdien for V_{max} er 360 $\mu\text{mol}/\text{mL}/\text{mg}$ enzym [5]. Denne verdien kan ikke sammenlignes med beregnet verdi, da mengde enzym ikke er kjent i forsøket.

5. Konklusjon

Temperaturoptimum ble funnet til å være 40 °C og pH-optimum ble funnet til å være 7,4. Disse verdiene stemmer godt overens med litteraturverdiene.

Beregnet verdi for K_M ble ca. 0,22 $\mu\text{mol/mL}$ og beregnet verdi for V_{max} ble ca. 0,21 $\mu\text{mol/min}$. K_M stemmer dårlig overens med litteraturverdien, mens V_{max} ikke kan sammenlignes grunnet ukjent mengde enzym.

Trondheim, 29. februar 2012.

Lene Brattsti Dypås

Katrine Bringe

Ove Øyås

Litteratur

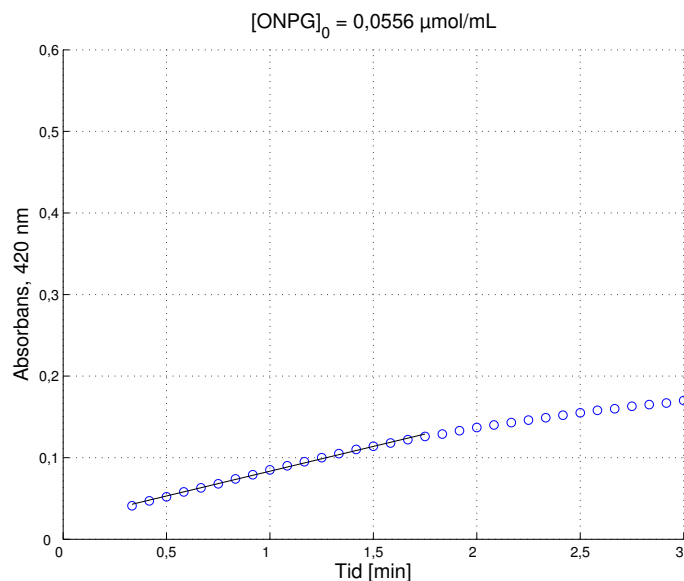
- [1] Kurshefte (2012), *Laboratoriekurs i TBT4107 Biokjemi 2*, NTNU, Trondheim.
- [2] *The effect of temperature on enzyme activity* [online]. Kilde: Brooklyn College. Tilgjengelig fra http://academic.brooklyn.cuny.edu/biology/bio4fv/page/enz_act.htm [Hentet 20. februar 2012]
- [3] *The effect of pH on enzyme activity* [online]. Kilde: Brooklyn College. http://academic.brooklyn.cuny.edu/biology/bio4fv/page/ph_and_.htm [Hentet 20. februar 2012]
- [4] *Beta-galactosidase* [online]. Kilde: BRENDA. <http://www.brenda-enzymes.org/literature/lit.php4?e=3.2.1.23&r=171273> [Hentet 20. februar 2012]
- [5] *Beta-galactosidase* [online]. Kilde: Uniprot. <http://www.uniprot.org/uniprot/P00722> [Hentet 20. februar 2012]

A. Bestemmelse av K_M og V_{max} for β -galaktosidase

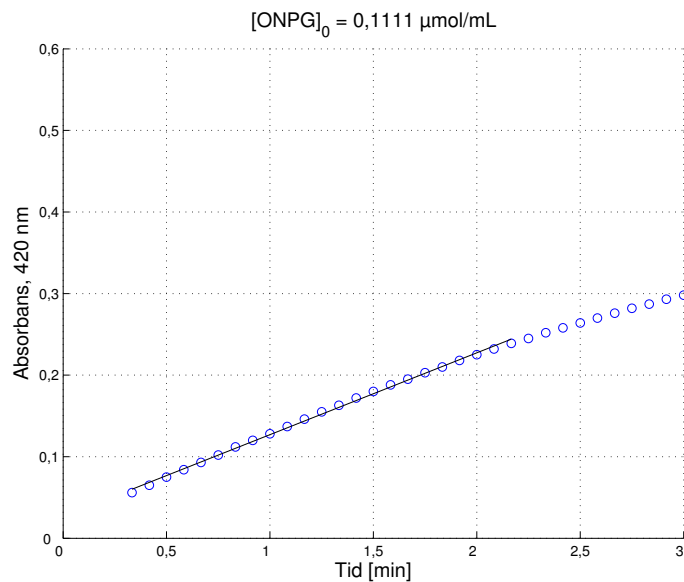
Tabell A.1: Verdier for absorbans ved 420 nm for ulike initielle konsentrasjoner av ONPG, $[\text{ONPG}]_0$, målt over et tidsrom på 3 minutter.

Tid [min]	Absorbans, 420 nm				
	$[\text{ONPG}]_0 =$	$[\text{ONPG}]_0 =$	$[\text{ONPG}]_0 =$	$[\text{ONPG}]_0 =$	$[\text{ONPG}]_0 =$
	0, 0556 [$\mu\text{mol/mL}$]	0, 1111 [$\mu\text{mol/mL}$]	0, 1667 [$\mu\text{mol/mL}$]	0, 2222 [$\mu\text{mol/mL}$]	0, 2778 [$\mu\text{mol/mL}$]
0,33	0,041	0,056	0,063	0,069	0,073
0,42	0,047	0,065	0,074	0,085	0,087
0,50	0,052	0,075	0,085	0,098	0,101
0,58	0,058	0,084	0,097	0,110	0,114
0,67	0,063	0,093	0,108	0,122	0,128
0,75	0,068	0,102	0,119	0,134	0,141
0,83	0,074	0,112	0,130	0,147	0,155
0,92	0,079	0,120	0,141	0,159	0,169
1,00	0,085	0,128	0,152	0,172	0,182
1,08	0,090	0,137	0,163	0,184	0,197
1,17	0,095	0,146	0,174	0,196	0,211
1,25	0,100	0,155	0,185	0,208	0,225
1,33	0,105	0,163	0,195	0,220	0,238
1,42	0,110	0,172	0,206	0,232	0,251
1,50	0,114	0,180	0,217	0,244	0,265
1,58	0,118	0,188	0,228	0,257	0,279
1,67	0,122	0,195	0,237	0,270	0,292
1,75	0,126	0,203	0,248	0,283	0,305
1,83	0,129	0,210	0,258	0,294	0,319
1,92	0,133	0,218	0,268	0,306	0,332
2,00	0,137	0,225	0,278	0,318	0,346
2,08	0,140	0,232	0,287	0,328	0,360
2,17	0,143	0,239	0,296	0,341	0,372
2,25	0,146	0,245	0,306	0,352	0,385
2,33	0,149	0,252	0,315	0,364	0,397
2,42	0,152	0,258	0,325	0,375	0,410
2,50	0,155	0,264	0,334	0,387	0,424
2,58	0,158	0,270	0,342	0,397	0,435
2,67	0,160	0,276	0,351	0,407	0,448
2,75	0,163	0,282	0,359	0,419	0,461
2,83	0,165	0,287	0,367	0,429	0,473
2,92	0,167	0,293	0,377	0,438	0,485
3,00	0,170	0,298	0,384	0,450	0,497

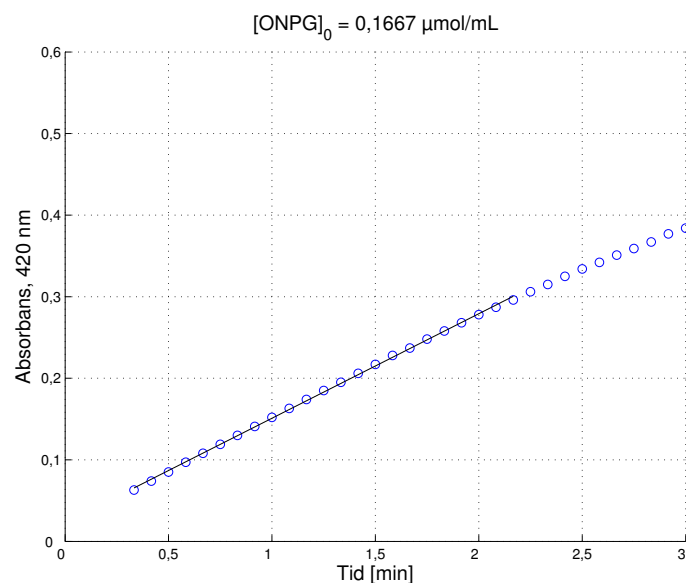
Sammenhengen mellom målte absorbansverdier og tid gitt i Tabell A.1 er vist for ulike initielle konsentrasjoner av ONPG i Figur A.1-Figur A.5.



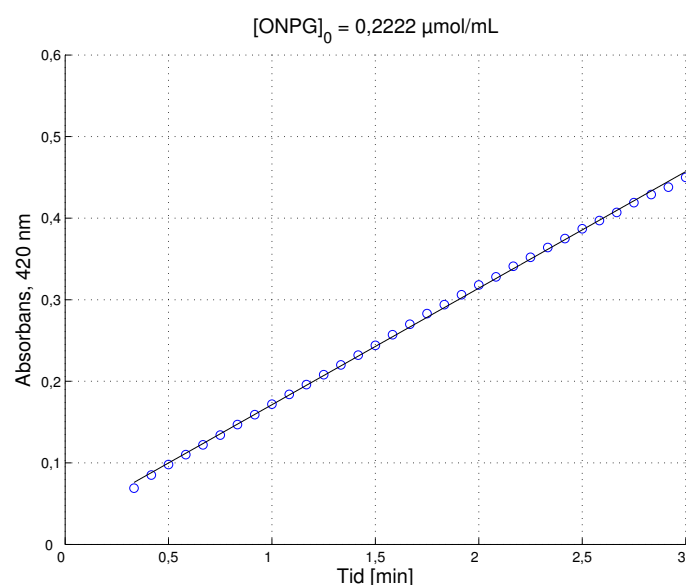
Figur A.1: Målte absorbansverdier som funksjon av tid for initieell ONPG-konsentrasjon $[\text{ONPG}]_0 = 0,0556 \mu\text{mol/mL}$. Lineær regresjon ga linjen $y = 0,0608x + 0,0226$ med bestemmelseskoeffisient $R^2 = 0,99741$. En del av de siste datapunktene er utelatt fra regresjonen for å oppnå større grad av linearitet.



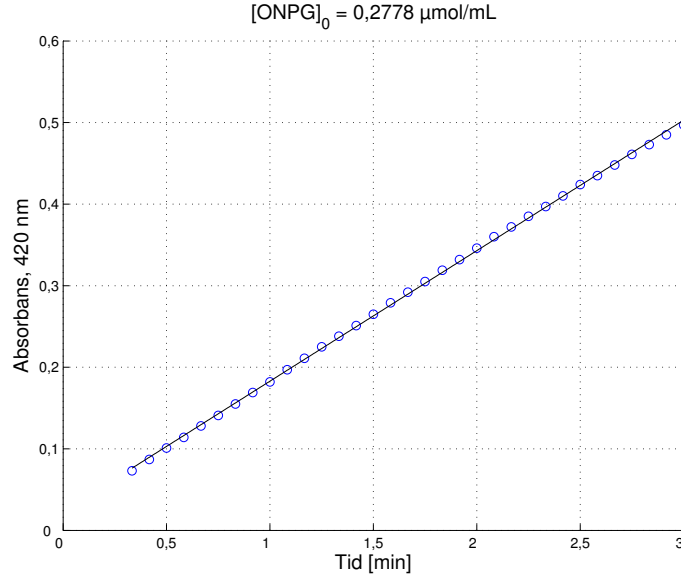
Figur A.2: Målte absorbansverdier som funksjon av tid for initieell ONPG-konsentrasjon $[\text{ONPG}]_0 = 0,1111 \mu\text{mol/mL}$. Lineær regresjon ga linjen $y = 0,1003x + 0,0267$ med bestemmelseskoeffisient $R^2 = 0,99810$. En del av de siste datapunktene er utelatt fra regresjonen for å oppnå større grad av linearitet.



Figur A.3: Målte absorbansverdier som funksjon av tid for initiell ONPG-konsentrasjon $[\text{ONPG}]_0 = 0,1667 \mu\text{mol/mL}$. Lineær regresjon ga linjen $y = 0,1281x + 0,0228$ med bestemmelseskoeffisient $R^2 = 0,99940$. En del av de siste datapunktene er utelatt fra regresjonen for å oppnå større grad av linearitet.



Figur A.4: Målte absorbansverdier som funksjon av tid for initiell ONPG-konsentrasjon $[\text{ONPG}]_0 = 0,2222 \mu\text{mol/mL}$. Lineær regresjon ga linjen $y = 0,1429x + 0,0284$ med bestemmelseskoeffisient $R^2 = 0,99926$.



Figur A.5: Målte absorbansverdier som funksjon av tid for initiell ONPG-konsentrasjon $[\text{ONPG}]_0 = 0.0556 \mu\text{mol/mL}$. Lineær regresjon ga linjen $y = 0,1600x + 0,0229$ med bestemmelseskoeffisient $R^2 = 0,99964$.

ONPG-konsentrasjon etter fortynning, $[\text{ONPG}]_0$, ble beregnet fra

$$[\text{ONPG}]_0 = \frac{V_{\text{ONPG},0}[\text{ONPG}]_{\text{utdelt}}}{V_{\text{tot}}} \quad (\text{A.1})$$

der $[\text{ONPG}]_{\text{utdelt}}$ er konsentrasjonen av ONPG i utdelt løsning før fortynning, V_{ONPG} er volum ONPG-løsning tilsatt og V_{tot} er totalt volum. Med $V_{\text{ONPG}} = 0,2 \text{ mL}$, $[\text{ONPG}]_{\text{utdelt}} = 2,5 \mu\text{mol/mL}$ og $V_{\text{tot}} = 9 \text{ mL}$ gir dette for eksempel

$$[\text{ONPG}]_0 = \frac{2,5 \cdot 0,2}{9} = 0,056 \mu\text{mol/mL}$$

Mengden ONPG i kyvetten før absorbansmålinger, $n_{\text{ONPG},0}$, kan videre finnes fra

$$n_{\text{ONPG},0} = [\text{ONPG}]_0 V_{\text{kyvette}} \quad (\text{A.2})$$

der V_{kyvette} er volum ONPG tilsatt i kyvetten. med $V_{\text{kyvette}} = 2,5 \text{ mL}$ gir dette for eksempel

$$n_{\text{ONPG},0} = 0,056 \cdot 2,5 = 0,139 \mu\text{mol}$$

Initiell hastighet, V_0 , ble beregnet fra uttrykket

$$V_0 = \frac{d(n_{\text{ONPG},0})}{dt} = \frac{n_{\text{ONPG},0}}{\text{OD}_{\text{max}}} \frac{d\text{OD}}{dt} \quad (\text{A.3})$$

der OD_{max} er maksimal absorbans og $\frac{d\text{OD}}{dt}$ er momentan endring i absorbans per tidsenhet. Med $n_{\text{ONPG},0} = 0,139 \mu\text{mol}$, $\text{OD}_{\text{max}} = 0,203$ og $\frac{d\text{OD}}{dt} = 0,0608 \text{ min}^{-1}$ gir dette for eksempel

$$V_0 = \frac{0,139 \cdot 0,0608}{0,203} = 0,0416 \mu\text{mol/min}$$

K_M og V_{max} ble beregnet på ulike måter fra Lineweaver-Burk- og Eadie-Hofstee-plott. Lineweaver-Burk-plottet ga $-1/K_M$ som skjæringspunkt med x -aksen, $1/V_{max}$ som skjæringspunkt med y -aksen og K_M/V_{max} som stigningstall, mens Eadie-Hofstee-plottet ga V_{max}/K_M som skjæringspunkt med x -aksen, V_{max} som skjæringspunkt med y -aksen og $-K_M$ som stigningstall. Initielle substratkonsentrasjoner, $[\text{ONPG}]_0$, og korresponderende V_0 -verdier benyttet i framstilling av plott er gitt Tabell A.2. Flere ulike Michaelis-Menten-kurver ble også framstilt ved innsetting av ulike verdier av V_{max} i ligning (1.1). Disse ble plottet sammen med en kurve basert på målte verdier for sammenligning.

Tabell A.2: Beregnede verdier for stigningstallet $d\text{OD}/dt$ og initiell hastighet, V_0 , samt målte verdier for maksimal absorbens, OD_{max} for ulike startmengder av ONPG i kyvetten, $n_{\text{ONPG},0}$.

$n_{\text{ONPG},0}$ [μmol]	OD_{max} [-]	$\frac{d\text{OD}}{dt}$ [min^{-1}]	V_0 [$\mu\text{mol}/\text{min}$]
0,139	0,203	0,0608	0,0416
0,278	0,395	0,100	0,0705
0,417	0,598	0,128	0,0907
0,556	0,765	0,143	0,1038
0,694	0,966	0,160	0,1150

B. Bestemmelse av temperatureffekt for β -galaktosidase

Målte verdier for absorbans ved 420 nm for ulike temperaturer er gitt i Tabell B.1.

Tabell B.1: Målte verdier for absorbans ved 420 nm for ulike temperaturer, T .

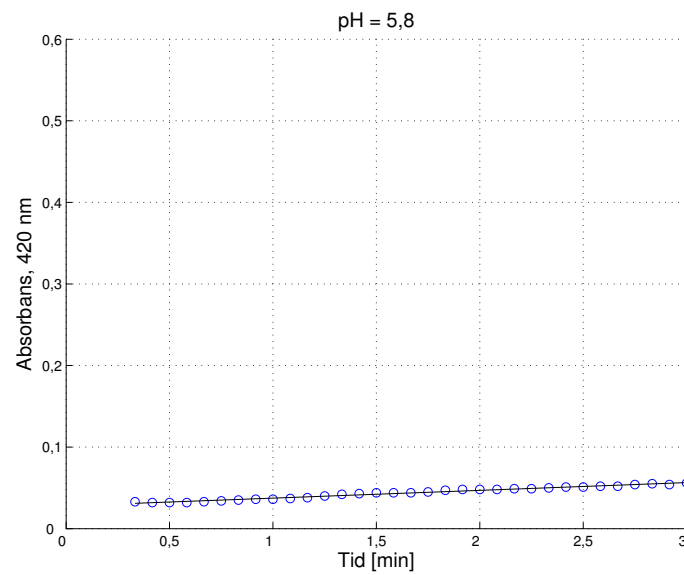
T [°C]	Absorbans, 420 nm
9,5	0,035
22,5	0,051
30,0	0,083
40,0	0,117
44,5	0,100
50,0	0,028
60,5	0,011

C. Bestemmelse av pH-optimum for β -galaktosidase

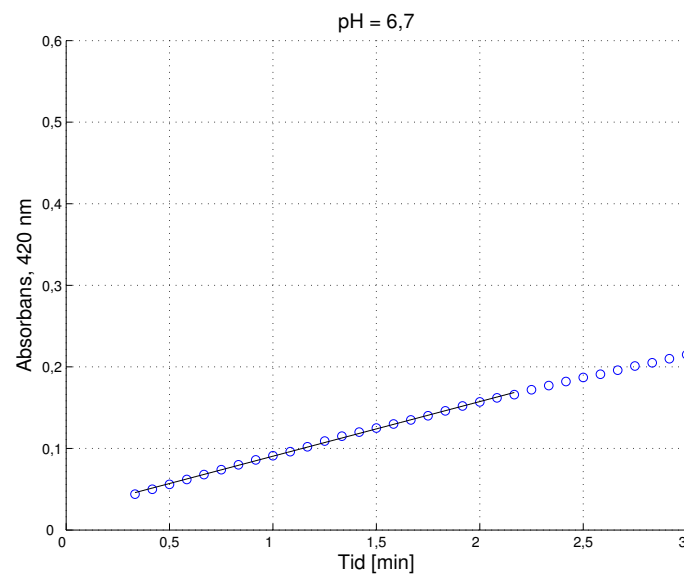
Tabell C.1: Verdier for absorbans ved 420 nm for ulike pH-verdier målt over et tidsrom på 3 minutter.

Tid [min]	Absorbans, 420 nm						
	pH = 5,8	pH = 6,7	pH = 7,4	pH = 7,7	pH = 7,9	pH = 8,1	pH = 9,1
0,33	0,033	0,044	0,087	0,067	0,074	0,079	0,050
0,42	0,032	0,050	0,102	0,080	0,088	0,094	0,056
0,50	0,032	0,056	0,118	0,092	0,102	0,108	0,063
0,58	0,032	0,062	0,132	0,104	0,115	0,123	0,071
0,67	0,033	0,068	0,147	0,117	0,129	0,137	0,078
0,75	0,034	0,074	0,162	0,129	0,141	0,151	0,086
0,83	0,035	0,080	0,176	0,141	0,154	0,165	0,093
0,92	0,036	0,086	0,191	0,156	0,168	0,180	0,100
1,00	0,036	0,091	0,205	0,168	0,182	0,194	0,107
1,08	0,037	0,096	0,219	0,181	0,195	0,209	0,115
1,17	0,038	0,102	0,233	0,193	0,209	0,222	0,121
1,25	0,040	0,109	0,247	0,205	0,223	0,236	0,129
1,33	0,042	0,115	0,261	0,218	0,236	0,250	0,136
1,42	0,043	0,120	0,276	0,230	0,248	0,264	0,143
1,50	0,044	0,125	0,289	0,243	0,261	0,278	0,149
1,58	0,044	0,130	0,303	0,255	0,275	0,294	0,156
1,67	0,044	0,135	0,316	0,267	0,288	0,309	0,163
1,75	0,045	0,140	0,329	0,279	0,301	0,320	0,170
1,83	0,047	0,146	0,342	0,291	0,315	0,334	0,178
1,92	0,048	0,152	0,355	0,302	0,329	0,346	0,185
2,00	0,048	0,157	0,367	0,315	0,342	0,360	0,191
2,08	0,048	0,162	0,380	0,327	0,355	0,374	0,198
2,17	0,049	0,166	0,392	0,340	0,368	0,387	0,206
2,25	0,049	0,172	0,405	0,352	0,381	0,399	0,213
2,33	0,050	0,177	0,418	0,364	0,394	0,412	0,220
2,42	0,051	0,182	0,430	0,376	0,405	0,426	0,227
2,50	0,051	0,187	0,441	0,387	0,417	0,440	0,233
2,58	0,052	0,191	0,453	0,399	0,430	0,452	0,239
2,67	0,052	0,196	0,464	0,412	0,443	0,465	0,247
2,75	0,054	0,201	0,475	0,423	0,456	0,479	0,253
2,83	0,055	0,205	0,486	0,433	0,468	0,491	0,258
2,92	0,054	0,210	0,497	0,445	0,481	0,502	0,266
3,00	0,056	0,215	0,508	0,457	0,492	0,515	0,272

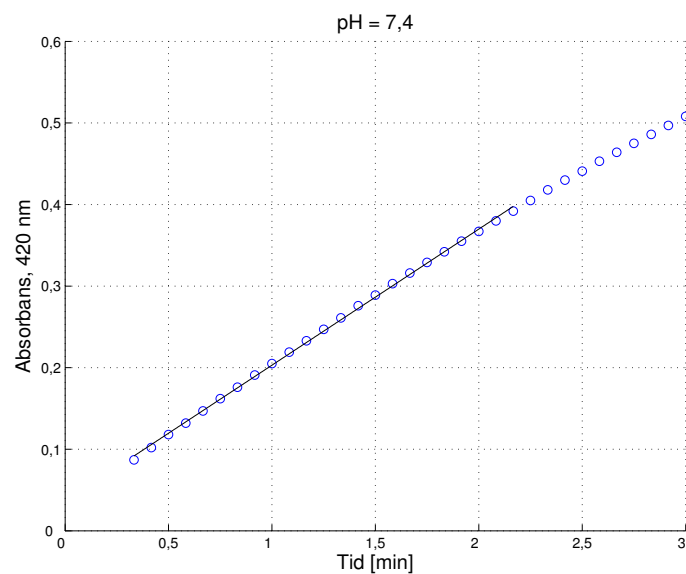
Sammenhengen mellom målte absorbanstverdier og tid gitt i Tabell A.1 er vist for ulike pH-verdier i Figur C.1-Figur C.7.



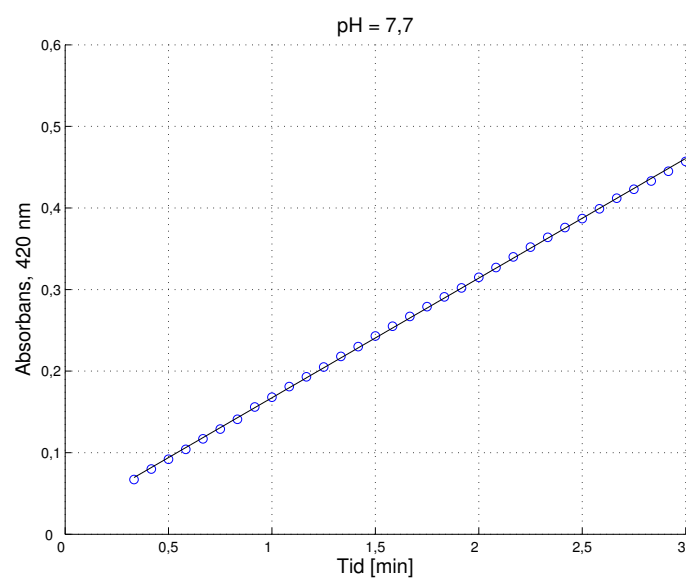
Figur C.1: Målte absorbanstverdier som funksjon av tid for pH = 5,8. Lineær regresjon ga linjen $y = 0,0095x + 0.0279$ med bestemmelseskoeffisient $R^2 = 0,98084$.



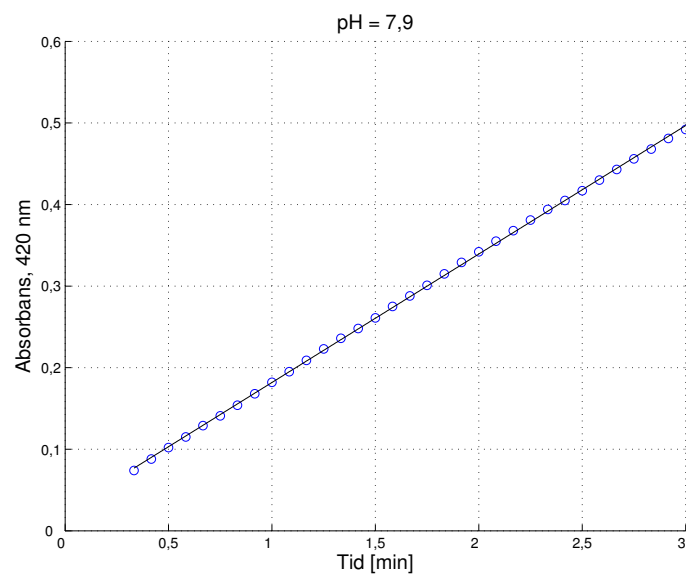
Figur C.2: Målte absorbanstverdier som funksjon av tid for pH = 6,7. Lineær regresjon ga linjen $y = 0,0670x + 0.0235$ med bestemmelseskoeffisient $R^2 = 0,99907$. En del av de siste datapunktene er utelatt fra regresjonen for å oppnå større grad av linearitet.



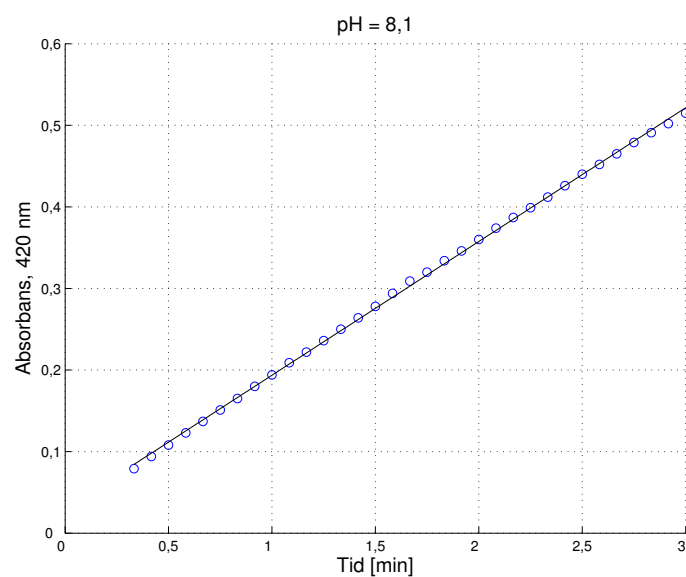
Figur C.3: Målte absorbansverdier som funksjon av tid for $\text{pH} = 7,4$. Lineær regresjon ga linjen $y = 0,1668x + 0,0362$ med bestemmelseskoeffisient $R^2 = 0,99921$. En del av de siste datapunktene er utelatt fra regresjonen for å oppnå større grad av linearitet.



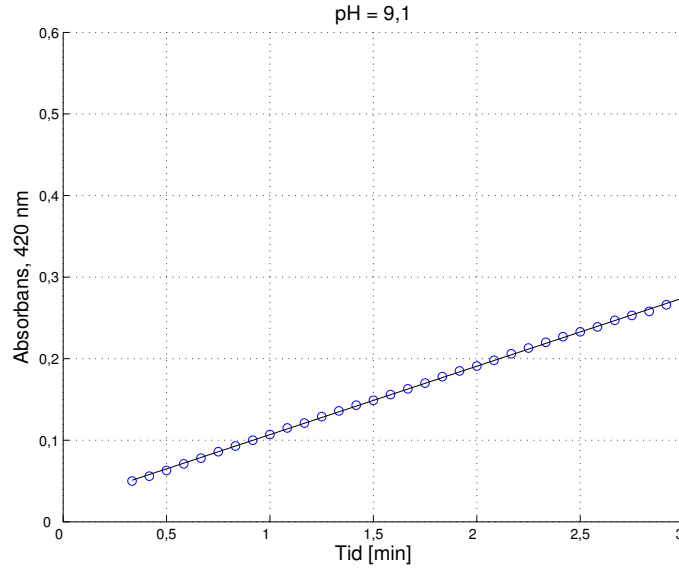
Figur C.4: Målte absorbansverdier som funksjon av tid for $\text{pH} = 5,8$. Lineær regresjon ga linjen $y = 0,1467x + 0,0207$ med bestemmelseskoeffisient $R^2 = 0,99977$.



Figur C.5: Målte absorbansverdier som funksjon av tid for $\text{pH} = 7,9$. Lineær regresjon ga linjen $y = 0,1575x + 0,0244$ med bestemmelseskoeffisient $R^2 = 0,99978$.



Figur C.6: Målte absorbansverdier som funksjon av tid for $\text{pH} = 8,1$. Lineær regresjon ga linjen $y = 0,1639x + 0,0297$ med bestemmelseskoeffisient $R^2 = 0,99948$.



Figur C.7: Målte absorbansverdier som funksjon av tid for pH = 9,1. Lineær regresjon ga linjen $y = 0,0839x + 0,0230$ med bestemmelseskoeffisient $R^2 = 0,99970$.

ONPG-konsentrasjon etter fortynning, $[\text{ONPG}]_0$, ble beregnet fra

$$[\text{ONPG}]_0 = \frac{V_{\text{ONPG},0}[\text{ONPG}]_{\text{utdelt}}}{V_{\text{tot}}} \quad (\text{C.1})$$

der $[\text{ONPG}]_{\text{utdelt}}$ er konsentrasjonen av ONPG i utdelt løsning før fortynning, V_{ONPG} er volum ONPG-løsning tilsatt og V_{tot} er totalt volum. Med $V_{\text{ONPG}} = 1 \text{ mL}$, $[\text{ONPG}]_{\text{utdelt}} = 2,5 \text{ } \mu\text{mol/mL}$ og $V_{\text{tot}} = 9 \text{ mL}$ gir dette for eksempel

$$[\text{ONPG}]_0 = \frac{2,5 \cdot 1}{9} = 0,2778 \text{ } \mu\text{mol/mL}$$

Mengden ONPG i kyvetten før absorbansmålinger, $n_{\text{ONPG},0}$, kan videre finnes fra

$$n_{\text{ONPG},0} = [\text{ONPG}]_0 V_{\text{kyvette}} \quad (\text{C.2})$$

der V_{kyvette} er volum ONPG tilsatt i kyvetten. med $V_{\text{kyvette}} = 2,5 \text{ mL}$ gir dette for eksempel

$$n_{\text{ONPG},0} = 0,2778 \cdot 2,5 = 0,695 \text{ } \mu\text{mol}$$

Initiell hastighet, V_0 , ble beregnet fra uttrykket

$$V_0 = \frac{d(n_{\text{ONPG},0})}{dt} = \frac{n_{\text{ONPG},0}}{\text{OD}_{\text{max}}} \frac{d\text{OD}}{dt} \quad (\text{C.3})$$

der OD_{max} er maksimal absorbans og $\frac{d\text{OD}}{dt}$ er momentan endring i absorbans per tidsenhet. OD_{max} ble i denne delen av forsøket målt til 0,939. Med $n_{\text{ONPG},0} = 0,695 \text{ } \mu\text{mol}$ og $\frac{d\text{OD}}{dt} = 0,0095 \text{ min}^{-1}$ gir dette for eksempel

$$V_0 = \frac{0,695 \cdot 0,0095}{0,939} = 0,0070 \text{ } \mu\text{mol/min}$$

Tabell C.2: Beregnede verdier for stigningstallet dOD/dt og initiell hastighet, V_0 , for ulike pH-verdier.

pH [-]	$\frac{dOD}{dt}$ [min^{-1}]	V_0 [$\mu\text{mol}/\text{min}$]
5,8	0,0279	0,00700
6,7	0,0670	0,0495
7,4	0,1668	0,123
7,7	0,1467	0,109
7,9	0,1575	0,117
8,1	0,1639	0,121
9,1	0,0839	0,0620

D. B-spørsmål

1.. Ut fra hvilke kriterier utledes Michaelis-Menten-likningen?

Michaelis-Menten likningen utledes fra følgende kriterier:

- Ligninger for reaksjonshastighet
- Massebalanse med hensyn på enzym
- Reaksjonen $ES \longrightarrow E + P$
- Krav om stasjonær tilstand, der mengde ES-intermediat er konstant

2.. Michaelis-Menten plottet flater ikke ut på samme måte som på figuren i kursheftet. Hvilke konsekvenser får dette for resultatene i dette forsøket? Hva kunne dere gjort for å unngå dette problemet?

Michaelis-Menten-plottet flater ikke ut på samme måte som på figuren i kursheftet, fordi det ikke ble utført målinger for høy nok konsentrasjon av substrat. Ved å utføre flere målinger ved høyere substratkonsentrasjoner, kunne dette problemet blitt unngått. Dette fører til at beregnede verdier for V_{max} og K_M blir veldig usikre.

3.. Beregn $\mu\text{mol ONPG}$ ved start (ONPG_0) i kyvetten i forsøk 3B. Vis beregningene. (Fasit: $0,694 \mu\text{mol ONPG}$).

Det benyttes en løsning med konsentrasjon $2,5 \text{ mM ONPG} = 2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$. Det ble overført 1 ml av denne løsningen, altså $2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$. Det ble så laget en ny løsning med buffer: $1 \text{ mL } 2,5 \text{ mM ONPG} + 8 \text{ ml buffer} = 9 \text{ mL løsning}$. Konsentrasjonen av ONPG i denne løsningen blir da: $(2,5 \cdot 10^{-6}) / (9 \cdot 10^{-3}) = 0,278 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L} = 0,278 \text{ mM}$. Det ble benyttet $2,5 \text{ ml}$ av denne løsningen i kyvetten, slik at antall mol ONPG i kyvetten blir: $0,278 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L} \cdot 2,5 \cdot 10^{-3} \text{ L} = 0,695 \mu\text{mol}$.