

## HOMOGEN KATALYSE MED ENZYMET KATALASE

### Indledning

Overalt i kemi, biokemi og miljøkemi støder man på kinetiske problemer: Selvom en reaktion sagtens kan forløbe ud fra en termodynamisk betragtning, er det ikke sikkert, at den også i praksis forløber, fordi reaktionshastigheden simpelthen er for lille. I biologiske systemer optræder enzymer som katalysatorer for kemiske reaktioner, og det er centralt at kunne undersøge reaktionsforløb hvor flere hurtige og langsomme reaktioner medvirker til den samlede kemiske proces gennem lang tid.

I denne øvelse skal I planlægge og udføre kinetiske forsøg med et simpelt enzymatisk reaktionssystem. Bruttoreaktionen er spaltningen af hydrogenperoxid  $\text{H}_2\text{O}_2$  til vand og dioxygen under indvirkning af enzymet katalase. Reaktionen følges ved at måle trykændringen, når der dannes  $\text{O}_2$  på gasform. Katalase findes i relativt store mængder i røde blodlegemer, lever og nyre. Enzymet er ekstremt effektivt til at fjerne  $\text{H}_2\text{O}_2$  og bruges industrielt f.eks. til fjernelse af rester af  $\text{H}_2\text{O}_2$  efter dette stof har været anvendt som bakteriedræbende middel. Reaktionen formodes at forløbe via to meget hurtige delreaktioner. Første trin er binding af  $\text{H}_2\text{O}_2$  til enzymet. Andet trin er reaktion med en hydrogenacceptor som i dette tilfælde kan være et andet  $\text{H}_2\text{O}_2$  molekyle. Formålet med øvelsen er at studere det samlede reaktionsforløbs afhængighed af koncentrationen af  $\text{H}_2\text{O}_2$  samt afhængigheden af enten katalasekoncentrationen, temperaturen eller pH. Der skal laves i alt 2 forsøg med hver 2 eksperimenter.

1. On-line opsamling af eksperimentelle data.
2. Opstilling af hastighedsudtryk på baggrund af en antaget reaktionsmekanisme.
3. Udledning af et matematisk udtryk for den forventede tidsudvikling.
4. Fitning af parametrene i udtrykket for tidsudviklingen til de eksperimentelle data og vurdering af gyldigheden af den antagne reaktionsmekanisme.
5. Steady-state approksimationen og dens gyldighed.
6. Begrebet "hastighedbestemmende trin" og dets begrænsninger.

### Litteratur

PWA P.W. Atkins: Physical Chemistry, Sixth and Seventh Edition,  
Oxford University Press 1998 and 2002: Afsnit 24.7 og 25.3

BC Britton Chance: The enzyme-substrate compounds of catalase and peroxides.  
Nature (1948) **161** 914-917

Kursets hjemmeside øvelse8.

## Problemformulering

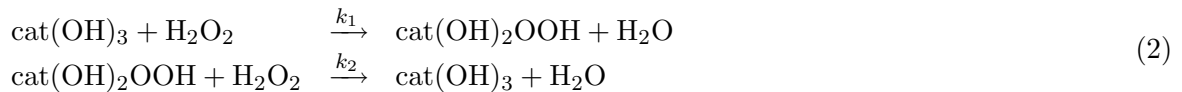
Bruttoreaktionen for den katalasekatalyserede hydrogenperoxidspaltning er



Vi følger reaktionen ved at måle de trykændringer, der kommer når reaktionen producerer  $\text{O}_2$ . Udviklingen af  $\text{O}_2$  sker i væsken, men da opløseligheden af  $\text{O}_2$  i vand er meget lille vil hovedparten af den dannede  $\text{O}_2$  meget hurtigt via små oxygenbobler ende i gasfasen, hvor trykket ifølge den ideale gaslov  $P = \frac{nRT}{V}$  vil være proportional med mængden af den udviklede dioxygen.  $V$  er her volumen af kolben og trykslugerne til manometrene minus volumen af væskefasen.

Reaktionshastigheden afhænger af mængden af katalase, temperaturen og pH.

Vi antager at bruttoreaktionen for spaltningen af  $\text{H}_2\text{O}_2$  ved hjælp af katalase forløber efter følgende mekanisme (se BC)



Det antages at hver af disse to reaktioner forløber efter massevirkningskinetik. Opstil hastighedsudtrykkene for de to delreaktioner i lign. 2, og brug disse til at opstille et udtryk for den forventede trykændring over reaktionsopløsningen ved at anvende stationaritetsprincippet på  $\text{cat}(\text{OH})_2\text{OOH}$ . Brug derefter gnuplot til at fitte det integrerede hastighedsudtryk til jeres data. I kan afprøve jeres fitteprocedure på det prøvedatasæt, der findes på kursets hjemmeside. Her findes også en vejledning i brugen af gnuplot. Brug derefter rutinen til at bestemme den tilsyneladende hastighedskonstant for jeres forsøg, og overvej om forsøgene faktisk følger det udtryk I har opstillet. Udregn dernæst den tilsyneladende hastighedskonstant  $k$  for bruttoreaktionen.

De faktiske værdier af hastighedskonstanterne  $k_1$  og  $k_2$  er mekanistiske parametre, der fortæller noget direkte og konkret om reaktionen. De kan ikke bestemmes ud fra de her udførte eksperimenter uden at kende mængden af aktive katalasemolekyler i det udleverede præparat. Britton Chance har bestemt  $k_1$  til  $3 \cdot 10^7 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , og  $k_2$  til at være af samme størrelsesorden som  $k_1$ .

Hydrogenperoxid er et biologisk aktivt stof, som kan inaktivere enzymer som katalase. Hvis dette er tilfældet, kan den samlede proces betragtes som to konkurrerende reaktioner, hvor katalaser destruerer hydrogenperoxiden, samtidig med at hydrogenperoxiden destruerer katalasen. Hvis den sidste proces er tilstrækkelig hurtig, vil katalasen være blevet inaktiv, inden hydrogenperoxiden er spaltet. Hvordan vil I eksperimentelt undersøge, om dette er tilfældet?

Til sidst skal I overveje, i hvilken grad det er rimeligt at tale om, at en af de to delprocesser kan betragtes som et hastighedsbegrænsende trin. Dette kan undersøges kvantitativt ved numerisk at integrere reaktionshastighedsudtrykkene for hele lign. 2 med den af Britton Chance bestemte værdi for  $k_1$  med forskellige værdier af  $k_2$  og med de aktuelle startkoncentrationer. Brug derefter jeres gnuplotrutine til at bestemme  $k_1$  fra de simulerede data og sammenlign med den eksperimentelle  $k$ . Programmet chem er velegnet til simulering af kemiske reaktionssystemer. Det er tilgængeligt på studenterserveren, og I kan finde en introduktion til det på hjemmesiden for dette kursus.

## Sikkerhed

Når kolben evakueres eller er evakueret, er det ekstra vigtigt at bruge beskyttelsesbriller. I tilfælde af implosion af kolben formindskes skaderne væsentligt, hvis kolben er neddyppet i termostaten. Man bør derfor altid sænke kolben ned i termostaten før man evakuerer den.

## Den eksperimentelle fremgangsmåde

Den opløsning, hvor reaktionen skal foregå, befinder sig i en trehalsed kolbe, der er neddykket i en termostat. Den dannede dioxygen opsamles i gasfasen over opløsningen. I løbet af det tidsrum, målingerne finder sted, vil temperaturen  $T$  og voluminet  $V_g$  af denne gasfase være konstant. Trykket i gasfasen registreres af tryktransduceren, der er anbragt i den ene sidegren på kolben. Tryktransduceren er koblet til en dataopsamlingsenhed, der er styret af en datamat. Værdierne for det målte tryk og de tilhørende tidspunkter vises løbende på dataskærmen og gemmes automatisk, så de kan analyseres senere. Den anden sidegren af den trehalsede kolbe er forsynet med en vakuumhane, hvorigennem kolben kan evakueres. Kolbens midtergren er forsynet med en gummihætte, hvorigennem reaktanter kan sprøjtes ned i kolben. I termostaten kan der anbringes to trehalsede kolber, og det er derfor muligt at lave to eksperimenter samtidigt.

Termostaten bør i god tid indstilles på den temperatur, der skal arbejdes med.

Programmet til styring af dataopsamlingsmodulet 'labpro' startes fra kommandolinien i et terminalvindue ved at skrive `./kat`. Programmet kaldes fra kataloget `/home/kemigfx/øvelse8`. Først vises et vindue, hvori man kan indtaste sit navn og en identifikation af eksperimentet som f.eks. kan være de anvendte koncentrationer og temperaturen. Denne information skrives i filen sammen med de opsamlede måledata, så man senere kan huske, hvilke data der stammer fra hvilket eksperiment. Herefter vises to vinduer, hvor det højre skal vise de målte tryk og tiden og det venstre en graf med trykvariationerne. Det højre vindue aktiveres ved at anbringe musepilen i vinduet og trykke på venstre museknap. Programmet kan køre på tre måder (Experiment, Calibration og Leaktest), der vælges cyklisk ved at trykke på tabulatortasten. Den valgte kørselsmåde vises med en understreget tekst i øverste linie og har betydning for de grafer der vises og for de kommandoer, der kan udføres. Dataopsamlingen kører hele tiden uafhængig af den valgte kørselsmåde. En liste over de aktuelle kommandoer kan fås med kommandoen `help`. Udskriften `ready` viser, at kommandoen er udført. Udskriften `***syntaxerror` indikerer en syntaksfejl.

Under kørselsmåden `Calibration` kan man ved en topunktskalibrering sikre at tryktransducerne viser korrekt tryk. Som kalibreringspunkter kan for eksempel vælges atmosfæretryk og det laveste tryk pumpen kan levere. Det øjeblikkelige atmosfæretryk kan enten findes ved hjælp af et nøjagtigt barometer eller ved hjælp af DMIs hjemmeside [www.dmi.dk](http://www.dmi.dk). Laveste pumpetryk for en oliepumpe er 0 mbar og for en ideal vandluftpumpe trykket af mættet vanddamp ved pumpevandets temperatur  $P_w(T)$  ( $P_w(24^\circ\text{C}) = 29.9$  mbar,  $P_w(25^\circ\text{C}) = 31.7$  mbar og  $P_w(26^\circ\text{C}) = 33.6$  mbar). Hvis man ved at trykket i kolbe 1 er f.eks. 1024 mbar, foretages kalibreringen med kommandoen `1: 1024 mbar.` og tilsvarende for kolbe 2. En roterende streg viser at kalibreringen er i gang. Husk at gemme kalibreringsværdierne i en fil på disken med kommandoen `savecalpar` når begge topunktskalibreringer er udført. Seneste sæt kalibreringskonstanter indlæses automatisk ved programstart og kan indlæses manuelt med kommandoen `getcalpar`.

Imens læktesten udføres som beskrevet nedenfor, forberedes de egentlige målinger. Der fremstilles desuden to portioner  $\text{H}_2\text{O}_2$ -opløsning, ved at fortynde 1 ml 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  op til 50ml med den valgte buffer. Disse to målekolber anbringes ligeledes i termostaten.

Læktesten udføres ved at samle apparaturet uden nogen væsker i kolberne, som fastspændes så de er sænkes ned i termostaten. Vakuumhanen forbindes til pumpen, og kolben evakueres til trykket ikke falder mere. Derefter lukkes vakuumhanen og forbindelsen til pumpen tages af. Dette gentages for den anden kolbe. Systemet undersøges nu for eventuelle lækager ved at vælge kørselsmåden `Leaktest`. Grafvinduet viser løbende de målte tryk og systemerne er tætte nok hvis hældningen af trykgraferne er mindre end hældningen af to rette linier der svarer til en trykstigning på 1 mbar pr minut. I modsat fald forbedres tætheden f.eks. ved rensning og smøring af slibene og stramning af slangeforbindelserne.

Når systemet har vist sig at være tæt, bestemmes en approximativ værdi af volumnet af reaktionsbeholderen og manometerslangerne ved 3 gange at tilsætte 50 ml atmosfærisk luft til beholderen og notere de tilhørende trykstigninger. Herefter lukkes luft ind i kolberne, som derefter påfyldes hver sin portion  $\text{H}_2\text{O}_2$ -opløsning og forsynes med magnetomrørere. For at fjerne atmosfærisk luft evakueres kolberne forsigtigt, så opløsningen ikke ”koger” for meget. Derefter kontrolleres tætheden igen.

Målingerne udføres ved at vælge kørselsmåden `Experiment`, udføre kommandoen `start` og derefter indsprøjte katalaseopløsning gennem gummimembranen. Det nøjagtige rumfang af den tilsatte katalaseopløsning (og dermed mængden af katalase) bestemmes ved at veje sprøjterne før og efter tilsætningen. Check før vejningen at sprøjten ikke indeholder luft.

Når trykstigningshastigheden er forsvindende i begge kolber afsluttes målingerne med kommandoen `end`. De målte data gemmes på en fil med navnet `katdata<x>` hvor `<x>` er et tal mellem 0 og 99.

Som afslutning åbnes vakuumhanen. Kolben tages op af termostaten og renses omhyggeligt. Pas på at omrørermagneten ikke forsvinder.

Målingerne udføres i to kolber med forskellige mængder af hydrogenperoxid, ved to forskellige temperaturer i området 30-40°C eller pH 6, 7 eller 8.

## Databehandling

Databehandlingen kan udføres på øvelsesdatamaterne med programmet `gnuplot` eller programmet `katfit` som er et kommandogenereringsprogram til `gnuplot`. Hvis beregningerne skal udføres senere overføres datafilen med de eksperimentelle målinger til studenterserveren med kommandoen `scp katdata<x> <login>@fys.ku.dk:` og indtastning af det tilhørende password. Beregningerne udføres på studenterserveren. Login på studenterserveren kan foretages fra maskinerne i øvelseslokalet med kommandoen

`ssh -X <login>@fys.ku.dk` og indtastning af det tilhørende password. Til behandlingen skal der bruges et program der kan plote de eksperimentelle data og fitte parametrene i et matematisk udtryk til dem. Der findes talrige programmer til dette formål. Vi anbefaler at I bruger programmet `gnuplot` fordi det er alsidigt, let tilgængeligt og frigivet under GNU General Public License men programmer som `xmgrace` eller `Mathematica` er også anvendelige, men `xmgrace` beregner ikke usikkerhedsestimater for parametrene så det må I gøre på anden vis. Via kursets hjemmeside findes en introduktion til de dele af `gnuplot` som er relevante for denne øvelse.

Hvis I vil undersøge gyldigheden af steady-state approksimationen og undersøge, hvornår man med rimelighed kan tale om et hastighedsbestemmende trin, har I brug for et program, der kan integrere kemiske kinetiske modeller, så I kan sammenligne den approksimative model med den fulde model. Igen findes der talrige programmer til formålet. Vi anbefaler `chem`, der er installeret på studenterserveren. En kort introduktion kan findes via kursets hjemmeside.

## Rapporten

Rapporten skal indeholde en samlet beskrivelse af de forsøg I har udført. Der skal være kurver som viser jeres eksperimentelle data, en udledning af hastighedsudtrykket for bruttoreaktionen, samt den databehandling I har lavet på grundlag af disse udtryk. Rapporten skal også indeholde en diskussion af hvad jeres eksperimenter viser om reaktionens mekanisme.

Rapporten kan indeholde en række numeriske integrationer af modellen med forskellige værdier af hastighedskonstanterne og med de faktisk anvendte startkoncentrationer, samt en sammenligning af modelresultaterne med de eksperimentelle resultater.

Appendix 1 med mekanistiske udledning for en simpel model.

Idet  $K$  betegner  $\text{cat}(\text{OH})_3$  og  $K'$   $\text{cat}(\text{OH})_2\text{OOH}$  medfører stationaritetsantagelsen at

$$\frac{d[K']}{dt} = k_1[K][\text{H}_2\text{O}_2] - k_2[K'][\text{H}_2\text{O}_2] \approx 0$$

hvoraf man får  $k_1[K] = k_2[K']$  som sammen med stofbevarelsesligningen  $[K] + [K'] = [K_0]$  hvor  $[K_0]$  er startkoncentrationen af katalase giver

$$[K] = \frac{[K_0]k_2}{k_1 + k_2}$$

For  $[\text{H}_2\text{O}_2]$  gælder den kinetiske ligning

$$\frac{d[\text{H}_2\text{O}_2]}{dt} = -k_1[K][\text{H}_2\text{O}_2] - k_2[K'][\text{H}_2\text{O}_2] = -\frac{2k_1k_2[K_0]}{k_1 + k_2}[\text{H}_2\text{O}_2]$$

som er en førsteordens differentilligning med konstant koefficient og derfor har løsningen

$$[\text{H}_2\text{O}_2] = [\text{H}_2\text{O}_2]_0 e^{-\frac{2k_1k_2[K_0]}{k_1+k_2}t}$$

hvor  $[\text{H}_2\text{O}_2]_0$  er startkoncentrationen af hydrogenperoxid. Ved hjælp af støkiometrien af bruttoreaktionen kan den samlede mængde  $\text{O}_2$  beregnes som

$$n_{\text{O}_2}(t) = \frac{V_L}{2}([\text{H}_2\text{O}_2]_0 - [\text{H}_2\text{O}_2]) = \frac{V_L}{2}[\text{H}_2\text{O}_2]_0(1 - e^{-\frac{2k_1k_2[K_0]}{k_1+k_2}t})$$

hvor  $V_L$  er volumenet af væskefasen.

Hvis al denne ilt overføres til gasfasen vil man få en trykforøgelse på

$$P_{\text{O}_2}(t) = n_{\text{O}_2}(t) \frac{RT}{V_G} \tag{3}$$

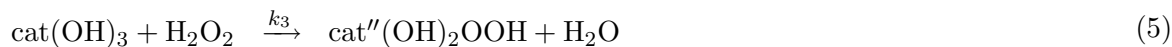
Hvis trykket på det tidspunkt  $t_0$  hvor katalasen tilsættes er  $a$ , vil trykændringen ifølge ovenstående udledning have den generelle form.

$$P = a + b(1 - e^{-k(t-t_0)}) \tag{4}$$

Dette udtryk fittes til de eksperimentelle målinger f.eks. med programmet `gnuplot`. Først vælges  $t_0$  og  $a$  ved at se på en kurve der viser det eksperimentelle forløb. Derefter varieres  $b$  og  $k$ , så modellen passer bedst muligt med de eksperimentelle data.

Appendix 2 med mekanistiske udledning for en udvidet model.

Den langsomme omdannelse af katalasen med med hydrogenperoxid kan beskrives ved reaktionen



hvor  $\text{cat}''$  er en konformation der ikke kan reagere videre med hydrogenperoxid. Idet  $\text{K}$  betegner  $\text{cat}(\text{OH})_3$ ,  $\text{K}'$   $\text{cat}(\text{OH})_2\text{OOH}$  og  $\text{K}''$   $\text{cat}''(\text{OH})_2\text{OOH}$ , får vi følgende kientiske ligninger

$$\frac{d[\text{H}_2\text{O}_2]}{dt} = -(k_1 + k_3)[\text{K}][\text{H}_2\text{O}_2] - k_2[\text{K}'][\text{H}_2\text{O}_2] \quad (6)$$

$$\frac{d[\text{K}]}{dt} = -k_1[\text{K}][\text{H}_2\text{O}_2] + k_2[\text{K}'][\text{H}_2\text{O}_2] - k_3[\text{K}][\text{H}_2\text{O}_2] \quad (7)$$

$$\frac{d[\text{K}']}{dt} = k_1[\text{K}][\text{H}_2\text{O}_2] - k_2[\text{K}'][\text{H}_2\text{O}_2] \quad (8)$$

$$\frac{d[\text{K}'']}{dt} = k_3[\text{K}][\text{H}_2\text{O}_2]$$

Da  $k_1$  og  $k_2$  er meget større end  $k_3$  giver stationaritetsprincippet at  $\frac{d[\text{K}']}{dt} \approx 0$ . Der gælder derfor approximativt  $k_1[\text{K}] = k_2[\text{K}']$  og ligningerne 6 og 7 reduceres til

$$\frac{d[\text{H}_2\text{O}_2]}{dt} = -(2k_1 + k_3)[\text{K}][\text{H}_2\text{O}_2] \quad (9)$$

$$\frac{d[\text{K}]}{dt} = -k_3[\text{K}][\text{H}_2\text{O}_2] \quad (10)$$

Division af 10 med 9 giver

$$\frac{d[\text{K}]}{d[\text{H}_2\text{O}_2]} = \frac{-k_3}{-(2k_1 + k_3)} \quad (11)$$

der har løsningen  $[\text{K}] = \frac{k_3}{2k_1 + k_3}[\text{H}_2\text{O}_2] + \text{Konst}$

Lige efter starten ( $t = 0+$ ) er  $[\text{K}''] = 0$  og massebevarelsen af enzym giver som før

$$[\text{K}] = \frac{[\text{K}_0]k_2}{k_1 + k_2}$$

Konstanten skal vælges så den rette linie går gennem punktet  $([\text{K}](0), [\text{H}_2\text{O}_2](0)) = \frac{[\text{K}_0]k_2}{k_1 + k_2}, [\text{H}_2\text{O}_2]_0$  hvor  $[\text{H}_2\text{O}_2]_0$  er startkoncentrationen af hydrogenperoxid. Ligningen for den rette linie bliver derfor

$$[\text{K}] = \frac{k_3}{2k_1 + k_3}([\text{H}_2\text{O}_2]_0 - [\text{H}_2\text{O}_2]) + \frac{[\text{K}_0]k_2}{k_1 + k_2}$$

Substitution i 9 giver

$$\frac{d[\text{H}_2\text{O}_2]}{dt} = (-k_3([\text{H}_2\text{O}_2] - [\text{H}_2\text{O}_2]_0) - \frac{[\text{K}_0]k_2(2k_1 + k_3)}{k_1 + k_2})[\text{H}_2\text{O}_2] \quad (12)$$

$$= -k_3[\text{H}_2\text{O}_2]^2 + (k_3[\text{H}_2\text{O}_2]_0 - \frac{[\text{K}_0]k_2(2k_1 + k_3)}{k_1 + k_2})[\text{H}_2\text{O}_2] \quad (13)$$

som er en Bernoulli differentiaalligning af formen

$$\frac{dx}{dt} = px^2 + qx \quad (14)$$

hvor  $x = [\text{H}_2\text{O}_2]$ ,  $p = -k_3$  og  $q = k_3[\text{H}_2\text{O}_2]_0 - \frac{[K_0]k_2(2k_1+k_3)}{k_1+k_2}$ . Denne differentiaalligning kan løses eksplicit ved substitution af  $x = \frac{1}{y}$  som genererer en lineære inhomogen differentiaalligning for  $y$ . Ved tilbageskift til variabel  $x$  fås løsningen

$$[\text{H}_2\text{O}_2] = \frac{q[\text{H}_2\text{O}_2]_0}{(p[\text{H}_2\text{O}_2]_0 + q)e^{-qt} - p[\text{H}_2\text{O}_2]_0} \quad (15)$$

der for  $k_3 = 0$  er identisk med den simple løsning. Ved hjælp af støkiometrien af bruttoreaktionen kan den samlede mængde  $\text{O}_2$  beregnes som

$$n_{\text{O}_2}(t) = \frac{V_L}{2}([\text{H}_2\text{O}_2]_0 - [\text{H}_2\text{O}_2]) = \frac{V_L}{2}[\text{H}_2\text{O}_2]_0 \left(1 - \frac{q}{(p[\text{H}_2\text{O}_2]_0 + q)e^{-qt} - p[\text{H}_2\text{O}_2]_0}\right)$$

hvor  $V_L$  er volumenet af væskefasen.

Hvis al denne ilt overføres til gasfasen vil man få en trykforøgelse på

$$P_{\text{O}_2}(t) = n_{\text{O}_2}(t) \frac{RT}{V_G} \quad (16)$$

Hvis trykket på det tidspunkt  $t_0$  hvor katalasen tilsættes er  $a$ , vil trykændringen ifølge ovenstående udledning have den generelle form.

$$P = a + b \left(1 - \frac{q}{(c + q)e^{-q(t-t_0)} - c}\right) \quad (17)$$

Dette udtryk fittes til de eksperimentelle målinger f.eks. med programmet **gnuplot**. Først vælges  $t_0$  så nøjagtigt som muligt ved at finde starttidspunktet for reaktionen. Denæst skønnes værdier for  $a$ ,  $b$ ,  $c$  og  $q$  f.eks. ved at se på kurven, der viser det eksperimentelle forløb. Derefter varieres  $a$ ,  $b$ ,  $c$  og  $q$ , så modellen passer bedst muligt med de eksperimentelle data.