

2007 年度 酵素化学実験(進化生命システム学領域)

2007.10.17.~2007.10.30. 実習  
 2007.10.31. レポート作製用予備日  
 2007.11.7. レポート提出期限

[実習内容]

実習1:イオン交換クロマトグラフィーを用いた2種類のアミラーゼの分離  
 実習2:グルコシダーゼを用いた酵素反応の性質

[実習期間のおおよその流れ]

		1~5 班	6~10 班
10 月 17 日	水	実習1説明、 サンプルのアプライ	実習1説明 サンプルのアプライ
18 日	木	未知試料の活性測定、 (午後)A280 測定	(午前)未知試料の活性測定 (午後)A280 測定
19 日	金	活性測定	
20 日	土		
21 日	日		
22 日	月	電気泳動	電気泳動
23 日	火	活性測定	活性測定
24 日	水	休み(午前中講義)	活性測定(午前中講義)
25 日	木	実習2説明、酵素活性の測定	実習2説明、酵素活性の測定
26 日	金	L-B プロットの作成	L-B プロットの作成
27 日	土		
28 日	日		
29 日	月	酵素反応の性質	酵素反応の性質
30 日	火	後片付け、まとめ	後片付け、まとめ
31 日	水		
11 月 7 日	水	12:00 レポート提出期限 提出場所:応用生物事務室前	

[班分け]

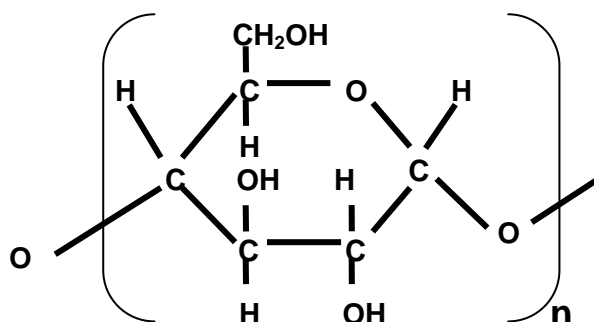
1 班							
2 班							
3 班							
4 班							
5 班							
6 班							
7 班							
8 班							
9 班							
10 班							

## 実習1:イオン交換クロマトグラフィーを用いた2種類のアミラーゼの分離

生物は多くのタンパク質から出来ているため、最初に得られるサンプルはタンパク質混合液である。このタンパク質混合液から、それぞれのタンパク質を分離、精製するにはどうすればよいか？有名な糖分解酵素であるアミラーゼを題材にして、その活性の測定方法や、分離・精製を実際に行う。

### 未知試料の活性測定(全員)

アミラーゼはアミロースや可溶性でんぷんを加水分解する酵素である。まず、濃度が未知のアミラーゼにおける酵素活性を測定してみる。基質として準備されたのは、3 mg/ml アミロース溶液である。



アミロースの構造

《注意》各班に配られた基質(アミロース)に酵素(サンプルや唾液)を決して混入させないこと。基質はプラスチックピペットで取ること。酵素、フラクションの希釈は、buf.Aを用いること。

使用したピペットやチップに確信が持てなくなった場合は、交換する用心さが重要。

- (1) まず、試験管立てに試験管を15~30本並べ、それぞれの試験管にヨード溶液を5 mlずつ分注する(室温でよい)。ヨード液はTA机に採りに来てください。
- (2) アミロース液(基質)を試験管に3 mlずつ分注し、40°C設定のウォーターバス中で保温待機。
- (3) 各班に配られた未知試料をbuffer Aを用いて希釈列を作製する。(ヒント:1000倍、1500倍、2000倍希釈あたりからはじめると良い) 希釈した酵素液は試験管に希釈倍を明記すること。
- (4) あらかじめ40°Cに保っておいたアミロース液(3 ml)に、1 mlの酵素液を加えて、試験管を良く振り、すばやく混ぜ、40°Cで反応させる。
- (5) 酵素液を加えて2分後から30秒間隔で反応液0.2 mlを採取し、順次5 mlのヨード液の中に加える。
- (6) 600 nmにおける吸光度を光路長1 cmのセルを用いて測定し、その値が0.4になったときの反応時間を、縦軸に吸光度、横軸に反応時間としたグラフから求める。このときの反応時間が3分から10分の間にならなければ、酵素液の希釈倍率を変えて再測定する。
- (7) 酵素濃度(U/ml)を求め、実習室前方のホワイトボードに記入する。  
酵素の単位は、次のように定義する。  
「10 mgのアミロースを加水分解して、30分後に上記のヨード反応の吸光度を0.4にまで低下させる酵素量を1単位(unit)とする。」

タンパク質の分離・精製を行うには、個々のタンパク質の性質の違いを利用すればよい

タンパク質分離のときに

各タンパク質分離原理に

着目される物性

対応する主な研究手法の名称

溶解度……………塩析、等電点沈殿

電荷……………イオン交換クロマトグラフィー、電気泳動

分子の大きさ……………ゲルろ過クロマトグラフィー、超遠心分離

疎水性……………疎水クロマトグラフィー(逆相クロマトグラフィー)

特異的な結合……………アフィニティークロマトグラフィー、

酵素活性(でんぷん-アミラーゼなど、基質と酵素)、

ウエスタンブロット(抗原と抗体)、

Protein A(黄色ブドウ球菌細胞壁成分)-IgGなど、

コンカナバリンA(マメ由来のレクチン)-糖タンパク質など

<イオン交換クロマトグラフィーについて>

イオン交換とは、固相中に静電結合で捕捉されているイオンが周囲の液相中のイオンと入れ換わる現象で、これを行う固体を「イオン交換体」という。

イオン交換体は、高分子基材(樹脂、セルロースなど)がつくる網目構造を持つ粒子上に、荷電基(-SO<sup>3-</sup>基や-CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>など)を有する共有結合させてつくられる。

荷電基が負電荷のものを陽イオン交換体、正電荷のものを陰イオン交換体として用いる。

<イオン交換クロマトグラフィー法の流れ>

イオン交換体の選択……………タンパク質の当電荷点をpIとすれば、分離条件のpHが

pH>pIのとき、タンパク質は負に荷電している。

このタンパク質を吸着させるためには

陰イオン交換体を使用すればよい。

pH<pIのとき、タンパク質は正に荷電している。

このタンパク質を吸着させるためには

陽イオン交換体を使用すればよい。

↓  
カラムの充填、平衡化……………カラム(ガラスなどで出来た中空の筒)に、イオン交換体を密に

充填し、タンパク質を吸着させる条件のpHに合わせた緩衝液で平衡化する。

↓  
サンプルの添加、吸着……………緩衝液で平衡化してあるイオン交換体にサンプルとなる

タンパク質液をapplyする。サンプルの調製時には、平衡化で用いた条件と同様な溶液となるように注意する。

溶出(分離)…………… 本実習では、イオン交換体と吸着したタンパク質と競合するイオン

(Cl<sup>-</sup>)の濃度を徐々に増加させることで、目的タンパク質を溶出させる「濃度勾配溶出法」を用いる。

(目的タンパク質のpIが大きく異なる場合)イオン交換体にpHを変化させた緩衝液を流し、吸着したタンパク質の電荷を変化させる。これによって、イオン交換体と静電的に吸着していたタンパク質は、それぞれ固有のpI値に従ってイオン交換体から遊離し、順に溶出する。

再生(イオン交換体の保存)……イオン交換体は結構高価。

毎回丁寧に処置すれば繰り返し使用可能。

### サンプルのアプライ(添加、吸着、溶出)

(注意)ピペットとビーカーは、プラスチック製品を用いる。ガラス製品は使用しないこと。

(注意)カラム、フラクションコレクターのセットアップはTAの協力で必ず行うこと。

- (1) 5 ml のプラスチックピペットを用いてサンプルを 15 mlアプライ。残りは保存。(重要!!)
- (2) buf.A で洗いこみ: 5 ml を2回。
- (3) buf. A を上の印線まで入れる。
- (4) 流路チューブの接続。buf. A , buf. B おのおの 400 ml。A、B のリザーバーを間違えないように。

#### 《カラムの運転条件》

1 drop / 1-2 sec、250 drops / tube、100 tubes

連通管が通じていることを確認すること。

#### 《buf.A の組成》

20mM TrisHCl pH7.5

1mM CaCl<sub>2</sub>

#### 《buf.B の組成》

20mM Tris-HCl pH7.5

1mM CaCl<sub>2</sub>

0.6M NaCl

#### 《buf.A の作り方》

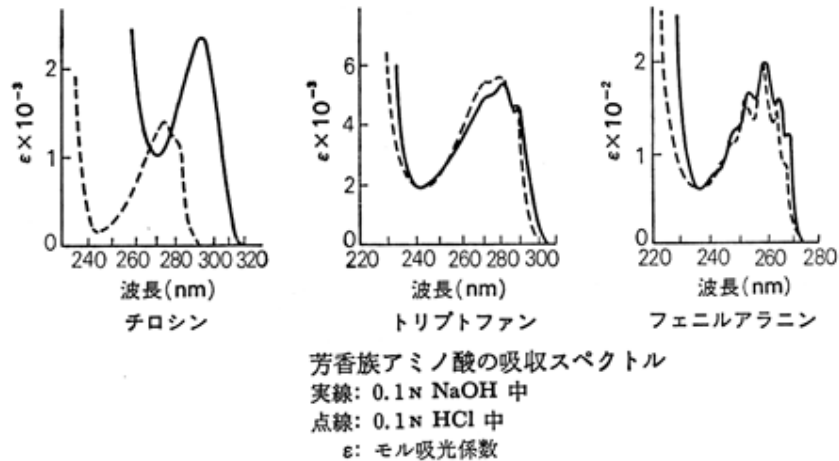
1M Tris-HCl pH7.5 20 ml

1M CaCl<sub>2</sub> 1 ml

に水を加えて1Lにする。

### <タンパク質の濃度とA280>

タンパク質はアミノ酸が重合したポリマーである。タンパク質を構成しているアミノ酸(残基)の中にはトリプトファン( $\epsilon_{\text{mM}}(280\text{nm}) = \text{約 } 5.5$ )、チロシン( $\epsilon_{\text{mM}}(280\text{nm}) = \text{約 } 1.5$ )、(フェニルアラニンも芳香環を持つが280 nmの吸収は低い)など芳香族側鎖を有するものを含むことが多い。これらのアミノ酸残基は紫外部に吸収極大を有するため、タンパク質も紫外吸収帯を持つことが多い。したがって、波長280nmの光がどれだけ吸収されたか(Abs 280nm)を測定するだけで、タンパク質濃度の指標にすることが可能である。このことを利用し、迅速にクロマトパターン(タンパク質が分離・溶出している様子)をみることができる。



<http://popup8.tok2.com/home2/rafysta/lesson/word/topic/top.html>から転載

### フラクションのA280の測定

- (1) 試験管にフラクション番号を書いてから測定する。
- (2) (ヒント)  $A_{280} \geq 1$ ならば buf.A で5~10倍希釈して再測定するとよい。
- (3) 吸光を示さないところは、1本おきに測定しても良いが、吸光を示すところは全数測定する。
- (4) 直ちにグラフにあらわす。測定時の希釈倍率を間違えないように。
- (5) 原液のサンプルは試験管に戻す。不要とわかるまでサンプルは廃棄しない。
- (6) カラムにアプライしたサンプル(冷蔵保存してあったもの)も、希釈して $A_{280}$ を測定する。
- (7) フラクションサンプルなどは低温室で保管する。

### <フラクションサンプルのアミラーゼ活性の測定>

触媒活性を有するタンパク質である酵素の量を表すには、mg や mol といった物理量ではなく、unit という触媒能力であらわす方が便利ことが多い。

通常、溶液1mlあたりの酵素量で表示するので、unit / ml が用いられる。

一方、タンパク質重量あたりの活性は、酵素に固有の値であり、比活性(specific activity: unit / mg)という。従って、酵素精製が進むにしたがって比活性は多くの場合上昇し、やがて固有値で一定となる様子が観察される。

### フラクションサンプルのアミラーゼ活性の測定

- (1) イオン交換クロマトグラフィーで分離された、どのフラクションにアミラーゼが多く含まれているか、各フラクションのアミラーゼ活性を測定する(活性測定法は、「未知試料の活性測定」と同じ。適当な希釈倍率のヒント無し)。
  - (2) クロマトパターンでピークの頂上からすそ野にかけて順番に測定し、結果は A280 のグラフに重ねて表示する。
  - (3) 冷蔵保存してあった、最初にカラムにアプライしたサンプルの活性も測定する。
  - (4) 最初、カラムにアプライしたアミラーゼが、どのフラクションに何%回収できたか求める。
  - (5) 活性のトップピークにおける比活性を、A280=1 を 0.5mg/mlとして算出する。2種類のアミラーゼの比活性を比較する。
- 《注意》基質(アミロース)に酵素(サンプルや唾液)を決して混入させないこと。基質はプラスチックピペットで取ること。酵素、フラクションの希釈は、buf.Aを用いること。

### フラクションの液量の測定

活性もなく吸光も示さないようなフラクションを 10 本選び、その液量をメスシリンダーで測りフラクションあたりの液量を計測する。この液量を用いて、今回のカラムクロマトグラフィーに供されたタンパク質総量と精製された酵素との量的関係を算出する。

#### <ポリアクリルアミドゲル電気泳動>

イオン交換クロマトグラフィーで分離した酵素(タンパク質)の純度検定、及び2種類のアミラーゼの帰属・同定を行う。

タンパク質の電荷と分子量の違いにより分離する手段の1つとして、電気泳動法を用いる(塚田が10月3日の講義で解説しました。そのときのプリント資料などを参考にしてください)。

今回の実習では、酵素の触媒活性が保持された条件での電気泳動(native PAGE)を行い、タンパク質染色法と活性染色法により、目的タンパク質の泳動バンドを可視化する。

#### 《各溶液の組成》

solution. a (soln. a)	1.5 M Tris-HCl pH8.8 0.48 %(v/v) TEMED
soln. b	0.375 M Tris-HCl pH6.8 0.3%(v/v) TEMED
soln. c	30 %(w/v) アクリルアミド溶液(30% T, 2.7% C)
soln. d	0.2 %(w/v) 過硫酸アンモニウム溶液

running buf.	3 g/L Tris 14.4 g/L glycine
loading buf.	22.5 ml soln. b 19.5 ml グリセリン 3.0 ml 0.05 % (w/v) プロモフェノールブルー (BPB)
染色液	0.25% (w/v) クーマシーブリリアントブルー (CBB) を メタノール:酢酸:純水 (9:2:9, v/v) に溶かす。
脱染液	メタノール:酢酸:純水 (3:1:6, v/v)

### 電気泳動1. separating gelゲルの作製

- (1) ガラス板、シリコンゴム、クリップで泳動板を組み立てる。
- (2) コームを泳動板上部にセットし、その櫛状の部分の下端からおよそ1cm のところに油性マジックでマークする。
- (3) 水とパスツールピペットを用意する。
- (4) 100 ml のプラビーカーに以下の順で混合する。
  - soln. a 10 ml
  - soln. c 10 ml
  - soln. d 20 ml
- (5) 泡立でないようによく混ぜ、マークした位置まで泳動板に流し込む。
- (6) パスツールピペットで水を穏やかに重層し、固まるまで待つ。

### 電気泳動2. stacking gelゲルの作製

- (1) separating gel が固化すれば重層している水を除く。
- (2) 100 ml のプラビーカーに以下の順で混合する。(以下、速やかに行うこと)
  - soln. b 5 ml
  - soln. c 2.5 ml
  - soln. d 7.5 ml
- (3) 泡立でないようによく混ぜ、泳動板に流し込み、コームを装填し、静かに固まるまで待つ。

### 電気泳動3. ゲルにアプライするサンプルの調製

A280 = 1 程度に希釈したフラクション	150 $\mu$ L
loading buf.	50 $\mu$ L

#### 電気泳動4. ゲルにサンプルをアプライ

タンパク染色用ゲルには、 30  $\mu$ L/レーン  
活性染色用ゲルには、 15  $\mu$ L/レーン  
アプライする。

ゲルにアプライするサンプルとそのレーン番号

レーン番号	サンプル名
1.	カビ由来のアミラーゼ
2.	バクテリア由来のアミラーゼ
3.	カラムにアプライしたサンプル(奇数班)
4.	ピーク1(奇数班)
5.	ピーク2(奇数班)
6.	カラムにアプライしたサンプル(偶数班)
7.	ピーク1(偶数班)
8.	ピーク2(偶数班)
9.	フリー(誰かの唾液など)
10.	フリー

#### 電気泳動5. 電気泳動の条件

150 V 定電圧(constant voltage), BPB がゲル下端に来るまで泳動させる。  
泳動時間が終了した後、流し台でゲルをガラス板から取り出す。このときに4隅のどこかを目印としてカットすると表裏や上下を判断するときに役立つ。取り外すとき、ゲルは破れやすいので注意。

#### 電気泳動6. 染色

タンパク質のCBB染色(脱染はTAが行う)

染色液にゲルをつける(~1時間)。手のタンパク質も染めてしまわないよう手袋を着用する。  
水洗後、脱染液に交換。適宜、脱染液を新しく入れ替え、1晩脱染。  
脱染の状況を見て、さらに脱染液を交換してバンドがはっきり確認できるように脱染(1晩)。

活性染色

ゲルを可溶性でんぷん溶液につけ、40°Cで10分間反応させる(酵素が反応する時間)。  
水洗後、ヨーン液をかける。このときの酵素反応で生成する産物はヨーン液により呈色しない。



## 実習2: $\alpha$ -グルコシダーゼを用いた、酵素反応の性質

触媒活性を有するタンパク質を酵素という。この実習では $\alpha$ -グルコシダーゼの酵素反応を題材として選び、反応速度論的アプローチによる理解を目指す。また、酵素の活性(機能)と物性の関係を調べる。本実習では活性を指標にした酵素の熱安定性を採り上げ、タンパク質分子の熱安定性分析を実際に行う。

### 《各溶液の組成》

$\alpha$ -グルコシダーゼ(酵素液はすべて、常に氷冷で扱うこと。)

50 mM リン酸緩衝液( pH 7.0 )に溶解

希釈は、50 mM リン酸緩衝液( pH 7.0 )

比活性 120 unit / mg

分子量 52,000

基質: 20 mM p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucoside

分解産物の p-nitrophenol の 410 nm における分子吸光係数は、 $10,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

水で希釈

室温

緩衝液: 150 mM リン酸緩衝液( pH 7.0 )

酵素の希釈には、この緩衝液を水で 3 倍希釈して用いる。

阻害剤: 100 mM Tris-HCl pH 7.0

水で希釈する。

### 《活性測定》

150 mM リン酸緩衝液 1 ml

水 900  $\mu$ l

基質 1 ml

酵素 100  $\mu$ l

(1) 上記 3 ml を試験管内で手早く混合し、光度計のセルに全量をすばやく移し、410 nm の吸光度の増加を分光光度計で測定する。

(2) 酵素反応の Tris による阻害実験のときは、水 900  $\mu$ l の代わりに水 800  $\mu$ l + Tris 100  $\mu$ l を加える。

### 《酵素の単位》

1分間に 1  $\mu$ mol の基質を分解する酵素量を 1 unit とする。

### 実習2-1 酵素活性の測定

一定の基質濃度[S]で酵素濃度[E]を10倍から100倍の間に希釈し、それぞれの希釈率での反応速度 $v$ を測定し、反応速度が、酵素濃度に比例することを観察する。このグラフから酵素活性( unit / ml )を求める。さらに、酵素の分子量と比活性の値を用いて酵素濃度( M )を求める。各班に配られた酵素溶液は、まず10倍希釈し、そこから100倍までの希釈倍率の酵素液を作製するとデータが揃いやすい。

横軸に酵素の希釈率の逆数、縦軸に反応速度をプロットすれば、希釈倍率が1倍のときの反応速度が求められる。酵素の活性の単位 unit は、反応速度によって決められるので、希釈倍率1倍での酵素活性が求められる。

### 実習2-2 Lineweaver-Bulk plot の作成

基質濃度を変化させて反応速度を測定し、基質濃度[S]に対し反応速度 $v / [E]$ をプロットする。そのグラフから $K_m$ の値を大まかに推定する。基質濃度が $1/2 K_m \sim 4 K_m$ に入るような範囲で基質濃度を変化させて反応速度を測定し、Lineweaver-Bulk plot ( $1 / [S]$  に対し  $[E] / v$  をプロットする)を描く。

グラフより  $k_{cat}$  と  $K_m$  を求める。単位も明記すること。

### 実習2-3 酵素反応の Tris による阻害の観察

実習2-2において用いた最も薄い基質濃度を選択して、酵素反応液にいろいろな濃度の Tris を加え反応速度を測定する。Trisの希釈は $\times 10$ 倍、 $\times 20$ 倍、 $\times 40$ 倍、 $\times 80$ 倍、160倍希釈を試みると良い。その中に、酵素反応の速度が Trisを加えていないときの $1/2 \sim 1/3$ 倍になる Tris の濃度が含まれているであろう。上記の各希釈倍率のTris を加えた場合の反応速度を、実習2-2でL-B plot作製に用いた基質濃度(5-6種類)において測定する。Trisを加えない場合の速度は実習2-2で既に調べられているが、再度測定する。これらの結果をLineweaver-Bulk plotとして描く(結果として、各基質濃度に尽き、Trisの濃度を変えたときの反応速度データが得られる)。この測定結果を、横軸にTris濃度、縦軸に各Tris濃度における傾きの値( $K_m\{1 + [I]/K_i\} \cdot k_{cat}^{-1}$ )をプロットしたグラフを作製する。グラフの切片などから阻害の形式ならびに  $K_i$  を求める。

ここまでは酵素反応とその阻害剤の効果を、反応速度解析の手法で調べた。酵素の反応様式を理解するための典型的なアプローチであり、是非ともよく理解して欲しい。

以下では、タンパク質としての酵素分子の性質について調べる。耐酸性、耐圧性、耐変性剤、・・・など多くの性質があり、いずれも興味深い。今回は最も代表的な耐熱性について調べる。反応させる温度を変える(反応速度の温度依存性)のではなく、酵素を熱処理した結果どのような活性になったか、を調べる点に注意。

#### 実習2-4 耐熱性の観察

酵素液 1 ml を試験管に採り 30, 35, 40, 45 °Cに 20 分間保つ。20 分の熱処理の後、直ちに試験管を氷につけるとともに氷冷した 50 mM リン酸緩衝液(pH 7.0) を1 ml 加え、しばらく氷冷する。酵素活性を測定し、熱処理していない酵素液サンプルの活性値を 100 % とした相対値で表示する。

#### 実習2-5 熱失活の経時変化の観察

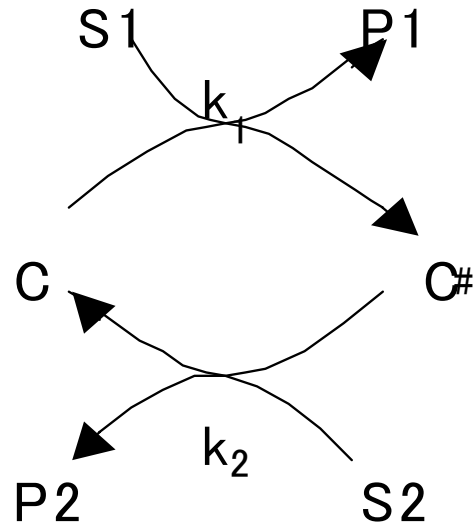
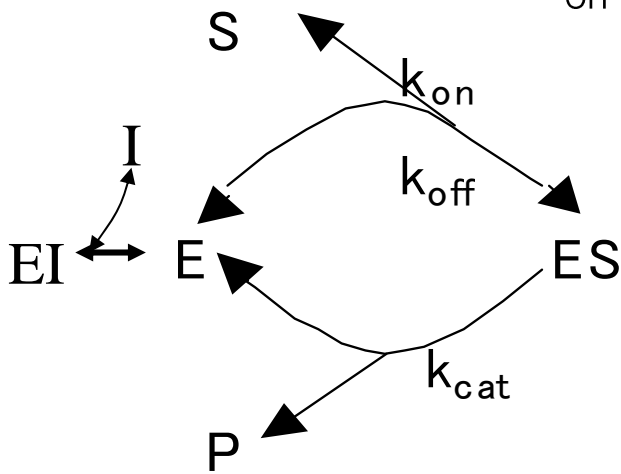
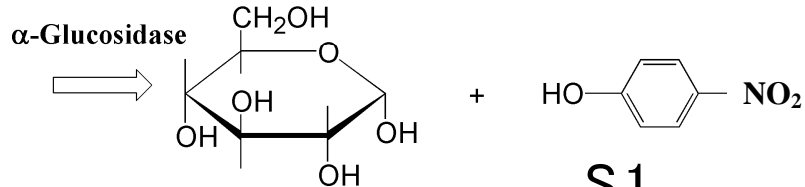
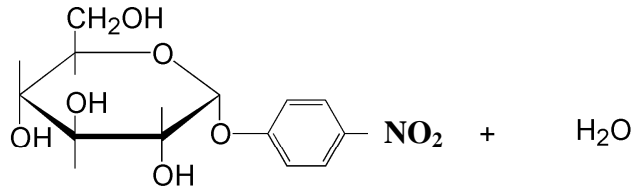
酵素液 1 ml を試験管5本に採り 45 °Cのインキュベーターに入れる。試験管を入れてから 2、5、10、15、20 分後に1本ずつ取り出し、直ちに氷につけるとともに氷冷した 50mM リン酸緩衝液(pH 7.0) を 1 ml 加え、しばらく氷上に保つ。

酵素活性を測定し、熱処理2分間のサンプルを 100 % とした相対値で活性の減少を片対数グラフに表示し、その傾きからそれぞれの熱処理における熱失活速度係数 $k_d$ を求める。

40°Cでは、2、15、30、45、60 分後

50°Cでは、1、5、10、15、20 分後

55°Cでは、1、2、4、6、8、10 分後



$$V = k_{cat}[ES] = k_{on}[S][E] \frac{k_{cat}}{k_{cat} + k_{off}}$$

$$V = k_1[S1][C] = k_2[S2][C^\#]$$

$$K_I = \frac{[I][E]}{[EI]}$$

$$[C]_0 = [C^\#] + [C]$$

$$[E]_0 = [ES] + [E] + [EI]$$

$$= [ES] + [E] \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$$

$$= \frac{V}{k_{cat}} + \frac{V(k_{cat} + k_{off})}{k_{cat}k_{on}[S]} \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$$

$$= \frac{V}{k_2[S2]} + \frac{V}{k_1[S1]}$$

$$\frac{[E]_0}{V} = \frac{1}{k_{cat}} + \frac{K_m}{k_{cat}[S]} \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$$

$$\frac{[C]_0}{V} = \frac{1}{k_2[S2]} + \frac{1}{k_1[S1]}$$

$$V = \frac{k_{cat}[E]_0[S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}$$

$$V = \frac{k_2[C]_0[S1][S2]}{[S1] + k_2[S2]/k_1}$$

## 酵素化学実験(進化生命システム学領域)

### 学生実習レポートの手引き

1) 各班のデータは班員で統一し、下記の項目をもらさないこと。有効数字に気を配ることを忘れないように。

#### <前半の実習>

タイトルと軸の名前と単位が明記されたグラフ、  
電気泳動の写真(レーンごとのサンプルの特定)、実験の結果得られた酵素濃度、  
溶出ピークフラクションの比活性、  
2つのピークから合計した収率(タンパク質・酵素活性)

#### <後半の実習>

タイトルと軸の名前と単位が明記されたグラフ、  
求められた酵素活性と、求めた計算の考え方、  
 $k_{cat}$ 、 $K_m$  の値、求めた計算の考え方、  
Tris による酵素反応阻害の様式と  $K_i$

2) その他、下記の項目は加点要素となるかもしれない。

1. 実習の目的や背景の理解度。実習で用いた計算法などの背景の勉強成果。
2. レポートをまとめる上でのオリジナルな工夫。図の見易さや、データの扱い。
3. 科学的に妥当な考察(感想文は不要)。

### 実習2-5 Arrhenius plotの作製と熱失活反応における活性化エネルギー (Option)

酵素液 1 ml を試験管5本に採り 45 °Cのインキュベーターに入れる。試験管を入れてから 2、5、10、15、20 分後に1本ずつ取り出し、直ちに氷につけるとともに氷冷した 50mM リン酸緩衝液( pH 7.0 ) を 1 ml 加え、しばらく氷上に保つ。

酵素活性を測定し、熱処理2分間のサンプルを 100 % とした相対値で活性の減少を片対数グラフに表示し、その傾きからそれぞれの熱処理における熱失活速度係数 $k_d$ を求める。

40°Cでは、2、15、30、45、60 分後

50°Cでは、1、4、8、12、16 分後

55°Cでは、1、2、4、6、8、10 分後

縦軸 $\log k_d$ 、横軸に処理した温度(絶対温度)の逆数をとりグラフを作製する。得られるグラフの傾きから熱失活過程の活性化エネルギー $E_A$ を求める。R=1.98 cal/mol/degとする。

Arrheniusの式を以下に示す。Tは絶対温度、Rはガス定数、 $E_A$ は活性化エネルギー。

$$\frac{d}{dT} (\ln k_d) = \frac{E_A}{RT^2} \therefore \frac{d(\ln k_d)}{d(\frac{1}{T})} = \frac{E_A}{R} \quad \text{または、} \quad k_d = Ae^{-\frac{E_A}{RT}}$$