

Übungen in physikalischer Chemie für B.Sc.-Studierende	
Versuch Nr.: W11	Version 2019 (210819)
Kurzbezeichnung: Enzymkinetik	

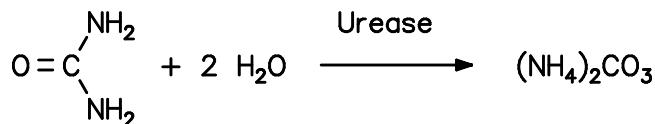
Enzymatische Hydrolyse von Harnstoff

Aufgabenstellung

Die enzymkatalysierte Hydrolyse von Harnstoff ist durch Messung der Zunahme der elektrischen Leitfähigkeit der Harnstofflösungen (0,005 M, 0,0075M, 0,01M, 0,05M) bei einer Messtemperatur von 25 °C von zu verfolgen. Die Michaelis-Menten-Konstante K_M und die Maximalgeschwindigkeit v_{MAX} sind zu bestimmen.

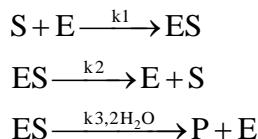
Grundlagen

Die enzymatische Hydrolyse von Harnstoff erfolgt nach der Bruttoreaktionsgleichung:



Obwohl Reaktionen in Lösung prinzipiell reversibel verlaufen, liegt das Gleichgewicht hier praktisch vollständig auf der Seite der Reaktionsprodukte, weswegen ausnahmsweise auf die Formulierung der Rückreaktion verzichtet werden kann.

Wie bei enzymkatalysierten Reaktionen als Vereinfachung üblich, wird der Ablauf der Reaktion zumindest im Anfangsbereich ($t \rightarrow 0$) durch drei Elementarreaktionen beschrieben, wobei hier gleichzeitig die durch den großen Überschuss bedingte Konstanz der Wasserkonzentration berücksichtigt wird:



(S=Harnstoff, E=Urease, P=Produkt {Ammoniumcarbonat})

Die differentiellen Zeitgesetze für die einzelnen Reaktionen werden nach denselben Regeln wie für einfache irreversible Reaktionen gebildet, wobei allerdings jede Reaktion eine eigene Umsatzvariable erhält:

$$\begin{aligned} \frac{dx_1}{dt} &= k_1[S][E] \\ \frac{dx_2}{dt} &= k_2[ES] \\ \frac{dx_3}{dt} &= k_3[ES] \end{aligned}$$

Bei komplexen Reaktionen wird nun meist nach der „Bruttogeschwindigkeit“ v gefragt, also der Geschwindigkeit, mit der sich das Reaktionsprodukt bildet.

Da

$$[P] = x_3$$

ist

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{dx_3}{dt} = k_3[ES]$$

Der Harnstoff-Urease-Komplex (Enzym-Substrat-Komplex) ES ist aber hochreaktiv und daher analytisch nur schwer zu erfassen. Andererseits ermöglicht dessen hohe Reaktivität aber auch die Annahme einer wesentlichen Vereinfachung: Bei reaktiven Zwischenprodukten kann man davon ausgehen, dass deren Konzentration bereits kurze Zeit nach dem Start der Reaktion dafür ausreicht, dass jedes neu gebildete Molekül praktisch sofort weiterreagiert. Die Konzentration reaktiver Zwischenprodukte bleibt somit nach einer kurzen Anlauf- und Bildungsphase (pre-steady-state) auf niedrigem Niveau praktisch konstant (Quasistationarität, steady-state):

$$\frac{d[ES]}{dt} \approx 0$$

Da andererseits

$$\begin{aligned} [ES] &= x_1 - x_2 - x_3 \\ \frac{d[ES]}{dt} &= \frac{dx_1}{dt} - \frac{dx_2}{dt} - \frac{dx_3}{dt} = k_1[S][E] - k_2[ES] - k_3[ES] \end{aligned}$$

gilt bei Annahme der Quasistationarität:

$$k_1[S][E] - k_2[ES] - k_3[ES] \approx 0$$

Aufgrund der gegenüber den Substratkonzentrationen äußerst geringen Enzymkonzentration kann die Konzentration des gebundenen Enzyms ES nicht gegenüber der Gesamtkonzentration des Enzyms vernachlässigt werden, so dass auch die Enzyambilanz zu berücksichtigen ist:

$$\begin{aligned} [E]_0 &= [ES] + [E] \\ [E] &= [E]_0 - [ES] \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} k_1[S]([E]_0 - [ES]) - k_2[ES] - k_3[ES] &\approx 0 \\ [ES] &= \frac{[E]_0[S]}{[S] + K_M} \end{aligned}$$

Die Michaelis-Menten-Konstante K_M wird also folgendermaßen definiert:

$$K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

Setzt man nun die Beziehung für ES in die Gleichung für die Bruttogeschwindigkeit ein und berücksichtigt, dass die gesamte Herleitung für $t \rightarrow 0$ gilt, erhält man die *Michaelis-Menten-Gleichung*:

$$v_0 = \frac{k_3 [E]_0 [S]_0}{[S]_0 + K_M}$$

bzw.

$$v_0 = \frac{v_{\text{Max}} [S]_0}{[S]_0 + K_M}$$

$$v_{\text{Max}} = k_3 [E]_0$$

Der Ausdruck „Maximalgeschwindigkeit“ (v_{Max}) ergibt sich daraus, dass $v_0 \rightarrow k_3 [E]_0$, wenn $[S]_0 \gg K_M$. Die Geschwindigkeitskonstante k_3 wird auch als „turnover number“ (Wechselzahl) bezeichnet, da sie die Anzahl der Substratmoleküle angibt, die maximal pro Zeiteinheit durch *ein* Enzymmolekül umgesetzt werden können.

Die Bestimmung der Parameter v_{Max} und K_M der Michaelis-Menten-Gleichung setzt nun die Ermittlung von Anfangsgeschwindigkeiten als Funktion der Anfangssubstratkonzentrationen bei jeweils konstanter Enzymkonzentration voraus.

Im einfachsten Falle wird für jede gegebene Anfangssubstratkonzentration die Produktbildung als Funktion der Zeit verfolgt und der Anstieg der Tangente im $[P]$ -über- t -Diagramm für $t = 0$ ermittelt.

Literatur:

C. Czeslik, H. Seemann und R. Winter, Basiswissen Physikalische Chemie, Vieweg+Teubner, Wiesbaden, 3. Auflage, 2009, Kap. 7.5.6.
 Peter W. Atkins und Julio de Paula, Kurzlehrbuch Physikalische Chemie 4. vollständig überarbeitete Auflage, WILEY-VCH Verlag 2008.
 Y. Qin, J. M. S. Cabral, Applied Biochemistry and Biotechnology, 49(1994)217

Vorbereitungsfragen

Die Urease ist ein Enzym, das zwei Substrate (H_2O , Harnstoff) zur Reaktion bringt. Warum kann man dennoch die für Einsubstratreaktionen gültige Michaelis-Menten-Gleichung zur Beschreibung der Enzymkinetik verwenden?

Informieren Sie sich über den Begriff der „Enzymaktivität“. Wie kann die Enzymkonzentration durch Aktivitätsmessungen bestimmt werden, und was ist dabei zu beachten?

Durchführung

0. Falls noch nicht geschehen: Thermostat einschalten und eine Temperatur von 25 °C einstellen

1. Die Büretten mit der 0,1M Harnstofflösung und mit VE-Wasser füllen (nach Verwendung zur Befüllung - Bürettentrichter wieder entfernen!)
2. Doppelmantelgefäß gründlich spülen und mit VE-Wasser füllen. Wenn die Temperatur im Bereich von 25 °C (+- 0,5 K) liegt, wird die Leitfähigkeit abgelesen und notiert. Spätestens während der Temperierung ist die Tabelle auf dem Datenblatt auszufüllen und einem Praktikumsmitarbeiter vorzulegen
3. Die erste Harnstofflösung im Doppelmantelgefäß ansetzen und temperieren (Rührwerk einschalten).

Zugleich das Leitfähigkeitsmessgerät zur Aufnahme der ersten Messreihe vorbereiten (ausführliche Anleitung dazu am Arbeitsplatz). Besonders wichtig ist es, die Eingabe der Versuchsnummer zu kontrollieren. Die Messdauer beträgt 10 min.

- Wenn die Temperatur im Bereich von 25 °C (+- 0,5 K) liegt, wird das Enzym mit einer Injektionsspritze zugegeben. Das Injektionsvolumen erfragen Sie bitte bei den Praktikumsmitarbeitern.

DIE AUFNAHME DER DATEN ABER ERST NACH 30 s STARTEN !

- Für die weiteren Harnstofflösungen sind Pkt. 3 - 4 sinngemäß abzuarbeiten. Das Doppelmantelgefäß nach jedem Versuch gründlich spülen und mit Zellstoff austrocknen.
- Zum Schluss ist die Leitfähigkeit der 0,01 M $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ -Kalibrierlösung zu ermitteln (vgl. Pkt. 2)
- Anschließend erfolgt das Auslesen der Daten und die Vorauswertung (ausführliche Anleitung dazu liegt am Computer).

Hinweise zur Versuchsauswertung

Durch das Auswerteprogramm wird der Verlauf der Leitfähigkeit als Polynom 4. Grades approximiert.

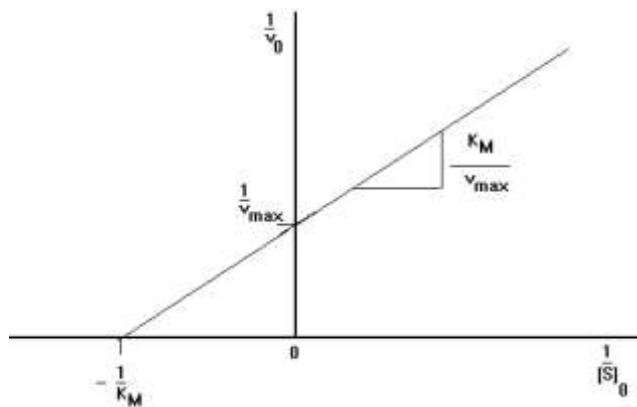
Hieraus ist der anfängliche Leitfähigkeitsanstieg $\left(\frac{dG}{dt}\right)_{t \rightarrow 0}$ zu berechnen und mit Hilfe der

Leitfähigkeit der 0,01M $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ -Lösung nach dem „Dreisatz“ in die Anfangsgeschwindigkeit v_0 in $\mu\text{mol}/(\text{l min})$ umzurechnen, so dass die folgende Wertetabelle entsteht:

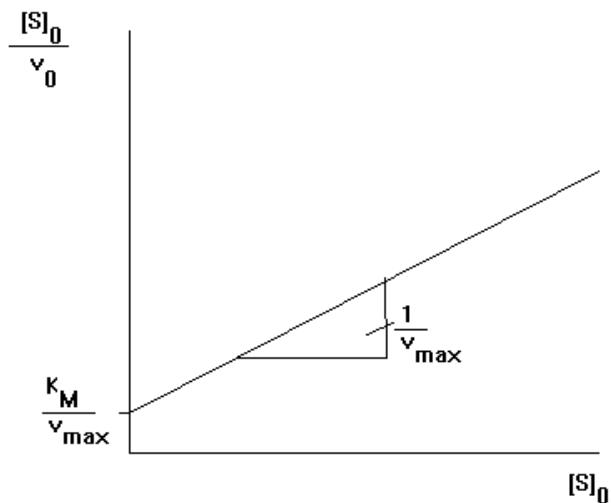
$[(\text{NH}_2)_2\text{CO}]_0$ mol/l	$\left(\frac{dG}{dt}\right)_{t \rightarrow 0}$ $\mu\text{S}/\text{min}$	$[(\text{NH}_2)_2\text{CO}]_0$ $\mu\text{mol}/\text{l}$	$v_0 =$ $\left(\frac{d[(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3]}{dt}\right)_{t \rightarrow 0} = \left(\frac{\left(\frac{dG}{dt}\right)_{t \rightarrow 0}}{G_{0,01\text{M}(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3}}\right) * 10^4 \frac{\mu\text{mol}}{\text{l}}$ $\frac{\mu\text{mol}}{\text{l min}}$
0,005			
0,0075			
0,01			
0,05			

Für die weitere Auswertung sind dann zweckmäßigerweise die Daten in den beiden rechten Spalten der Tabelle zu nutzen.

Diese Daten sind einmal nach LINEWEAVER-BURK



und zum anderen nach HANES



zu linearisieren und jeweils die Maximalgeschwindigkeit und die Michaelis-Menten-Konstante zu bestimmen.

Nachbereitungsfragen

- Berechnen Sie die Aktivität des eingesetzten Enzyms in U.
- Welches der beiden Linearisierungsverfahren ist für die quantitative Ermittlung von v_{Max} und K_M geeigneter?
- Die Urease unterliegt bei noch höheren als den eingesetzten Harnstoffkonzentrationen einer Substratinhibierung. Welchem Inhibierungstyp ist diese zuzuordnen? Wie lautet dafür die entsprechend modifizierte Michaelis-Menten-Gleichung?

Symbole

Symbol	Bezeichnung
x	Umsatzvariable
t	Zeit
k	Geschwindigkeitskonstante
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
v_0	Anfangsgeschwindigkeit
v_{Max}	Maximalgeschwindigkeit
G	Leitfähigkeit (Leitwert)

Übungen in physikalischer Chemie für B.Sc.-Studierende

Datenblatt: Enzymkinetik

Gruppe:

Datum:.....

Anmeldung nicht vergessen!

Die Harnstofflösung wird mit Hilfe einer Bürette aus der 0,1 M Stammlösung hergestellt, wobei aus einer zweiten Bürette so viel VE-Wasser zuzugeben ist, dass ein Lösungsvolumen von 100 ml resultiert.

Zu Versuchsbeginn bitte die nachfolgende Tabelle komplettieren und abzeichnen lassen.

$[(\text{NH}_2)_2\text{CO}]_0$ in mol/l	v der 0,1 M $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ in ml	v des VE-Wassers in ml
0,005		
0,0075		
0,01		
0,05		

Von den Praktikumsmitarbeitenden vorgegebenes Injektionsvolumen der Enzymlösung:

$v_{\text{Inj}} = \dots \mu\text{l}$

.....
(1. Unterschrift !)

$G_{(\text{H}_2\text{O})} = \dots \mu\text{S}$

$[(\text{NH}_2)_2\text{CO}]$ in mol/l	Messreihe Nr.
0,005	
0,0075	
0,01	
0,05	

$G_{(0,01 \text{ M } (\text{NH}_4)_2\text{CO}_3)} = G_{(\text{Kalibrierlösung})} - G_{(\text{H}_2\text{O})} = \dots \mu\text{S}$

Der Versuch wurde ordnungsgemäß durchgeführt, die Daten in das Excel-Formular eingetragen und der Arbeitsplatz übergeben.

.....
(2. Unterschrift)

Abmeldung nicht vergessen!