

Versuch 12: Kinetik der enzymatischen Hydrolyse von Harnstoff

1. Theoretische Grundlagen

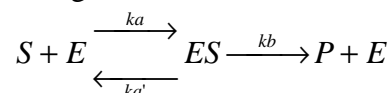
In diesem Versuch wird eine enzymatische Katalyse betrachtet.

Ein Enzym ist ein Biokatalysator, der die biochemischen Vorgänge durch Senkung der notwendigen Aktivierungsenergie ermöglicht, sie beschleunigt u. in eine gewünschte Richtung ablaufen lässt, ohne dabei selbst verändert zu werden.

Durch ihre Eiweißstruktur sind sie befähigt, den Stoff, dessen Reaktion sie steuern sollen, zu erkennen (Substratspezifität).

Bei so einer Art von Reaktion wird das Edukt (=Substrat S) im ersten Schritt an das Enzym (E) gebunden. Dabei entsteht ein sog. aktivierter Komplex (ES). Im zweiten Schritt zerfällt der Komplex in das Produkt (P) und das Enzym, das nun wieder ein weiteres Edukt Molekül aufnehmen kann.

Die Allgemeine Reaktionsgleichung lautet:



Die Reaktion vom Edukt zum aktivierten Komplex und umgekehrt kann in beide Richtungen ablaufen. Die Rückreaktion vom Produkt zum Komplex ist hingegen gehemmt und kann vernachlässigt werden. Dies ist auf das Schlüssel-Schloss-Prinzip der Enzyme zurückzuführen (Substratspezifität)

In Bezug auf die Reaktionsordnung bzw. -geschwindigkeit können zwei Fälle unterschieden werden.

Erstens das Substrat liegt im Überschuss vor. Dann findet eine Sättigung des Enzyms statt. Das bedeutet die Reaktionsgeschwindigkeit wird zu Beginn ansteigen und dann wenn jedes Enzymmolekül ein Edukt aufgenommen hat stagnieren (v_{\max}).

Nun hängt die Geschwindigkeit der Reaktion nur noch vom Zerfall des aktivierten Komplexes ab und nicht mehr von der Konzentration des Substrats. Die Reaktionsordnung ist also in Bezug auf die Substratkonzentration Null.

Im zweiten Fall liegt das Substrat nicht im Überschuss vor, deswegen tritt keine Sättigung des Enzyms ein und die Reaktionsordnung ist bezüglich des Substrats eins.

Dieser Mechanismus der enzymatischen Katalyse wird als Michaelis-Menten-Mechanismus bezeichnet.

Mit der folgenden Michaelis-Menten-Gleichung ist es möglich die Geschwindigkeit der Reaktion in Abhängigkeit der Substratkonzentration zu berechnen. Voraussetzung ist allerdings eine konstante Enzymkonzentration.

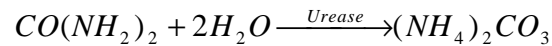
$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

K_M ist die sog. Michaelis Konstante. Sie setzt sich zusammen aus:

$$K_M = \frac{k_b + k_{a'}}{k_a}$$

Sie gibt die Konzentration an Substrat an, bei der die die Geschwindigkeit genau $\frac{v_{\max}}{2}$ beträgt.

Die in diesem Versuch betrachtete enzymatische Hydrolyse von Harnstoff funktioniert nach folgender Gleichung:



Der Harnstoff mit Hilfe eines Enzyms zu Ammoniumcarbonat umgesetzt.

Durch die Bildung des Ammoniumcarbonats findet ein Anstieg der Leitfähigkeit statt, da es dissoziiert. Diese Veränderung wird gemessen.

2. Aufgabenstellung

2.1 Geräte/Chemikalien:

Konduktometer, LF-Messzelle, Thermostat und thermostatisierbares Messgerät, Magnetrührer und Kern, Messkolben, Vollpipetten
Ammoniumcarbonat, Harnstoff, Urease jeweils als wässrige Lösung

2.2 Durchführung:

Vor Beginn der Messungen ermitteln wir wieder die Zellkonstante (vgl. Versuch 10).

Danach wird eine Eichgerade mit Hilfe acht verschiedener Ammoniumcarbonatlösungen bei 25°C erstellt. Diese wird zur späteren Bestimmung der Konzentrationsänderung pro Zeit benötigt.

Wenn dies alles geschehen ist, fangen die eigentlichen Messungen an.

Es wird eine Verdünnungsreihe an Harnstofflösungen mit jeweils 100ml mit folgenden Konzentrationen hergestellt: 0,0025M, 0,005M, 0,0075M, 0,01M, 0,025M, 0,05M, 0,075M, 0,1M.

Nun wird die Urease abgewogen und mit 25ml Wasser aufgefüllt. Beim Umgang mit dem Enzym ist auf ständige Kühlung zu achten, da es sehr Temperatur empfindlich ist.

Die Harnstofflösungen werden vorgelegt und während der Zugabe des Enzyms wird die Messung gestartet. Zu jeder entstehenden Kurve wird eine Ausgleichsparabel erstellt. Die Steigung zum Zeitpunkt $t=0$ erhalten wird nicht wie im Protokoll angegeben durch das Anlegen einer Tangente, sondern durch die Bildung der ersten Ableitung an der Stelle $t=0$ (dies entspricht ja genau der Steigung).

2.3 Ergebnisse und Auswertung

Die ermittelte Zellkonstante beträgt: $C=0,906\text{cm}^{-1}$ bei einer Temperatur von 22°C.

Die aufgenommene Eichgerade befindet sich im Anhang. Ihre Steigung beträgt:

$$k = 119 \frac{mS \cdot l}{cm \cdot mol}$$

Die ermittelten Steigungen m zum Zeitpunkt $t=0$ der verschiedenen Harnstoffkonzentrationen sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Aus ihnen kann nun mit Hilfe der Eichgeraden die Anfangsgeschwindigkeit v_0 berechnet werden.

Beispielrechnung für 0,0025M:

Die Gleichung der Ausgleichsparabel lautet:

$$y = -0,00048 \frac{\text{mS}}{\text{cm} \cdot \text{s}^2} \cdot x^2 + 0,652 \frac{\text{mS}}{\text{cm} \cdot \text{s}} \cdot x + 3 \frac{\text{mS}}{\text{cm}}$$

Die erste Ableitung nach x lautet demnach:

$$y' = -0,00048 \frac{\text{mS}}{\text{cm} \cdot \text{s}^2} \cdot x + 0,652 \frac{\text{mS}}{\text{cm} \cdot \text{s}}$$

Zum Zeitpunkt x=0 gilt für diese Gleichung:

$$y' = m = 0,652 \frac{\text{mS}}{\text{cm} \cdot \text{s}}$$

Hieraus erhalten wir nun die Anfangsgeschwindigkeit durch Bildung des folgenden Quotienten:

$$v_0 = \frac{m}{k} = \frac{0,652 \frac{\text{mS}}{\text{cm} \cdot \text{s}}}{119000 \frac{\text{mS} \cdot \text{l}}{\text{cm} \cdot \text{mol}}} = 5,47899 \cdot 10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{l} \cdot \text{s}}$$

Konzentration c	m in $\left[\frac{\text{mS}}{\text{cm} \cdot \text{s}} \right]$	$v_0 = \frac{m}{k} \left[\frac{\text{mol}}{\text{l} \cdot \text{s}} \right]$
0,0025	0,652	5,47899E-06
0,005	0,859	7,21849E-06
0,0075	0,893	7,5042E-06
0,01	1,048	8,80672E-06
0,025	1,220	1,02521E-05
0,05	1,361	1,1437E-05
0,075	1,305	1,09664E-05
0,1	1,336	1,1479E-05

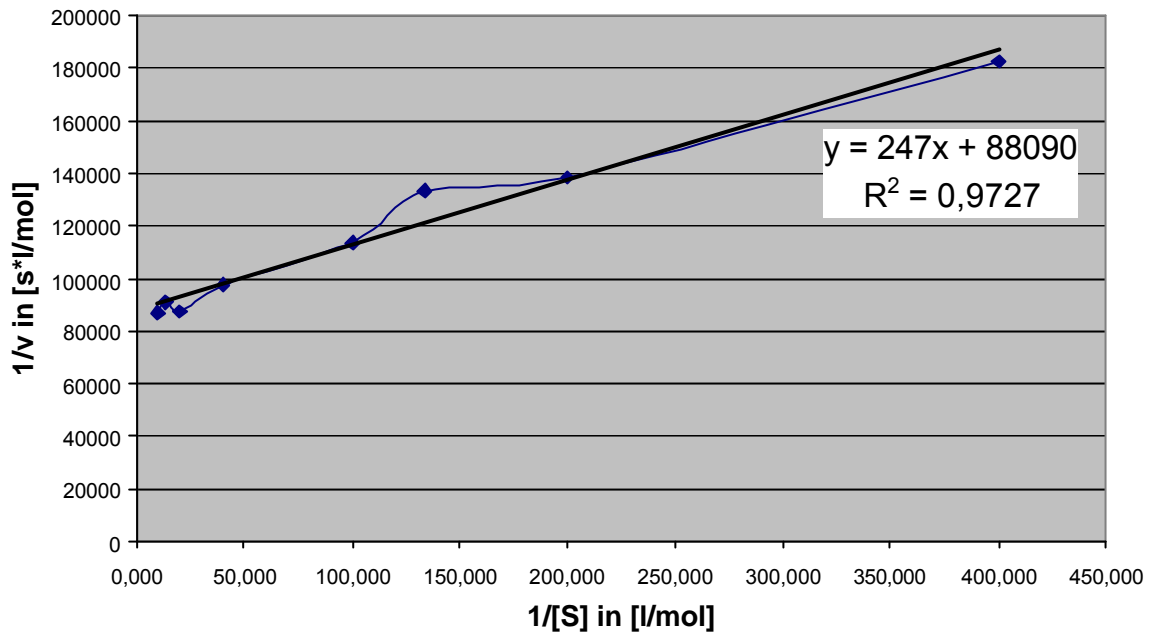
Diese ermittelten Anfangsgeschwindigkeiten werden nun gegen die Konzentration des Substrats aufgetragen und man erhält ein Michaelis-Menten-Diagramm (siehe Anhang).

Aus dieser Sättigungskurve lesen wir einen Wert für V_{max} und für K_{m} ab.

Wir erhalten schätzungsweise: $v_{\text{max}} \approx 1,145 \cdot 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{l} \cdot \text{s}}$ und $K_{\text{M}} \approx 0,003 \frac{\text{mol}}{\text{l}}$.

Durch Umrechnung der Michaelis-Menten-Gleichung nach drei verschiedenen Linearisierungen erhalten wir weitere Werte für v_{max} und K_{M} und bewerten diese auf ihre Genauigkeit hin. Hierdurch können wir bestätigen, dass es sich wirklich um einen Michaelis-Menten-Mechanismus handelt.

Linearisierung nach Lineweaver-Burk



Bei dieser Linearisierung wird der Kehrwert der Michaelis-Menten-Gleichung verwendet:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_{\max} \cdot [S]} + \frac{1}{v_{\max}}$$

Nun trägt man $1/v$ gegen $1/[S]$ auf und erhält die oben gezeigte Gerade, bei der der Y-Achsenabschnitt genau $\frac{1}{v_{\max}}$ und die Steigung $\frac{K_M}{v_{\max}}$ betragen.

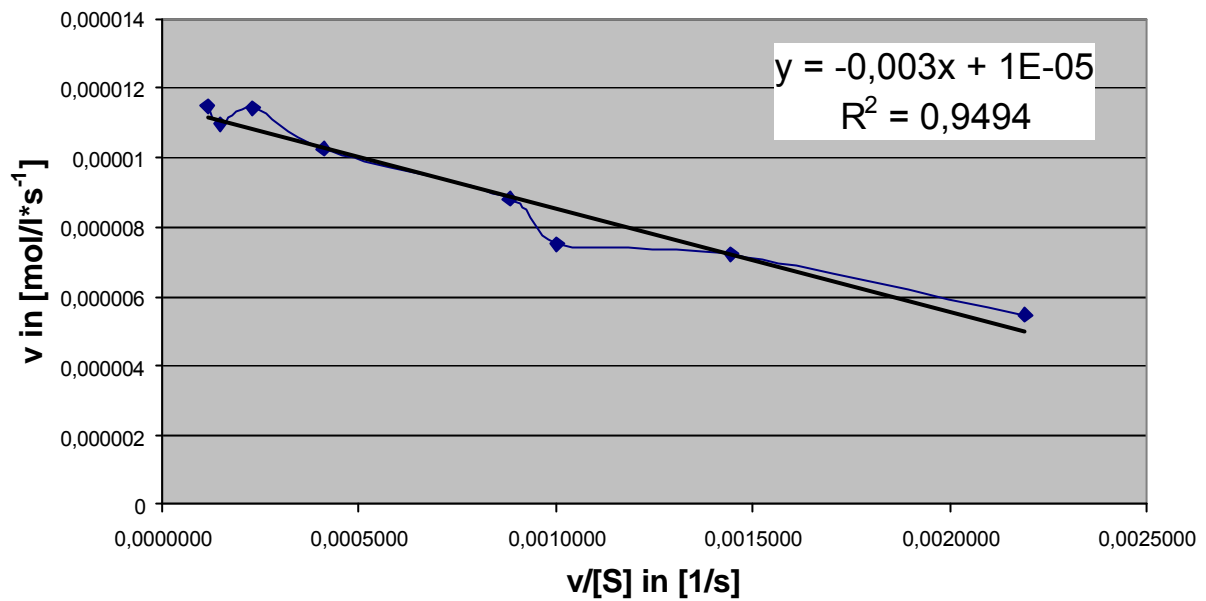
Man erhält also:

$$88090 \frac{s \cdot l}{mol} = \frac{1}{v_{\max}} \Rightarrow v_{\max} = 1,135 \cdot 10^{-5} \frac{mol}{l \cdot s}$$

$$247s = \frac{K_M}{v_{\max}} \Rightarrow 1,135 \cdot 10^{-5} \frac{mol}{l \cdot s} \cdot 247s = 2,804 \cdot 10^{-3} \frac{mol}{l}$$

Eadie-Hofstee liefert:

Linearisierung nach Eadie-Hofstee



Diesmal verwendet man die M-M-Gleichung in folgender Form:

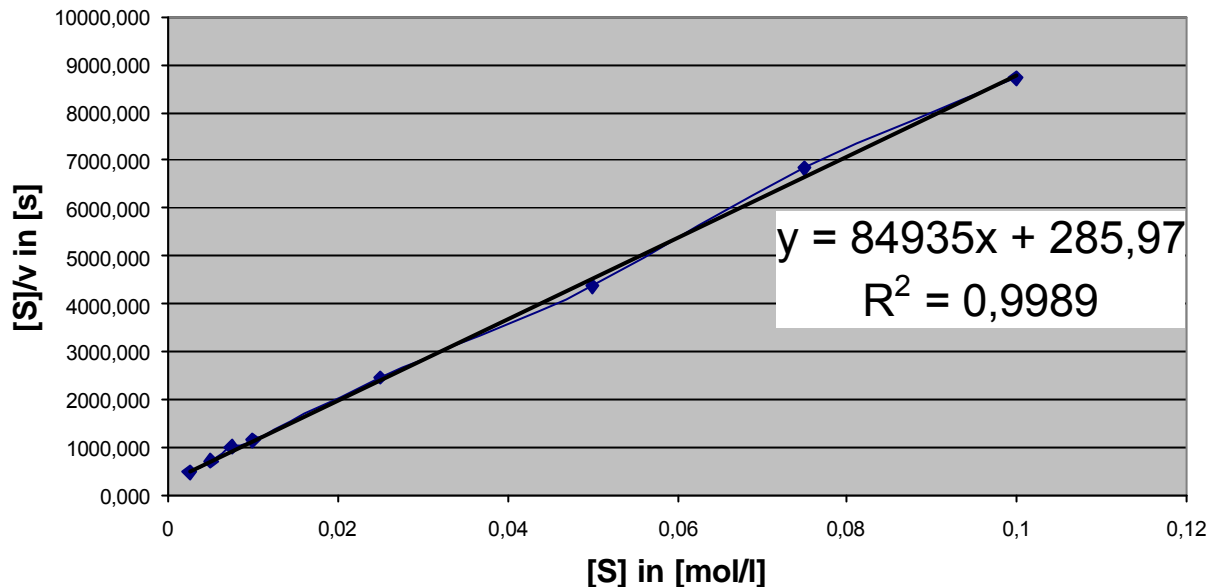
$$v = -K_M \cdot \frac{v}{[S]} + v_{\max}$$

Aus der oben erhaltenen Gleichung kann nun K_M direkt als negative Steigung abgelesen werden und v_{\max} ergibt sich direkt als Y-Achsenabschnitt.

Wir erhalten:

$$K_M = 0,003 \frac{\text{mol}}{\text{l}} \text{ und } v_{\max} = 1 \cdot 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{l} \cdot \text{s}}$$

Linearisierung nach Dixon-Hanes-Woolf



Diese Form der Linearisierung multipliziert den Kehrwert der M-M-Gleichung mit der Substratkonzentration [S]. Man erhält also folgende Gleichung:

$$\frac{[S]}{v} = \frac{K_M}{v_{\max}} + \frac{1}{v_{\max}} \cdot [S]$$

Nun trägt man $\frac{[S]}{v}$ gegen [S] auf und ermittelt aus dem oben gezeichneten Graphen die Werte für v_{\max} (Kehrwert der Steigung) und K_M .

Es gilt:

$$84935 \frac{s \cdot l}{mol} = \frac{1}{v_{\max}} \Rightarrow v_{\max} = 1,177 \cdot 10^{-5} \frac{mol}{l \cdot s}$$

$$285,97s = \frac{K_M}{v_{\max}} \Rightarrow K_M = 285,97s \cdot 1,177 \cdot 10^{-5} \frac{mol}{l \cdot s} = 3,367 \cdot 10^{-3} \frac{mol}{l}$$

Diese drei Linearisierungen sollen nun im Folgenden statistisch auf Ihre Zuverlässigkeit geprüft werden.

Hierzu benötigen wir ein paar Formeln. Zuerst wird die Streuung unserer Messwerte um die Regression berechnet:

$$S_{xy} = \sqrt{\frac{\sum_{YY}}{n-2}}$$

$$\sum_{YY} = \sum_{yy} - \frac{(\sum_{xy})^2}{\sum_{xx}}$$

$$\sum_{yy} = \sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}$$

$$\sum_{xx} = \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}$$

$$\sum_{xy} = \sum xy - \frac{(\sum x \cdot \sum y)}{n}$$

Mit Hilfe der Streuung S_{xy} können dann die Standardabweichung der Regressionskoeffizienten m und b nach folgenden Gleichungen berechnet werden:

$$S_m = \frac{S_{xy}}{\sqrt{\sum_{xx}}} \text{ und } S_b = S_{xy} \cdot \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{xx}}}$$

Lineweaver Burk

X 1/[S]	Y 1/v	Summe _{xx}	125020,8333
		Summe _{yy}	7841277577,7453
400,000	182515,337	Summe _{xy}	30880131,9279
200,000	138533,178	Summe _{yy}	213888426,2
133,333	133258,679	S _{xy}	5970,601
100,000	113549,618	S _m	16,886
40,000	97540,9836	S _b	2863,507
20,000	87435,709		
13,333	91187,7395		
10,000	87115,6662		

Eadie Hofstee

v/[S]	v=m/k	Summe _{xx}	0,0000038
0,0021916	5,47899E-06	Summe _{yy}	3,52015E-11
0,0014437	7,21849E-06	Summe _{xy}	-1,12291E-08
0,0010006	7,5042E-06	Summe _{yy}	1,78096E-12
0,0008807	8,80672E-06	S _{xy}	5,44818E-07
0,0004101	1,02521E-05	S _m	0,000280488
0,0002287	1,1437E-05	S _b	2,96162E-07
0,0001462	1,09664E-05		
0,0001148	1,1479E-05		

Dixen Hanes Woolf

Konzentration [S]	[S]/v		
0,0025	456,288	Summe_{xx}	0,0094844
0,005	692,666	Summe_{yy}	68492265,63
0,0075	999,440	Summe_{xy}	805,5532593
0,01	1135,496	Summe_{YY}	72780,57633
0,025	2438,525	S_{xy}	110,1367153
0,05	4371,785	S_m	1130,909263
0,075	6839,080	S_b	55,02297786
0,1	8711,567		

Es wird deutlich, dass bei der Linearisierung nach Eadie-Hofstee die geringsten Abweichungen auftreten. Diese ist also demnach am genauesten und am besten zur Berechnung von v_{\max} und K_M geeignet.

2.4. Fehlerbetrachtung:

Die Temperatur verursacht auch in diesem Fall wieder einen gewissen Fehler.

Wir haben unsere Messzelle zwar am Anfang geeicht, aber während des

Versuches war die Temperatur im Labor nicht ganz konstant.

Ein weiterer Faktor ist die Urease. Wir zwar immer unter den vorgeschriebenen

Bedingungen mit dem Enzym gearbeitet, aber eine geringe Erwärmung durch

den Transport, etc. konnten wir natürlich nicht ganz verhindern.

Ein gewisser Fehler ist natürlich auch bei der Eichkurve zu berücksichtigen, der

sich dann natürlich in die v_{\max} und K_M Werte fortsetzt.

Die aus der Michaelis Menten Kurve ermittelten Werte für v_{\max} und K_M konnten

nur abgeschätzt werden, dies führt natürlich auch zu einer erheblichen

Ungenauigkeit.