

Michaelis-Menten-Gleichung

Versuch K4

1 Aufgabe

Experimentelle Bestimmung der Kinetik der Zersetzung von Harnstoff durch Urease.

2 Grundlagen

Im Bereich der Biochemie spielen viele Katalysatoren eine wichtige Rolle, die von Zellen aufgebaut werden. Diese Katalysatoren werden als *Enzyme* bezeichnet. Ihre katalytische Wirkung ist nicht an das Vorhandensein lebender Zellen gebunden; sie entfalten ihre katalytische Aktivität vielmehr auch unabhängig vom lebenden Organismus.

Das Diamid der Kohlensäure ($\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}_2$) wird als Harnstoff bezeichnet. Die Urease ist ein Enzym, das in wässriger Umgebung Harnstoff in Kohlenstoffdioxid und Ammoniak spaltet, die in wässriger Umgebung der Protolyse unterliegen:



Die Reaktion zwischen dem Substrat Harnstoff (S) und dem Enzym Urease (E) erfolgt in zwei aufeinander folgenden Schritten:



Die Geschwindigkeitskonstante k_2 in Gl. 2 wird als *turnover*-Frequenz (deutsch auch *Wechselzahl* oder *Umsatzzahl*) bezeichnet.

Die Konzentration des intermediären Enzym-Substrat-Komplex [ES] wird durch folgendes quasistationäre Geschwindigkeitsgesetz beschrieben:

$$\frac{d}{dt}[\text{ES}] = k_1[\text{E}][\text{S}] - (k_{-1} + k_2)[\text{ES}] \stackrel{!}{=} 0. \quad (3)$$

Ferner ist

$$[\text{E}] + [\text{ES}] = [\text{E}]_0. \quad (4)$$

Die Geschwindigkeit der Bildung des Produkts (Ammoniumcarbonat) v kann daraus hergeleitet werden. Man erhält die Michaelis-Menten-Gleichung:

$$v = \frac{d[\text{P}]}{dt} = k_2 \cdot \frac{[\text{E}]_0 \cdot [\text{S}]}{K_M + [\text{S}]} \quad (5)$$

mit

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}. \quad (6)$$

Spezialfälle:

1. Ist $[\text{S}] \ll K_M$, so folgt aus Gl. 5 Proportionalität von v und $[\text{S}]$:

$$v = k_2 \cdot \frac{[\text{E}]_0 \cdot [\text{S}]}{K_M}. \quad (7)$$

Die Reaktion ist formal erster Ordnung bzgl. $[\text{S}]$.

2. Ist $[\text{S}] \gg K_M$, so ist in Gl. 5 v von $[\text{S}]$ unabhängig:

$$v = k_2 \cdot [\text{E}]_0. \quad (8)$$

Die Bildung des Produkts folgt einer Reaktion nullter Ordnung.

Zum Zeitpunkt $t = 0$ ist die Konzentration $[\text{S}]$ durch die Einwage an Harnstoff festgelegt. Daher können die Konstanten K_M und k_2 durch Messung der Anfangsgeschwindigkeit v_0 ermittelt werden:

$$v_0 = \left(\frac{d[\text{P}]}{dt} \right)_{t=0} = \frac{k_2 \cdot [\text{E}]_0 [\text{S}]_0}{[\text{S}]_0 + K_M}. \quad (9)$$

Der Kehrwert von Gl. 9 liefert graphisch aufgetragen den *Lineweaver-Burk-Plot*:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{v_{\max}} + \frac{1}{[\text{S}]_0} \cdot \frac{K_M}{v_{\max}}.$$

Die Auftragung des Kehrwertes der Anfangsgeschwindigkeit über der reziproken Ausgangs-

konzentration des Substrates (Harnstoff) liefert eine Gerade mit dem Ordinatenabschnitt $1/v_{\max}$ und der Steigung K_M/v_{\max} .

Für eine gegebene Konzentration $[E]_0$ ist die *maximale* Geschwindigkeit v_{\max} der Grenzwert für sehr hohe Konzentration an Substrat:

$$\lim_{[S] \rightarrow \infty} \left(\frac{d[P]}{dt} \right) = k_2[E]_0 = v_{\max}. \quad (10)$$

Für eine Substratkonzentration $[S]_0 = K_M$ erhält man aus Gl. 9 für v_0 :

$$[S]_0 = K_M \rightarrow v_0 = \frac{v_{\max}}{2}. \quad (11)$$

den Wert $v_{\max}/2$.

Leitfähigkeitsmessungen.– Harnstoff leitet in wässriger Lösung den elektrischen Strom vernachlässigbar wenig. Daher stammt die elektrische Leitfähigkeit κ der Lösung praktisch ausschließlich aus dem gebildeten Ammoniumcarbonat sowie aus der Leitfähigkeit der Urease. Die elektrische Leitfähigkeit der Lösung kann genutzt werden, um die Konzentration des Ammoniumcarbonats zu bestimmen. Von der gemessenen elektrischen Leitfähigkeit muss jedoch der Beitrag der Urease subtrahiert werden.

Die Kinetik des Systems kann charakterisiert werden, indem nach dem Zusammenbringen des Harnstoffs und des Enzyms die zeitliche Entwicklung der Leitfähigkeit $\kappa(t)$ gemessen wird. Die Konzentration an Harnstoff kann auf einfache Weise bestimmt werden, wenn man eine Verdünnungsreihe zum Kalibrieren ansetzt.

3 Arbeitsgeräte und Chemikalien

Arbeitsgeräte: Konduktometer *Cond 3210* ; temperierbares Becherglas; 10 Bechergläser (150 mL); Magnetrührer; Uhr; Waage, Thermometer, Pipetten.

Chemikalien: Harnstoff; Urease; Ammoniumcarbonat; KCl-Kalibrierlösung für das Konduktometer.

4 Messungen

Verwenden Sie für alle Versuche Reinst-Wasser (Millipore).

1. Setzen Sie zur Kalibrierung der Substratkonzentration eine Verdünnungsreihe mit Ammoniumcarbonatlösung an. Ermitteln Sie bei 25 °C die Leitfähigkeit wässriger Ammoniumcarbonatlösungen als Funktion der Konzentration. Nutzen Sie für Ihre Verdünnungsreihe die folgenden Konzentrationen in mol/L: $4 \cdot 10^{-3}$; $3 \cdot 10^{-3}$; $2 \cdot 10^{-3}$; $1 \cdot 10^{-3}$; $0,5 \cdot 10^{-3}$.
2. Stellen Sie 250 mL einer 0,1 M Harnstofflösung her.
3. Stellen Sie aus 0,1 M Harnstofflösung eine Verdünnungsreihe mit jeweils 100 mL der folgenden Konzentrationen in mol/L her: $0,5 \cdot 10^{-3}$; $1 \cdot 10^{-3}$; $1,5 \cdot 10^{-3}$; $2 \cdot 10^{-3}$; $3 \cdot 10^{-3}$; $4 \cdot 10^{-3}$; $6 \cdot 10^{-3}$; $8 \cdot 10^{-3}$; $1 \cdot 10^{-2}$.
4. Wiegen Sie 100 mg Urease ab und lösen Sie sie in 100 mL Wasser.
5. Kalibrieren Sie das Konduktometer *Cond 3210* mit Eichlösung (0.01 M KCl, $\kappa_{25^\circ\text{C}} = 1413 \mu\text{S/cm}$), falls notwendig (Rücksprache mit Assistent/in).
6. Gehen Sie wie folgt mit jeder Harnstofflösung vor: Die Harnstofflösung wird in ein auf 25 °C temperiertes Reaktionsgefäß mit Magnetrührer gegeben. Die Messung darf erst durchgeführt werden, wenn die Temperatur der Lösung 25 °C beträgt. Messen Sie die Leitfähigkeit der Harnstofflösung *vor* der Zugabe des Enzyms. Danach werden *unter Rühren* aus einer Pipette 10 mL der Ureaselösung hinzu gegeben. Es wird mit einem Leitfähigkeitsmessgerät *Cond 3210* die Leitfähigkeit der Lösung gemessen. 10 s nach der Zugabe wird die Leitfähigkeit alle 10 s für drei Minuten gemessen (ca. 20 Messungen). Das Reaktionsgefäß, der Rührer und das Konduktometer werden vor jeder Messung gespült.
7. Füllen Sie einige mL der verbleibenden Urease-Lösung mit Reinstwasser auf das 11-fache Volumen auf (z.B. 5 mL auf 55 mL) und messen Sie die elektrische Leitfähigkeit dieser Urease-Lösung, die die Urease in derselben Konzentration enthält wie die Messlösungen. Der entsprechende Wert muss von den Messwerten der vorausgegangenen Messungen subtrahiert werden, um die Leitfähigkeit der Ammoniumcarbonat-Lösung zu erhalten.

5 Auswertung

1. Tragen Sie die Leitfähigkeit der Ammoniumcarbonat-Verdünnungsreihe gegen die Konzentration auf. Die dabei gebildete Kurve ist Ihre Eichkurve.
2. Bestimmen Sie die Konstanten v_{\max} , K_M und k_2 aus den Anfangsgeschwindigkeiten v_0 unter Benutzung eines Lineweaver-Burk-Plots.

19.06.2014