

Enzymreaktion (Hydrolyse von Harnstoff)

Ziel des Versuchs

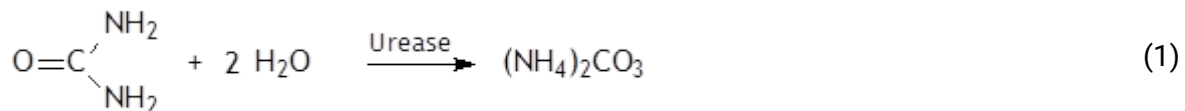
- Kennenlernen des Michaelis-Menten-Mechanismus enzymatischer Reaktionen/ Enzymkatalyse
- Messung der Enzymaktivität aus der Abhängigkeit der anfänglichen Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration (Harnstoffkonzentration)

Vorausgesetzte Kenntnisse

Zeitgesetze, Gleichgewichtsreaktionen, Bodenstein'sches Quasistationaritätsprinzip, Heterogene Katalyse, Leitfähigkeitsmessungen zur Aufnahme kinetischer Daten

Theoretische Grundlagen

Mit Hilfe von Enzymen ist es möglich, die Aktivierungsenergie von chemischen Reaktionen so weit herabzusetzen, dass die Reaktionsgeschwindigkeit um Größenordnungen erhöht wird. Dabei wirkt das Enzym wie ein Katalysator. Als Beispiel betrachten wir die Hydrolyse von Harnstoff mit dem Enzym Urease [1]:



Obwohl in der Bruttoreaktionsgleichung das Enzym nicht erscheint, hängt die gemessene Reaktionsgeschwindigkeit von der Enzymkonzentration ab. Das kann durch einen Reaktionsmechanismus mit zwei Reaktionsschritten erklärt werden.

Im ersten Schritt lagert sich ein Harnstoffmolekül (H) an ein Ureasemolekül (U) an, wobei der Enzym-Substrat-Komplex (HU) gebildet wird. Dabei wird das kleine Harnstoffmolekül (Molmasse $60 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) an einer „passenden“ Stelle des vergleichsweise riesigen Eiweißmoleküls (Molmasse $490\,000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) adsorbiert. Wegen der Ähnlichkeit dieses Schrittes mit der Adsorption auf der festen Katalysatoroberfläche bei der heterogenen Katalyse wird die Enzymreaktion gelegentlich als „mikroheterogene Katalyse“ bezeichnet.

Entweder wird der adsorbierte Harnstoff unverändert in die Lösung zurückkehren (Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes) oder im **adsorbierten Zustand** mit Wasser zum Reaktionsprodukt (P) weiterreagieren. Da das Produkt in Lösung geht, erscheint die Urease nach Ablauf der Reaktion unverändert.

Der Reaktionsmechanismus ist also





Für die Bildungsgeschwindigkeiten der Reaktanten gilt im Einzelnen:

$$\frac{dc_H}{dt} = -k_1 \cdot c_H \cdot c_U + k_{-1} \cdot c_{HU} \quad (4)$$

$$\frac{dc_U}{dt} = -k_1 \cdot c_H \cdot c_U + k_{-1} \cdot c_{HU} + k_2' \cdot c_{HU} \cdot c_{H_2O}^2 \quad (5)$$

$$\frac{dc_{HU}}{dt} = k_1 \cdot c_H \cdot c_U - k_{-1} \cdot c_{HU} - k_2' \cdot c_{HU} \cdot c_{H_2O}^2 \quad (6)$$

$$\frac{dc_P}{dt} = k_2' \cdot c_{HU} \cdot c_{H_2O}^2 \quad (7)$$

Da sich c_{H_2O} im Laufe der Reaktion praktisch nicht ändert, kann das Produkt $k_2' \cdot c_{H_2O}^2$ in einer neuen Konstante k_2 zusammengefasst werden:

$$k_2 = k_2' \cdot c_{H_2O}^2$$

Unter der Ureasekonzentration c_u ist die Menge der „aktiven“, für eine Harnstoffanlagerung geeigneten Plätze auf der Urease pro Volumeneinheit der Lösung zu verstehen. Da auf einem Ureasemolekül abhängig von der Enzymqualität unterschiedlich viele „aktive Zentren“ vorhanden sein können, kann c_u nicht einfach aus Ureasemasse/(Molmasse · Volumen der Lösung) berechnet werden. Die Enzymqualität kann jedoch umgekehrt über die Reaktionsgeschwindigkeit charakterisiert werden, die mit einer bestimmten Enzymeinwaage erreichbar ist. Um diesen Zusammenhang zu erfassen, wird das Differentialgleichungssystem näherungsweise unter Verwendung des Bodenstein'sches Quasistationaritätsprinzip gelöst:

Nach einer kurzen Anlaufphase stellt sich eine solche Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes HU ein, bei der pro Zeiteinheit gerade so viel HU gebildet wird, wie auch zerfällt. Damit wird

$$(dc_{HU})/dt = 0.$$

Aus Gl. (6) kann dann die stationäre Konzentration von HU errechnet und in Gl. (7) eingesetzt werden. Es ergibt sich so die Geschwindigkeit $(dc_P)/dt$, mit der das Reaktionsprodukt gebildet wird, als Funktion der Harnstoff- und der Ureasekonzentration:

$$\frac{dc_P}{dt} = \frac{k_2 \cdot c_{U,0} \cdot c_H}{c_H + \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1}} \quad (8)$$

(8) Bei der Ableitung dieser Gleichung wurde die Urease-Bilanz

$$c_U = c_{U,0} - c_{HU}$$

verwendet, um die unbekannte augenblickliche Konzentration c_U durch die bekannte Anfangskonzentration $c_{U,0}$ auszudrücken. Diese Gleichung nennt man Michaelis-Menten-Gleichung; die Größe

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (9)$$

bezeichnet man als Michaelis-Menten-Konstante.

Durch Messen der Anfangsgeschwindigkeit

$$v_0 = \left(\frac{dc_P}{dt} \right)_{t=0} = \frac{k_2 \cdot c_{U,0} \cdot c_{H,O}}{c_{H,O} + K_M} \quad (10)$$

kann man K_M und k_2 ermitteln.

Dazu führt man die Reaktion mit verschiedenen großen Anfangskonzentrationen $c_{H,O}$ aus und bestimmt jeweils v_0 .

Solange $c_{H,O}$ klein gegen K_M ist, sollte v_0 nach (10) linear mit $c_{H,O}$ ansteigen ($c_{H,O} \ll K_M$). Ist $c_{H,O} \gg K_M$, dann wird nach (10) v_0 unabhängig von $c_{H,O}$, weil gemäß (2) praktisch alle Urease in den Komplex HU überführt worden ist. Die Konzentration von HU kann dann durch weitere Zunahme der Harnstoffkonzentration nicht mehr gesteigert werden.

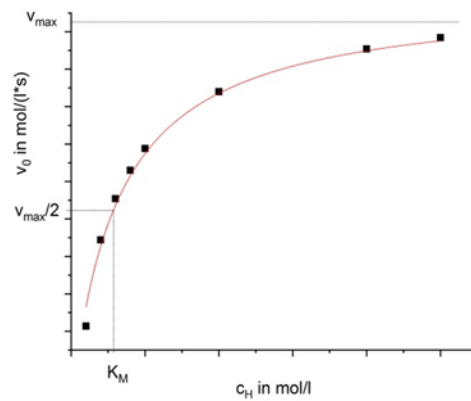


Abbildung 1 – Reaktionsgeschwindigkeit v_0 in Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration c_H

Für sehr große Harnstoffkonzentrationen ($c_{H,O} \gg K_M$) erreicht die Reaktionsgeschwindigkeit nach Gl. (10) den maximalen Wert

$$v_{0,max} = k_2 \cdot c_{U,0} \quad (11)$$

der nur von der Urease- und nicht von der Harnstoffkonzentration abhängt. Diese Maximalgeschwindigkeit kann deshalb als Maß für die „enzymatische Aktivität“ A (12) der Urease verwendet werden, die als die Stoffmenge Harnstoff definiert ist, die (bei $T = 25^\circ\text{C}$ und $pH = 7$) pro Zeiteinheit und Masseneinheit Urease maximal umgesetzt werden kann (siehe auch „Anmerkung“ am Ende der Anleitung):

$$A = \frac{1}{m_{Urease}} \left(\frac{dn_H}{dt} \right) \quad (12)$$

Wegen

$$n_H = c_H \cdot V$$

(V = Volumen der Reaktionslösung) ergibt sich die gesuchte Enzymaktivität aus der

maximalen Reaktionsgeschwindigkeit $v_{0,max}$ (11) und der Ureaseeinwaage m_U zu:

$$A = \frac{v_{0,max}}{m_U} \quad (13)$$

Üblicherweise wird die Aktivität in der Einheit $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ oder „Unit“/mg angegeben.

Um den Grenzwert $v_{0,max}$ der anfänglichen Reaktionsgeschwindigkeit zu ermitteln, wird v_0 für eine Reihe von Harnstoffkonzentrationen gemessen und auf unendlich hohe Harnstoffkonzentration extrapoliert. Dazu trägt man nach Lineweaver-Burk $1/v_0$ als Funktion von $1/c_{H,0}$ auf. Man erhält aus Gl. (10) eine Gerade mit der Steigung $K_M / v_{0,max}$ und dem Achsenabschnitt $1/v_0$. Daraus kann man K_M und k_2 berechnen (Ausgleichsrechnung):

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{v_{0,max}} + \frac{K_M}{v_{0,max}} \frac{1}{c_{H,0}} \quad (14)$$

Aufgaben

1. Man verfolge die Hydrolyse von Harnstoff durch Messung der elektrischen Leitfähigkeit. Das Endprodukt P ($(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$) dissoziiert in wässriger Lösung in NH_4^+ , HCO_3^- und OH^- . Die Reaktion kann deshalb durch Messung der elektrischen Leitfähigkeit κ der Lösung verfolgt werden. κ ist proportional zur Konzentration von P .

Um sich die Wirkung der Urease zu verdeutlichen wird die Hydrolyse bei jeder Harnstoffkonzentration zunächst unkatalysiert durchgeführt. Nach Ablauf einer halben Minute wird Ureaselösung zugegeben. Die Reaktionsgeschwindigkeit muss drastisch steigen.

Die Messung wird bei konstanter Ureasekonzentration und konstanter Temperatur (25 °C) bei Harnstoffkonzentrationen im Bereich 0,002...0,035 mol · L⁻¹ durchgeführt.

2. Den Messkurven ist die anfängliche Reaktionsgeschwindigkeit $v_0 = \left(\frac{dc_p}{dt}\right)_{t \rightarrow 0}$ zu entnehmen und gegen die anfängliche Harnstoffkonzentration aufzutragen. Schätzwerte für $v_{0,max}$ und K_M sind diesem Diagramm zu entnehmen.
3. Berechnung der Michaelis-Menten-Konstanten K_M und der Maximalgeschwindigkeit $v_{0,max}$ einschließlich der Streuungen.

Benutzen Sie zur Regression sowohl die linearisierte Form nach Lineweaver-Burk (Gl. (13)) als auch die ursprüngliche Michaelis-Menten-Gleichung (Gl. (10), nichtlineare Regression, Regressionsfunktion z.B.: „Hyperbel“).

Die Ergebnisse beider Regressionsverfahren sind zu diskutieren.

Aus $v_{0,max}$ sind jeweils die Enzymaktivitäten zu berechnen und mit den Herstellerangaben (*beim Assistenten zu erfragen*) zu vergleichen.



Durchführung

- Herstellung einer wässrigen Ureaselösung nach Arbeitsplatzanweisung
- Herstellung einer wässrigen 0.1 M Harnstofflösung (Stammlösung), 100 ml
- Herstellung einer Verdünnungsreihe (*nach Anweisung des Assistenten*)
 $c_{H,O} = 0.002; 0.003; 0.004; 0.005; 0.01; 0.015; 0.02 \text{ und } 0.025 \text{ mol/L}$
(jeweils 100 ml)
- Herstellung einer wässrigen 0.01 M $(NH_4)_2CO_3$ -Lösung, 100 ml
- Messung der anfänglichen Reaktionsgeschwindigkeit:
 - Beginnend mit der niedrigsten Harnstoffkonzentration jeweils 100 ml Harnstofflösung in die temperierte Messzelle geben.
 - Rührfisch einlegen, Leitfähigkeitssonde einsetzen, Magnetrührer so einstellen, dass zwar intensiv gerührt wird, die Leitfähigkeitsmessung aber nicht durch Gasblasen oder den Rührtrichter beeinflusst wird (ausprobieren).
 - Die Aufzeichnung der Messwerte erfolgt mit einem Leitfähigkeitsmessgerät Co 3100L, dessen Messwerte über Excel vom Computer registriert werden.

Die Messung wird abgebrochen, wenn ein zur Bestimmung des Leitfähigkeitsanstiegs ausreichendes Kurvenstück registriert worden ist (etwa 5 min).

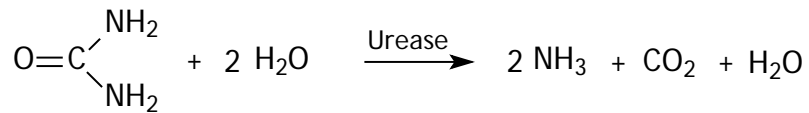
- Berechnung des Kalibrierfaktors aus den bekannten Konzentrationen der Messlösung durch:
 - Registrierung der Leitfähigkeit von 100 ml dest. Wasser.
 - Folgende Zugabe von 1 ml der 0.01 M $(NH_4)_2CO_3$ -Lösung.

Anzugebende Werte

- anfängliche Umsatzgeschwindigkeit v_0 für $c_{H,O} = 10^{-3} \dots 2.5 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$)
(Diagramm)
- Schätzung von v_{max} und K_M
- $c_{H,O}$ und $v_{0,max}$ einschließlich ihrer Streuungen aus Ausgleichsrechnungen mit Gleichungen (10) und (13), Computerausdrucke
- Enzymatische Aktivität A der Urease in $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ einschließlich ihrer Streuung und dem Vergleich mit Herstellerangaben

Anmerkung

Für die Enzymaktivitäten sind zwei unterschiedliche Definitionen gebräuchlich, deren Zusammenhang am deutlichsten wird, wenn die Bruttoreaktion (1) in der folgenden Form geschrieben wird:



Die Reaktionsgeschwindigkeit v dieser Reaktion ist

$$v = -\frac{dc_H}{dt} = +\frac{1}{2} \frac{dc_{\text{NH}_3}}{dt}$$

Definiert man die Enzymaktivität A_{NH_3} als Stoffmenge NH_3 , die pro Zeiteinheit und Masseneinheit Urease gebildet wird, ergibt sich deshalb ein Wert, der doppelt so groß ist wie die auf den Abbau von Harnstoff bezogene Aktivität A_H .

$$A_H = -\frac{1}{m_u} \cdot \frac{dc_H}{dt} \cdot V = \frac{1}{2} \cdot \frac{1}{m_U} \cdot \frac{dc_{\text{NH}_3}}{dt} \cdot V,$$

$$A_{\text{NH}_3} = 2 \cdot A_H$$