

Michaelis-Menten-Kinetik am Enzym Urease

Versuchsziele

- Einen enzymatischen Versuch durchführen.
- Den Zusammenhang zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Konzentration erkennen.
- Die Relation zwischen Leitfähigkeit und Konzentration verstehen.
- Das Michaelis-Menten- und das Lineweaver-Burk-Diagramm erstellen.
- Die Michaeliskonstante bewerten.

Grundlagen

Enzyme gehören in die Stoffklasse der Proteine. Proteine wiederum sind Makromoleküle, welche aus einer Kette von Aminosäuren bestehen. In lebenden Zellen sind bisher 23 proteinogene Aminosäuren bekannt.

In Zellen regulieren Enzyme durch Bio-Katalyse viele chemische Prozesse. Vereinfacht lässt sich eine enzymatische Reaktion folgendermaßen darstellen:

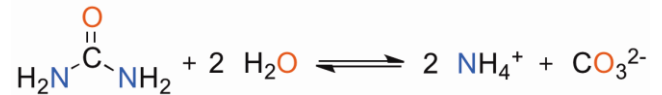


Ein Enzym E bindet ein Substrat S und ändert damit seine Konformation. Es bildet sich der Enzymsubstratkomplex ES, welcher meist den Übergangszustand zwischen Substrat und Produkt stabilisiert. Die Aktivierungsenergie wird so herabgesenkt, jedoch nicht das Gleichgewicht der Reaktion verschoben. Die Folge ist, dass die Reaktionsgeschwindigkeit der Reaktion erhöht wird. Der Enzymsubstratkomplex löst sich auf zum Produkt P und dem unveränderten Enzym E. Alle diese Schritte sind Gleichgewichtsreaktionen.

Die vereinfachte Reaktionsgleichung dient als Grundlage für kinetische Untersuchungen nach dem Modell von Leonor Michaelis und Maud Menten. Sie wurde 1913 aufge-

stellt, ist noch immer gültig und kann auch die Kinetik des Enzyms Urease beschreiben.

Das Enzym Urease katalysiert die Spaltung von Harnstoff in Ammonium- und Carbonationen nach der folgenden Reaktionsgleichung.



Mit der Michaelis-Menten-Kinetik können kinetische Parameter von Enzymen bestimmt werden. Die Reaktionsgeschwindigkeit einer chemischen Reaktion gibt an, wie viele Teilchen pro Zeit umgesetzt werden. Bei katalytischen Reaktionen wie der Spaltung von Harnstoff ist die Reaktionsgeschwindigkeit meist unabhängig von der Konzentration der Reaktanden. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist konstant. Es handelt sich also um Reaktionen nullter Ordnung. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist jedoch abhängig von der anfänglichen Substratkonzentration.

In diesem Versuch muss die Reaktionsgeschwindigkeit des Zerfalls von Urease nicht mit direkten Methoden gemessen werden. Es wird nur die Änderung der Leitfähigkeit zeitabhängig aufgenommen. Diese ist ein Maß für die Reaktionsgeschwindigkeit, da der nicht leitende Harnstoff durch



Abb. 1: Versuchsaufbau zur Leitfähigkeitsmessung.

Urease zu Ammonium- und Carbonationen zerfällt. Diese Ionen leiten den elektrischen Strom. Der Anstieg der Leitfähigkeit ist so proportional zur Reaktionsgeschwindigkeit.

Wird die Reaktionsgeschwindigkeit nach Michaelis-Menten gegen die anfängliche Substratkonzentration aufgetragen, so erhält man eine Sättigungskurve. Aus dieser kann die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{\max} bestimmt werden. Michaelis und Menten führten die enzymespezifische Konstante K_M ein. Diese nach ihnen benannte Michaelis-Menten-Konstante K_M gibt für ein bestimmtes Enzym an, bei welcher anfänglichen Substratkonzentration das Enzym mit der Hälfte der Maximalgeschwindigkeit v_{\max} arbeitet.

$$K_M = \frac{1}{2} v_{\max}$$

Die Sättigungskurve der Michaelis-Menten-Kinetik kann durch die folgende Gleichung beschrieben werden:

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

Dabei ist v_0 die Anfangsgeschwindigkeit, v_{\max} die Maximalgeschwindigkeit der Reaktion bei Substratsättigung, $[S]$ die Substratkonzentration bei Beginn der Reaktion und K_M die Michaelis-Menten-Konstante.

In diesem Versuch soll die Michaelis-Menten-Konstante für die Spaltung von Harnstoff durch Urease bestimmt werden.

Gefährdungsbeurteilung

Die verwendeten Chemikalien sind im Allgemeinen ungefährlich.

Geräte und Chemikalien

1	Pocket-CASSY 2 Bluetooth	524 018
1	CASSY Lab 2	524 220
1	Leitfähigkeits-Adapter S	524 0671
1	Leitfähigkeits-Sensor	529 670
1	Magnetrührer	607 105
1	Sockel	300 11
1	Stativstange 25 cm, 10 mm Ø	301 26
1	Kreuzmuffe, 0...16 mm	666 543
1	Universalklemme 0...80 mm	666 555
1	Messkolben Boro 3.3, 100 ml	665 793
5	Becherglas, Boro 3.3, 150 ml, hF	602 010
5	Rührstäbchen	666 851
1	Messpipette 10 ml	665 997
1	Pipettierball (Peleusball)	666 003
1	Messzylinder 100 ml, Kunststofffuß	665 754
2	Uhrglas 6 mm Ø	664 153
2	Pulvertrichter Boro 3.3, 60 mm Ø	602 681
6	Reagenzglas Fiolax, 16 x 160 mm, aus	664 043
6	Gummistopfen voll, 14...18 mm Ø	667 253
1	Reagenzglasgestell f. 9 Gläser, 18 mm Ø	667 050
1	Mikro-Doppelspatel Edelstahl, 185 mm	666 961
1	Kompaktwaage 200 g : 0,01 g	667 7977
1	Harnstoff, 100 g	672 1700
1	Urease (1 U/mg), 5 g	675 2810
1	Wasser, rein, 1 l	675 3400
1	Spritzflasche, PE, 500 ml	661 243
zusätzlich erforderlich:		
1	Computer mit Windows XP, 7 oder 8	
für eine kabellose Messung zusätzlich nötig:		
1	Akku für Pocket-CASSY 2 Bluetooth	524 019
1	Bluetooth-Dongle	524 0031

Versuchsaufbau und -vorbereitung

Ansetzen der Lösungen

Verdünnungsreihe einer 0,2 molaren Harnstofflösung: Um eine Verdünnungsreihe von Harnstofflösungen anzusetzen, wird zunächst eine 0,2 molare Stammlösung hergestellt. Dazu werden 0,24 g Harnstoff auf einem Uhrglas eingewogen und über einen Pulvertrichter in ein Reagenzglas gefüllt. Danach werden genau 20 ml destilliertes Wasser in das Reagenzglas gegeben. Es ist ratsam, den zurückgebliebenen Harnstoff vom Uhrglas in das Reagenzglas zu spülen. Das Reagenzglas mit einem Stopfen verschließen und den Feststoff durch Schütteln in Lösung bringen.

Anschließend wird wie folgt eine Verdünnungsreihe angesetzt: Es wird zunächst in 4 Reagenzgläsern je 10 ml Wasser vorgelegt. Die Hälfte (10 ml) der 0,2 M Stammlösung wird mit einer Pipette aufgenommen, und in das erste der mit 10 ml Wasser gefüllten Reagenzglases gegeben und gut geschüttelt. Die Hälfte (10 ml) der so entstandenen Lösung wird abermals abgenommen und in das nächste mit Wasser gefüllte Reagenzglas gegeben. Dies wird zweimal wiederholt, sodass zum Schluss Lösungen mit den Konzentrationen 0,2; 0,1; 0,05; 0,025 mol/l vorliegen.

Ureaselösung: Für die Ureaselösung werden 0,5 g Urease auf einem Uhrglas abgewogen und in ein Reagenzglas gegeben. Es werden 50 ml destilliertes Wasser zur Urease hinzugegeben. Durch Schütteln wird der Feststoff vollständig gelöst.

Hinweis: Die so angesetzte Lösung hat zu Anfang eine Enzymaktivität von 10 000 U/l. Mit der angegebenen Aktivität der Urease von 1 U/mg können pro Minute und Liter 10 mmol des Substrates umgesetzt werden. Die Lösung sollte möglichst kurz vor Versuchsbeginn angesetzt und im Kühlschrank aufbewahrt werden, um diese Aktivität zu erhalten. Gelöst und bei Raumtemperatur kann die Urease leicht denaturieren und damit inaktiv werden.

Aufbau der Apparatur

Aus Magnetrührer, Stativmaterial, Leitfähigkeits-Sensor und Leitfähigkeits-Adapter wird eine Apparatur zur Leitfähigkeitsmessung aufgebaut (siehe Abb. 1). Den Sensor über das Pocket-CASSY mit dem Computer verbinden.

Versuchsdurchführung

1. [Einstellungen in CASSY Lab laden.](#)

2. Ein 150-ml-Becherglas mit 80 ml Wasser füllen und 10 ml Harnstofflösung und einen Rührfisch hinzugeben. Damit wird die Harnstofflösung 1:10 verdünnt. Die untersuchten Harnstoffkonzentrationen betragen also 0,02; 0,01; 0,005 und 0,0025 mol/l.

3. Den Leitfähigkeitssensor ca. 2 cm tief in die Harnstofflösung eintauchen und die Rührplatte einschalten.

4. Die Messung wird gestartet. Nach circa 10 Sekunden wird zu der wässrigen Harnstofflösung 10 ml Ureaselösung gegeben. Nach 2 – 3 Minuten kann die Messung beendet werden.

5. Die Punkte 2 und 3 werden für jede einzelne Konzentration wiederholt. Dabei am besten jeweils neue Bechergläser und Rührfische verwenden.

Beobachtung

Bei der Reaktion wird der Harnstoff zu den leitenden Produkten NH_4^+ und CO_3^{2-} umgesetzt, welche den Stromfluss erhöhen.

Im Diagramm „spez. Leitfähigkeit“ sind die Messwerte der spezifischen Leitfähigkeit gegen die Zeit aufgetragen (siehe Abb. 2). Die spezifische Leitfähigkeit steigt nach einer Anfangsphase nahezu linear an. Je größer die anfängliche Substratkonzentration ist, desto stärker steigt die Leitfähigkeit.

Auswertung

Die Auswertung erfolgt in CASSY Lab. Dafür sind drei Diagramme vorbereitet.

Bestimmung der relativen Reaktionsgeschwindigkeiten

Im Diagramm „spez. Leitfähigkeit“ wird in jede der Messungen eine Ausgleichsgerade gelegt (Anpassung durchführen → Gleichgerade), siehe Abb. 2. Die Geradengleichung wird mit Drag & Drop in das Diagramm gezogen. Die Steigung der Geraden ist ein Maß für die Geschwindigkeit der Reaktion. Folglich ist die Steigung umso höher, je schneller die Reaktion abläuft. Hier wird vereinfacht die spezifische Leitfähigkeit anstelle der Substratkonzentrationen verwendet. Die Angabe der Reaktionsgeschwindigkeit erfolgt daher in $\frac{\mu S}{m \cdot s}$.

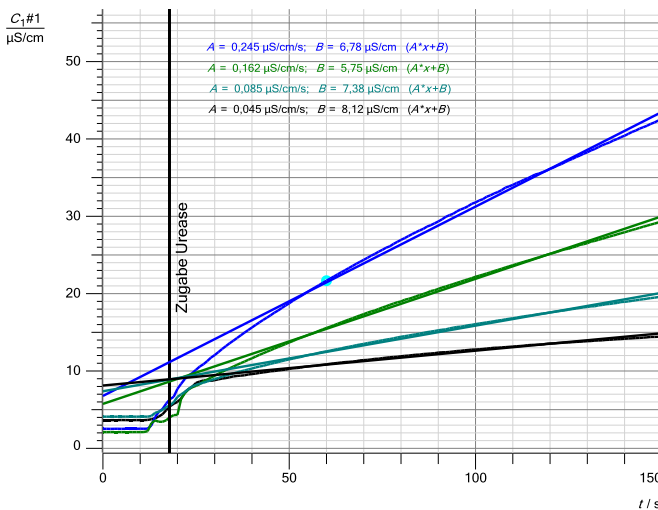


Abb. 2: Aufnahme der Leitfähigkeit über die Zeit bei verschiedenen Substratkonzentrationen. Dabei ist blau: 0,02, grün: 0,01, türkis: 0,005 und schwarz 0,0025 mol/l Harnstoff.

Michaelis-Menten-Kinetik

Im Diagramm „Michaelis-Menten“ wird die Substratkonzentration gegen die ermittelten Steigungen aufgetragen (siehe Abb. 3). Dafür wird in der zugehörigen Tabelle (siehe Tab. 1) als x-Wert die eingesetzten Konzentrationen und als y-Wert die Steigung der entsprechenden Ausgleichsgeraden eingetragen.

Tab. 1: Reaktionsgeschwindigkeit v der Urease bei den verwendeten Substrat-Konzentrationen S.

S $\left[\frac{mol}{l}\right]$	v $\left[\frac{\mu S}{m \cdot s}\right]$
0,0200	0,254
0,0100	0,162
0,0050	0,085
0,0025	0,045

Die Reaktionsgeschwindigkeit erreicht bei hoher Substratkonzentration eine Sättigung. Diese Sättigung ist die Maximalgeschwindigkeit v_{max} . Graphisch kann dann die Michaelis-Menten-Konstante K_M bestimmt werden, also die Substratkonzentration bei halber Maximalgeschwindigkeit.

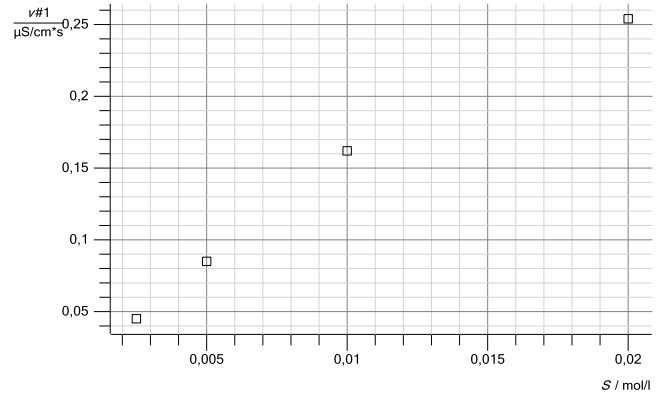


Abb. 3: Michaelis-Menten-Diagramm für Urease. Aufgetragen ist Reaktionsgeschwindigkeit v gegen die Substratkonzentration S.

Wird die Sättigung nicht erreicht, kann die Michaelis-Menten-Konstante auch bestimmt werden. Dafür wird die Lineweaver-Burk-Auftragung verwendet.

Auftragung nach Lineweaver-Burk

Auch die Auftragung nach Lineweaver-Burk ist in CASSY Lab als Diagramm vorbereitet (siehe Abb. 4). Hier wird die Sättigungskurve als eine Gerade dargestellt. Dies gelingt durch eine doppelt-reziproke Umformung der Michaelis-Menten-Gleichung (s.o.) zu einer linearen Geradengleichung.

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

$$y = a \cdot x + b$$

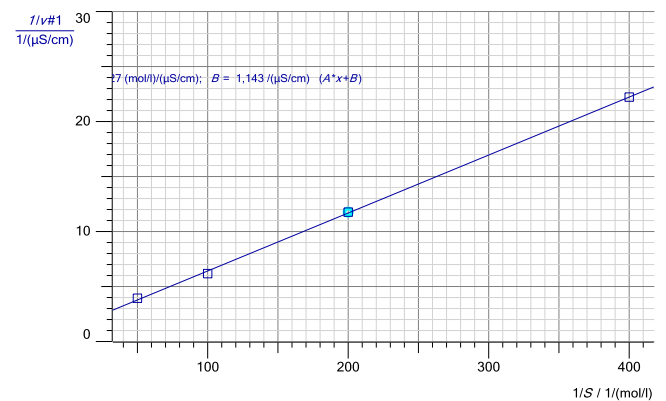


Abb. 4: Lineweaver Burk- Diagramm.

Die y-Werte (Kehrwert der Reaktionsgeschwindigkeit) können nun gegen die x-Werte (Kehrwert der Substratkonzentration) aufgetragen werden (siehe Tab. 2). Aus dem y-Achsenabschnitt kann so die maximale Reaktionsgeschwindigkeit und aus dem x-Achsenabschnitt die Michaelis-Menten-Konstante durch Bildung des Kehrwertes ermittelt werden.

Tab. 2: Umgeformte Werte für die Auftragung nach Lineweaver-Burk.

S $\left[\frac{mol}{l}\right]$	$\frac{1}{S} \left[\frac{l}{mol}\right]$	v $\left[\frac{\mu S}{m \cdot s}\right]$	$\frac{1}{v} \left[\frac{cm \cdot s}{\mu S}\right]$
0,0200	50	0,254	3,937
0,0100	100	0,162	6,173
0,0050	200	0,085	11,765
0,0025	400	0,045	22,222

Ergebnis

Bestimmung der relativen Reaktionsgeschwindigkeiten

In jeden der Graphen des Diagramms „spez. Leitfähigkeit“ wird eine Ausgleichsgerade gelegt und die Geradengleichung mit Drag & Drop in das Diagramm gezogen (siehe Abb. 2). Danach wird der Wert der Steigung in die Wertetabelle des „Michaelis-Menten“-Diagramm eingetragen (siehe Tab. 1). Mit Halbierung der Substratkonzentration halbiert sich in etwa auch die Reaktionsgeschwindigkeit.

Michaelis-Menten-Kinetik

Aus der Tabelle kann dann das Michaelis-Menten-Diagramm erstellt werden (siehe Abb. 3). Dabei wird die Reaktionsgeschwindigkeit gegen die verschiedenen Konzentrationen aufgetragen. Die vier gemessenen Konzentrationen führen nicht in die Sättigung, da zu wenige Messwerte verwendet werden. Aus diesem Grund ist eine Abschätzung der maximalen Geschwindigkeit nach Michaelis und Menten nicht möglich. Daher wird ein Diagramm nach Lineweaver und Burk erstellt.

Auftragung nach Lineweaver-Burk

Bei dem Lineweaver-Burk-Diagramm (siehe Abb. 4) wird eine doppeltreziproke Auftragung vorgenommen. Die Punkte liegen auf einer Gerade. Es wird eine Ausgleichsgerade durch die Punkte gelegt und die Geradengleichung mit Drag & Drop in das Diagramm gezogen. Nun ist es möglich, die

Kehrwerte der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit am y-Achsenabschnitt und den der Michaelis-Menten-Konstante am x-Achsenabschnitt abzulesen.

Aus den abgelesenen Werten können so folgende Werte für die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{\max} und die Michaelis-Menten-Konstante K_M bestimmt werden.

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

$$\frac{1}{v_{\max}} = 1,1 \frac{\text{cm} \cdot \text{s}}{\mu\text{S}}$$

$$v_{\max} = 0,9 \frac{\mu\text{S}}{\text{cm} \cdot \text{s}}$$

$$-\frac{1}{K_M} = -20 \frac{\text{l}}{\text{mol}}$$

$$K_M = 0,05 \frac{\text{mol}}{\text{l}} = 50 \frac{\text{mmol}}{\text{l}}$$

Die Literaturwerte der Michaelis-Menten-Konstante für Urease liegen je nach Organismus zwischen $0,12 \frac{\text{mmol}}{\text{l}}$ bis $130 \frac{\text{mmol}}{\text{l}}$. Damit liegt der K_M -Wert von $50 \frac{\text{mmol}}{\text{l}}$ im Bereich der Literatur.

Reinigung und Entsorgung

Die Lösungen können im Ausguss entsorgt werden.