

Stephanie [REDACTED]  
BTA-OH  
Gruppe A, Arbeitsplatz 5  
Partner: Martin [REDACTED]

Versuch vom 19.09.2002

## „Enzymkinetik“

### **Biochemisches Praktikum**

Berufskolleg Kartäuserwall  
Kartäuserwall 30, Köln

bei: Fr. Ulrike Schlicher

# Bestimmung der Enzymaktivität von ADH und Ermittlung von $K_M$ und $v_{max}$

## Theorie / Prinzip des Versuchs

Enzyme sind **Biokatalysatoren**, d.h. sie beschleunigen biologische Reaktionen, indem sie die **Aktivierungsenergie** der Reaktionen herabsetzen und einen Übergangszustand stabilisieren. Ohne Enzyme würden in biologischen Systemen keine nennenswerten Umsetzungen stattfinden, da einfach zuviel Energie verbraucht würde. Enzyme beschleunigen die Reaktionen zwar, verändern aber nicht das Reaktionsgleichgewicht.

Enzyme sind hochspezialisierte Proteine die die Fähigkeit besitzen, Substrate an sich zu binden (= **Enzym-Substrat-Komplex**) und in Produkte umzuwandeln. Das Enzym wird dabei nicht aufgebraucht. Jedes Enzym katalysiert dabei nur eine ganz bestimmte Reaktion mit einem ganz bestimmten Substrat; es ist also **wirkungs- und substratspezifisch**. Zudem arbeiten sie nur unter optimalen Bedingungen; sie besitzen ein pH-Optimum und ein **Temperatur-Optimum**. Im **pH-Optimum** weisen Enzyme ihre größte Aktivität auf. Mit steigender Temperatur nimmt auch die Enzymaktivität zu. Da es sich jedoch um Proteine handelt, denaturiert das Enzym bei zu großer Temperatur. Variierende **Substratkonzentration** verändert ebenfalls die Wirkung des Enzyms.

Das Substrat bindet an das Enzym im **aktiven Zentrum**, einer spalten- oder höhlenförmigen Struktur, die nur einen sehr kleinen Anteil des Enzyms ausmacht. Es handelt sich um eine schwache Bindung durch van-der-Waals-Kräfte, hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken. Diese Bindungen zerfallen leichter wieder, wenn das Produkt vom Enzym abgespalten werden soll. Viele Reaktionen werden durch **Coenzyme** unterstützt. Das Coenzym ist ebenfalls an der Reaktion beteiligt. Es bindet mit dem Substrat an das Enzym und wird mit dem Produkt wieder abgespalten.

Michaelis und Menten haben ein Modell aufgestellt, dass die Kinetik einiger Enzyme verdeutlicht:

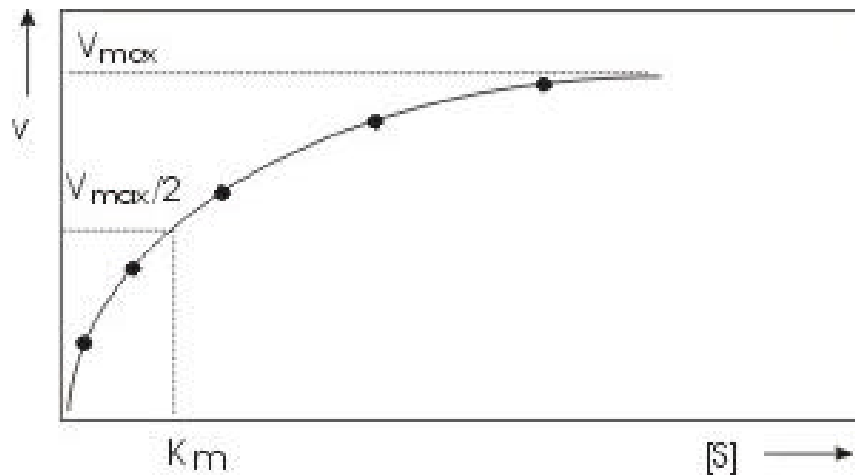


Ein Enzym E bindet ein Substrat S unter Bildung eines ES-Komplexes mit der Geschwindigkeitskonstanten  $k_1$ . Der ES-Komplex kann nun entweder mit der Geschwindigkeitskonstanten  $k_{-1}$  wieder in E und S dissoziieren, oder er wird mit der Geschwindigkeitskonstanten  $k_2$  in das Produkt P umgewandelt. Durch zahlreiche Umwandlungen gelangt man von dieser Gleichung zur **Michaelis-Menten-Gleichung**:

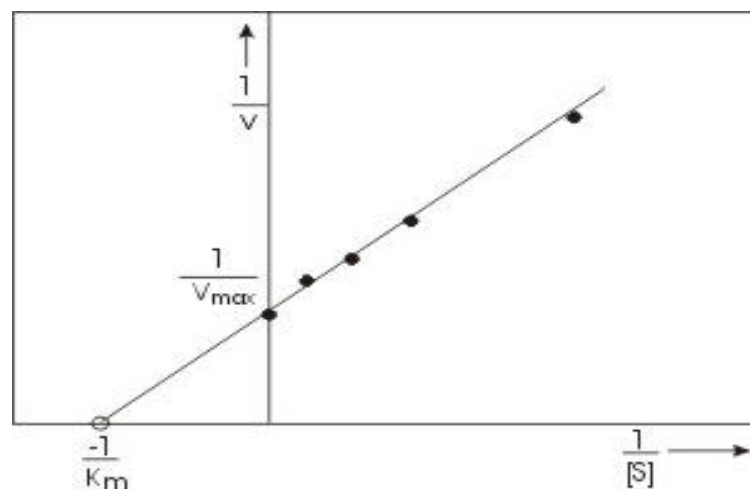
$$v = v_{max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

$K_M$  ist die Michaelis-Konstante. Sie entspricht der Substratkonzentration, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit die Hälfte ihres Maximalwertes erreicht hat. Das

heißt die Hälfte der aktiven Zentren ist mit Substrat besetzt. Ein niedriger  $K_M$  bedeutet eine hohe Substrataffinität, ein hoher eine sehr niedrige.  $v_{max}$  wird erreicht, wenn alle Bindungsstellen der Enzyme mit Substrat gesättigt sind. Die Reaktion befindet sich hier im Gleichgewicht. Diese Werte lassen sich ermitteln, wenn man in einer **Sättigungskurve** die Umsetzungsgeschwindigkeit des Enzyms  $v$  gegen die Substratkonzentration  $[S]$  aufträgt:



Durch die **Lineweaver-Burk-Auftragung** wird die Ermittlung von  $K_M$  und  $v_{max}$  erleichtert, da es sich um eine lineare Funktion handelt. Hierzu werden die reziproken Werte  $1/v$  und  $1/[S]$  der Sättigungskurve gebildet und gegeneinander aufgetragen:



Die Verlängerung der Gerade ergibt zwei Schnittpunkte mit den Achsen, aus denen man  $K_M$  und  $v_{max}$  ablesen und berechnen kann. Ermittelt man die Geradengleichung, so kann man die Schnittpunkte mit den beiden Achsen berechnen. Der Schnittpunkt mit der x-Achse entspricht  $-(1/K_M)$ , der mit der y-Achse  $1/v_{max}$ . Bildet man von diesen Werten wieder den Kehrwert, so hat man  $K_M$  und  $v_{max}$ .

Die **Aktivität** eines Enzyms wird standardisiert dargestellt als diejenige Menge Enzym, die unter optimalen Bedingungen ein  $\mu\text{mol}$  Substrat in einer Minute katalysiert.

Die Einheit ist das **Unit**  $U = \mu\text{mol Substrat} / \text{min}$ . Die **spezifische Aktivität** ist die Aktivität eines Enzyms bezogen auf ein mg Protein [U/mg Protein]. Diese Angabe ist sinnvoll, wenn Enzyme als Gemische vorliegen.

In unserem Versuch geht es um die Umsetzung von EtOH in Acetaldehyd durch die Alkoholdehydrogenase (ADH). Die Aktivität soll durch Extinktionsmessung ermittelt werden. Substrat und Produkt unterscheiden sich jedoch nicht in ihrer Lichtabsorption. An der Reaktion ist aber  $\text{NAD}^+$  als Coenzym beteiligt. Es wird zu  $\text{NADH}_2$  reduziert. Die oxidierte Form hat ein Absorptionsmaximum bei 290 nm, die reduzierte Form bei 340 nm. So kann man durch Messung von  $\text{NADH}_2$  auf die Substratumsetzung zurückschließen; für jedes  $\text{NADH}_2$  ist auch ein Substrat umgesetzt worden.

### **Material**

*Geräte:* Meßkolben 100 ml von Schott  
Meßkolben 10 ml von Schott  
Analysenwaage, Spatel, Wägeschälchen  
Aqua dest.  
Mikropipette 10 - 100  $\mu\text{l}$  von Eppendorf  
Mikropipette 100 -1000  $\mu\text{l}$  von Eppendorf  
Spitzen für Mikropipette  
Spectrophotometer mit PC-Software von Pharmacia Biotech  
Plastikküvetten halbmirko, 1 ml von Plastibrand  
Küvettenreck  
Parafilm  
Rührspatel

*Untersuchungsmaterial:* Alkoholdehydrogenase ADH, aus Hefe von Boehringer Mannheim GmbH  
 $\text{NAD}^+$  ( $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_{14}\text{P}_2$ ) von Merck,  $M=663,44 \text{ g/mol}$

*Chemikalien:* Tetranatriumdiphosphat-Decahydrat ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ ),  $M=446,06 \text{ g/mol}$  von Merck  
Dinatriumhydrogenphosphat-Monohydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ),  $M=137,99 \text{ g/mol}$  von Merck  
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ),  $M=136,09 \text{ g/mol}$  von Merck  
Ethanol 99%, p.A. von Merck,  $M=46,07 \text{ g/mol}$ ,  $\delta=0,793 \text{ kg/l}$

### **Durchführung**

Ansetzen der Stammlösungen für beide Versuchsteile

- o  $\text{NAD}^+$ -Lösung  $M = 663,44 \text{ g/mol}$

(Coenzymlösung)  $V = 10 \text{ ml} = 0,01 \text{ l}$   
 $c = 50 \text{ mmol/l} = 0,05 \text{ mol/l}$

$$\begin{aligned} m &= M * V * c \\ &= 663,44 \text{ g/mol} * 0,01 \text{ l} * 0,05 \text{ mol/l} \\ &= \mathbf{0,33172 \text{ g}} \text{ NAD}^+ \text{ auf 10 ml mit Aqua dest. auffüllen} \end{aligned}$$

o Natrium-Pyrophosphat-Puffer

$M = 446,06 \text{ g/mol}$   
 $V = 100 \text{ ml} = 0,1 \text{ l}$   
 $c = 0,1 \text{ mol/l}$

$$\begin{aligned} m &= M * V * c \\ &= 446,06 \text{ g/mol} * 0,1 \text{ l} * 0,1 \text{ mol/l} \\ &= \mathbf{4,4606 \text{ g}} \text{ Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 * 10 \text{ H}_2\text{O} \text{ auf 100 ml auffüllen, vorher} \\ &\text{mit NaOH pH 8,8 einstellen} \end{aligned}$$

o Phosphat-Puffer

- 0,01 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung ansetzen:

$M = 136,09 \text{ g/mol}$   
 $V = 100 \text{ ml} = 0,1 \text{ l}$   
 $c = 0,01 \text{ mol/l}$

$$\begin{aligned} m &= M * V * c \\ &= 136,09 \text{ g/mol} * 0,1 \text{ l} * 0,01 \text{ mol/l} \\ &= \mathbf{0,1361 \text{ g}} \text{ KH}_2\text{PO}_4 \text{ auf 100 ml auffüllen} \end{aligned}$$

- 0,01-M  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ -Puffer ansetzen:

$M = 137,99 \text{ g/mol}$   
 $V = 100 \text{ ml} = 0,1 \text{ l}$   
 $c = 0,01 \text{ mol/l}$

$$\begin{aligned} m &= M * V * c \\ &= 137,99 \text{ g/mol} * 0,1 \text{ l} * 0,01 \text{ mol/l} \\ &= \mathbf{0,1379 \text{ g}} \text{ Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \text{ auf 100 ml auffüllen, vorher noch pH} \\ &\text{7,5 mit 0,01-M KH}_2\text{PO}_4 \text{ einstellen} \end{aligned}$$

o Ethanol-Lösung (Substratlösung)

- im Ansatz sollen 20 mM enthalten sein, der Anteil an EtOH-Lösung beträgt aber nur 1/3 des Gesamtvolumens (1,2 ml zu 0,4 ml)
- die EtOH-Lösung muß also dreifach konzentriert angesetzt werden, da sie um diesen Satz verdünnt wird = 60 mM

$$M = 46,07$$

$$V = 100 \text{ ml} = 0,1 \text{ l}$$

$$c = 60 \text{ mmol/l} = 0,06 \text{ mol/l}$$

$$\delta = 0,793 \text{ g/ml}$$

$$m = M \cdot V \cdot c$$

$$= 46,07 \text{ g/mol} \cdot 0,1 \text{ l} \cdot 0,06 \text{ mol/l}$$

$$= 0,2764 \text{ g EtOH}$$

$$V = m / \delta$$

$$= 0,276 \text{ g} / 0,793 \text{ g/ml}$$

$$= 0,348 \text{ ml} = \mathbf{348 \mu\text{l}} \text{ EtOH auf 100 ml auffüllen}$$

- ADH-Lösung (Enzymlösung) 200  $\mu\text{g/ml}$   $\Rightarrow$  20 mg/100 ml ( bei 4°C kaltstellen, erst kurz vor Versuchsbeginn herstellen!)

## Versuchsteil A: Enzymaktivität

### Durchführung

- der Reaktionsansatz (RA) wird in Halbmikro-Küvetten wie folgt angesetzt:

400  $\mu\text{l}$  Na-Pyrophosphat-Puffer  
 400  $\mu\text{l}$  EtOH-Lösung  
 320  $\mu\text{l}$  Aqua dest.  
 40  $\mu\text{l}$  NAD<sup>+</sup>-Lösung

- mindestens 2-3 Ansätze herstellen für eine Mehrfachbestimmung
- Ansätze mit Parafilm abdecken, damit das EtOH nicht verdunstet
- kurz vor der Messung die Reaktion mit ADH starten = Zugabe 40  $\mu\text{l}$  ADH
- mit dem Rührspatel gründlich durchmischen
- mit dem Programm „Swift – Kinetik – Reaktion“ die Enzymaktivität messen:  
1 min bei 340 nm gegen Luft
- Auswertung der ausgedruckten Graphen

### Ergebnisse und Auswertung

Aus den Graphen A1 und A2 kann man die *Anfangsgeschwindigkeit*  $v_0$  der Enzymreaktion berechnen. Hierzu wird eine Gerade (gestrichelt) an den ersten linearen Bereich zu Beginn des Graphen angelegt. Aus der Steigung der Geraden  $\Delta E / \Delta t$  ergibt sich die Anfangsgeschwindigkeit  $v_0$ :

$$A1 \quad v_0 = 2,802 \text{ E/min}$$

$$A2 \quad v_0 = 2,724 \text{ E/min}$$

$$\emptyset \quad v_0 = 2,763 \text{ E/min}$$

### *Aktivität:*

Die umgesetzte Substratmenge zur Berechnung der Aktivität der ADH-Lösung kann man durch Umstellung des Lambert-Beer'schen Gesetzes ermitteln:

$$\Delta E = \Delta C * \epsilon * d$$

$$d = 1 \text{ cm}$$

$$v_0 = 2,763 \text{ E/min} = \Delta E$$

$$\epsilon_{\text{NADH}_2} = 6,3 \text{ l/(mmol * cm)}$$

$$\begin{aligned} \Delta C &= v_0 / (\epsilon * d) \\ &= 2,764 / [6,3 \text{ l/(mmol * cm)} * 1 \text{ cm}] \\ &= 0,439 \text{ mmol/l} = 439 \text{ } \mu\text{mol/l} \end{aligned}$$

$$439 \text{ } \mu\text{mol} \rightarrow 1000 \text{ ml}$$

$$x \text{ } \mu\text{mol} \rightarrow 1,2 \text{ ml}$$

$$\begin{aligned} x &= 0,527 \text{ } \mu\text{mol} \\ &= 0,527 \text{ } \mu\text{mol/min} \\ &= \mathbf{0,527 \text{ U}} \text{ in } 1,2 \text{ ml RA mit } 40 \text{ } \mu\text{l ADH} \end{aligned}$$

### *spezifische Aktivität:*

$$20 \text{ mg ADH} \rightarrow 100.000 \text{ } \mu\text{l RA}$$

$$x \text{ mg ADH} \rightarrow 40 \text{ } \mu\text{l RA}$$

$$\begin{aligned} x &= 0,008 \text{ mg} \\ &= 8 \text{ } \mu\text{g ADH} \text{ haben demnach } 0,527 \text{ } \mu\text{mol EtOH} \text{ in } 1 \text{ min umgesetzt} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Die spezifische Aktivität betragt also} \quad & 0,527 \text{ U}/0,008 \text{ mg} \\ &= \mathbf{65,875 \text{ U/mg}} \end{aligned}$$

## Versuchsteil B: Bestimmung von $K_M$ und $v_{max}$

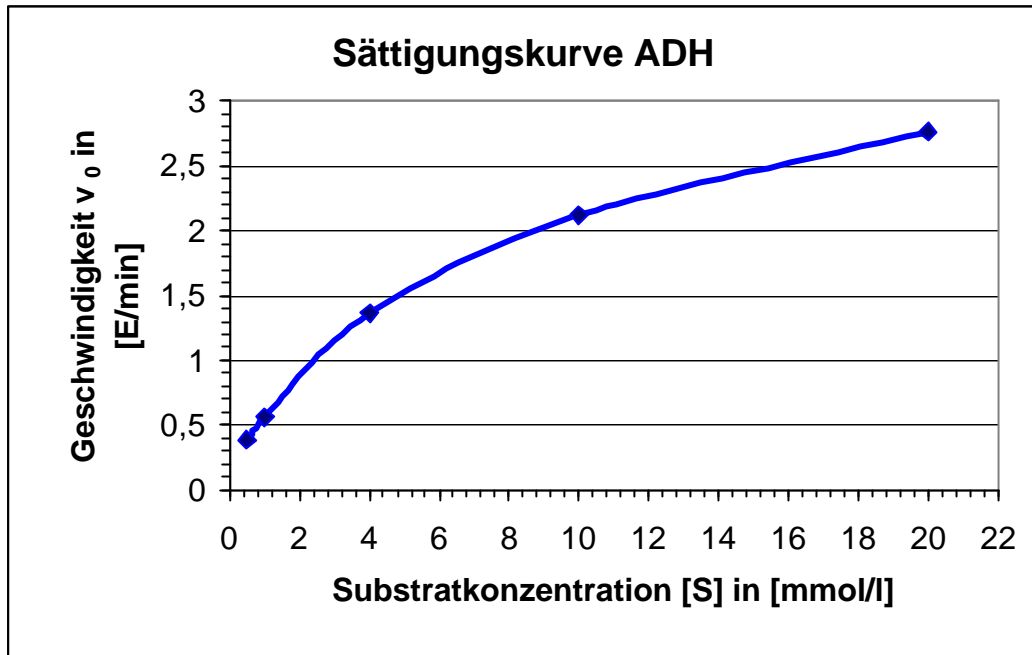
### Durchführung

- es soll die Reaktion bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen miteinander verglichen werden, daher brauche ich Reaktionsansätze mit sinkender Substratmenge
- die Ansätze in Halbmikro-Küvetten wie folgt herstellen:
  - 20 mM            siehe oben = 400  $\mu$ l EtOH  
(ab hier verändert sich die Substratmenge, die Lücke wird durch Puffer aufgefüllt!)
  - 10 mM            200  $\mu$ l EtOH + 200  $\mu$ l  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ -Puffer
  - 4 mM             80  $\mu$ l EtOH + 320  $\mu$ l  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ -Puffer
  - 1 mM             20  $\mu$ l EtOH + 380  $\mu$ l  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ -Puffer
  - 0,5 mM          10  $\mu$ l EtOH + 390  $\mu$ l  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ -Puffer
- jeden Ansatz wieder 2-3 mal herstellen für mehrere Messungen
- die Küvetten in einer Reihe mit fallender Substratkonzentration (20, 10, 4, 1, 0,5mM) ins Photometer stellen
- mit dem Programm „Swift-Kinetik-Reaktion“ die Enzymaktivität der einzelnen Proben der Reihe messen: 1 min bei 340 nm gegen Luft
- jede Reihe in mehreren Essay hintereinander wegmessen und die Kurven im Overlay-Modus in einem Graphen darstellen lassen
- Auswertung der Graphen

### Ergebnisse und Auswertung

Aus den vom PC ermittelten Steigungen =  $v_0$ 's in den Graphen B1 und B2 wird der Durchschnitt gebildet. In einer Sättigungskurve wird die Geschwindigkeit  $v_0$  gegen die Substratkonzentration [S] aufgetragen:

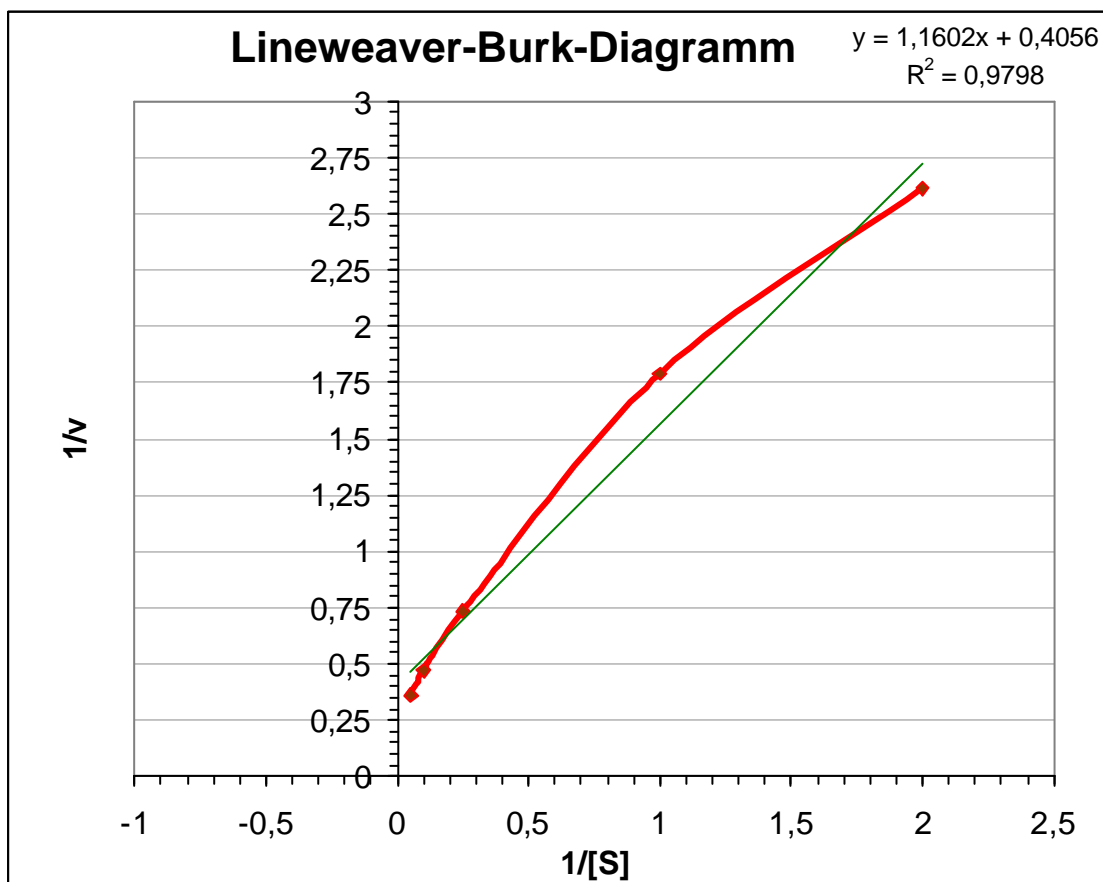
[S] [mmol/l]	$v_0$ [E/min]
20	2,763
10	2,118
4	1,361
1	0,559
0,5	0,383



Man muss nun die Maximalgeschwindigkeit  $v_{\max}$  in etwa abschätzen, da der Graph noch nicht im waagerechten Bereich ist:

$$v_{\max} = 2,9 \quad K_M = 4,4.$$

Bildet man die reziproken Werte  $1/v$  und  $1/[S]$  und trägt diese in einem Lineweaver-Burk-Diagramm gegeneinander auf, so kommt man zu diesem Graphen:



Da die Punkte nicht in einer Geraden liegen, fügt man eine Regressionsgerade ein und lässt sich die Geradengleichung anzeigen:

$$y = 1,1602x + 0,4056$$

Rechnerisch kann man  $1/K_M$  und  $1/v_{\max}$  ermitteln, indem  $y=0$  setzt für  $1/K_M$   
 $x=0$  setzt für  $1/v_{\max}$

$$\begin{array}{lcl} \text{Es ergibt sich} & 0 = 1,1602x + 0,4056 & | -0,4056 \\ & -0,4056 = 1,1602x & | : 1,1602 \\ & x = -0,35 \rightarrow 1/K_M & \end{array}$$

$$y = 0,41 \rightarrow 1/v_{\max}$$

Hierbei handelt es sich aber noch um Kehrwerte, die man rückgängig machen muss. Es ergibt sich für

$$K_M = -0,35^{-1} = 2,86$$

$$v_{\max} = 0,41^{-1} = 2,44$$

Zeichnerisch kann man die Regressionsgerade verlängern und die Schnittpunkte mit den beiden Achsen direkt ablesen und umrechnen. Man kommt zum selben Ergebnis.

### **Fehlerdiskussion**

Die von mir ermittelten  $K_M$ - und  $v_{\max}$ -Werte liegen weit auseinander. Das kann zum einen daran liegen, dass die beiden Methoden unterschiedlich genau sind. Zum anderen hat die Lineweaver-Burk-Abtragung auch keine Gerade ergeben, sondern eine weitere Kurve! Woran das liegt kann ich nicht sagen. Die Sättigungskurve sieht sehr gut aus, finde ich. Auch die anderen Graphen sehen gut aus. Es sind uns keine Fehler beim Pipettieren unterlaufen und wir haben keine Ansätze vertauscht. Aber egal was ich versucht habe (durch Verlängerung des Graphen Richtung x-Achse), es kam nie ein ähnliches Ergebnis wie bei der Sättigungskurve heraus???