

Robert Strothmann, 5040218
Jonas Scholz, 5153815
David Ueberle, 4903184

Jonas.Scholz@fu-berlin.de
Robert.Strothmann@fu-berlin.de
Ueberleda@zedat.fu-berlin.de

Laborbericht / Versuchsprotokoll

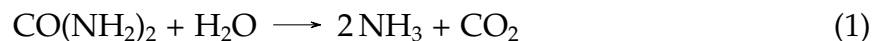
K4-Michaelis-Menten-Gleichung (Enzymkinetik)

Datum der Versuchsdurchführung: 31. Mai 2018
Datum der Protokolleinreichung: 21. Juni 2018
Assistent/in: Felix Gerke
Dateiname:K4-5040218-5153815-4903184-2

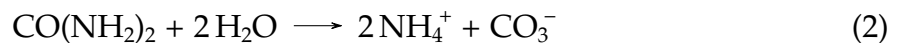
Mit der Einreichung wird versichert, dass das Protokoll von den oben eingetragenen Personen in gemeinschaftlicher Arbeit angefertigt worden ist und dass sämtliche Quellen, die zur Erstellung des Protokolls genutzt wurden, im ?? Teil des Protokolls (Literatur) kenntlich gemacht worden sind.

1 Einleitung

Biochemische Reaktionen, also solche, welche Reaktionen des Stoffwechsels lebender Zellen umfassen, unterliegen in den häufigsten Fällen einer katalytischen Beschleunigung. Dabei nutzt die Zelle eigens dafür konstruierte Proteine die sogenannten Enzyme als Katalysatoren. Bemerkenswert ist hierbei, dass jeder Reaktion des Metabolismus ein hierfür spezialisiertes Enzym bereitgestellt wird. Die Urease ist ein prominentes Beispiel für ein solches Protein. Spezieller handelt es sich hierbei um ein Metalloprotein. Sie ist überwiegend in solchen Organismen zu finden, die sich als sogenannte Destruenten durch Zersetzung von organischen Material ernähren und so unter anderen aus Harnstoff den für viele Organismen so wichtigen Stickstoff in Form von Ammonium bereitstellen. Die Urease katalysiert also folgende chemische Reaktion.



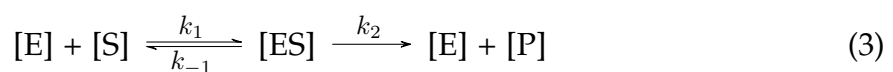
bzw. in wässriger Umgebung



Diese Reaktion eignet sich gut, um die Konzepte der Kinetik einer enzymatischen Reaktion zu veranschaulichen und wurde daher schon häufig als Labor-Modell für eine solche Untersuchung gewählt.

2 Theoretische Grundlagen^[1]

Als Grundlage bei dem Versuch dient die von Michaelis und Menten entwickelte Theorie zur Untersuchung der Enzymkinetik. Dabei wird angenommen, dass ein Enzym E zunächst mit einem Substrat S einen Komplex ES bildet, welcher in einem zweiten Schritt zum freien Enzym und dem Produkt P zerfällt. Weiterhin sei vorausgesetzt, dass die Rückreaktion des Enzyms mit dem Produkt vernachlässigt werden kann, somit eine irreversible Reaktion vorliegt.



Ferner wird vorausgesetzt, dass die Konzentration des ES-Komplexes [ES] in einem quasistationären Zustand vorliegen muss, sodass die zeitliche Änderung dieser annähernd null ist.

$$\frac{d[\text{ES}]}{dt} = k_1[\text{E}][\text{S}] - (k_{-1} + k_2)[\text{ES}] \stackrel{!}{=} 0 \quad (4)$$

Es ergibt sich unter Verwendung von

$$[\text{E}] = [\text{E}]_0 - [\text{ES}] \quad (5)$$

durch substituieren und umformen in Gleichung 4 die Michaelis-Menten Konstante K_M mit

$$K_M = \frac{([E]_0 - [ES]) \cdot [S]}{[ES]} = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1} \quad \text{bzw.} \quad [ES] = \frac{[E]_0 \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (6)$$

Damit ist es möglich für die Geschwindigkeit der Bildung des Produkts P die allgemeine Michaelis-Menten-Gleichung hinzuschreiben, welche den Reaktionsverlauf in Abhängigkeit der Substratkonzentration darstellt.

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2 \cdot [ES] = k_2 \cdot \frac{[E]_0 \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (7)$$

Hierbei können zwei mögliche Spezialfälle unterschieden werden.

1. Spezialfall: Reaktion 1. Ordnung

$$K_M \gg [S] \quad \implies \quad v = k_2 \cdot \frac{[E]_0 \cdot [S]}{K_M} \quad (8)$$

2. Spezialfall: Reaktion 0. Ordnung

$$K_M \ll [S] \quad \implies \quad v = k_2 \cdot [E]_0 \quad (9)$$

Desweiteren sei erwähnt, dass bei Substratüberschuss die maximale Reaktionsgeschwindigkeit dann erreicht ist, wenn alles Enzym an Substrat gebunden vorliegt.

$$v_{max} = k_2 \cdot [E]_0 \quad \text{mit} \quad [E]_0 = [ES] \quad (10)$$

Damit ergibt sich unter Verwendung der Gleichung 7 am Zeitpunkt $t = 0$, also dem Reaktionsbeginn

$$v_0 = \left(\frac{d[P]}{dt} \right)_{t=0} = k_2 \cdot \frac{[E]_0 \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (11)$$

folgende Beziehung

$$v_0 = v_{max} \cdot \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (12)$$

Nach Bildung des Kehrwertes erschließt sich so der mathematische Zusammenhang, welcher der graphischen Auftragung des Lineweaver-Burk-Plots zugrunde liegt.

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{v_{max}} + \frac{K_M}{v_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} \quad (13)$$

3 Durchführung

Zuerst wurde eine Kalibrierung mit einer Ammoniumcarbonatlösung durchgeführt. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen von $4 \cdot 10^{-3}$ M, $3 \cdot 10^{-3}$ M, $2 \cdot 10^{-3}$ M, $1 \cdot 10^{-3}$ M und $0.5 \cdot 10^{-3}$ M einer wässrigen Ammoniumcarbonatlösung angesetzt und deren Leitfähigkeit mit Konduktometer *Cond 3210* in einem auf 27.6°C temperierten Becherglas unter ständigem Rühren gemessen.

Anschließend wurde eine 0.1 M Harnstofflösung auf jeweils 100 ml der folgenden Konzentrationen verdünnt: $0.5 \cdot 10^{-3}$ M, $1 \cdot 10^{-3}$ M, $1.5 \cdot 10^{-3}$ M, $2 \cdot 10^{-3}$ M, $3 \cdot 10^{-3}$ M, $4 \cdot 10^{-3}$ M, $6 \cdot 10^{-3}$ M, $8 \cdot 10^{-3}$ M, $1 \cdot 10^{-2}$ M. Außerdem wurden 100 ml einer wässrigen Ureaselösung mit der Konzentration 1 g/L hergestellt.

Die Messung erfolgte indem 100 ml der Harnstofflösungen unterschiedlicher Konzentration in dem Becherglas vorgelegt und auf 27.6°C temperiert wurde. Sobald die Temperatur erreicht worden ist, wurde unter ständigem Rühren die Leitfähigkeit bestimmt und 10 ml der Ureaselösung hinzugegeben. Für 3 Minuten wurde alle 10 Sekunden die Leitfähigkeit gemessen.

Um den Einfluss, der Ureaselösung auf die Leitfähigkeit zu messen, wurden 5 ml auf 55 ml mit Wasser verdünnt und erneut die Leitfähigkeit gemessen.

Zwischen allen Messungen wurden das Becherglas, der Rührfisch und die Messsonde gespült.

4 Auswertung

Um eine Relation zwischen Leitfähigkeit und Konzentration des Produktes zu erhalten, wurde eine Eichgerade durch die lineare Regression der Kalibrierungsmessreihe bestimmt (vgl. Abbildung 4.1). Ferner wurde die Konzentration der Urease im Prozess als Konstant angenommen ($78 \text{ } [\mu\text{S}/\text{cm}]$) und von jeder Messung subtrahiert, um aus der vorliegenden Leitfähigkeit die Produktkonzentration gemäß folgender Gleichung abzuleiten :

Sei :

$[P]_M$ die Konzentration des Produktes in einer Messung

σ_M die gemessene Leitfähigkeit in $[\mu\text{S}/\text{cm}]$

σ_U die konstante Leitfähigkeit der Urease bei gegebener Verdünnung

$f()$ die Eichfunktion, die eine Leitfähigkeit in die Produktkonzentration abbildet.

Es gilt :

$$[P] \sim \sigma_M \quad | \quad [P] = f(\sigma_M - \sigma_U) \quad (14)$$

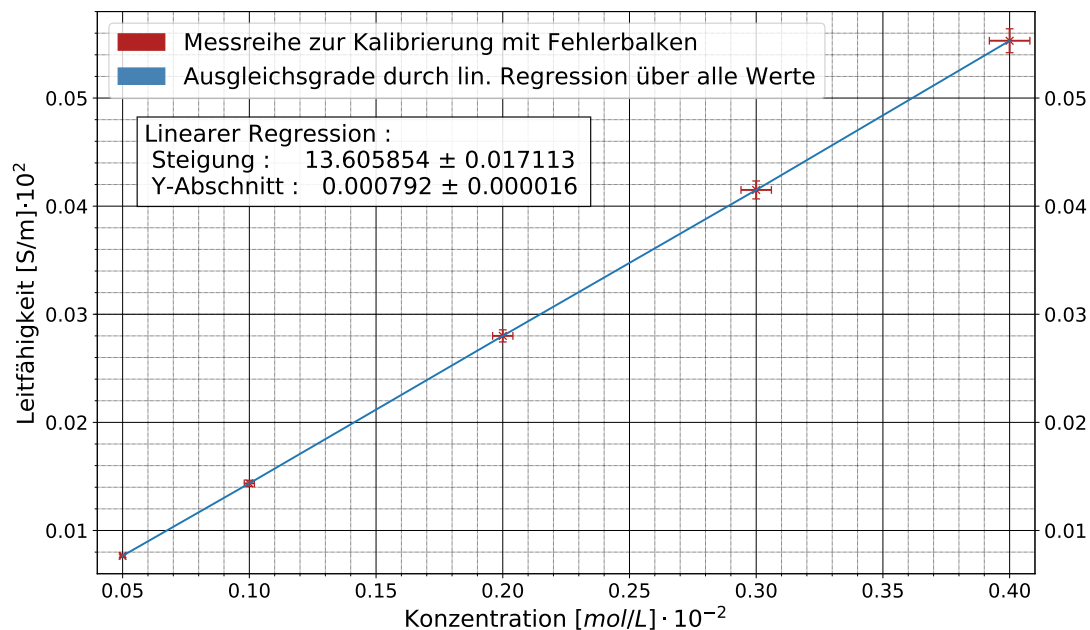


Abbildung 4.1: Eichgerade mithilfe der lineare Regression der Kalibrierungsreihe durch eine Routine in der Programmiersprache *python*. Fehlerbalken resultieren aus Messungenauigkeit sowie Abmessungsfehler sowie dem Fehler des Verfahrens.

Im folgenden Schritt wurden die neun durchgeführten Messreihen in einer Abbildung als zeitliche Messung der Konzentration aufgetragen. Insbesondere wurde hierfür Gleichung 14 verwendet um aus der eigentlich gemessene Leitfähigkeit die Konzentration zu bestimmen. Der Fehler ergibt sich hier als Fehler des Verfahrens sowie als Fehler

basierend auf der fehlerbehaftete Eichfunktion.

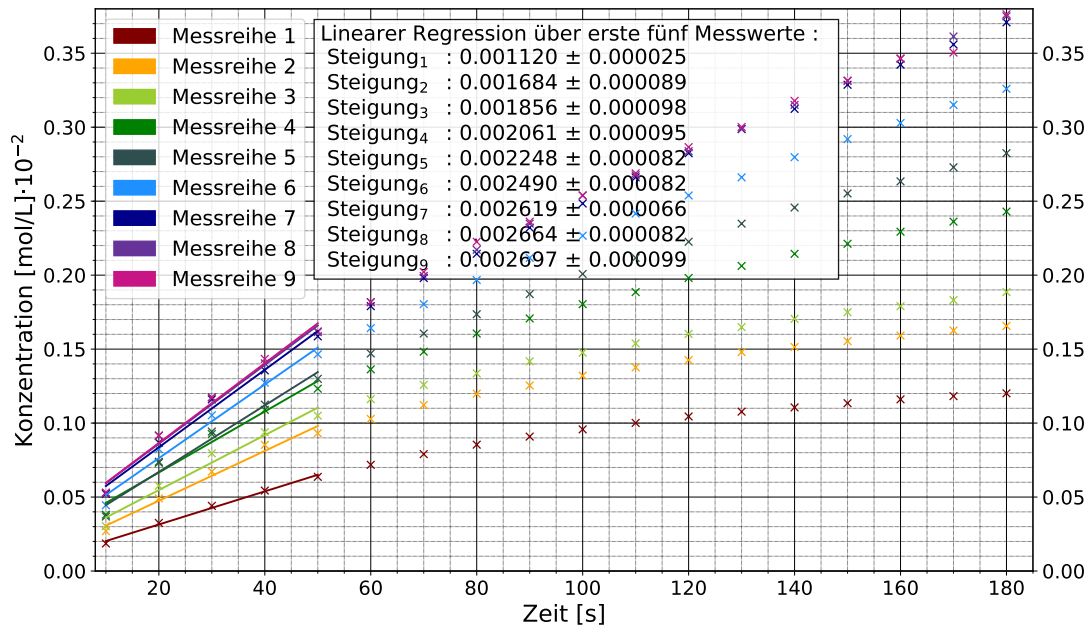


Abbildung 4.2: Auftragung der neun durchgeführten Messreihen der Konzentration über der Zeit. Die Ausgleichsgeraden im Bereich der ersten fünf Messpunkte wurde durch eine lineare Regression in der Programmiersprache *python* erzeugt, ferner die Steigung dieser Geraden ermittelt sowie dessen Fehler.

Wichtig ist hier, dass die betreffenden Steigungen sich auf die Konzentrationszunahme der gemessenen Leitfähigkeit, also der Ammoniumcarbonatkonzentration bezieht. Die erhaltenen Steigungen bezogen auf die verwendete Verdünnung sowie der zugehörigen Fehler wurden in folgender Tabelle in signifikanten Stellen angegeben.

Tabelle 4.1: Steigungen der Ausgleichsgeraden, welche durch eine lineare Regression der ersten fünf Messwerte erhalten wurden. Die lineare Regression erfolgte über eine Routine in *python*

Messreihe	Steigung $\left[\frac{\text{s} \cdot \text{mol}}{\text{L}}\right] \cdot 10^{-3}$	Absoluter Fehler $\left[\frac{\text{s} \cdot \text{mol}}{\text{L}}\right] \cdot 10^{-3}$	Konzentration Harnstoff $[\text{mol/L}] \cdot 10^{-2}$
1	1.120	± 0.025	0.05
2	1.684	± 0.089	0.10
3	1.856	± 0.098	0.15
4	2.061	± 0.095	0.2
5	2.248	± 0.082	0.3
6	2.490	± 0.082	0.4
7	2.619	± 0.066	0.6
8	2.664	± 0.082	0.8
9	2.697	± 0.099	1

Mithilfe dieser wurde ein *Lineweaver-Burk-Plot* angefertigt um die gesuchten Größen v_{\max} , K_M , k_2 aus den bestimmten Steigungen, also Anfangsgeschwindigkeiten v_0 , zu bestimmen. Hierfür wurde insbesondere Gleichung 9 verwendet, also die Annahme

eines linearen Verlaufs der somit formalen Reaktion nullter Ordnung, für die ersten Messwerte einer jeden gezeigten Messreihe in Abbildung 4.2. Die ermittelten Anfangsgeschwindigkeit wurden über die zugehörige Konzentration des Harnstoffs in einem reziproken Raum aufgetragen.

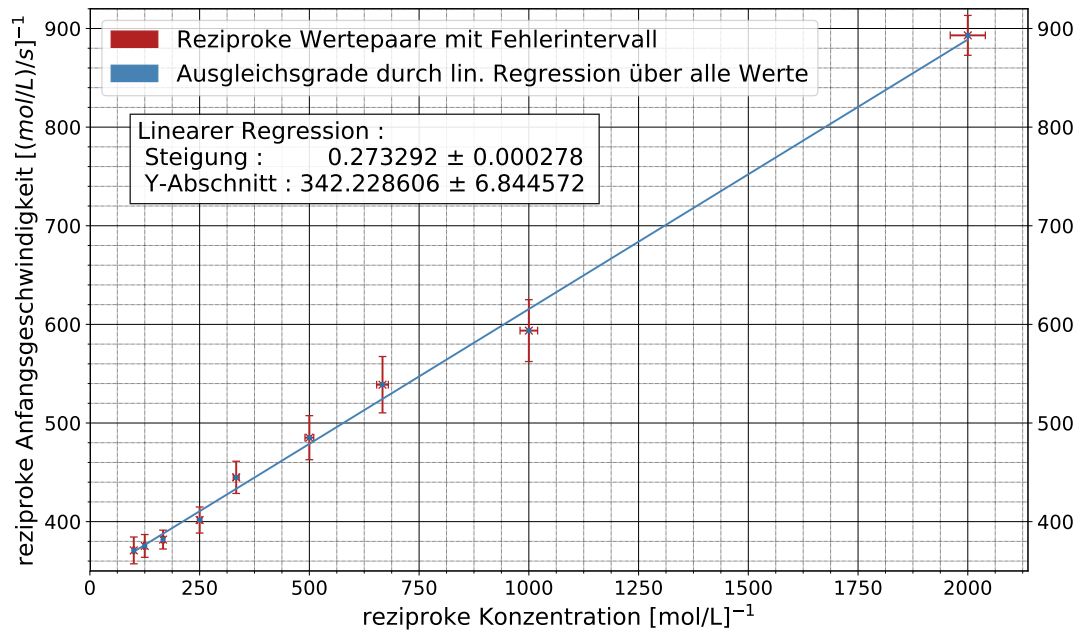


Abbildung 4.3: Auftragung der neun reziproken Wertepaare als Anfangsgeschwindigkeit über Konzentration. Die Fehler resultieren bezogen auf die Y-Achse aus den Fehlern der Steigungen und in der X-Achse aus der Messungenauigkeit von 2%. Die Ausgleichsgerade wurde durch eine lineare Regression über alle Punkte in der Programmiersprache *python* erzeugt. Der Fehler bezieht sich neben dem Fehler des Verfahrens ebenfalls auf zuvor angesprochene fehlerbehaftete Größen.

Die Geradengleichung ergibt sich also in fehlerfreier Darstellung wie folgt :

$$g(x) = 0.2733x + 342.229 \quad (15)$$

Gemäß Gleichung 13 lässt sich hierdurch $\frac{1}{v_{max}}$ als Y-Achsenabschnitt (als n) sowie ferner $\frac{K_M}{v_{max}}$ als Steigung (als m) bestimmen. Die Fehler resultieren aus den Fehlern der Regression.

$$v_{max} = \frac{1}{n} = \frac{1}{342.229} \approx 2.92 \cdot 10^{-3} \quad \left[\frac{\text{mol}}{\text{L} \cdot \text{s}} \right] \quad (16)$$

$$\Delta v_{max} = \left| \frac{\partial v_{max}}{\partial n} \right| \Delta n = \left| -\frac{1}{n^2} \right| \Delta n \approx \pm 0.03 \cdot 10^{-3} \quad \left[\frac{\text{mol}}{\text{L} \cdot \text{s}} \right] \quad (17)$$

Es ergibt sich somit :

$$v_{max} = (2.92 \pm 0.03) \cdot 10^{-3} \left[\frac{\text{mol}}{\text{L} \cdot \text{s}} \right] \quad (18)$$

Die Michaelis Menten Konstante ergibt sich als Produkt der Steigung und des zuvor bestimmten v_{max} . Betrachte ferner für die Einheitenberechnung, dass die Steigung in [s], da $\left[\frac{\text{mol}}{\text{L}} \cdot \frac{\text{L} \cdot \text{s}}{\text{mol}} = \text{s} \right]$:

$$K_M = v_{max} \cdot m = 2.92 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{L} \cdot \text{s}} \cdot 0.2733 \text{ s} \approx 8.097 \cdot 10^{-4} \left[\frac{\text{mol}}{\text{L}} \right] \quad (19)$$

Der Fehler resultiert analog als Summe der partiellen Ableitungen gemäß :

$$\Delta K_M = \left| \frac{\partial K_M}{\partial v_{max}} \right| \Delta v_{max} + \left| \frac{\partial K_M}{\partial m} \right| \Delta m = m \Delta v_{max} + v_{max} \Delta m \approx 8.93 \cdot 10^{-7} \left[\frac{\text{mol}}{\text{L}} \right] \quad (20)$$

Der Wert der Michaelis Menten Konstante ist also :

$$K_M = (8.097 \pm 0.009) \cdot 10^{-4} \left[\frac{\text{mol}}{\text{L}} \right] \quad (21)$$

Die Übergangskonstante k_2 kann unter Nutzung der Konzentration der verwendeten Urease bestimmt werden. Die Konzentration der Urease wurde mit einer Messungenauigkeit von 10%, basierend des Einwiegens, gegeben als :

$$[Urease]_0 = \frac{m}{M} \cdot \frac{1}{V} = (1.85 \pm 0.19) \cdot 10^{-6} \left[\frac{\text{mol}}{\text{L}} \right] \quad (22)$$

bestimmt. Im Anschluss ergibt sich k_2 als :

$$k_2 = \frac{v_{max}}{[Urease]_0} = \frac{2.92 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{L} \cdot \text{s}}}{1.85 \cdot 10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{L}}} \approx 1.58 \cdot 10^3 \left[\frac{1}{\text{s}} \right] \quad (23)$$

Sowie dessen Fehler :

$$\Delta k_2 = \left| \frac{\partial k_2}{\partial v_{max}} \right| \Delta v_{max} + \left| \frac{\partial k_2}{\partial [Urease]_0} \right| \Delta [Urease]_0 = \dots \quad (24)$$

$$\dots \left| \frac{1}{v_{max}} \right| \Delta v_{max} + \left| \frac{v_{max}}{([Urease]_0)^2} \right| \Delta [Urease]_0 \approx 0.16 \cdot 10^3 \left[\frac{1}{s} \right]$$

Die Übergangskonstante k_2 lautet somit :

$$k_2 = (1.58 \pm 0.16) \cdot 10^3 \left[\frac{1}{s} \right] \quad (25)$$

5 Zusammenfassung

Zu untersuchen war in den getätigten Versuch die enzymkatalysierte Zersetzung von Harnstoff in Ammoniumcarbonat. Insbesondere sollten Eigenschaften der Reaktionskinetik über die Michaelis Menten Theorie studiert werden. Die Ergebnisse als v_{max} entsprechend der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit, k_2 als Übergangskonstante des zweiten irreversiblen Schritt der Reaktion sowie K_M als Michealis Menten Konstante, wurden in folgender Tabelle dargestellt :

Tabelle 5.1: Erhaltene experimentelle Werte sowie Gegenüberstellung zur Literatur

	experimenteller Wert	Literatur ^[2]
$v_{max} \left[\frac{\text{mol}}{\text{L} \cdot \text{s}} \right]$	$(2.92 \pm 0.03) \cdot 10^{-3}$	
$k_2 \left[\frac{1}{s} \right]$	$(1.58 \pm 0.16) \cdot 10^3$	$25 \cdot 10^3$
$K_M \left[\frac{\text{mol}}{\text{L}} \right]$	$(8.08 \pm 0.01) \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-4}$

Weder die Michaelis Menten Konstante, noch die Maximalgeschwindigkeit sind verträglich mit den Literaturwerten. Insbesondere ist die Abweichung des experimentell bestimmten Wechselzahl k_2 auffällig. Da k_2 direkt Proportional zu der Konzentration der Urease ist, sowie antiproportional zu der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit gemäß Gleichung 23 kann durch diesen Zusammenhang die Abweichung untersucht werden. Nehmen wir an, dass die Konzentration der Urease nicht stark fehlerbehaftet war, somit begründet sich der Fehler von k_2 besonders durch $\frac{1}{v_{max}}$. Ferner ist $\frac{1}{v_{max}} = n$ gerade der *offset* gemäß Gleichung 13. Es folgt also, dass der Y-Achsenabschnitt, berechnet durch die lineare Regression, einen zu hohen Wert angenommen hat. Dies liegt genau dann vor, wenn die reziproken Anfangsgeschwindigkeiten gerade Werte um den Y-Achsenabschnitt annehmen, sowie die Steigung verhältnismäßig gering ist. Zurück zum Experiment heißt dies also, dass die linearen Regressionen der durchgeführten Messreihen in Abbildung 4.2, zum einen eine zu ähnliche Steigung und zum anderen eine zu steile Steigung besitzen. Dies kann daran liegen, dass wir von einem idealen System ausgehen, also von einer Reinheit von 100% des verwendeten Harnstoffes sowie der Urease ausgehen. Ebenfalls gehen wir davon aus, dass die Urease sich nicht durch äußere Einflüsse zersetzt hat.

Literatur

- [1] G. Wedler, *Lehrbuch der physikalischen Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
 [2] M. Otto, *Analytische Chemie*, 4 Auflage, Wiley-VCH Verlag, **2011**.

6 Rohdaten

Tabelle 6.1: Rodaten aus der Leitfähigkeitsmessung der Hydrolyse von Harnstoff bei verschiedenen Konzentrationen. Die Werte sind in $\left[\frac{\mu\text{S}}{\text{cm}}\right]$ angegeben. Die Temperatur betrug 27.7 °C.

Zeit in [s]	1.0 $\left[\frac{\text{mol}}{\text{L}}\right]$	0.8 $\left[\frac{\text{mol}}{\text{L}}\right]$	0.6 $\left[\frac{\text{mol}}{\text{L}}\right]$	0.4 $\left[\frac{\text{mol}}{\text{L}}\right]$	0.3 $\left[\frac{\text{mol}}{\text{L}}\right]$
10.0	111.4	111.2	110.7	105.1	99.5
20.0	139.8	139.6	136.2	133.0	126.7
30.0	158.7	158.7	157.7	149.8	141.7
40.0	177.8	175.6	172.1	166.0	155.1
50.0	191.5	191.1	189.0	180.1	167.9
60.0	206.0	206.0	204.0	193.1	180.5
70.0	221.0	219.0	218.0	205.0	190.4
80.0	236.0	232.0	230.0	217.0	200.0
90.0	246.0	245.0	243.0	228.0	210.0
100.0	259.0	259.0	255.0	239.0	220.0
110.0	270.0	269.0	268.0	250.0	228.0
120.0	283.0	281.0	280.0	259.0	236.0
130.0	293.0	292.0	292.0	268.0	245.0
140.0	306.0	304.0	302.0	278.0	253.0
150.0	316.0	316.0	314.0	287.0	260.0
160.0	327.0	327.0	324.0	295.0	266.0
170.0	330.0	338.0	334.0	304.0	273.0
180.0	349.0	348.0	345.0	312.0	280.0

Tabelle 6.2: Rodaten aus der Leitfähigkeitsmessung der Hydrolyse von Harnstoff bei verschiedenen Konzentrationen. Die Werte sind in $\left[\frac{\mu\text{S}}{\text{cm}}\right]$ angegeben. Die Temperatur betrug 27.7 °C.

Zeit in [s]	0.2 $\left[\frac{\text{mol}}{\text{L}}\right]$	0.15 $\left[\frac{\text{mol}}{\text{L}}\right]$	0.1 $\left[\frac{\text{mol}}{\text{L}}\right]$	0.05 $\left[\frac{\text{mol}}{\text{L}}\right]$
10.0	100.4	94.7	92.3	86.1
20.0	126.2	114.8	108.5	96.3
30.0	140.5	130.9	121.8	104.8
40.0	152.5	141.4	135.1	112.4
50.0	163.0	149.6	140.9	119.2
60.0	172.6	157.8	148.0	125.2
70.0	181.4	164.9	154.9	130.5
80.0	190.4	170.6	160.5	135.2
90.0	197.9	176.6	164.6	139.2
100.0	205.0	180.9	169.5	142.8
110.0	211.0	185.5	173.6	146.0
120.0	218.0	190.2	177.2	149.2
130.0	224.0	193.6	181.2	151.6
140.0	230.0	197.7	183.7	153.7
150.0	235.0	201.0	186.6	155.8
160.0	241.0	204.0	189.4	157.7
170.0	246.0	207.0	191.9	159.3
180.0	251.0	211.0	194.2	160.7