

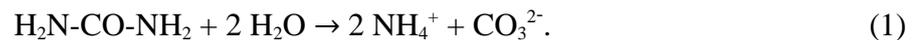
Aufgabe:

Untersuchung der Kinetik der Zersetzung von Harnstoff durch Urease.

Grundlagen:**a) Michaelis-Menten-Kinetik**

Im Bereich der Biochemie spielen katalytische Reaktionen eine wichtige Rolle. Solche Biokatalysatoren werden als Enzyme bezeichnet.

Die Urease ist ein Enzym, welches in wässriger Umgebung Harnstoff (das Diamid der Kohlensäure) zu Ammoniumcarbonat spaltet. Die Bruttoreaktionsgleichung lautet hierfür:



Obwohl Katalysatoren, in diesem Fall die Urease, nach Ablauf der Reaktion unverändert vorliegen und daher nicht in der Bruttoreaktionsgleichung auftauchen, nehmen sie entscheidenden Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Das einfachste Modell einer enzymkatalysierten Reaktion ist der Michaelis-Menten-Mechanismus:



E bezeichnet hier das Enzym, S das Substrat und P die Produkte. Im ersten Schritt wird also in einer reversiblen Reaktion der Enzym-Substrat-Komplex ES mit der Geschwindigkeitskonstanten k_1 gebildet bzw. mit k_{-1} wieder zu den Edukten zersetzt. In einem zweiten, irreversiblen Schritt werden die Produkte aus ES gebildet, wobei das Enzym zurückgewonnen wird. Die zeitliche Änderung der Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes [ES] kann nun wie folgt beschrieben werden:

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

Die Bildungsgeschwindigkeit v der Produkte lautet:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES]. \quad (4)$$

Bleibt nun die Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes während der gesamten Reaktion klein, gilt das Quasistationaritätsprinzip nach Bodenstein:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0. \quad (5)$$

Es gilt außerdem die Massenbilanz

$$[E] + [ES] = [E]_0, \quad (6)$$

wobei $[E]_0$ die anfängliche Enzymkonzentration darstellt.

Durch entsprechendes Umstellen der Gleichungen (5) und (6) sowie Einsetzen in Gleichung (4), erhält man die sogenannte Michaelis-Menten-Gleichung:

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

mit

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}. \quad (8)$$

Für den Fall, dass $[S]$ wesentlich größer als K_M ist, gilt die Näherung $[S] + K_M \approx [S]$. Das Geschwindigkeitsgesetz aus (7) reduziert sich dann zu

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[E]_0. \quad (9)$$

Die Bildung des Produkts folgt somit einem Zeitgesetz nullter Ordnung.

Ist $[S]$ wesentlich kleiner als K_M , so ergibt sich eine Reaktion erster Ordnung bezüglich $[S]$:

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2 \frac{[E]_0[S]}{K_M} \quad (10)$$

Zum Zeitpunkt $t = 0$ ist die Konzentration des Substrats $[S]_0$ bekannt, deshalb können aus der Messung der Anfangsgeschwindigkeit v_0 die Konstanten K_M und k_2 bestimmt werden:

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

Der Kehrwert von Gleichung (11) liefert die Lineweaver-Burk-Auftragung:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{v_{\max}} + \frac{1}{[S]_0} \cdot \frac{K_M}{v_{\max}}, \quad (12)$$

mit $v_{\max} = k_2 \cdot [E]_0$.

Die Auftragung von $1/v_0$ gegen $1/[S]_0$ ergibt somit eine Gerade, aus deren Ordinatenabschnitt und Steigung man K_M und v_{\max} ermittelt werden kann.

b) Leitfähigkeit von Elektrolyten

Der Widerstand im Allgemeinen ist definiert als das Verhältnis von Spannung zu Strom. In einem Elektrolyten ist er proportional zum Quotienten aus Abstand der Elektroden l und Elektrodenfläche A . Man definiert daher einen spezifischen Widerstand ρ , der für einen elektrolytischen Leiter charakteristisch ist:

$$\rho = R \frac{A}{l} \quad (13)$$

Die spezifische Leitfähigkeit κ ist definiert als der Kehrwert des spezifischen Widerstands

$$\kappa = \frac{1}{\rho} = \frac{l}{R \cdot A} \quad \left[\frac{1}{\Omega \cdot m} = \frac{S}{m} \right] \quad (14)$$

und hängt von der Konzentration des Elektrolyten in Lösung ab.

Harnstoff in wässriger Lösung ist nicht leitfähig, die spezifische Leitfähigkeit κ , die bei diesem Versuch vor der Zugabe der Urease-Lösung gemessen wird, stammt also von der schwachen Eigenleitfähigkeit des Wassers. Übersteigt κ einen Wert von $7 \mu\text{S}/\text{cm}$ sind die Verunreinigungen zu groß, so dass die Glasgeräte noch einmal gespült und die Lösung neu angesetzt werden muss. Die Leitfähigkeitszunahme nach Zugabe der Urease-Lösung resultiert dann aus der Bildung des Ammoniumcarbonats durch die Harnstoffspaltung der Urease. Nach einer kurzen Mischphase (ca. 20 s) kann der erwartete lineare Anstieg der spezifischen Leitfähigkeit mit der Zeit beobachtet werden.

Durchführung:

- Bitte USB-Stick mitbringen! –

- 1) Berechnen Sie vor Beginn des Praktikums die benötigten Massen und Volumina für die Verdünnungsreihen von Harnstoff- und Ammoniumcarbonatlösung.
- 2) Setzen Sie eine Urease-Suspension mit $\beta = 2 \text{ g/l}$ an. Achten Sie auf gute Durchmischung.
- 3) Stellen Sie ausgehend von 100 ml einer 0,1 M Harnstofflösung eine Verdünnungsreihe mit je 50 ml Lösung der folgenden Konzentrationen (in mol/l) her:
 $2 \cdot 10^{-3}$; $2,2 \cdot 10^{-3}$; $2,5 \cdot 10^{-3}$; $2,8 \cdot 10^{-3}$; $3,4 \cdot 10^{-3}$; $4 \cdot 10^{-3}$; $5 \cdot 10^{-3}$; $8 \cdot 10^{-3}$; $2 \cdot 10^{-2}$; $5 \cdot 10^{-2}$.
- 4) Gehen Sie wie folgt mit jeder Harnstofflösung vor: Die Harnstofflösung wird auf Zimmertemperatur temperiert (kann mit „measure“ verfolgt werden) und mit dem Magnetrührer gerührt (wenn $\kappa > 7 \mu\text{S}/\text{cm}$ Lösung entsorgen, gut spülen und neu ansetzen). Nach dem Erreichen der Temperatur starten Sie die Messung und geben wenige Sekunden später 5 ml Urease-Suspension (vor Entnahme nochmal schütteln!) mit einer Vollpipette zu. Nach 3 Minuten beenden Sie die Messung und speichern die Daten (Option „Alle Daten an measure übertragen“ auswählen, dann unter Messung „Messwerte exportieren“ wählen → Exportieren in Datei)

- 5) Setzen Sie eine Verdünnungsreihe von Ammoniumcarbonatlösungen ausgehend von 50 ml einer 0,1 molaren Stammlösung mit folgenden Konzentrationen an (in mol/L): $5 \cdot 10^{-4}$; $5 \cdot 10^{-3}$; $1 \cdot 10^{-2}$; $1,5 \cdot 10^{-2}$; $2 \cdot 10^{-2}$. Messen Sie die Leitfähigkeiten der jeweiligen Lösungen. (Achtung: Das Ammoniumcarbonat muss vollständig gelöst sein!)

WICHTIG: Beim Hinzufügen der Urease darauf achten, dass das Enzym auch tatsächlich in die Lösung gelangt und nicht etwa am Rand des Kolbens verbleibt, da hier kleinste Änderungen zu großen Fehlern führen können.

Auswertung:

- 1) Tragen Sie die Leitfähigkeit der verschiedenen Ammoniumcarbonatlösungen gegen die Konzentration auf und führen Sie eine lineare Regression durch. So erhalten Sie die Kalibriergerade.
- 2) Ermitteln Sie aus der Auftragung der gemessenen Leitfähigkeiten der Harnstoff-Urease-Lösungen gegen die Zeit die Anfangsgeschwindigkeiten v_0 . Vernachlässigen Sie hierbei ungefähr die ersten 20 s nach der Urease-Zugabe und verwenden Sie die in den anschließenden 120 s aufgenommenen Messwerte. (Die zugehörigen Tabellen müssen NICHT ins Protokoll.)
- 3) Bestimmen Sie mithilfe der Lineweaver-Burk-Auftragung die Konstanten K_M und v_{max} aus den Anfangsgeschwindigkeiten v_0 . ACHTUNG: Durch die Zugabe von 5 ml wässriger Ureaselösung ergibt sich eine nicht vernachlässigbare Änderung der Harnstoff-Anfangskonzentration. Für die Lineweaver-Burk-Auftragung müssen daher die Konzentrationen umgerechnet werden. Hierfür kann von einer idealen Lösung, also von einem Gesamtvolumen von 55 ml ausgegangen werden.
- 4) Diskutieren Sie Ihre Ergebnisse (nicht nur anhand der Fehlerrechnung) und mögliche Abweichungen von Literaturwerten.

Was man wissen sollte:

Vorgelagertes Gleichgewicht, Reaktionen 0., 1., 2. Ordnung, Quasistationarität nach Bodenstein, Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten, Prinzip von

Leitfähigkeitsmessung, Leitfähigkeit starker und schwacher Elektrolyte, Kohlrausch-Quadratwurzelgesetz, Ostwaldsches Verdünnungsgesetz.

Zusatzfragen

- Skizzieren Sie den Konzentrations-Zeit-Verlauf der an der Reaktion beteiligten Spezies qualitativ.
- Erklären Sie die Funktionsweise eines Katalysators. Skizzieren Sie zusätzlich ein Energiepotentialdiagramm für eine Reaktion Ihrer Wahl mit und ohne Einfluss des Katalysators.