

# Enzymkinetik

**Praktikanten:** Mirjam Eisele und Matthias Jasch

**Gruppennummer:** 129

**Versuchsdatum:** 3. September 2009

**Betreuer:** Benjamin Marchetti

## 1 Aufgabenstellung

In diesem Versuch soll der Einfluss der eingesetzten Menge an Enzym auf den Substratumsatz und auf die spezifische Aktivität des Enzyms alkalische Phosphatase untersucht werden. Dazu wird die enzymkatalysierte Hydrolyse von Phosphorsäure-Nitrophenolester zu p-Nitrophenol und Phosphat untersucht.

Ferner soll die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration sowie der Einfluss eines Hemmstoffes mittels Lineweaver-Burk-Diagrammen untersucht und die Art der Hemmung bestimmt werden.

## 2 Theorie

### 2.1 UV/Vis-Spektroskopie

Die UV/Vis-Spektroskopie beruht darauf, dass Moleküle mit elektromagnetischer Strahlung wechselwirken und so beispielsweise die Intensität von Licht abschwächen. Die Abschwächung rührt daher, dass Photonen einer bestimmten Wellenlänge absorbiert werden. Für die Absorption gilt

$$E = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d \quad (1)$$

wobei  $E$  die Extinktion (Abschwächung),  $\varepsilon_{\lambda}$  der Extinktionskoeffizient, ein Proportionalitätsfaktor,  $c$  die Konzentration der zu messenden Lösung und  $d$  die Länge des Weges ist, den das Licht in der Lösung zurücklegt.

Mit der UV/Vis-Spektroskopie kann die Konzentration eines gelösten Stoffes bestimmt werden. Über diese Konzentration können dann Rückschlüsse auf die Reaktionsgeschwindigkeit gezogen werden.

### 2.2 Enzymreaktionen

Bei einer Enzymreaktion wird ein Substrat  $S$  mittels eines Enzyms  $E$ , das als Katalysator wirkt, in ein Produkt  $P$  überführt. Dabei reagiert zunächst das Substrat mit dem Enzym zu einem Enzym-Substrat-Komplex  $ES$ , der dann weiter mit einem Reaktand  $R$  zum Produkt reagiert. Mögliche Rückreaktionen werden hierbei vernachlässigt.



Die Kinetik folgt dem Michaelis-Menten-Mechanismus für Enzymreaktionen.

### 2.3 Hemmung

Bei der Hemmung von Enzymaktivität lassen sich zwei Fälle unterscheiden. Zum einen die irreversible und zum anderen die reversible Hemmung. Die reversible Hemmung lässt sich außerdem noch weiter in kompetitive und nichtkompetitive Hemmung unterteilen.

#### 2.3.1 Irreversible Hemmung

Bei irreversibler Hemmung wird der Inhibitor sehr fest an das Enzym gebunden, sodass es nicht mehr aktiv werden kann, da die Dissoziation wenn überhaupt nur sehr langsam verläuft.

### 2.3.2 Reversible Hemmung

1. **Kompetitive Hemmung.** In diesem Fall wird ein Inhibitor, der dem Substrat chemisch sehr ähnlich ist, an das aktive Zentrum des Enzyms gebunden, sodass dieses blockiert ist.  $v_{max}$  wird hierdurch nicht beeinflusst, da die kompetitive Hemmung durch eine hohe Substratkonzentration unterbunden werden kann.
2. **Nichtkompetitive Hemmung.** Hier besetzen Inhibitor und Substrat gleichzeitig unterschiedliche aktive Zentren eines Enzymmoleküls, sodass dieses seine Arbeit nur verlangsamt tun kann. Da es sich hier um zwei unterschiedliche aktive Zentren handelt, hat die Substratkonzentration keine Auswirkung auf die maximale Reaktionsgeschwindigkeit -  $v_{max}$  sinkt.

## 3 Versuchsbeschreibung

### 3.1 Konzentrationen der gegebenen Lösungen

Im Folgenden werden für verschiedene Lösungen Konzentrationen verwendet, die nicht berechnet wurden. Diese ergeben sich aus den Angaben im Praktikumsskript und sind hier zusammengefasst.

Die im Folgenden mit  $c_{Eich}$  bezeichnete Stammlösung zur Bestimmung der Eichgeraden ist eine wässrige Lösung von p-Nitrophenol mit einer Konzentration von  $c_{Eich} = 11,4 \frac{mg}{l}$ .

Als  $c_{Sub}$  wird die Stammlösung zur Bestimmung der Substratkonzentration bezeichnet. Es handelt sich um eine wässrige Lösung des Dinatriumsalzes des Phosphorsäure-mono-(4-nitrophenylesters) mit  $c_{Sub} = 2 \frac{g}{l}$ .

Die verwendete Enzymlösung des Enzyms „alkalische Phosphatase“ hat eine Konzentration von  $c = 0,15 \frac{g}{l}$ .

Als Hemmlösung wurde eine wässrige Lösung von Natriumdihydrogenphosphat mit einer Konzentration von  $c = 9,1 \frac{g}{l}$  verwendet.

### 3.2 Eichgerade

Zum aufnehmen der Eichgerade werden fünf Verdünnungen einer p-Nitrophenollösung gegen destilliertes Wasser gemessen.

Als Blindprobe wird reines Wasser verwendet.

Tabelle 1: Verdünnungen zum Aufnehmen der Eichgerade.

Nr.	p-Nitrophenol/ml	Wasser/ml
1	1	4
2	2	3
3	3	2
4	4	1
5	5	0

### 3.3 Bestimmung der Aktivität

Zur Bestimmung der Aktivität des Enzyms werden fünf Reagenzgläser wie folgt befüllt.

Tabelle 2: Mischungen zur Messung der Aktivität des Enzyms.

Nr.	Puffer/ml	Substrat/ml	Enzym/ml
1	0,5	0,48	0,02
2	0,5	0,47	0,03
3	0,5	0,44	0,06
4	0,5	0,4	0,1
5	0,5	0,35	0,15

Nachdem das Enzym zugegeben wurde, werden alle Reagenzgläser schnell in 36°C warmes Wasser gestellt. Nach 30 Minuten werden in jedes Reagenzglas 2 ml Stopplösung (Natronlauge) gegeben und die Reagenzgläser mit Eis gekühlt, damit die Reaktion nicht weiterläuft. Anschließend wird der Inhalt der Reagenzgläser in je ein mit weiteren 3 ml Stopplösung befülltes Schnappdeckelglas gegeben. Diese Lösung wird dann mit dem UV/Vis-Spektrometer untersucht.

Als Blindprobe wird eine Mischung aus 0,5 ml Substrat, 0,4 ml Puffer und 0,1 ml Wasser verwendet.

### 3.4 Substratkonzentrationsabhängigkeit

Zur Bestimmung der Substratkonzentrationsabhängigkeit werden sechs Reagenzgläser wie folgt befüllt.

Tabelle 3: Mischungen zur Bestimmung der Substratkonzentrationsabhängigkeit.

Nr.	Puffer/ml	Substrat/ml	Enzym/ml
1	0,88	0,02	0,1
2	0,84	0,06	0,1
3	0,78	0,12	0,1
4	0,7	0,2	0,1
5	0,55	0,35	0,1
6	0,4	0,5	0,1

Nachdem das Enzym zugegeben wurde, werden auch hier wieder alle Reagenzgläser schnell in 36°C warmes Wasser gestellt, nach 30 Minuten mit Stopplösung versetzt und mit dem UV/Vis-Spektrometer untersucht.

Als Blindprobe wird eine Mischung aus 0,5 ml Puffer, 0,5 ml Substrat verwendet.

### 3.5 Hemmung

Hier werden Lösungen verwendet, denen unterschiedlich viel Phosphat als Hemmsubstanz zugesetzt ist. (cf. 3.5.1)

#### 3.5.1 Berechnung der Hemmlösungskonzentrationen

Für die Konzentration der Hemmlösung gilt folgender Zusammenhang.

$$c = c_{Hem} \cdot \frac{V_{Hem}}{V_{ges}} \quad (4)$$

Wobei  $c_{Hem}$  die Konzentration der Stammlösung,  $V_{Hem}$  das zugegebene Volumen der Stammlösung und  $V_{ges}$  das Gesamtvolumen der unverdünnten Reaktionslösung ist.

#### Verdünnung 1<sup>1</sup>

$$c_{Verd1} = c_{Hem} \cdot \frac{V_{Hem}}{V_{ges}} = 9,2 \frac{mg}{ml} \cdot \frac{0,1ml}{1ml} = 0,92 \frac{mg}{ml} \quad (5)$$

#### Verdünnung 2<sup>1</sup>

$$c_{Verd2} = c_{Hem} \cdot \frac{V_{Hem}}{V_{ges}} = 9,2 \frac{mg}{ml} \cdot \frac{0,2ml}{1ml} = 1,84 \frac{mg}{ml} \quad (6)$$

Mit den jeweils sechs Reagenzgläsern wird wie oben schon mehrmals erklärt verfahren.

Tabelle 4: Mischungen ohne Hemmsubstanz.

Nr.	Puffer/ml	Wasser/ml	Substrat/ml	Enzym/ml
1	0,8	0,1	0,05	0,05
2	0,75	0,1	0,1	0,05
3	0,65	0,1	0,2	0,05
4	0,55	0,1	0,3	0,05
5	0,45	0,1	0,4	0,05
6	0,35	0,1	0,5	0,05

Blindprobe: 0,4 ml Puffer, 0,1 ml Wasser und 0,5 ml Substrat.

<sup>1</sup>Verdünnung 1: 0,1 ml PO<sub>4</sub>-3 Stammlösung mit 0,9 ml Puffer verdünnt.

<sup>1</sup>Verdünnung 2: 0,2 ml PO<sub>4</sub>-3 Stammlösung mit 0,8 ml Puffer verdünnt.

Tabelle 5: Mischungen mit weniger Hemmsubstanz.

Nr.	Puffer/ml	Verd. 1 <sup>1</sup> /ml	Substrat/ml	Enzym/ml
1	0,8	0,1	0,05	0,05
2	0,75	0,1	0,1	0,05
3	0,65	0,1	0,2	0,05
4	0,55	0,1	0,3	0,05
5	0,45	0,1	0,4	0,05
6	0,35	0,1	0,5	0,05

Blindprobe: 0,4 ml Puffer, 0,1 ml Verdünnung 1<sup>1</sup> und 0,5 ml Substrat.

Tabelle 6: Mischungen mit mehr Hemmsubstanz.

Nr.	Puffer/ml	Verd. 2 <sup>2</sup> /ml	Substrat/ml	Enzym/ml
1	0,8	0,1	0,05	0,05
2	0,75	0,1	0,1	0,05
3	0,65	0,1	0,2	0,05
4	0,55	0,1	0,3	0,05
5	0,45	0,1	0,4	0,05
6	0,35	0,1	0,5	0,05

Blindprobe: 0,4 ml Puffer, 0,1 ml Verdünnung 2<sup>2</sup> und 0,5 ml Substrat.

## 4 Messwerte und Auswertung

### 4.1 Eichgerade

Die für die verschiedenen Verdünnungen der p-Nitrophenollösung gemessenen Extinktionen sind in Tabelle 7 aufgelistet. Die Konzentrationen der Lösungen wurden mit Formel (7) berechnet, wobei  $c$  die Konzentration von Nitrophenol in der Lösung,  $c_{Eich}$  die Konzentration der Stammlösung ( $11,4 \frac{mg}{l}$ ),  $V_{Eich}$  das Volumen der zugegebenen Stammlösung (cf. Tabelle 1) und  $V_{ges}$  das Gesamtvolumen der Lösung ist.

$$c = \frac{c_{Eich} \cdot V_{Eich}}{V_{ges}} \quad (7)$$

Tabelle 7: Extinktionen beim Aufnehmen der Eichgerade.

$c(\text{Nitrophenol})/\frac{mg}{l}$	Extinktion
1,9	0,17782
3,8	0,38335
5,7	0,56445
7,6	0,73139
9,5	0,93364

Die eingezeichnete Ausgleichsgerade ist eine Ursprungsgerade und hat die Steigung  $0,186 \frac{l}{mg}$ .

<sup>1</sup>Verdünnung 1: 0,1 ml PO<sub>4</sub>-3 Stammlösung mit 0,9 ml Puffer verdünnt.

<sup>2</sup>Verdünnung 2: 0,2 ml PO<sub>4</sub>-3 Stammlösung mit 0,8 ml Puffer verdünnt.

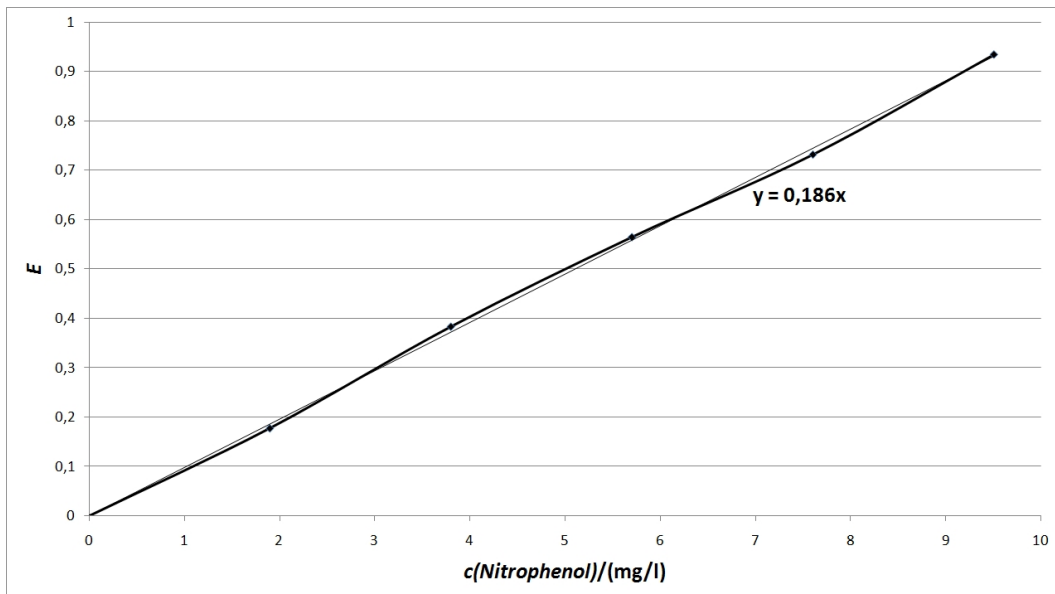


Abbildung 1: Eichgerade.

## 4.2 Bestimmung der Aktivität des Enzyms

### 4.2.1 Produktkonzentration

Tabelle 8: Extinktionen zum Bestimmen der Aktivität des Enzyms.

Lösung Nr.	Extinktion
1	0,03478
2	0,16185
3	0,44785
4	0,62418
5	1,2069

Mit der Funktionsgleichung der Ausgleichsgeraden

$$E(c) = 0,186c \quad \Leftrightarrow \quad c = \frac{E}{0,186} \quad (8)$$

lassen sich die Produktkonzentrationen der verdünnten Reaktionslösungen berechnen. (cf. Tabelle 9)

Tabelle 9: Produktkonzentrationen der verdünnten Lösungen.

Lösung Nr.	1	2	3	4	5
$\tilde{c}(\text{Nitrophenol})/\frac{mg}{l}$	0,187	0,870	2,408	3,356	6,489

Da es sich hier aber noch um mit jeweils 5 ml Stopplösung verdünnte Lösungen handelt, muss die eigentliche Konzentration noch mit Formel (9) berechnet werden.

$$c = \frac{\tilde{c} \cdot V_{ges}}{V_{Rkt}} \quad (9)$$

$c$  ist hier die Produktkonzentration der unverdünnten Reaktionslösung,  $\tilde{c}$  die Produktkonzentration der verdünnten Reaktionslösung,  $V_{ges}$  das Gesamtvolumen der Lösung (1 ml Reaktionslösung + 5 ml Stopplösung = 6 ml) und  $V_{Rkt}$  das Volumen der Reaktionslösung (1 ml).

Tabelle 10: Produktkonzentrationen der unverdünnten Lösungen.

Lösung Nr.	1	2	3	4	5
$c(\text{Nitrophenol})/\frac{mg}{l}$	1,122	5,221	14,447	20,135	38,932

### 4.2.2 Gebildete Stoffmenge

Die Menge von gebildetem Produkt wird mit Formel (10) berechnet.

$$n = \frac{c \cdot V}{M} \quad (10)$$

Hier ist  $n$  die Stoffmenge,  $c$  die Produktkonzentration der unverdünnten Reaktionslösung,  $V$  das Volumen der unverdünnten Reaktionslösung und  $M$  die molare Masse von Nitrophenol ( $139 \frac{g}{mol}$ ).

Tabelle 11: Gebildete Stoffmengen der unverdünnten Lösungen.

Lösung Nr.	1	2	3	4	5
n(Nitrophenol)/ $\mu$ mol	0,008	0,038	0,104	0,145	0,28

### 4.2.3 Zugegebene Enzymmenge

Die zugegebene Enzymmenge lässt sich aus der Konzentration der Enzymlösung von  $0,15 \frac{g}{l}$  mit Formel (11) berechnen.

$$m_{Enz} = c \cdot V \quad (11)$$

Wobei  $m_{Enz}$  die zugegebene Enzymmenge,  $c$  die Konzentration der Enzymlösung ( $0,15 \frac{g}{l}$ ) und  $V$  die zugegebene Menge an Enzymlösung ist.

Tabelle 12: Zugegebene Enzymmengen.

Lösung Nr.	1	2	3	4	5
Enzymmenge/ $\mu$ g	3	4,5	9	15	22,5

### 4.2.4 Aktivität

Die Aktivität wird nach Formel (12) berechnet.

$$A = \frac{n_{Nitroph}}{t \cdot m_{Enz}} \quad (12)$$

$A$  ist die Aktivität,  $n_{Nitroph}$  die Stoffmenge von Nitrophenol und  $m_{Enz}$  die Enzymmenge.

Tabelle 13: Aktivitäten des Enzyms.

Lösung Nr.	Aktivität/ $\frac{\mu mol}{min \cdot mg}$
1	0,09
2	0,278
3	0,385
4	0,322
5	0,415
Mittelwert	0,289

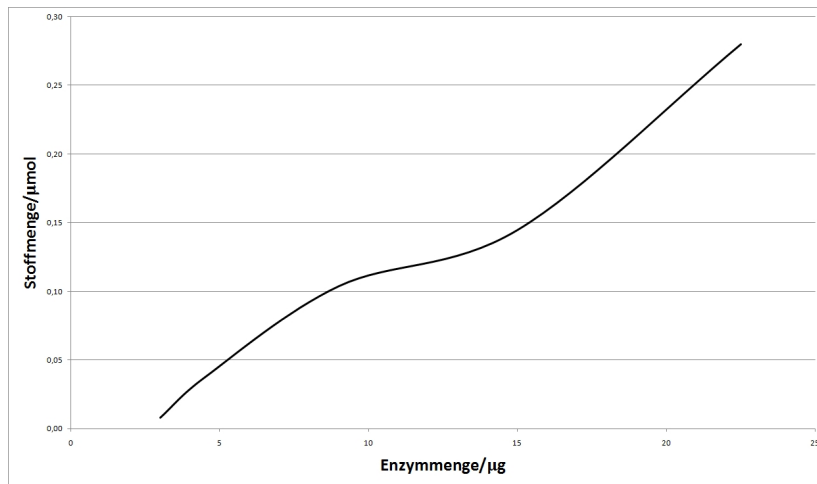


Abbildung 2: Stoffmenge des Produktes als Funktion der Enzymmenge.

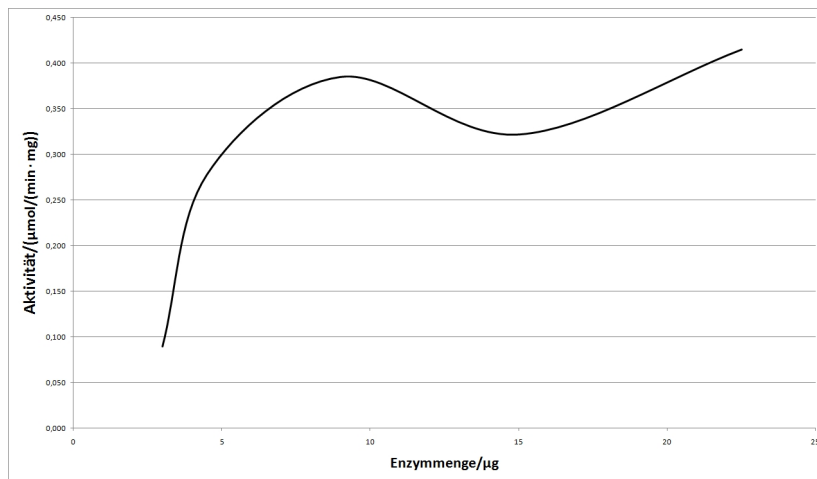


Abbildung 3: Aktivität als Funktion der Enzymmenge.

In Abbildung 2 ist deutlich zu erkennen, dass die Produktmenge mit zunehmender Enzymmenge zunimmt. Dies kommt daher, dass mehr Enzyme auch mehr Substrat pro Zeiteinheit umsetzen können. Die Kurve in Abbildung 3 müsste eigentlich linear steigen, da die Aktivität linear mit der Stoffmenge zusammenhängt.

## 4.3 Substratkonzentrationsabhängigkeit

### 4.3.1 Produktkonzentration

Tabelle 14: Extinktionen bei der Bestimmung der Substratkonzentrationsabhängigkeit.

Lösung Nr.	Extinktion
1	0,0674
2	0,30431
3	0,48923
4	0,65319
5	0,63197
6	0,63587

Wie oben lassen sich mit der Funktionsgleichung der Ausgleichsgeraden

$$E(c) = 0,186c \Leftrightarrow c = \frac{E}{0,186}$$

die Produktkonzentrationen der verdünnten Reaktionslösungen berechnen. (cf. Tabelle 15)

Tabelle 15: Produktkonzentrationen der verdünnten Lösungen.

Lösung Nr.	1	2	3	4	5	6
$\tilde{c}(\text{Nitrophenol})/\frac{mg}{l}$	0,362	1,636	2,63	3,512	3,398	3,419

Da es sich auch hier aber noch um mit jeweils 5 ml Stopplösung verdünnte Lösungen handelt, muss die eigentliche Konzentration noch mit Formel (9) berechnet werden.

Tabelle 16: Produktkonzentrationen der unverdünnten Lösungen.

Lösung Nr.	1	2	3	4	5	6
$c(\text{Nitrophenol})/\frac{mg}{l}$	2,174	9,816	15,782	21,071	20,386	20,512

### 4.3.2 Gebildete Stoffmenge

Die Menge von gebildetem Produkt wird wieder mit Formel (10) berechnet.

Tabelle 17: Gebildete Stoffmengen der unverdünnten Lösungen.

Lösung Nr.	1	2	3	4	5
$n(\text{Nitrophenol})/\mu\text{mol}$	0,016	0,071	0,114	0,152	0,147

### 4.3.3 Zugegebene Enzymmenge

Die zugegebene Enzymmenge lässt sich aus der Konzentration der Enzymlösung von  $0,15 \frac{g}{l}$  mit Formel (11) berechnen. Sie beträgt hier bei allen Proben  $15 \mu\text{g}$ , da jeweils  $100 \mu\text{l}$  Enzymlösung zugegeben wurden.



#### 4.3.4 Aktivität

Die Aktivität wird nach Formel (12) berechnet.

Tabelle 18: Aktivitäten des Enzyms.

Lösung Nr.	Aktivität/ $\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}\cdot\text{mg}}$
1	0,035
2	0,157
3	0,252
4	0,337
5	0,326
6	0,328
Mittelwert	0,239

#### 4.3.5 Substratkonzentration

Zur Berechnung der Substratkonzentration wurde Formel (16) verwendet.

$$c = \frac{c_{Sub} \cdot V_{Sub}}{V_{ges}} \quad (13)$$

$c$  ist die Substratkonzentration in 1 ml Reaktionslösung,  $c_{Sub}$  die Konzentration der Substratstammlösung ( $2 \frac{g}{l}$ ),  $V_{Sub}$  das Volumen der eingesetzten Substratstammlösung in 1 ml Reaktionslösung und  $V_{ges}$  das Gesamtvolumen der Reaktionslösung (1 ml).

Tabelle 19: Eingesetzte Substratkonzentrationen.

Lösung Nr.	Konzentration/ $\frac{mg}{l}$
1	40
2	120
3	240
4	400
5	700
6	1000

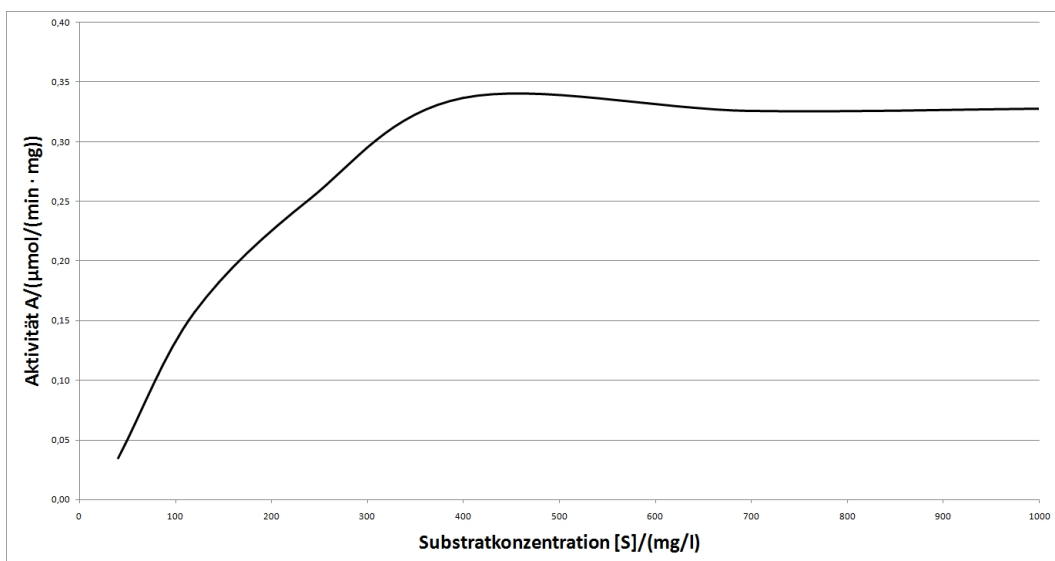


Abbildung 4: Aktivität als Funktion der Substratkonzentration.

### 4.3.6 Reaktionsgeschwindigkeit

Zur Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeit wird vom Ansatz  $v = \frac{\Delta[S]}{\Delta t}$  ausgegangen. Da  $\Delta[S]$  nicht direkt bestimmt werden kann, wird die Geschwindigkeit über die Produktkonzentration wie folgt berechnet.

$$v = \frac{\Delta[S]}{\Delta t} = \frac{[S_0] - [S]}{\Delta t} \quad (14)$$

mit  $[S] = [S_0] - [P]$

$$v = \frac{[P]}{\Delta t} \quad (15)$$

Tabelle 20: Reaktionsgeschwindigkeiten.

Lösung Nr.	Reaktionsgeschwindigkeit / $\frac{mg}{l \cdot min}$
1	0,072
2	0,327
3	0,526
4	0,702
5	0,68
6	0,684

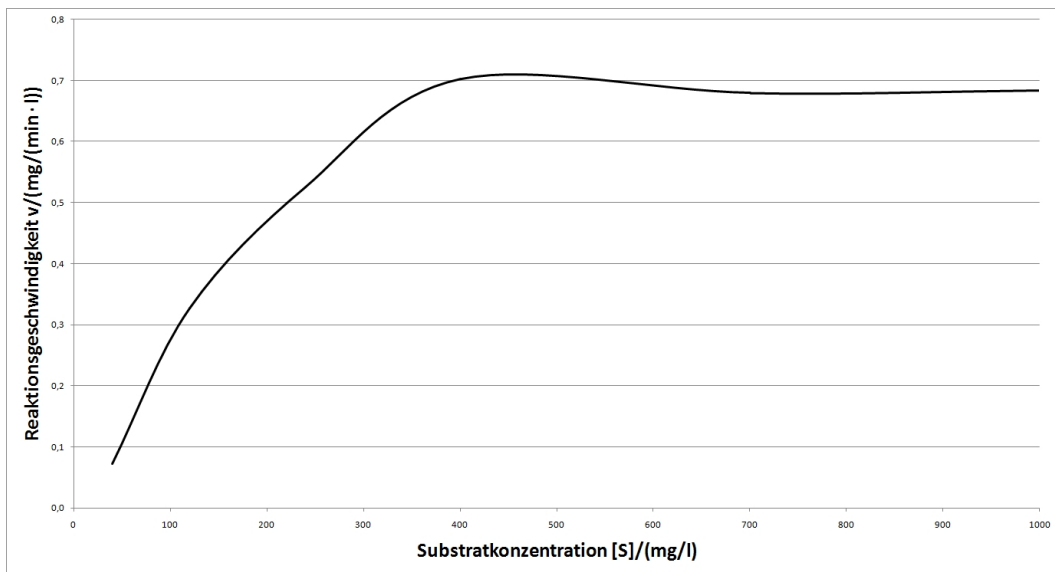


Abbildung 5: Reaktionsgeschwindigkeit-Substratkonzentrations-Diagramm.

Aktivität und Reaktionsgeschwindigkeit nehmen erwartungsgemäß mit steigender Substratkonzentration zu und nähern sich langsam einem Maximalwert an.

Bei hoher Substratkonzentration sind alle Enzyme schon nach kurzer Zeit aktiv, um schnellstmöglich das Produkt zu bilden. Dies erklärt außerdem die hohe Reaktionsgeschwindigkeit. Irgendwann sind alle Enzyme maximal aktiv und die Reaktionsgeschwindigkeit nähert sich ihrem Maximum an. Eine weitere Substratkonzentrationserhöhung hat keine Auswirkungen mehr auf die Aktivität und Reaktionsgeschwindigkeit.

$K_M$  und  $v_{max}$  werden wie in Abb. 7 bestimmt.

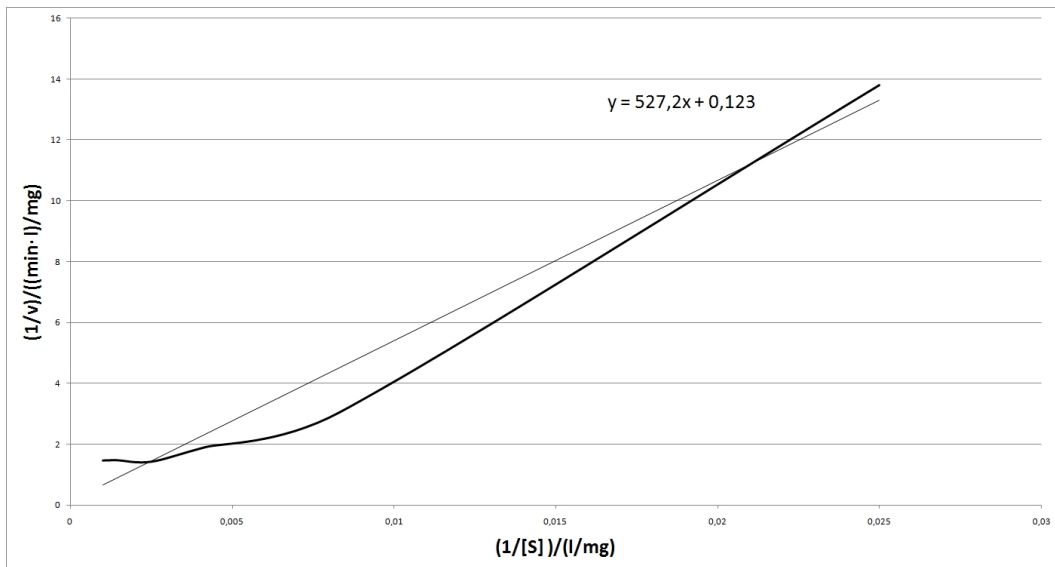


Abbildung 6: Lineweaver-Burk-Diagramm.

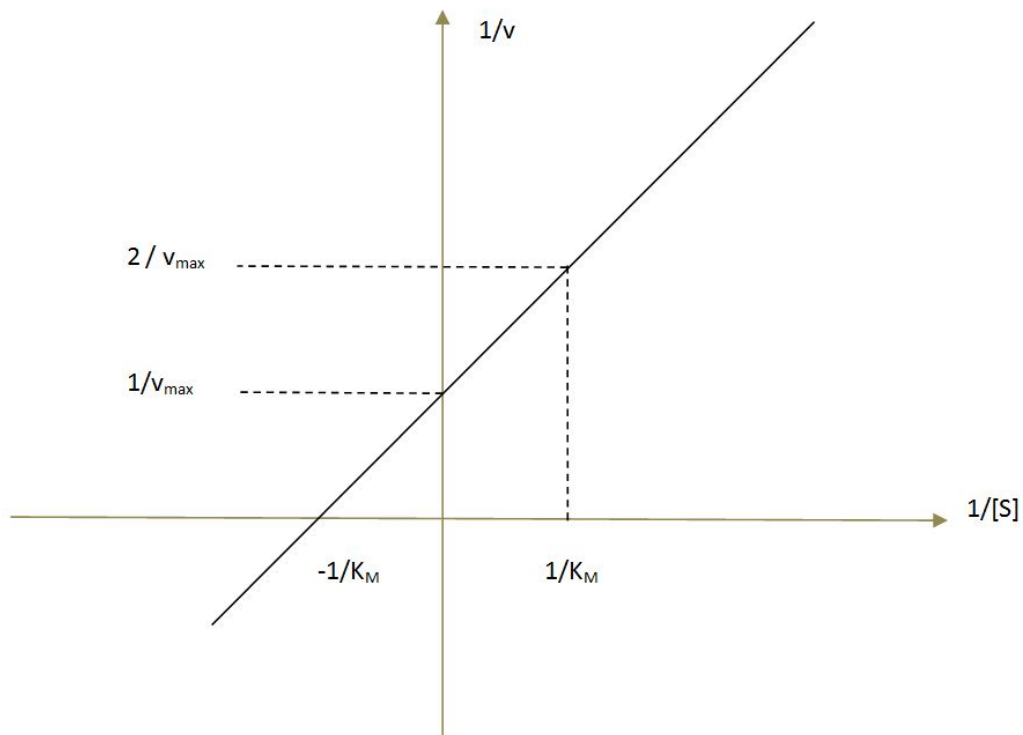


Abbildung 7: Bestimmung von  $K_M$  und  $v_{max}$ .

Aus der Funktionsgleichung der Ausgleichsgerade im Lineweaver-Burk-Diagramm (Abb. 6) kann ihre Nullstelle berechnet werden.

$$y = 527,2x + 0,123$$

$$0 = 527,2x + 0,123 \Leftrightarrow x = -0,0002334 = \frac{-1}{K_M} \Leftrightarrow \boxed{K_M = 4284,66 \frac{mg}{l}}$$

$$\frac{1}{v_{max}} = 0,123 \Leftrightarrow \boxed{v_{max} = 8,13 \frac{mg}{l \cdot min}}$$

## 4.4 Hemmung

### 4.4.1 Produktkonzentration

Im Folgenden wird die Lösung, der nur Wasser zu gesetzt wurde, als Lösung A, die der Verdünnung 1 zugesetzt wurde, als Lösung B und die der Verdünnung 2 zugesetzt wurde, als Lösung C bezeichnet.

Tabelle 21: Extinktionen der drei gemessenen Lösungen.

Lösung Nr.	Extinktion A	Extinktion B	Extinktion C
1	0,1116	(-0,01897)	0,18317
2	0,18038	0,08067	0,22293
3	0,1745	0,12927	0,28067
4	0,26855	0,15959	0,30663
5	0,39222	0,18132	0,33857
6	0,39719	0,21009	0,35211

Wie oben lassen sich mit der Funktionsgleichung der Ausgleichsgeraden

$$E(c) = 0,186c \Leftrightarrow c = \frac{E}{0,186}$$

die Produktkonzentrationen der verdünnten Reaktionslösungen berechnen. (cf. Tabelle 22)

Tabelle 22: Produktkonzentrationen der verdünnten Lösungen.

Lösung Nr.	1	2	3	4	5	6
$\tilde{c}_A(\text{Nitrophenol})/\frac{mg}{l}$	0,6	0,97	938	1,444	2,109	2,135
$\tilde{c}_B(\text{Nitrophenol})/\frac{mg}{l}$	(-0,1)	0,434	0,695	0,858	0,975	1,13
$\tilde{c}_C(\text{Nitrophenol})/\frac{mg}{l}$	0,98	1,199	1,509	1,649	1,82	1,893

Da es sich auch hier aber noch um mit jeweils 5 ml Stopplösung verdünnte Lösungen handelt, muss die eigentliche Konzentration noch mit Formel (9) berechnet werden.

Tabelle 23: Produktkonzentrationen der unverdünnten Lösungen.

Lösung Nr.	1	2	3	4	5	6
$c_A(\text{Nitrophenol})/\frac{mg}{l}$	3,6	5,819	5,629	8,663	12,652	12,813
$c_B(\text{Nitrophenol})/\frac{mg}{l}$	(-0,612)	2,602	4,17	5,148	5,849	6,777
$c_C(\text{Nitrophenol})/\frac{mg}{l}$	5,909	7,191	9,054	9,891	10,922	11,358

### 4.4.2 Substratkonzentration

Zur Berechnung der Substratkonzentration wurde Formel (16) verwendet.

$$c = \frac{c_{Sub} \cdot V_{Sub}}{V_{ges}} \quad (16)$$

$c$  ist die Substratkonzentration in 1 ml Reaktionslösung,  $c_{Sub}$  die Konzentration der Substratstammlösung ( $2 \frac{g}{l}$ ),  $V_{Sub}$  das Volumen der eingesetzten Substratstammlösung in 1 ml Reaktionslösung und  $V_{ges}$  das Gesamtvolumen der Reaktionslösung (1 ml).

Die Substratkonzentration ist bei allen drei Lösungen identisch, da diese sich nur in der Konzentration der Hemmlösung unterscheiden.

Tabelle 24: Eingesetzte Substratkonzentrationen.

Lösung Nr.	1	2	3	4	5	6
Konzentration/ $\frac{mg}{l}$	100	200	400	600	800	1000

#### 4.4.3 Reaktionsgeschwindigkeit

Die Reaktionsgeschwindigkeit wird wie oben mit Gleichung (15) berechnet.

Tabelle 25: Reaktionsgeschwindigkeiten  $v_i$ .

Lösung Nr.	$v_A / \frac{mg}{l \cdot min}$	$v_B / \frac{mg}{l \cdot min}$	$v_C / \frac{mg}{l \cdot min}$
1	0,12	(-0,02)	0,197
2	0,194	0,087	0,24
3	0,188	0,139	0,302
4	0,289	0,172	0,33
5	0,422	0,195	0,364
6	0,427	0,226	0,379

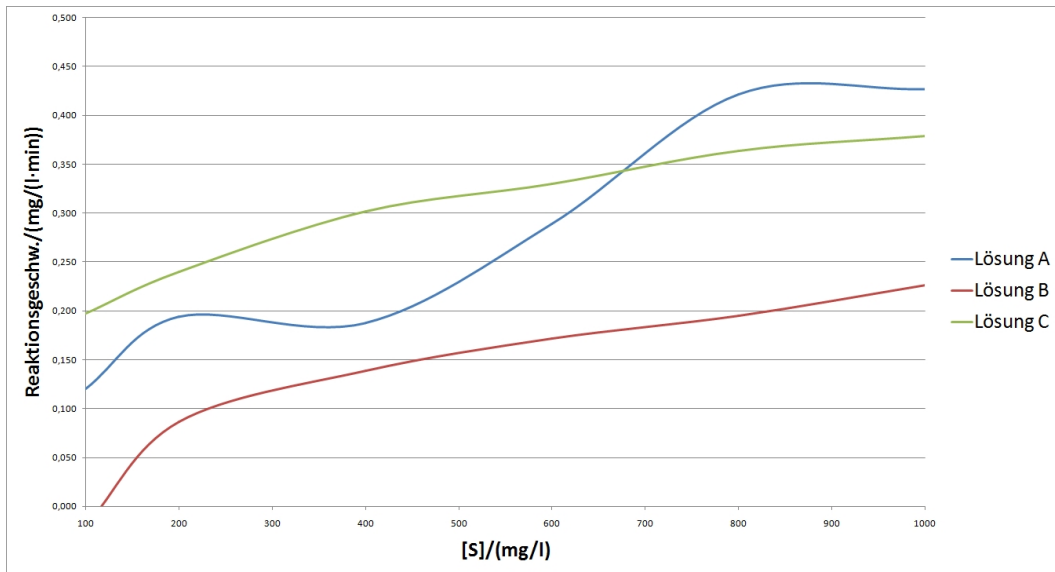


Abbildung 8: Reaktionsgeschwindigkeit-Substratkonzentrations-Diagramm.

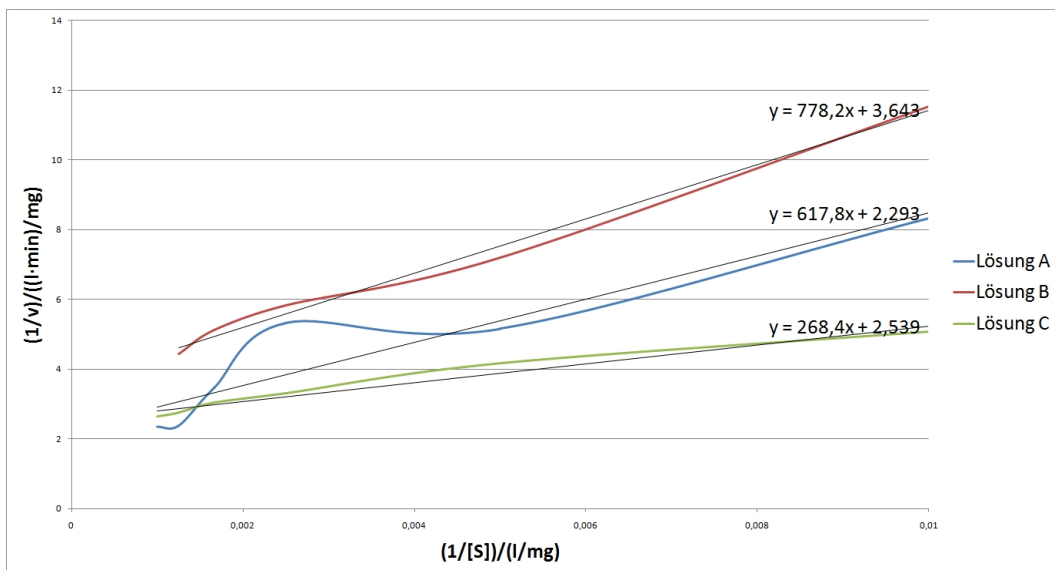


Abbildung 9: Lineweaver-Burk-Diagramm.

Aus den Funktionsgleichungen der Ausgleichsgeraden im Lineweaver-Burk-Diagramm (Abb. 9) können die  $K_M$ - und  $v_{max}$ -Werte wieder wie in Abb. 7 berechnet werden.

**Lösung A:** Geradengleichung:  $y = 617,8x + 2,293$

$$v_{max} = \frac{1}{c} = 0,436 \frac{mg}{l \cdot min}$$

$$K_M = m \cdot v_{max} = 269,429 \frac{mg}{l}$$

**Lösung B:** Geradengleichung:  $y = 776,2x + 3,643$

$$v_{max} = \frac{1}{c} = 0,274 \frac{mg}{l \cdot min}$$

$$K_M = m \cdot v_{max} = 213,066 \frac{mg}{l}$$

**Lösung C:** Geradengleichung:  $y = 268,4x + 2,539$

$$v_{max} = \frac{1}{c} = 0,394 \frac{mg}{l \cdot min}$$

$$K_M = m \cdot v_{max} = 105,711 \frac{mg}{l}$$

Bei kompetitiver Hemmung steigt  $K_M$  an,  $v_{max}$  bleibt jedoch konstant. Bei nichtkompetitiver Hemmung bleibt  $K_M$  konstant und  $v_{max}$  sinkt.

Im vorliegenden Fall ist keine der beiden Hemmungen eindeutig zu erkennen. Es spricht jedoch mehr für eine nichtkompetitive Hemmung, da  $K_M$  zumindest bei Lösung A und B fast konstant bleibt und  $v_{max}$  bei Lösung A und B sinkt.

$K_M$  nimmt von Lösung A zu Lösung C immer weiter ab, was eindeutig gegen die kompetitive Hemmung spricht. Bei  $v_{max}$  ist weder ein eindeutiges Fallen noch ein Konstantbleiben zu erkennen.

## 5 Fehlerbetrachtung

**Herstellung der Lösungen.** Da zum Herstellen der Stammlösungen bestimmte Substanzen abgewogen bzw. abgemessen werden müssen und dabei immer mehr oder weniger große Fehler auftreten, gehen schon von den Stammlösungen Fehler aus.

**Pipettierfehler.** Es wurde teilweise mit extrem winzigen Mengen, die mit einer Eppendorfpipette abgemessen wurden, gearbeitet. Bei solch kleinen Mengen machen sich kleine Fehler natürlich besonders bemerkbar.

**Zeitfehler.** Man konnte das Enzym und die Stopplösung nicht exakt gleichzeitig in alle Reagenzgläser füllen, weshalb die Reaktion in manchen Gläsern einige Sekunden länger ablaufen konnte als in anderen.

**Temperaturfehler.** Durch Konvektion im Wasserbad war die Temperatur nicht an allen Stellen und über den gesamten Messzeitraum konstant. Eine höhere Temperatur hat eine erhöhte Reaktionsgeschwindigkeit zur Folge.

## Literatur

- [1] D. LEICHT ET AL., *Praktikumsskript Physikalische Chemie „Enzymkinetik EK“*, Universität Stuttgart, Sommersemester 2009