

Kinetik einer enzymkatalysierten Reaktion

Versuchsziel

Gegenstand dieses Versuchs ist die kinetische Analyse einer enzymkatalytischen Alkohol-Oxidation unter Verwendung der Alkoholdehydrogenase. Mit Hilfe von grundlegenden Gesetzen der Reaktionskinetik, wie z.B. der Arrhenius-Gleichung und der Michaelis-Menten-Gleichung, werden die ablaufenden Prozesse unter verschiedenen Gesichtspunkten betrachtet.

Theoretische Grundlagen

Der nachfolgende Versuch setzt einige Definitionen aus den Bereichen der Kinetik, der Enzymkatalyse sowie der Spektroskopie voraus.

Reaktionsgeschwindigkeit v

Die Reaktionsgeschwindigkeit wird am anschaulichsten über eine Änderung der Stoffmenge von Edukten und Produkten in einem Zeitablauf definiert, also

$$v = -\frac{dn_A}{dt} = \frac{dn_B}{dt} \quad . \text{ In diesem Fall ist A Edukt und B Produkt.}$$

Für einen allgemeineren Ansatz wird die Reaktionszahl ξ verwendet, die auch stöchiometrische Koeffizienten berücksichtigt. Es gelten

$$d\xi = \frac{dn_i}{\nu_i} \quad \text{und} \quad v = \frac{d\xi}{dt} = \frac{dn_i}{(\nu_i * dt)} \quad .$$

Wenn Reaktionen mit einem konstanten Volumen V ablaufen, kann eine Reaktionsvariable x eingeführt werden, die eine Definition der Reaktionsgeschwindigkeit über eine Stoffmengenkonzentrationsänderung erlaubt. Aus

$$dx = d\xi = \frac{dc_i}{\nu_i} \quad \text{folgt}$$

$$v = \frac{dx}{dt} = \frac{dc_i}{(\nu_i * dt)} \quad .$$

Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k

Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k stellt den Proportionalitätsfaktor für die Beziehung zwischen Reaktionsgeschwindigkeit v und den Konzentrationen c_i der Edukte. Es gilt:

$$v = \frac{dx}{dt} = k * c_A^a * c_B^b * \dots \quad . \text{ Die Exponenten } a, b, \dots \text{ dieser Gleichung geben}$$

neben der Reaktionsordnung der einzelnen Komponenten auch die Summe der Exponenten bezogen auf die Gesamtreaktion an.

Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit

Die Arrhenius-Gleichung bringt die Reaktionstemperatur T , die Aktivierungsenergie E_A sowie k in Beziehung:

$$v_0 = \frac{(v_{0,max} * c_s)}{(K_M + c_s)} = \frac{v_{0,max}}{(\frac{K_M}{c_s} + 1)}$$

(k_0 : reaktionsspezifisch ; R : allgemeine Gaskonstante ; E_A : Aktivierungsenergie)

Die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt also mit steigender Reaktionstemperatur zu.

Michaelis-Menten-Gleichung

Die Michaelis-Menten-Gleichung
$$v_0 = \frac{(v_{0,max} * c_s)}{(K_M + c_s)} = \frac{v_{0,max}}{(\frac{K_M}{c_s} + 1)}$$

beschreibt das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeit und der Substratkonzentration zu der Michaelis-Konstante, die definiert ist als

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

Um die Michaelis-Menten-Gleichung zu linearisieren, d.h. um die reaktionsspezifischen Größen K_M und $v_{0,max}$ zu bestimmen, gibt es verschiedene Ansätze. Einer davon ist die Methode nach Lineweaver-Burk.

Hierbei wird nach Bildung des Kehrwerts $\frac{1}{v_0}$ die Gleichung als Gerade $y = mx + b$ geschrieben, wobei $v_{0,max} = \frac{1}{b}$ für $\frac{1}{c_s} = 1$ und $K_M = \frac{m}{b}$.

Spektroskopie

Mit Hilfe der Spektroskopie ist es möglich, die Stoffkonzentration einer Probe und deren Änderung während einer Reaktion anhand der gemessenen Extinktion zu bestimmen. Dies geschieht über das Lambert-Beer'sche Gesetz, nach dem die Extinktion einer Substanz stets $E_\lambda = \varepsilon_{\lambda,i} * c_i * d$ ist. Hierbei ist ε der mediumspezifische Extinktionskoeffizient, c die Konzentration und d die Schichtdicke der Probe.

Extinktionen verhalten sich beim Mischen von Substanzen additiv, d.h. das Gesetz hat dann folgenden Form:

$$E_\lambda = \sum \varepsilon_i * c_i * d$$

Vorfragen

1.

<i>Ethanol- volumen V[μl]</i>	<i>Stoffmenge Ethanol n[μmol]</i>	<i>ges. Proben- volumen cs[mmol /l]</i>	<i>Ethanol- konzentration</i>	<i>1/Ethanol- konzentration</i>
1	17,1326	3,001	5,708	0,1752
2	34,2652	3,002	11,42	0,08756
5	85,6631	3,005	28,51	0,03508
10	171,3262	3,010	56,91	0,01757
20	342,6525	3,020	113,5	0,008811
50	856,6312	3,050	280,9	0,003560
100	1713,2624	3,100	552,6	0,001810

$$\rho_{\text{Ethanol}} = 0,7893 \text{ g/cm}^3 \text{ (bei } 20^\circ\text{C)}$$

$$M_{\text{Ethanol}} = 2 * 12,011 \text{ g/mol} + 6 * 1,0079 \text{ g/mol} + 15,999 \text{ g/mol} = 46,07 \text{ g/mol}$$

$$n = \frac{m}{M}$$

$$m = \rho * V$$

Mit obigen Werten ergibt sich beispielsweise für die Stoffmenge von 1 μl Ethanol $n = (0,7893 \text{ g/cm}^3 * 1 \mu\text{l}) / (46,07 \text{ g/mol}) = 17,1326 \mu\text{mol}$.

2. Einheiten für Gleichung 4:

Die Änderung der Stoffmenge besitzt die Einheit [mol]. Die Stöchiometriezahl hat keine Einheit. Mit der Zeiteinheit [s] hat die Reaktionsgeschwindigkeit v somit die Einheit [mol/s].

Einheiten für Gleichung 6:

Die Änderung in der Konzentration hat die Einheit [mol/l]. Die Stöchiometriezahl ist auch hier einheitenlos. Analog zu oben ergibt sich mit der Zeiteinheit [s] die Reaktionsgeschwindigkeit v mit [mol/l*s].

3. Die kinetische Kontrolle einer Reaktion kommt bei niedrigen Temperaturen zum Tragen. Hierbei wird das kinetisch bevorzugte Produkt gebildet, das über den Reaktionsweg mit der geringeren Aktivierungsenergie entsteht.
Bei thermodynamischer Kontrolle hingegen wird das stabilere Produkt gebildet. Es handelt sich dabei um eine stärker exergonische Reaktion.

4. Bei einer Reaktion 1.Ordnung besitzt die Geschwindigkeitskonstante k die Dimension $\frac{1}{s}$. Im Grenzfall der unendlich hohen Temperatur ($T \rightarrow \infty K$) konvergiert k gegen k_0 . Es gilt ferner $\lim_{T \rightarrow 0} k = 0$.
5. Die Molekularität ist ein Maß für die an einer Elementarreaktion beteiligten Teilchen. Im Gegensatz hierzu versteht man unter der Ordnung einer Reaktion die Summe der Exponenten der Konzentrationen der an der Reaktion beteiligten Edukte.
6. Die Konzentration des Eduktes C nimmt im Verlauf der Reaktion ab, während die Konzentrationen von A und B solange zunehmen, bis die Substratsättigung erreicht wird.
7. Für die Intensität eines Lichtstrahls bei Austritt aus einem durch die Konzentration c und Schichtdicke d bestimmten Medium, gilt mit der Eintrittsintensität I_0 und dem Proportionalitätsfaktor ϵ :

$$I_d = I_0 * 10^{(-\epsilon * c * d)}$$

$$\frac{I_d}{I_0} = 10^{-\epsilon * c * d} \rightarrow \log\left(\frac{I_d}{I_0}\right) = -\epsilon * c * d \rightarrow \log\left(\frac{I_0}{I_d}\right) = \epsilon * c * d = E$$

Dies ist das Lambert-Beer'sche Gesetz.

□

8. Voraussetzungen des Lambert-Beer'schen Gesetzes:
 - paralleler Einfall monochromatischen Lichts
 - Vermeidung von Streuung und Reflexion
 - benötigt verdünnte Lösungen

Abweichungen des Lambert-Beer'schen Gesetzes:

- Fluoreszenz oder Phosphoreszenz in der Probe
- Siebeffekt durch inhomogene Verteilung des absorbierenden Stoffes
- zu niedrige Stoffkonzentration

9. Gemeinsamkeiten:
 - Reduzierung der Aktivierungsenergie
 - Katalysator befindet sich in der gleichen Phase wie die Reaktanten

Unterschiede:

- Möglichkeit der Substratsättigung bei heterogener und enzymatischer Katalyse
- Bei der heterogenen Katalyse erfolgt die Reaktion nur an der Phasengrenze
- Ausbildung des Enzym-Substrat-Komplexes nur bei der Enzymkatalyse

10. Die Michaelis-Konstante $K_M = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1}$ hat die Dimension
 $\frac{l}{mol}$.

11. Die maximale Anfangsgeschwindigkeit ist abhängig von der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k_2 der Dissoziation (d.h. also der Geschwindigkeitskonstante des Zerfalls) des Enzym-Substrat-Komplexes und der Ausgangskonzentration des Enzyms.

12. Gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetz gehen in die Extinktion einer Probe die Konzentration der einzelnen Komponenten c_i , die Schichtdicke der Probe d und der mediumspezifische Koeffizient ϵ ein, so dass sich insgesamt folgende Formel ergibt:
$$E = \sum \epsilon_i * c_i * d$$