

**Experimentalvortrag für Lehramtskandidaten**  
**Karen Hornbacher**  
**WS 1998/99**

# **Enzyme**

## **- die biologischen Katalysatoren**

## GLIEDERUNG:

1. Einleitung
  - a) Definition
  - b) Charaktere
  - c) Proteinstruktur
  - d) Röntgenstrukturanalyse
2. Proteinbiosynthese (V1)
  - a) Transkription
  - b) Translation
3. Wirkungsmechanismen - Modellvorstellungen
  - a) Enzym-Substrat Theorie
  - b) Spezifität des Enzym-Substrat-Komplex
4. Katalysatorwirkung von Enzymen (V2)
5. Enzymkinetik (Michaelis und Menten) (V3)
6. Enzyminhibitoren (V4)
7. Abhängigkeiten enzymatischer Umsetzungen
  - a) Temperaturoptimum (V5)
  - b) pH-Optimum (V6)
8. Quantitative Analyse mit Enzymen (V7)

## VERSUCHE:

- V1: DNA-Präparation
- V2: Peroxidase-Luminoltest
- V3: Stärkespaltung durch Amylase
- V4: Kompetitiver Inhibitor der Carboanhydrase
- V5: Temperaturoptimum von Trypsin
- V6: pH-Optimum von Katalase
- V6: Blutalkoholtest

# 1. Einleitung

a) **Def.:** Gruppe von hochmolekularen Proteinen die als biologische Katalysatoren das Muster chemischer Umsetzungen bestimmen, indem sie durch Herabsetzen der Aktivierungsenergie die Reaktionsgeschwindigkeit erhöhen.

## **b) Charaktere der Enzyme**

→ Beschleunigung der Reaktionszeit:

Die Katalysatorwirkung, die durch die Erniedrigung der Aktivierungsenergie zustande kommt, beschleunigt bei einigen Reaktionen den Reaktionsablauf sogar um's Millionenfache. Viele Reaktionen können nun leicht geschehen, die sonst in nicht meßbarer Zeit ablaufen würden.

→ Spezifität:

Substratspezifität: Ein Enzym setzt nur ein bestimmtes Substrat um.

Gruppenspezifität: Ein Enzym ist für eine bestimmte funktionelle Gruppe spezifisch, so daß es verschiedene Substratmoleküle, die diese Gruppe besitzen angreifen kann.

Wirkungsspezifität: Ein Enzym katalisiert nur eine mögliche Reaktion, wie ein Substratmolekül umgesetzt werden kann.

→ Die Aktivität regulierbar:

Dies geschieht sowohl durch Inhibitoren und Aktivoren als auch durch Reaktionsbedingungen wie Temperatur und pH.

Diese Eigenschaften machen sie geradezu prädisziniert für die Regulation aller biologischen Funktionssysteme.

⇒ großes Interesse und vielfältiger Einsatzbereich

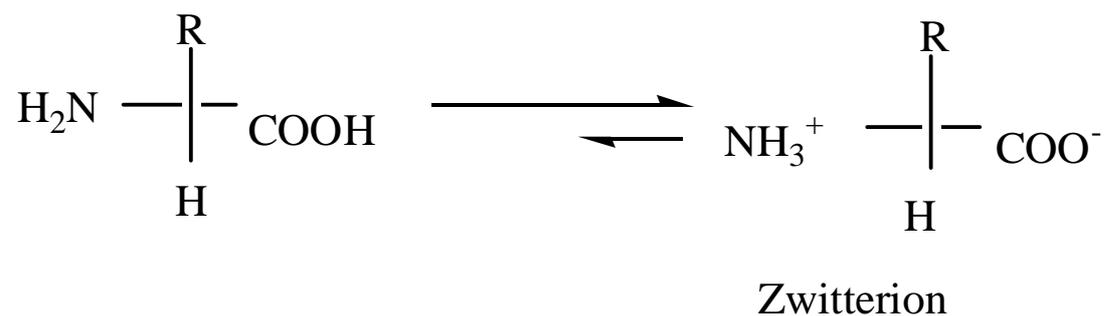
- grundsätzliches Verständnis biologischer Zusammenhänge
- Verwendung in Medizin
- Produktion von Nahrungsmitteln
- Technologische Prozesse
- Analysemethoden
- Waschmittel

## c) Protein-Struktur

### Primärstruktur

→Lineare Sequenz von Aminosäuren, die durch Peptidbindungen verknüpft sind.

Zwitterion Aminosäure:



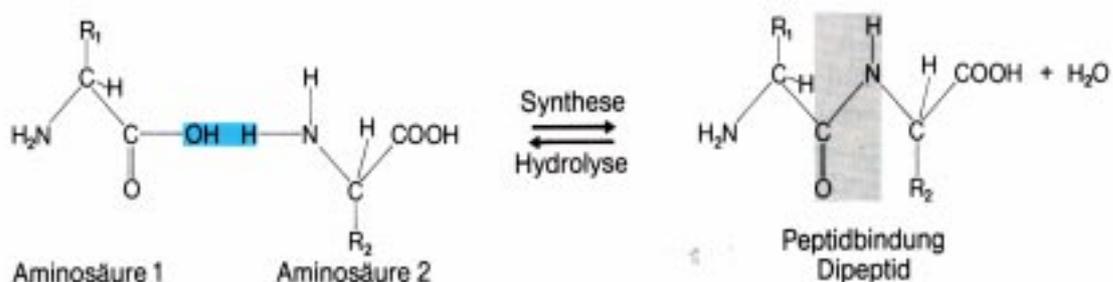
Aminosäuren besitzen zwei funktionelle Gruppen, und zwar eine Aminogruppe und eine Carboxylgruppe, die maßgeblich die chemischen Eigenschaften einer Aminosäure bestimmen.

Die Aminogruppe kann durch Aufnahme eines Protons als Base fungieren, während die Carboxylgruppe als Säurefunktion Protonen abgibt.

In wässriger Lösung tritt deshalb ein Protonenübergang innerhalb des Moleküls auf, sodaß Zwitterionen entstehen.

Es hängt von der Säure und Basestärke der Aminosäure ab, bei welchem pH Wert die Aminosäure vollständig als Zwitterion vorliegt. Diesen pH -Wert nennt man isoelektischen Punkt.

Bildung einer Peptidbindung:



Bei der Synthese einer Peptidbindung reagiert die Carboxylgruppe der einen Aminosäure mit der Aminogruppe einer anderen unter Wasserabspaltung und bildet eine Dipeptid. Setzt sich dieser Vorgang so fort, bildet sich ein Polypeptid.

Die Peptidbindung ist infolge einer Elektronendelokalisierung eben gebaut. C und N liegen in einer Ebene während an den C-Atomen, an denen die Reste sitzen freie Drehbarkeit zur Verfügung steht.

Da Proteine jeweils eine freie Aminogruppe und Carboxylgruppe besitzen ( N- und C- Terminus), haben sie eine klar definierte Polarität.

Sequenz und Anzahl der Aminosäuren ist durch die Basensequenz der DNA determiniert.

Die Primärstruktur bedingt Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur

## **Sekundärstruktur**

Die Sekundärstruktur bezeichnet man durch Wasserstoffbrückenbindungen bedingte spezielle Strukturen.

Sie müssen nicht unbedingt vorhanden sein, doch findet man sie oft, besonders wegen ihrer zusätzlichen Stabilisierung in Proteinen.

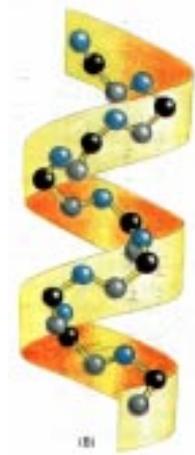
→ $\alpha$ - Helix :

Das Peptid bildet eine Helix durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen benachbarten und in der Umgebung befindlichen Aminosäuren.

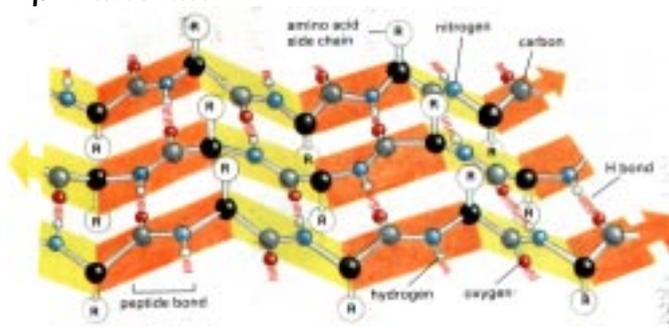
→  $\beta$ -Faltblatt:

Zwischen Aminosäuren unterschiedlicher Polypeptide bilden sich intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen, sodaß ein Faltblatt zustande kommt.

$\alpha$ -Helix



$\beta$ -Faltblatt



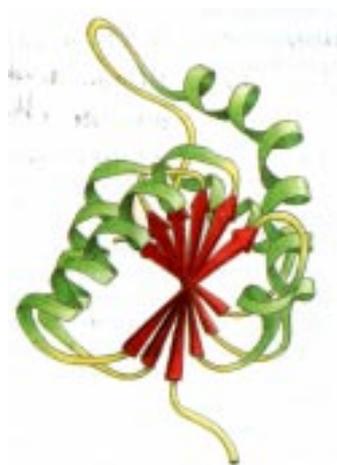
## Tertiärstruktur

→ Spezifische Raumgestalt durch chemische Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Aminosäuren

Diese setzen sich zusammen aus:

- Kovalente Bindungen (Disulfidbindung)
- Ionenbindung
- Schwache Wechselwirkung ( Wasserstoffbrückenbindung, van der Waals Wechselwirkung)

Diese spezifische Raumgestalt eines Proteins ist immer vorhanden (wenn auch nicht leicht vorhersagbar), und bestimmt die Funktion, chemisches Verhalten und Aktivität der Enzyme.

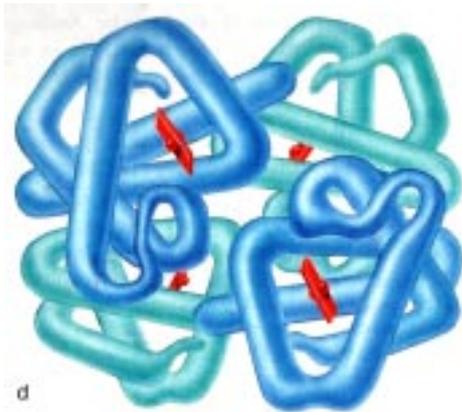


NAD-binding domain of lactate dehydrogenase

## Quartärstruktur

→ Struktur, die durch Wechselwirkungen zwischen mehreren Polypeptidketten eines Proteinmoleküls zustande kommt

Dies trifft zu bei komplexeren Proteinen, die meistens auch über kompliziertere Regulationsmechanismen verfügen, wie z.B. Hämoglobin:

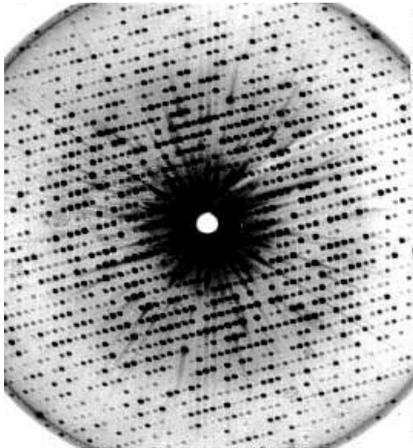


Hämoglobin (Quartärstruktur)

Hämoglobin ist aus 4 Polypeptidketten aufgebaut, von denen je zwei identisch sind ( $2\alpha, 2\beta$ ). Außerdem ist an jede Polypeptidkette ein Porphyrinring (Häm) gebunden.

## d) Röntgenstrukturanalyse:

⇒ Viele Strukturen von Proteinen durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt



Röntgenbeugungsmuster einer Strukturanalyse

Durch Auswertung des Beugungsmusters kann die Verteilung der Elektronendichte des Moleküls erhalten werden, welches mit dem molekularen Modell des Moleküls in Einklang gebracht werden muß, um die endgültige Struktur eines Moleküls zu erhalten.

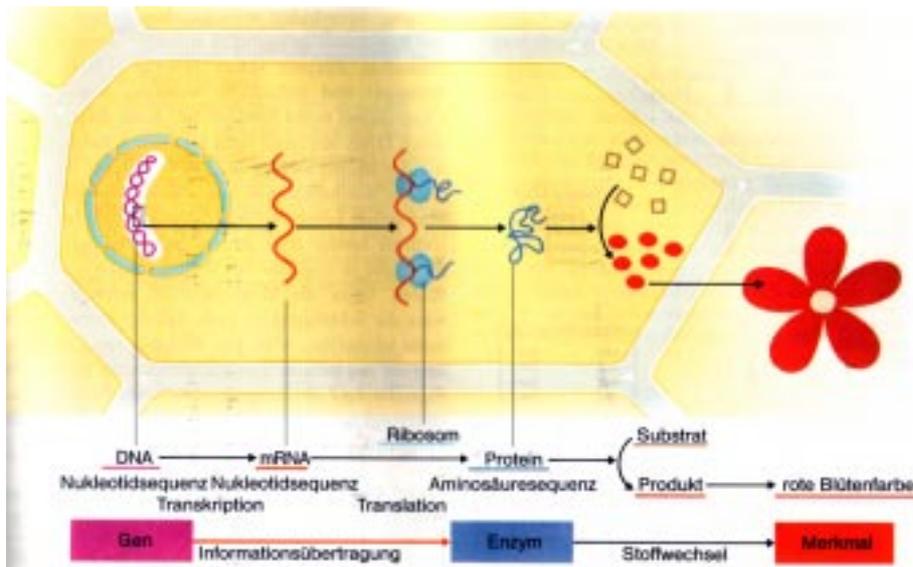
### Enzyme zeichnen sich aus

- durch ein Aktives Zentrum (Substratbindestelle), an dem die katalytische Umsetzung erfolgt
- manchmal durch die Assoziation mit Coenzymen:  
Apoenzym (Enzymprotein) + Coenzym = Holoenzym
- durch die Wechselzahl, die die Aktivität eines Enzyms ausdrückt. Diese gibt an, wieviele Substratmoleküle pro Minute von einem Enzymmolekül umgesetzt werden.

⇒ Struktur bedingt - Funktion

- Aktivität
- Spezifität
- chemisches Verhalten der Enzyme

## 2) Proteinbiosynthese



Die Aminosäuresequenz des Proteins ist determiniert durch die Nukleotidsequenz der DNA. Während der Proteinbiosynthese wird diese im Kern transkribiert in mRNA, die zu den Ribosomen wandert, an denen die mRNA zu dem Protein translatiert werden.

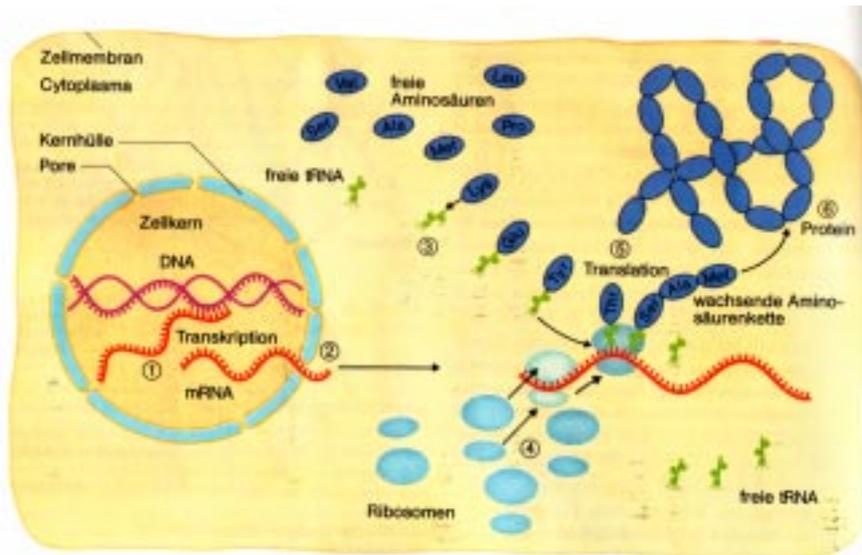
### → Transkription:

Genetische Information wird von DNA in RNA umgeschrieben. Die DNA-Polymerase findet den Start eines abzulesenden Gens und nach Bindung löst sich die Überstruktur der DNA auf, woraufhin ein Ablesen bis zum Terminationsende stattfindet. Die entstandene mRNA (Komplementär zur DNA) wird frei und verläßt den Kern.

### → Translation:

Basensequenz der DNA/mRNA wird in die Aminosäuresequenz des Proteins übersetzt.

Dies geschieht, indem die mRNA an Ribosomen (freie und zu dem rauhen Endoplasmatischen Retikulum gehörend) bindet und Aminosäuren, die an tRNA gebunden sind, zu den Ribosomen transportiert werden, wo die Knüpfungen der Peptidbindungen nach Muster der mRNA (Translation) erfolgt. Für diesen Vorgang ist sehr viel Energie erforderlich, die in Form von GTP (Guanosintriphosphat) geliefert wird.



Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Proteinbiosynthese

- katalytisch abläuft, dh für die Regulation sind wiederum eine Reihe von Enzymen verantwortlich.
- sehr energieverbrauchend ist
- und gefolgt ist durch posttranslationale Modifikationen, welche erst das Propeptid zum funktionellen Enzym umwandeln (darunter fallen Splitting von Peptidstücken, chemische Modifikation von einzelnen Aminosäuren durch Acetylierung oder Phosphorylierung und die Assoziation mit Coenzymen)

## Versuch 1: DNA-Präparation

### Durchführung:

- 5g Gurkenkeimlinge im Mörser mit Quarzsand und 10ml CTAB Extraktionspuffer (2% CTAB; 1.4M NaCl; 100mM Tris-HCl, 0,2%  $\beta$ -Mercaptoethanol; pH 8,0, vorgewärmt auf 60°C) aufschließen
- Pflanzenhomogenat 30 min bei 60°C inkubieren
- Gemisch mit 15ml Chloroform versetzen und 10min schütteln
- Zentrifugieren (10min bei 5000g)
- Überstand (wässrige Phase) abnehmen und mit 2 Volumenanteilen Ethanol überschichten

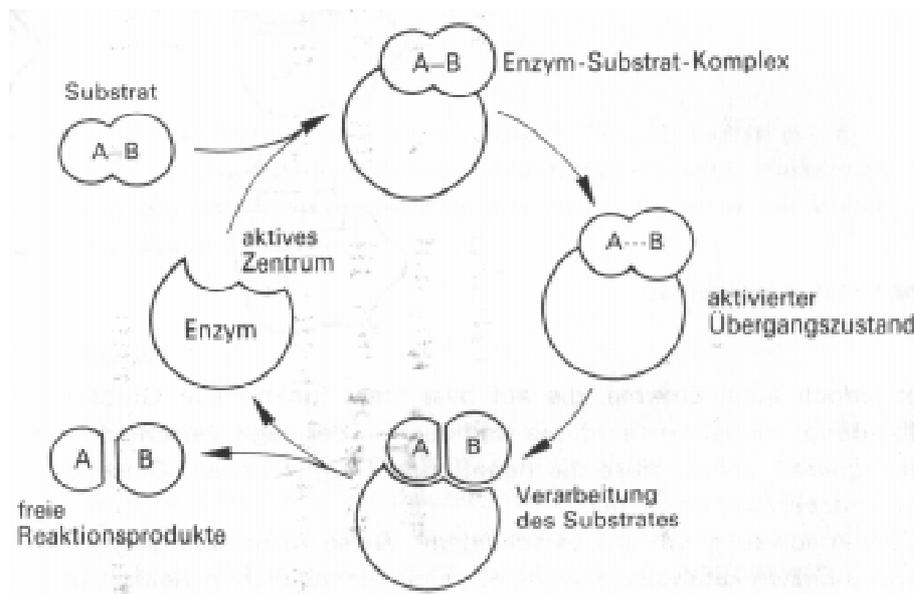
- An der Grenzschicht Ethanol/wässrige Phase fällt fädige DNA aus, die durch gleichmäßiges Rühren mit einer Pasteurpipette aufgewickelt werden kann

Alle molekularbiologischen Methoden (besonders auch Enzymologie) erfordern an der einen oder anderen Stelle die Isolation von DNA.

### 3) Wirkungsmechanismen -Modellvorstellungen

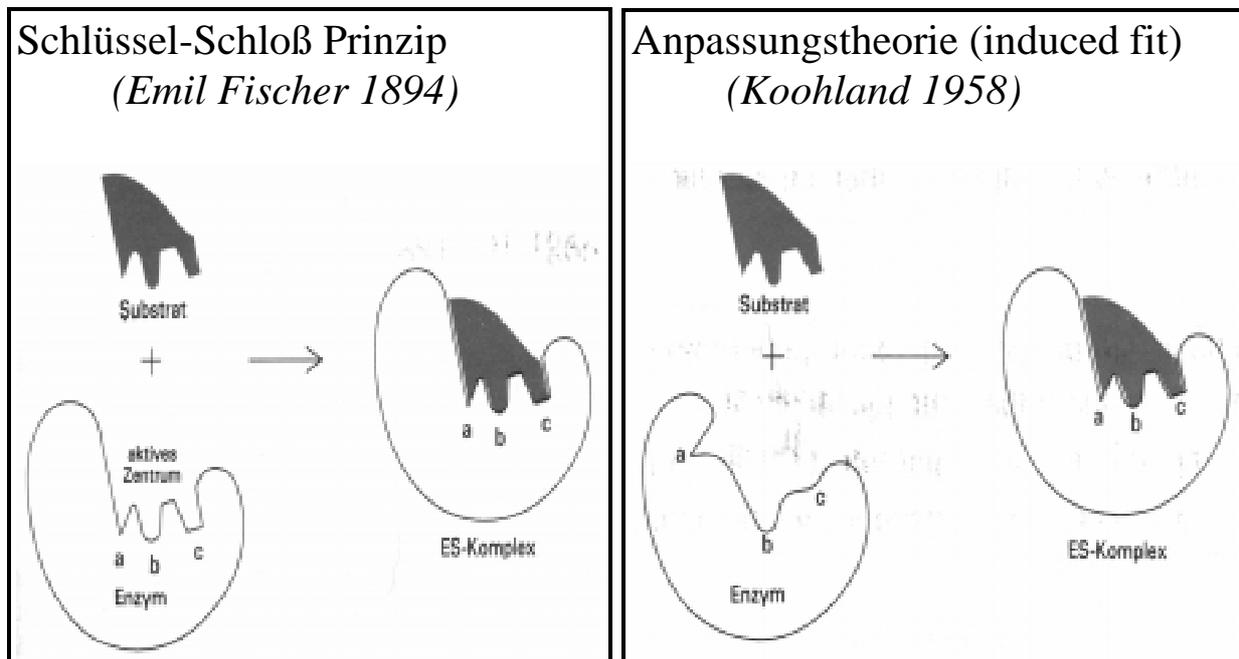
#### 1. Enzym-Substrat Theorie

(*Michaelis und Menten 1913*)



Ein freies Substrat bindet an ein aktives Zentrum eines Enzyms. Der gebildete Enzym-Substrat Komplex durchläuft einen aktivierten Übergangszustand, in dem die Verarbeitung des Substrat stattfindet. Die Produkte werden frei und das Enzym kann erneut ein Substrat binden.

## 2. Spezifität des Enzym-Substrat Komplex



### → **Schlüssel-Schloß Prinzip**

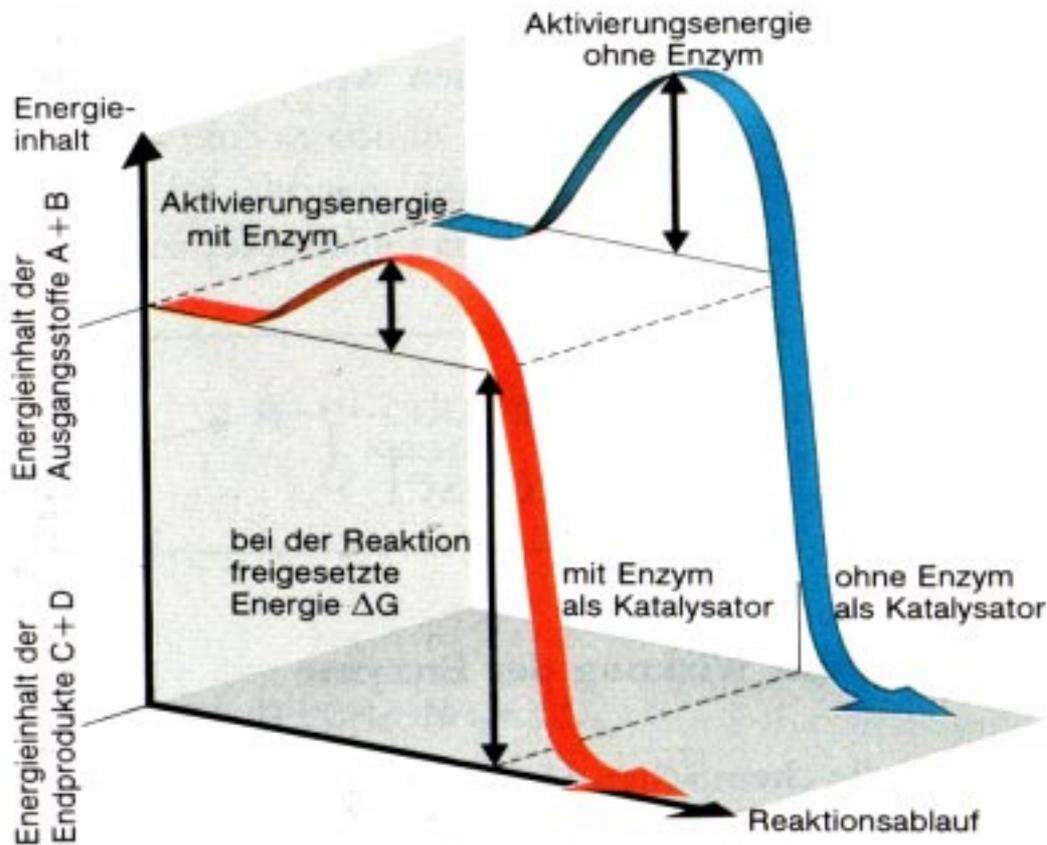
Das aktive Zentrum ist als eine starre präforierte Matrix zu verstehen, an der sich ein solches Substrat anlagert, das so hineinpasst, wie ein Schlüssel in ein Schloß.

### → **Anpassungstheorie (induced fit)**

Diese Theorie ist die modernere und mehr zutreffendere.

Enzym und Substrat sind in der Lage, gegenseitig Konformationsveränderungen herbeizuführen, die zu komplementären aktiven Zentren führen.

## 4) Katalysatorwirkung von Enzymen



Bei einer enzymatisch katalysierten Reaktion wird das Reaktionsgleichgewicht der Reaktion nicht verschoben und die Energieinhalte der Edukte und Produkte nicht verändert. Nur die Gibbsche freie Aktivierungsenergie wird erniedrigt, so daß die Hin- und Rückreaktion um den selben Faktor beschleunigt wird, also die Einstellung des Gleichgewichts schneller geschieht.

→ Herabsetzung der Aktivierungsenergie

Durch Bildung eines kurzlebigen Enzym-Substrat Komplex, der die Bindungspartner viel näher zusammenbringt, wird das Substrat durch Bindung aktiviert, so daß die Aktivierungsenergie für die gesamte Reaktion erniedrigt wird.

Dies hat eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit zur Folge.

## Versuch 2: Peroxidase-Luminoltest

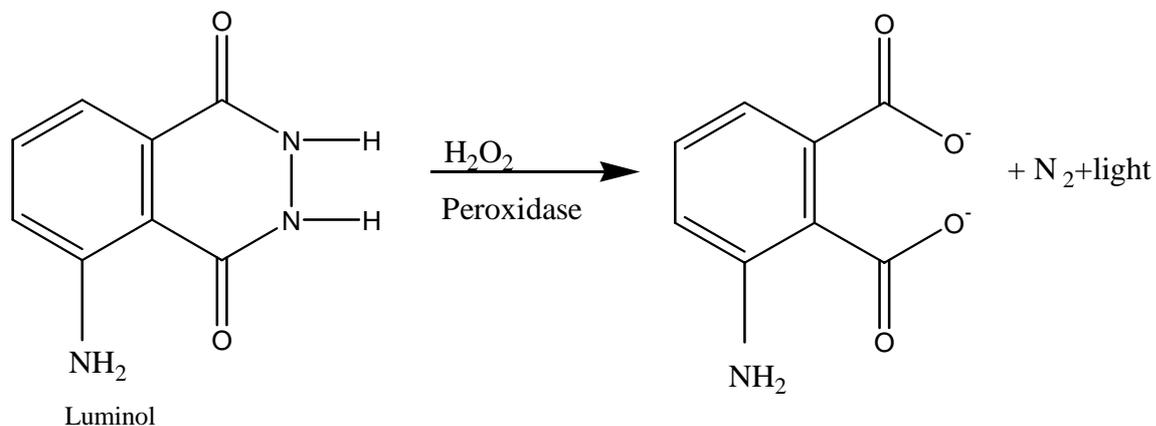
### Versuchsdurchführung:

Je 2 ml von Substrat 1 und 2 werden in ein Reagenzglas überführt (genauer Inhalt ist nicht bekannt, da dieser Test patentiert ist. Doch Lösungen, die getrennt aufbewahrt werden müssen, enthalten einen Puffer mit alkalischen pH-Wert, Wasserstoffperoxid und Luminol).

Anschließend werden 10µl einer Peroxidase-Lösung hinzugegeben.

Die Reaktionsmischung sendet eine blaue Lumineszenz im abgedunkelten Raum aus.

### Reaktionsgleichung:



Diese Reaktion findet weite Anwendung in der chemischen Analyse. Durch die Oxidation von Luminol mit Wasserstoffperoxid/ Peroxidase in Alkalischem Milieu, katalysiert durch das Enzym Peroxidase, wird Luminol in einen angeregten Zustand versetzt. Beim Übergang in den Grundzustand sendet es dann eine chemische Lumineszenz aus, die als blau emittiertes Licht sichtbar wird ( $\lambda_{\text{max}} = 428\text{nm}$ ).

Das blaue Licht kann mit einem lichtempfindlichen Film detektiert werden.

## 5. Enzymkinetik

### V3 Enzymatische Spaltung der Stärke mit $\alpha$ -Amylase

Stärke, die osmotisch unwirksame Speicherform der Glucose in Pflanzen, besteht aus Amylose und Amylopektin. Während Amylose die Struktur einer langen unverzweigten Schraube besitzt, die aus D-Glucose-Molekülen aufgebaut ist, die  $\alpha$  1-4 glycosidisch miteinander verknüpft sind, weist Amylopektin zusätzlich Verzweigungen auf, die durch  $\alpha$ -1-6-glycosidische Bindungen zustande kommen. Nur Amylose ist in heißem Wasser löslich.

Das Enzym  $\alpha$ -Amylase spaltet Amylose durch Hydrolyse bis zu Maltoseeinheiten.

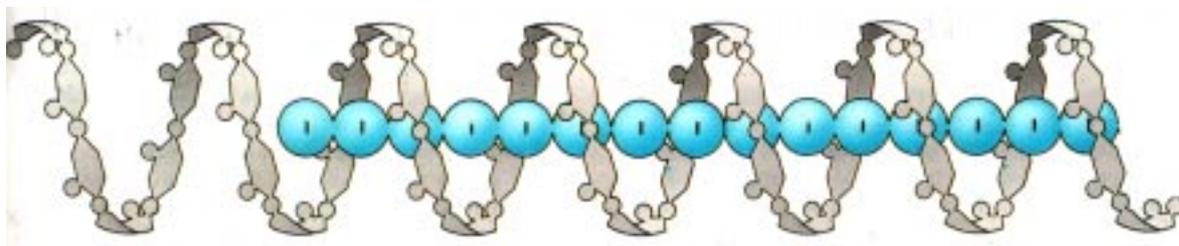
#### Durchführung:

100ml 1%ige Stärkelösung werden unter ständigem Rühren mit 2ml 1%iger Amylase-Lösung versetzt. Um den Reaktionsverlauf festzuhalten, werden alle 15sec 1ml der Reaktionslösung dem Reaktionsgefäß entnommen und einer verdünnten Iod-Kaliumiodid-Lösung zugegeben. Nach ca. 2 min sollte die Reaktion abgeschlossen sein und keine Stärke im Reaktionsgefäß mehr nachweisbar sein.

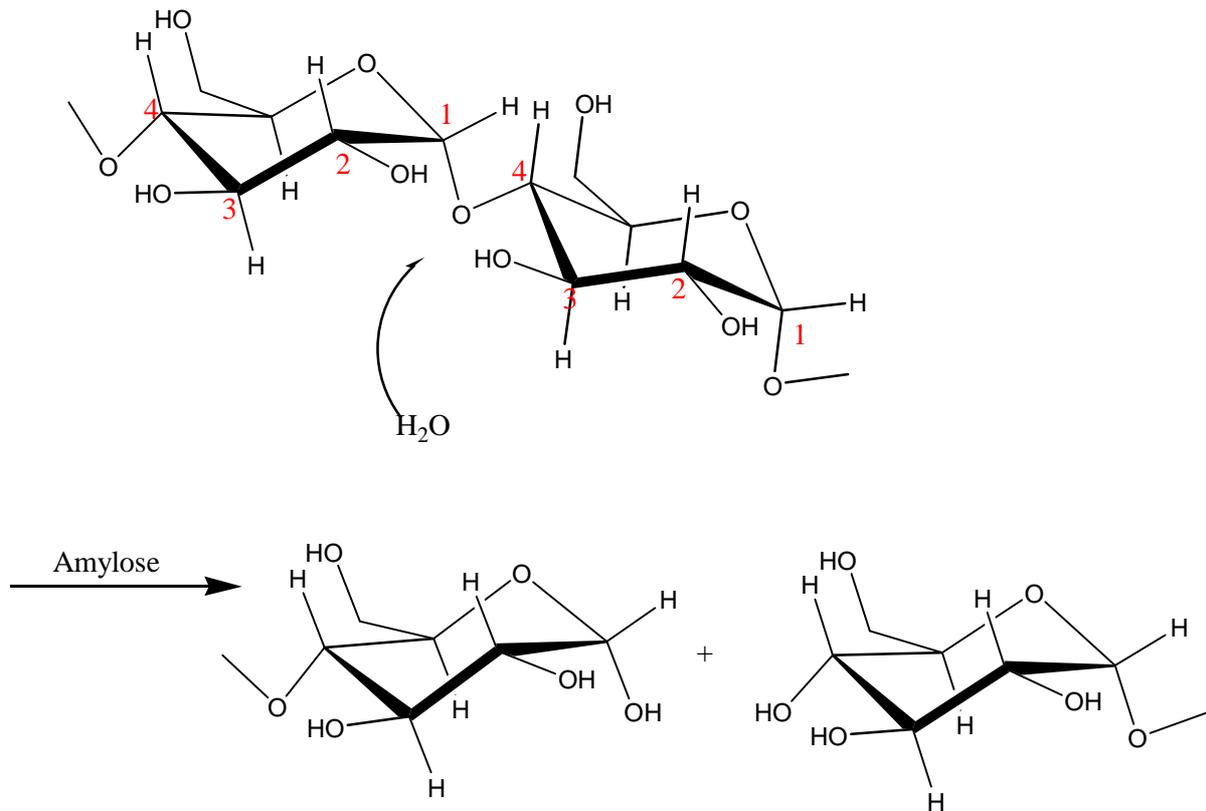
Die vorher entnommenen Proben ergeben eine Farbskala von tiefblau bis schwachviolett bis hellgelb, die eine Abnahme der Stärkekonzentration mit der Zeit darstellt.

#### Nachweis der Stärke: Jod- Stärke Komplex

→ Einlagerung von Jod in schraubiges Stärkemolekül



Reaktionsgleichung:



Ablauf der Reaktion:

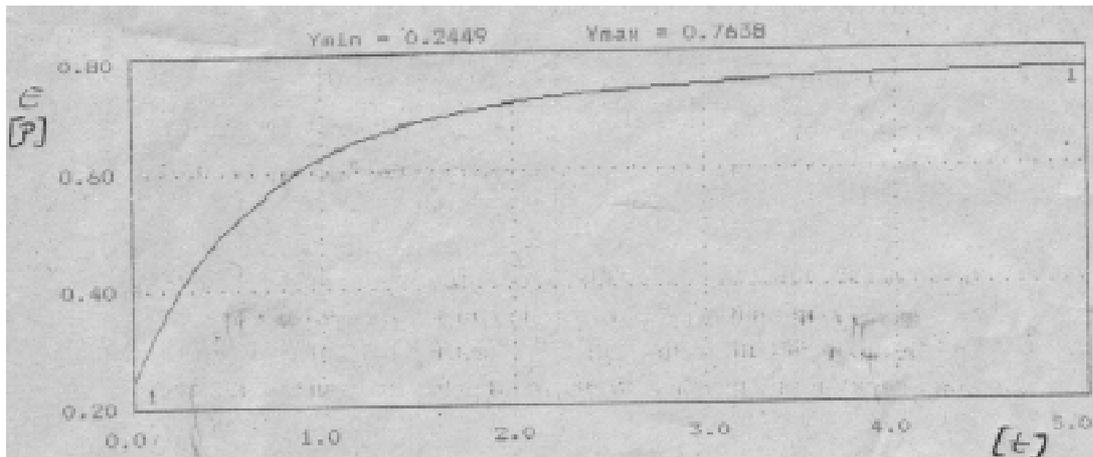
- ➔ Hydrolyse erfolgt im Inneren der Makromoleküle unter Retention der Konfiguration
- ➔ Verlängerung der Lichtabsorption deren Maximum infolge der kürzeren Ketten nach kürzeren Wellenlängen verschoben ist

# Enzymkinetik

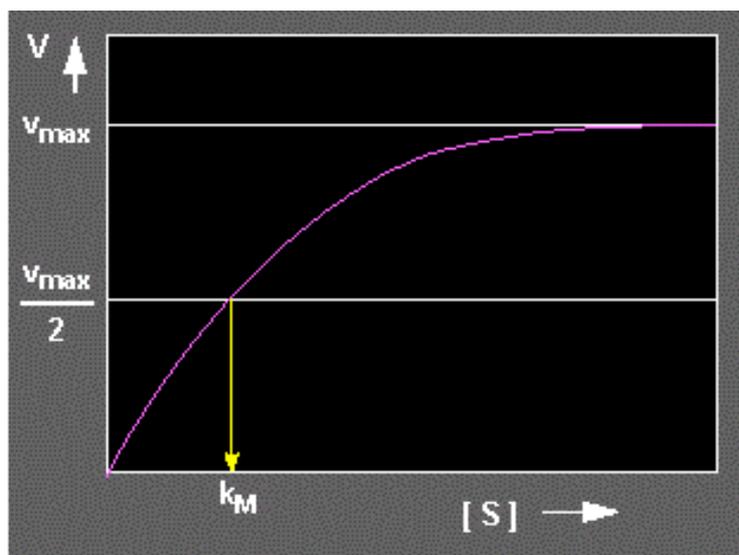
- Charakterisierung von Enzymen (Michaelis Menten Modell)

Enzymreaktionen zeigen einen charakteristischen Verlauf:

Wachsende Produktkonzentration mit Zunahme der Zeit:



Mißt man die Katalysegeschwindigkeit ( $V$ ) (Anzahl der pro Sekunde entstehenden Moleküle des Produkts) bei unterschiedlichen Konzentrationen des Substrat aber konstanter Enzymkonzentration, ergibt sich folgender Zusammenhang:



$V$  = Katalysegeschwindigkeit

$V_{\max}$  = Maximale Katalysegeschwindigkeit

$S$  = Substratkonzentration

$k_m$  = Michaelis-Konstante

Bei einer konstanten Enzymkonzentration steigt Reaktionsgeschwindigkeit mit wachsender Substratkonzentration an, bis maximale Geschwindigkeit erreicht ist (Sättigungseffekt).

Zu diesem Zeitpunkt sind alle katalytisch aktiven Zentren von Substrat besetzt.

Die halbe  $V_{max}$  bestimmt  $k_m$ , die Michaeliskonstante, welche ein Maß für die Affinität eines Enzyms zum Substrat darstellt.

Ein hoher  $K_m$ -Wert bedeutet, daß eine hohe Substratkonzentration erforderlich ist, um eine  $\frac{1}{2} V_{max}$  zu erreichen, d.h. das Enzym besitzt eine geringe Affinität zum Substrat.

### **Michaelis -Menten Modell:**

Diesen Zusammenhang haben Michaelis und Menten näher betrachtet und eine mathematische Formel gefunden. Sie geht von folgendem Modell aus:



Enzym und Substrat bilden mit einer Geschwindigkeit  $k_1$  ein Enzym-Substrat-Komplex. Dieser hat die Möglichkeit, entweder mit  $k_2$  in E und S zurück zu zerfallen oder sich mit  $k_3$  in Produkt und Enzym umzuwandeln.

Die Verbindung von Katalysegeschwindigkeit mit Substrat und Enzymkonzentration und Geschwindigkeiten der Einzelschritte ergibt folgende Formel:

$$V = V_{max} \cdot \frac{[S]}{[S] + k_m}$$

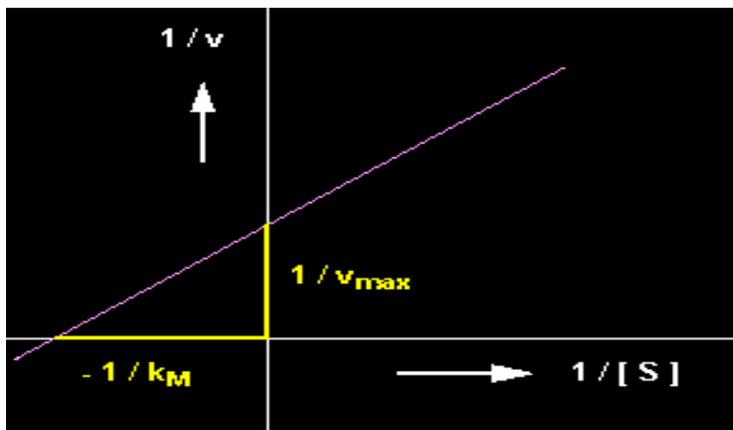
$k_m$  = Michaelis-Menten Konstante: Substratkonzentration bei der die Reaktionsgeschwindigkeit die Hälfte ihres Maximalwertes erreicht (Charakterisierung der Enzym-Substrat-Affinität)

Diese Formel beschreibt mit  $k_M$  das Verhalten eines Enzyms mathematisch. So können die für Enzyme charakteristischen Werte berechnet werden, die sonst nur durch aufwendige Versuche bestimmt werden können.

Modifikation:

### Modell von Lineweaver und Burk:

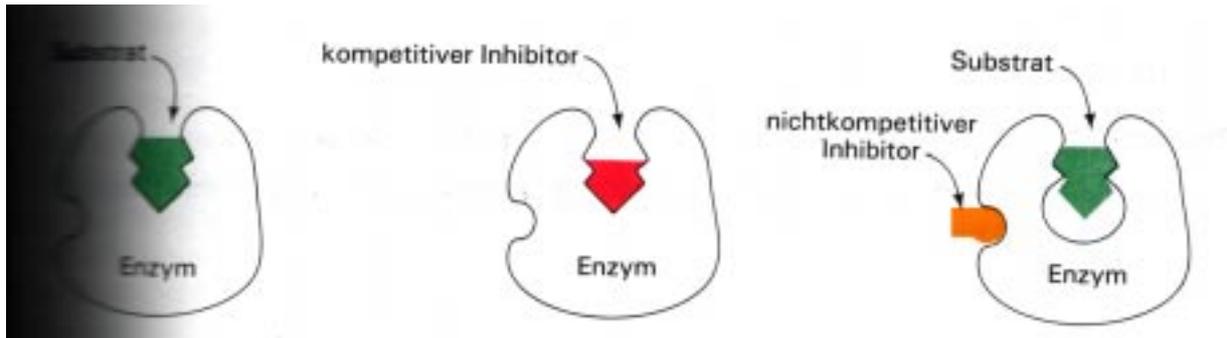
Diese veränderte Schreibweise (im Gegensatz zu Michaelis Menten) hat den Vorteil, daß keine Kurve sondern eine Gerade entsteht, die beide Koordinaten schneidet, so daß eine exaktere Bestimmung von  $V_{max}$  und  $k_M$  möglich ist.



## 6. Enzyminhibitoren

Es gibt verschiedene Einteilungsmöglichkeiten für Inhibitoren. Beispiele sind:

- a) Reversibel- Irreversibel
- b) Kompetitiv - nicht kompetitiv

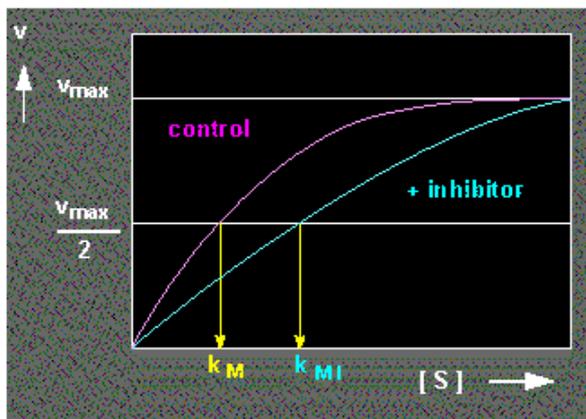


### Kompetitiver Inhibitor

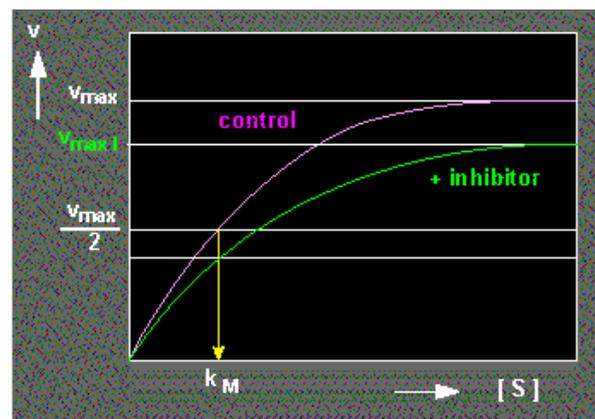
- große chemische Ähnlichkeit mit dem Substrat
- tritt mit Substrat am aktiven Zentrum in Konkurrenz
- vermindert Katalysegeschwindigkeit durch Blockade des Aktiven Zentrums
- kann durch Erhöhung der Substratkonzentration aufgehoben werden (z.B. Methanolvergiftung mit Ethanolüberschuß)

### Nicht-kompetitiver Inhibitor

- Inhibitor und Substrat können gleichzeitig am Enzym an verschiedenen Stellen binden
- erniedrigt Aktivität des Enzyms durch Veränderung der Struktur
- Inhibitor läßt sich nicht durch Erhöhung der Substratkonzentration ausschalten



→ Veränderung vom  $k_M$   
(Affinität)



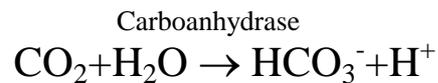
→ Veränderung von  $V_{max}$   
(Umsatzrate)

## V4 Kompetitive Hemmung der Carboanhydrase

Carboanhydrase im menschlichen Körper:

- Lungen- und Gewebekapillaren
  - Magen
  - Glomeruli der Nieren
- ⇒ CO<sub>2</sub>-Transport bzw. Austausch

Reaktionsgleichung:



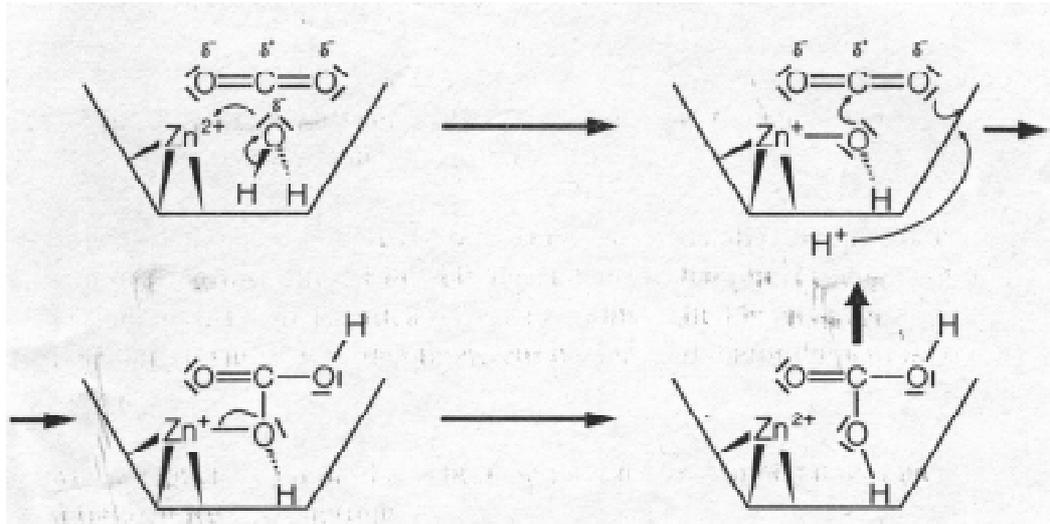
### Durchführung:

Drei verschiedene Reaktionsgemische werden vorbereitet:

Substanzen	1.	2.	3
5ml Phenolrot	+	+	+
5ml Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> / NaHCO <sub>3</sub> -Puffer	+	+	+
30ml CO <sub>2</sub> -gesättigtes Wasser	+	+	+
0,1ml Toluol-4-sulphonamid-Lösung	+		
0,1ml Carboanhydrase-Lösung	+	+	

Das CO<sub>2</sub>-gesättigte Wasser wird zuletzt zugegeben und man beobachtet den unterschiedlichen Zeitpunkt der Verfärbung der verschiedenen Gemische.

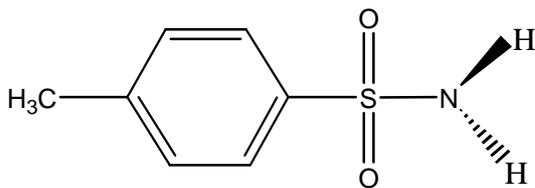
## Wirkungsmechanismus der Carboanhydrase:



Im aktiven Zentrum sitzt ein  $Zn^{2+}$ -Ion, welches als Ligand Wassermoleküle anlagern kann. Durch Abspaltung eines Protons, das vom Protein abgefangen wird, entsteht eine Lewis-Base.

Das in die Vertiefung passende  $CO_2$  wird mit Hilfe des  $Zn^{2+}$ -Ions eingepaßt, so daß ein nucleophiler Angriff auf das C-Atom durch die Lewis-Base erfolgen kann. Die resultierende Kohlensäure dissoziiert schnell und wird von einem neuen  $H_2O$ -Molekül abgelöst.

Hemmung der Carboanhydrase durch Sulfonamide  
z.B. Toluol-4-sulfonamid



Modell einer kompetitiven Hemmung:

- Sulfonamid verdrängt  $CO_2$  und  $H_2O$  am aktiven Zentrum
- Toluolrest hindert sterische Anlagerung des Substrats an das aktive Zentrum

➔ Toluol-4-sulphonamid wird als Arzneimittel angewandt

## 6) Abhängigkeiten Enzymatischer Umsetzungen

### Versuch 5: Kinetische Optimum einer enzymatischen Katalyse

➔ Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Temperatur am Beispiel der Milcheiweisspaltung durch Trypsin.

Dieses Beispiel eignet sich besonders gut deshalb, da der Reaktionsverlauf leicht sichtbar ist durch eine Verschiebung des pH-Wertes und eine Aufklärung der Lösung, wie später erklärt wird.

#### **Durchführung:**

200ml Magermilch werden mit NaOH auf einen pH-Wert von 9 eingestellt und mit soviel Phenolphthalein versetzt, bis die Emulsion eine deutliche Rosafärbung aufzeigt.

Diese wird dann gleichmäßig auf 4 Demonstrationsreaganzgläser verteilt, die dann in die jeweiligen Reaktionsbedingungen gebracht werden:

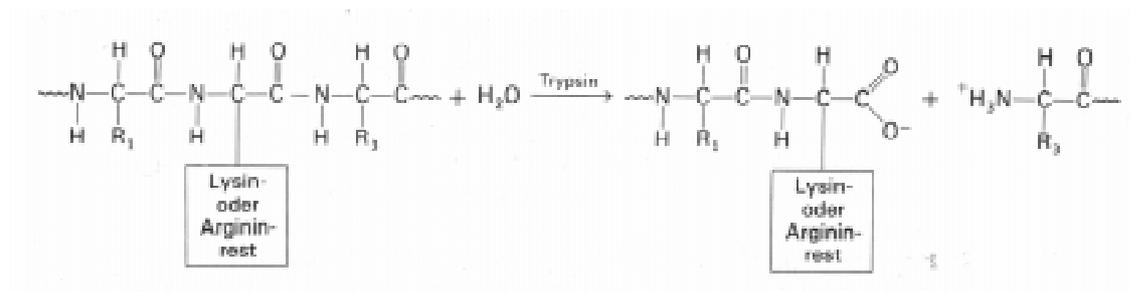
1. Eisbad
2. Wasserbad  $T = 35^{\circ}\text{C}$
3. Raumtemperatur
4. Raumtemperatur (aber später ohne Enzym)

Ist entsprechende Temperatur erreicht worden, werden je 2ml einer 2% Trypsin-Lösung hinzugefügt und der Reaktionsverlauf im Vergleich beobachtet.

#### **Beobachtung:**

Die Reaktionsmischung mit  $T = 35^{\circ}\text{C}$  verändert (Verschwinden der Rosafärbung, Aufklären der Lösung) sich am schnellsten, wogegen die im Eisbad fast keine Änderung zeigt. Bei Raumtemperatur zeigt sich eine langsame Reaktion.

## Reaktionsgleichung:



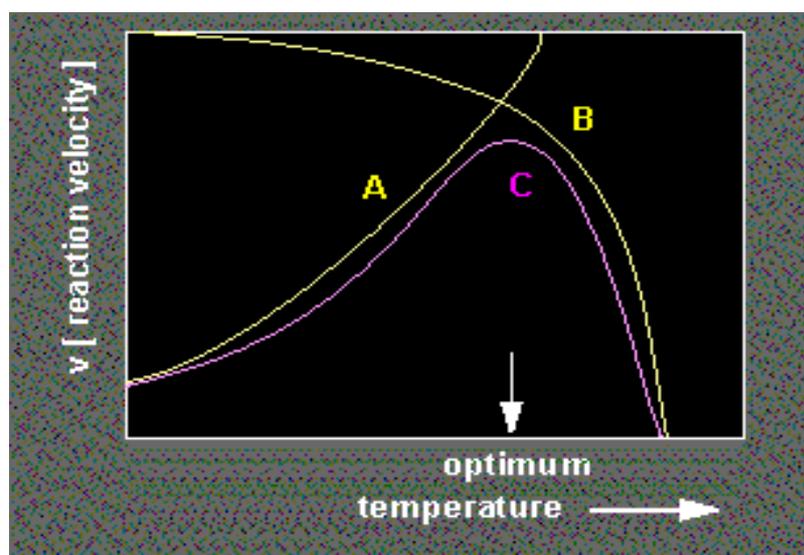
## Ergebnis:

Trypsin spaltet Polypeptidketten hochspezifisch auf der Carboxylseite von Arginin und Lysinresten.

Dadurch werden die Casein- Micellen, die die weiße Farbe und Undurchsichtigkeit der Milch bedingen, durch Trypsin hydrolysiert und in kleinere Spaltprodukte zerlegt, die wegen geringer Größe und höherer Ladungszahl gut wasserlöslich sind.

Dadurch klärt sich die Lösung auf und der pH-Wert verschiebt sich von basisch nach sauer wegen Auflösung der Peptidbindung und damit freiwerdenden Amino und Carboxylgruppen.

Die Temperaturabhängigkeit ist Ergebnis von zwei entgegengesetzt wirkenden Einflüssen:



Der Einfluß auf die Enzymaktivität hängt davon ab,

- ➔ daß im unteren Temperaturbereich die Reaktionsgeschwindigkeit nach der RGT- Regel (eine Zunahme von 10°C bedingt eine Verdopplung der Reaktionsgeschwindigkeit) zunimmt.
- ➔ daß es bei höheren Temperaturen durch Hitzedenaturierung (Sekundär und Teriärstruktur geht verloren) zu einer Inaktivierung des Enzyms kommt.
- ➔ Dadurch liegt das Temperaturoptimum bei den meisten Enzymen bei 30-50 °C.

### **Versuch 6: pH- Optimum einer Enzymatischen Katalyse**

- ➔ Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom pH-Wert bei der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zersetzung der Katalase

Funktion der Katalase in tierischen und pflanzlichen Zellen:

Beseitigung des schädlichen Stoffwechselnebenproduktes Wasserstoffperoxids in Peroxisomen, Glyoxisomen und Chloroplasten

#### **Reaktionsgleichung:**



#### **Versuchsaufbau:**

### Durchführung:

Eine 1%ige Wasserstoffperoxidlösung wird mit Phosphatpuffer angesetzt und auf drei verschiedene pH-Werte eingestellt (pH=4,5; pH=7; pH=9,5). In die Spritzen werden je 10ml einer 1%igen Katalase-Lösung gegeben, welche gleichzeitig durch die Kanülen in die Reaktionsgefäße gegeben werden.

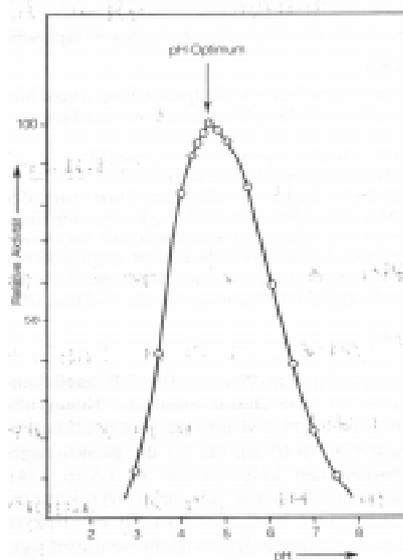
### Beobachtung:

Gasentwicklung (Sauerstoff) setzt sofort ein, nur in den verschiedenen Reaktionsgefäßen unterschiedlich schnell, und zwar am heftigsten bei dem, mit pH=7.

### Ergebnis:

Der Einfluß auf Enzymaktivität beruht darauf, daß Enzyme haben auf der Oberfläche zahlreiche ionisierbare Gruppen (Proteinnatur) haben. Durch eine Veränderung des pH-Wertes kommt es Ladungsveränderung, wodurch die Bindungskräfte am aktiven Zentrum beeinflußt werden, so daß Substrat und Enzym weniger komplementär zueinander sind.

Der isoelektrische Punkt ist derjenige pH-Wert, bei dem die Summe der Einzelladungen null ist.



➔ Das pH-Optimum der meisten Enzyme liegt bei neutral bis schwachsaure. Eine Ausnahme bilden die Verdauungsenzyme (Pepsin mit  $\text{pH}_{\text{opt.}}=1$ , Trypsin mit  $\text{pH}_{\text{opt.}}=9$ ).

## 7) Quantitative Analyse mit Enzymen

### Versuch 7: Alkoholbestimmung mit Alkoholdehydrogenase (ADH)

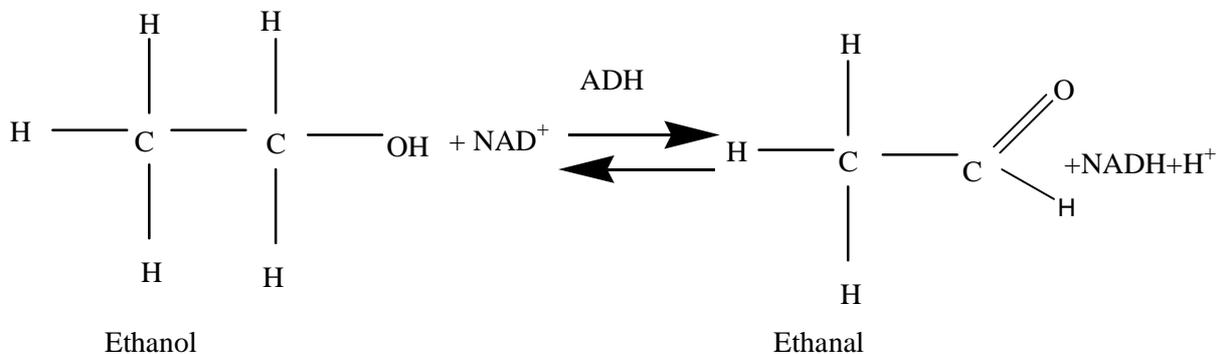
Dieser Versuch findet vielfältige Anwendungen sowohl in der Praxis (Alkoholkonzentration im Blut), als auch im wissenschaftlich-demonstrativen im Bereich der Enzymkinetik.

#### Durchführung:

In zwei 3ml Küvetten werden je

- 0,5ml 0,06M Diphosphatpuffer (pH=8,8)
- 1ml 0,6mM Nad<sup>+</sup>
- 1ml 0,3M Ethanol
- 0,5ml 0,01M Phosphatpuffer (einmal mit Enzym, einmal ohne) gegeben und nach kalibrieren mit der Blindprobe die Absorption mit einem Photometer bei der Wellenlänge= 340nm gemessen.

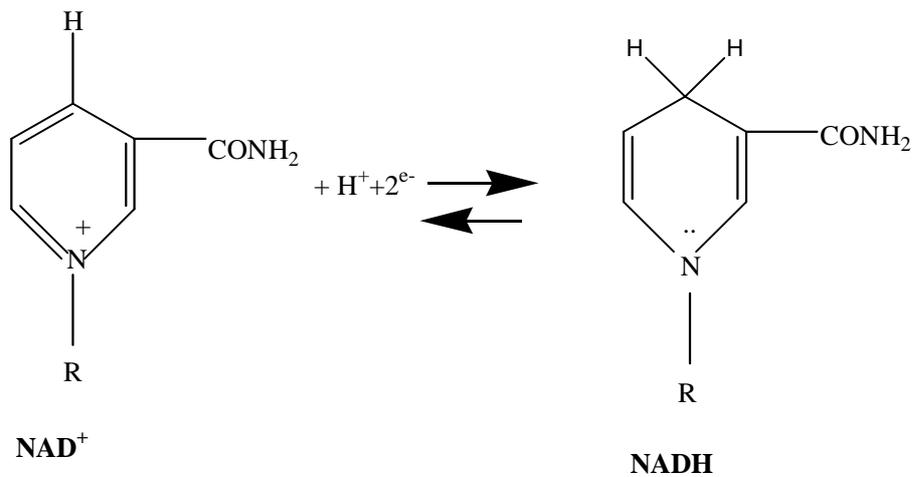
#### Reaktionsgleichung:



NADH (Nicotinamidadenindinucleotid) absorbiert bei  $\lambda = 340\text{nm}$   
 $\text{NAD}^+ \neq 340\text{nm}$

➔ Die Konzentration des Ethanols kann mit Hilfe der Zunahme der Extinktion (Zunahme von NADH) bei  $\lambda = 340\text{nm}$  bestimmt werden.

Reduktion des  $\text{NAD}^+$ :



**Auswertung:**

Bestimmung der Ethanolkonzentration:

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (\text{Gesetz von Lambert und Beer})$$

$\varepsilon$  = Extinktionskoeffizient von NADH =  $6200 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

$c$  = Konzentration von NADH = Konzentration von Ethanol

$d$  = Durchmesser (Lichtweg) der Küvette = 1 cm

$$E = 0,73$$

$$c = \frac{0,73 \text{ mol}}{6200 \cdot 1}$$

$$c = 1,17 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$$

Umrechnung in Promille:

$$c = 1,17 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1} \cdot 46 \text{ g mol}^{-1}$$

$$c = 5,4 \cdot 10^{-3} \text{ g l}^{-1} = 5,4 \text{ Promille}$$

## LITERATURVERZEICHNIS:

### **Bücher:**

- (1) Biochemie, Lubert Streyer, 4.Auflage, Spektrum Chemie, 1997
- (2) Organische Chemie, K.Peter, C.Vollhardt, 1. Auflage, VHC Verlagsgesellschaft, 1990
- (3) Pharmazeutische Biologie, Ernst Reinhard, 3.Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1986
- (4) Biologie, H.Lindner, 20.Auflage, J.B.Mecklersche Verlagsbuchhandlung
- (5) Biochemie, Konrad Lechner, Bayerischer Schulbuchverlag, 1979
- (6) Cytologie, K.H.Scharf, W.Weber, Schroedel Verlag KG, 1979
- (7) Römpp, Chemielexikon, 9.Auflage, Thiemeverlag

### **Zeitschriften:**

- (1) Naturwissenschaft im Unterricht  
8. Nr.39, 1997

- Enzyme-Katalysatoren in der Zelle  
(von Doris Schmidkunz-Eggler)
- Experimente zum Thema Katalyse  
(von Dietrich Büttner und Sabine Bär)
- Katalyse und Enzyme (Helmut  
Wenck, Michael Budde)
- Enzyme-Eigenschaften und Anwendung  
(Kerstin Höger, Helmut Wenck)

- (2) Praxis der Naturwissenschaften

- Biologie 5/34.Jg., 1985, (Heinrich Köhler),  
Dynamisches Modell der Enzymregulation
- Biologie 4/45.Jg., 1996, (F. Helbig)  
Arzneimittel als Enzymhemmer

- Chemie 2/46.Jg., 1997 (T.M.Braun)  
Klinische Chemie :Enzymfarbtest
- Biologie 7/41.Jg.,1992 (Ch.Högermann, J.Gast)  
Einfache Funktionsmodelle in der Biologie
- Biologie 6/42.Jg.,1993 (Schulte)  
Milcheiweiß-ein hochgeeignetes Substrat für Versuche der  
Eiweißverdauung
- Chemie 7/24.Jg.,1975 (Werner Pilhofer)  
Versuche und Modelle zur Enzymkonformation
- Chemie 3/39 Jg.,1990 (K.W.Leienbach)  
Biochemie in der gymnasialen Oberstufe

### **Sonstiges:**

- (1) botanic-online, the internet hypertextbook, Alice Bergfeld, Rolf Bergmann, Peter v.Sengbusch
- (2) Course Manual Cell Metabolism & Regulation, Edinburgh School of Biology, 1997-98