

Aufgaben zu enzymatischen Analysen

Viele dieser Aufgaben wurden in den vergangenen Jahren im Rahmen von Klassenarbeiten und/oder Prüfungen gestellt.

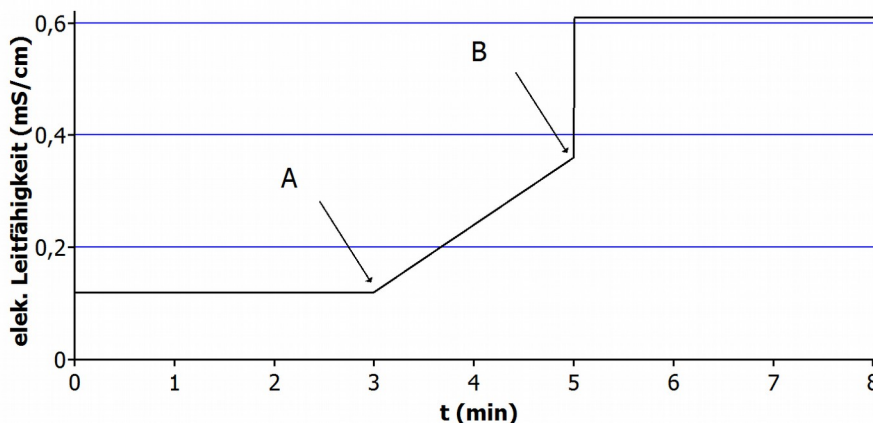
1. Grundlagen: Spezifität, T- und pH-Optima, Sättigungskinetik, Cofaktoren

1.1. Die Temperatur wird in einem Enzymversuch mit einem typischen Säugetierenzym im Verlauf von 10 Minuten von 10 °C auf 95°C gesteigert und im Verlauf weiterer 10 Minuten wieder auf 35°C gesenkt. Wie verändert sich die Geschwindigkeit/Enzymaktivität im Verlauf des gesamten Experiment? Annahme: Das Enzym ist zu jedem Zeitpunkt optimal mit Substrat versorgt. Geben Sie einen entsprechenden Kurvenverlauf in einem Diagramm an (x-Achse: Zeit, y-Achse: Reaktionsgeschwindigkeit) und erklären Sie die Hintergründe!

1.2. Die Biochemie kennt heute viele tausende Enzyme. Mehrere hunderte solcher Enzyme sind im Zellplasma normalerweise gleichzeitig aktiv. Weshalb ist es dies möglich, ohne dass sich die Enzyme gegenseitig in ihrer Funktion stören/behindern und der geordnete Stoffwechsel in ein Chaos verfällt? Erläutern Sie ausführlich.

1.3 Das Enzym Urease spaltet Harnstoff ($\text{H}_2\text{N-CO-NH}_2$) hydrolytisch in Ammoniak (NH_3) und Kohlenstoffdioxid. Die Aktivität des Enzyms kann durch die kontinuierliche Messung der elektrischen Leitfähigkeit mit einem Leitfähigkeitsmessgerät erfolgen, denn als Base bildet das Ammoniak Ionen: $\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NH}_4^+ + \text{OH}^-$. Je mehr Ionen in der Lösung, desto höher ist die mit dem Leitfähigkeitsmessgerät gemessene elektrische Leitfähigkeit.

Zum Zeitpunkt A wurde in einer Harnstofflösung eine Spatelspitze Urease gelöst. Zum Zeitpunkt B wurden einige Tropfen konz. Silbernitratlösung zugegeben. Insgesamt ergab sich folgender Verlauf:



- Notieren Sie die Reaktionsgleichung für die enzymatische Reaktion.
- Beschreiben und erklären Sie den Verlauf der Leitfähigkeit.
- Zeichnen Sie die zu erwartende Kurve, wenn zum Zeitpunkt A Silbernitratlösung und zum Zeitpunkt B Urease dazugegeben worden wäre.

1.4 Begründen Sie welches Cosubstrat bei folgenden enzymatischen Reaktionen benutzt wird. Stellen Sie eine entsprechende Reaktionsgleichung auf, wobei organische Substrate und Produkte in Strukturformeln darzustellen sind.

- Bei der Milchsäuregärung kommt es zur Umwandlung von Pyruvat (Anion der Brenztraubensäure, $\text{H}_3\text{C-C(O)-COOH}$) zu Lactat (Anion der Milchsäure, $\text{H}_3\text{C-CH(OH)-COOH}$).
- Der Citratzyklus ist ein sehr wichtiger Stoffwechselweg. Ein Teilschritt ist die Umwandlung von Malat (zweifach negativ geladenes Anion der 2-Hydroxy-Butandisäure) in Oxalacetat (zweifach negativ geladenes Anion der Oxobutandisäure – besitzt neben Carboxylgruppen noch eine Ketogruppe).

Rund um enzymatische Berechnungen existiert auch ein eigenes Arbeitsblatt mit dem Titel „Rechnen mit der Wechselzahl und der Enzymaktivität“

2.1. a) Zeichnen und erklären Sie den Verlauf der Kurve wenn man die Geschwindigkeit bzw. die Enzymaktivität gegen die Substratkonzentration in ein Diagramm aufträgt.

- b) Wie gelangt man ausgehend von a) zur Lineweaver-Burk-Auftragung? Zeichnen und beschriften Sie ein solches Diagramm (Größe der Zeichnung: ca. ¼ DIN A4-Seite)
- c) Wie verändert sich die Kurve/Gerade von b), wenn in einem ansonsten gleichen Ansatz zusätzlich ein allosterischer Hemmstoff vorhanden ist. Zeichnen Sie in das Diagramm von b) eine solche Kurve/Gerade ein.

2.2 Die Carboanhydrase der Erythrozyten katalysiert die Reaktion $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$. Die gehört zu den schnellsten bekannten Enzymen.

- a) Erklären Sie kurz den Begriff Wechselzahl.
- b) Berechnen Sie die Wechselzahl des Enzyms, wenn 10 µg des hochreinen Enzyms ($M = 30000 \text{ g/mol}$) pro Minute 6,8 mmol CO_2 umsetzen können. Hinweis: Avogadro-Konstante $N_A = 6,022 \cdot 10^{23} \text{ 1/mol}$.

2.3. Die Alkoholdehydrogenase (ADH) katalysiert in Hefezellen die Umwandlung von Acetaldehyd (= Ethanal, $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$, $M = 44,1 \text{ g/mol}$) in Ethanol. Die spezifische Aktivität eines hochreinen Präparats von Alkoholdehydrogenase beträgt 4,16 µkatal/mg.

- a) Berechnen Sie die spezifische Aktivität in der Einheit U/mg um
- b) Welche Masse des Enzympräparats muss in einem Versuch eingesetzt werden, um in einem Versuchsansatz 793,8 mg Ethanal in 20 Minuten umzuwandeln.

2.4 Bestimmen Sie β (Glucose) und β (Saccharose) in einer Probe anhand folgende Daten:

Bestimmung von Glucose ($M = 180,2 \text{ g/mol}$): In Reaktionsgefäße werden gemischt:

- 500 µL Testflüssigkeit (Probe oder Referenz)
- + 1250 µL GOD/PAP-Reagenz (enthält u.a. Glucoseoxidase + chromogenes Substrat)
- ausreichend lange bei 30 °C inkubieren.
- **Ergebnis:** Probe: $A = 0,501$ Glucose-Referenzlösung (1 g/L): $A = 0,230$

Bestimmung von Saccharose ($M = 342,3 \text{ g/mol}$): In ein Reaktionsgefäß wird gemischt

- 500 µL Probe
- + 100 µL Invertase-Lsg.: Saccharose $\xrightarrow{\text{Invertase}}$ D-Fructose + D-Glucose.
- ausreichend lange bei 30 °C inkubieren.
- + 1250 µL GOD/PAP-Reagenz
- ausreichend lange bei 30 °C inkubieren.
- **Ergebnis:** $A = 0,383$.

2.5 Bestimmen Sie β (Glucose) und β (Saccharose) in einer Probe anhand folgende Daten. Beachten Sie auch grundlegende Unterschiede zur vorangegangenen Aufgabe.

Bestimmung von Glucose ($M = 180,2 \text{ g/mol}$): In Reaktionsgefäße werden gemischt:

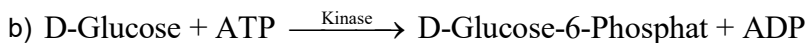
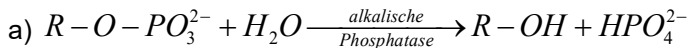
- 500 µL Testflüssigkeit (Probe oder Referenz)
- + 100 µL H_2O
- + 1250 µL GOD/PAP-Reagenz (enthält u.a. Glucoseoxidase + chromogenes Substrat)
- 10 Minuten bei 30 °C inkubieren. danach: + 1000 µL HCl_{aq} (1 M).
- **Ergebnis:** Probe: $A = 0,100$ Glucose-Referenzlösung (1 g/L): $A = 0,166$

Bestimmung von Saccharose (M = 342,3 g/mol): In ein Reaktionsgefäß werden gemischt:

- 500 µL Testflüssigkeit (Probe oder Referenz)
- + 100 µL Invertase-Lsg.: Saccharose $\xrightarrow{\text{Invertase}}$ D-Fructose + D-Glucose.
- 30 Minuten bei 30 °C inkubieren.
- + 1250 µL GOD/PAP-Reagenz
- 10 Minuten bei 30 °C inkubieren. danach: + 1000 µL HCl_{aq} (1 M).
- + 1000 µL HCl (1 M)
- **Ergebnis:** Probe: A = 0,205 Saccharose-Referenzlösung (0,5 g/L): A = 0,157 A.

3. Enzymklassen

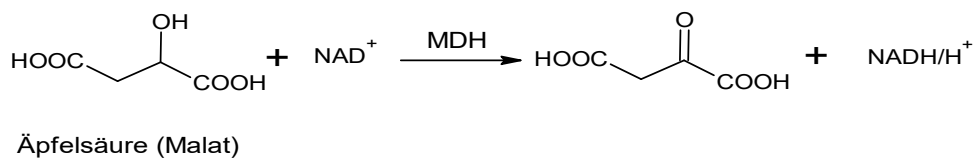
3.1. Begründen Sie kurz, zu welchen Enzymklassen diese Enzyme gehören.



- c) Malatdehydrogenase ist ein Enzym, das die chemische Reaktion von Malat (zweifach geladenes Säurerestion der 2-Hydroxy-butandisäure (C₄H₆O₅)) zu Oxalacetat (Oxalacetat: zweifach geladenes Säurerestion der 2-Oxobutandisäure (C₄H₄O₅)) katalysiert. Geben Sie neben der Enzymklasse (incl. Begründung) auch die Reaktionsgleichung incl. Cosubstrat an!

4. Gemischte Aufgaben

4.1 Äpfelsäure kann in einer Probe fotometrisch mit Hilfe des Enzyms Malat-Dehydrogenase (MDH) und NAD⁺ als Cosubstrat bestimmt werden. Das Enzym MDH katalysiert dabei folgende Reaktion:



- a) Erklären Sie kurz das Prinzip dieser Bestimmungsmethode.
- b) Zu welcher Enzymklasse gehört die Malat-Dehydrogenase?

4.2 Das Enzym Aldehyddehydrogenase oxidiert Aldehyde (R-CHO) mithilfe von NAD⁺ oder NADH/H⁺ auf. Der molare Absorptionskoeffizient von NADH/H⁺ beträgt bei λ = 339 nm, ε = 6200 L/(mol · cm), der von NAD⁺ bei gleicher Wellenlänge beträgt ε = 0,0 L/(mol · cm).

- a) Notieren Sie eine allgemeine Reaktionsgleichung (mit R-CHO) und entscheiden Sie ob NAD⁺ oder NADH/H⁺ benötigt wird.
- b) Berechnen Sie die Enzymaktivität eines Aldehyddehydrogenase-Präparats wenn sich während der 1-stündigen enzymatischen Reaktion in einem Ansatz mit 200 mL die Absorbanz um $A_{339\text{nm}} \approx 0,875$ ändert. Geben Sie das Ergebnis in Units und in Nanokatal an.
- c) Zur Bestimmung der Masse an Acetaldehyd (Hinweis: Acetaldehyd = Ethanal) wurden 50 mL einer Probelösung mit einer großen Portion der Aldehyddehydrogenase versetzt. Nach längerer Zeit hat sich die Absorbanz von $A_{339\text{nm}} \approx 0,454$ verändert. Berechnen Sie die Masse Acetaldehyd, die in der Probe vorlag.

Lösungshinweise ohne Gewähr

Zu vielen Fragen finden sich nur Lösungshinweise. Sie sollen dazu anregen, selbst auf die entscheidenden Denkschritte zu kommen.

In jedem Fall auch die Aufgabenstellung dieser online-Version mit Ihrer Kopie aus dem Unterricht abgleichen. Manchmal gibt es Änderungen, auch in der Nummerierung! Wenn Sie einen Fehler entdecken, bin ich um eine kurze e-Mail dankbar. Die finden sie unter http://www.laborberufe.de/meine_angaben.html

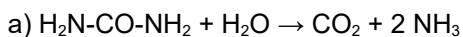
1.1

Zu Beginn greift die RGT-Regel. Erhöht man die T um 10°C so nimmt die Enzymaktivität (Reaktionsgeschwindigkeit) je nach Enzym um das Doppelte bis Dreifache zu. Bis zum Temperaturoptimum verläuft die Zunahme also exponentiell. Als T-Optimum nimmt man z.B. eine bestimmte T im Bereich von 35 °C – 40 °C an. Danach kommt es zu einer Senkung der Enzymaktivität, weil das Enzym denaturiert. Ab ca. 50 °C kommt es zur irreversiblen Denaturierung, die Enzymaktivität fällt auch 0,0 mol/min. Auch bei einer T-Senkung steigt die Enzymaktivität nicht mehr an.

1.2

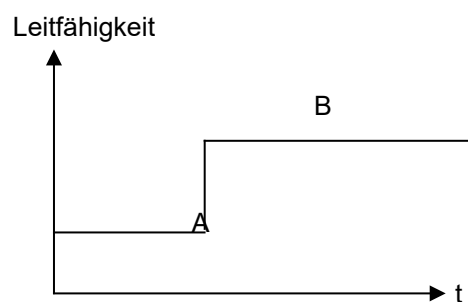
Die Erklärung liegt in der ausgeprägten Substrat- und Wirkungsspezifität der Enzyme.

1.3



b) Die elektrische Leitfähigkeit ist ein Maß für die Ionenkonzentration in der Lösung. Zu Beginn ist sie konstant. Bei Zugabe von Urease beginnt sie kontinuierlich zu steigen, weil die CO_2 und Ammoniak entstehen, die in wässriger Lösung teilweise in Ionen zerfallen ($\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NH}_4^+ + \text{OH}^-$, $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_3\text{O}^+ + \text{HCO}_3^-$). Bei Zugabe des Salzes AgNO_3 nimmt die Ionenleitfähigkeit sprunghaft zu, da das Salz in Ionen dissoziiert vorliegt. Dabei wird jedoch die Urease irreversibel aktiviert, sodass es nicht mehr zu einer kontinuierlichen Zunahme der Leitfähigkeit kommt.

c) Bis zum Punkt A (AgNO_3 -Zugabe): horizontal. Bei Punkt A senkrechter (sprunghafter) Anstieg, da ein Salz (Ionenverbindung) zugegeben wird. Dann bis zum Punkt B horizontal weiter (\rightarrow keine weitere Zunahme der Ionenkonzentrationen). Auch nach Urease-Zugabe ändert sich die Ionenleitfähigkeit nicht, da die Urease durch das Ag^+ irreversibel gehemmt wird.

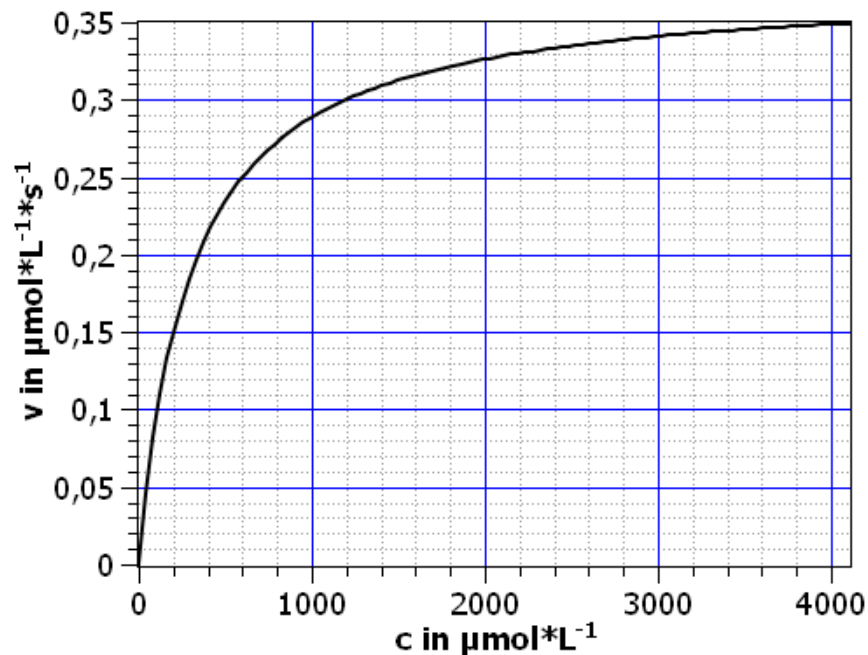


1.4

Fehlt noch

2.1

Es resultiert eine Substratsättigungskurve. Beispiel für eine Kurve mit $v_{\max} = 0,375 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{s})$ und $K_M = 300 \mu\text{mol}/\text{L}$



c) Bei einer allosterischen Hemmung wird v_{\max} kleiner, da ja eine *Hemmung* eintritt! Wenn v_{\max} kleiner wird, dann wird $1/v_{\max}$ größer. D.h. die Gerade hat bei Anwesenheit eines allosterischen Hemmstoff hat auf jeden Fall einen größeren y-Achsenabschnitt. Der K_M -Wert kann größer, gleich oder kleiner sein, so dass man keine Aussage über den x-Achsenabschnitt machen kann. (*Hinweis: Es gibt hier auch genauere Differenzierungen, die aber im Unterricht nicht behandelt wurden*).

2.2

a) Die Wechselzahl (turnover number) gibt an, wie viel Substratmoleküle pro Enzymmolekül pro Zeiteinheit umgesetzt wird. Meist gibt man die Wechselzahl pro Sekunde an. Einheit: s^{-1}

b) Die Avogadro-Konstante wird für das Rechnen nicht unbedingt benötigt!

$10 \mu\text{g}$ Enzym entsprechen $3,3333 \cdot 10^{-10}$ mol Enzym. Diese Stoffmenge setzt $6,8 \text{ mmol}$ ($= 6,8 \cdot 10^{-3} \text{ mol}$) CO_2 um. Es wird die $2,04 \cdot 10^7$ -fache Substratmenge umgesetzt, wie Enzymmenge vorhanden ist.

Mit anderen Worten (Variante 1): Pro mol Enzym werden also $2,04 \cdot 10^7$ mol CO_2 umgesetzt.

Mit anderen Worten (Variante 2): Pro Molekül Enzym werden pro Minuten $2,04 \cdot 10^7$ CO_2 - Moleküle umgesetzt.

Die Wechselzahl beträgt also $t_n = 2,04 \cdot 10^7 \text{ min}^{-1}$ ODER $t_n = 340000 \text{ s}^{-1}$

2.3

a)

$$4,16 \frac{\mu\text{katal}}{\text{mg}} = 4,16 \frac{\frac{\mu\text{mol}}{\text{s}}}{\text{mg}} = 4,16 \frac{\frac{\mu\text{mol}}{1 \text{ min}}}{\text{mg}} = 249,6 \frac{\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}}}{\text{mg}} = 249,6 \frac{\text{U}}{\text{mg}}$$

b)

$793,8 \text{ mg}$ Ethanal entsprechen $0,018 \text{ mol}$ Ethanal. Das sind $18000 \mu\text{mol}$ Ethanal. Pro Minute müssen also $900 \mu\text{mol}$ Ethanal umgewandelt werden. Die eingesetzte Enzymportion muss also 900 Units besitzen. Wenn die spezifische Aktivität $249,6 \text{ U pro mg}$ beträgt, müssen $3,6 \text{ mg}$ eingesetzt werden.

2.4 Saccharose und Glucose

Wie auch immer Proben durch Vorbehandlung/Reagenzienzugabe etc. gemischt werden, das ist für die Berechnung des Ergebnisses irrelevant, sofern es sowohl die Probe als auch die Referenz in gleicher Weise betrifft. Selbstverständlich muss man deshalb die 1250 μL nicht beachten. Dort können auch 0 μL , 1000 μL oder 20 Liter stehen. Die Effekte die durch das Verdünnen zustande kommen, betreffen in gleichem Maß auch die Referenzlösung und sind deshalb nicht zu berücksichtigen.

Durch die Invertase entsteht zusätzliche Glucose! Jedes hinzugekommene Glucosemolekül steht für ein Saccharosemolekül was in der Probe ursprünglich enthalten war und gespalten wurde. Das Absorbanz**zuwachs** ist ein Maß für den Saccharosegehalt. Bei der Saccharose muss rechnerisch darüber hinaus berücksichtigt werden, dass die Lösung durch die Zugabe von 100 μL Invertasepräparat verdünnt wurde. Grund: Diese Verdünnung betrifft die Probe, nicht aber die Referenz.

Ergebnisse

$\beta(\text{Gluc}) = 2,17 \text{ g/L}$

Absorbanzzunahme: $A = 0,153$. $\beta(\text{Gluc})$ -Zunahme (in 600 μL): 0,665 g/L. In 500 μL entspräche das einer Zunahme von $\beta(\text{Gluc}) = 0,798 \text{ g/L}$. Zunahme von $c(\text{Gluc}) = 4,428 \text{ mmol/L} = c(\text{Saccharose})$. **$\beta(\text{Sac}) = 1,516 \text{ g/L}$**

2.5 Saccharose und Glucose II

Prinzipieller Unterschied: Es handelt diesmal sich nicht um eine *Endpunktbestimmung*. Die enzymatischen Reaktionen werden abgebrochen, ohne dass es zu einem vollständigen Substratumsatz gekommen ist. Die Bestimmung beruht darauf, dass die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion von der Substratkonzentration abhängt (Stichwort: Substratsättigungskurve). Ist viel Substrat (Analyt) in der Lösung, so bildet sich innerhalb von 10 Minuten relativ viel Farbstoff, bei wenig Analyt ist die Geschwindigkeit der Farbstoffbildung geringer und es bildet sich innerhalb eines Zeitintervalls nur wenig Farbstoff.

Die Auswertung erfolgt trotzdem praktisch identisch mit der Glucose-Auswertung der vorangegangenen Aufgabe.

$\beta(\text{Gluc}) = 1,66 \text{ g/L}$

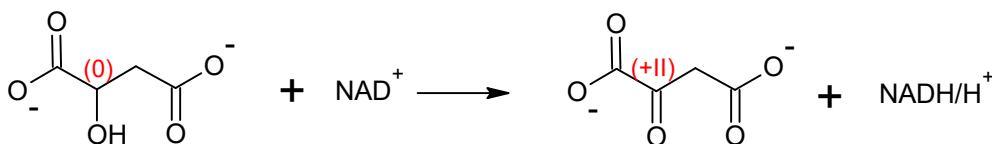
Bei der Auswertung der Saccharose muss bei der Probe nicht die Gesamtabsorbanz, sondern nur der Absorbanzanstieg im vgl. zum Glucose-Ansatz berücksichtigt werden: $\Delta A = 0,105$. \Rightarrow **$\beta(\text{Sac}) = 0,334 \text{ g/L}$** .

3.1.

3.1. a) Es handelt sich um eine Hydrolase, da ein Molekül unter dem Einfluss von Wasser gespalten wird.

3.1. b) Es handelt sich um eine Transferase, da eine Molekülgruppe (hier: Phosphat) von einem Molekül (hier: ATP) auf ein anderes Molekül (hier: D-Glucose) übertragen wird.

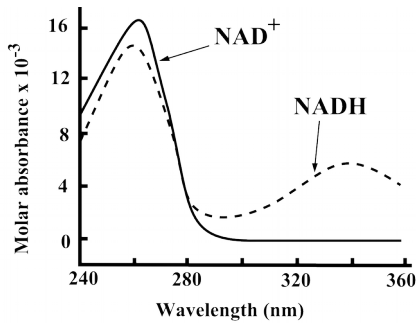
3.1.c)



Es handelt sich um eine Redoxreaktion, denn Oxalat wird oxidiert (das 2. C-Atom gibt zwei Elektronen ab). Als Elektronenempfänger dient das Cosubstrat NAD^+ , was zu NADPH/H^+ reduziert wird. Die Malatdehydrogenase ist damit eine Oxidoreduktase.

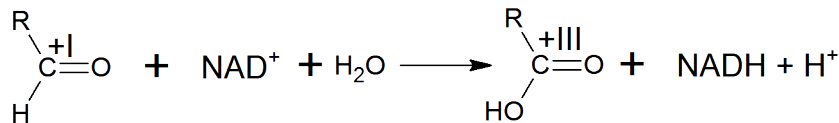
4.1

a) Es handelt sich um den optischen Test. Es wird fotometrisch die Umwandlung von NAD^+ zu NADH/H^+ verfolgt. Die Absorbanz bei ca. 340 nm nimmt im Verlauf der Reaktion zu, die Absorbanz bei ca. 260 nm ab. Diese Absorbanzänderungen sind ein Maß für den Gehalt an Äpfelsäure.



4.2

a) Schon allein durch die Information, dass das Substrat aufoxidiert wird, ist klar, dass NAD^+ benötigt wird, also die Form des Cosubstrats, die die bei der Oxidation frei werdenden Elektronen aufnehmen kann. NAD^+ ist das „Oxidationsäquivalent“.



Bitte folgendes Aufoxidationsschema einprägen:

Aufoxidation: prim. Alkohole \rightarrow Aldehyde \rightarrow Carbonsäuren \rightarrow xxx [ohne Molekülbruch nicht weiter möglich]

Aufoxidation: sek. Alkohole \rightarrow Ketone \rightarrow xxx [ohne Molekülbruch nicht weiter möglich]

Aufoxidation: tert. Alkohole \rightarrow xxx [ohne Molekülbruch nicht weiter möglich]

Bitte Einprägen: In den Reaktionsgleichungen von Reaktion die von Oxidoreduktasen katalysiert werden, taucht häufig H_2O auf.

b)

Die Absorbanzänderung von $A = 0$ auf $A = 0,875$ lässt sich in eine NADH/H^+ -Änderung zurückführen. Die dazugehörige Stoffmengenänderung lässt sich mit dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnen:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d \Rightarrow c = \frac{A}{\varepsilon \cdot d} = \frac{0,875}{6200 \frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \cdot 1 \text{ cm}} \approx 1,41129 \cdot 10^{-4} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \approx 141,1 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}} \quad \text{NAD}^+ \text{ bzw. } \text{NADH}/\text{H}^+$$

Wegen dem 1:1-Koeffizient in der Reaktionsgleichung entspricht die NAD^+ -Änderung bzw. NADH/H^+ -Änderung auch der Substratänderung. Änderung der Substratkonzentration in 1 Stunde: 141,1 μmol pro Liter. In den 200 mL des Ansatzes werden pro Stunde ein Fünftel davon, also 28,2 μmol umgesetzt. Pro Minute sind das 0,47 μmol . Die Enzymaktivität beträgt also

EA = 0,47 $\mu\text{mol} / \text{min}$ = 0,47 Units.

EA = $0,47 \cdot 10^{-6} \mu\text{mol} / 60 \text{ sek.} = 7,84 \cdot 10^{-9} \text{ mol/s} = 7,84 \cdot 10^{-9} \text{ katal} = 7,84 \text{ nanokatal}$

c)

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d \Rightarrow c = \frac{A}{\varepsilon \cdot d} = \frac{0,454}{6200 \frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \cdot 1 \text{ cm}} \approx 7,3226 \cdot 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$$

In 50 mL wurden also $3,66 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$ Acetaldehyd ($\text{CH}_3\text{-CHO}$, $M = 44,1 \text{ g/mol}$) umgesetzt. Das sind 0,16 Milligramm Ethanal.