

Besonders wichtige Begriffe: Enzymeinheit (unit), katal, spezifische Aktivität, chromogenes Substrat

1. Grundlegende Aufgaben

1.1 Die Alkoholdehydrogenase (ADH) katalysiert in Hefezellen die Umwandlung von Acetaldehyd (= Ethanal, C_2H_5O , $M = 44,1$ g/mol) in Ethanol. Die spezifische Aktivität eines hochreinen Präparats von Alkoholdehydrogenase beträgt $4,16 \mu\text{katal/mg}$.

- Rechnen Sie die spezifische Aktivität in die Einheit U/mg um
- Welche Masse des Enzympräparats muss in einem Versuch eingesetzt werden, um in einem Versuchsansatz $793,8$ mg Ethanal in 20 Minuten umzuwandeln?
- 7 mg des hochreinen Enzympräparats wirken unter optimalen Bedingungen für 10 Minuten auf eine Substratlösung ein. Welche Masse Ethanal wird in dieser Zeit dabei umgesetzt?

1.2 Invertase spaltet Saccharose hydrolytisch in Glucose ($C_6H_{12}O_6$) und Fructose ($C_6H_{12}O_6$). Ein Invertase-Präparat hat eine spezifische Aktivität von $EA_{\text{spez}} = 300$ U/mg. Es sollen daraus 50 mL mit einer spezifischen Aktivität von 2 kU/mL hergestellt werden.

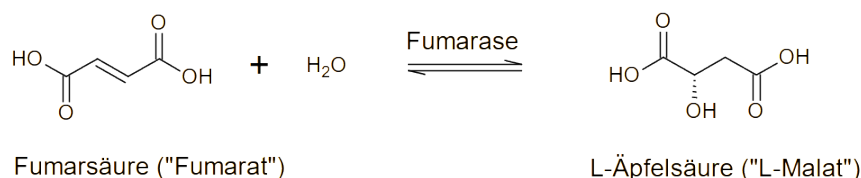
- Geben Sie die Reaktionsgleichung für die Spaltungsreaktion in Summenformeln an.
- Wie gehen Sie zur Herstellung der Ziellösung vor?
- Welche Masse Glucose können $500 \mu\text{L}$ der Ziellösung mit 2 kU/mL pro Stunde unter idealen Bedingungen maximal bilden?

1.3 Von einem Enzym soll die spezifische Aktivität bestimmt werden. Hierfür setzt man es mit dem *chromogenen Substrat* ABTS um. Das fotometrisch detektierte Produkt besitzt bei $\lambda_{\text{max}} = 420$ nm einen Absorptionskoeffizienten von $\epsilon_{\text{Produkt}} = 3,6 \cdot 10^4$ $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

- Erklären Sie den Ausdruck *chromogenes Substrat*.
- 40 mg des Enzyms wurden in 250 mL gelöst. $50 \mu\text{L}$ der Enzymlösung wurden in der 1cm -Küvette mit $1950 \mu\text{L}$ Substratlösung versetzt. Die Absorbanz nahm innerhalb von 100 Sekunden um $A = 0,825$ zu. Berechnen Sie die spezifische Aktivität des Enzyms in U/mg.

1.4 Eine hochreine Taq-DNA-Polymerase besitzt die spezifische Aktivität von 292000 Units/mg, die Molekülmasse beträgt 94 kDa. Wie viel Enzymmoleküle befinden sich in eine Enzymsatz, wenn er die Aktivität von 2 Enzyme Units besitzt? Hinweis: Bei der Taq-DNA-Polymerase ist das Unit als die Enzymportion definiert, die bei 74°C in 30 Minuten 10 nmol (nanomol) Nucleotide in die DNA einbaut. **Hinweis:** AVOGADRO-Konstante $N_A = 6,022 \cdot 10^{23}$ 1/mol

1.5 Das Enzym Fumarase katalysiert die Umwandlung von Fumarat zu L-Malat und umgekehrt:

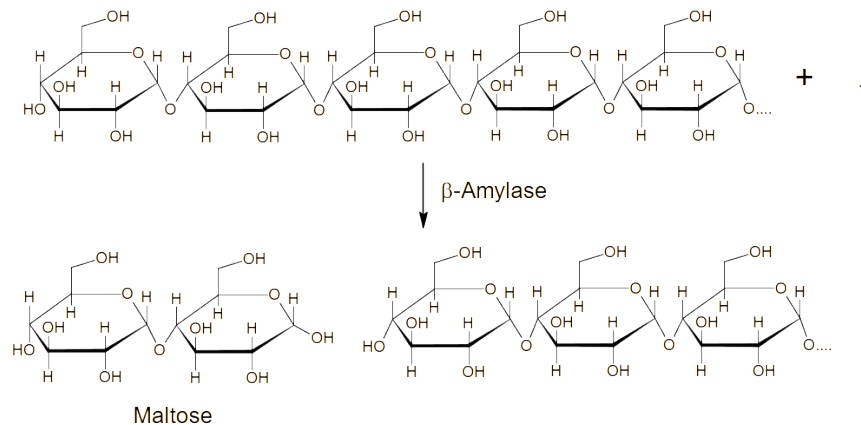


- Bei einer Enzym-Elektrophorese ergab sich ein ungefähres Molekulargewicht von 200 kg/mol (200 kDa). Berechnen Sie aus wie viel Aminosäuren das Protein ungefähr aufgebaut ist, wenn man als mittlere Molekülmasse einer Aminosäure ca. 430 g/mol annimmt.
- 12 mg eines Fumarase-Präparats setzten unter optimalen Bedingungen $515 \mu\text{g}$ Fumarsäure pro Minute zu L-Äpfelsäure um. Berechnen Sie die spezifische Aktivität in Mikrokatal pro Gramm ($\mu\text{kat/g}$) und in Units pro Milligramm (U/mg) um.

2. Gemischte Aufgaben

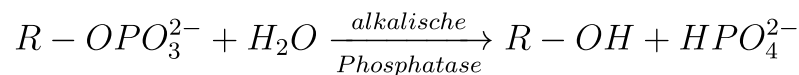
2.1 Ein großer, auch überregional bekannter Chemikalien- und Laborbedarf-Lieferant aus Karlsruhe bietet ein β -Amylase-Präparat mit 12 U/mg an. Wie bei manchen Enzymen üblich und notwendig wird hier die Enzymeinheit „Unit“ anders als die internationale Enzymeinheit definiert. So ist angegeben „1 Unit entspricht der Enzymmenge, die 1 μmol Maltose pro Minute bei 25°C und pH 4,8 freisetzt (nach Zulkowsky).“

β -Amylase (EC-Nummer 3.1.2) spaltet vom Kettenende der Amylose/Dextrine jeweils ein Maltosemolekül nach dem anderen ab:



- Erklären Sie, zu welcher Enzymklasse die β -Amylase gehört.
- Welche Masse Maltose ($M = 342,3 \text{ g/mol}$) können unter den gegebenen Bedingungen aus 30 Milligramm Enzympräparat in 30 Minuten bei 25°C und pH 4,8 und optimaler Substratsättigung entstehen?
- Warum kann bei Amylase nicht die übliche Definition der Enzymeinheit (μmol Substratumsatz pro Minute) benutzt werden bzw. ist ungeeignet?

2.2 Von vielen verschiedenen Substraten kann die **alkalische Phosphatase** eine Phosphat-Gruppe (PO_4^{3-} bzw. HPO_4^{2-}) abspalten. Allgemeine Reaktionsgleichung:



Alkalische Phosphatase ist ein wichtiges Enzym, dass auch in der Bioanalytik große Anwendung gefunden hat. So wird es z.B. bei vielen ELISA-Tests benutzt, da es durch Phosphatgruppenabspaltung aus pNPP (para-Nitrophenylphosphat) einen Farbstoff bilden kann, dessen Konzentration fotometrisch bestimmt werden kann. 1 Unit ist definiert als die Enzymmenge, die pro Minute 1 μmol pNPP spalten kann:



Wie groß ist die Aktivität (in Units) in einem Ansatz, wenn in 10 Minuten sich 15 mg Nitrophenol ($M = 139,1 \text{ g/mol}$) bilden?

2.3 Ein Alkoholdehydrogenase-Präparat aus Hefe besitzt unter optimalen Bedingungen die spezifische Aktivität von 250 U/mg. Mithilfe der ADH können die Hefezellen Ethanal ($M = 44,1 \text{ g/mol}$) in Ethanol umwandeln.

- Rechnen Sie die spezifische Aktivität in die Einheit $\mu\text{katal/g}$ um.
- Wie ist es möglich, dass ein anderes Präparat eine spez. Aktivität von deutlich unter 250 U/mg besitzt?
- 7 mg des hochreinen Enzympräparats wirken unter optimalen Bedingungen für 10 Minuten auf eine Substratlösung ein. Welche Masse Ethanal wird in dieser Zeit dabei umgesetzt?

Lösungen (ausführliche Lösungswege unter www.laborberufe.de)

1.1a 249,6 U/mg; **1.1b** 3,6 mg; **1.1c** 0,77 g **1.2** fehlt noch; **1.3b** 3,44 U·mg⁻¹; **1.4** 4,4·10¹⁰ Enzymmoleküle; **1.5a** 465 AS; **1.5b** 6,17 $\mu\text{kat/g}$ und 0,37 U/mg; ; **2.1a** Hydrolase; **2.1b** 3,70 g; **2.2** 10,8 U; **2.3a** 4167 $\mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1}$; **2.3c** 0,77 g Ethanal;

Lösungen ohne Gewähr

Wenn Sie einen Fehler entdecken, bitte ich um kurze Mail.

Immer auch die Aufgabenstellung/Nummerierung abgleichen. Manchmal ergen sich Änderungen.

1.1

a)

$$4,16 \frac{10^{-6} \text{ kat}}{\text{mg}} = 4,16 \frac{10^{-6} \text{ mol}}{\text{mg} \cdot \text{s}} = 4,16 \frac{10^{-6} 10^6 \mu\text{mol}}{\text{mg} \cdot \frac{1}{60} \text{ min}} = 249,6 \frac{\mu\text{mol}}{\text{mg} \cdot \text{min}} = 249,6 \frac{\text{U}}{\text{mg}}$$

b) Umrechnung in eine Stoffmenge: $793,8 \text{ mg Ethanal (C}_2\text{H}_4\text{O)} \hat{=} 0,018019 \text{ mol} \hat{=} 18019 \mu\text{mol}$

Dreisatz (Schlussrechnung): Berechnung der Stoffmenge, die pro Minute umgesetzt werden soll

$$\begin{array}{rcl} 18019 \mu\text{mol.} & \hat{=} & 20 \text{ Min.} \\ x & \hat{=} & 1 \text{ Min.} \end{array} \quad \left. \vphantom{\begin{array}{rcl} 18019 \mu\text{mol.} & \hat{=} & 20 \text{ Min.} \\ x & \hat{=} & 1 \text{ Min.} \end{array}} \right\} x \approx 901 \mu\text{mol}$$

Pro Minute sollen 901 μmol umgesetzt werden (901 Units)

Dreisatz (Schlussrechnung): Berechnung der erforderlichen Masse an Enzympräparat

$$\begin{array}{rcl} 249,6 \text{ Units} & \hat{=} & 1 \text{ mg Enzympräparat} \\ 901 \text{ Units} & \hat{=} & x \text{ mg Enzympräparat} \end{array} \quad \left. \vphantom{\begin{array}{rcl} 249,6 \text{ Units} & \hat{=} & 1 \text{ mg Enzympräparat} \\ 901 \text{ Units} & \hat{=} & x \text{ mg Enzympräparat} \end{array}} \right\} x \approx 3,6 \text{ mg Enzympräparat}$$

Es werden 3,6 mg Enzympräparat benötigt.

1.2

fehlt noch

1.3

a) „chromo-gen“ = „farb-bildend“es Substrat. D.h. Durch die enzymatische Reaktion wird aus dem Substrat ein Farbstoff gebildet.

b)

$$\bullet \quad A = \varepsilon \cdot d \cdot c \Rightarrow c = \frac{A}{\varepsilon \cdot d} = \frac{0,825}{3,6 \cdot 10^4 \frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \cdot 1 \text{ cm}} = 2,2917 \cdot 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L}} = 22,917 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}} \quad .$$

$$\bullet \quad \text{Da } V = 0,002 \text{ L: } n = c \cdot V = 22,917 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}} \cdot 0,002 \text{ L} = 0,045834 \mu\text{mol}$$

• Berechnung der Enzymaktivität in μmol pro min:

$$EA = \frac{0,045834 \mu\text{mol}}{100 \text{ s}} \cdot \frac{60 \text{ s}}{\text{min}} = 0,0275004 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} = 0,0275004 \text{ U}$$

$$\bullet \quad \text{Berücksichtigung, dass aliquotiert wurde: } f_A = \frac{250 \text{ mL}}{0,05 \text{ mL}} = 5000 \Rightarrow EA_{\text{gesamt}} = 5000 \cdot 0,0275004 \text{ U} \approx 137,502 \text{ U}$$

$$\bullet \quad \text{spezifische Aktivität: } EA_{\text{spez}} = \frac{137,502 \text{ U}}{40 \text{ mg}} = 3,44 \frac{\text{U}}{\text{mg}}$$

1.4

Dreisatz (Schlussrechnung): Berechnung der Enzymmasse mit der Aktivität von 2 Units

$$\begin{array}{rcl} 292000 \text{ Units} & \hat{=} & 1 \text{ mg Enzym} \\ 2 \text{ Units} & \hat{=} & x \text{ mg Enzym} \end{array} \quad \left. \vphantom{\begin{array}{rcl} 292000 \text{ Units} & \hat{=} & 1 \text{ mg Enzym} \\ 2 \text{ Units} & \hat{=} & x \text{ mg Enzym} \end{array}} \right\} x \approx 6,849 \cdot 10^{-6} \text{ mg}$$

Umrechnung in eine Stoffmenge:

$$n(\text{Enzym}) = \frac{m(\text{Enzym})}{M(\text{Enzym})} \approx \frac{6,849 \cdot 10^{-6} \cdot 10^{-3} \text{ g}}{94000 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} \approx 7,287 \cdot 10^{-14} \text{ mol}$$

Dreisatz (Schlussrechnung): Berechnung der Anzahl der Enzymmoleküle (mit AVOGADRO-Konstante)

$$\begin{array}{rcl} 6,022 \cdot 10^{23} & \hat{=} & 1 \text{ mol Enzym} \\ x & \hat{=} & 7,287 \cdot 10^{-14} \text{ mol Enzym} \end{array} \quad \left. \vphantom{\begin{array}{rcl} 6,022 \cdot 10^{23} & \hat{=} & 1 \text{ mol Enzym} \\ x & \hat{=} & 7,287 \cdot 10^{-14} \text{ mol Enzym} \end{array}} \right\} x \approx 4,4 \cdot 10^{10}$$

1.5

a)

$$N(AS) = \frac{M_{\text{gesamt}}}{M(AS)} = \frac{200000 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{430 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} \approx 465 \text{ AS}$$

b) Schritt 1: Da die Aktivität des Enzyms in der Einheit Mikromol pro Sekunde berechnet werden soll, wird zuerst die Stoffmenge Substrat in μmol berechnet. Hierfür wird die Molekülmasse von Fumarsäure benötigt, die man durch Zusammenzählen der einzelnen Atommassen errechnen kann. Aus der Strukturformel kann man die hierfür benötigte Summenformel ableiten: $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$

$$n(\text{Fumarsäure}) = \frac{m(\text{Fumarsäure})}{M(\text{Fumarsäure})} = \frac{515 \cdot 10^{-6} \text{ g}}{116 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = 4,43966 \cdot 10^{-6} \text{ mol} = 4,43966 \cdot 10^{-6} \cdot 10^6 \mu\text{mol} = 4,43966 \mu\text{mol}$$

Schritt 2: Die bei Schritt 1 berechnete Stoffmenge entspricht einer Reaktionszeit von 1 Minute (vgl. Aufgabenstellung). Da aber Mikrokatal einer Reaktionszeit von Mikromol pro Sekunde entspricht, wird berechnet, welche Stoffmenge in einer Sekunde umgesetzt wird.

$$A = \frac{n(\text{Fumarsäure})}{t} = \frac{4,43966 \mu\text{mol}}{60 \text{ s}} = 0,073994 \frac{\mu\text{mol}}{\text{s}} = 0,073994 \mu\text{kat}$$

Schritt 3: Zur Berechnung des spezifischen Aktivität wird die Aktivität durch die Masse an Enzympräparat geteilt. Man könnte alternativ auch die Aktivität pro Gramm Präparat auch mit Dreisatz/Schlussrechnung berechnen.

$$A_{\text{spez}} = \frac{A}{m(\text{Präparat})} = \frac{0,073994 \mu\text{kat}}{12 \cdot 10^{-3} \text{ g}} \approx 6,17 \frac{\mu\text{kat}}{\text{g}}$$

c)

$$6,17 \frac{\mu\text{kat}}{\text{g}} = 6,17 \frac{10^{-6} \text{ kat}}{10^3 \text{ mg}} = 6,17 \frac{10^{-6} \cdot 60 \cdot 10^6 \text{ U}}{10^3 \text{ mg}} \approx 0,37 \frac{\text{U}}{\text{mg}}$$

2.1

a) β -Amylase gehört zu den Hydrolasen, weil die Maltoseeinheit hydrolytisch abgespalten ist. Das erkennt man an der Reaktionsgleichung an der Spaltungsstelle: $\dots\text{C-O-C}\dots + \text{HOH} \rightarrow \dots\text{C-OH} + \text{HO-C}\dots$

b) Wenn 1 mg die Aktivität von 12 Units besitzt ($A_{\text{spez}} = 12 \text{ U/mg}$), dann besitzen 30 Milligramm die Aktivität von 360 Units. Pro Minute werden also 360 μmol Maltose gebildet. In 30 Minuten bilden sich damit 10800 μmol Maltose.

$$m(\text{Maltose}) = n(\text{Maltose}) \cdot M(\text{Maltose}) = 10800 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot 342,3 \text{ g/mol} \approx 3,70 \text{ g}.$$

c) Das Enzym spaltet kein genau definiertes Substratmolekül mit z.B. gegebener molarer Masse. Es kann sich beim Substrat z.B. um Amylose oder auch um Dextrine mit unterschiedlicher Länge handeln. Da kein exakt definiertes Substratmolekül angegeben werden kann, definiert man hier die Enzymeinheit zweckmäßiger mit der Stoffmenge an sich bildendem Produkt (und nicht Substrat). Eines der Produkte ist nämlich exakt definiert: Es bildet sich stets um Maltose. Man kann also bei diesem Enzym nicht von „ $\mu\text{mol Substratumsatz pro Minute}$ “ sprechen, weil das Substrat variabel ist.

2.2

15 mg Nitrophenol sind 107,84 μmol Nitrophenol. Zur Bildung dieser Stoffmenge müssen auch 107,84 μmol pNPP gespalten werden. Pro Minute spalten sich also 10,784 μmol pNPP. Die Aktivität beträgt somit $A = 10,784 \text{ U} \approx 10,8 \text{ U}$.

2.3

a)

$$250 \frac{\text{U}}{\text{mg}} = 250 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{mg}} = 250 \frac{\mu\text{mol}}{60\text{s} \cdot 10^{-3} \text{g}} = 4167 \frac{\mu\text{mol}}{\text{s} \cdot \text{g}} = 4167 \frac{\mu\text{kat}}{\text{g}}$$

b) Die spezifische Aktivität ist ein Maß für die Reinheit eines Enzyms. Beim anderen Präparat wurde z.B. einige Reinigungsschritte weggelassen, z.B. um die empfindlichen Enzymmoleküle zu schonen. Ein weiterer Erklärungsansatz ist, dass ein anderer Isotyp des Enzyms (Varianten eines Enzyms mit unterschiedlicher Primärstruktur) vorliegt, dessen natürliche Aktivität schwächer ist.

c)

Dreisatz (Schlussrechnung): Berechnung der Aktivität von 7 Milligramm Enzym

$$250 \text{ Units} \quad \hat{=} \quad 1 \text{ mg Enzym}$$

$$x \text{ Units} \quad \hat{=} \quad 7 \text{ mg Enzym} \quad \Rightarrow \quad x \approx 1750 \text{ Units}$$

$\Rightarrow$ Pro Minute werden also 1750 μmol Ethanal umgesetzt. $\Rightarrow$ In 10 Minuten werden somit 17500 μmol Ethanal ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$) umgesetzt. Das sind ca. 0,77 g Ethanal