



Reaktionskinetik

1 Versuchsinhalte

1.1 Versuchsziel

Die spontane und durch Imidazol oder Chymotrypsin katalysierte Hydrolyse von p-Nitrophenylestern (p-Nitrophenylacetat oder p-NPA) werden spektroskopisch im ultravioletten (**UV**) und sichtbaren (**Vis**) Bereich untersucht. Anhand der Messungen werden die dynamischen und thermodynamischen Grundlagen der Reaktionskinetik dargestellt und erarbeitet.

1.2 Lehrinhalt

Reaktionsgeschwindigkeit und **Umsatzgrad** einer Reaktion sind durch die **Reaktionskoordinate** und die Temperatur bestimmt. Ist die Reaktionsbarriere zwischen den Edukten und Produkten hoch, d.h. sind die Werte für die **Aktivierungsenergie** groß, so wird die **Reaktionsgeschwindigkeitskonstante** deutlich von der Temperatur abhängen und die Reaktionsgeschwindigkeit selbst gering sein. Das Ausmaß der Reaktion bzw. die Lage des Gleichgewichtes hängt dagegen von der thermodynamischen **Freien Reaktionsenthalpie** (IUPAC: **GIBBS-Energie**) ab (Energiedifferenz zwischen den Edukten und Produkten). Um Reaktionsprodukte schneller zu erhalten, kann daher die Temperatur erhöht oder mit einem **Katalysator** gearbeitet werden. Ein typisches Beispiel ist die Enzymkatalyse, bei der selektiv *neue* Reaktionswege eröffnet werden, die eine niedrigere Energiebarriere aufweisen.

Die Spontanhydrolyse von p-Nitrophenylacetat stellt eine basenkatalysierte Reaktion dar, die bei Wasserüberschuss nach einer Reaktion **pseudo-erster Ordnung** verläuft. Die Reaktion kann auch durch Imidazol katalysiert werden, eine Modellreaktion zur enzymatischen Esterspaltung. Auch die Serinprotease Chymotrypsin kann die Spaltung von p-NPA katalysieren. Bei der Auswertung dieser Reaktion lässt sich dann nach den Vorstellungen von MICHAELIS (1913; Leonor Michaelis: 16.1.1875 – 8.10.1949) und MENTEN mit dem Modell eines **Übergangskomplexes** arbeiten.

Alle Reaktionen können über **Absorptionsspektroskopie** im ultravioletten und sichtbaren Spektralbereich verfolgt werden. Aus den erhaltenen Extinktions-Zeit- bzw. Konzentrations-Zeit-Diagrammen lassen sich **Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten**, die **Aktivierungsenergie** der Reaktion und bei Beteiligung von Chymotrypsin charakteristische Größen wie **MICHAELIS-Konstante** und **maximale Reaktionsgeschwindigkeit** ermitteln. Außerdem kann kontrolliert werden, ob bei der Reaktion eine oder mehrere linear unabhängige Reaktionsschritte auftreten.

1.3 Stichworte zur Vorbereitung

Elementarreaktion, Molekularität, Reaktionsordnung, Reaktionsgeschwindigkeit, Reaktionslaufzahl bzw. Reaktionsvariable, Reaktionsgeschwindigkeitskonstante (*weitere auf der folgenden Seite!*)

BODENSTEIN-Hypothese, MICHAELIS-MENTEN-Gleichung, Diagramme nach LINEWEAVER und BURK, sowie nach EADIE und HOFSTEE, Auftragung nach GUGGENHEIM und SWINBOURNE.

Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit, ARRHENIUS-Gleichung, kinetisch und thermodynamisch kontrollierte Reaktion, Reaktionskoordinate, Stoßtheorie, Theorie des Übergangskomplexes, Theorie nach EYRING.

Grundlagen der UV/Vis-Absorptionsspektroskopie, wie sie in der Versuchsanleitung zur Bestimmung der pK-Werte beschrieben sind. Insbesondere der Zusammenhang zwischen Extinktion und Konzentration nach dem LAMBERT-BEERSchen Gesetz.

1.4 Literatur

- [1] P. W. Atkins: Physikalische Chemie, 2. Aufl., VCH, Weinheim 1996.
- [2] K. Laidler: Reaktionskinetik, Bd. I und II, Bibliographisches Institut, Mannheim 1973.
- [3] H. Mauser: Formale Kinetik, Bertelsmann Universitätsverlag, Düsseldorf 1974.
- [4] G. Gauglitz: GIT Fachz. Lab. 26, 205 (1982), 26, 597 (1982), 29, 186 (1985) (bei Frau Doeze einzu-sehen).
- [5] H. U. Bergmeier (Herausg.): Methods of Enzymatic Analysis, Vol. 1: Fundamentals, Vol. 2: Samples, Reagents and Assessments of Results, 3. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim 1983.
- [6] Bisswanger, H. Enzymkinetik, 2. Auflage, Wiley VCH, Weinheim 2002.

1.5 Mitzubringende Hilfsmittel

Zum Versuch sind ein Taschenrechner und Konzeptpapier mitzubringen.

2 Grundlagen

2.1 Grundlegende Begriffe der Kinetik

Die chemische Kinetik beschreibt die Geschwindigkeit einer chemischen Reaktion sowie alle Faktoren, von denen die Geschwindigkeiten abhängen (Konzentration, Temperatur, Druck). Die Geschwindigkeit einer Reaktion kann verschieden definiert werden. Bei allen Definitionen muss jedoch die Reaktionsgeschwindigkeit einen positiven Zahlenwert annehmen.

Um die Formeln in dieser Anleitung zu vereinfachen, wird folgende Schreibweise gewählt:

Großbuchstaben: A, B, C, ... Bezeichnung der Reaktanden

Kleinbuchstaben: a, b, c, ... deren Konzentrationen (statt c_A oder [A] usw.).

2.1.1 Reaktionsgeschwindigkeit v

Die Reaktionsgeschwindigkeit kann definiert werden über die

2.1.1.1 Zeitliche Änderung der Stoffmenge n_i

Bei der Betrachtung einer Reaktion (z. B. $A \rightarrow B$) lässt sich die Reaktionsgeschwindigkeit v als Stoffmengenänderung dn_i pro Zeiteinheit dt beschreiben, wobei der Index i für die Edukte oder die Produkte stehen kann:

$$v = - \frac{dn_A}{dt} = \frac{dn_B}{dt} . \quad \text{Gl. (2.1)}$$

2.1.1.2 Zeitliche Änderung der Stoffkonzentration c_i

Die Reaktionsgeschwindigkeit v kann auch über die Stoffkonzentration c_i definiert werden:

$$v = -\frac{da_A}{dt} = \frac{db_B}{dt} . \quad \text{Gl. (2.2)}$$

Der Zusammenhang ist in Abb. 1 dargestellt. Die Geschwindigkeit entspricht also je nach Definition der positiven oder der negativen Steigung des zeitlichen Verlaufs der Stoffkonzentration.

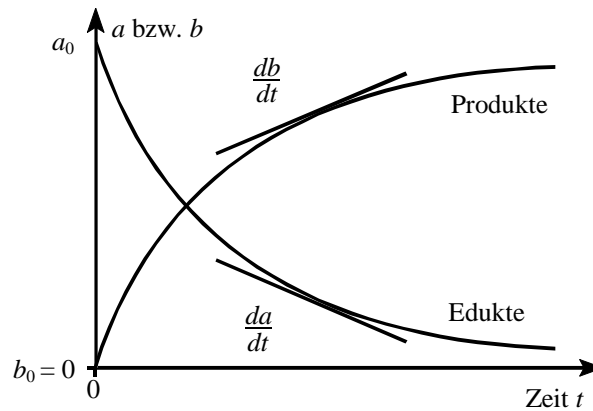


Abb. 1 Konzentrationsänderungen für die einfache Reaktion $A \rightarrow B$ als Funktion der Zeit, dargestellt für ein Edukt A bzw. ein Produkt B

2.1.1.3 Zeitliche Änderung der Reaktionslaufzahl ξ

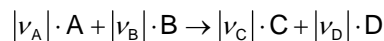
Bei dieser allgemeineren Formulierung der Reaktionsgeschwindigkeit wird die Stoffmengenänderung dn_i durch Berücksichtigung der stöchiometrischen Koeffizienten ν_i auf den Formelumsatz normiert:

$$d\xi = \frac{dn_i}{\nu_i} . \quad \text{Gl. (2.3)}$$

Die Reaktionsgeschwindigkeit v ist als Änderung der **Reaktionslaufzahl** $d\xi$ pro Zeiteinheit dt definiert:

$$v = \frac{d\xi}{dt} = \frac{dn_i}{\nu_i \cdot dt} . \quad \text{Gl. (2.4)}$$

Allgemein gilt somit für eine komplexe Reaktion des Typs



unter Benutzung von den Gl. (2.3) und (2.4) für die Reaktionsgeschwindigkeit

$$v = \frac{dx}{dt} = \frac{dn_A}{\nu_A \cdot dt} = \frac{dn_B}{\nu_B \cdot dt} = \frac{dn_C}{\nu_C \cdot dt} = \frac{dn_D}{\nu_D \cdot dt} . \quad \text{Gl. (2.5)}$$

Über die Stöchiometrie der betrachteten Reaktionsgleichung kann also direkt ein Ausdruck für die Reaktionsgeschwindigkeit formuliert werden.

2.1.1.4 Zeitliche Änderung der Reaktionsvariablen x

Läuft eine Reaktion bei konstantem Volumen V ab, so lässt sich, ausgehend von der Reaktionslaufzahl ξ , eine der Stoffkonzentration c analoge Größe definieren, die **Reaktionsvariable** x genannt wird:

$$dx = \frac{d\xi}{V} = \frac{dn_i}{\nu_i \cdot V} = \frac{dc_i}{\nu_i} . \quad \text{Gl. (2.6)}$$

Die Reaktionsgeschwindigkeit v lautet unter diesen Bedingungen

$$v = \frac{dx}{dt} = \frac{1}{V} \cdot \frac{d\xi}{dt} = \frac{1}{V} \cdot \frac{dn_i}{\nu_i \cdot dt} = \frac{dc_i}{\nu_i \cdot dt} . \quad \text{Gl. (2.7)}$$

und ergibt sich ebenfalls aus der Stöchiometrie der Reaktionsgleichung.

2.1.2 Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k und Reaktionsordnung

Die Reaktionsgeschwindigkeit v ist allgemein abhängig von den Konzentrationen c_i der an der Reaktion beteiligten Edukte i . Als Proportionalitätsfaktor wird die **Geschwindigkeitskonstante k** eingeführt:

$$v = \frac{dx}{dt} = k \cdot c_A^n \cdot c_B^m \cdot \dots \quad \text{Gl. (2.8)}$$

Die Exponenten n , m usw. geben die Reaktionsordnung in Bezug auf die Komponenten A, B usw. an. Die Summe dieser Exponenten stellt die **Reaktionsordnung** der gesamten Reaktion dar. Die Reaktionsordnung ist eine rein empirische Größe und stimmt manchmal nur zufällig mit der Stöchiometrie überein. Anhand der theoretisch formulierten Reaktionsgleichung lässt sich also nicht sicher die Reaktionsordnung vorhersagen. Umgekehrt lassen sich allerdings über die experimentell bestimmte Reaktionsordnung mehrere denkbare, allerdings nicht eindeutige Reaktionsmechanismen und –gleichungen formulieren. Bei Reaktionen nullter Ordnung ergibt sich aus Gl. (2.8), dass die Reaktionsgeschwindigkeit gleich der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten wird und damit eine zeit- und konzentrationsunabhängige Größe ist.

2.1.3 Reaktionsmolekularität

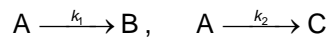
Die Reaktionen bestehen oft aus mehreren Einzelschritten, den **Elementarreaktionen**. Die Anzahl der Teilchen, die an einer Elementarreaktion unter Bildung eines **Übergangszustandes (aktivierter Komplex)** teilnehmen, wird als **Reaktionsmolekularität** bezeichnet. Es wird in diesem Zusammenhang von **mono-** oder **bimolekularen** Elementarreaktionen gesprochen.

Die Reaktionsordnung und die Reaktionsmolekularität dürfen nicht verwechselt werden. Aus der Reaktionsordnung kann *nicht* unbedingt auf die Reaktionsmolekularität geschlossen werden.

2.1.4 Linear unabhängiger Teilschritt

Hängen die zeitlichen Änderungen der Konzentrationen linear voneinander ab, so lassen sich alle diese „Elementarreaktionen“ zu einem einzigen *linear unabhängigen Teilschritt* zusammenfassen. So bilden z.B. bei einer Parallelreaktion, die vom selben Edukt ausgeht und deren Teilschritte gleiche Reaktionsordnung haben, beide Schritte zusammen eine *linear unabhängige Teilreaktion* (einen *linear unabhängigen Teilschritt*).

Für



ist

$$\frac{da}{dt} = -k_1 \cdot a \quad ; \quad \frac{da}{dt} = -k_2 \cdot a \quad . \quad \text{Gl. (2.9a und b)}$$

Somit wird

$$\frac{da}{dt} = -(k_1 + k_2) \cdot a \quad . \quad \text{Gl. (2.10)}$$

2.2 Zeitgesetze und ihre graphische Auswertung in Konzentrations-Zeit-Kurven

2.2.1 Reaktionen erster und pseudo-erster Ordnung

Für die Reaktion $A \xrightarrow{k_1} B$ gilt Gl. (2.9a). In dieser Differentialgleichung hat die Geschwindigkeitskonstante k_1 die Dimension s^{-1} . Ist die Reaktion zweiter Ordnung, wie für $A + B \xrightarrow{k_1} C$, so gilt

$$\frac{da}{dt} = -k_1 \cdot a \cdot b \quad , \quad \text{Gl. (2.11)}$$

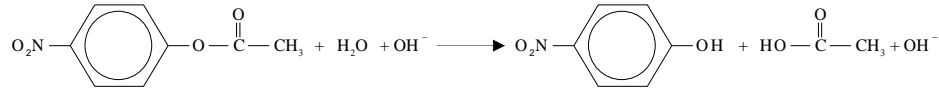
wobei k_1 die Dimension $l \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$ aufweist. Liegt z.B. die Komponente B in großem Überschuss vor und bleibt damit ihre Konzentration während der gesamten Reaktion praktisch konstant, so ergibt sich mit

$$\frac{da}{dt} = -k' \cdot a \quad \text{Gl. (2.12)}$$

eine Reaktion **pseudo-erster Ordnung**, deren Reaktionsgeschwindigkeitskonstante die Konzentration von B zu Reaktionsbeginn enthält: $k' = k_1 \cdot b$.

2.2.1.1 Spontanhydrolyse als Reaktion pseudo-erster Ordnung

Die Hydrolyse des Esters der Nitrophenylelessigsäure (p-NPA) läuft nach



ab, wobei die Konzentrationen von OH^- als Katalysator und von H_2O (in großem Überschuss eingesetzt) als konstant angesehen werden. Dadurch reduziert sich die Reaktionsordnung auf die einer Reaktion pseudo-erster Ordnung.

2.2.2 Auswertung der Konzentrations-Zeit-Kurven

2.2.2.1 Kurvenanpassung der Exponentialfunktion

Integration von Gl. (2.9a) zwischen den Grenzen $t = 0$ bis t ergibt

$$a(t) = a(0) \cdot e^{-k_1 t} \quad \text{Gl. (2.13)}$$

als exponentiellen Zusammenhang. An die Konzentrations-Zeit-Werte kann mit Computer-Programmen eine Kurve angepasst werden (Methoden nach GAUß-NEWTON oder MARQUARDT). Aus dieser Kurvenanpassung lässt sich die Größe k_1 gewinnen.

2.2.2.2 Linearisierung durch Logarithmieren

Gl. (2.13) kann logarithmiert werden und führt zu

$$\ln a(t) - \ln a(0) = -k_1 \cdot t \quad \text{Gl. (2.14)}$$

Eine entsprechende graphische Darstellung ist in Abb. 2 wiedergegeben. Aus der Steigung kann die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k_1 berechnet bzw. abgelesen werden.

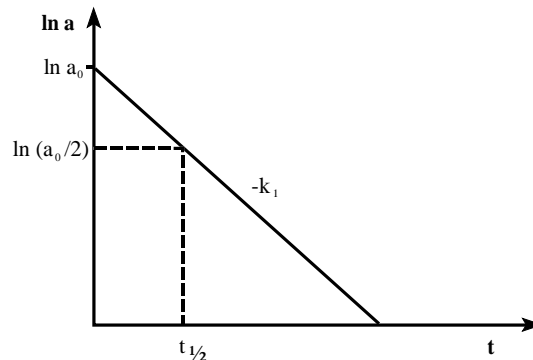


Abb. 2 Logarithmische Darstellung des Konzentrationsverlaufes

2.2.2.3 Linearisierung nach SWINBOURNE

Wird die Reaktionsgeschwindigkeit UV/Vis-spektroskopisch verfolgt, so ergibt sich die Gesamttextinktion $E(t)$ einer Reaktion $A \rightarrow B$ nach dem LAMBERT-BEERSchen Gesetz (1857; August Beer: 31.7.1825-11.1863) als

$$E(t) = d \cdot [\varepsilon_A \cdot a(t) + \varepsilon_B \cdot b(t)] \quad \text{Gl. (2.15)}$$

bzw.
$$E(t) = d \cdot [(\varepsilon_B - \varepsilon_A) \cdot b(t) + \varepsilon_A \cdot a(0)] \quad \text{Gl. (2.16)}$$

Bei Reaktionsbeginn berechnet sich die Extinktion $E(0)$ als
$$E(0) = d \cdot \varepsilon_A \cdot a(0),$$

am Ende der vollständigen Reaktion ist die Extinktion $E(\infty)$ gleich $E(\infty) = d \cdot \varepsilon_B \cdot a(0)$.

Bei einer Schichtdicke von $d = 1$ cm (übliche Küvetteninnenabmessung) gilt während des Reaktionsverlaufes

$$E(t) - E(0) = (\varepsilon_B - \varepsilon_A) \cdot b(t) \quad \text{Gl. (2.17)}$$

bzw. $E(\infty) - E(0) = (\varepsilon_B - \varepsilon_A) \cdot a(0)$. Gl. (2.18)

Da die Extinktion bei Reaktionsbeginn schwer bestimmbar ist, wird $E(0)$ eliminiert:

$$E(t) - E(\infty) = (\varepsilon_B - \varepsilon_A) \cdot [b(t) - a(0)] \quad \text{Gl. (2.19)}$$

Daraus folgt mit $\frac{db}{dt} = k \cdot [a(0) - b(t)]$: Gl. (2.20)

$$E(t) - E(\infty) = -\frac{1}{k} \cdot \frac{db}{dt} \cdot (\varepsilon_B - \varepsilon_A) \quad \text{Gl. (2.21)}$$

Um die Gleichungen zu vereinfachen, wird im weiteren von einer Schichtdicke $d = 1$ cm (also $d = 1$) ausgegangen. Durch Differenzieren von Gl. (2.16) folgt

$$\frac{E(t)}{dt} = \frac{db}{dt} \cdot (\varepsilon_B - \varepsilon_A) \quad \text{Gl. (2.22)}$$

und damit aus Gl. (2.21) $\frac{E(t)}{dt} = -k \cdot [E(t) - E(\infty)]$. Gl. (2.23)

Durch Integration dieser Differentialgleichung

$$\int_{E(0)}^{E(t)} \frac{dE(t)}{E(t) - E(\infty)} = -k \cdot \int_{t=0}^t dt \quad \text{Gl. (2.24)}$$

ergibt sich $\ln \left(\frac{E(t) - E(\infty)}{E(0) - E(\infty)} \right) = -k \cdot t$ Gl. (2.25)

bzw. $\ln[E(t) - E(\infty)] = \ln[E(0) - E(\infty)] - k \cdot t$ Gl. (2.26)

oder $\ln[E(\infty) - E(t)] = \ln[E(\infty) - E(0)] - k \cdot t$. Gl. (2.27)

Für die Auswertung nach SWINBOURNE wird Gl. (2.25) für die Zeiten t und $(t + \Delta)$ entlogarithmiert, wobei Δ ungefähr der **Halbwertszeit** (s. Kap. 2.2.3) entspricht:

$$E(t) - E(\infty) = [E(0) - E(\infty)] \cdot e^{-kt} \quad \text{Gl. (2.28)}$$

$$E(t + \Delta) - E(\infty) = [E(0) - E(\infty)] \cdot e^{-k(t+\Delta)} \quad \text{Gl. (2.29)}$$

Aus diesen Gleichungen lässt sich $E(0) - E(\infty)$ eliminieren:

$$\frac{E(t) - E(\infty)}{E(t + \Delta) - E(\infty)} = \frac{e^{-kt}}{e^{-k(t+\Delta)}} = e^{+k\Delta} \quad \text{Gl. (2.30)}$$

bzw. $E(t) = E(t + \Delta) \cdot e^{k\Delta} + E(\infty) \cdot (1 - e^{k\Delta})$. Gl. (2.31)

Wird $E(t)$ gegen $E(t + \Delta)$ aufgetragen, so ergibt sich die Geschwindigkeitskonstante k aus der Steigung.

2.2.2.4 Linearisierung nach GUGGENHEIM

Aus Gln. (2.28,(2.29)) lässt sich $E(\infty)$ eliminieren:

$$E(t+\Delta) - E(t) = [E(0) - E(\infty)] \cdot (e^{-k(t+\Delta)t} - e^{-kt}) = [E(0) - E(\infty)] \cdot (e^{-k\Delta} - 1) \cdot e^{-kt} \quad \text{Gl. (2.32)}$$

Logarithmieren führt zu einer Linearisierung dieser Gleichung:

$$\ln[E(t+\Delta) - E(t)] = -k \cdot t + \ln([E(0) - E(\infty)] \cdot [e^{-k\Delta} - 1]) \quad \text{Gl. (2.33)}$$

Wird $\ln[E(t+\Delta) - E(t)]$ gegen die Zeit aufgetragen, ergibt sich eine Gerade mit der Steigung $-k$.

2.2.2.5 Prinzip der Formalen Integration

Bei den bisher beschriebenen Verfahrenen ist immer die Lösung der Differentialgleichung notwendig. Dies führt schon bei einer Folgereaktion $A \xrightarrow{k_1} B \xrightarrow{k_2} C$ wegen der resultierenden inhomogenen DGL für die zeitliche Abhängigkeit von B zu Problemen.

Durch die Möglichkeiten moderner Computer wird häufig dieser Weg vermieden und die ursprüngliche DGL **numerisch integriert**, ein Verfahren, das nach H. Mauser (Literatur [3]) auch **formale Integration** genannt wird. Dies bedeutet, dass im einfachsten Fall Gl. (2.12) als

$$\int_{a=a(0)}^{a=a(t)} da = -k' \cdot \int_{t=0}^t a(t) \cdot dt \quad \text{Gl. (2.34)}$$

geschrieben wird. Nun muss nur noch das Integral auf der rechten Seite der Gleichung numerisch ermittelt und gegen verschiedene Zeitpunkte aufgetragen werden. Gerade bei thermischen Reaktionen ist es günstig, die Konzentrationswerte zum Zeitpunkt $t = 0$ für die Auswertung nicht benützen zu müssen.

Bei der numerischen Integration wird die Fläche unter einer Kurve durch eine endliche Anzahl von Trapezen angenähert. Die Breite der Trapeze muss zu diesem Zweck nicht konstant sein, wie Abb. 3 zeigt:

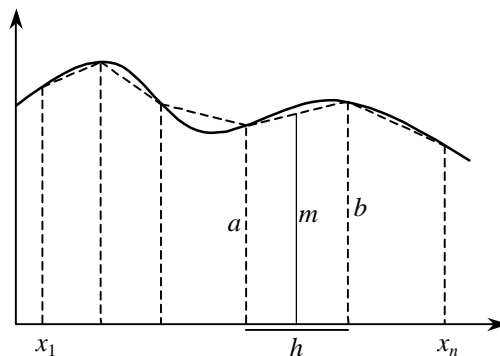


Abb. 3 Trapezregel für numerische Integration

Die Fläche eines Trapezes ergibt sich aus dem Produkt aus Mittellinie und Höhe:

$$A = m \cdot h = \frac{1}{2}(a + b)h$$

oder mit $a = y_i$, $b = y_{i+1}$ und $h = x_{i+1} - x_i$:

$$A_i = \frac{1}{2}(y_i + y_{i+1})(x_{i+1} - x_i).$$

Summenbildung führt schließlich zu:

$$A_{\text{ges}} = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{1}{2} (y_i + y_{i+1}) (x_{i+1} - x_i) \approx \int_{x_1}^{x_n} f(x) dx . \quad \text{Gl. (2.35)}$$

2.2.3 Halbwertszeiten

Die Halbwertszeit gibt die Zeitspanne an, nach der die Ausgangskonzentration zur Hälfte abreagiert hat, d.h. $a(t_{1/2}) = \frac{1}{2}a(0)$. Für eine Reaktion erster Ordnung ergibt sich nach Gl. (2.14) die Halbwertszeit $t_{1/2}$ zu

$$\ln \frac{a(0)}{2} = \ln a(0) - k_1 \cdot t_{1/2} \quad \text{Gl. (2.36)}$$

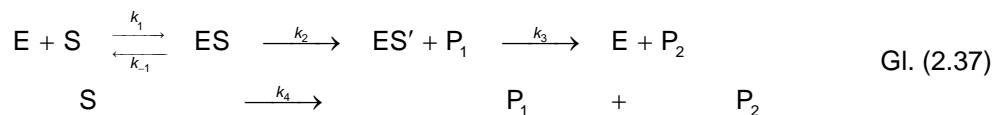
$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_1} = \frac{0.693}{k_1} .$$

2.3 Enzymkatalyse

Die Enzymkatalyse nimmt eine Zwischenstellung zwischen homogener und heterogener Katalyse ein, da Enzyme einen Durchmesser von ca. 10 - 100 nm (Wasser: ca. 0.3 nm) besitzen. Das Phänomen der Substratsättigung (s.u.) tritt bei der enzymatischen wie bei der heterogenen Katalyse auf. Alle aktiven Zentren sind besetzt: die Katalysator-„Konzentration“ limitiert den Prozess. Dagegen ist dieser Effekt bei der homogenen Katalyse nicht zu beobachten.

2.3.1 Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeit einer enzymkatalysierten Reaktion nach MICHAELIS-MENTEN

Die Enzym-Substrat-Wechselwirkung kann allgemein nach dem Schema



unter Einbeziehung eines MICHAELIS-MENTEN-Komplexes beschrieben werden. In einem vorgelagerten Gleichgewicht entsteht ein **Enzym-Substrat-Komplex** [ES], der im *geschwindigkeitsbestimmenden* Schritt (d.h. beim langsamsten Schritt der Gesamtreaktion) weiter zum Endprodukt (bzw. zu mehreren Produkten) unter Freisetzung des Enzyms reagiert. Dabei wird die Rückreaktion vom Produkt aus als vernachlässigbar angenommen. Diese Bedingung ist zu Reaktions*beginn* gut erfüllt.

Die Konzentration e an freiem, ungebundenem Enzym ist also gleich der Ausgangskonzentration $e(0)$ des Enzyms abzüglich der Konzentration des im Komplex gebundenen Enzyms es :

$$e = e(0) - es . \quad \text{Gl. (2.38)}$$

Für die zeitliche Konzentrationsänderung des Komplexes ergibt sich unter Berücksichtigung von Gl. (2.38)

$$\frac{des}{dt} = k_1 \cdot s \cdot (e(0) - es) - k_{-1} \cdot es - k_2 \cdot es . \quad \text{Gl. (2.39)}$$

Kurz nach Beginn der Reaktion stellt sich ein quasi-stationärer Zustand ein, bei dem die Konzentration des Komplexes einen niedrigen, weitgehend konstanten Wert annimmt (**BODENSTEIN-HYPOTHESE**) (Max E. A. Bodenstein: 15.7.1871 – 3.9.1942):

$$\frac{des}{dt} = 0 . \quad \text{Gl. (2.40)}$$

Aus Gl. (2.39) und (2.40) folgt

$$es = \frac{k_1 \cdot e(0) \cdot s}{k_1 \cdot s + k_{-1} + k_2} = \frac{e(0) \cdot s}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + s} . \quad \text{Gl. (2.41)}$$

Der Ausdruck im Nenner wird zur sog. **MICHAELIS-KONSTANTE** K_M zusammengefasst:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} . \quad \text{Gl. (2.42)}$$

Solange noch keine Rückreaktion auftritt (also zu Reaktionsbeginn) gilt:

$$\frac{dp}{dt} = k_2 \cdot es . \quad \text{Gl. (2.43)}$$

Nach Gl. (2.7) entspricht dp/dt der Reaktionsgeschwindigkeit v_0 zu Reaktionsbeginn. Somit ergibt sich aus Gl. (2.43) und Gl. (2.41)

$$v_0 = k_2 \cdot \frac{e(0) \cdot s}{K_M + s} . \quad \text{Gl. (2.44)}$$

Diese Anfangsgeschwindigkeit wird maximal, wenn K_M klein gegenüber der Substratkonzentration ist:

$$v_{0,\max} = k_2 \cdot e(0) . \quad \text{Gl. (2.45)}$$

Mit diesen Größen lässt sich die so genannte **MICHAELIS-MENTEN-GLEICHUNG** aufstellen:

$$v_0 = \frac{v_{0,\max} \cdot s}{K_M + s} = \frac{v_{0,\max}}{\frac{K_M}{s} + 1} . \quad \text{Gl. (2.46)}$$

Der Verlauf der Reaktionsgeschwindigkeit v_0 einer enzymkatalysierten Reaktion für verschiedene Substratkonzentrationen ist in Abb. 4 dargestellt.

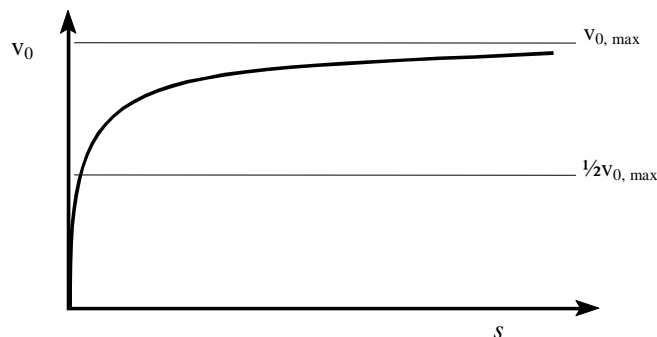


Abb. 4 Beschreibung der Enzymkinetik: Verlauf der Anfangsgeschwindigkeit v_0 als Funktion der Substratkonzentration s . Zudem lässt sich die MICHAELIS-KONSTANTE über den Wert von $v_{0,\max}$ bestimmen, wie es weiter unten erklärt wird.

Anhand von Gl. (2.46) lassen sich zwei Grenzfälle für die Anfangsgeschwindigkeit unterscheiden:

- **Sättigung mit Substrat**

Für $s \gg K_M$ kann K_M im Nenner gegenüber der Substratkonzentration s in Gl. (2.46) vernachlässigt werden; s lässt sich damit herauskürzen und führt zu

$$v_0 = k_2 \cdot e(0) = v_{0,\max} . \quad \text{Gl. (2.47)}$$

Die Anfangsgeschwindigkeit v_0 nähert sich also der maximalen Anfangsgeschwindigkeit. Die Reaktion läuft damit als Reaktion nullter Ordnung bezüglich der Substratkonzentration s ab, d.h. die Anfangsgeschwindigkeit ist gänzlich unabhängig von der Substratkonzentration.

- *Proportionalität zur Substratkonzentration*

Für $s \ll K_M$ kann s gegenüber K_M im Nenner vernachlässigt werden; es ergibt sich nach Gl. (2.46)

$$v_0 = \frac{v_{0,\max}}{K_M} \cdot s \quad \text{Gl. (2.48)}$$

Die Anfangsgeschwindigkeit v_0 ist proportional zur Substratkonzentration s . Die Reaktion läuft erster Ordnung ab, wie in Gl. (2.37) mit k_4 gezeigt.

2.3.1.1 Bestimmung von K_M und $v_{0,\max}$

Um aus Gl. (2.46) die MICHAELIS-Konstante K_M und die maximale Anfangsgeschwindigkeit $v_{0,\max}$ ermitteln zu können, wird die MICHAELIS-MENTEN-Gleichung linearisiert, d.h. in eine Gleichung der Form $y = ax + b$ (mit a : Steigung der Geraden und b : y -Achsenabschnitt) überführt. In der Biochemie sind u.a. die zwei folgenden Methoden von Interesse:

2.3.1.1.1 Methode nach Lineweaver-Burk

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{v_{0,\max}} \cdot \frac{1}{s} + \frac{1}{v_{0,\max}} \quad \text{Gl. (2.49)}$$

In Abb. 5 ist jeweils der Kehrwert der Anfangsgeschwindigkeit v_0 gegen den Kehrwert der zugehörigen Substratkonzentration s aufgetragen. Aus dem Ordinatenabschnitt ergibt sich die maximale Anfangsgeschwindigkeit, aus der Steigung die MICHAELIS-Konstante K_M .

2.3.1.1.2 Methode nach EADIE-HOFSTEE

In diesem Fall wird Gl. (2.46) in

$$v_0 = -K_M \cdot \frac{v_0}{s} + v_{0,\max} \quad \text{Gl. (2.50)}$$

umgeformt. In Abb. 6 ist die Anfangsgeschwindigkeit v_0 gegen den Quotienten aus v_0/s aufgetragen. Für verschiedene Substratkonzentrationen ergibt sich eine Gerade, aus deren Steigung die MICHAELIS-Konstante und aus deren Ordinate die maximale Anfangsgeschwindigkeit $v_{0,\max}$ ermittelt werden kann.

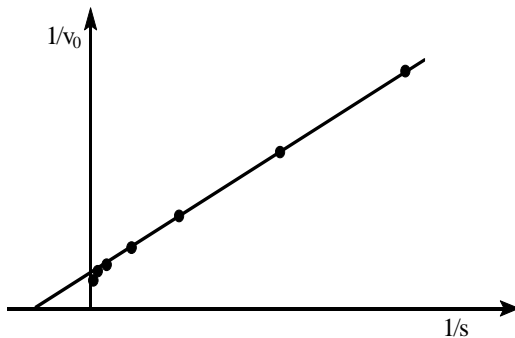


Abb. 5

Linearisierung der MICHAELIS-MENTEN-Gleichung nach LINEWEAVER-BURK

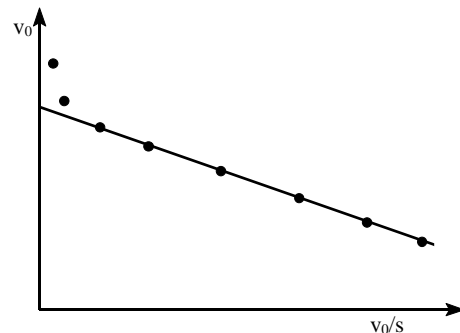


Abb. 6

Linearisierung der MICHAELIS-MENTEN-Gleichung nach EADIE-HOFSTEE

2.3.1.1.3 Direkte Bestimmung aus der MICHAELIS-MENTEN-Auftragung

In Gl. (2.46) lässt sich zeigen, dass die MICHAELIS-Konstante K_M genau dann gleich der Substratkonzentration wird, wenn die Anfangsgeschwindigkeit die halbe maximale Anfangsgeschwindigkeit beträgt. Wird wie in Abb. 6 die Anfangsgeschwindigkeit gegen die Substratkonzentration aufgetragen, so nähert sie sich für hohe Substratkonzentrationen der maximalen Anfangsgeschwindigkeit asymptotisch. Die MICHAELIS-Konstante lässt sich aus dem Schnittpunkt zwischen der halben Maximalgeschwindigkeit und dem

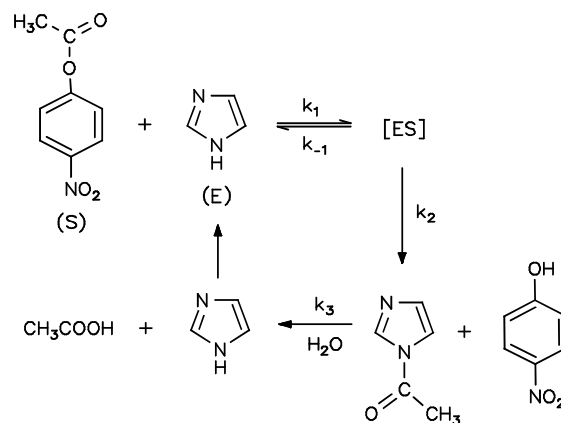
Kurvenverlauf auf der Abszisse ablesen.

2.3.1.2 Die Serinprotease Chymotrypsin

Obwohl für Chymotrypsin als natürliche Substrate nur Proteine in Frage kommen, kann das Enzym auch die der Peptidbindung sehr ähnliche Esterbindung spalten, befindet sich - wie im Falle von *p*-NPA - ein hydrophober Rest in Nachbarschaft zu der Esterbindung. *p*-NPA spielte aus diesem Grund als künstliches Substrat bei der Aufklärung des Reaktionsmechanismus der Serinproteasen eine große Rolle. Der Reaktionsablauf beinhaltet die vorübergehende, kovalente Acetylierung des Enzyms am katalytisch aktiven Serinrest; dieser Zustand kann bei geeignetem pH (etwa 4) festgehalten werden, bei alkalischem pH wird die Acetylgruppe jedoch wieder hydrolytisch vom Enzym abgespalten und das Enzym so regeneriert. Der Acetylierungsschritt verläuft schnell, der Desacetylierungsschritt ist geschwindigkeitsbestimmend; die Michaelis-Menten-Gleichung beschreibt diesen als Ping-Pong-Mechanismus bezeichneten, kinetisch komplizierten Reaktionsmechanismus nur unter bestimmten Randbedingungen zutreffend: Die Anfangsgeschwindigkeiten werden unter Vernachlässigung der Rückreaktion bestimmt, darüber hinaus darf Wasser als zweites Substrat des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts nicht als limitierender Faktor für den Ablauf der Reaktion vorliegen.

2.3.2 Enzymkatalyse am Beispiel der imidazolkatalysierten Hydrolyse von *p*-NPA

Die imidazolkatalysierte Hydrolyse von *p*-Nitrophenylacetat (*p*-NPA) ist eine organisch-chemische Modellreaktion für eine enzymatische Esterspaltung. Der Gesamtmechanismus kann durch folgendes Schema wiedergegeben werden:



Allerdings läuft parallel immer noch die Spontanhydrolyse ab. Daher ist die Reaktion für eine Auswertung im Praktikum nur bedingt geeignet.

Nach **Arrhenius** gilt für die Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k

$$k = A \cdot e^{-\frac{E_A}{RT}}$$

bzw. in logarithmischer Form

$$\ln k = -\frac{E_A}{R} \cdot \frac{1}{T} + a,$$

$$\lg k = -\frac{E_A}{2.303R} \cdot \frac{1}{T} + a'. \quad \text{Gl. (2.51)}$$

Trägt man $\lg k$ gegen $1/T$ auf, so kann man aus dem Anstieg der Geraden die Aktivierungsenergie ermitteln:

$$\tan \alpha = -\frac{\Delta \lg k}{\Delta \frac{1}{T}} = -\frac{E_A}{2.303R},$$

$$E_A = 2.303R \frac{\Delta \lg k}{\Delta \frac{1}{T}}.$$

Während **Arrhenius** über thermodynamische Überlegungen zu dieser Beziehung kam, hat **Lewis** die Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten über die Stoßtheorie abgeleitet.

Andererseits lässt sich die Geschwindigkeitskonstante aus spektroskopischen Daten über die thermodynamische Gleichgewichtskonstante aus den Zustandssummen der beteiligten Moleküle aus den Gleichungen der Statistischen Thermodynamik berechnen. Zwar sind diese Berechnungen bei dem vorliegenden Reaktionssystem sicher nicht einfach durchzuführen, für kleine Moleküle jedoch lässt sich nach der Theorie des Übergangszustandes von **Eyring** mit einer freien Aktivierungsenthalpie ΔG^\ddagger , die mit der Gleichgewichtskonstanten K^\ddagger und der entsprechenden Aktivierungsenergie zusammenhängt, nach

$$k = \frac{k_B T}{h} K^\ddagger$$

ein Zusammenhang zwischen den statistischen Größen und der gewünschten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten finden (Einzelheiten in den Literaturzitat).

Für die weiteren Rechnungen benutzt man folgende Beziehungen:

Aktivierungsenthalpie: $\Delta H^\ddagger = E_A - RT,$

freie Aktivierungsenthalpie: $\Delta G^\ddagger = -RT \ln K^\ddagger = -2.303RT \lg K^\ddagger,$

$$K^\ddagger = \frac{k h}{k_B T},$$

Plancksche Konstante: $h = 6.626 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s},$

Boltzmann-Konstante: $k_B = 1.38 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}.$

Mit $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$

folgt für die Aktivierungsentropie: $\Delta S^\ddagger = \frac{\Delta H^\ddagger - \Delta G^\ddagger}{T}.$

3 Geräte und Chemikalien

3.1 Geräte und Chemikalien

3.1.1 Lösungen

Folgende Stoffe/Lösungen werden vom Betreuer ausgegeben:

- 4-Nitrophenylacetat (p-NPA, Stammlösung mit 20 mM):
Für die Enzymkinetik muss eine Verdünnungsreihe (siehe Tabelle) hergestellt werden!
- Chymotrypsin (gefrorenes Lyophilisat, Masse auf Aufbewahrungsgefäß angegeben):
Lösung mit 10 mg/ml herstellen, auf Eis aufbewahren!
- SÖRENSEN-Phosphatpuffer pH 7 (aus Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4)
- Imidazol-Puffer (Na-Phosphat-Puffer mit 20 mM Imidazol)

Herstellung der 4-Nitrophenylacetat-Stammlösung

Stammlösung				
20	mM	Stammlösung		
1.5	mL	Volumen Ethanol		
5.43	mg	Einwaage p-NPA	(M: 181.15 g /mol)	

p-Nitrophenylacetat -Verdünnungsreihe (aus Stammlösung, mit Ethanol verdünnen)				
20	mM	Stammlösung	Stammlösung	Ethanol
10	mM	1:2	200 µL	200 µL
5	mM	1:4	50 µL	150 µL
2	mM	1:10	20 µL	180 µL
1	mM	1:20	10 µL	190 µL
0.5	mM	1:40	10 µL	390 µL
0.2	mM	1:100	10 µL	990 µL

3.1.2 Küvetten

Die verwendeten 3 ml Zweisichtküvetten dürfen **nur an den matten Seiten angefasst** werden. Küvetten sind teuer und dürfen nicht direkt auf Steinfliesen oder Kacheln abgestellt werden (Gefahr des Zerkratzen und Zersplitters beim Umfallen); legen Sie daher bitte **immer Papier unter die Küvette**. Vor dem Einsetzen ins Spektrometer sind die Fenster der Küvette mit Papier sauber und trocken zu wischen.

3.1.3 Pipetten

Die EPPENDORF-Pipette (0.5 - 10µl) wird verstellt, indem der Druckknopf zunächst **herausgezogen** und **erst dann** daran gedreht wird.

Nach dem Einstellen der gewünschten Menge wird diese durch Drücken des Knopfes fixiert. Zur Handhabung müssen drei Druckpunkte beachtet werden:

1. Ansaugen der Flüssigkeitsmenge
2. Vollständige Entleerung der Flüssigkeitsmenge
3. Entfernen der Pipettenspitze

Bei der GILSON-Pipette erfolgt die Volumeneinstellung über ein Drehrad im Griff. Sie besitzt zwei Druckknöpfe, einen zum Befüllen und Entleeren mit insgesamt zwei Druckpunkten und einen zum Entfernen der Pipettenspitze.

3.1.4 Spektrometer

Die Anleitungen zu den verschiedenen UV/VIS-Spektrometern liegen am jeweiligen Versuchsplatz aus. Es sind sowohl Einstrahl- als auch Zweistrahl-Spektrometer vorhanden.

4 Versuchsdurchführung

4.1 Spontanhydrolyse von p-Nitrophenylacetat

Am Zweistrahl-Spektrometer wird die Spontanhydrolyse von p-Nitrophenylacetat im SÖRENSEN-Phosphatpuffer bei 405 nm verfolgt. Dazu wird am Computer das Programm UV WinLab und darin die Methode **TD (Timedrive)** mit dem Namen „BC_41.MTD“ aufgerufen.

Nullabgleich:

- In zwei Küvetten werden 2970 µL SÖRENSEN-Phosphatpuffer gefüllt und 30 µl reines Ethanol dazupipettiert.

- Die Küvetten werden verschlossen, geschüttelt und in die Küvettenhalterungen des Spektrometers gestellt.
- Nach Äquibrierung im Spektrometer erfolgt der Nullabgleich („Blank“). Die Küvette im Probenhalter wird ausgeleert und als Messküvette verwendet, die andere Küvette verbleibt als Referenz im Spektrometer.

Messung (die anderen Versuchsteile können nach Start dieser Messung durchgeführt werden!)

- In die Messküvette werden 2970 μL SÖRENSEN-Phosphatpuffer pipettiert und die Küvette zum Temperatúrausgleich in das Spektrometer gestellt.
- Dann werden 30 μL p-NPA-Lösung (**10 mM**) dazu pipettiert, die Küvette sofort verschlossen und durch Schwenken gemischt.
- Die Aufnahme der Spektren wird per Computer gestartet.
- Der Computer misst die Extinktion in den in der Tabelle angegebenen Zeitintervallen für 180 min.
- Zur Bestimmung von $E(\infty)$ wird die Reaktionslösung nach Ende der Messung in einem sauberen, beschrifteten Glasgefäß aufbewahrt.

Übersicht: Spontanhydrolyse von 4-Nitrophenylacetat

<i>Methodenname</i>	Timedrive (Td)	BC_41.MTD	
Wellenlänge:	Messdauer:	Intervall:	Temperatur:
<u>405 nm</u>	<u>180 min</u>	<u>60 s</u>	<u>35 °C</u>
<i>Nullabgleich</i>			
„Referenz“	Sörensen-Puffer pH 8	2970	
	Ethanol	30	
„Blank“	Sörensen-Puffer	2970	
	Ethanol	30	
<i>Messung mit</i>			
„Referenz“	Sörensen-Puffer	2970	wie bei Nullabgleich
	Ethanol	30	
„td_41“	Sörensen-Puffer	2970	Probe aufbewahren!
	p-NPA 10 mM	30	

4.2 Imidazolkatalysierte Hydrolyse von p-Nitrophenylacetat

4.2.1 Reaktionsspektrum

Im Programm UV WinLab wird die Methode **SP** (*spectrum*) und das Programm „BC_421“ aufgerufen.

Nullabgleich (Blank):

- Zwei Küvetten werden mit jeweils 2970 μL Imidazolpuffer und 30 μL Ethanol gefüllt, verschlossen und durchmischt.
- Dann wird das Gerät auf Null abgeglichen (*blank*) und die Messküvette wieder geleert.

Messung:

- In die Messküvette werden 2970 μL Imidazolpuffer pipettiert.
- Dann werden 30 μL p-NPA-Lösung (**10 mM**) hinzu pipettiert. Die Küvette wird verschlossen, geschüttelt, ins Gerät eingesetzt und die Messung gestartet.
- Die Aufnahme der Spektren wird per Computer gestartet.
- Zur Bestimmung von $E(\infty)$ wird die Reaktionslösung nach Ende der Messung in einem sauberen, beschrifteten Glasgefäß aufbewahrt.

Übersicht: Imidazolkatalysierte Hydrolyse von 4-Nitrophenylacetat (Reaktionsspektren)

<i>Methoden</i>	Spektrum	BC_421.MSC	
Wellenlänge: <u>200-500 nm</u>	Spektranzahl: <u>20</u>	Intervall: <u>60 s</u>	Temperatur: <u>Raumtemp.</u>
<i>Nullabgleich</i>			
„Referenz“	Imidazolpuffer 1 mM Ethanol	2970 30	
„Blank“	Imidazolpuffer Ethanol	2970 30	
<i>Messung mit</i>			
„Referenz“	Imidazolpuffer Ethanol	2970 30	wie bei Nullabgleich
„sp_421“	Imidazolpuffer p-NPA 10 mM	2970 30	Probe aufbewahren!

4.2.2 E(t)-Kurven bei 405 nm

Ein $E(t)$ -Diagramm bei 405 nm wird für die Imidazol-katalysierte Reaktion über 30 bis 60 min bei Raumtemperatur registriert. Im Programm UV WinLab wird die Methode **TD** (*time drive*) und das Programm „BC_422“ aufgerufen.

Nullabgleich (Blank):

- Zwei Küvetten werden mit jeweils 2970 μ L Imidazolpuffer und 30 μ L Ethanol gefüllt und verschlossen.
- Dann wird das Gerät auf Null abgeglichen (*blank*) und die Messküvette wieder geleert.

Messung:

- Zu 2970 μ L Imidazolpuffer werden 30 μ L p-NPA-Lösung (**10 mM**) hinzupipettiert. Die Küvette wird verschlossen, geschüttelt, ins Gerät eingesetzt und die Messung gestartet.
- Zur Bestimmung von $E(\infty)$ wird die Reaktionslösung nach Ende der Messung in einem sauberen, beschrifteten Glasgefäß aufbewahrt.

Übersicht: Imidazolkatalysierte Hydrolyse von 4-Nitrophenylacetat (E[t]-Kurve)

<i>Methoden</i>	Timedrive (Td)	BC_422.MTD	
Wellenlänge: <u>405 nm</u>	Messdauer: <u>30 oder 45 min</u>	Intervall: <u>30 s</u>	Temperatur: <u>Raumtemp.</u>
<i>Nullabgleich</i>			
„Referenz“	Imidazolpuffer 1 mM Ethanol	2970 30	
„Blank“	Imidazolpuffer Ethanol	2970 30	
<i>Messung mit</i>			
„Referenz“	Imidazolpuffer Ethanol	2970 30	wie bei Nullabgleich
„td_422“	Imidazolpuffer p-NPA 10 mM	2970 30	Probe aufbewahren!

4.3 Bestimmung von $E(\infty)$

- Die aufbewahrten und beschrifteten Reaktionslösungen der vorherigen Versuche werden 20-30 min im Wasserbad auf 70 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen werden von allen Proben Spektren (200-500 nm) aufgenommen, Referenz und „Blank“-Probe sind entweder SÖRENSEN-Phosphatpuffer oder Imidazolpuffer (*welche Unterschiede sind je nach verwendeter Lösung zu erwarten?*).

- Weshalb müssen die Reaktionslösungen wieder auf Gerätetemperatur bzw. 20 °C abgekühlt werden?

Übersicht: Bestimmung von $E(\infty)$

Methodenbeschreibung	Spektrum	BC_43.MSC	Temperatur:
<i>Methodenbeschreibung</i> Wellenlänge: <u>200-500 nm</u>			Raumtemp.
<i>Nullabgleich</i>			
„Referenz“	Sörensen/Imidazol-Puffer	2970	
	Ethanol	30	
„Blank“	Sörensen/Imidazol-Puffer	2970	
	Ethanol	30	
<i>Messung mit</i>			
„Referenz“	Sörensen/Imidazol-Puffer	2970	wie bei Nullabgleich
	Ethanol	30	
„sp_43_spo“	Probe von 4.1	3000	
„sp_43_imi1“	Probe von 4.2.1	3000	
„sp_43_imi2“	Probe von 4.2.2	3000	

4.4 Chymotrypsin-katalysierte Hydrolyse von p-Nitrophenylacetat

Insgesamt werden 7 Reaktionen mit unterschiedlichen 4-Nitrophenylacetat-Lösungen durchgeführt. Es wird in einem Zweistrahlenspektrometer bei 405 nm der Extinktions-Zeit-Verlauf jeder Reaktion über einen Zeitraum von 240 s verfolgt.

- Jeweils 2940 μL Sörensen-Puffer, 30 μL Ethanol und 30 μL Chymotrypsin-Lösung werden in zwei trockene Küvetten pipettiert. Die Küvetten werden verschlossen.
- Dann wird ein Nullabgleich durchgeführt.
- Die Messküvette wird aus dem Spektrometer genommen, entleert und 2940 μL Sörensen-Phosphatpuffer, 30 μL Chymotrypsin-Lösung und 30 μL der entsprechenden p-NPA-Lösung hinzu pipettiert. Dann wird die Küvette mehrmals umgedreht (nicht schütteln!), ins Spektrometer gestellt und die zeitabhängige Messung gestartet.
- Für die nächste Messung wird die Messküvette mit Wasser ausgespült, getrocknet und neu befüllt.

Übersicht: Chymotrypsinkatalysierte Hydrolyse von 4-Nitrophenylacetat

Methodenbeschreibung	TimeDrive (Td)	BC_44.MTD	Temperatur:
<i>Methodenbeschreibung</i> Wellenlänge: <u>405 nm</u>	Messdauer: <u>3 min</u>	Intervall: <u>5 s</u>	Raumtemp.
	Chymotrypsin-Konz.: <u>10 mg / ml</u>		
<i>Nullabgleich</i>			
„Referenz“	Sörensenpuffer pH 8	2940	
	Ethanol	30	
	Chymotrypsin	30	
„Blank“	Sörensenpuffer	2940	
	Ethanol	30	
	Chymotrypsin	30	
<i>Messung mit</i>			
„Referenz“	Sörensenpuffer	2940	wie bei Nullabgleich
	Ethanol	30	

	Chymotrypsin	30
„td_44_1“	Sörensenspuffer	2940
	Chymotrypsin	30
	p-NPA 0.2 mM	30
„td_44_2“	Sörensenspuffer	2940
	Chymotrypsin	30
	p-NPA 0.5 mM	30
„td_44_3“	Sörensenspuffer	2940
	Chymotrypsin	30
	p-NPA 1 mM	30
„td_44_4“	Sörensenspuffer	2940
	Chymotrypsin	30
	p-NPA 2 mM	30
„td_44_5“	Sörensenspuffer	2940
	Chymotrypsin	30
	p-NPA 5 mM	30
„td_44_6“	Sörensenspuffer	2940
	Chymotrypsin	30
	p-NPA 10 mM	30
„td_44_7“	Sörensenspuffer	2940
	Chymotrypsin	30
	p-NPA 20 mM	30

5 Auswertung

5.1 Spontanhydrolyse

Für die Spontanhydrolyse von *p*-NPA soll die Geschwindigkeitskonstante nach folgenden Methoden bestimmt werden:

- *Linearisierung durch Logarithmieren*

Auswertung 1: Zunächst müssen die Werte $\ln[E(\infty) - E(t)]$ für die linearisierte Funktion $\ln[E(\infty) - E(t)] = \ln[E(\infty) - E(0)] - k \cdot t$ berechnet werden.

Auswertung 2: Die Geschwindigkeitskonstante k wird über die Regressionsgerade mit Hilfe des Programms *Origin* bestimmt (ggf. Nachkommastellen auf 9 erhöhen).

- *Formale Integration*

Auswertung 3: Die formale Integration führen Sie mit dem Programm Formale Integration unter Windows durch.

- *Anpassung einer Exponentialfunktion*

Auswertung 4: In *Origin* wird die gemessene Extinktion gegen die Zeit aufgetragen. Eine Funktion der Form $f(x) = A \cdot (1 - e^{-Bx}) + C$ wird an die Kurve angepasst. Für die Angabe von sinnvollen Startparametern ist die Interpretation von A, B und C wichtig. Daher sollen vor der eigentlichen Auswertung sowohl die obige Formel aus dem allgemeinen LAMBERT-BEERSchen Gesetz $E(t) = (\varepsilon_A \cdot a + \varepsilon_B \cdot b) \cdot d$ hergeleitet als auch daraus die Parameter A, B und C abgeschätzt werden.

- *Linearisierung nach SWINBOURNE.*

Für die Auftragemethoden nach Swinbourne und Guggenheim benötigen Sie Wertepaare $E(t)$ und $E(t + \Delta)$, wobei Δ der halben Gesamtmessdauer entspricht.

Auswertung 5: Die Werte $E(t)$ sind Ihre Messwerte bis zur halben Gesamtmessdauer. Für einige dieser Werte haben Sie $E(t + \Delta)$ -Werte (ab der halben Gesamtmessdauer) gemessen. Die anderen $E(t + \Delta)$ -Werte erhalten Sie durch Einsetzen von $t + \Delta$ in die in der vorherigen Aufgabe ermittelte Exponential-Fitfunktion. Diese Werte tragen Sie nach der Gl. $E(t) = E(t + \Delta) \cdot e^{k\Delta} + E(\infty) \cdot (1 - e^{k\Delta})$ auf und bestimmen über lineare Regression die Geschwindigkeitskonstante.

- *Linearisierung nach GUGGENHEIM.*

Auswertung 6: Die vorher ermittelten Werte werden nach Gl. (2.33) $\ln[E(t + \Delta) - E(t)] = -kt + \ln\left(\frac{E(0) - E(\infty)}{E(t + \Delta) - E(\infty)}\right)$ aufgetragen und die Geschwindigkeitskonstante bestimmt.

5.2 Imidazolkatalysierte Hydrolyse

5.2.1 Interpretation des Extinktionsdiagramms

Auswertung 7: Was beobachten Sie im Reaktionsspektrum? In *Origin* soll aus dem Reaktionsspektrum ein **Extinktionsdiagramm** (E -Diagramm) für die beiden Absorptionsmaxima erstellt und bezüglich der Stufigkeit des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes interpretiert werden (vgl. pK-Wert-Anleitung).

5.2.2 Bestimmung der ARRHENIUS-Parameter

Auswertung 8: Die Messwerte der $E(t)$ -Kurve bei 20 °C werden in *Origin* eingegeben. Durch Anpassung der obigen Exponentialfunktion wird die Geschwindigkeitskonstante bestimmt.

- Die Daten werden als ASCII-Datei exportiert und in das Programm *Extinkt* unter *Windows* eingeladen. Nach Angabe der Konzentration, der Geschwindigkeitskonstante, sowie des **Extinktionskoeffizienten** für das Edukt (A) und das Produkt (C) (Einheiten!) können Werte für andere Temperaturen simuliert werden. Nach Wahl eines Dateinamens werden die Daten direkt in eine Datei geschrieben. Diese simulierten Daten können als ASCII-Datei in *Origin* eingelesen und graphisch dargestellt werden.

Auswertung 9: Durch Kurvenanpassung werden für die simulierten Kurven die Geschwindigkeitskonstanten bestimmt.

Auswertung 10: Aus der Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten kann nach ARRHENIUS die Aktivierungsenergie bestimmt werden (lineare Regression).

5.2.3 Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante über die Halbwertszeit

Auswertung 11: Aus dem in 5.2.2 erstellten $E(t)$ -Diagramm wird an der Stelle $E = E(\infty)/2$ die Zeit abgelesen und daraus die Geschwindigkeitskonstante berechnet.

5.3 Enzymkatalyse

Aus den Anfangssteigungen sollen MICHAELIS-Konstante und Maximalgeschwindigkeit durch verschiedene Methoden bestimmt und miteinander verglichen werden.

Auswertung 12: Berechnen Sie die Konzentrationen von p-NPA in den Küvetten.

Auswertung 13: Passen Sie anhand der jeweiligen Reaktionskurven im Programm *Origin* Geraden mittels *linearer Regression* an (sinnvollen Bereich auswählen!), berechnen Sie aus der Anfangssteigung die Anfangsgeschwindigkeit v_0 , indem Sie den Extinktionskoeffizienten des Produktes (berechnet in Aufgabe 8) und die Schichtdicke berücksichtigen.

- *MICHAELIS-MENTEN-Auftragung*

Auswertung 14: In *Origin* werden die Werte für v_0 und c_0 eingegeben und eine Grafik erstellt. An diese Kurve wird eine Funktion der Form $f(x) = \frac{A \cdot x}{B + x}$ angepasst. Aus der Halbwertskonzentration ($A/2$) bzw. aus dem Parameter B der gefitteten Kurve kann die MICHAELIS-Konstante bestimmt werden, aus Parameter A die Maximalgeschwindigkeit.

- *Linearisierung nach LINEWEAVER und BURK*

Auswertung 15: Durch Auftragung von $1/v_0$ gegen $1/c_0$ und anschließender linearer Regression lassen sich K_M und v_{max} nach Lineweaver Burk bestimmen.

- *Linearisierung nach EADIE und HOFSTEE*

Auswertung 16: Mit den oben ermittelten Anfangssteigungen werden durch Auftragung von v_0 gegen v_0/c_0 und linearer Regression K_M und v_{max} bestimmt.

5.4 Vergleich der Ergebnisse

Auswertung 17: Vergleichen Sie die mit den verschiedenen Auswerteverfahren gewonnenen enzymatischen Größen K_M und v_{max} , diskutieren sie Vor- und Nachteile der Auswerteverfahren (vgl. Lit. [6]!). Bestimmen Sie anhand von Gleichung (2.47) die Konstante k_2 für die enzymkatalysierte Reaktion (Molekulargewicht Chymotrypsin: 25 kDa) und vergleichen Sie diese mit den Geschwindigkeitskonstanten der spontanen Hydrolyse und der imidazolkatalysierten Hydrolyse (Tabelle). Was erwarten Sie und werden Ihre Erwartungen bestätigt? (Kurze Diskussion der Ergebnisse!) Gibt es Substanzen, die Chymotrypsin noch schneller umsetzen kann?

Inhaltsverzeichnis

1	Versuchsinhalte	1
1.1	Versuchsziel	1
1.2	Lehrinhalt	1
1.3	Stichworte zur Vorbereitung	1
1.4	Literatur	2
1.5	Mitzubringende Hilfsmittel	2
2	Grundlagen	2
2.1	Grundlegende Begriffe der Kinetik	2
2.1.1	Reaktionsgeschwindigkeit v	2
2.1.1.1	Zeitliche Änderung der Stoffmenge n_i	2
2.1.1.2	Zeitliche Änderung der Stoffkonzentration c_i	2
2.1.1.3	Zeitliche Änderung der Reaktionslaufzahl ξ	3
2.1.1.4	Zeitliche Änderung der Reaktionsvariablen x	3
2.1.2	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k und Reaktionsordnung	4
2.1.3	Reaktionsmolekularität	4
2.1.4	Linear unabhängiger Teilschritt	4
2.2	Zeitgesetze und ihre graphische Auswertung in Konzentrations-Zeit-Kurven	4
2.2.1	Reaktionen erster und pseudo-erster Ordnung	4
2.2.1.1	Spontanhydrolyse als Reaktion pseudo-erster Ordnung	5
2.2.2	Auswertung der Konzentrations-Zeit-Kurven	5
2.2.2.1	Kurvenanpassung der Exponentialfunktion	5
2.2.2.2	Linearisierung durch Logarithmieren	5
2.2.2.3	Linearisierung nach SWINBOURNE	5
2.2.2.4	Linearisierung nach GUGGENHEIM	7
2.2.2.5	Prinzip der Formalen Integration	7
2.2.3	Halbwertszeiten	8
2.3	Enzymkatalyse	8
2.3.1	Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeit einer enzymkatalysierten Reaktion nach MICHAELIS-MENTEN	8
2.3.1.1	Bestimmung von K_M und $v_{0,max}$	10
2.3.1.2	Die Serinprotease Chymotrypsin	11
2.3.2	Enzymkatalyse am Beispiel der imidazolkatalysierten Hydrolyse von p-NPA	11
3	Geräte und Chemikalien	12
3.1	Geräte und Chemikalien	12
3.1.1	Lösungen	12
3.1.2	Küvetten	13
3.1.3	Pipetten	13
3.1.4	Spektrometer	13
4	Versuchsdurchführung	13
4.1	Spontanhydrolyse von p-Nitrophenylacetat	13
4.2	Imidazolkatalysierte Hydrolyse von p-Nitrophenylacetat	14
4.2.1	Reaktionsspektrum	14
4.2.2	$E(t)$ -Kurven bei 405 nm	15
4.3	Bestimmung von $E(\infty)$	15
4.4	Chymotrypsin-katalysierte Hydrolyse von p-Nitrophenylacetat	16
5	Auswertung	17
5.1	Spontanhydrolyse	17
5.2	Imidazolkatalysierte Hydrolyse	18
5.2.1	Interpretation des Extinktionsdiagramms	18
5.2.2	Bestimmung der ARRHENIUS-Parameter	18
5.2.3	Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante über die Halbwertszeit	18
5.3	Enzymkatalyse	18
5.4	Vergleich der Ergebnisse	19
6	Inhaltsverzeichnis	20