

Enzymologie

Am Beispiel der Stärke-Phosphorylase

1) Einleitung

Enzyme sind spezifische Biokatalysatoren, die an nahezu allen biochemischen Reaktionen beteiligt sind. Ohne die Beteiligung von Enzymen würden sogar die meisten dieser Reaktionen unter physiologischen Bedingungen gar nicht erst in messbarer Geschwindigkeit ablaufen.

In diesem Kurs beschäftigten wir uns mit dem Enzym Stärke-Phosphorylase, um anhand dieses Enzyms die grundlegenden Abhängigkeiten der enzymatischen Katalyse physiologischer Reaktionen zu untersuchen.

2) Material

Reagenzien s. Skript, S.126

Kartoffeln, Messer, Reibe (mit 1M Mercaptanol-Lösung betropft), Filtertuch, Eppis, Eppendorfpipetten, Reagenzgläser, Zentrifuge, Photometer, Eis

3) Methode

Es wurden folgende Versuche durchgeführt:

a) Gewinnung der Phosphorylase aus der Kartoffel

s. Skript, S.126

b) Erstellung einer Eichgeraden

s. Skript, S.126f; hier wurde allerdings eine Änderung gegenüber dem Skript vorgenommen und zwar verwendeten wir zusätzlich zu den anderen sechs Gläschen (1-6) ein weiteres (6a), das nur mit 0,65ml Stärke befüllt wurde.

c) Bestimmung des pH-Optimums

s. Skript, S.127

d) Bestimmung des Einflusses der Temperatur auf die Reaktionsgeschwindigkeit

s. Skript, S.127

e) Bestimmung des K_M -Wertes für Glukose-1-Phosphat

s. Skript, S.128

4) Ergebnisse und Diskussion

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Versuche b bis e tabellarisch aufgeführt, graphisch dargestellt und nach verschiedenen Gesichtspunkten diskutiert.

b) Erstellung einer Eichgeraden

Versuchsergebnisse:

Gläschen Nummer	1	2	3	4	5	6	6a
Stärke in mg	0,00	0,05	0,10	0,20	0,30	0,40	0,65
Extinktion bei 620nm	0,000	0,099	0,192	0,413	0,561	0,770	1,137

Graphische Darstellung:

Die Eichgerade ist im **Anhang (i)** zu finden.

Mit Hilfe der Eichgerade wurden die Extinktionswerte der anderen Versuche im Photometer bei ebenfalls 620nm in mg entstandene Stärke umgerechnet.

Der Knick in der Geraden rührt daher, dass nach Lambert-Beer nur über kleine Abschnitte eine lineare Beziehung vorliegt.

c) Bestimmung des pH-Optimums

Versuchsergebnisse:

Gläschen Nummer	7	8	9	10	11	12
pH-Wert	4,5	5,5	6,0	6,5	7,5	6,0
Extinktion bei 620nm	0,086	0,197	0,335	0,231	0,086	0,000
mg Stärke nach der Eichgerade	0,04	0,0975	0,17	0,0925	0,04	0
V in µg(Stärke)/min	2,000	4,875	8,500	4,625	2,000	0,000

Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse:

Aus dem Graphen, der im **Anhang (ii)** zu finden ist, geht ein deutliches Maximum des Kurvenverlaufs bei pH=6,0 hervor.

Bei pH=6 ist die Reaktionsgeschwindigkeit mehr als viermal so hoch wie z.B. bei pH=4,5 oder pH=7,5.

Diskussion der Versuchsergebnisse:

Da bei pH=6,0 die maximale Reaktionsgeschwindigkeit des Substratsatzes erreicht ist, spricht man beim pH um 6,0 vom pH-Optimum der Phosphorylase.

d) Bestimmung des Einflusses der Temperatur auf die Reaktionsgeschwindigkeit

Versuchsergebnisse:

Gläschen Nummer	13	14	9	15
Temperatur (°C)	4	~21	37	60
Extinktion bei 620nm	0,022	0,22	0,335	0,031
mg Stärke nach der Eichgerade	0,01	0,1125	0,17	0,015
V in µg(Stärke)/min	0,500	5,625	8,500	0,750

Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse:

Der graphischen Auftragung der Daten, die sich im **Anhang (iii)** befindet, ist ein Maximum der Reaktionsgeschwindigkeit bei ca. 37°C zu entnehmen. Von 4-37°C ist ein gleichmäßiges Ansteigen und von 37-60°C ist ein Abfallen der Reaktionsgeschwindigkeit zu beobachten.

Diskussion der Versuchsergebnisse:

Im *ersten Abschnitt* der Kurve, also von 4°C bis 37°C ($\Delta T = 33^\circ\text{C}$) nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit von 0,5 µg/min auf 8,5 µg/min, also um den Faktor 17 zu. Berechnet man ($\sqrt[3,3]{17} = 2,36$), um welchen Faktor die Reaktionsgeschwindigkeit im Durchschnitt in diesem Bereich bei 10°C Temperaturerhöhung zunimmt, so erhält man $Q_{10} = 2,36$. Die Reaktion folgt also in diesem ersten Abschnitt der RGT-Regel, die besagt, dass bei einer Temperaturerhöhung um 10°C der Q_{10} -Wert in etwa bei 2 liegt, sich also die Reaktionsgeschwindigkeit in etwa verdoppelt.

Im *zweiten Abschnitt* der Kurve, also von 37°C bis 60°C nimmt dann die Reaktionsgeschwindigkeit mit zunehmender thermischer Denaturierung der Enzyme ab (- aus reinem Interesse errechnet: die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt hier bei 10°C Temperaturerhöhung im Durchschnitt um den Faktor **0,348** ($\sqrt[2.3]{0,088} = 0,348$) ab).

e) Bestimmung des K_M -Wertes für Glucose-1-Phosphat

Versuchsergebnisse:

Gläschen Nummer	16	17	18	19	20	21	22	23
c(G-1-P) in mMol/l	0,000	0,308	0,615	0,923	1,231	1,846	3,077	4,308
Extinktion bei 620nm	0,000	0,049	0,118	0,164	0,222	0,271	0,327	(-0,470)
mg Stärke nach der Eichgerade	0,0	0,025	0,06	0,082	0,1125	0,1375	0,1675	---
V in µg(Stärke)/min	0,000	1,250	3,000	4,100	5,625	6,875	8,375	---
1/V in min/µg(Stärke)	$+\infty$	0,8	0,33	0,24	0,18	0,15	0,12	---
1/c(G-1-P) in l/mMol	$+\infty$	3,25	1,63	1,08	0,81	0,54	0,32	0,23

Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse:

Zu *beiden* Graphen ist vorab anzumerken, dass der Extinktionswert, den wir bei der höchsten Konzentration (Gläschen 23) erhalten haben unbrauchbar ist. Dieser Wert geht wahrscheinlich auf einen Pipettierfehler unsererseits zurück und weil er den Verlauf der Graphen total verfälschen würde wurde er in beiden Darstellungen weggelassen.

In der *klassischen Darstellung* der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration, die im **Anhang (iv)** zu finden ist, kann man beobachten, dass die Kurve zunächst relativ steil ansteigt, sich die Steigung dann allmählich verkleinert, bis zu einer asymptotischen Annäherung an die Maximalgeschwindigkeit. Die Michaelis-Menten-Konstante K_M erhält man aus diesem Graph definitionsgemäß aus dem, der halbmaximalen Geschwindigkeit entsprechenden Abszissenwert.

In der *doppelt reziproken Darstellung* der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration, die im **Anhang (v)** zu finden ist, erhält man den $1/K_M$ -Wert aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse. Die Gerade wurde so durch die Werte gelegt, dass sich die Werte mit der geringeren Streuung, sprich der größeren Genauigkeit (- das sind die Werte, die näher an der Ordinate liegen -) näher an der Gerade befinden.

Diskussion der Versuchsergebnisse:

Aufgrund des unbrauchbaren Messwertes der Extinktion bei Gläschen 23 mussten wir bei der klassischen Darstellung schon den Extinktionswert des Gläschens 22 als Maximal ansehen. V_{max} ist hier demnach 8,375 µg/min und für $V_{max}/2 = 4,19$ µg/min ergibt sich ein Abszissenwert von **$K_M = 0,88$** .

In der Lineweaver-Burk-Darstellung ergibt sich aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse: $1/K_M = -0,72$

→ **$K_M = 1,389$**

Diese beiden K_M -Werte liegen recht weit auseinander, was sich aber ganz einfach daraus erklären lässt, dass wir in unseren Versuchen nur Einzelmessungen durchgeführt haben. Bei uns kam an Ungenauigkeit noch dazu, dass wir aufgrund des fehlenden Extinktionswertes V_{max} schon bei Gläschen 22 annehmen mussten. Mit dem fehlen von diesem Wert fehlte uns außerdem bei der doppelt reziproken Darstellung ein Randpunkt, durch den die Gerade evtl. eine andere Steigung und somit einen anderen Abszissenabschnitt erhalten hätte.

5) Anhang

- i) Eichgerade bei 620nm
- ii) Bestimmung des pH-Optimums – Graph
- iii) Bestimmung des Einflusses der Temperatur auf die Reaktionsgeschwindigkeit – Graph
- iv) K_M -Wert Ermittlung - graphisch nach Michaelis-Menten
- v) K_M -Wert Ermittlung - graphisch nach Lineweaver-Burk