

Facharbeit

aus dem Fach

Chemie

Thema: Untersuchungen zur Kinetik der enzymatischen Harnstoffspaltung

Verfasserin: Stephanie Bajus

Leistungskurs: Chemie

Kursleiter: StR Dr. Hetz

Abgabetermin: 02.02.2004

Abgabe im KSt-Sekr.:

Bewertung:

schriftliche Arbeit: Punkte mündliche Prüfung: Punkte
(einfache Wertung)

Gesamtergebnis
(0 – 60 Punkte): Punkte in Worten:

(Gesamtergebnis = 3 x schriftliche Arbeit + 1 x mündliche Prüfung)

.....
Unterschrift des Kursleiters

INHALTSVERZEICHNIS

1	ENZYME ALS BIOKATALYSATOREN	3
2	DIE UREASE	4
2.1	Bedeutung der Urease in der Natur.....	4
2.2	Bedeutung der Urease für den Menschen	5
3	KINETIK ENZYMATISCHER REAKTIONEN	5
3.1	Herabsetzung der Aktivierungsenergie	5
3.2	Die Theorie nach MICHAELIS und MENTEN.....	7
4	UNTERSUCHUNGEN ZUR ENZYMATISCHEN HARNSTOFFSPALTUNG UND DISKUSSION DER ERGEBNISSE	13
4.1	Versuchsaufbau	14
4.2	Die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Substratkonzentration	15
4.3	Die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Enzymkonzentration.....	17
4.4	Die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Temperatur	18
4.5	Die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit des pH-Wertes.....	21
4.6	Zusammenfassung	23
	ANHANG.....	25
a)	Messkurven	25
b)	Tabellen	28
c)	CD.....	31
	QUELLENANGABEN	32

1 Enzyme als Biokatalysatoren^{1, 2}

Enzyme sind Katalysatoren biologischer Systeme. Fast alle heute bekannten Enzyme sind Proteine, riesige Makromoleküle, die eine Molekülmasse von etwa zehntausend bis mehreren hunderttausend Gramm pro Mol haben. Katalysatoren sind Stoffe, die durch eine Verbindung mit einem Edukt aktive Zwischenprodukte bilden, damit die chemische Reaktion schneller ablaufen kann. Durch die Bildung dieser aktiver Zwischenprodukte wird die Aktivierungsenergie der Reaktion gesenkt, die Reaktionsgeschwindigkeit also erhöht. Die Katalysatoren liegen dabei nach Ablauf der Reaktion wieder unverändert vor, sie werden also nicht verbraucht. Die Gleichgewichtslage der Reaktion wird dabei nicht verändert, sie wird bei einer katalysierten Reaktion schneller erreicht. Bei Verwendung von Enzymen als Katalysator wird die Reaktionsgeschwindigkeit um den Faktor $10^8 - 10^{20}$ erhöht. In biologischen Systemen würde ein Großteil der Reaktionen nicht oder in nicht wahrnehmbarem Umfang ablaufen, wenn sie nicht durch Enzyme katalysiert würden. Ein Enzym katalysiert dabei meistens nur eine oder nur wenige Reaktionen, d.h. Enzyme sind substratspezifisch. EMIL FISCHER entwickelte bereits 1894 die Modellvorstellung des „Schlüssel-Schloss-Prinzips“. Dieses Modell besagt, dass das Substrat die passende Gestalt haben muss um mit dem Enzym eine Verbindung eingehen zu können.

Enzym und Substrat passen also wie Schlüssel und Schloss zusammen. Wie spätere Untersuchungen ergaben, besitzen Enzyme tatsächlich eine Art Tasche, in die das Substrat genau hineinpasst. Diese Tasche wird als aktives Zentrum des Enzyms bezeichnet.

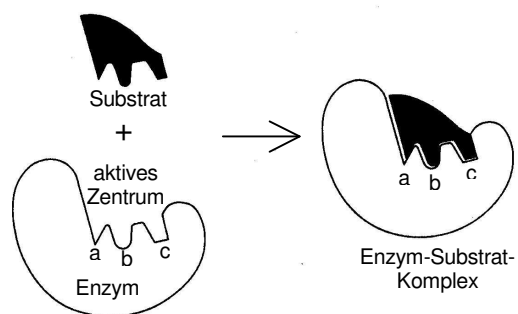


Abb. 1 Schlüssel-Schloss-Modell der Enzym-Substrat-Wechselwirkung¹

In industriellen Prozessen finden Enzyme, die man meist ohne Verlust ihrer biologisch katalytischen Aktivität aus biologischen Systemen extrahieren kann, häufig Anwendung als Katalysator zur Synthese biologisch aktiver Verbindungen wie Hormone und Arzneimittel, z.B. Insulin. Eine große Bedeutung kommt ihnen bei der Racemattrennung zu.

2 Die Urease ^{3, 4, 5, 6}

Das Enzym Urease, deren biochemischer Name Harnstoff-Amidohydrolase ist, katalysiert die Hydrolyse von Harnstoff in Ammoniak und Carbaminsäure, die spontan in Kohlendioxid und Ammoniak zerfällt. Das natürliche Vorkommen der Urease erstreckt sich von Bakterien wie *Bacillus pasteurii*, *Proteus vulgaris* und *Klebsiella aerogenes*, bis zu Pilzen und höheren Pflanzen. Die höchste Konzentration in Pflanzen findet man dabei in Schwert- oder Jackbohnen, bei denen die Urease 0,15% bezogen auf das Trockengewicht ausmacht. Warum gerade dort die Ureasekonzentration so groß ist, ist bis heute noch ungeklärt. ⁷

1926 gelang es dem US-amerikanischen Chemiker JAMES BATCHELLER SUMNER (1887-1955) erstmals Urease aus der Schwertbohne zu isolieren und in kristalliner Form darzustellen. Die Urease war damit auch das erste Enzym, das in kristalliner Form dargestellt wurde. SUMNER erhielt für seine Entdeckung zur „Kristallisierbarkeit von Enzymen“ 1946 den Nobelpreis für Chemie.

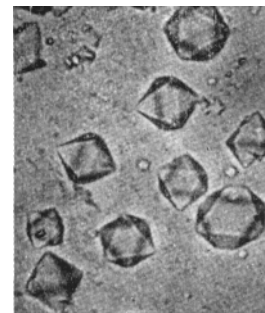


Abb. 2 Urease-Kristalle (1300fach) ⁶

2.1 Bedeutung der Urease in der Natur ^{3, 8}

Bei der Skelettbildung von Korallen, Mollusken und Echinodermen wird der pH-Wert durch den bei der Harnstoffspaltung entstehenden Ammoniak von 8,6 auf 8,9 angehoben. Erst in diesem pH-Bereich ist eine Kalkabscheidung überhaupt möglich.

Viele Pflanzen sind auf Bodenbakterien, die ebenfalls über Urease verfügen, angewiesen, denn die Pflanzen können den im Harnstoff gebundenen Stickstoff nicht nutzen. Erst den Stickstoff, der in den durch Harnstoffspaltung entstandenen Ammoniumionen gebunden ist, können diese Pflanzen aufnehmen und auch für ihren Stoffwechsel verwenden.

2.2 Bedeutung der Urease für den Menschen^{3, 9, 10}

Im menschlichen Körper sind Bakterien mit Ureaseaktivität verantwortlich für die Bildung von Harnsteinen, etlichen Entzündungskrankheiten und Darmgeschwüren.

Das Bakterium *Helikobacter pylori* benötigt Urease um im sauren Milieu des Magens überleben zu können. Es spaltet, mit Hilfe des Enzyms, Harnstoff und kann so durch die Entstehung des Ammoniaks die saure Umgebung neutralisieren. Untersuchungen haben bewiesen, dass dieses Bakterium maßgeblich an der Entstehung von Magengeschwüren beteiligt ist.

Anwendung findet die Urease auch beim Legen von Dauerwellen, wenn eine Kaltwelle mit ansteigendem pH-Wert angewandt wird. Die verwendete Entwicklerlösung enthält neben den für die Dauerwelle benötigten Chemikalien auch Harnstoff und Urease. Dadurch wird die für die Entwicklung der Dauerwelle erforderliche Alkalität durch die Harnstoffspaltung erst allmählich aufgebaut. Die Vorteile dieses Verfahrens liegen auf der einen Seite darin, dass die Haare keinen „Alkalischock“ erleiden. Der pH-Wert wird erst allmählich angehoben. Auf der anderen Seite werden die Hände des Ausführenden nicht durch einen hohen pH-Wert der Entwicklerlösung in Mitleidenschaft gezogen.

3 Kinetik enzymatischer Reaktionen

3.1 Herabsetzung der Aktivierungsenergie²

Die Geschwindigkeit chemischer Reaktionen hängt von verschiedenen Faktoren ab. Zum einen müssen die Reaktionspartner erst einmal zusammenstoßen um überhaupt miteinander reagieren zu können. Zum anderen müssen sie über ausreichend Aktivierungsenergie E_A verfügen um die Energiebarriere der jeweiligen Reaktion überwinden zu können. Damit Edukte in Produkte umgewandelt werden können, müssen diese erst in einen aktivierten Zustand gebracht werden. In biologischen Systemen benötigen viele Reaktionen eigentlich eine sehr hohe Aktivierungsenergie, die in der Regel nicht aufgewandt werden kann. Hier werden

Katalysatoren, meistens Enzyme, eingesetzt um diese Aktivierungsenergie zu senken.

Der Mechanismus hierzu ist immer derselbe: Das Substrat, also das Edukt geht mit einem Enzym einen Enzym-Substrat-Komplex ein. Dieser zerfällt dann in Enzym und freies Produkt. Indem der Übergangszustand stabilisiert wird, wird die Aktivierungsenergie also gesenkt, d.h. der Enzym-Substrat-Komplex ist energetisch günstiger als das aktivierte Substrat. (Abb. 3)

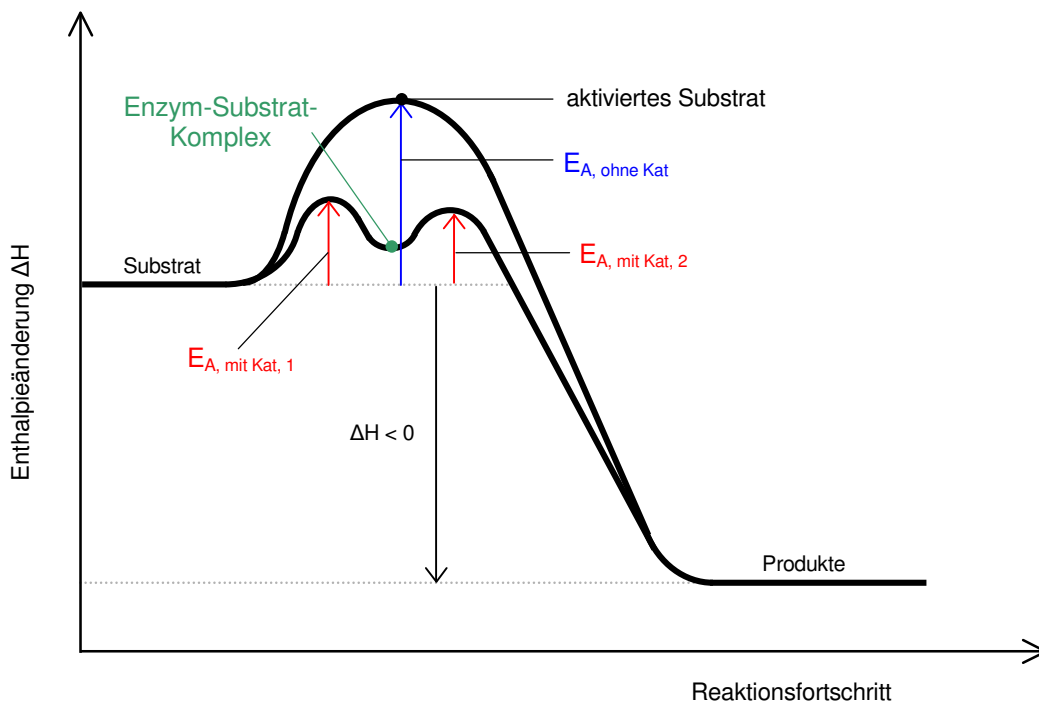


Abb. 3 Energieniveauschema einer Reaktion mit bzw. ohne Katalysator ¹¹

Die Tatsache, dass fast alle Reaktionen in biologischen Systemen so hohe Aktivierungsenergien haben und auf Enzyme angewiesen sind, hat letztendlich Leben auf der Erde erst möglich gemacht. Ohne diese hohe Aktivierungsenergie würde das Gleichgewicht nahezu jeder Reaktion in Gegenwart von Sauerstoff auf der Seite von Kohlendioxid und Wasser liegen, komplexe Moleküle wären äußerst instabil und würden quasi nicht existieren. Damit würde auch kein Leben existieren.

3.2 Die Theorie nach MICHAELIS und MENTEN^{1, 2, 12}

Die Reaktionsgeschwindigkeit v hängt außer von ausreichender Aktivierungsenergie auch noch von der Konzentration der einzelnen Reaktionsteilnehmer ab, wobei v definiert ist als die Anzahl der pro Sekunde entstandenen Mole des Produkts. Lässt man zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Substratkonzentration c_S die Enzymkonzentration c_E konstant, so stellt man fest, dass v für kleine c_S nahezu linear ansteigt. Ist c_S allerdings sehr viel größer als c_E , dann ist v praktisch von c_S unabhängig und erreicht einen Maximalwert, der nicht weiter überschritten werden kann (Abb. 4).

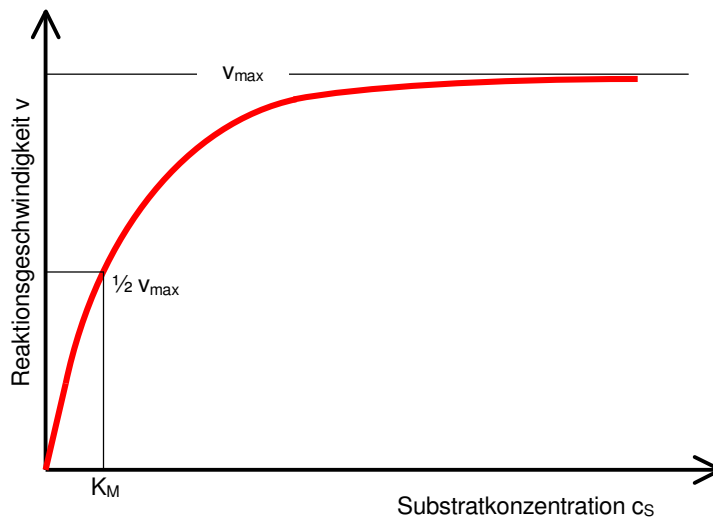


Abb. 4 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit eines Enzyms von der Substratkonzentration²

In Abb. 5 a) – c) ist das Verhältnis Enzym- zu Substratkonzentration schematisch dargestellt. Obwohl in Situation a) und b) mehr Substrat- als Enzymmoleküle vorhanden sind, sind nicht alle Enzymmoleküle E mit Substratmolekülen S besetzt bzw. richtig besetzt. Erst bei einer viel größeren Substratkonzentration (Situation c) ist die Wahrscheinlichkeit des richtigen Zusammenstoßes groß genug, so dass alle Enzymmoleküle gebunden sind. Deshalb ist hier auch die maximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht.

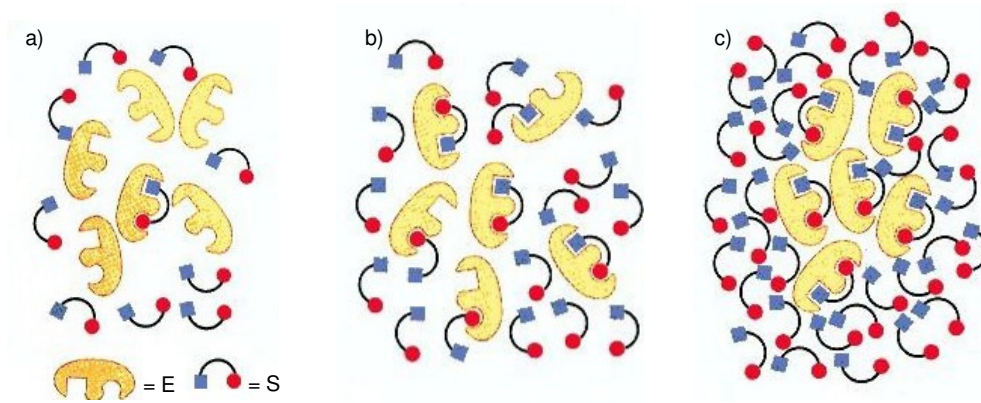
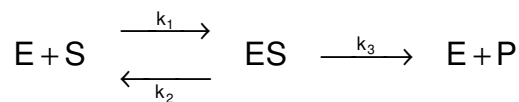


Abb. 5 Schematische Darstellung eines Enzyms bei a) niedriger Substratkonzentration; b) halbmaximaler Geschwindigkeit; c) hoher Substratkonzentration²

Der Deutsch-Amerikaner LEONOR MICHAELIS (1875-1947) und die Kanadierin Miss MAUD LEONORA MENTEN (1879-1960)¹³ schlugen 1913 ein einfaches Modell zur Erklärung dieser kinetischen Eigenschaften vor. Sie nahmen an, dass das Substrat S mit dem Enzym E als Zwischenprodukt einen Enzym-Substrat-Komplex ES eingeht und so bei sehr großer Substratkonzentration alle Enzymmoleküle von Substratmolekülen besetzt sind. Der Enzym-Substrat-Komplex zerfällt dann in Produkt P und freies Enzym. Die Reaktionsgleichung hierzu lautet:



Das Enzym E bindet das Substrat S unter Bildung des ES-Komplexes mit der Geschwindigkeitskonstante k_1 an sich. ES kann entweder mit der Geschwindigkeitskonstanten k_2 wieder in E und S zerfallen oder aber mit der Geschwindigkeitskonstanten k_3 in das Produkt P und freies Enzym umgesetzt werden. Man nimmt außerdem an, dass das Produkt kaum in das ursprüngliche Substrat zurück reagiert. Diese Bedingung trifft für die Anfangsphase, wenn die Produktkonzentration c_P noch vernachlässigbar gering ist, auch zu.

Nun wird angenommen, dass die Umwandlung des ES-Komplexes in Produkt und Enzym der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Daraus folgt, dass die Reaktionsgeschwindigkeit direkt proportional zur Konzentration des ES-Komplexes c_{ES} ist:

$$v = k_3 \cdot c_{ES} \quad (1)$$

c_{ES} muss nun noch durch bekannte Größen ausgedrückt werden. Da c_{ES} zum einen von der Bildung, zum anderen vom Zerfall abhängt, kann man folgende Zusammenhänge herstellen:

$$\text{ES – Bildungsgeschwindigkeit} = k_1 \cdot c_E \cdot c_S \quad (2)$$

$$\text{ES – Zerfallsgeschwindigkeit} = (k_2 + k_3) \cdot c_{ES} \quad (3)$$

Man betrachtet nun die Reaktionsgeschwindigkeit unter Fließgleichgewichtsbedingungen. In diesem Fließgleichgewicht (steady state) sind die Bildungs- und Zerfallsgeschwindigkeit gleich groß, nur die Konzentration der Ausgangs- und Endprodukte ändert sich. Demnach kann man Gleichung (2) und (3) gleichsetzen und erhält:

$$k_1 \cdot c_E \cdot c_S = (k_2 + k_3) \cdot c_{ES} \quad (4)$$

oder umgeformt

$$c_{ES} = \frac{c_E \cdot c_S}{(k_2 + k_3)/k_1} \quad (5)$$

Diese Gleichung lässt sich durch eine neue Konstante K_M , die MICHAELIS-MENTEN-Konstante, vereinfachen:

$$K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (6)$$

In Gleichung (5) eingesetzt ergibt sich:

$$c_{ES} = \frac{c_E \cdot c_S}{K_M} \quad (7)$$

Da das Enzym als Katalysator nicht verbraucht wird, muss der Einfluss der Anfangskonzentration $c_{E,0}$ auf die Reaktionsgeschwindigkeit berücksichtigt werden. Die Anfangskonzentration $c_{E,0}$ setzt sich während der Reaktion aus der Konzentration des freien Enzyms c_E und der Konzentration des im Enzym-Substrat-Komplex gebundenem Enzyms c_{ES} zusammen. Demnach ist die Konzentration c_E während der Reaktion:

$$c_E = c_{E,0} - c_{ES} \quad (8)$$

Setzt man diesen Ausdruck in Gleichung (7) ein, erhält man:

$$c_{ES} = \frac{c_{E,0} \cdot c_S - c_{ES} \cdot c_S}{K_M} \quad (9)$$

Diese Gleichung wird noch etwas umgeformt.

$$\begin{aligned} c_{ES} \cdot K_M + c_{ES} \cdot c_S &= c_{E,0} \cdot c_S \\ c_{ES} \cdot (K_M + c_S) &= c_{E,0} \cdot c_S \\ c_{ES} &= \frac{c_{E,0} \cdot c_S}{K_M + c_S} \end{aligned} \quad (10)$$

Der letzte Ausdruck wird in die Gleichung (1) eingesetzt und man erhält für die Reaktionsgeschwindigkeit den Ausdruck:

$$v = k_3 \cdot c_{E,0} \cdot \frac{c_S}{K_M + c_S} \quad (11)$$

Die Geschwindigkeit wird maximal, wenn alle Enzymmoleküle im Enzym-Substrat-Komplex gebunden sind, wenn also c_S sehr groß ist und demnach auch viel größer ist als K_M . Der Quotient $\frac{c_S}{K_M + c_S}$ nähert sich damit folglich dem

Wert eins. Es gilt also:

$$v_{\max} = k_3 \cdot c_{E,0} \quad (12)$$

Setzt man diesen Ausdruck nun in Gleichung (11) ein, erhält man die MICHAELIS-MENTEN-Gleichung:

$$v = v_{\max} \cdot \frac{c_S}{K_M + c_S} \quad (13)$$

Diese Gleichung liegt auch Abb. 4 zugrunde. Man kann aus ihr ablesen, warum der Graph zu Beginn für geringe Substratkonzentrationen linear ansteigt. Für kleine c_S -Werte, die sehr viel kleiner sind als K_M , kann c_S im Nenner vernachlässigt werden und aus Gleichung (13) lässt sich folgendes ableiten:

$$v = c_S \cdot \frac{v_{\max}}{K_M} \quad (\text{für } c_S \ll K_M) \quad (14)$$

Die Geschwindigkeit ist also direkt proportional zur Substratkonzentration, solange diese gering ist, da v_{\max} und K_M jeweils Konstanten sind.

Ist die Substratkonzentration nun sehr groß, also auch viel größer als K_M , kann jetzt K_M im Nenner vernachlässigt werden und es gilt:

$$v = v_{\max} \quad (\text{für } c_S \gg K_M) \quad (15)$$

Das heißt, wenn die Substratkonzentration groß genug ist, nähert sich die Geschwindigkeit einem Maximalwert v_{\max} an, wie man ebenfalls Abb. 4 entnehmen kann.

Auch die Bedeutung von K_M kann man der Gleichung (13) entnehmen. Wenn $c_S = K_M$ dann gilt

$$v = \frac{1}{2} \cdot v_{\max} \quad (\text{für } c_S = K_M) \quad (16)$$

Das bedeutet also, dass K_M der Substratkonzentration entspricht, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit genau die Hälfte ihres Maximalwertes erreicht hat.

Die MICHAELIS-MENTEN-Konstante kann demzufolge auf diesem Weg bestimmt werden. Da dieses Verfahren durch die hyperbolische Auftragung der Geschwin-

digkeit gegen die Substratkonzentration meist sehr ungenau ist, empfiehlt es sich, die Gleichung so umzuwandeln, dass der Sachverhalt in Form einer Geraden wiedergegeben wird. Um die MICHAELIS-MENTEN-Gleichung in eine Geradengleichung der Form $y = mx + t$ zu bringen, wird von beiden Seiten der Kehrwert genommen und entsprechend umgeformt; so erhält man die doppeltreziproke Darstellung nach LINEWEAVER und BURK (17):

$$\begin{aligned} \frac{1}{v} &= \frac{K_M + c_S}{v_{\max} \cdot c_S} \\ \frac{1}{v} &= \frac{K_M}{v_{\max} \cdot c_S} + \frac{c_S}{v_{\max} \cdot c_S} \\ \frac{1}{v} &= \frac{K_M}{v_{\max} \cdot c_S} + \frac{1}{v_{\max}} \\ \frac{1}{v} &= \frac{K_M}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{c_S} + \frac{1}{v_{\max}} \end{aligned} \quad (17)$$

Es wird also $\frac{1}{v}$ gegen $\frac{1}{c_S}$ aufgetragen und man erhält so eine Gleichung mit dem Ordinatenabschnitt $t = \frac{1}{v_{\max}}$ und der Steigung $m = \frac{K_M}{v_{\max}}$ (Abb. 6). Der Ab-

zissenabschnitt errechnet sich aus $x = -\frac{t}{m} = -\frac{1}{K_M}$. Die MICHAELIS-MENTEN-Konstante K_M kann also unter Verwendung der LINEWEAVER-BURK-Gleichung entweder aus der Steigung der Geraden und ihrem Schnittpunkt mit der Ordinate oder aus dem negativen Schnittpunkt mit der Abszisse berechnet werden.

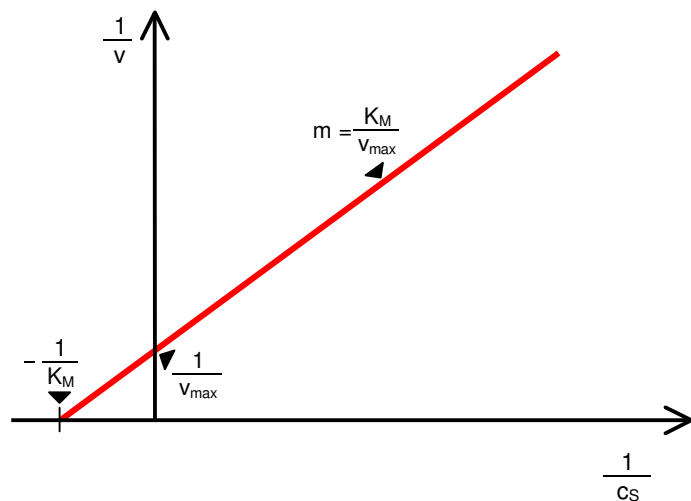
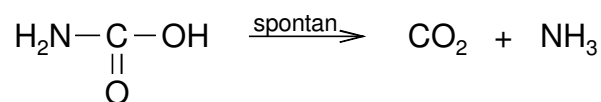
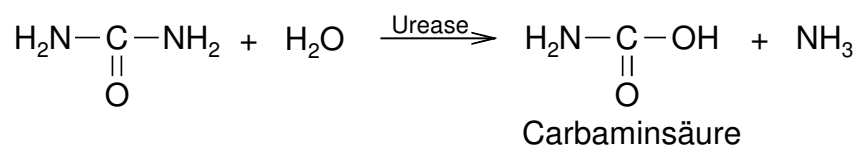


Abb. 6 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit eines Enzyms von der Substratkonzentration in doppelt reziproker Auftragung nach LINEWEAVER und BURK ¹

4 Untersuchungen zur enzymatischen Harnstoffspaltung und Diskussion der Ergebnisse⁶

In den folgenden Versuchen wurde die Kinetik von Enzymen am Beispiel von Urease untersucht, denn Urease erweist sich in der Handhabung unter Schulla-borbedingungen als relativ unproblematisch. Die Kinetik wurde dabei unter ver-schiedenen Aspekten untersucht, nämlich die Reaktionsgeschwindigkeit in Ab-hängigkeit von der Substratkonzentration, von der Enzymkonzentration, der Temperatur und des pH-Wertes.

Dazu wurden jeweils Harnstofflösung mit verdünnter Ureaselösung versetzt, mit Hilfe der „Chembox“, ein Messwerterfassungssystem der Firma IBK Burghausen, die Zunahme der Leitfähigkeit gemessen und so die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt. Harnstoff, das Diamid der Kohlensäure, wird von dem Enzym Urease hydrolysiert. Es bildet sich Ammoniak und Carbaminsäure, die spontan in Koh-lendioxid und Ammoniak zerfällt.



Ammoniak reagiert in wässriger Lösung alkalisch, es entstehen Ammoniumionen und Hydroxidionen. Die Leitfähigkeit nimmt also zu, je mehr Hydroxidionen und Ammoniakionen in Lösung sind.



Da Enzymreaktionen aber pH-Wert-abhängig sind und die Urease ihre maximale Aktivität bei pH = 7 hat, wird in allen Fällen die Reaktionsgeschwindigkeit nur zu Beginn der Reaktion gemessen. Zu diesem frühen Zeitpunkt der Reaktion kann man davon ausgehen, dass die Bedingungen jeweils gleich sind. Das Einsetzen eines Puffers zum Stabilisieren des pH-Werts erweist sich als problematisch, da zum einen die Anfangsleitfähigkeit schon sehr hoch ist, zum anderen die Ände-

rung der Leitfähigkeit während der Reaktion nur sehr gering ist, weil die Hydroxidionen ja durch den Puffer weggefangen werden.

Zur Auswertung wird also die Methode der Anfangsgeschwindigkeit angewandt. Die Anfangsgeschwindigkeiten der erhaltenen Messkurven werden ermittelt und pro Versuchsreihe in ein gemeinsames Diagramm übertragen. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist normalerweise definiert als Änderung der Konzentration eines Stoffes pro Zeit, also $v = \frac{\Delta c}{\Delta t}$. Hier wird allerdings nicht die Änderung der Konzentration, sondern die Änderung des Leitwerts der Lösung bestimmt. Der Leitwert G ist definiert als $G = \frac{1}{R}$, da der Widerstand R gleich $R = \frac{U}{I}$ ist, lässt sich ein Zusammenhang zwischen dem Leitwert und der Stromstärke I herstellen: $G = I \cdot \frac{1}{U}$, d.h. G und I sind zueinander direkt proportional. Die Zunahme der Stromstärke, d.h. auch des Leitwerts, ist direkt proportional der Zunahme der OH^- -Ionen und NH_4^+ -Ionen. Da die Zunahme der Ionenkonzentrationen direkt proportional der Zunahme der Konzentration von Ammoniak ist, siehe auch Reaktionsgleichung (18), ist die Änderung der Stromstärke ΔI und die Änderung des Leitwerts ΔG auch direkt proportional der Geschwindigkeit v . Damit kann man die Geschwindigkeit aus den Steigungen der ermittelten Kurven berechnen. Das heißt $v = \frac{\Delta I}{\Delta t}$ bzw. $v = \frac{\Delta G}{\Delta t}$. Exemplarisch ist dazu im Anhang eine Messkurve (Messkurve 1) dargestellt.

4.1 Versuchsaufbau

Es werden jeweils 100ml Probelösung in einem Becherglas untersucht. In diese Probelösung taucht eine Leitwertsonde ein, die die Leitfähigkeit der Lösung misst und diese Daten über die „Chembox“ dem Computer übermittelt. Ein Magnetrührer sorgt für eine schnelle gleichmäßige Verteilung aller Substanzen.

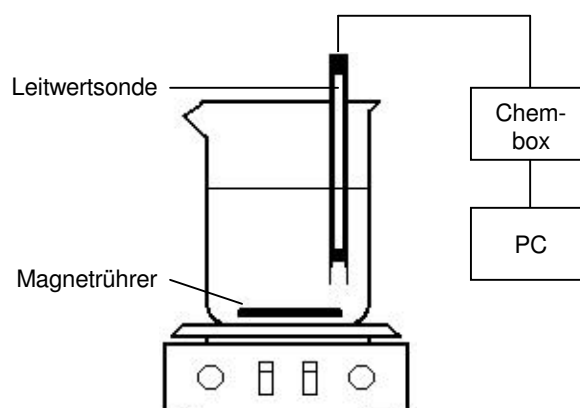


Abb. 7 Schematischer Versuchsaufbau

Die Probelösung enthält je nach Versuch unterschiedliche Konzentrationen an Harnstoff und unterschiedliche Konzentrationen an Urease. Die verwendete Urease stammt aus Schwertbohnen (Fluka-Nr. 94282) und hat ein Molekulargewicht von etwa $480.000 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$.

4.2 Die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Substratkonzentration

In der ersten Versuchsreihe werden zu unterschiedlichen Konzentrationen an Harnstofflösung jeweils eine konstante Menge an Ureaselösung gegeben, so dass die Konzentration an Urease in der Probelösung jeweils $c(\text{Urease})_{\text{Pr obelsg}} = 2,08 \cdot 10^{-7} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ beträgt. Die Temperatur der Probelösungen beträgt jeweils 25°C , der Anfangs-pH-Wert der Lösung 6,76.

Die experimentellen Ergebnisse wurden in Diagramm 1 ausgewertet.

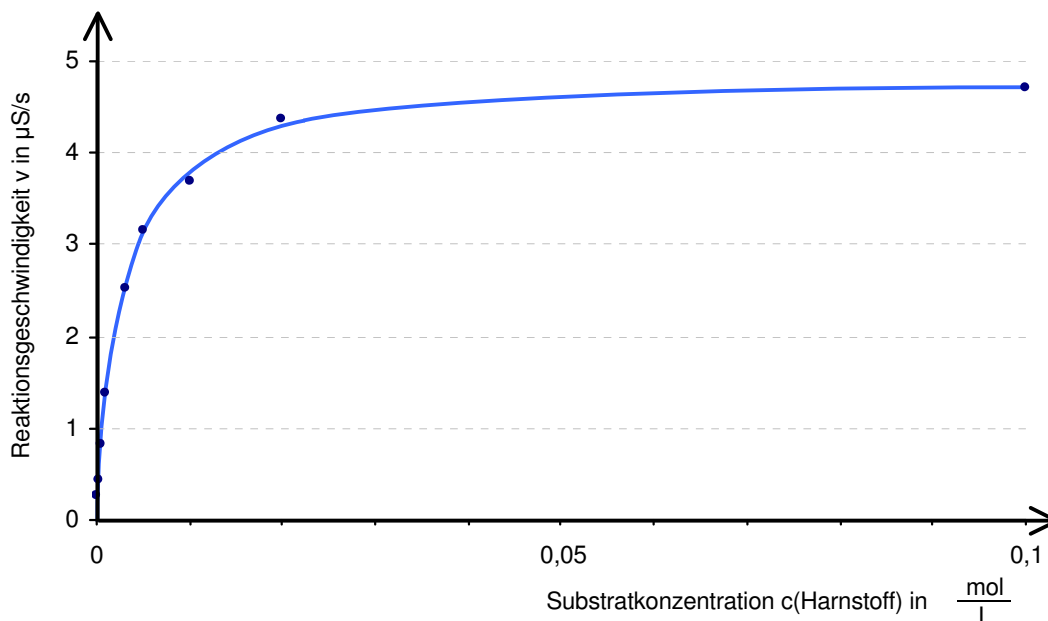


Diagramm 1 Experimenteller Befund der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Substratkonzentration für den Geltungsbereich der MICHAELIS-MENTEN-Gleichung; Messwerte im Anhang, Tabelle 1

Wie auf Grund der MICHAELIS-MENTEN-Gleichung erwartet, steigt die Reaktionsgeschwindigkeit für sehr kleine Substratkonzentrationen zunächst stark an, bis sie bei einer Substratkonzentration von etwa $c(\text{Harnstoff}) = 0,1 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ für die Reaktionsgeschwindigkeit v einen Maximalwert erreicht hat.

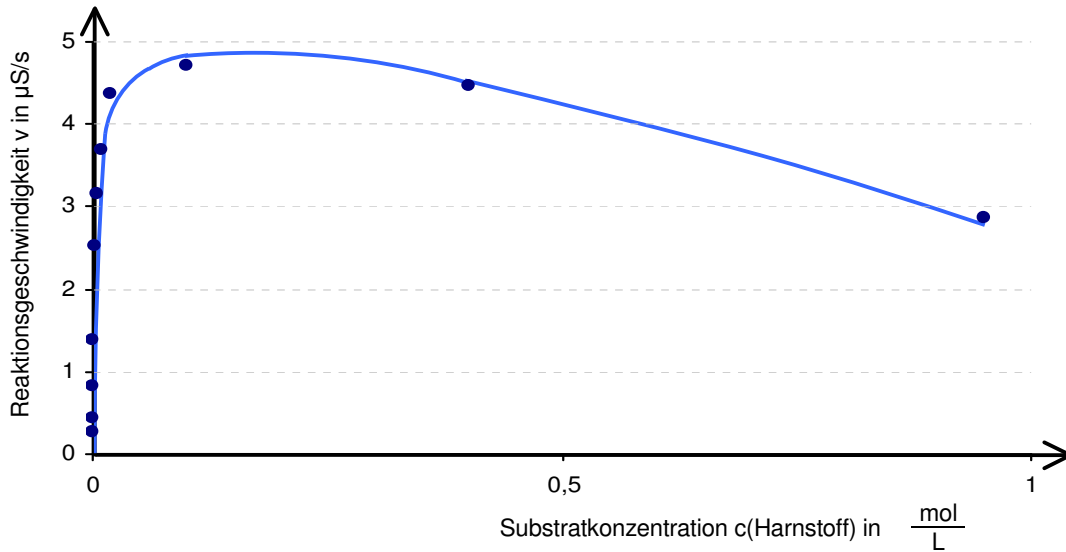


Diagramm 2 Experimenteller Befund der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Substratkonzentration für die gesamte Versuchsreihe; Messwerte im Anhang, Tabelle 2

Wie man Diagramm 2 entnehmen kann, sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit bei weiterer Erhöhung der Harnstoffkonzentration wieder ab, denn bei höheren Substratkonzentrationen tritt bei dieser Reaktion eine so genannte Substrathemmung, die jedoch nur bei wenigen Enzymen vorkommt, auf. Es lagert sich ein zweites Substratmolekül an das Enzym an und bildet so einen Enzym-Substrat-Komplex ES_2 . Dieser ist erheblich weniger reaktionsfähig als der normale Enzym-Substrat-Komplex ES , deshalb sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit.

Für den niedrigen Konzentrationsbereich, d.h. für Konzentrationen im Bereich $c(\text{Harnstoff}) = 5 \cdot 10^{-4} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ bis $0,1 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$, wurde die doppeltreziproke Auftragung nach LINEWEAVER und BURK durchgeführt (siehe auch Gleichung (17)). Für geringere Konzentrationen wurden die Werte nicht berücksichtigt, da hier kleine Messfehler zu deutlich ins Gewicht fallen würden.

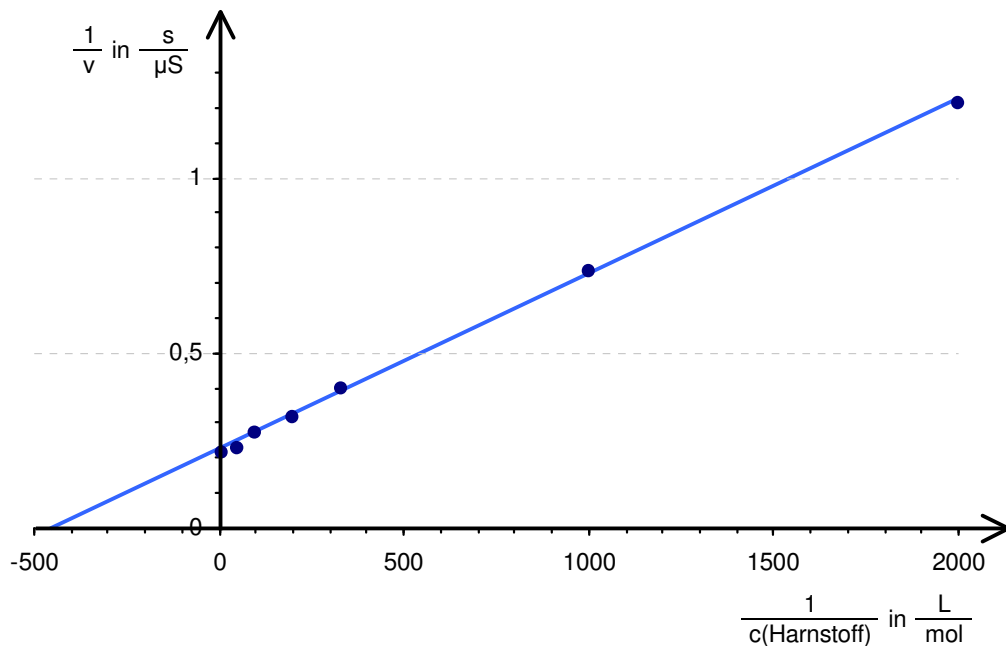


Diagramm 3 Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Substratkonzentration nach LINEWEAVER und BURK zur Ermittlung von K_M ; Messwerte im Anhang, Tabelle 3

Mit dieser Darstellung bekommt man für diese Reaktion für $\frac{1}{K_M}$ einen Näherungswert von etwa $450 \frac{\text{L}}{\text{mol}}$. Daraus lässt sich die MICHAELIS-MENTEN-Konstante zu etwa $2,2 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ ermitteln.

4.3 Die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Enzymkonzentration¹⁴

Eine bestimmte Konzentration eines Enzyms ist also ab einer gewissen Substratkonzentration gesättigt und kann die Substratmoleküle nicht mehr schneller umsetzen. Wenn diese Substratkonzentration nun sehr viel größer als die Enzymkonzentration ist, kann die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht werden, indem man mehr Enzym zugibt.

In der nun folgenden Versuchsreihe wurde jeweils eine Substratkonzentration von $c(\text{Harnstoff}) = 3 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ mit unterschiedlichen Enzymkonzentrationen verwendet. Die Temperatur der Probelösungen beträgt 25°C , der Anfangs-pH-Wert der Lösung 6,76.

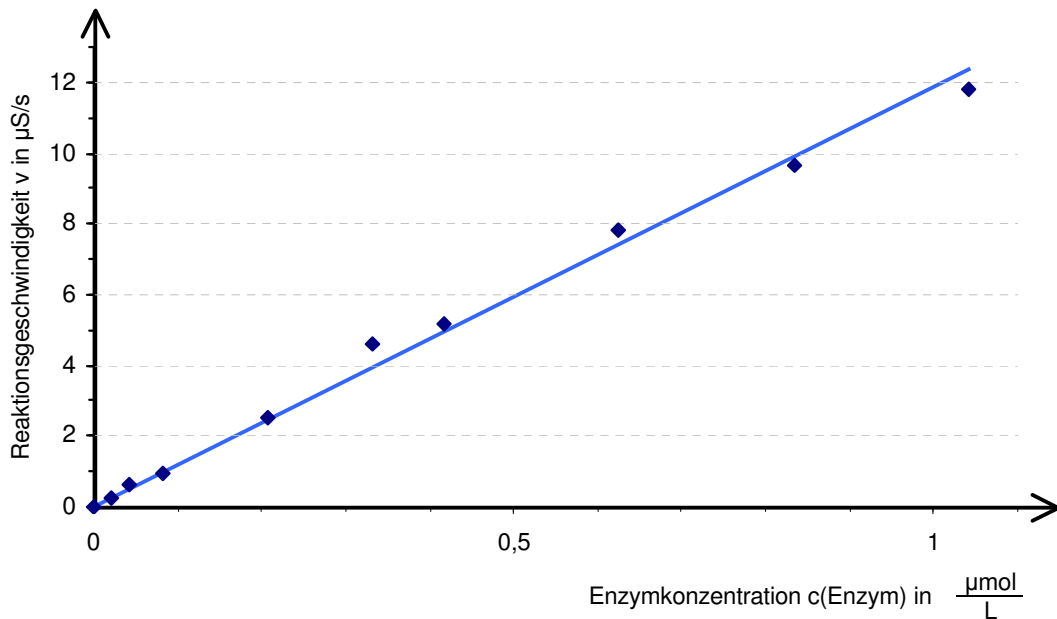


Diagramm 4 Experimentelle Ergebnisse der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Enzymkonzentration; Messwerte im Anhang, Tabelle 4

Die Geschwindigkeit steigt nun linear an, da die Reaktionsgeschwindigkeit direkt proportional zu den Konzentrationen der Edukte ist und noch genug Substratmoleküle vorhanden sind um weitere Enzym-Substrat-Komplexe zu bilden.

4.4 Die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Temperatur^{2, 14, 15, 16}

Wie alle Proteine zeigen Enzyme in ihrer Aktivität eine typische Temperaturabhängigkeit. Zunächst bestimmt die Reaktionsgeschwindigkeits-Temperatur-Regel, die sogenannte RGT-Regel, die enzymatische Umsetzung. So verdoppelt sich die Reaktionsgeschwindigkeit in einem bestimmten Temperaturbereich mit steigender Temperatur etwa alle 10°C. Dieser Faktor, mit dem sich die Geschwindigkeit alle 10°C erhöht, wird auch Temperaturkoeffizient oder Q_{10} genannt. Ein weiteres Merkmal von enzymatischen Reaktionen ist das Temperaturoptimum, das jede enzymatische Reaktion aufweist. Dieses Optimum ist enzymespezifisch. Es liegt meist in einem Bereich, in dem Enzyme auch unter natürlichen Bedingungen arbeiten. So haben Enzyme bei Menschen ein Optimum von etwa 37°C. Bei einigen Mikroorganismen, die in heißen Quellen leben, kann dieses Maximum nahe 100°C sein. Mit Überschreiten dieses Temperaturoptimums fällt die Geschwindigkeit stark ab, da die Enzyme anfangen zu denaturieren. Ein

Enzym denaturiert, weil sich durch die Hitzeeinwirkung das komplizierte intramolekulare Bindungssystem infolge erhöhter Schwingungsanregung löst. Dabei werden v.a. Disulfidbrücken aufgelöst. Beim Abkühlen werden neue Bindungen geknüpft, wobei diese meist Zufallsprodukte sind. Die räumliche Struktur der Enzyme, d.h. ihre Tertiärstruktur, wird durch die Wärmeeinwirkung demnach so nachhaltig verändert, dass sie ihre ursprüngliche Form nicht mehr einnehmen können und so ihre Reaktionsfähigkeit verlieren.

Durch Kochen eines katalytisch wirksamen Systems kann also festgestellt werden, ob dieses mit Enzymen arbeitet. Wenn die katalytische Aktivität nach dem Erhitzen verloren ist, war der Katalysator ein Enzym.

Diese Hitzedenaturierung wendet man bei der Konservierung von Lebensmitteln durch z.B. Pasteurisieren oder Einwecken ganz gezielt an. Die Enzyme der Mikroben werden hierbei so nachhaltig zerstört, dass diese nicht mehr lebensfähig sind. Aber auch für den Menschen kann dieser Vorgang lebensgefährlich werden, wenn er zu hohes Fieber, d.h. mehr als 42°C, hat und so seine Enzyme ebenfalls hitzedenaturiert werden.

Bei der dritten Versuchsreihe wurden jeweils Konzentrationen von $c(\text{Urease}) = 2,08 \cdot 10^{-7} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ und $c(\text{Harnstoff}) = 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ verwendet. Diese Lösungen wurden auf unterschiedliche Temperaturen erhitzt bzw. gekühlt.

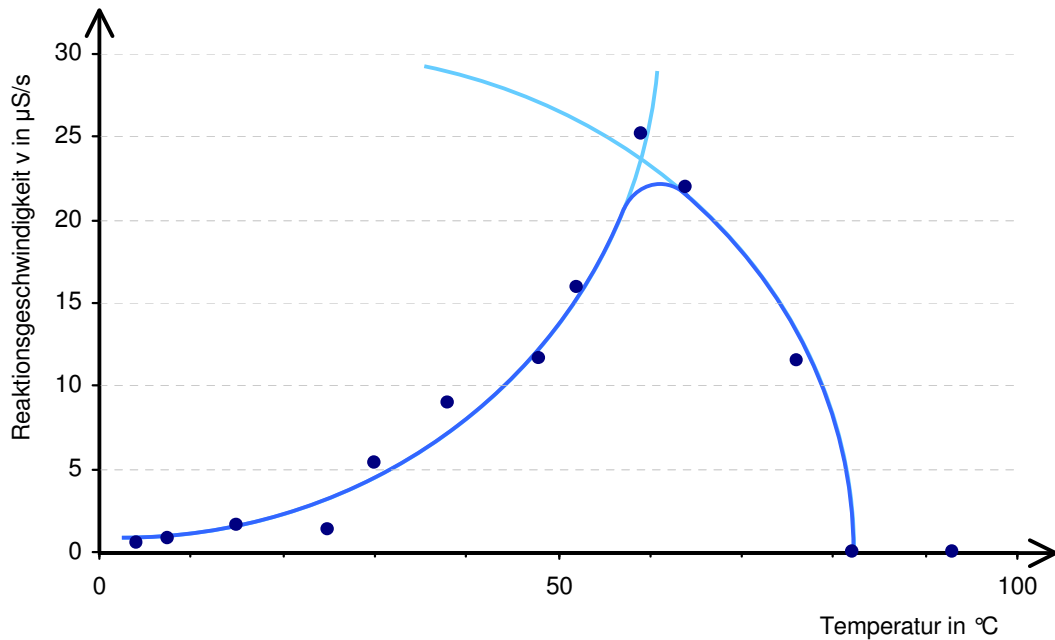


Diagramm 5 Experimenteller Befund der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Temperatur; Messwerte im Anhang, Tabelle 5

Wie man dieser Kurve entnehmen kann, tritt die Denaturierung in dieser Versuchsreihe bei etwa 60°C auf. Der Grund für diesen relativ hohen Wert liegt im Herkunftsgebiet der Schwertbohne oder *Canavalia gladiata*, aus der das verwendete Enzym gewonnen wurde. Sie ist in Südasien und Afrika beheimatet. Die optimale Temperatur für die Schwertbohne liegt zwischen 14°C und 30°C . Bei direkter Sonneneinstrahlung kann diese Temperatur aber auch höher liegen. Daraus erklärt sich, dass die Hitzedenaturierung erst bei einer relativ hohen Temperatur einsetzt, da die Pflanze sonst nicht überleben könnte.

Bei dieser Versuchsdurchführung war folgendes zu beachten. Erhitzt man nur die Harnstofflösung auf entsprechende Temperaturen und gibt anschließend die raumtemperaturwarme Enzymlösung zu, setzt der Denaturierungsprozess des Enzyms erst bei Reaktionsbeginn ein. Die Anfangsgeschwindigkeit ist also in diesem Fall nicht zu verwenden, da zu diesem Zeitpunkt trotz entsprechender Temperatur noch nicht entsprechend viele Enzyme denaturiert wurden. In der laufenden Reaktion kann der Zeitpunkt nicht nachträglich bestimmt werden, da die Abnahmen der Reaktionsgeschwindigkeit entweder auf die Denaturierung der Enzyme oder auf die reaktionsbedingte Abnahme der Substratkonzentration zurückzuführen ist. Deshalb muss die Enzymlösung mit erhitzt werden, natürlich in getrennten Gefäßen. Dabei darf die Enzymlösung aber nicht über die gewünsch-

te Temperatur erhitzt werden. Werden Enzyme einmal zu stark erhitzt, ist die stattgefundene Denaturierung irreversibel.

Wie eine Messkurve für einen Versuch mit vollständig denaturiertem Enzym aussieht, findet man im Anhang, Messkurve 2. Hier findet keine Reaktion mehr statt, die Leitfähigkeit der Lösung bleibt unverändert konstant.

4.5 Die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit des pH-Wertes¹⁷

Auch bei Zugabe konzentrierter Säuren und Laugen kommt es zu einer Denaturierung der Enzyme. Bei einer pH-Wert-abhängigen Darstellung nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit links und rechts eines Aktivitätsmaximums stark ab. Da Enzyme globuläre Proteine sind, wird ihre Tertiärstruktur, also ihr räumlicher Bau, auch von den Anziehungskräften, die zwischen den ionischen Resten der Aminosäure-Bausteine wirken, beeinflusst. Bei Änderung des pH-Wertes wird die Protonenkonzentration in der Lösung geändert, d.h. in saurem Milieu können vorher neutrale Aminogruppen z.B. zu positiv geladenen Gruppen werden bzw. vorher negativ geladene Gruppen durch Aufnahme eines Protons neutralisiert werden. Diese Änderungen der Ladung der einzelnen am Aufbau eines Enzyms beteiligten Gruppen bewirken nun irreversible Änderungen der räumlichen Struktur des Enzyms und des aktiven Zentrums, d.h. das Enzym hat seine katalytische Aktivität verloren.

Für die letzte Versuchsreihe wurden jeweils Konzentrationen von $c(\text{Urease}) = 2,08 \cdot 10^{-7} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ und $c(\text{Harnstoff}) = 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ verwendet. Diese Probelösungen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Salzsäure $\text{HCl}_{(\text{aq})}$ in verschiedene saure pH-Bereiche und mit unterschiedlichen Konzentrationen an Natriumhydroxid $\text{NaOH}_{(\text{aq})}$ in verschiedene alkalische pH-Bereiche gebracht.

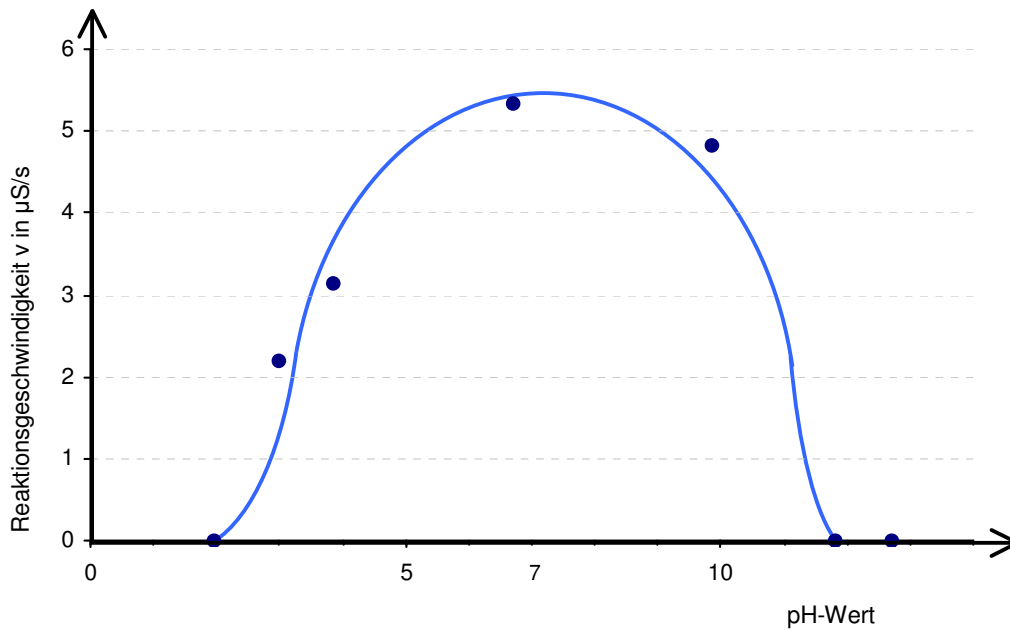


Diagramm 6 Experimenteller Befund der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit des pH-Wertes; Messwerte im Anhang, Tabelle 6

Das pH-Optimum der Urease liegt also bei etwa $\text{pH} = 7$. Unter einem pH-Wert von $\text{pH} = 1,97$ bzw. über einem pH-Wert von $\text{pH} = 11,8$ ist das Enzym vollständig denaturiert.

Bei der Auswertung der Daten im sauren Milieu sind folgende Punkte zu beachten. Die Leitfähigkeit im sauren ist anders als im alkalischen Bereich, deshalb müssen die durch die Steigung ermittelten Reaktionsgeschwindigkeiten mit dem Faktor $0,56^{18}$ multipliziert werden. Dieser Faktor entspricht der Äquivalenzleitfähigkeit. Außerdem nimmt die Leitfähigkeit der Lösung zunächst einmal ab. Das liegt daran, dass auf Grund der zugegebenen Salzsäure H_3O^+ -Ionen in Lösung vorliegen. Diese H_3O^+ -Ionen werden von den OH^- -Ionen, die bei der Harnstoffspaltung entstehen, erst einmal neutralisiert, deshalb sinkt die Leitfähigkeit. Erst wenn alle H_3O^+ -Ionen neutralisiert wurden, steigt die Leitfähigkeit wieder an. Zur Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeit muss aber der Betrag der Anfangssteigung des absteigenden Arms genommen werden, da die anderen Bedingungen, wie die Substratkonzentration c_s , zu diesem Zeitpunkt noch konstant und mit den anderen Versuchen vergleichbar sind. Der Betrag wird deshalb genommen, da die Reaktionsgeschwindigkeit nicht negativ ist. Im Anhang gibt es dazu eine ex-

emplarische Messkurve (Messkurve 3). Im alkalischen Bereich werden die ermittelten Daten wie gewohnt übernommen.

4.6 Zusammenfassung

Die Untersuchungen zur Kinetik der enzymatischen Harnstoffspaltung mit dem Enzym Urease haben für enzymatische Reaktionen typische Ergebnisse geliefert.

So folgt bei der Untersuchung der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Substratkonzentration die Reaktionsgeschwindigkeit zunächst den Gesetzmäßigkeiten der MICHAELIS-MENTEN-Gleichung. Bei einer konstanten Enzymkonzentration von $c(\text{Urease}) = 2,08 \cdot 10^{-7} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ steigt die Reaktionsgeschwindigkeit für kleine Substratkonzentrationen bis zirka $c(\text{Harnstoff}) \approx 0,01 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ sehr stark an und nähert sich schließlich bei etwa $c(\text{Harnstoff}) \approx 0,1 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ einer Maximalreaktionsgeschwindigkeit von ungefähr $v_{\text{max}} \approx 4,8 \frac{\mu\text{S}}{\text{s}}$ an. Für größere Substratkonzentrationen, das heißt ab einer Konzentration von etwa $c(\text{Harnstoff}) > 0,1 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit auf Grund von Substrathemmung wieder deutlich ab. Der mithilfe der doppeltreziproken Auftragung nach LINEWEAVER und BURK ermittelte Wert für die MICHAELIS-MENTEN-Konstante beträgt $K_M \approx 2,2 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$.

Bei einer konstanten Substratkonzentration von $c(\text{Harnstoff}) = 3 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$, dafür aber einer variablen Enzymkonzentration, also bei der Untersuchung der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Enzymkonzentration, steigt die Reaktionsgeschwindigkeit direkt proportional zur Zunahme der Enzymkonzentration im untersuchten Bereich an, da die Substratkonzentration groß genug ist. Alle Enzymmoleküle liegen also in einem ES-Komplex gebunden vor und nach Ablauf der Reaktion können sie sofort wieder mit einem neuen Substratmolekül einen neuen ES-Komplex eingehen.

Auch die Untersuchungen zur Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Temperatur haben ein für enzymatische Reaktionen typisches Ergebnis geliefert.

Zunächst nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit nach der RGT-Regel zu bis zu einem ermittelte Temperaturoptimum bei etwa 60 °C, hier zeigt das Enzym Urease seine höchste Aktivität. Danach tritt die Hitzedenaturierung ein bis ab einer Temperatur von etwa 82 °C das Enzym vollständig denaturiert ist und seine Aktivität verloren hat.

Bei der Untersuchung der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit des pH-Wertes zeigt sich wie schon bei der Temperaturabhängigkeit ebenfalls der Eiweißcharakter des Enzyms. Der pH-Bereich, in dem die Urease katalytisch aktiv sein kann, liegt zwischen $\text{pH} \approx 1,97$ und $\text{pH} \approx 11,8$. Außerhalb dieses Bereiches ist das Enzym vollständig denaturiert und hat seine Aktivität verloren. Das Optimum, das heißt die höchste katalytische Aktivität, zeigt die Urease bei einem pH-Wert von etwa $\text{pH} \approx 7$.

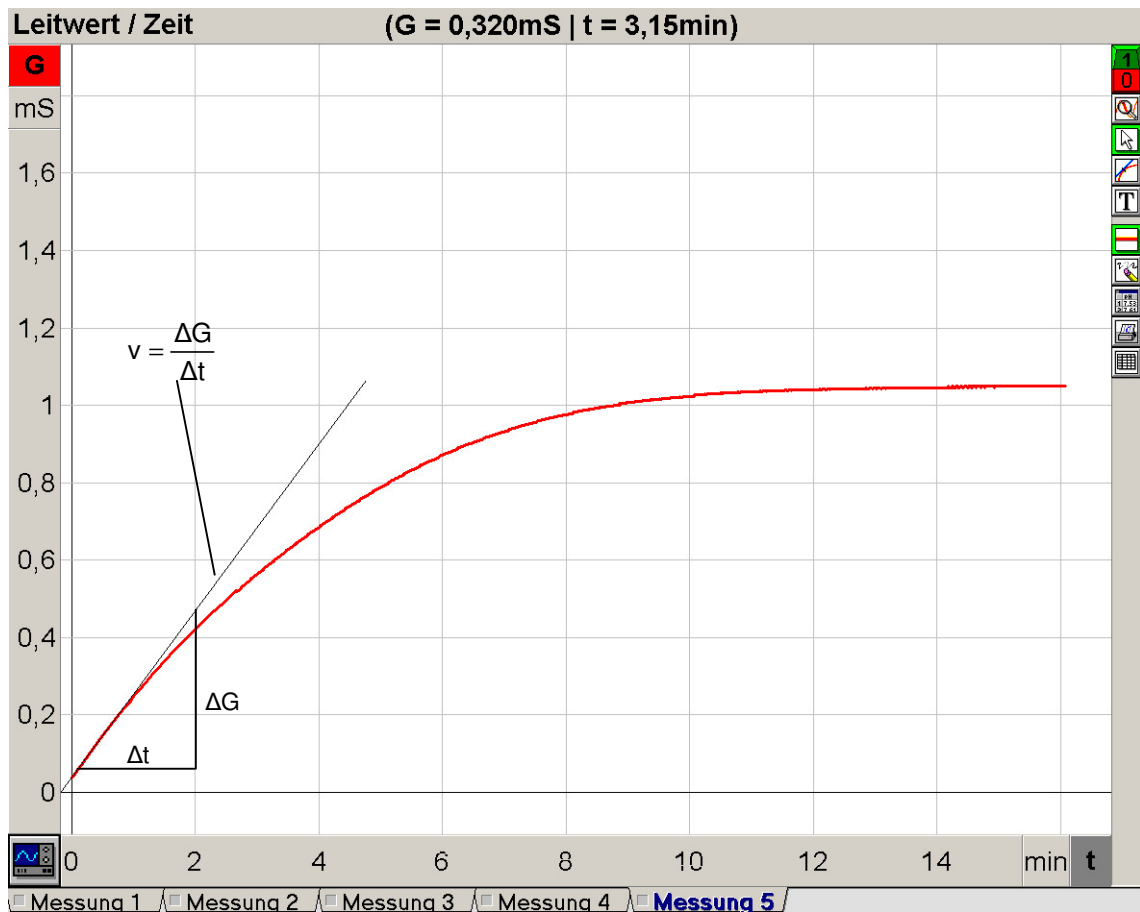
Anhang

a) Messkurven

Im folgenden sind exemplarisch einige Messkurven der durchgeführten Versuche gezeigt, aus denen die Reaktionsgeschwindigkeiten ermittelt wurden. Diese errechneten Werte wurden pro Versuchsreihe in eine Tabelle übernommen.

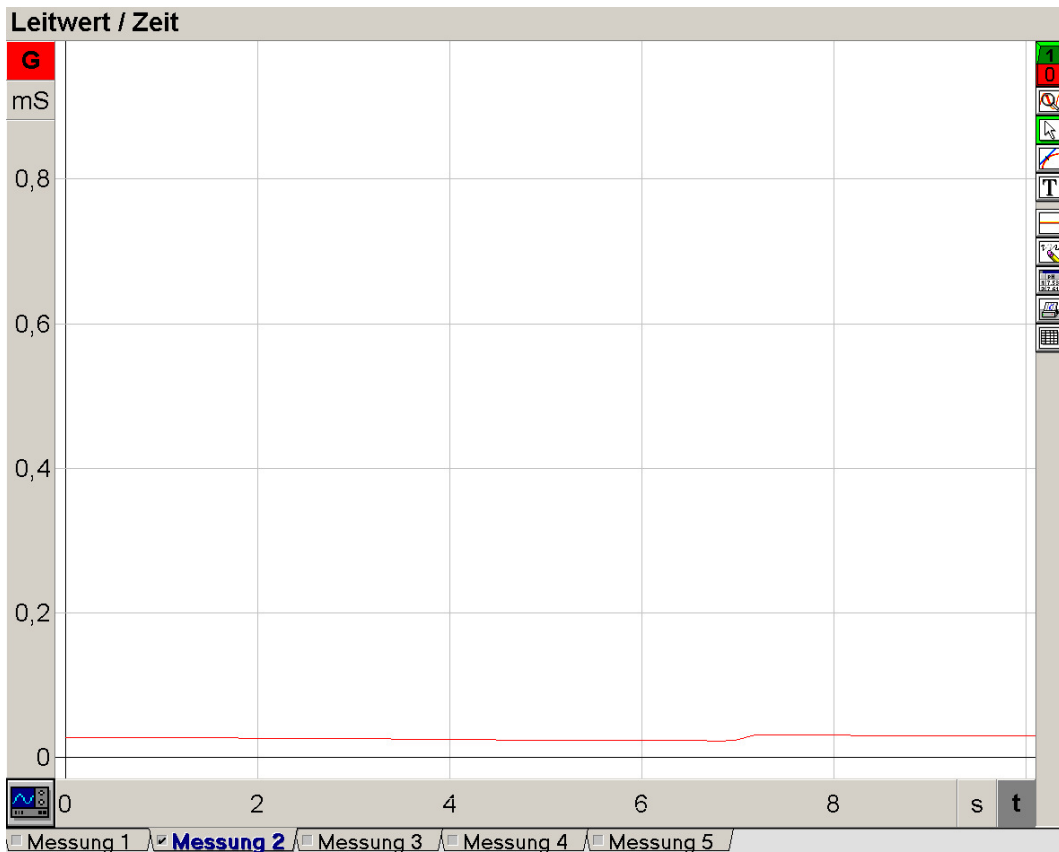
- Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeit über die Anfangssteigung der

Messkurve $m = \frac{\Delta y}{\Delta x} = v = \frac{\Delta G}{\Delta t}$:



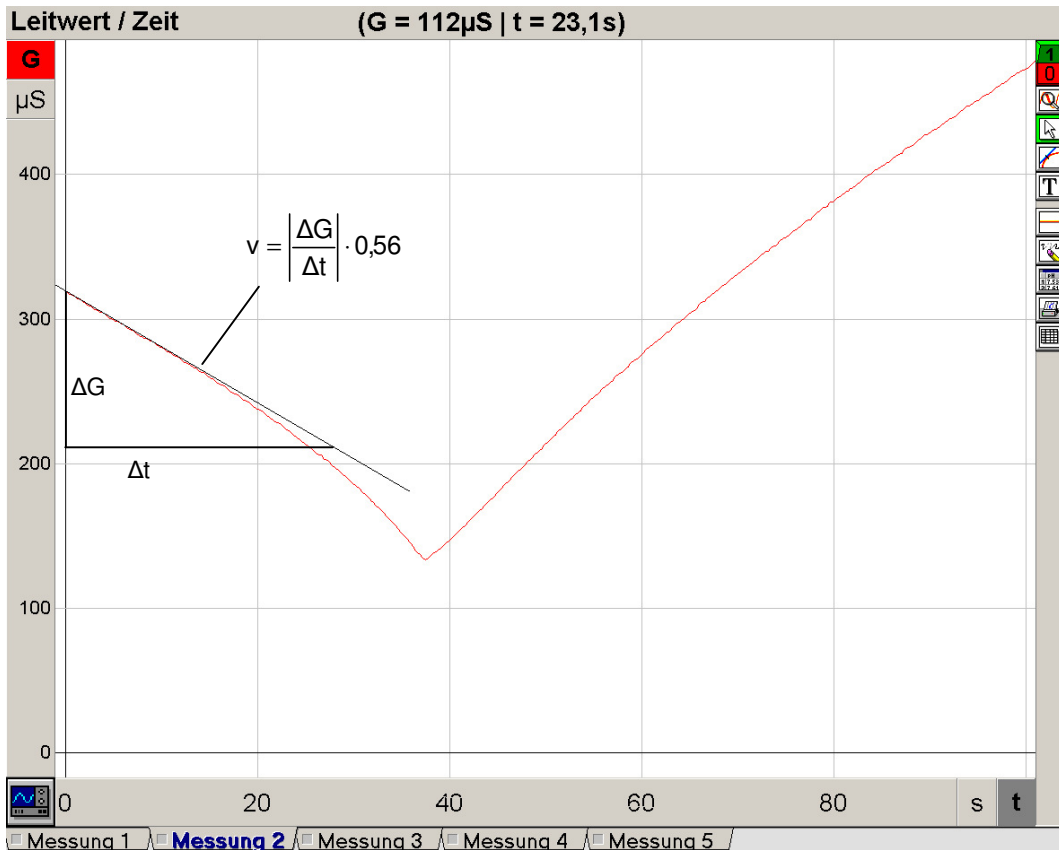
Messkurve 1 Versuchsreihe:
„Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Substratkonzentration“;
 $c(\text{Harnstoff}) = 0,01 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$

- Bei denaturierten Enzymen findet keine Harnstoffspaltung mehr statt, es entstehen also keine Carbaminsäuremoleküle und somit auch keine H_3O^+ -Ionen und OH^- -Ionen, d.h. die Änderung der Leitfähigkeit ΔG ist Null. Folglich ist auch die Steigung der Messkurve und damit die Reaktionsgeschwindigkeit gleich Null.



Messkurve 2 Versuchsreihe:
„Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Temperatur“;
Temperatur: 93 °C

- Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeit v im sauren Bereich über die Steigung des absteigenden Arms. Die in der Probelösung vorhandenen H_3O^+ -Ionen werden zunächst neutralisiert, die Leitfähigkeit nimmt zunächst also ab.



Messkurve 3 Versuchsreihe:
„Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit des pH-Wertes“;
pH-Wert = 3,00

b) Tabellen

Nachfolgend findet man die Messwerte-Tabellen, die den Diagrammen im Hauptteil zugrunde liegen. Die Tabellen sind analog zu den Diagrammen durchnummeriert.

Tabelle 1 Werte für den experimentellen Befund der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Substratkonzentration für den Geltungsbereich der MICHAELIS-MENTEN-Gleichung

c(Harnstoff) in $\frac{\text{mol}}{\text{L}}$	v in $\frac{\mu\text{S}}{\text{s}}$
0,10	4,70
0,02	4,37
0,01	3,70
$5 \cdot 10^{-3}$	3,15
$3 \cdot 10^{-3}$	2,51
$1 \cdot 10^{-3}$	1,37
$5 \cdot 10^{-4}$	0,83
$2 \cdot 10^{-4}$	0,44
$1 \cdot 10^{-4}$	0,28

Tabelle 2 Werte für den experimentellen Befund der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Substratkonzentration für die gesamte Versuchsreihe

c(Harnstoff) in $\frac{\text{mol}}{\text{L}}$	v in $\frac{\mu\text{S}}{\text{s}}$
0,95	2,87
0,40	4,47
0,10	4,70
0,02	4,37
0,01	3,70
$5 \cdot 10^{-3}$	3,15
$3 \cdot 10^{-3}$	2,51
$1 \cdot 10^{-3}$	1,37
$5 \cdot 10^{-4}$	0,83
$2 \cdot 10^{-4}$	0,44
$1 \cdot 10^{-4}$	0,28

Tabelle 3 Werte für die Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Substratkonzentration nach LINEWEAVER und BURK zur Ermittlung von K_M

$\frac{1}{c_S}$ in $\frac{L}{mol}$	$\frac{1}{v}$ in $\frac{s}{\mu S}$
10	0,21
50	0,23
100	0,27
200	0,32
333	0,40
1000	0,73
2000	1,21

Tabelle 4 Werte für den experimentellen Befund der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Enzymkonzentration

c(Urease) in $\frac{mol}{L}$	v in $\frac{\mu S}{s}$
0	0
$2,08 \cdot 10^{-8}$	0,25
$4,17 \cdot 10^{-8}$	0,65
$8,33 \cdot 10^{-8}$	0,93
$2,08 \cdot 10^{-7}$	2,51
$3,33 \cdot 10^{-7}$	4,63
$4,17 \cdot 10^{-7}$	5,15
$6,25 \cdot 10^{-7}$	7,82
$8,33 \cdot 10^{-7}$	9,66
$1,04 \cdot 10^{-6}$	11,81

Tabelle 5 Werte für den experimentellen Befund der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Temperatur

Temperatur in $^{\circ}C$	v in $\frac{\mu S}{s}$
4	0,58
7,5	0,86
15	1,56
25	1,37
30	5,38
38	8,99
48	11,7
52	15,9
59	25,2
64	22,0
76	11,5
82	0
93	0

Tabelle 6 Werte für den experimentellen Befund der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit des pH-Wertes

pH-Wert	v in $\frac{\mu\text{S}}{\text{s}}$
1,97	0
3	2,21
3,85	3,15
6,7	5,33
9,86	4,83
11,8	0
12,7	0

c) CD

Auf der CD befinden sich sämtliche verwendete Internetseiten und die zur Auswertung verwendeten Messkurven.

Quellenangaben

Alle verwendeten Internetseiten befinden sich als Kopie auf der beigefügten CD.

- ¹ Stryer, L., Biochemie, 4.Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin Oxford, 1999
- ² Löffler, G., Petrides, P., Biochemie und Pathobiochemie, 5.Auflage, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1997
- ³ „Biochemisches Grundpraktikum für Biochemiker“, Internetseite: <http://www.ruhr-uni-bochum.de/mol-neurobio/Lehrstuhl/BCGSS2001.pdf>, aufgerufen am 05.01.2004
- ⁴ Karlson, P., Kurzes Lehrbuch der Biochemie, 8. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart, 1972
- ⁵ „Das Net-Lexikon – James Batcheller Sumner (Definition, Erklärung, Bedeutung)“, Internetseite: <http://www.net-lexikon.de/James-Batcheller-Sumner.html>, aufgerufen am 31.12.2003
- ⁶ Blume, Rüdiger: „Die Urease für Experten“, Internetseite: <http://www.chemieunterricht.de/dc2/tip/urease.htm>, letzte Überarbeitung am 15.11.2001 von Wiechoczek, Dagmar, aufgerufen am 05.01.2004
- ⁷ persönliche Auskunft von Prof. Dr. Rüdiger Blume, Universität Bielefeld, Fakultät für Chemie, Didaktik der Chemie II
- ⁸ Lindner, Stefan: „Stefan’s Meerwasser Seiten“, Internetseite: <http://www.sl-online.de/index.html?/strj.html>, aufgerufen am 01.11.2003
- ⁹ „Fachrichtung/ Institution: Mikrobiologie“, Internetseite: <http://www.uni-saarland.de/Forschung/6fb/mikrobio.htm>, aufgerufen am 20.12.2003
- ¹⁰ „Das Dauerwellen“, Internetseite: <http://www.friseur.bedarf.at/tips/dauerwellen.htm>, vom 10.12.2002, aufgerufen am 01.11.2003
- ¹¹ Kirsch, W., Mangold, M., Schlachter, B., Fit fürs Abi in Chemie – Schriftliche und mündliche Prüfung, Schroedel Verlag, Hannover, 2002
- ¹² Lang, G., Reaktionskinetik, Reihe: Studienbücher Chemie, 1. Auflage, Verlag Moritz Disterweg GmbH & Co., Frankfurt am Main, Verlag Sauerländer AG, Aarau, 1990

-
- ¹³ Blume, Rüdiger: „Die Geschichte der Michaelis-Menten-Gleichung“,
Internetseite: <http://www.chemieunterricht.de/dc2/rk/mm-histo.htm>,
letzte Überarbeitung am 04.11.2002 von Wiechoczek, Dagmar,
aufgerufen am 01.11.2003
- ¹⁴ Löwe, B., Biochemie,
Buchners Verlag, Bamberg, 1989
- ¹⁵ Blume, Rüdiger: „Beschreibung einzelner Stoffklassen, Aminosäuren – Peptide - Proteine“,
Internetseite: http://www.chemieunterricht.de/dc2/wsu-bclm/kap_02a.htm,
letzte Überarbeitung am 07.06.2001 von Wiechoczek, Dagmar,
aufgerufen am 01.11.2003
- ¹⁶ „Schwertbohne (*Canavalia gladiata* [Jacq.]DC.)“,
Internetseite:
http://bibd.uni-giessen.de/gdoc/2000/uni/p000003/sch_bohn.htm#TopOfPage
vom 20.03.2000, aufgerufen am 16.11.2003
- ¹⁷ Helmich, Ulrich: „Proteine“,
Internetseite: <http://www.u-helmich.de/bio/cyt/reihe04/Proteine2002.pdf>
vom März 2002, aufgerufen am 16.11.2003
- ¹⁸ Atkins, Peter W., Physikalische Chemie, 3. korrigierte Auflage,
Wiley-VCH, Weinheim New York Chichester Brisbane Singapore Toronto,
2002