

Ein Beitrag zur viskosimetrischen Verfolgung der Kinetik bestimmter Enzymreaktionen und Bestimmung der Enzymaktivität*

Von

Metodi Tschetkarov und Dimiter Koleff**

Fakultät für Physik der Universität Sofia
Sofia, Bulgarien

Mit 2 Abbildungen

(Eingegangen am 23. Juni 1966)

Es wurde eine Theorie aufgestellt, die es gestattet, die Kinetik bestimmter enzymatischer Hydrolysen und die Aktivität des daran beteiligten Enzyms zu verfolgen. Die spezif. Aktivität k des Enzyms ist durch diejenige Reaktionsgeschwindigkeit gegeben, die durch die Einheit der Enzymmasse in der Volumseinheit pro Zeiteinheit bewirkt wird. Nach der hier aufgestellten Theorie hängt die spezif. Aktivität des Enzyms nicht vom Molekulargewicht und der Konzentration des verwendeten Substrates ab.

A theory has been set for tracing the kinetics of some hydrolysis enzymes, which allows to determine the activity of the enzyme participating in them. The specific activity k of the latter is determined through the reaction rate in a unit of volume by a unit of enzyme mass for a unit of time ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$). According to this theory, the specific activity of the enzyme does not depend on the molecular weight and the concentration of the substrate used.

Einführung

Hydrolysenreaktionen sind in der Biosphäre weit verbreitet. Man versteht darunter Reaktionen, in welchen unter der katalysierenden Wirkung der Hydrolasen genannten Enzyme bestimmte Bindungen gesprengt und gleichzeitig die Elemente des Wassers an die entstandenen Fragmente addiert werden.

* Herrn Prof. Dr. *T. Trandafilov* zum 60. Geburtstag gewidmet.

** Gegenwärtige Adresse: Institut für Biochemie der Bulgarischen Akademie der Wissenschaften, Sofia.

Die Methode der viskosimetrischen Verfolgung des Hydrolysenvorganges wird zur qualitativen Bestimmung des katalysierenden Enzyms verwendet und weist einige wesentliche Vorteile auf: Empfindlichkeit, gute Reproduzierbarkeit, die Möglichkeit, den Beginn der Reaktion zu erfassen und ihre Kinetik zu verfolgen. In den bis jetzt veröffentlichten Arbeiten, die sich dieser Methode durch Bestimmung der spezifischen Viskosität bedienen, werden für die Aktivität des beteiligten Enzyms verschiedene Einheiten verwendet. In vielen Fällen sind diese Einheiten ganz willkürlich gewählt, weil die verschiedenen Autoren einen unterschiedlichen Abbaugrad des Substrats annehmen¹.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Auffindung einer Gleichung, welche die Kinetik des Abbaues des Substrats beschreibt, wenn man die Reaktion durch Bestimmung der Änderung der spezifischen Viskosität verfolgt. Aus der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante dieser Reaktion läßt sich die spezifische Aktivität des beteiligten Enzyms ermitteln, welche von der Konzentration, dem Molekulargewicht und der Konzentration des Substrats unabhängig ist.

Theorie

Wir führen in eine enzymkatalysierte Hydrolysenreaktion die folgenden Symbole und Bedeutungen ein:

$[S]$	Substratkonzentration in mg/ml
$[E]$	Enzymkonzentration in mg/ml
η	dynamische Viskosität der Lösung
η_0	dynamische Viskosität des reinen Lösungsmittels
$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0}$	spezifische Viskosität
$Z_\eta = \frac{\eta_{sp}}{[S]}$	Viskositätszahl
$[\eta] = \lim_{[S] \rightarrow 0} Z_\eta$	Grenzviskositätszahl

$[S_0]$ die Anfangskonzentration des Substrats, $[P_\infty]$ die nach theoretisch unendlicher Hydrolysezeit vorhandene Konzentration der Reaktionsprodukte.

Im allgemeinsten Fall läßt sich die Abhängigkeit der Viskositätszahl von der Substratkonzentration als Potenzreihe² darstellen:

$$Z_\eta = A + B [S] + C [S]^2 + \dots \quad (1)$$

¹ V. I. Bilai, Biologically active substances of microscopic fungi and their alterations. Kiev: Nauk. Dumka 1965.

² P. W. Allen, Techniques of polymer characterization, p. 226. London: Butterworth 1952.

Im Falle unendlicher Verdünnung, wenn also die Substratkonzentration sich dem Wert Null nähert, bestimmt das erste Glied dieser Reihe die Grenzviskositätszahl

$$[\eta] = \lim_{[S] \rightarrow 0} Z_{\eta} = A, \quad (2)$$

die nach (3) andererseits dem Molekulargewicht M des polymeren Substrats proportional ist:

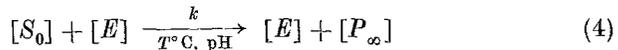
$$[\eta] = K \cdot M^a \quad (3)$$

K und a sind Konstante, die nicht nur von der chemischen Zusammensetzung und Struktur der einzelnen hochmolekularen Verbindungen abhängen, sondern auch vom Lösungsmittel und, zu einem geringeren Grade, von der Temperatur. Im allgemeinen ist

$$0 < a \leq 2 \text{ und } K < 1.$$

Für $a = 1$ nimmt die Abhängigkeit eine einfachere Form an⁴. K und a können graphisch aus dem Diagramm der logarithmischen Form von Gl. (3) ermittelt werden.

Für den Fall einer unilateralen (irreversiblen, einseitigen, eindeutigen) Umwandlung (Transformation) eines Substrats kann die enzymatische Hydrolyse durch die allgemeine Reaktionsgleichung



beschrieben werden.

Bezeichnen wir mit m das Molekulargewicht des Elementarbausteins und mit n den Polymerisationsgrad des Polymeren, dann ist das Molekulargewicht des polymeren Substrats zu Beginn der enzymatischen Hydrolyse $M_0 = m \cdot n$. Im Verlaufe der enzymatischen Hydrolyse wird dieses Anfangsmolekulargewicht abnehmen und nach unendlich langer Zeit

$$M_0 + n \cdot m_{H_2O} = n \cdot m + n \cdot m_{H_2O} \xrightarrow{k} n M_{\infty} = n (m + m_{H_2O}) \quad (5)$$

betragen.

$M_{\infty} = n + m_{H_2O}$ bedeutet darin das Molekulargewicht des nach unendlich langer Enzymeinwirkung erhaltenen Reaktionsprodukts und m_{H_2O} das Molekulargewicht des Wassers.

Infolgedessen wird im Verlaufe der enzymatischen Hydrolyse eine kontinuierliche Abnahme des Molekulargewichtes des Substrats beobachtet, nämlich

$$M_0(0) \longrightarrow M(t) \longrightarrow M_{\infty}(\infty), \quad (6)$$

³ H. Mark, Der feste Körper, p. 103. Leipzig: Hirzel 1938; R. Houwink, J. prakt. Chem. **157**, 15 (1940).

⁴ H. Staudinger und W. Heuer, Ber. dtsh. chem. Ges. **63**, 222 (1930); H. Staudinger und W. Nodzy, Ber. dtsh. chem. Ges. **63**, 721 (1930).

worin $M(t)$ das Molekulargewicht des abgebauten Substrats im Zeitpunkt t nach Beginn der enzymatischen Hydrolyse ist. Die Abnahme des Molekulargewichts des Substrats im Zeitpunkt t ist der Enzymkonzentration $[E]$, dem gerade vorhandenen Molekulargewicht M und der Zeit t des Abbaues proportional:

$$dM = -k M [E] dt. \quad (7)$$

k ist die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante des Substratabbaues, hängt spezifisch vom Enzym ab und ist eine für jedes Enzym charakteristische Größe, die unabhängig ist vom Molekulargewicht des abgebauten Substrats und seiner Konzentration. k hängt hingegen ab von der Temperatur, vom pH, von Inhibitoren und Aktivatoren. Hydrolysiert das Enzym auch noch andere Substrate, so wird k , unter optimalen Bedingungen, einen anderen Wert besitzen. Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante charakterisiert daher das Enzym—Substrat-Paar und hängt weder von der Konzentration des Enzyms noch der des Substrats ab, noch vom Molekulargewicht des letzteren. Sie erscheint daher als Maß für die spezifische Aktivität des Enzyms in der Hydrolyse-reaktion. Im CGS-System besitzt k die Dimension $[\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}]$ und ist gleich der Geschwindigkeit der Reaktion einer Masseneinheit des Enzyms pro Volumseinheit in der Zeiteinheit.

Durch Integration der Gl. (7) in den durch Gl. (6) gegebenen Grenzen

$$\int_{M_0 - M_\infty}^{M - M_\infty} \frac{dM}{M} = -k [E] \int_0^t dt. \quad (8)$$

erhält man den folgenden Ausdruck für die Änderung des Molekulargewichts mit der Zeit:

$$M(t) = (M_0 - M_\infty) e^{-k[E]t} + M_\infty. \quad (9)$$

Gl. (9) liefert das Molekulargewicht $M(t)$ des Substrats in einem beliebigen Zeitpunkt nach Beginn der enzymatischen Hydrolyse. Für $[E] = 0$ und $t = 0$ erhält man aus (9)

$$M(0) = M_0$$

d. h. das Molekulargewicht des Substrats erleidet in Abwesenheit des Enzyms keine Änderung. Für $E \neq 0$ und $t = \infty$ ist $M = M_\infty$, d. h. das Molekulargewicht des Substrats verändert sich unter dem Einfluß des Enzyms nach einer hinreichend langen Einwirkungszeit und erreicht schließlich den Wert des Molekulargewichts des Reaktionsprodukts.

Diese Veränderung des Molekulargewichts des Substrats kann mit Hilfe von Gl. (3) mit der spezifischen Viskosität der Lösung verknüpft werden

$$\gamma_{\text{sp}} = Z_\eta [S] = K [S] M^a + B [S]^2 \quad (10)$$

Für nicht zu große Konzentrationen kann $[S]^2$ vernachlässigt werden, da das 2. Glied der rechten Seite der Gleichung kleiner ist als das 1. Glied. Dies entspricht einer fast linearen Beziehung zwischen η_{sp} und $[S]$.

Die Werte der Substratanfangskonzentration $[S]$ sind so gewählt, daß sie den folgenden Bedingungen gehorchen:

$$[S] \leq [S_0] = \frac{[\eta]}{4B}. \quad (11)$$

B und $[\eta]$ sind durch die Neigungen der für $[S] \rightarrow 0$ extrapolierten Werte der Geraden

$$Z_\eta = [\eta] + B[S]$$

für die entsprechenden MG des Substrats gegeben. Diese Bedingung erscheint für die viskosimetrische Messung notwendig, um einen homogenen Abbau des Substrats im gesamten Volumen zu gewährleisten. Die Konzentration des Substrats ist so gewählt, daß $[E] \leq [S]$. Damit können wir Gl. (10) in folgender Weise schreiben:

$$\sqrt[a]{\eta_{sp}(t)} = \eta'_{sp}(t) = \sqrt[a]{k[S]M^a} = DM(t) \quad (12)$$

Durch Einsetzen von (9) in (12) erhalten wir

$$\eta'_{sp}(t) = [DM_0 - DM_\infty] e^{-k[E]t} + DM_\infty \quad (13)$$

oder

$$\eta'_{sp}(t) = [\eta'_{sp}(0) - \eta'_{sp}(\infty)] e^{-k[E]t} + \eta'_{sp}(\infty), \quad (14)$$

wobei wir gleichzeitig für $D \cdot M_0 = \eta'_{sp}(0)$ und für $D \cdot M_\infty = \eta'_{sp}(\infty)$ gesetzt haben. Durch Logarithmieren läßt sich (14) in noch einfacherer Form anschreiben:

$$\ln \theta(t) = \ln \theta(0) - k[E]t, \quad (15)$$

worin

$$\theta(t) = \eta'_{sp}(t) - \eta'_{sp}(\infty) \quad \text{und} \quad \theta(0) = \eta'_{sp}(0) - \eta'_{sp}(\infty).$$

Die aus der Theorie gezogenen Schlußfolgerungen können experimentell auf folgendem Wege geprüft werden: Man bedient sich eines Substrats mit verschiedenen Molekulargewichten M und mißt bei kleinen Konzentrationen $[S]$ in einer Pufferlösung die spezif. Viskosität η_{sp} (s. Abb. 1 a). Mit Hilfe der so erhaltenen Ergebnisse trägt man $Z_\eta = f([S])$ auf und bestimmt durch lineare Extrapolation die Grenzviskositäten $[\eta]$ und die Neigungen B für die verschiedenen Molekulargewichte M (Abb. 1 b). Aus dem Diagramm der logarithmischen Form von Gl. (3)

$$\lg [\eta] = \lg K + a \lg M$$

kann K und a entnommen werden (Abb. 1 c).

Zu einer bestimmten Menge $[S] \cong [S_0]$ des Substrats wird unter optimalen Bedingungen (pH, T) eine bestimmte Menge des Enzyms entsprechend der Konzentrationsbedingung

$$[E] < [S]$$

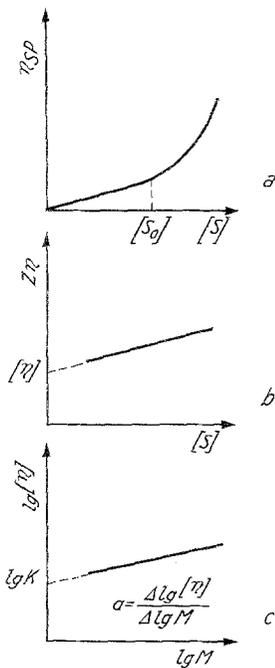


Abb. 1

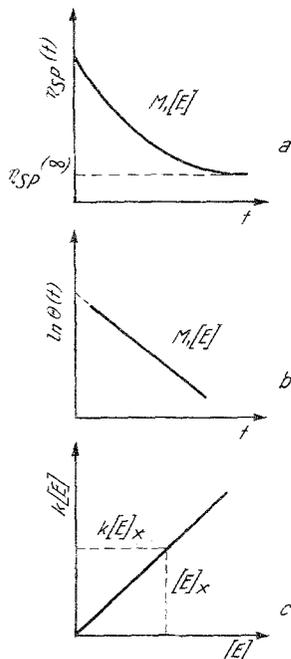


Abb. 2

Abb. 1. Schematische Darstellung a) der Abhängigkeit der spezifischen Viskosität η_{sp} von der Substratkonzentration $[S]$; b) der Abhängigkeit der Viskositätszahl Z_η von $[S]$; c) der Abhängigkeit der Grenzviskositätszahl $[\eta]$ vom Molekulargewicht M des Substrats

Abb. 2. Schematische Darstellung a) der Abhängigkeit der spezif. Viskosität $\eta_{sp}(t)$ von der Zeit (t) der Enzymreaktion für ein Substrat des gegebenen Molekulargewichtes M bei einer Enzymkonzentration $[E]$; b) der gleichen Abhängigkeit in logarithmischer Form (vgl. Text); c) der Abhängigkeit des Kehrwertes der Relaxationszeit $k[E] = 1/\tau$ von der Enzymkonzentration $[E]$

zugesetzt und die spezif. Viskosität $\eta_{sp}(t)$ zu bestimmten Zeitpunkten der enzymatischen Hydrolyse gemessen (Abb. 2 a). Für jeden Zeitpunkt t werden die Werte

$$\eta'_{sp} = \sqrt[3]{\eta_{sp}(t)} \quad \text{und} \quad \eta'_{sp}(\infty) = \sqrt[3]{\eta_{sp}(\infty)}$$

berechnet und entsprechend Gl. (15) $\ln \theta(t) = f(t)$ gegen die verschiedenen Molegewichte (M) bei verschiedenen Enzymkonzentrationen $[E]$ aufgetragen (Abb. 2 b). Aus der Neigung der so erhaltenen Geraden kann man $k[E]$ bestimmen und graphisch als Funktion von $[E]$ ausdrücken (Abb. 2 c). Die Neigung der Geraden ist ein Maß für die spezif. Aktivität des Enzyms k (Reaktionsgeschwindigkeitskonstante).

Das mit einem reinen Enzym aufgestellte Eichdiagramm (Abb. 2 c) gestattet es, in beliebigen Proben einer enzymatischen Hydrolyse der gleichen Art die Konzentration $[E]_x$ des Enzyms zu bestimmen. Es genügt, für diese Probe die Diagramme der Abb. 2 a und 2 b zu zeichnen und aus letzteren $k [E]_x$ in der angegebenen Weise zu bestimmen.

Durch Differenzieren von Gl. (9) nach der Zeit erhält man die Änderung des MG (M) des Substrats mit der Zeit. Diese Änderung ist, mit dem entgegengesetzten Vorzeichen versehen, gleich der RG

$$v(t) = -\frac{dM}{dt} = k[E](M_0 - M_\infty)e^{-k[E]t} \quad (16)$$

der Enzymreaktion, die mit der Zeit t ständig abnimmt. Der Anfangswert ist

$$v(0) = k[E](M_0 - M_\infty). \quad (17)$$

Für den Fall sehr großer Molekulargewichte des Polymeren $M_0 \gg M_\infty$ nimmt Gl. (17) die Form

$$v(0) = k[E]M_0 \quad (18)$$

an. Die Messung erfolgt in Internationalen Aktivitätseinheiten ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$).

Die Beziehung zwischen der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit $v(0)$ und der Enzymkonzentration $[E]$ bestimmt die spezifische Anfangsaktivität

$$\frac{v(0)}{[E]} = kM_0, \quad (19)$$

welche in der Einheit ($\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$) gemessen werden kann.

Das Molekulargewicht des Substrats ist in einem beliebigen Zeitpunkt der Enzymreaktion gegeben durch

$$M(t) = m \cdot n(t),$$

worin m wieder das Molekulargewicht des Monomeren und $n(t)$ der Polymerisationsgrad ist. In Übereinstimmung mit Gl. (18) kann die molekulare Anfangsaktivität $[Z(0)]$ dann ausgedrückt werden durch

$$Z(0) = \frac{v(0)}{m} = k[E]n(0) \quad (20)$$

Der Anfangsgrad der Polymerisation ist hier gegeben durch

$$n(0) = \frac{M_0}{m}.$$

Die Dimension der molekularen Aktivität in internationalen Einheiten ist min^{-1} .

Die Beziehung zwischen molekularer Anfangsaktivität $Z(0)$ und der Enzymkonzentration $[E]$ bestimmt die spezifische molekulare Anfangsaktivität

$$\frac{Z(0)}{[E]} = kn(0), \quad (21)$$

gemessen in Einheiten von $(\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$.

Da alle Ausdrücke für die Enzymaktivität die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k enthalten, schlagen wir vor, $k = 1$ ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$) *ein Ferm* zu nennen.