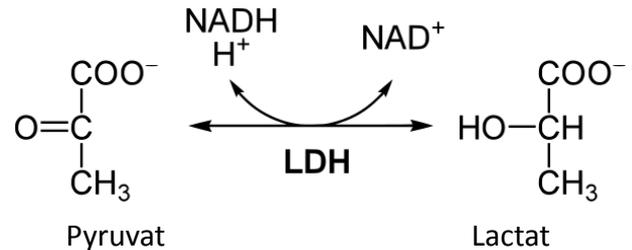


Versuch 4: Bestimmung der Michaeliskontanten der Laktatdehydrogenase (LDH)

Einführung:

Im Zytoplasma der Zellen ist dieses Enzym oftmals gelöst und oxidiert die Alkoholgruppe vom Lactat mithilfe von NAD⁺ zu einem Carbonyl. In diesem Versuch werden wir die Michaelis-Menten-Konstante für dieses Enzym bestimmen. Diese Konstante ist die Konzentration welche man bei der Hälfte der maximalen Umsatzgeschwindigkeit vorliegen hat.



Die Umsatzgeschwindigkeit von Enzymen werden von diversen Mechanismen beeinflusst. So gibt es verschiedene Arten von Hemmung:

1. Kompetitive Hemmung: Es gibt ein Konkurrenzsubstrat, welches um die Bindestelle des aktiven Zentrums konkurriert.
2. Allosterische Hemmung: Hier bindet ein Inhibitor an das Enzym und verändert dieses so, dass das Substrat nicht mehr bzw. nur noch schwächer an das aktive Zentrum binden kann.
3. Unkompetitive Hemmung: Hier bindet der Inhibitor nur an den Enzym-Substrat-Komplex.

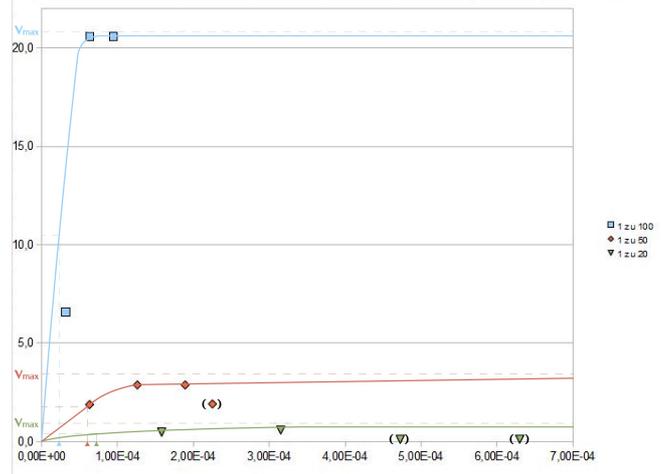
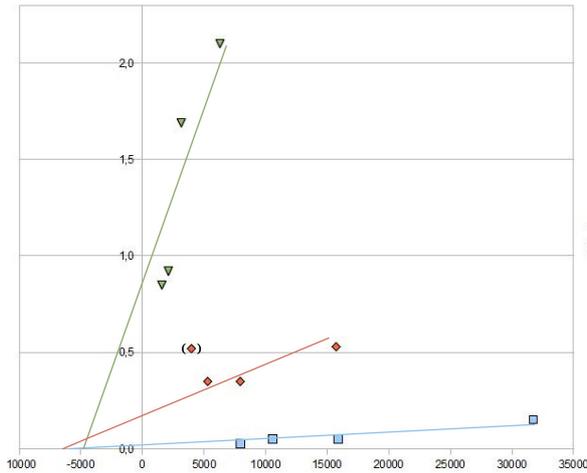
Durchführung:

		1 : 100			
Einheit	Probe	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>
mol/L	C _{Pyruvat}	3,15*10 ⁻⁵	6,3*10 ⁻⁵	9,45*10 ⁻⁵	1,26*10 ⁻⁴
1/mV	ΔE/Δt	0,225	0,70	0,68	1,24
μmol/min*ml	U/ml	6,6	20,6	20,6	36,5
L/mol	1/c	31.746	15.873	10.582	7.936
s/μmol	1/U	0,1515	0,05	0,05	0,027

		1 : 50			
Einheit	Probe	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>
mol/L	C _{Pyruvat}	6,3*10 ⁻⁵	1,26*10 ⁻⁴	1,89*10 ⁻⁴	2,52*10 ⁻⁴
1/mV	ΔE/Δt	0,064	0,098	0,098	0,065
μmol/min*ml	U/ml	1,88	2,88	2,88	1,91
L/mol	1/c	15.718	7.936	5.291	3.968
s/μmol	1/U	0,53	0,35	0,35	0,52

		1 : 20			
Einheit	Probe	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>
mol/L	C _{Pyruvat}	1,58*10 ⁻⁴	3,15*10 ⁻⁴	4,725*10 ⁻⁴	6,3*10 ⁻⁴
1/mV	ΔE/Δt	0,016	0,02	0,0036	0,004
μmol/min*ml	U/ml	0,47	0,59	0,11	0,12
L/mol	1/c	6.289	3.144	2.096	1.572
s/μmol	1/U	2,1	1,69	0,92	0,85

Ergebnisse:



	1:100	1:50	1:20	Schnitt
Wert	-5833	-7106	-4931	-5957
K_M	0,171	0,141	0,202	1,67

	1:100	1:50	1:20	Schnitt
Wert	$0,22 \cdot 10^{-5}$	$0,58 \cdot 10^{-5}$	$0,67 \cdot 10^{-5}$	$0,49 \cdot 10^{-5}$
K_M	0,022	0,058	0,067	0,049

Diskussion:

Die Michaelis-Menten-Konstanten, die aus der Lineweaver-Burk-Darstellung abgelesen wurden sind, liegen recht nahe den Literaturwerten. Wenn man diese Konstanten aus einem Michaelis-Menten-Diagramm ablesen will, muss man subjektiv entscheiden, wo die Sättigung liegt. Bei diesem Schritt kann es sein, dass man große Abweichungen generiert (erst recht, wenn man nur 4 Messwerte hat!).

Es wurden „Außreißer“-Messwerte nicht berücksichtigt (Im Diagramm eingeklammert bzw. nicht aufgeführt), damit die Graphen generierbar sind.

Weitere Fehlerquellen sind die Messpipetten, die schlecht geeicht sein könnten, bzw. durch Alterserscheinungen nicht mehr die korrekten Mengen aufziehen (oftmals war Luftblasenbildung zu beobachten). Dies führt gerade bei der 1:100-Verdünnung zu großen Abweichungen.