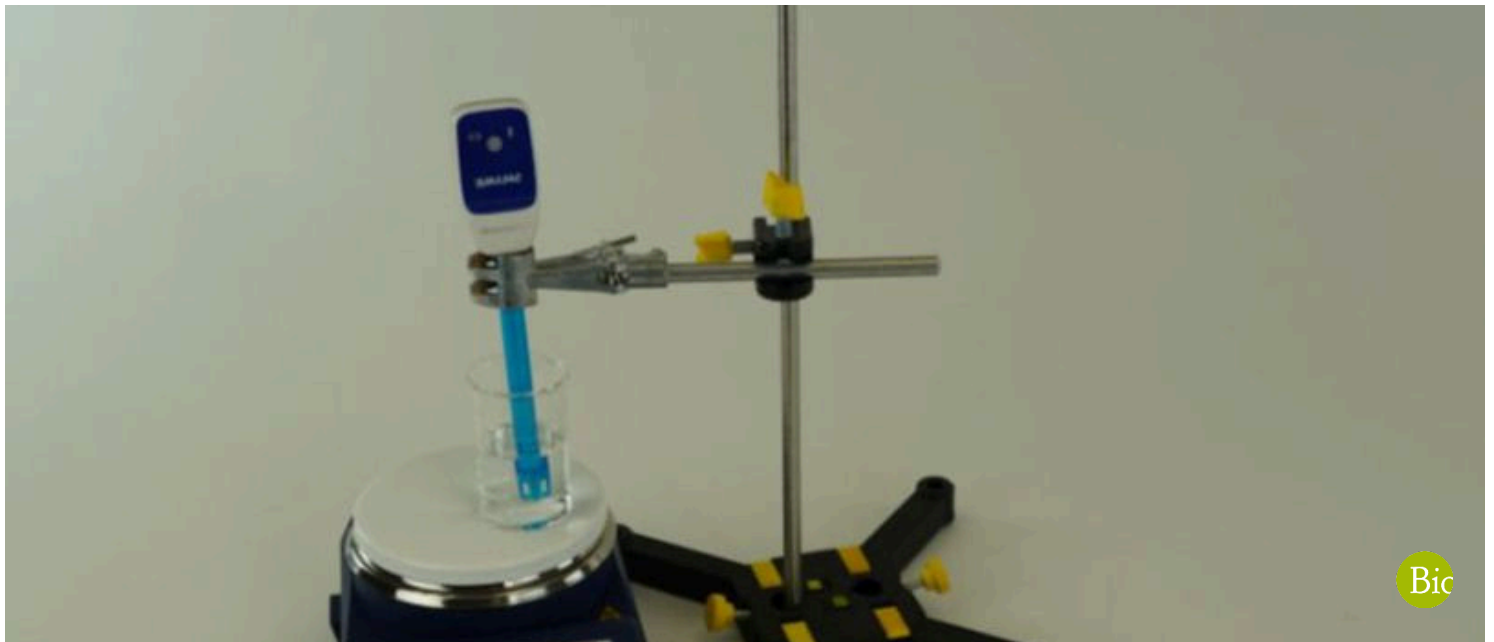


Bestimmung der Michaeliskonstanten mit Cobra SMARTsense



Chemie

Organische Chemie

Biochemie

Biologie

Biochemie

Applied Science

Medizin

Biochemie



Schwierigkeitsgrad

mittel



Gruppengröße

2



Vorbereitungszeit

10 Minuten



Durchführungszeit

40 Minuten

PHYWE
excellence in science

Allgemeine Informationen

Anwendung

PHYWE
excellence in science

Versuchsaufbau

Die enzymatische Hydrolyse von Harnstoff in wässriger Lösung liefert Kohlenstoffdioxid und Ammoniak. Die Ionen dieser Verbindungen erhöhen die Leitfähigkeit der Lösung. Über Leitfähigkeitsmessungen können die Geschwindigkeiten der Harnstoffhydrolyse durch das Enzym Urease bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen bestimmt werden. Aus diesen Werten lässt sich die Michaeliskonstante berechnen.

Sonstige Informationen (1/7)

PHYWE
excellence in science

Vorwissen



Die Schüler und Studenten sollten mit Enzym-Substrat-Komplexen, der enzymatischen Harnstoffhydrolyse und dem Prinzip der Leitfähigkeitsmessung vertraut sein.

Prinzip



Über Leitfähigkeitsmessungen wird die Michaeliskonstante berechnet.

Sonstige Informationen (2/7)

PHYWE
excellence in science

Lernziel



Die Schüler und Studenten sollen lernen, wie über die Bestimmung der Leitfähigkeit (über Hydrolyse von Harnstoff, welche Kohlenstoffdioxid und Ammoniak liefert) die Michaeliskonstante berechnet werden kann.

Aufgaben

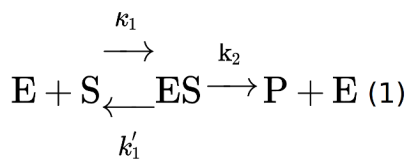


Die Schüler und Studenten sollen die Michaeliskonstante aus den in diesem Versuch ermittelten Messwerten bestimmen.

Sonstige Informationen (3/7)

Weitere Informationen zur Auswertung und Vorbereitung

- Zur Bestimmung der Michaelis-Konstanten werden die Leitfähigkeitswerte zu den Zeitpunkten 100 s und 200 s und ihre Differenz ΔY für alle sechs durchgeführten Messungen ermittelt und protokolliert.
- Der Mechanismus von enzymkatalysierten Reaktionen nach Michaelis-Menten geht von einem Enzym-Substrat-Komplex ES aus, das aus dem Enzym E und dem Substrat S in einer vorgelagerten Gleichgewichtsreaktion entsteht und zu Produkt P und unverändertem Enzym E zerfällt.



$$\frac{dc_{ES}}{dt} = k_1 c_E c_S - k_1' c_{ES} - k_2 c_{ES} \approx 0 \quad (2)$$

Nach dem Bodensteinprinzip ist die zeitliche Änderung der Konzentration von ES ≈ 0 .

Sonstige Informationen (4/7)

Umgestellt nach der Konzentration von ES ergibt sich:

$$c_{ES} = \frac{k_1 c_E c_S}{k_1' + k_2} \quad (3)$$

Die freie Substratkonzentration c_S kann der Gesamtkonzentration von S gleichgesetzt werden, da nur wenig Enzym zugegeben wird. Die Gesamtkonzentration von E, $c_{E,0}$ ist gleich der Summe der Konzentration an freiem Enzym c_E und an Enzym-Substrat-Komplex c_{ES} :

$$c_{E,0} = c_E + c_{ES} \quad (4)$$

Nach Umstellen und Einsetzen von Gleichung (4) in Gleichung (3) erhält man:

$$c_{ES} = \frac{k_1 \cdot (c_{E,0} - c_{ES}) c_S}{k_1' + k_2} \quad (5)$$

Umstellen nach c_{ES} liefert:

$$c_{ES} = \frac{k_1 \cdot c_{E,0} \cdot c_S}{k_1' + k_2 + k_1 c_S} \quad (6)$$

Sonstige Informationen (5/7)

PHYWE
excellence in science

Für den Schritt der Produktbildung lautet das Zeitgesetz: $\frac{dc_p}{dt} = k_2 c_{ES}$ (7)

Setzt man für c_{ES} den Ausdruck Gleichung (6) ein, erhält man: $\frac{dc_p}{dt} = \frac{k_1 k_2 c_{E,0} c_S}{k_1 + k_2 + k_1 c_S}$ (8)

Der Quotient $\frac{k_1 + k_2}{k_1} = K_M$ (9) wird zur Michaeliskonstante, K_M , zusammengefasst. Somit lautet das Zeitgesetz: $\frac{dc_p}{dt} = \frac{k_2 c_{E,0} c_S}{K_M + c_S}$ (10)

Die Geschwindigkeit der Enzymolyse ist also linear von der Enzymkonzentration abhängig. Der Einfluss der Substratkonzentration ist komplizierter. Für den Fall $c_S > K_M$ vereinfacht sich die Gleichung (10) zu

$$\frac{dc_p}{dt} = k_2 c_{E,0} \quad (11)$$

Sonstige Informationen (6/7)

PHYWE
excellence in science

In diesem Fall ist die Reaktion nullter Ordnung nach S und die Enzymolyse hat ihr Geschwindigkeitsmaximum mit $k_2 c_{E,0}$. Ist $c_S = K_M$, so wird die Hälfte der Maximalgeschwindigkeit erreicht. Die Michaeliskonstante entspricht also der Substratkonzentration, bei der die Reaktion mit halbmaximaler Geschwindigkeit abläuft. Für den Fall, dass nur noch wenig Substrat vorhanden ist, also $c_S > K_M$, ergibt sich

$$\frac{dc_p}{dt} = \frac{k_2}{K_M} \cdot c_{E,0} c_S \quad (12)$$

d.h., die Bildungsgeschwindigkeit von P ist erster Ordnung nach E und S.

Zur Auswertung werden die Durchschnittsgeschwindigkeiten der Enzymolyse zwischen 100 s und 200 s nach dem Start bestimmt. Es ist dazu die Differenz der Leitfähigkeitswerte nach jeweils 100 und 200 Sekunden zu bilden (ΔY) und durch 100 s zu teilen. Diese Geschwindigkeiten (in $\mu S \text{ cm}^{-1} \text{ s}^{-1}$) werden gegen die Harnstoffkonzentration (in mmol l^{-1}) aufgetragen. Die Substratkonzentration c_S (in mmol/l) ergibt sich nach der Formel:

$c_S = (W10000)/M$ (13) mit **W** = Konzentration der Harnstofflösung in % und **M** = molaren Masse von Harnstoff = 60,06 g/mol.

Sonstige Informationen (7/7)

PHYWE
excellence in science

Da es schwierig ist, die der halbmaximalen Geschwindigkeit entsprechende Konzentration, also K_M , direkt abzulesen, bedient man sich der Lineweaver-Burk-Auftragung.

Mit der Reaktionsgeschwindigkeit $v = dc_P/dt$ und in reziproker Darstellung erhält man aus Gleichung (10):

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{k_2} + \frac{K_M}{k_2} \cdot \frac{1}{c_S} \quad (14)$$

Die Auftragung von $1/v$ gegen $1/c_S$ (vgl. Abb.5) liefert k_2 (hoch -1) demnach als Ordinatenabschnitt ($1/c_S=0$) und K_M/k_2 als Anstieg einer Geraden. Zunächst werden der Ordinatenabschnitt und die Steigung der Geraden ermittelt. Diese Steigung wird dann durch den Ordinatenabschnitt geteilt, um die Michaelis-Konstante zu erhalten. Die Berechnung ergibt einen Wert von $4,86 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ für die Michaelis-Konstante von Urease.

Ein kleiner K_M -Wert bedeutet eine hohe Affinität des Enzyms zu seinem Substrat.

Urease war das erste Enzym, das kristallin dargestellt wurde (Sumner, 1926). Es gehört, im Gegensatz zu den allosterischen Enzymen, zu den „normalen“ Enzymen, die dem Michaelis-Menten-Mechanismus genügen.

Sicherheitshinweise

PHYWE
excellence in science

- Für diesen Versuch gelten die allgemeinen Hinweise zum sicheren Experimentieren im naturwissenschaftlichen Unterricht.

Theorie

Urease katalysiert die enzymatische Hydrolyse von Harnstoff in Wasser und liefert dabei Kohlenstoffdioxid und Wasser. Mit Hilfe des SMARTsense Conductivity Sensors lässt sich die Leitfähigkeit der so entstandenen Lösung messen. Dadurch kann verfolgt werden, wie die Ionen der Verbindung die Leitfähigkeit erhöhen.

Mit der Michaeliskonstante wird die Substratkonzentration angegeben, bei der die halbe maximale Geschwindigkeit eines Enzyms erreicht ist.

Da über die Leitfähigkeitsmessung die Geschwindigkeiten der Harnstoffhydrolyse bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen gemessen werden kann, lässt sich aus diesen Werten die Michaeliskonstante berechnen.

Material

Position	Material	Art.-Nr.	Menge
1	Cobra SMARTsense - Conductivity, 0...20000 µS/cm, 0...100°C (Bluetooth)	12922-00	1
2	Magnetrührstäbchen-Entferner	35680-03	1
3	Magnetrührer ohne Heizung für 3 Liter, 230 V	35761-99	1
4	Magnetrührstäbchen, PTFE, 30 mm, zylindrische Form	46299-02	1
5	Kompaktwaage, OHAUS TA 302, 300 g : 10 mg	49241-93	1
6	Bunsenstativ, 210 x 130 mm, h = 750 mm	37694-00	1
7	Doppelmuffe, für Kreuz- oder T-Spannung	02043-00	1
8	Stativklemme, Spannweite 80 mm mit Stellschraube	37715-01	1
9	Becherglas, Boro, hohe Form, 100 ml	46026-00	6
10	Laborbecher, Kunststoff (PP), 250 ml	36013-01	1
11	Erlenmeyerkolben, Boro, 100 ml, SB 19	MAU-EK17082002	6
12	Gummistopfen 17/22, ohne Bohrung	39255-00	6
13	Vollpipette, 20 ml	36579-00	1
14	Vollpipette, 50 ml	36581-00	1
15	Pipettierball, Flip-Modell, Pipetten bis 100 ml	36592-00	1
16	Mikroliterspritze, Boro, 100 Mikroliter	02606-00	1
17	Mikrospatellöffel, Stahl, l = 150	33393-00	1
18	Spritflasche, 500 ml, Kunststoff	33931-00	1
19	Harnstoff, 250 g	30086-25	1
20	Urease-Lsg.in 50% Glycerin, 10 ml	31924-03	1
21	Wasser, destilliert, 5 l	31246-81	1
22	measureAPP - die kostenlose Mess-Software für alle Endgeräte	14581-61	1

Zusätzliches Material

PHYWE
excellence in science

Position	Art. Nr.	Bezeichnung
1		mobiles Endgerät (Smartphone / Tablet)
2	14581-61	measureAPP

PHYWE
excellence in science

Aufbau und Durchführung

Aufbau (1/3)

PHYWE
excellence in science

Zur Messung der Leitfähigkeit wird der Cobra SMARTsense Conductivity und die measureAPP benötigt. Kontrolliere, ob an deinem Gerät (Tablet, Smartphone) "Bluetooth" aktiviert ist (die App kann im App Store kostenlos heruntergeladen werden - QR-Codes unten). Öffne nun auf deinem Gerät die measureAPP.



measureAPP für

Android Betriebssysteme



measureAPP für

iOS Betriebssysteme

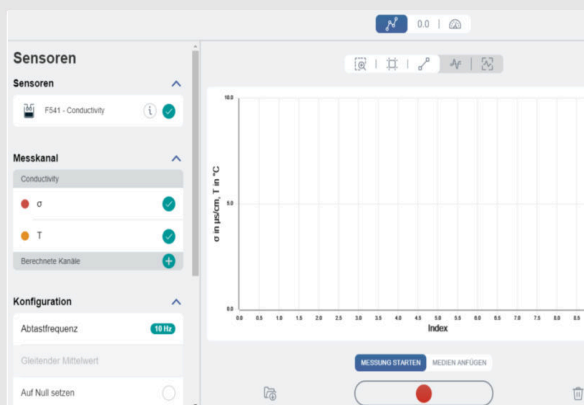


measureAPP für

Tablets und PCs mit Windows 10

Aufbau (2/3)

PHYWE
excellence in science



Bedienoberfläche measureApp
in der Windows 10 Version

- Schalte den SMARTsense Conductivity Sensor durch langes Drücken auf den Einschaltknopf an.
- Verbinde den Sensor in der measureAPP unter dem Punkt "Measure" mit dem Gerät, wie in Abbildung links gezeigt.
- Der SMARTSense Conductivity Sensor wird nun in der App angezeigt.

Aufbau (2/3)

Für den Versuch werden Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen an Harnstoff benötigt. Diese sind vor Versuchsbeginn jeweils frisch herzustellen:

- 0,4%ige Harnstoff-Lösung (Harnstoff-Stammlösung): In einen 100 ml-Erlenmeyerkolben werden 0,40 g Harnstoff eingewogen und in 99,6 g destilliertem Wasser gelöst.
- 0,2%ige Harnstoff-Lösung: Durch Pipettieren von 50 ml der 0,4%igen Harnstoff-Lösung mit der 50 ml Vollpipette in einen 100-ml-Erlenmeyerkolben und Zugabe von 50 ml destilliertem Wasser.
- 0,1%ige Harnstoff-Lösung: Durch Pipettieren von 50 ml der 0,2%igen Harnstoff-Lösung mit der 50 ml Vollpipette in einen 100-ml-Erlenmeyerkolben und Zugabe von 50 ml destilliertem Wasser.
- 0,05%ige Harnstoff-Lösung: Durch Pipettieren von 50 ml der 0,1%igen Harnstoff-Lösung mit der 50 ml Vollpipette in einen 100-ml-Erlenmeyerkolben und Zugabe von 50 ml destilliertem Wasser.

Aufbau (2/3)

- 0,025%ige Harnstoff-Lösung: Durch Pipettieren von 50 ml der 0,05%igen Harnstoff-Lösung mit der 50 ml Vollpipette in einen 100-ml-Erlenmeyerkolben und Zugabe von 50 ml destilliertem Wasser.
- 0,0125%ige Harnstoff-Lösung: Durch Pipettieren von 50 ml der 0,025%igen Harnstoff-Lösung mit der 50 ml Vollpipette in einen 100-ml-Erlenmeyerkolben und Zugabe von 50 ml destilliertem Wasser.

Hinweis: Die Ureaselösung sollte stets im Kühlschrank aufbewahrt werden!

Aufbau (3/3)

PHYWE
excellence in science

- Baue die Geräte wie in der Abbildung zum Versuchsaufbau auf.
- Universalklemme mit der Doppelmuffe an der Stativstange des Bunsenstativs befestigen.
- Den SMARTsense Conductivity Sensor mit der Universalklemme fixieren.



Durchführung (1/2)

PHYWE
excellence in science

- In ein 100-ml-Becherglas werden durch zweimaliges Pipettieren mit der 20-ml-Vollpipette 40 ml der 0,0125%igen Harnstofflösung (die niedrigste Konzentration zuerst) und ein Magnetrührstäbchen gegeben.
- Das Becherglas auf den Magnetrührer stellen und die Leitfähigkeitssonde in die Lösung eintauchen.
- Den Rührer auf eine mittlere Rührgeschwindigkeit einregeln. (Vorsicht: Das Magnetrührstäbchen darf nicht an die Leitfähigkeitssonde schlagen!).
- Mit der Mikroliterspritze werden 50 µl der Ureaselösung zugegeben und die Messung wird ohne Verzögerung durch Anklicken des Startbuttons gestartet.
- Der zeitliche Verlauf der Reaktion ist am Monitor visuell zu verfolgen.
- Nach Beendigung der Messung die Daten zur weiteren Datenbearbeitung speichern.

Durchführung (2/2)

PHYWE
excellence in science

- Auf diese Weise werden die Messungen mit allen sechs vorbereiteten Harnstofflösungen (in aufsteigender Reihenfolge) durchgeführt.
- Für die Einzelmessungen wird das Becherglas jeweils vom Magnetrührer genommen und mit dem Entfernungsstab das Magnetrührstäbchen aus der Lösung herausgeholt.
- Das Magnetrührstäbchen wird gründlich mit destilliertem Wasser abgespült, mit einem Papiertuch kurz getrocknet und in die nächste Lösung gegeben.
- Die Leitfähigkeitssonde muss ebenfalls nach jedem Versuch gründlich mit destilliertem Wasser abgespült werden.

PHYWE
excellence in science



Protokoll

Aufgabe 1

Ziehe die Wörter an die korrekten Plätze.

Die enzymatische Hydrolyse von Harnstoff in wässriger Lösung liefert [] und Ammoniak. Die [] dieser Verbindungen erhöhen die [] der Lösung. Über Leitfähigkeitsmessungen können die Geschwindigkeiten der Harnstoffhydrolyse durch das Enzym [] bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen bestimmt werden. Aus diesen Werten lässt sich die [] berechnen.

Michaeliskonstante

Leitfähigkeit

Ionen

Kohlenstoffdioxid

Urease

 Überprüfen

Aufgabe 2

Was bedeutet ein kleiner Wert der Michaeliskonstante?

Ein kleiner Michaeliskonstanten-Wert bedeutet eine hohe Affinität des Enzyms zu seinem Substrat.

Ein kleiner Michaeliskonstanten-Wert hat keine Bedeutung für die Enzym-Substrat-Beziehung.

Ein kleiner Michaeliskonstanten-Wert bedeutet eine niedrige Affinität des Enzyms zu seinem Substrat.

Ein kleiner Michaeliskonstanten-Wert bedeutet, dass das Enzym in dem Substrat nichts bewirken kann und ein anderes Enzym gewählt werden muss.

Aufgabe 3


Wähle die korrekten Aussagen aus.

- Mit der Michaeliskonstante wird die Substratkonzentration angegeben, bei der die maximale Geschwindigkeit eines Enzyms erreicht ist.
- Die Michaeliskonstante ist immer 50.
- Mit der Michaeliskonstante wird die Substratkonzentration angegeben, bei der die halbe maximale Geschwindigkeit eines Enzyms erreicht ist.

✓ Überprüfen

Folie	Punktzahl/Summe
Folie 23: Michaeliskonstante	0/5
Folie 24: Bedeutung Michaeliskonstante	0/2
Folie 25: Aussagen zur Michaeliskonstante	0/1

Gesamtsumme  0/8

 Lösungen

 Wiederholen