

# Determinación de la constante de Michaelis con Cobra SMARTsense



Química

Química Orgánica

Bioquímica

Biología

Bioquímica

ciencia aplicada

Medicina

Bioquímica



Nivel de dificultad

medio



Tamaño del grupo

2



Tiempo de preparación

10 minutos



Tiempo de ejecución

40 minutos

**PHYWE**  
excellence in science

## Información general

### Ejecución

**PHYWE**  
excellence in science

Montaje del experimento

La hidrólisis enzimática de la urea en solución acuosa produce dióxido de carbono y amoníaco. Los iones de estos compuestos aumentan la conductividad de la solución. Las mediciones de conductividad pueden utilizarse para determinar las tasas de hidrólisis de la urea por la enzima ureasa en diferentes concentraciones de sustrato. De estos valores puede calcularse la constante de Michaelis.

## Información adicional (1/7)

**PHYWE**  
excellence in science

### Conocimiento

previo



Los estudiantes deben estar familiarizados con los complejos enzimáticos-sustratos, la hidrólisis enzimática de la urea y el principio de medición de la conductividad.

### Principio



La constante de Michaelis se calcula mediante mediciones de conductividad.

## Información adicional (2/7)

**PHYWE**  
excellence in science

### Objetivo de aprendizaje



Los estudiantes deben aprender a calcular la constante de Michaelis determinando la conductividad (mediante la hidrólisis de la urea, que produce dióxido de carbono y amoníaco).

### Tareas



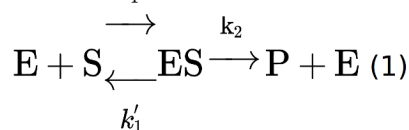
Los estudiantes deben determinar la constante de Michaelis a partir de las lecturas obtenidas en este experimento.

## Información adicional (3/7)

### Más información sobre la evaluación y la preparación

- Para determinar las constantes de Michaelis, se determinan y registran los valores de conductividad en los puntos temporales de 100 s y 200 s y su diferencia  $\Delta Y$  para las seis mediciones realizadas.
- El mecanismo de las reacciones catalizadas por enzimas según Michaelis-Menten asume un complejo enzima-sustrato ES, que se forma a partir de la enzima E y el sustrato S en una reacción de equilibrio ascendente y se descompone en el producto P y la enzima E inalterada.

Tareas  $k_1$



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

Según el principio de Bodenstein, la variación temporal de la concentración de ES  $\approx 0$ .

## Información adicional (4/7)

Convertido según la concentración de ES, el resultado es:

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

La concentración de sustrato libre  $c_S$  se puede equiparar a la concentración total de S, ya que sólo se añade una pequeña enzima. La concentración total de E,  $c_{E,0}$  es igual a la suma de la concentración

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

Después de reordenar y sustituir la ecuación (4) por la ecuación (3), obtenemos:

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

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

## Información adicional (5/7)

Para el paso de formación del producto, la ley del tiempo es:  $\frac{dc_p}{dt} = k_2 c_{ES}$  (7)

Si se establece para  $C_{ES}$  la ecuación de expresión (6), se obtiene:  $\frac{dc_p}{dt} = \frac{k_1 k_2 c_{E,0} c_S}{k_1 + k_2 + k_1 c_S}$  (8)

El cociente  $\frac{k_1 + k_2}{k_1} = K_M$  (9) se convierte en la constante de Michaelis,  $K_M$ ...resumido. Así, la ley del tiempo es:  $\frac{dc_p}{dt} = \frac{k_2 c_{E,0} c_S}{K_M + c_S}$  (10)

Por lo tanto, la velocidad de la enzimólisis depende linealmente de la concentración de la enzima. La influencia de la concentración del sustrato es más complicada. Para el caso  $C_S > K_M$  la ecuación (10) se simplifica a

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

## Información adicional (6/7)

En este caso, la reacción es de orden cero según S y la enzimólisis tiene su máxima tasa con  $k_2 c_{E,0}$ . En  $C_S = K_M$  se alcanza la mitad de la velocidad máxima. La constante de Michaelis corresponde, por lo tanto, a la concentración de sustrato a la que la reacción procede a la mitad de su velocidad máxima. En el caso de que sólo quede poco sustrato, es decir,  $C_S > K_M$  esto resulta en

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

es decir, la tasa de formación de P es de primer orden después de E y S.

Para la evaluación se determinan las tasas medias de enzimólisis entre 100 s y 200 s después del inicio. Para ello se formará la diferencia de los valores de conductividad después de 100 y 200 segundos respectivamente ( $\Delta Y$ ) y se dividirá por 100 s. Estas velocidades (en  $\mu S \text{ cm}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) se trazan contra la concentración de urea (en mmol l<sup>-1</sup>). La concentración de sustrato  $C_S$  (en mmol/l) se calcula según la fórmula:

$C_S = (W10000)/M$  (13) con **W** = concentración de la solución de urea en % y **M** = masa molar de urea = 60,06 g/mol.

## Información adicional (7/7)

**PHYWE**  
excellence in science

Dado que es difícil determinar la concentración correspondiente a la velocidad media-máxima, es decir,  $K_M$ . Para leer los datos directamente, se utiliza el orden Lineweaver-Burk.

Con la velocidad de reacción  $v=dc_P/dt$  y en representación recíproca se obtiene de la ecuación (10):

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

La gráfica de  $1/v$  contra  $1/C_S$  (cf. Fig.5) proporciona  $k_2$  (a la potencia de -1) como una intercepción ordenada ( $1/c_S=0$ ) y  $K_M/k_2$  como la pendiente de una línea recta. Primero se determina la intercepción de la ordenada y la pendiente de la línea. Esta pendiente se divide luego por la intercepción de la ordenada para obtener la constante de Michaelis. El cálculo da un valor de  $4,86 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$  para la constante de Michaelis de la ureasa.

Un valor de  $K_M$  pequeño significa que la enzima tiene una alta afinidad por su sustrato.

La ureasa fue la primera enzima en presentarse en forma cristalina (Sumner, 1926). A diferencia de las enzimas alostéricas, pertenece a las enzimas "normales" que satisfacen el mecanismo de Michaelis-Menten.

## Instrucciones de seguridad

**PHYWE**  
excellence in science

- Para este experimento aplican las reglas y medidas generales de seguridad para actividades experimentales en la enseñanza de ciencia naturales.

## Teoría

La ureasa cataliza la hidrólisis enzimática de la urea en el agua, produciendo dióxido de carbono y agua. Con la ayuda del sensor de conductividad SMARTsense, se puede medir la conductividad de la solución resultante. Esto permite seguir cómo los iones del compuesto aumentan la conductividad.

La constante de Michaelis es la concentración de sustrato en la que se alcanza la mitad de la velocidad máxima de una enzima.

Dado que las tasas de hidrólisis de urea a diferentes concentraciones de sustrato pueden medirse a través de la medición de la conductividad, la constante de Michaelis puede calcularse a partir de estos valores.

## Material

Posición	Material	Artículo No.	Cantidad
1	Cobra SMARTsense - Conductividad, 0...20000 $\mu$ S/cm, 0...100°C (Bluetooth)	12922-00	1
2	Varilla recoge imanes, resistencia química	35680-03	1
3	Agitador magnético sin calefactor, 3 l, 230 V	35761-99	1
4	Varilla para agitador magnético, cilíndrica, 30 mm	46299-02	1
5	Balanza compacta, OHAUS TA 302, 300 g / 0,01 g	49241-93	1
6	Soporte para mechero Bunsen 75 cm	37694-00	1
7	Nuez	02043-00	1
8	Pinza universal	37715-01	1
9	V.D.PRECIP.,ALTO,BORO 3.3,100 ml	46026-00	6
10	Vaso de precipitación, plástico, forma baja, 250ml	36013-01	1
11	Matraz Erlenmeyer, lecho de tapón, 100 mlSB 19	MAU-EK17082002	6
12	Tapón de goma, 17/22 mm, sin perforación	39255-00	6
13	PIPETA VOLUMETRICA, 20 ML	36579-00	1
14	PIPETA VOLUMETRICA, 50 ML	36581-00	1
15	PERA PARA PIPETA	36592-00	1
16	JERINGA MICROLITRICA,100 MICRO-L	02606-00	1
17	Microespátula de acero inoxidable, l=150 milímetros	33393-00	1
18	Botella de lavado, plástica, 500 ml	33931-00	1
19	UREA, 250 g	30086-25	1
20	Solución de ureasas en glicerina al 50%, 10 ml	31924-03	1
21	AGUA DESTILADA, 5000ML	31246-81	1
22	measureAPP - el software de medición gratuito para todos los dispositivos y sistemas operativos	14581-61	1



## Material adicional

**PHYWE**  
excellence in science

Posición	El arte. No.	Designación
1		dispositivo móvil (smartphone / tableta)
2	14581-61	measureAPP

**PHYWE**  
excellence in science

## Montaje y ejecución

## Montaje (1/3)

**PHYWE**  
excellence in science

El Cobra SMARTsense Conductivity y el measureAPP son necesarios para medir la conductividad. Comprobar si el "Bluetooth" está activado en tu dispositivo (tableta, smartphone) (la aplicación se puede descargar gratuitamente en la App Store - códigos QR más abajo). Ahora abrir el measureAPP de tu dispositivo.



measureAPP para

Sistemas operativos Android



measureAPP para

Sistemas operativos del iOS

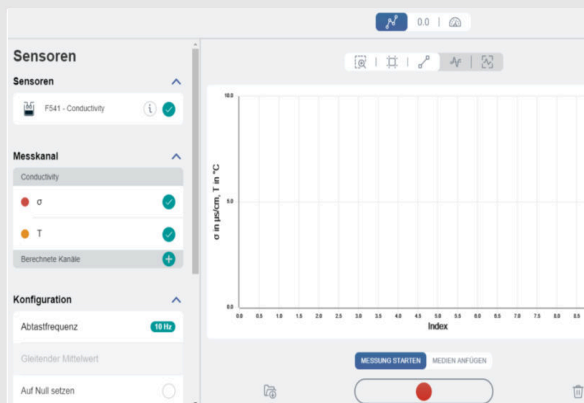


measureAPP para

Tabletas y PCs con Windows 10

## Montaje (2/3)

**PHYWE**  
excellence in science



Interfaz de usuario measureApp  
en la versión de Windows 10

- Encender el sensor de conductividad SMARTsense pulsando y manteniendo el botón de encendido.
- Conectar el sensor en el measureAPP bajo el punto "Medir" con el dispositivo como se muestra en la figura de la izquierda.
- El sensor de conductividad SMARTSense se muestra ahora en la aplicación.

## Montaje (2/3)

**PHYWE**  
excellence in science

Se requieren soluciones con diferentes concentraciones de urea para el experimento. Deben estar recién preparados antes de comenzar la prueba:

- Solución de urea al 0,4 % (solución madre de urea): se debe pesar 0,40 g de urea en un matraz Erlenmeyer de 100 ml y disolver en 99,6 g de agua destilada.
- Solución de urea al 0,2 %: pipetear 50 ml de la solución de urea al 0,4 % con la pipeta volumétrica de 50 ml en un matraz cónico de 100 ml y añadir 50 ml de agua destilada.
- Solución de urea al 0,1 %: pipetear 50 ml de la solución de urea al 0,2 % con la pipeta volumétrica de 50 ml en un matraz cónico de 100 ml y añadir 50 ml de agua destilada.
- Solución de urea al 0,05 %: pipetear 50 ml de la solución de urea al 0,1 % con la pipeta volumétrica de 50 ml en un matraz cónico de 100 ml y añadir 50 ml de agua destilada.

## Montaje (2/3)

**PHYWE**  
excellence in science

- Solución de urea al 0,025 %: pipetear 50 ml de la solución de urea al 0,05 % con la pipeta volumétrica de 50 ml en un matraz cónico de 100 ml y añadir 50 ml de agua destilada.
- Solución de urea al 0,0125 %: pipetear 50 ml de la solución de urea al 0,025 % con la pipeta volumétrica de 50 ml en un matraz cónico de 100 ml y añadir 50 ml de agua destilada.

Nota: La solución de ureasa siempre debe ser almacenada en el refrigerador!

## Montaje (3/3)

**PHYWE**  
excellence in science

- Preparar el equipo como se muestra en el diagrama de configuración experimental.
- Fijar la abrazadera universal con el enchufe doble a la barra de soporte del trípode Bunsen.
- Asegurar el sensor de conductividad SMARTsense con la abrazadera universal.



## Ejecución (1/2)

**PHYWE**  
excellence in science

- Añadir 40 ml de la solución de urea al 0,0125% (la concentración más baja primero) y una barra de agitación magnética a un vaso de 100 ml pipeteando dos veces con la pipeta volumétrica de 20 ml.
- Colocar el vaso en el agitador magnético y sumergir la sonda de conductividad en la solución.
- Poner el agitador a una velocidad media de agitación. (Precaución: La barra de agitación magnética no debe golpear la sonda de conductividad!).
- Con la jeringa de microlitros añadir 50  $\mu$ l de la solución de ureasa e iniciar la medición sin demora pulsando el botón de inicio.
- El curso temporal de la reacción puede seguirse visualmente en el monitor.
- Una vez finalizada la medición, guardar los datos para su posterior procesamiento.

## Ejecución (2/2)

**PHYWE**  
excellence in science

- De esta manera las mediciones se realizan con las seis soluciones de urea preparadas (en orden ascendente).
- Para las mediciones individuales, el vaso se debe retirar del agitador magnético en cada caso y la varilla de agitación magnética se debe retirar de la solución con la varilla de extracción.
- La barra de agitación magnética se debe enjuagar a fondo con agua destilada, secar brevemente con una toalla de papel y añadir a la siguiente solución.
- La sonda de conductividad también debe enjuagarse a fondo con agua destilada después de cada prueba.

**PHYWE**  
excellence in science

## Resultados

## Tarea 1

Arrastrar las palabras a los lugares correctos.

La hidrólisis enzimática de la urea en solución acuosa produce [ ] y amoníaco. Los [ ] de estos compuestos aumentan la [ ] de la solución. Las mediciones de conductividad pueden utilizarse para determinar las tasas de hidrólisis de la urea por la enzima [ ] a diferentes concentraciones de sustrato. A partir de estos valores, se puede calcular la [ ].

conductividad

iones

ureasa

dióxido de carbono

constante de Michaelis

 Comprobar

## Tarea 2

¿Qué significa un valor pequeño de la constante de Michaelis?

Un valor pequeño de la constante de Michaelis indica una baja afinidad de la enzima con su sustrato.

Un valor pequeño de la constante de Michaelis significa que la enzima no puede hacer nada en el sustrato y se debe elegir otra enzima.

Un valor pequeño en la constante de Michaelis indica una alta afinidad de la enzima con su sustrato.

Un valor pequeño de la constante de Michaelis no tiene importancia para la relación enzima-sustrato.

## Tarea 3

Elegir las declaraciones correctas.

- La constante de Michaelis es la concentración de sustrato a la que se alcanza la máxima velocidad de una enzima.
- La constante de Michaelis es siempre 50.
- La constante de Michaelis es la concentración de sustrato a la que se alcanza la mitad de la velocidad máxima de una enzima.

✓ Comprobar

Diapositiva	Puntaje/Total
Diapositiva 23: La constante de Micaela	0/5
Diapositiva 24: Significa que la constante de Michaelis	0/2
Diapositiva 25: Las declaraciones sobre la constante de Michaelis	0/1

Puntuación Total  0/8

Mostrar solución

Reintentar