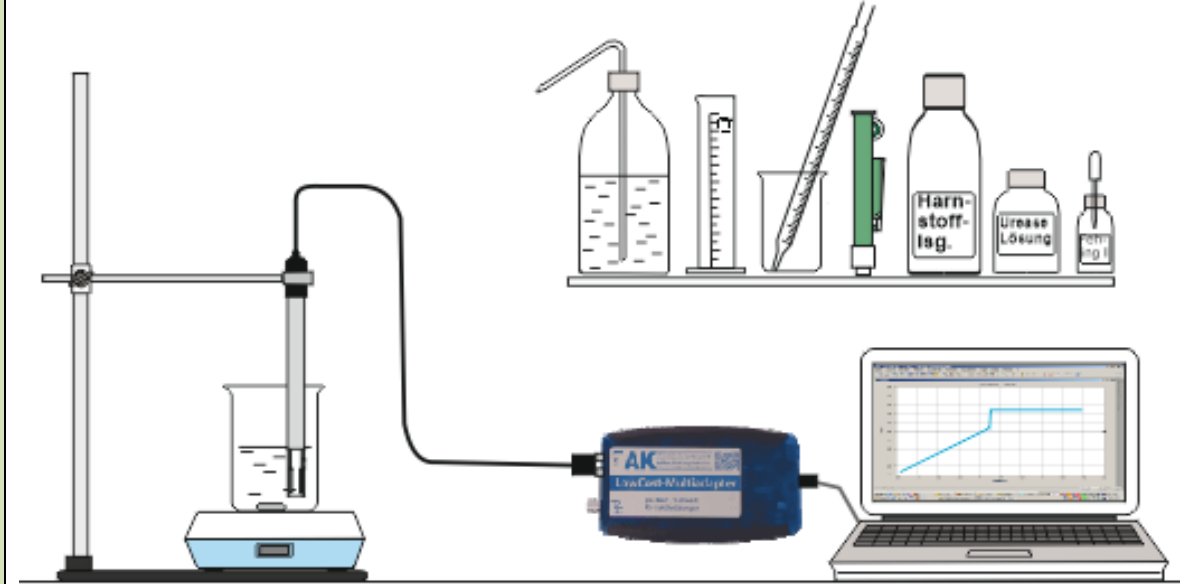


Prinzip

Bei der Spaltung von Harnstoff durch Urease entstehen Kohlenstoffdioxid und Ammoniak, wobei insbesondere letzteres mit Wasser leicht zu Ammonium- und Hydroxidionen reagiert. Daher bietet sich eine Verfolgung der Reaktion über eine Leitfähigkeitsmessung an.

Aufbau  
und  
Vorbe-  
reitung



Benötigte Geräte

- AK Low Cost Multiadapter pH/L
- USB-Kabel
- Tablet oder Laptop
- LF-Elektrode
- Becherglas, 50 mL
- Messpipette, 5 mL
- Messzylinder, 50 mL
- Pipettierhilfe
- Stativ
- Muffe
- Greifklemme, klein
- Magnetrührer
- Rührfisch

Verwendete Chemikalien

- Harnstofflösung,  $c = 10\text{g/L}$   
2,5 g zu 250 mL Wasser
- Ureaselösung,  $c = 0,05\text{ g in } 50\text{ mL}$  /  
(oder: 2 Ureasetabletten in 10 mL)
- Fehling-Lösung I
- 3,5 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  zu 50mL Wasser
- destilliertes Wasser

Vorbereitung des Versuchs

- ▶ Die Geräte entsprechend der Zeichnung bereitstellen und aufbauen.
- ▶ Im Becherglas auf dem Magnetrührer 30 mL Harnstofflösung vorlegen und den Rührfisch nicht vergessen!
- ▶ LF-Elektrode gut abspülen, in die Lösung tauchen (**die Bleche müssen vollständig bedeckt sein!**) und die Bananenstecker in die entsprechenden LF-Buchsen stecken.

Vorbereitung am Tablet/ Laptop

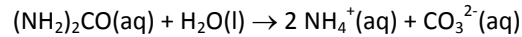
- ▶ **AK Analytik 11** starten **Messen** **mit Geräte-Schnellstarter App** **AK LowCost Multiadapter**
- ▶ Anweisungen befolgen und 'abhaken' **Weiter**
- ▶ **Auswahl des Messkanals: links oben neben dem blauen Multiadapter die Buchse** **L** **Weiter**
- ▶ **Auf welche Weise möchten Sie messen:** **auf Zeit**
- ▶ **Zeitintervall:** **5** s, **Gesamtzeit (Grafik):** **400** s, **x-Komma** **0**
- ▶ **Darstellung der Kanäle im Graphen:** **Leitfähigkeit** **y-Untergrenze im Graphen** **0,00** mS/cm
- ▶ **y-Obergrenze** **0,50** mS/cm **y-Nachkomma** **2** – Bestätigen mit **Akzeptieren** dann **Weiter**



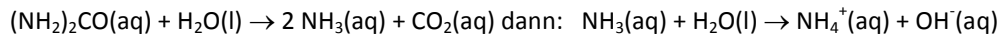
Durchführung

- ▶ Mit der Pipette 3 mL Ureaselösung in die Harnstofflösung geben.
- ▶ Gleichzeitig mit **Aufzeichnen** oder mit der 's'-Taste die Messwertspeicherung starten.
- ▶ Nach ca. 600 s den Versuch **Messung beenden** beenden.
- ▶ Projektnamen eingeben (hier: Beispiel) **Mein erstes Projekt** und **Akzeptieren** .

Spaltung von Harnstoff durch Urease:



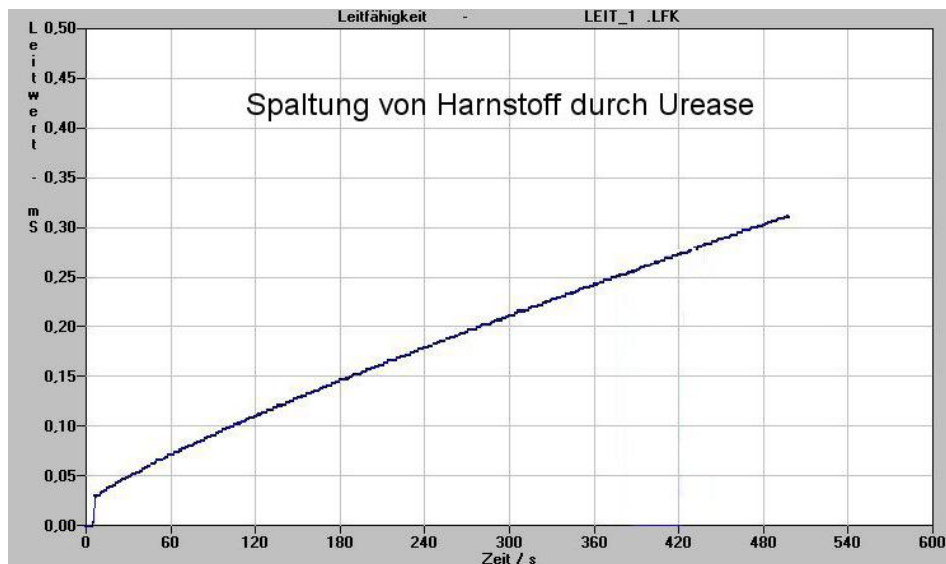
Bei anderen Autoren findet man eher eine Spaltung in Ammoniak und Kohlenstoffdioxid, das sich in Wasser löst.



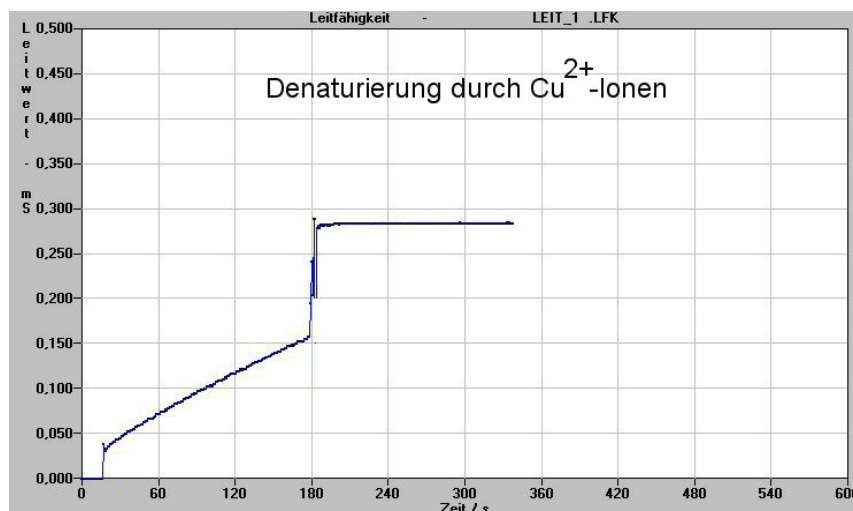
Es werden auf jeden Fall Ionen gebildet und die Leitfähigkeit steigt.

Auswertung

Aus dem relativ linearen Verlauf kann man schließen, dass es sich unter Vernachlässigung des Starts jeweils um eine Reaktion 0. Ordnung handelt.



In der folgenden Abbildung soll noch die Wirkung eines Enzymgiftes durch Zugabe von 0,1 mL Fehling-Lösung I gezeigt werden.



**Experimentelle Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante für die Harnstoffspaltung**

Das Experiment wird mit unterschiedlichen Harnstoffkonzentrationen durchgeführt und die Ergebnisse nach der Theorie von Michaelis-Menten ausgewertet.

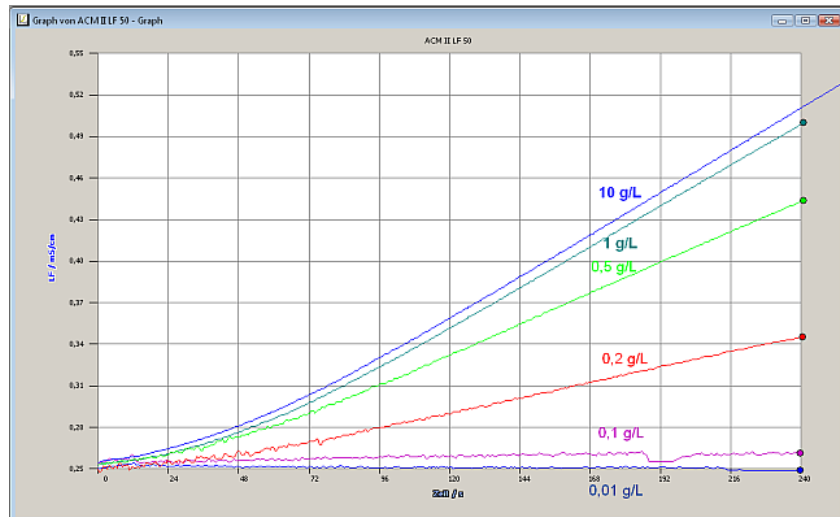
Alter-  
native

Herstellen der Harnstofflösungen:

Harnstoff-Lsg Konzentration g/L	ml Stammlsg. auf 50 mL	mL der *Lsg. auf 50 mL	Geschwindigkeit (Beispielwerte) mS/cm*s
10	-		0,00126
1	5		0,00121
0,5	2,5		0,00093
0,2	1		0,00046
0,1	0,5*		0,00030
0,01		5	Änderung zu gering

Durch-  
führung

- Die Messungen analog der vorher beschriebenen Messung, beginnend mit der kleinsten Konzentration, durchführen.
- dabei die Option „in den gleichen Graphen einzeichnen“ wählen
- evtl. die x- und y-Abschnitte der Graphikachsen so beschneiden, dass die Kurven möglichst deutlich dargestellt werden.
- evtl. Graphik beschriften



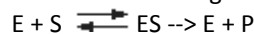
Aus-  
wertung

Zunächst werden die Geschwindigkeiten der einzelnen Reaktionen bestimmt. Es sind dies die Änderungen der Leitfähigkeit in der Zeiteinheit, also die jeweilige Steigung.

- Hauptmenü: **AK Analytik 11** Start Messung Favoriten **Auswerten** Hinzufügen **Ein-Geraden-Methode**
- Folgen Sie den Anweisungen (mit 'Abhaken')
- Dann mit **Gerade einzeichnen** und **Beschriften** (evtl. Position ändern) und **Fertig**

Beispielwerte sind in der obigen Tabelle in Rot eingetragen.

Eine enzymkatalysierte Reaktion lässt sich vereinfacht durch folgende Reaktionsgleichung beschreiben:



Für die Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  gilt dann:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k \cdot [ES]$$

Ist die Substratkonzentration deutlich größer als die Enzymkonzentration, hängt  $[ES]$  nur von der Enzymkonzentration ab. Es handelt sich um eine Reaktion 0. Ordnung. Ist der größte Teil des Substrates umgesetzt, können nicht mehr alle Enzymmoleküle mit Substrat beladen werden, es wird auch der  $[S]$ -Einfluss sichtbar.

Der Zusammenhang wird durch die **Michaelis-Menten-Gleichung** beschrieben:



$$[ES] = \frac{[ES]_0 \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

$K_M$  bezeichnet hierin die **Michaelis-Konstante**,  $[E]_0$  die Gesamt-Enzymkonzentration.  
Bezogen auf die Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  erhält man:

$$v = v_{\max} \cdot \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

Trägt man die Reaktionsgeschwindigkeit gegen die Substratkonzentration auf, erkennt man, dass die maximale Reaktionsgeschwindigkeit nur bei sehr hohen Substratkonzentrationen erreicht wird, denn dann sind alle Enzyme aktiv, d.h. sie liegen als Enzym-Substrat-Komplex vor.

Die **Michaelis-Menten-Konstante  $K_M$**  gibt jene Substratkonzentration  $[S]$  in  $[\text{mol/L}]$  an, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit  $v_{\max}/2$  ist.

AK Analytik 11 starten; Auswerten Messwerte eintippen Name **Michaelis-Menten**

**y-Achse**

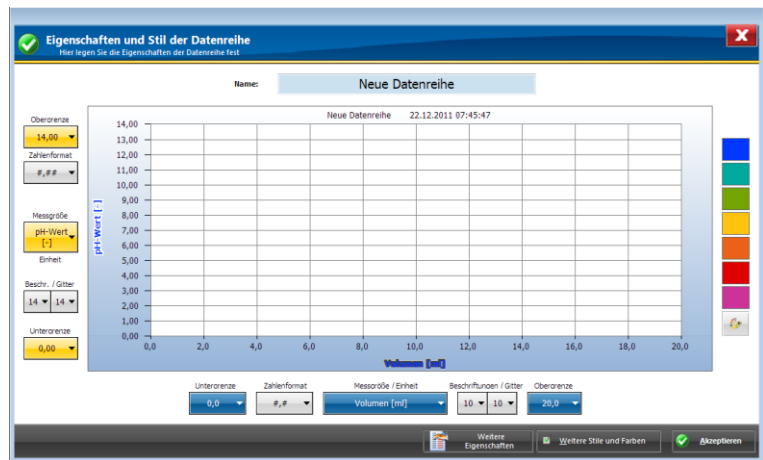
- ▶ Obergrenze: 0,015
- ▶ Zahlenformat: 0,00000
- ▶ Messgröße: Leitwert
- ▶ Einheit: mS/cm
- ▶ Beschr.: 10
- ▶ Gitter: 10
- ▶ Untergrenze: 0

**x-Achse**

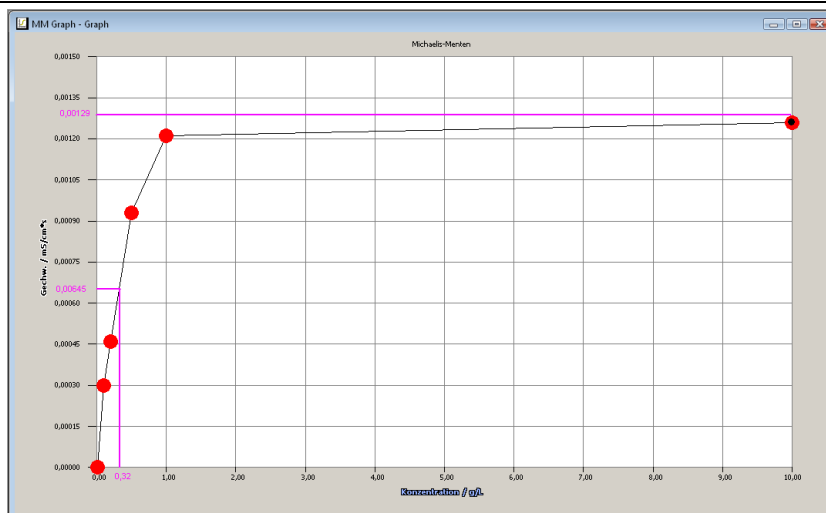
- ▶ Untergrenze: 0
- ▶ Zahlenformat: 0,00
- ▶ Messgröße: Konzentration
- ▶ Einheit: g/L

▶ Beschr.: 10 ▶ Gitter: 10 ▶ Obergrenze: 10 **Akzeptieren**

▶ Werte eintippen: jeweils weiter mit [Enter] Ende mit → **Fenster Schließen**



Auswertung



Geschwindigkeitsmaximum  $v_{\max}$  liegt bei etwa 0,00129 mS/cm\*s. Die Konzentration bei  $v_{\max}/2$  beträgt 0,32 g/L.  
Umrechnung in molare Größen:  $c = 0,32\text{g/L} \cdot 60,06 \text{ g/mol} = \mathbf{0,0053 \text{ mol/L}}$  Literaturwert: 0,0035 mol/L

**Tipp**

Die Urease-Suspension kann durch ein feines Sieb filtriert werden. Die größeren Teilchen, die beim späteren Einsatz der Suspension die Pipette verstopfen würden, werden so zurückgehalten.

**Literatur**

B. Seite, Anwenderheft zur Programmdiskette Leitfähigkeit- Reaktionskinetik der Fa. Maey, (Leybold Heraeus), Bonn 1984 Voet, Voet, Biochemie VCH-Verlag, Weinheim 1992, S. 331