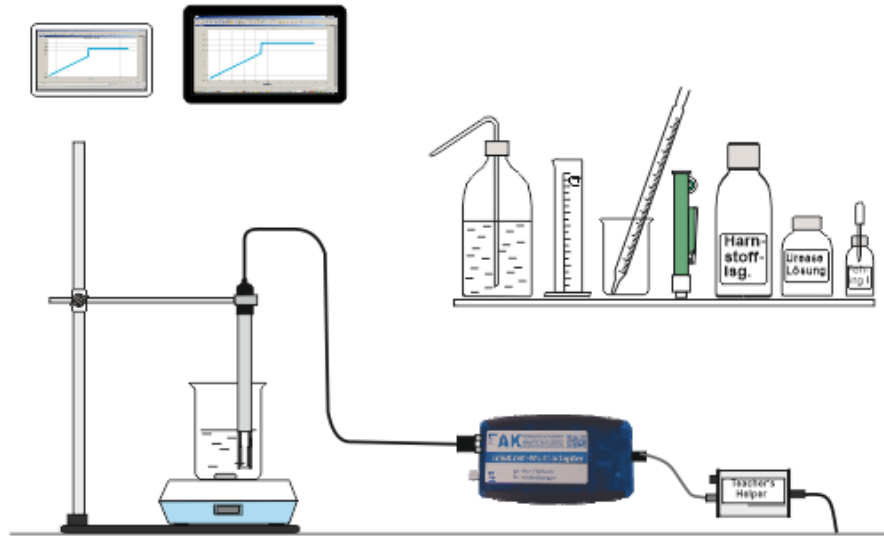




Prinzip

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
- Teacher's Helper / Netzteil/ USB Kabel
- Tablet, Laptop oder Smartphone
- LF-Elektrode
- Becherglas, 50 mL
- Messpipette, 5 mL
- Messzylinder, 50 mL

Verwendete Chemikalien

- Pipettierhilfe
- Stativ
- Muffe
- Greifklemme, klein
- Magnetrührer
- Rührfisch
- 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 an den Tablets / Laptops (Clients)

- ▶ Am Tablet / Laptop / Smartphone Einstellungen oder mit **WLAN** eine Verbindung herstellen: **ak.net** anwählen und warten bis die Verbindung eingebucht ist.
- ▶ Browser z.B. **Firefox/Safari** aufrufen, in die Adresszeile (URL-Zeile) - nicht in der (Google-Suchzeile!!) **http://labor.ak** eingeben. - Es erscheinen 4 Bildschirme.
- ▶ **AK MiniAnalytik** wählen. Im erscheinenden Bild können die Menüicons neben- oder (bei kleinen Bildschirmen) untereinander angeordnet sein.
- ▶ Icon 'Messen' (2. Von links) und **Mit Messgerät verbinden** auswählen
- ▶ **Messgrößen-Auswahl:** **Leitfähigkeit(L)**
- ▶ **Konfiguration-Methode** y-Achse L Min **0,0 mS/cm** und Max **0,5 mS/cm**
Nachkomma **2** und Linie **ja**
- ▶ **x-Achse: Zeit**
- ▶ x-Achse Zeit Intervall **2 s** und Zeit Max **600 s**
Nachkomma **0** und
- ▶ Der Messbildschirm wird aufgebaut und Werte angezeigt



Durchführung

- ▶ Mit der Pipette 3 mL Ureaselösung in die Harnstofflösung geben.
- ▶ Gleichzeitig mit **Aufzeichnung starten** die Messwertspeicherung starten.
- ▶ Nach ca. 600 s den Versuch mit **Stoppen** beenden.

Speichern

- ▶ Icon oben links und **Speichern unter** wählen
 - ▶ Unter ‚Projekt Speichern‘ Projektnamen eingeben (hier: Beispiel) **D18 User** und **OK**

Excel-Export

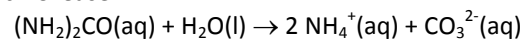
- ▶ Icon oben links und **Datenreihen exportieren** wählen
- ▶ Unter ‚Datenreihen Speichern‘ Projekt **D18 User** auswählen und **Speichern**
- ▶ Je nach Gerät mit ‚Speichern unter‘ noch Pfad aussuchen und bestätigen!

Öffnen bei Bedarf

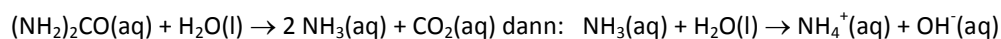
- ▶ Ist der Teacher's Helper nicht mehr zu erreichen: Browser z.B. **Firefox/Safari** aufrufen, in die Adresszeile (URL-Zeile) - nicht in der (Google-Suchzeile!!) **http://labor.ak** eingeben. -
- ▶ Icon oben links und **Laden** "Projekt Laden" **D18 User** direkt auswählen und → anklicken

Auswertung

Spaltung von Harnstoff durch Urease:

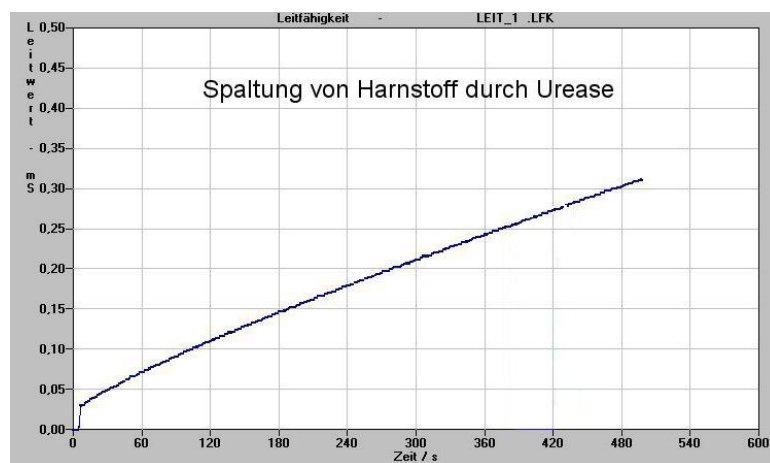


Bei anderen Autoren findet man eher eine Spaltung in Ammoniak und Kohlenstoffdioxid, das sich in Wasser löst.

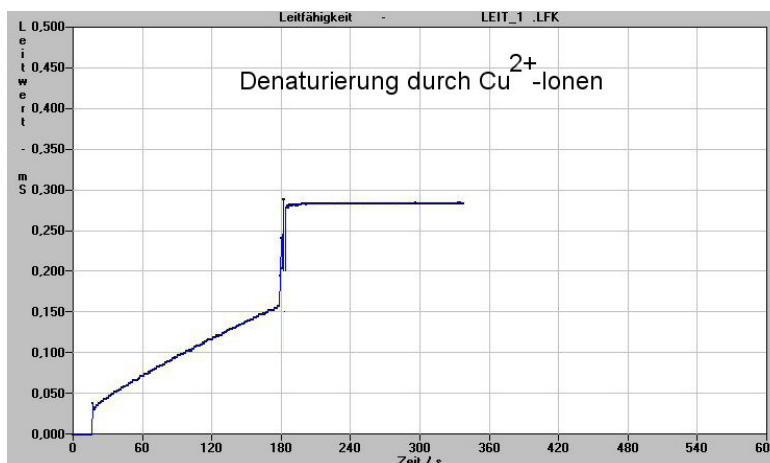


Es werden auf jeden Fall Ionen gebildet und die Leitfähigkeit steigt.

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



Die folgenden Abbildung zeigt die Wirkung eines Enzymgiftes durch Zugabe von 0,1 mL Fehling-Lösung I.



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.

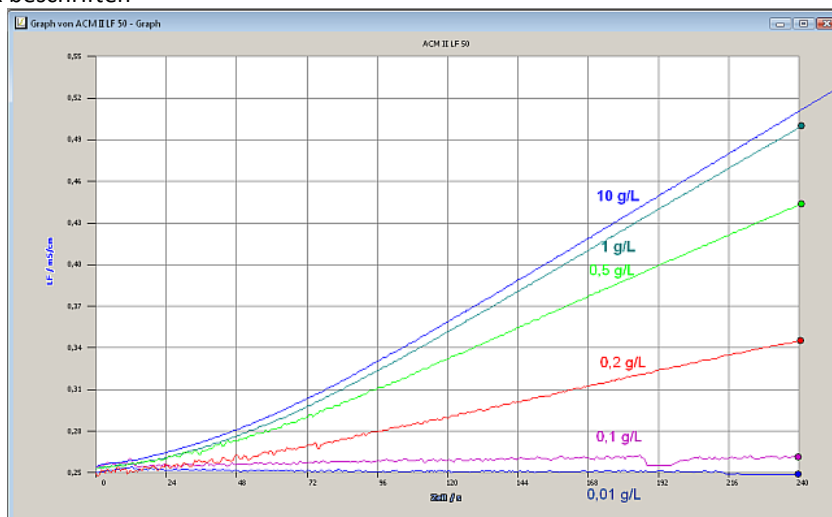
Herstellen der Harnstofflösungen:

Alter-
native

Harnstoff-Lsg Konzentration	ml Stammlsg. auf 50 mL	mL der *Lsg. auf 50 mL	Geschwindigkeit (Beispielwerte)
g/L			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.
- Die Datenreihe wird automatisch in den Graphen eingezeichnet
- evtl. die x- und y-Abschnitte der Graphikachsen so beschneiden, dass die Kurven möglichst deutlich dargestellt werden.
- evtl. Graphik beschriften



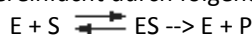
Aus-
wertung

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

- Icon 'Auswerten' (3. von links) und **Ein-Geraden-Methode**
- Folgen Sie den Anweisungen (Legen Sie den Bereich der Ausgleichsgeraden durch Tippen, gedrückt halten und ziehen, fest)
- Neue Datenreihe wird automatisch eingezeichnet

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.

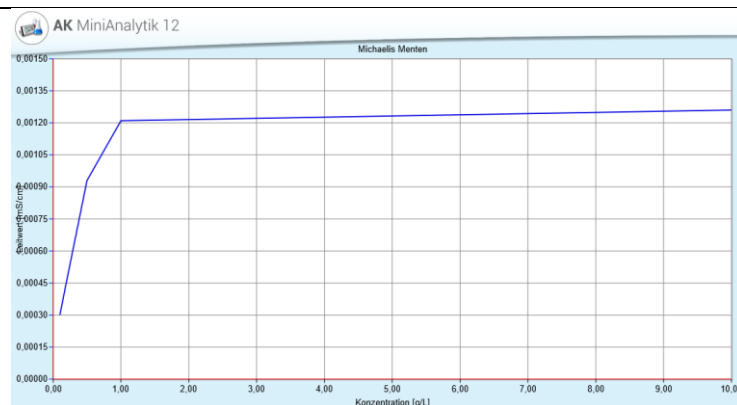
Die Michaelis-Menten-Konstante K_M gibt jene Substratkonzentration $[S]$ in $[\text{mol/L}]$ an, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit $v_{\max}/2$ ist.

- ▶ Icon 'Messen'  (2. Von links) und **Werte manuell eingeben** auswählen
- ▶ Felder ausfüllen und das erste Wertepaar nacheinander eingeben.

Eigenschaften der Datenreihe

Name	Michaelis Menten	
	X-Achse	Y-Achse
Messgröße:	Konzentration	Leitwert
Einheit:	g/L	mS/cm
Untergrenze:	0,00	0,00000
Obergrenze:	10,00	0,00150
Nachkommastellen:	2	5
Beschriftungen:	10	10
Gitter:	10	10

- ▶ Evtl. auf  und **Wertetabelle** mit Klick auf „2+“ das nächste Wertepaar eintippen usw.



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

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

Beachten:



Entsorgung