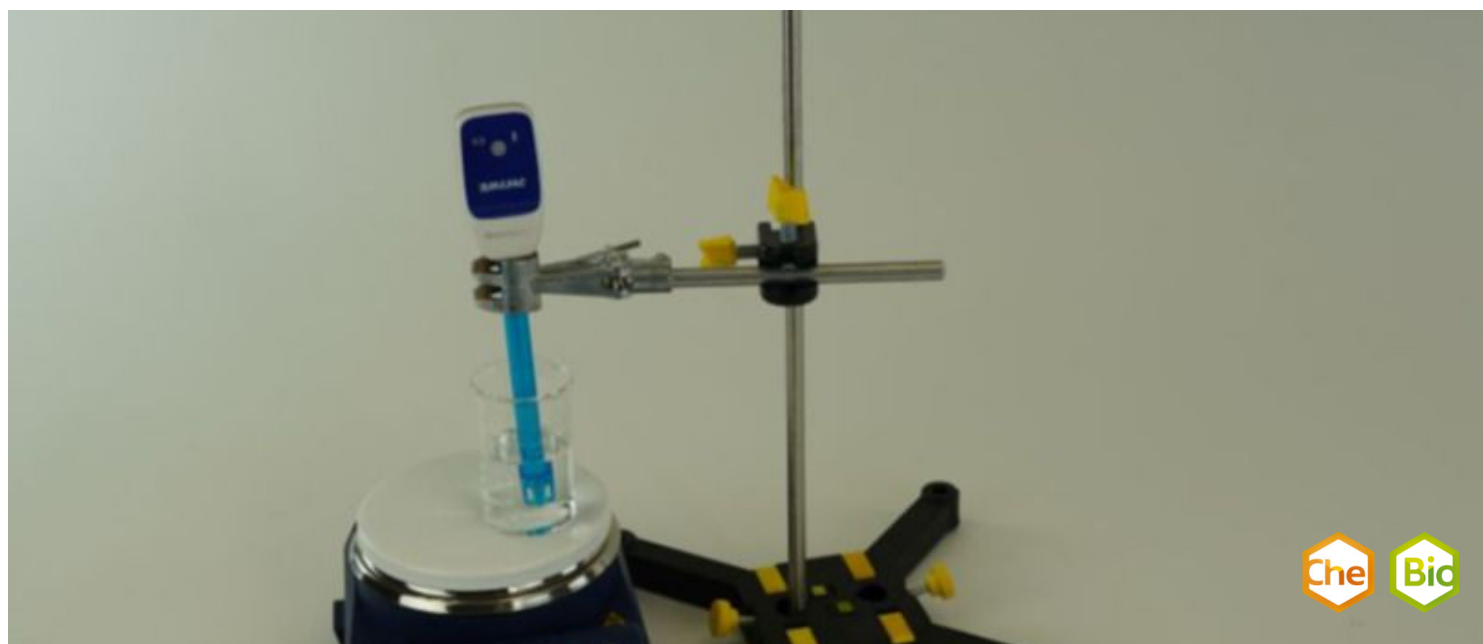


# Визначення константи Міхаеліса з Cobra SMARTsense



Chemistry

Organic chemistry

Biochemistry

Biology

Biochemistry



Рівень складності

середній



Розмір групи

-



Час підготовки

10 хвилини



Час виконання

40 хвилини

This content can also be found online at:

<http://localhost:1337/c/64e64c1a5b28040002e9b1f6>

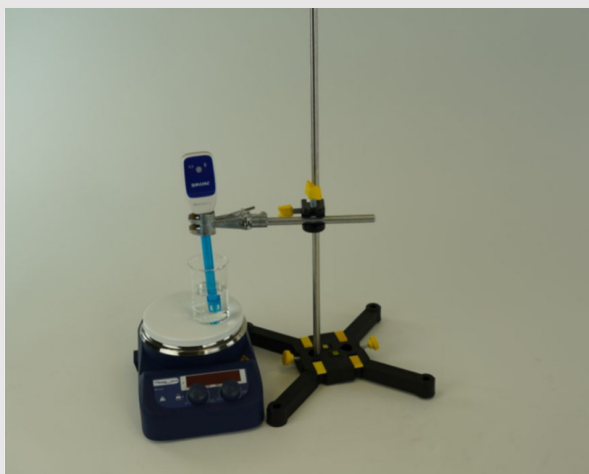
PHYWE



## Загальна інформація

### Опис

PHYWE



Експериментальна установка

Під час ферментативного гідролізу сечовини (карбаміду) у водному розчині отримують вуглекислий газ та аміак. Іони цих сполук збільшують провідність розчину. Вимірювання електропровідності можуть бути використані для визначення швидкості гідролізу сечовини ферментом уреази за різних концентрацій субстрату. Константа Міхаеліса може бути розрахована на основі цих значень.

## Додаткова інформація (1/7)

PHYWE

### Попередні

#### знання



Учні та студенти мають бути знайомі з ферментно-субстратними комплексами, ферментативним гідролізом сечовини та принципом вимірювання електропровідності.

### Принцип



Константа Міхаеліса обчислюється на основі вимірювань провідності.

## Додаткова інформація (2/7)

PHYWE

### Мета



Учні та студенти мають дізнатися, як можна розрахувати константу Міхаеліса шляхом визначення провідності (шляхом гідролізу сечовини, що постачає вуглекислий газ та аміак).

### Завдання



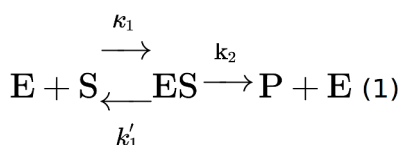
Учні та студенти мають визначити константу Міхаеліса за виміряними значеннями, визначеними в цьому експерименті.

## Додаткова інформація (3/7)

PHYWE

### Додаткова інформація про оцінку та підготовку

- Для визначення константи Міхаеліса визначаються і записуються значення електропровідності в моменти часу 100 с і 200 с та їх різницю  $\Delta Y$  для всіх шести виконаних вимірювань.
- Механізм ферментативних реакцій за Міхаелісом-Ментеном передбачає наявність фермент-субстратного комплексу  $ES$ , який утворюється з ферменту  $E$  і субстрату  $S$  у висхідній рівноважній реакції і розпадається на продукт  $P$  і незмінений фермент  $E$ .



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

Згідно з принципом Боденштейна, зміна концентрації протягом часу дорівнює  $ES \approx 0$ .

## Додаткова інформація (4/7)

PHYWE

Після перетворення з урахуванням концентрації  $ES$  отримуємо:

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

Концентрація вільного субстрату  $C_S$  може бути прирівняна до загальної концентрації  $S$  оскільки додається тільки трохи ферменту. Загальна концентрація  $C_{E_0}$  дорівнює сумі концентрацій вільного ферменту  $C$  і фермент-субстратного комплексу  $C_{ES}$ :

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

Після перетворення і заміни рівняння (4) у рівняння (3) отримуємо:

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

Таким чином, перехід на  $C_{ES}$  забезпечує:

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

## Додаткова інформація (5/7)

PHYWE

Етап формування продукту має такий закон часу:  $\frac{dc_p}{dt} = k_2 c_{ES}$  (7)

Підставивши вираз (6) замість  $C_{ES}$ , отримуємо:  $\frac{dc_p}{dt} = \frac{k_1 k_2 c_{E,0} c_S}{k_1' + k_2 + k_1 c_S}$  (8)

Коефіцієнт  $\frac{k_1' + k_2}{k_1} = K_M$  (9) разом утворюють сталу Міхаеліса  $K_M$ .  
Отже, закон часу має вигляд:  $\frac{dc_p}{dt} = \frac{k_2 c_{E,0} c_S}{K_M + c_S}$  (10)

Таким чином, швидкість ензимолізу лінійно залежить від концентрації ферменту. Вплив концентрації субстрату концентрації субстрату є більш складним. У випадку  $C_S > K_M$  рівняння (10) спрощується до:

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

## Додаткова інформація (6/7)

PHYWE

У цьому випадку реакція  $S$  нульового порядку і ензимоліз (ферментоліз) має максимальну швидкість при  $k_2 c_{E_0}$ . Якщо  $C_S = K_M$ , досягається половина максимальної швидкості. Таким чином, константа Міхаеліса відповідає концентрації субстрату, за якої реакція протікає на половині максимальної швидкості. У разі, якщо субстрату залишилося зовсім небагато, тобто  $C_S < K_M$  це призводить до рівняння:

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

тобто швидкість утворення  $P$  є першим порядком після  $E$  та  $S$ .

Для оцінки середня швидкість ензимолізу визначається між 100 і 200 с після початку експерименту. Слід розрахувати різницю між значеннями електропровідності ( $\Delta Y$ ) через 100 і 200 с і розділити на 100 с. Потім визначають швидкість ферментативного розщеплення (лізису). Ці швидкості (у мкСм/смс) наносять на графік в залежності від концентрації сечовини (у ммоль/л). Концентрація субстрату  $C_S$  (у ммоль/л) визначається за формулою:

$C_S = (W/10000)/M$  (13), де  $W$  – концентрація розчину сечовини в % і  $M$  – молярна маса сечовини = 60,06 г / моль.

## Додаткова інформація (7/7)

PHYWE

Оскільки важко безпосередньо зчитувати концентрацію, що відповідає половині максимальної швидкості, тобто  $K_M$ , використовується графік Лайнвівера-Берка.

При швидкості реакції  $v = dcP/dt$  і у зворотному поданні з рівняння (10) отримуємо:

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

Графік залежності  $1/v$  відносно  $1/C_S$  (див. рис. 5), таким чином, дає  $k_2$  (у ступені -1) як перетин ординати ( $1/c_S = 0$ ) і  $K_M / k_2$  як нахил прямої лінії. Спочатку визначається перетин ординати і нахил прямої. Потім цей нахил ділиться на точку перетину ординат, щоб отримати константу Міхаеліса. Розрахунок дає значення  $4,86 \cdot 10^{-3}$  моль/л для константи Міхаеліса уреаз.

Невелике значення  $K_M$  означає, що фермент має високу спорідненість до свого субстрату. Уреаза була першим ферментом, представленим у кристалічній формі (Самнер, 1926). На відміну від алостеричних ферментів, він належить до "нормальних" ферментів, що задовольняють механізму Міхаеліса-Ментена.

## Інструкції з техніки безпеки

PHYWE



- До цього експерименту застосовуються загальні інструкції щодо безпечного проведення експериментів під час викладання природничих наук.

## Теорія

PHYWE

Уреаза каталізує ферментативний гідроліз сечовини у воді, забезпечуючи тим самим діоксид вуглецю і воду. За допомогою датчика провідності SMARTsense можна виміряти електропровідність отриманого розчину. Це дає змогу простежити, як іони в сполучі збільшують електропровідність.

Константа Міхаеліса вказує концентрацію субстрату, за якої досягається половина максимальної швидкості ферменту.

Оскільки швидкість гідролізу сечовини за різних концентрацій субстрату може бути визначена шляхом вимірювання провідності, константа Міхаеліса може бути розрахована на основі цих значень.

## Обладнання

PHYWE

| Позиція | Матеріал                                                                                                       | Пункт №.    | Кількість |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|-----------|
| 1       | <a href="#">Cobra SMARTsense - Conductivity - Електропровідність, 0...20000 мкСм/см, 0...100°C (Bluetooth)</a> | 12922-01    | 1         |
| 2       | <a href="#">Розділювач для магнітних стрижнів</a>                                                              | 35680-03    | 1         |
| 3       | Магнітна мішалка з підігрівом, нержавіюча сталь, цифрова, 280 °C, 100-1500 об/хв                               | FHO-RSM10HS | 1         |
| 4       | <a href="#">Магнітна мішалка, циліндрична, 50 мм</a>                                                           | 46299-03    | 1         |
| 5       | <a href="#">Портативні ваги, OHAUS YA302, 300 г / 0,05 г</a>                                                   | 49213-00    | 1         |
| 6       | <a href="#">Підставка для штатива Бунзена, 210x130 мм, h=750 мм</a>                                            | 37694-00    | 1         |
| 7       | <a href="#">Подвійна муфта</a>                                                                                 | 02043-00    | 1         |
| 8       | <a href="#">Універсальний затискач</a>                                                                         | 37715-00    | 1         |
| 9       | <a href="#">Мензурка, висока, 100 мл</a>                                                                       | 46026-00    | 1         |
| 10      | <a href="#">Мензурка, низька, 250 мл, пластмаса</a>                                                            | 36013-01    | 1         |

## Додаткові матеріали

PHYWE

| Позиція | Номер артикля | Матеріали |
|---------|---------------|-----------|
|---------|---------------|-----------|

|   |          |                                       |
|---|----------|---------------------------------------|
| 1 |          | мобільний пристрій (смартфон/планшет) |
| 2 | 14581-61 | measureAPP                            |

PHYWE



## Підготовка та виконання роботи

## Підготовка (1/5)

PHYWE

Для вимірювання за допомогою **датчиків Cobra SMARTsense** необхідне додаток **PHYWE measureAPP**. Цей застосунок можна безкоштовно завантажити з відповідного магазину додатків (QR-коди дивіться нижче). Перед запуском додатка, будь ласка переконайтеся, що на Вашому пристрої (смартфоні, планшеті, персональному комп'ютері) **активовано Bluetooth**.



iOS



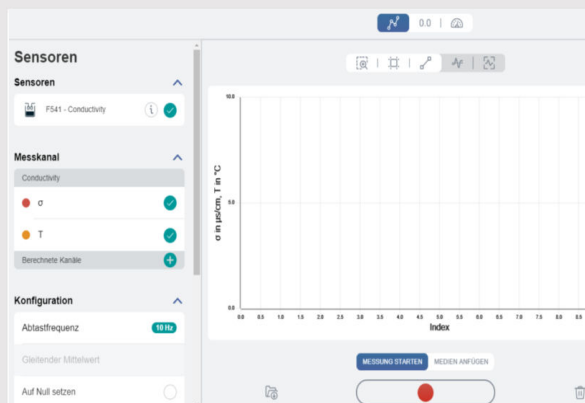
Android



Windows

## Структура (2/5)

PHYWE



measureApp  
у версії Windows 10

- Увімкніть датчик електропровідності SMARTsense, натиснувши й утримуючи кнопку живлення.
- Підключіть датчик до пристрою в застосунку measureAPP у розділі "Вимірювання", як показано на рисунку ліворуч.
- Датчик електропровідності SMARTSense тепер відображається в застосунку.

## Підготовка (3/5)

PHYWE

Для проведення експерименту потрібні розчини з різними концентраціями сечовини. Вони мають бути свіжоприготовані перед початком експерименту:

- 0,4% розчин сечовини (основний розчин сечовини): 0,40 г сечовини відміряють у колбу Ерленмейєра об'ємом 100 мл і розчиняють у 99,6 г дистильованої води.
- 0,2% розчин сечовини: Перенесіть 50 мл 0,4% розчину сечовини мірною піпеткою об'ємом 50 мл у колбу Ерленмейєра об'ємом 100 мл і додайте 50 мл дистильованої води.
- 0,1% розчин сечовини: Перенесіть 50 мл 0,2% розчину сечовини мірною піпеткою об'ємом 50 мл у колбу Ерленмейєра об'ємом 100 мл і додайте 50 мл дистильованої води.
- 0,05 % розчин сечовини: Перенесіть 50 мл 0,1 % розчину сечовини мірною піпеткою об'ємом 50 мл у колбу Ерленмейєра об'ємом 100 мл і додайте 50 мл дистильованої води.

## Підготовка (4/5)

PHYWE

- 0,025 % розчин сечовини: Перенесіть 50 мл 0,05 % розчину сечовини мірною піпеткою об'ємом 50 мл у колбу Ерленмейєра об'ємом 100 мл і додайте 50 мл дистильованої води.
- 0,0125 % розчин сечовини: Перенесіть 50 мл 0,025 % розчину сечовини мірною піпеткою об'ємом 50 мл у колбу Ерленмейєра об'ємом 100 мл і додайте 50 мл дистильованої води.

**Примітка:** розчин сечовини **завжди слід зберігати** у холодильнику!

## Підготовка (5/5)

PHYWE

- Зберіть експериментальну установку, як показано на рисунку.
- Закріпіть універсальний затискач на штативному стрижні підставки Бунзена за допомогою подвійної муфти.
- Закріпіть датчик SMARTsense-Електропровідність (Cobra SMARTsense Conductivity) універсальним затискачем.



## Виконання роботи (1/2)

PHYWE

- Додайте 40 мл 0,0125% розчину сечовини (спочатку найнижча концентрація) до мензурки об'ємом 100 мл шляхом подвійного піпетування за допомогою мірної піпетки об'ємом 20 мл, потім помістіть у мензурку стрижень для магнітної мішалки.
- Поставте мензурку на магнітну мішалку і занурте датчик SMARTsense-Електропровідність (Cobra SMARTsense Conductivity) в розчин.
- Встановіть мішалку на середню швидкість перемішування. (Увага: стрижень магнітної мішалки не повинен торкатися датчика!).
- За допомогою мікролітрового шприца додайте 50 мкл розчину уреазы й одразу почніть вимірювання, натиснувши кнопку "Пуск".
- За ходом реакції можна візуально стежити на моніторі.
- Після завершення вимірювання збережіть дані для подальшої обробки.

## Виконання роботи (2/2)

PHYWE

- Таким самим чином проводять вимірювання з усіма шістьма приготованими розчинами сечовини (у порядку зростання).
- Для проведення окремих вимірювань склянку знімають з магнітної мішалки в кожному випадку, а стрижень магнітної мішалки виймають з розчину.
- Стрижень магнітної мішалки необхідно ретельно промити дистильованою водою, ненадовго просушити паперовим рушником, а потім помістити в наступний розчин.
- Після кожного експерименту датчик SMARTsense-Електропровідність (Cobra SMARTsense Conductivity) слід промити дистильованою водою.

## Протокол

## Завдання 1

Вставте слова в тексті в потрібне місце!

При ферментативному гідролізі сечовини у водному розчині отримують [ ] і аміак. [ ] цих сполук збільшують [ ] розчину. Вимірювання провідності можуть бути використані для визначення швидкості гідролізу сечовини ферментом [ ] за різних концентрацій субстрату. [ ] може бути розрахована на основі цих значень.

уреази

Константа Міхаеліса

вуглекислий газ

електропровідність

іони

✓ Перевірити

## Завдання 2

PHYWE

Що означає невелике значення константи Міхаеліса?

Невелике значення константи Міхаеліса означає, що фермент має низьку спорідненість до субстрату.

Невелике значення константи Міхаеліса не має значення для ферментно-субстратних відносин.

Невелике значення константи Міхаеліса означає, що фермент нічого не може зробити з субстратом, і необхідно вибрати інший фермент.

Невелике значення константи Міхаеліса означає, що фермент має високу спорідненість до свого субстрату.

## Завдання 3

PHYWE

Виберіть правильні твердження.

- ☐ Константа Міхаеліса вказує концентрацію субстрату, за якої досягається максимальна швидкість ферменту.
- ☐ Константа Міхаеліса вказує концентрацію субстрату, за якої досягається половина максимальної швидкості ферменту.
- ☐ Константа Міхаеліса завжди дорівнює 50.

✓ Перевірити

Слайд

Оцінка / Усього

|                                                  |     |
|--------------------------------------------------|-----|
| Слайд 23: Міхаельмська константа                 | 0/5 |
| Слайд 24: Значення константи Міхаеліса           | 0/2 |
| Слайд 25: Заяви з приводу Міхаеліської константи | 0/1 |

Усього  0/8

👁️ Рішення

🔄 Повторити