

Enzyme im Unterricht

Enzym-Kit

Die Substanzen dieses Enzym-Kits reichen bei 4 - 5 Schülergruppen für mehrfache Versuchswiederholungen aus. **Enzyme im Kühlschrank (ca. +4° C)**, trocken und lichtgeschützt aufbewahren.

Inhalt:

α -Amylase	Salzsäure 0,1 N, 250 ml
Urease	3 versch. Lösungen von Puffersubstanzen, je 250 ml
Harnstoff z.A.	Tropfpipetten
Thioharnstoff z.A.	Diffusions-Schalen
Stärke, löslich z.A.	Bromthymolblau-Indikator für die Herstellung einer 0,1%igen
Lugolsche Lösung, 50 ml	Lösung in 80 % Methanol, 50 ml
Messpipetten	
Mikrolöffelspatel	

Enzym**lösungen** halten sich zwar im Kühlschrank einige Tage: es ist jedoch besser, sie frisch anzusetzen. Glas- und Plastikwaren gründlich reinigen und mit destilliertem oder entmineralisiertem Wasser nachspülen. Für die Enzymversuche nur destilliertes oder entmineralisiertes Wasser verwenden.

Die Arbeit mit diesem Kit setzt voraus, dass folgende Materialien zusätzlich zur Verfügung stehen: Reagenz- und Bechergläser, Bunsenbrenner oder Heizplatte, destilliertes oder entmineralisiertes Wasser.

Stärke und α -Amylase

Amylasen verwandeln Stärke in Malzzucker (Maltose). In der Natur sind zwei Amylaseformen anzutreffen:

β -Amylase: Diese baut das Stärkemolekül von den Enden her ab. Es werden dabei jeweils 2 zusammenhängende Glucoseeinheiten (d.h. ein Maltosemolekül) abgespalten.

α -Amylasen: Im Gegensatz zur β -Amylase greift die α -Amylase nicht am Ende, sondern im mittleren Bereich des Stärkemoleküls an. Als Zwischenprodukte entstehen daher zunächst größere Bruchstücke der Stärkemoleküle, sog. Dextrine. Diese werden allerdings sehr rasch bis zur Maltosestufe weiter abgebaut.

β -Amylasen finden sich in Pflanzen. α -Amylasen dagegen sind bei Tieren und Menschen verbreitet, beispielsweise enthält der menschliche Mund- und Speichel beträchtliche Mengen von α -Amylase.

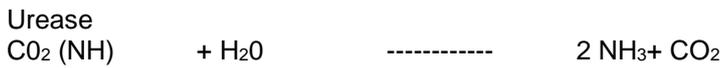
Der Stärkenachweis erfolgt allgemein mit Hilfe der Jodprobe unter Verwendung einer „Lugolschen Lösung“ (Jod-Kaliumjodidlösung nach Lugol). Eine blau-violette Färbung zeigt die Anwesenheit von Stärke an. Die Amylasewirkung ist am Ausbleiben dieser typischen Nachweisreaktion zu erkennen.

Beachten Sie bitte, dass der Jod-Stärke-Komplex nicht hitzebeständig ist. In heißen Lösungen bleibt die Jod-Stärke-Reaktion daher aus.

Harnstoff und Urease

Harnstoff bildet sich als stickstoffhaltiges Stoffwechselprodukt im tierischen und menschlichen Organismus. Er ist ein häufiger Bestandteil von Exkreten - z.B. scheidet ein erwachsener Mensch mit dem Urin täglich etwa 30 g Harnstoff aus.

Bestimmte Bodenbakterien sind zur Bildung von Urease befähigt. Mit ihrer Hilfe können sie den Harnstoff hydrolytisch zu Ammoniak und Kohlendioxid abbauen.



Urease ist außerdem in zahlreichen Pflanzen anzutreffen. So wurde z.B. Urease als erstes Enzym in reiner, kristallisierter Form aus Sojabohnen gewonnen (Sumner 1926):

wird eine neutral reagierende Harnstofflösung mit Urease versetzt, so verschiebt sich der pH-Wert in den alkalischen Bereich. Dies kann z.B. mit Hilfe des Indikators Bromthymolblau sichtbar gemacht werden:

Bromthymolblau-Lösung ist im sauren Bereich gelb, im neutralen grün und im alkalischen blau gefärbt.

Versuche 1: Hydrolyse des Harnstoffs

a.) Unter Verwendung einer Diffusionsschale

Der Versuch soll zeigen, dass bei der Hydrolyse des Harnstoffs Ammoniak (gasförmig) entsteht.

Vorbereitung: ca. 5 g Harnstoff in 50 ml Wasser lösen.
ca. 50 mg Urease in 50 ml Wasser geben und schütteln.
Evtl. unlösliche Bestandteile lässt man absetzen und verwendet den Überstand.
Diese Lösungen reichen zur Füllung von 5 Diffusionsschalen.

Durchführung: In die eine Hälfte einer Diffusionsschale werden ca. 10 ml Wasser einpipettiert und einige Tropfen Bromthymolblau-Lösung zugegeben. In die andere Hälfte geben Sie ca. 10 ml Harnstofflösung und anschließend 8 ml Ureaselösung. Dann wird der Deckel aufgelegt und durch vorsichtiges Bewegen der Inhalt der Schalenhälften gleichmäßig durchmischt. Achten Sie darauf, dass die Flüssigkeiten in den beiden getrennten Schalenhälften sich nicht vermischen.

Beobachtung: Nach kurzer Zeit schlägt der Indikator nach blau um. Die Färbung beginnt in der Nähe des Steges und dehnt sich schließlich über die gesamte Schalenhälfte aus.

Erklärung: Unter der Einwirkung der Urease erfolgt eine Hydrolyse des Harnstoffs. Neben CO₂ entsteht NH₃. Ammoniak tritt in den Luftraum über und verbindet sich z.T. mit dem Wasser der gegenüberliegenden Schalenhälfte zu Ammoniumhydroxid, welches die alkalische Reaktion hervorruft.

b.) Reagenzglasversuch

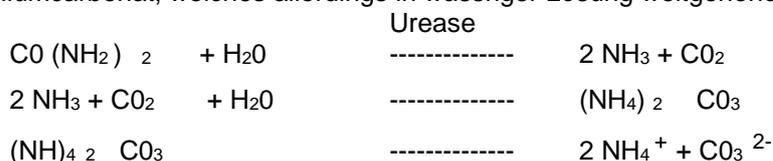
Bei diesem Versuch erfolgt - im Gegensatz zu a.) - keine Trennung in verschiedene Reaktionsräume. Daher sind wesentlich geringere Substanzmengen ausreichend.

Vorbereitung: ca. 0,5 g Harnstoff in 50 ml Wasser lösen (oder Harnstofflösung von Versuch 1 a.) im Verhältnis 1:9 mit Wasser verdünnen).
ca. 25 mg Urease zu 25 ml Wasser geben und schütteln.
Evtl. unlösliche Bestandteile lässt man absetzen und verwendet den Überstand.

Durchführung: Ein Reagenzglas zu etwa einem Drittel mit Harnstofflösung füllen, wenige Tropfen Bromthymolblau-Lösung zugeben und zum Schluss das Ganze mit 1 - 2 ml Ureaselösung versetzen.

Beobachtung: Der Indikator schlägt nach blau um. Um den Reaktionsverlauf noch eindrucksvoller demonstrieren zu können, kann auch von einer leicht sauren Harnstofflösung ausgegangen werden. Dies ist in einfacher Weise zu bewerkstelligen, in dem durch ein Glasrohr (z.B. Pipette) so viel Atemluft (CO₂!) durch die mit Indikator versetzte Harnstofflösung geblasen wird, bis ein Farbumschlag von grün nach gelb eintritt. Nach Zugabe der Ureaselösung verändert sich jetzt die Indikatorfarbe von gelb über grün nach blau.

Erklärung: Beim Harnstoffabbau (Hydrolyse) entstehen NH₃ und CO₂. Zusammen mit Wasser bildet sich Ammoniumcarbonat, welches allerdings in wässriger Lösung weitgehend dissoziiert ist:



Versuch 2: Hitzedenaturierung von Urease

Vorbereitung wie bei Versuch 1 b.)

Durchführung: Ein Reagenzglas zu etwa einem Drittel mit Harnstofflösung füllen und wenige Tropfen Bromthymolblau-Lösung zugeben. In einem anderen Reagenzglas werden 1 - 2 ml Ureaselösung bis zum Kochen erhitzt. Dies kann im kochenden Wasserbad oder - schneller - über der Bunsenflamme erfolgen. In letzterem Fall sollten Sie vorsichtig erhitzen, um ein Übersäumen der Ureaselösung zu vermeiden. Ferner ist darauf zu achten, dass eine der Reagenzglaswand evtl. anhaftende Ureaselösung ebenfalls erhitzt wird. Anschließend geben Sie die Ureaselösung zur Harnstofflösung zu.

Beobachtung: Es erfolgt keine Farbänderung des Indikators, d.h. es findet auch kein Harnstoffabbau statt.

Erklärung: Enzyme sind Eiweißstoffe, deren Struktur durch Hitze zerstört wird.

Hinweis: „Spezialisten“, wie z.B. Bakterien heißer Quellen, besitzen Enzyme, deren Wirkungsoptimum zum Teil bei 90 ° liegt. Solche Enzyme können demnach relativ hohe Temperaturen unverändert überstehen.

Versuch 3: Wirkung von Jod auf Enzyme

Vorbereitung wie bei Versuch 1 b.)

Durchführung: Ein Reagenzglas zu etwa einem Drittel mit Harnstofflösung füllen und wenige Tropfen Bromthymolblau-Lösung zugeben. In ein zweites Reagenzglas pipettiert man ca. 1 - 2 ml Ureaselösung. Danach wird die Ureaselösung mit einem Tropfen Lugolscher-Lösung versetzt und dann die Ureaselösung zur Harnstofflösung gegossen.

Beobachtung: Nach der Zugabe der Ureaselösung (mit Jodzusatz) verändert sich nichts mehr.

Erklärung: Jod ist ein reaktionsfähiges Element, das offensichtlich in der Lage ist, die Wirksamkeit der Urease zu hemmen.

Versuch 4: Substratspezifität von Enzymen

Vorbereitung wie bei Versuch 1 b.), außerdem ca. 0,5 g Thioharnstoff in 50 ml Wasser lösen.

Durchführung: Zwei Reagenzgläser zu je einem Drittel mit Harnstoff- bzw. Thioharnstoff füllen, jeweils mit wenigen Tropfen Bromthymolblau-Lösung versetzen und schließlich je 1 ml Ureaselösung hinzufügen.

Beobachtung: Im Reagenzglas, welches Harnstoff enthält, tritt die übliche Blaufärbung auf. Im anderen Reagenzglas (Thioharnstoff) ist keine Veränderung zu erkennen.

Erklärung: Zwischen Harnstoff und Thioharnstoff besteht eine sehr enge „chemische Verwandtschaft“: sie stimmen in der Struktur weitgehend überein. Trotzdem ist aber die Urease lediglich in der Lage, den Harnstoff abzubauen. Dagegen kann das Enzym nicht mit dem Thioharnstoff reagieren.



Versuch 5: Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Temperatur

Vorbereitung: ca. 1 g Stärke in einem Becherglas mit ca. 100 ml Wasser aufschwemmen und anschließend unter Umschwenken erhitzen, bis die Lösung klar erscheint. Stärkelösung auf Zimmertemperatur abkühlen lassen (evtl. Becherglas in kaltes Wasser tauchen).
ca. 20 mg Amylase in 10 ml Wasser auflösen. Wasserbäder (z.B. wassergefüllte Bechergläser) vorbereiten (siehe bei „Durchführung“).

Durchführung: In 4 Reagenzgläser jeweils 5 ml Stärkelösung einfüllen. Die Reagenzgläser in die verschiedenen temperierten Wasserbäder einstellen, wo sie auch während des ganzen Versuchsablaufs verbleiben:

1. Wasserbad: Eis - Wasser - Gemisch (0° C)
2. Wasserbad: Wasser von Zimmertemperatur (ca. 20° C)
3. Wasserbad: Wasser auf ca. 45° C erwärmen. Um ein rasches Abkühlen zu vermeiden, erweist sich die Verwendung eines Thermosgefäßes als zweckmäßig.
4. Wasserbad: kochendes Wasser(ca. 100° C).

Warten Sie zunächst einige Minuten bis der Reagenzglasinhalt die Temperatur des Wasserbades angenommen hat. Geben Sie dann mit einer Tropfpipette in rascher Folge jeweils 1 Tropfen der Amylase-Lösung in jedes Reagenzglas und schütteln Sie kurz. Wird ein rascherer Versuchsablauf angestrebt, so kann die Tropfenzahl auch auf 2 oder 3 pro Reagenzglas erhöht werden.

Entnehmen Sie dann mit einem Glasstab oder einer Tropfpipette jeweils einen großen Tropfen des Reaktionsgemisches, bringen ihn auf eine Glasplatte (z.B. Objektträger) und fügen einen Tropfen Lugolscher-Lösung hinzu. Dieser Vorgang muss evtl. mehrmals wiederholt werden (je nach Arbeitsgeschwindigkeit), bis sich deutliche Färbungsunterschiede feststellen lassen.

Beobachtung:

- 0° C: starke Jod-Stärke-Reaktion, deren Intensität erst nach längerer Zeit abnimmt.
- 20° C: zunächst ist eine Jod-Stärke-Reaktion zu beobachten. Bei Wiederholung des Tests nach einigen Minuten bleibt diese aus.
- 45° C: wie bei 20° C, jedoch wesentlich schnellerer Verlauf.
- 100° C: die Jod-Stärke-Reaktion tritt auch nach längerer Zeit in unveränderter Stärke auf.

Anmerkung: Selbstverständlich bietet es sich an, weitere Temperaturstufen in die Untersuchungen mit einzubeziehen.

Wenn Sie die Jod-Stärke-Reaktion mit dem gesamten Reagenzglasinhalt durchführen (was möglich ist), dann ist zu beachten, dass der Stärkenachweis bei hohen Temperaturen nicht gelingt. In diesem Fall müssten Sie zuvor abkühlen.

Erklärung: Auch bei Enzymreaktionen gilt die RGT-Regel: bei 0° C verläuft der Stärkeabbau ziemlich langsam. Bei 20° C ist die Reaktionsgeschwindigkeit deutlich größer. Das Optimum der Enzymaktivität liegt bei etwa 40° C. Bei noch höheren Temperaturen verlieren jedoch die Enzyme i.a. sehr rasch ihre Aktivität infolge Hitzedenaturierung des Enzym-Eiweißes (vgl. Versuch 2.)

Versuch 6: Abhängigkeit der Enzymaktivität vom pH-Wert

Vorbereitung: 2 g Stärke in ein Becherglas geben und mit 100 ml Wasser aufschwemmen. Anschließend unter leichtem Schütteln aufkochen, bis die Lösung klar ist. ca. 20 mg Amylase in 10 ml Wasser auflösen.

Zur Herstellung von Pufferlösungen enthält der Kit vier Lösungen von Grundsubstanzen. Durch entsprechendes Mischen erhalten Sie Pufferlösungen mit ganz bestimmten pH-Werten. Bei Verwendung nur einer Lösung tritt natürlich keine Pufferwirkung auf. Die Erfahrung zeigt aber, dass (z.B. bei pH 4,7) die Versuche trotzdem mit ausreichender Zuverlässigkeit ablaufen.

Stellen Sie nun bitte nach den Angaben der folgenden Tabelle durch Mischung entsprechender Volumenteile Lösungen verschiedener pH-Stufen her (z.B. pH 3,0 - 4,7 - 5,9 - 7,0 - 8,0, 10,7)

Hinweis: Zur Durchführung einer Untersuchungsreihe benötigen Sie jeweils 2 ml von jeder pH-Stufe.

Die Mischung der angegebenen Volumenteile ergeben Lösungen eines bestimmten pH-Wertes:

pH-Wert	Salzsäure	KH ₂ PO ₂	Na ₂ HPO	K ₂ PO ₄
(ca.)	N/10	M/15	M/15	M/15
1,0	10,0			
1,9	5,0	5,0		
3,0	1,0	9,0		
3,6	0,5	9,5		
4,7		10,0		
5,6		9,5	0,5	
5,9		9,0	1,0	
6,2	8,0	8,0	2,0	
6,5		7,0	3,0	
6,8		5,0	5,0	
7,0		4,0	6,0	
7,2		3,0	7,0	
7,4		2,0	8,0	
7,7		1,0	9,0	
8,0		4,5		5,5
8,7		4,0		6,0
10,7		3,5		6,5
11,1		3,0		7,0
11,5		2,0		8,0
12,0				10,0

Durchführung: Füllen Sie bitte die entsprechende Anzahl an Reagenzgläsern mit je 2 ml Pufferlösung und 2 ml Stärkelösung. Dann geben Sie rasch nacheinander in jedes Reagenzglas 5 Tropfen der Amylase-Lösung und mischen den Inhalt durch kurzes Schütteln. Anschließend entnehmen Sie mit einem Glasstab oder einer Tropfpipette jeweils einen großen Tropfen des Reaktionsgemisches, bringen ihn auf eine Glasplatte (z.B. Objektträger) und fügen einen Tropfen Lugolscher-Lösung hinzu. Dieser Vorgang muss evtl. wiederholt werden, bis sich deutliche Färbungsunterschiede feststellen lassen.

Hinweis: Im stark alkalischen Bereich ist es möglich, dass die Jod-Stärke-Reaktion unterbleibt (Blindprobe!) In diesem Fall muss durch Zugabe von N/10 HCl zunächst eine neutrale oder saure Reaktion hergestellt werden.

Beobachtung: Im Bereich zwischen pH 6 bis 7 geht der Stärkeabbau rasch vonstatten. In den stark sauren bzw. alkalischen Versuchsansätzen zeigen sich dagegen auch nach längerer Zeit keine Veränderungen.

Erklärung: Die meisten Enzyme sind nur in einem bestimmten pH-Bereich wirksam. Dies kann verschiedene Ursache haben. Beispielsweise kann das Enzymprotein in den extremen pH-Bereichen denaturiert werden. Im Zusammenhang mit dem pH-Milieu kann sich auch der Dissoziationsgrad wesentlicher Strukturen des aktiven Zentrums verändern. Ferner ist in bestimmten Fällen auch eine pH-abhängige Veränderung des Substrates oder evtl. Aktivatoren möglich.

Versuch 7: Abhängigkeit der Umsatzgeschwindigkeit von der Enzymkonzentration

a. Versuch mit Urease

Vorbereitung und Versuchsablauf entsprechen im Prinzip dem Versuch 1 a. Die Versuchsansätze variieren jedoch.

Durchführung: 4 Diffusionsschalen auf ein weißes Blatt Papier stellen.

In jeweils eine Schalenhälfte 10 ml Wasser pipettieren, dem zuvor einige Tropfen Bromthymolblau-Lösung zugesetzt werden. In die anderen Schalenhälften je 8 ml Harnstofflösung füllen. Hinzu kommt noch Urease in abgestuften Mengen.

- | | | | |
|------------|---------------------------------|------------|---------------------------------|
| 1. Schale: | 8 ml Ureaselösung | 2. Schale: | 4 ml Ureaselösung + 4 ml Wasser |
| 3. Schale: | 2 ml Ureaselösung + 6 ml Wasser | 4. Schale: | 1 ml Ureaselösung + 7 ml Wasser |

Sofort nach Zugabe der Urease werden die Schalendeckel aufgelegt. Durch vorsichtiges Bewegen der Papierunterlage wird eine gleichmäßige Durchmischung der Lösungen erreicht. Bitte beachten Sie aber, dass der Inhalt der getrennten Schalenhälften sich nicht mischen kann!

Beobachtung: Nach ca. 5 - 10 Minuten ist in der 1. Schale eine kräftige Blaufärbung zu erkennen. In den Schalen 2 - 4 ist die Blaufärbung in abgestufter Weise wesentlich geringer ausgeprägt.

Erklärung: Bei hoher Ureasekonzentration wird wesentlich mehr Harnstoff umgesetzt als bei niedrigerer.

b. Versuch mit Amylase

Durchführung: In 3 Reagenzgläser jeweils 5 ml Stärkelösung einfüllen und unterschiedliche Amylasen-Mengen zugeben, z.B. 1,5 und 20 Tropfen zugeben.

Anschließend entnehmen Sie mit einem Glasstab oder einer Tropfpipette jeweils einen großen Tropfen des Reaktionsgemisches, bringen ihn auf eine Glasplatte (z.B. Objektträger) und fügen einen Tropfen Lugolscher-Lösung hinzu.

Dieser Vorgang muss evtl. mehrmals wiederholt werden, bis deutliche Farbunterschiede erkennbar sind.

Beobachtung: Je größer die Amylasenmenge, umso rascher verschwindet die Jod-Stärke-Reaktion

Enzyme im Unterricht

Art. 110.260 Die Verdauung, Schlüter-Enzym-Kit

Die Schülergruppen erarbeiten sich die experimentellen Grundlagen: Fettverdauung, Wirkung des Gallensaftes, Nachweise von Stärke und Glukose, Stärkeabbau durch Amylase, Nachweis der Stärke Abbauprodukte, Eiweißverdauung, Temperaturabhängigkeit des Verdauungsprozesses. 16 verschiedene Substanzen mit ausf. Versuchsanleitung.

Art. 110.265 Biokraftstoffe, Enzyme bei der Herstellung von Bioethanol

In dieser Versuchsreihe untersuchen Schüler den Nutzen von Enzymen und Mikroben bei der Herstellung von Bioethanol-Kraftstoff. Die Schüler beobachten zunächst die Fähigkeit von Enzymen Stärke zu spalten. Die Schüler bauen ihr technisches Verständnis und kritisches Denkvermögen aus, indem sie um den Entwurf eines Apparates zur Messung der Gasproduktion während der Fermentation miteinander in Wettstreit treten. Sie demonstrieren ihr Wissen über Biokraftstoffe, Fermentation und Enzyme, indem sie Fragen beantworten und ihre Ergebnisse auswerten. Das Kit ist für 8 Gruppen mit bis zu 4 Schülern ausgelegt.

