

Enzymatik: Harnstoffspaltung durch Urease

Versuchsziele

- Ein Versuch mit einem Enzym kennenlernen.
- Eine in der Natur vorkommende Enzymreaktion untersuchen.
- Zusammenhänge zwischen Ionenkonzentrationen und Leitfähigkeiten erkennen.
- Die Funktionsweise von Katalysatoren verstehen.
- Einen Einblick in biochemische Prozesse erhalten.

Grundlagen

Enzyme gehören in die Stoffklasse der Proteine und bestehen aus Aminosäuren. In der Natur gibt es 20 verschiedene Aminosäuren, aus denen viele verschiedene Proteine zusammengesetzt werden können. Eine Proteingruppe sind Enzyme. Dabei handelt es sich um Biokatalysatoren, die z.B. Stoffwechselwege katalysieren. Ein Enzym bindet nicht-kovalent an das umzusetzende Substrat. Es bildet sich ein Enzymsubstratkomplex, der zu einer Konformationsänderung im Protein führt. Dieser stabilisiert wiederum den Übergangszustand der zu katalysierenden Reaktion. Durch Abspaltung des Enzyms wird dann das gewünschte Produkt gebildet. Das Enzym geht unverändert aus der Reaktion hervor und kann weitere Substrate umsetzen. Die allgemeine Enzymreaktion lautet daher:



Dabei ist E das Enzym, S das Substrat, ES der Enzymsubstratkomplex und P das gewünschte Produkt.

Bei katalytischen Prozessen wird stets nur die Reaktions-

geschwindigkeit erhöht, nicht jedoch das Reaktionsgleichgewicht verschoben. Dies ist möglich, da Enzyme als Katalysatoren die Aktivierungsenergie für eine Reaktion herabsetzen. So können mehr Moleküle im Übergangszustand vorliegen, was zu einer schnelleren Produktbildung führt. Meist stabilisiert das Enzym den Übergangszustand, wodurch die Energie für diesen herabgesenkt wird. So kann das Produkt schneller gebildet werden, da der Energiehügel (Aktivierungsenergie), der für die Reaktion überwunden werden muss, erniedrigt wird.

Die Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit durch Enzyme kann jedoch durch bestimmte Inhibitoren gehemmt werden. In der Natur spielt dies eine große Rolle, da so viele biochemische Prozesse reguliert werden. So ist es möglich, dass auch in menschlichen Zellen alle Reaktionen an- und ausgeschaltet werden können.

Es gibt zwei Arten der Hemmung, die reversible und die irreversible Hemmung. Bei der reversiblen Hemmung kann der Inhibitor wieder vom Enzym gelöst werden, bei der letzteren nicht mehr. Hier verliert das Enzym seine katalyti-



Abb. 1: Versuchsaufbau zur Leitfähigkeitsmessung.

schen Eigenschaften. Eine reversible Hemmung kann auf zwei Weisen wirken. Entweder setzt sich der Inhibitor an das Enzym anstelle des Substrates (kompetitive Hemmung). Das Enzym ist dann belegt und nicht mehr für das Substrat frei. Inhibitor und Substrat konkurrieren hier um die Bindungsstellen. Ein Inhibitor kann jedoch auch an einer anderen Stelle an das Enzym binden (nichtkompetitive Hemmung) und so die Konformation des Proteins in einer Weise verändern, dass die Reaktion nicht (oder nur wenig) katalysiert werden kann.

In diesem Versuch wird das Enzym Urease untersucht. Dieses Enzym kommt in der Natur häufig in Pflanzen vor. Dort katalysiert es im wässrigen Milieu die Reaktion von Harnstoff zu Ammoniak und Kohlenstoffdioxid, bzw. Ammonium- und Carbonationen (siehe Abb. 2).

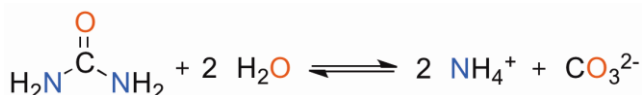



Abb. 2: Von dem Enzym Urease katalysierter Zerfall von Harnstoff in Ammonium- und Carbonationen.


Durch die Katalyse von Urease erhöht sich somit die Anzahl der Ionen einer Lösung. Diese leiten den elektrischen Strom und erzeugen einen Anstieg der Leitfähigkeit. So kann der Verlauf der Reaktion mit einem Leitfähigkeits-Sensor einfach verfolgt und aufgenommen werden. Es folgt eine einfache kinetische Auswertung der Reaktion (Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit und der Reaktionsordnung).

Zusätzlich wird die Produktbildung im Verlaufe des Versuches exemplarisch durch Kupfersulfat irreversibel gehemmt. Das Enzym wird deaktiviert und die Reaktion kommt zum Erliegen.

Gefährdungsbeurteilung

Im Allgemeinen sind die verwendeten Chemikalien ungefährlich. Jedoch sollte beim Arbeiten mit Kupfersulfat der Kontakt mit der Haut und den Augen vermieden werden.

Kupfer (II)-sulfat-5-hydrat	
 <p>Signalwort: Achtung</p>	<p>Gefahrenhinweise</p> <p>H302 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken. H319 Verursacht schwere Augenreizung. H315 Verursacht Hautreizungen. H410 Sehr giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung.</p> <p>Sicherheitshinweise</p> <p>P273 Freisetzung in die Umwelt vermeiden. P302+P352 BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen. P305+P351+P338 BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.</p>

Ammoniumcarbonat	
 <p>Signalwort: Achtung</p>	<p>Gefahrenhinweise</p> <p>H302 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.</p>

Geräte und Chemikalien

1 Pocket-CASSY 2 Bluetooth	524 018
1 CASSY Lab 2	524 220
1 Leitfähigkeits-Adapter S	524 0671
1 Leitfähigkeits-Sensor	529 670
1 Magnetrührer	607 105
1 Sockel	300 11
1 Stativstange 25 cm, 10 mm Ø	301 26
1 Kreuzmuffe, 0...16 mm	301 09
1 Universalklemme 0...80 mm	666 555
1 Messkolben Boro 3.3, 100 ml	665 793
2 Becherglas, Boro 3.3, 150 ml, hF	602 010
1 Messpipette 10 ml	665 997
1 Pipettierball (Peleusball)	666 003
2 Uhrglas 60 mm Ø	664 153
2 Pulvertrichter Boro 3.3, 50 mm Ø	602 680
2 aus: Reagenzglas ,16 x 160 mm Satz 10 ...	664 043
2 Gummistopfen voll, 14-18 mm Ø	667 253
1 Reagenzglasgestell f. 9 Gläser, 18 mm Ø ..	667 050
1 Mikro-Doppelspatel Edelstahl, 185 mm	666 961
1 Kompaktwaage 200 g : 0,01 g	667 7977
1 Ammoniumcarbonat, 100 g	670 3900
1 Harnstoff, 100 g	672 1700
1 Urease (1 U/mg), 5 g	675 2810
1 Kupfer(II)-sulfat-5-hydrat, 100 g	672 9600
1 Wasser, rein, 1 l	675 3400
zusätzlich erforderlich	
1 Computer mit Windows XP, 7 oder 8	
Für eine kabellose Messung wird zusätzlich benötigt:	
1 Akku für Pocket-CASSY 2 Bluetooth	524 019
1 Bluetooth-Dongle	524 0031

Versuchsaufbau und -vorbereitung

Ansetzen der Lösungen

0,1 molare Ammoniumcarbonatlösung: Für 100 ml Lösung werden 0,96 g Ammoniumcarbonat auf einem Uhrglas abgewogen und über einen Pulvertrichter in den Messkolben (100 ml) gespült. Dieser wird bis zur 100 ml-Marke mit Wasser aufgefüllt. Anschließend wird das Ammoniumcarbonat durch Schütteln vollständig gelöst.

0,1 molare Harnstofflösung: Um eine 0,1 molare Lösung zu erhalten, werden 0,12 g Harnstoff auf einem Uhrglas eingewogen und über einen Pulvertrichter in ein Reagenzglas gefüllt. Danach werden genau 10 ml destilliertes Wasser mit einer Messpipette in das Reagenzglas gegeben. Es ist ratsam, den zurückgebliebenen Harnstoff vom Uhrglas in das Reagenzglas zu spülen. Danach wird das Reagenzglas mit einem Stopfen verschlossen und geschüttelt, bis der Harnstoff vollständig gelöst ist.

Ureaselösung: Es werden 0,1 g Urease abgewogen und in ein Reagenzglas gegeben. Wie zuvor bei der Harnstofflösung werden 10 ml destilliertes Wasser hinzugegeben und die Rückstände abgespült. Der Feststoff wird durch Schütteln in Lösung gebracht.

Hinweis: Die so angesetzte Lösung hat zu Anfang eine Enzymaktivität von 10 000 U/l. Mit der angegebenen Aktivi-

tät der Urease von 1 U/mg können pro Minute und Liter 10 mmol des Substrates umgesetzt werden. Die Lösung sollte möglichst kurz vor dem Versuchsbeginn angesetzt und im Kühlschrank aufbewahrt werden, um diese Aktivität zu erhalten. Gelöst und bei Raumtemperatur kann die Urease leicht denaturieren und damit inaktiv werden.

Aufbau der Apparatur

Aus Magnetrührer, Stativmaterial, Leitfähigkeits-Sensor und Leitfähigkeits-Adapter wird eine Apparatur zur Leitfähigkeitsmessung aufgebaut (siehe Abb. 1). Anschließend wird der Sensor über das Pocket-CASSY mit dem Computer verbunden.

Versuchsdurchführung

1. Einstellungen in CASSY Lab laden.

2. Um die Konzentration von Ammoniumcarbonat zu jedem Zeitpunkt zu bestimmen, wird ein Referenzwert für eine Ammoniumcarbonat-Konzentration von 0,1 mol/l aufgenommen. Dafür werden ein Becherglas und der Leitfähigkeitssensor mit 30 ml Ammoniumcarbonatlösung gespült. Die Spüllösung wird weggeschüttet und die restliche Ammoniumcarbonatlösung in das Becherglas gefüllt. Ein Rührfisch wird in das Becherglas gegeben und der Magnetrührer angeschaltet. Danach den Leitfähigkeitssensor mindestens 2 cm tief in die Flüssigkeit eintauchen.

3. Den Messwert ablesen. In den Einstellungen unter „Parameter“ bei „Leitfähigkeit Ammoniumcarbonat κ_1 “ an Stelle der Vorgabe den abgelesenen Messwert (12 430 $\mu\text{S/cm}$) eintragen. Dieser Wert entspräche der vollständigen Hydrolyse der 0,1 molaren Harnstofflösung zu Ammonium- und Carbonationen.

4. Das zweite Becherglas (150 ml) mit 80 ml Wasser füllen und 10 ml Harnstofflösung und einen Rührfisch hinzugeben. Anschließend den Leitfähigkeitssensor eintauchen und den Rührer einschalten.

5. Die Messung starten. Nach circa 10 Sekunden zu der wässrigen Harnstofflösung die gesamten 10 ml der Urease-Lösung geben. Die Harnstofflösung beträgt nun 0,01 mol/l.

6. Für eine Inhibierung der Reaktion nach circa 3 min einzelne Kupfersulfatkristalle hinzugeben.

Hinweis: Darauf achten nicht zu viel Kupfersulfat zuzugeben, da sonst die Leitfähigkeit durch die Kupfersulfationen zu stark erhöht wird.

7. Nach weiteren 2 min die Messung beenden.

Beobachtung

Die spezifische Leitfähigkeit steigt nach Zugabe der Urease linear an. Wird nach einigen Minuten Kupfersulfat hinzugegeben, steigt diese nochmals ein wenig durch die Ionen aus dem Kupfersulfat. Nach einigen Sekunden schwächt sich der Anstieg ab, bis die Leitfähigkeit nahezu konstant bleibt.

Auswertung

Für die Auswertung sind im CASSY-Beispiel in CASSY Lab mehrere Diagramme vorbereitet.

Im Diagramm „spez. Leitfähigkeit“, werden die Messwerte der spezifischen Leitfähigkeit gegen die Zeit aufgetragen (siehe Abb. 3).

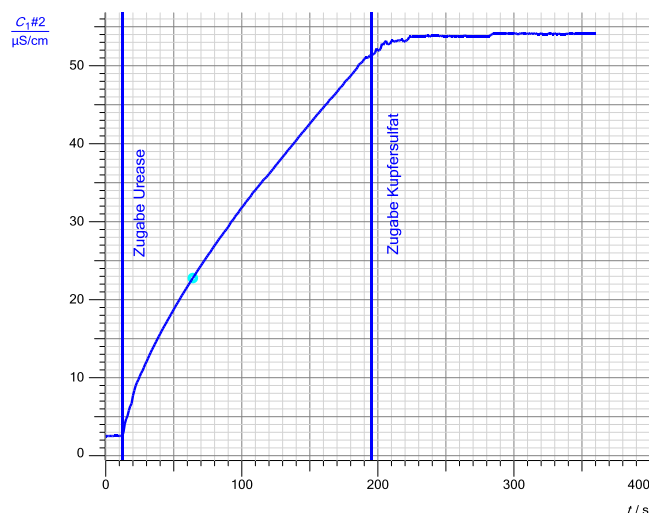


Abb. 3: Auftragung der spezifischen Leitfähigkeit der Ammoniumcarbonatlösung gegen die Zeit.

Die Leitfähigkeit kann mit Hilfe der Kalibrierung in eine Harnstoffkonzentration umgerechnet werden. Diese wird im Diagramm „Harnstoffkonzentration“ dargestellt (siehe Abb. 4). Sie wird automatisch wie folgt berechnet:

$$[\text{NH}_2\text{CONH}_2] = \frac{\kappa_1 - C_{A1}}{\kappa_1 - \kappa_0} \cdot 100 \text{ mmol/l}$$

Dabei ist κ_1 der Referenzwert der 0,1 molaren Ammoniumcarbonatlösung aus der Kalibrierung. C_{A1} ist der gemessene Wert für die Leitfähigkeit zu jeder Zeit und κ_0 die Leitfähigkeit der Lösung zu Reaktionsbeginn.

Nach Zugabe von Urease ist im Diagramm ein linearer Abfall der Harnstoffkonzentration ersichtlich. Wird Kupfersulfat hinzugegeben, sinkt die Harnstoffkonzentration nicht weiter, sondern ist nahezu konstant.

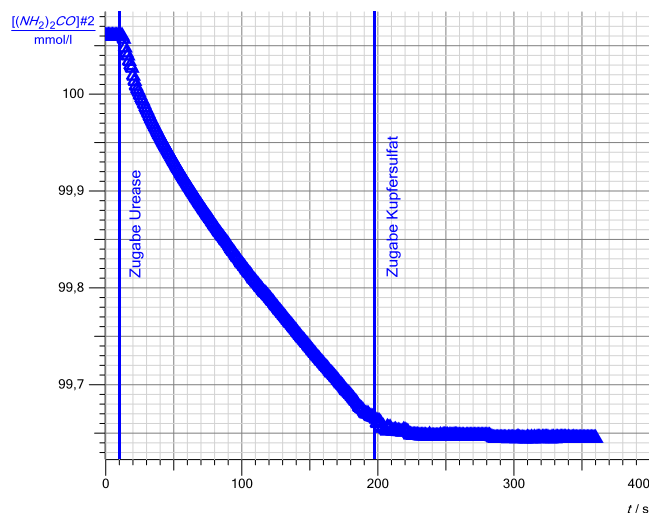


Abb. 4: Auftragung der Harnstoffkonzentration gegen die Zeit.

Zuletzt wird im Diagramm „Reaktionsgeschwindigkeit“ (siehe Abb. 5) die automatisch berechnete Reaktionsgeschwindigkeit gegen die Zeit dargestellt. Diese ist die zeitliche Änderung der Konzentration eines Ausgangsstoffes bzw. eines Produktes (hier: Harnstoff). Wird also wie folgt die zeitliche Ableitung gebildet,

$$r_{\text{H}_2\text{NCONH}_2} = - \frac{d[\text{H}_2\text{NCONH}_2]}{dt}$$

kann so die Reaktionsgeschwindigkeit zu jedem Zeitpunkt in Bezug auf das Edukt Harnstoff berechnet werden.

Die Reaktionsgeschwindigkeit ist nach Zugabe der Urease bezüglich der Harnstoffkonzentration nahezu konstant. Es handelt sich also um eine Reaktion nullter Ordnung.

Nach der Zugabe vom Inhibitor Kupfersulfat ist nach einigen Sekunden eine nahezu konstante Reaktionsgeschwindigkeit von Null zu sehen. Die Reaktion ist zum Erliegen gekommen. Zur Veranschaulichung können dazu wie in Abbildung 5 Ausgleichsgeraden gelegt werden.

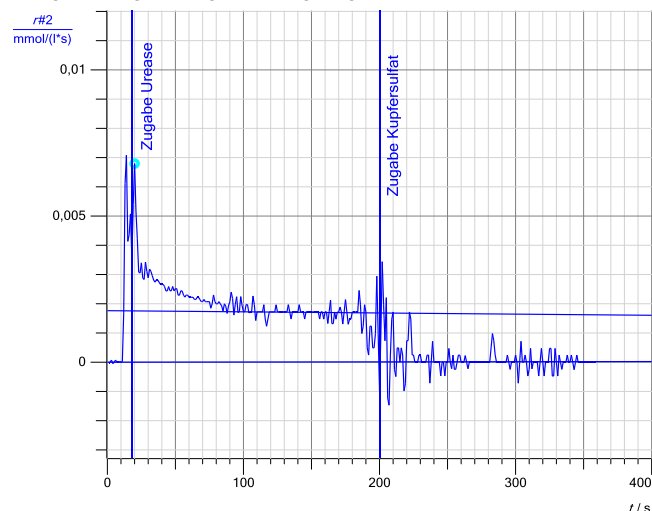


Abb. 5: Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit gegen die Zeit.

Ergebnis

Das Enzym Urease katalysiert im wässrigen Milieu die Spaltung von Harnstoff zu Ammonium- und Carbonationen. Daraus resultiert ein Anstieg der Leitfähigkeit. Diese Leitfähigkeit wird dann zur Berechnung der Harnstoffkonzentration zu jedem Zeitpunkt genutzt. Dabei wird ersichtlich, dass diese im Verlauf der Reaktion linear abfällt. Es handelt sich hier also um eine Reaktion nullter Ordnung. Solche Reaktionen sind unabhängig von der Konzentration der beteiligten Stoffe. Viele katalysierte Reaktionen verhalten sich so. Grund dafür ist, dass geschwindigkeitsbestimmende Schritte am Katalysator stattfinden, der im Verhältnis zu den Reaktanden in sehr kleinen Mengen vorliegt.

Werden als Inhibitor Kupfersulfatkristalle hinzugegeben kommt die Reaktion zum Erliegen. Kupfersulfat denaturiert das Enzym, da Kupfer mit den Aminosäuren stabile Komplexe eingeht. Diese verursachen in der Urease Konformationsänderungen, die das Enzym deaktivieren.

Reinigung und Entsorgung

Die Lösungen ohne Kupfersulfat können im Ausguss entsorgt werden. Die Lösungen mit Kupfersulfat werden im Behälter für Schwermetalle ohne Halogene entsorgt. Um das Volumen zu verringern, kann diese Lösung vorher getrocknet oder eingedampft werden.