

Enzyme als Biokatalysatoren

„Hydrolyse von Eiweißen und Stärke zur Charakterisierung der Hydrolasen Trypsin und Amylase“



Klassenstufe	Oberthemen	Unterthemen	Anforderungsniveau	Durchführungsniveau	Vorbereitung
S1 / S2	Cytologie/Enzymatik	Wirkweise und Spezifität von Enzymen	●●	■ ■	30 min

Die Rolle von Enzymen als Biokatalysatoren ist von zentraler Bedeutung für die Vorgänge in lebenden Systemen. Mittelbar oder unmittelbar wird Enzymatik als Thema in den Klassenstufen der Sekundarstufen I und II auf entsprechend verschiedenen Niveaus unterrichtet.

Das Thema findet sich im Zusammenhang mit Stoffwechselprozessen im Bereich Ernährung und Verdauung, Energiehaushalt autotropher und heterotropher Lebewesen (Gewinnung, Versorgung und Bereitstellung), Genetik und als eigenes Thema des Bereichs Cytologie wieder.

Die Neuordnung des Unterrichts an Gymnasien durch die Einführung der verkürzten Sekundarstufenzeit auf 8 Jahre bis zum Abitur hat die Enzymatik auch in unteren Klassenstufen zum Unterrichtsinhalt gemacht. Was zuvor im 11. Schuljahr zu lernen war ist nun Plan der 10. Jahrgangsstufe.

Desweiteren sind molekular-biologische Sachverhalte insbesondere zu Ernährung und Verdauung, die mehr als das faktische Erkennen einer Stoffumsetzung abverlangen, nun verstärkt auch in Klassenstufe 9 aufgenommen.

Selbiges erfordert eine bessere Anschaulichkeit von Unterrichtsinhalten. Darüber hinaus wirken selbst gesteuerte Lernprozesse, in denen kognitive Inhalte durch Experimente nachvollzogen oder besser sogar eigens erarbeitet werden können, steigend auf die Lernleistung.

Überschaubare Versuche können die Enzymwirkung darstellen und so ihren Einfluss auf Lebensvorgänge phänomenologisch darlegen. Möchte man hier einen anschaulichen Vergleich zur Enzymwirkung heranziehen, so eignet sich ein Bild aus der Cytologie: hier wird die Zelle gerne als Fabrik dargestellt, in der die Zellorganellen die Funktion von Maschinen übernehmen und Enzyme Arbeiter sind. Weiterhin sind quantitative Experimente möglich, die entweder als Demonstration oder angeleitet sowie von Schülern leicht selbsttätig durchgeführt werden können.

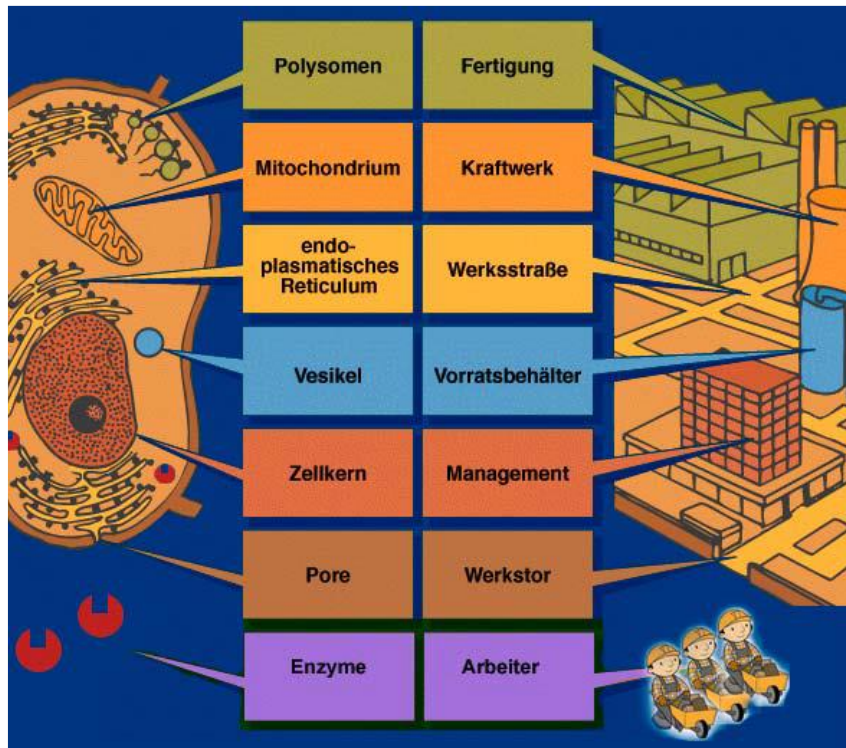


Abbildung 1:

Einordnung der Enzyme im System Zelle

Enzyme katalysieren biochemische Reaktionen in lebenden Systemen (Biokatalysatoren). Ihre Notwendigkeit wird beispielsweise im Versuch zum Stärke-Abbau durch Amylase verdeutlicht. In einem weiteren Versuch wird Stärke durch Säurekatalyse bei 100°C zersetzt. Ein Vergleich der Reaktionsbedingungen beider Versuche legt die Besonderheiten der Enzymwirkung dar. Sie unterscheiden sich im Wesentlichen von anderen Katalysatoren durch ihre Spezifität, da in verschiedene Zelltypen sowohl gleiche als auch spezialisierte Stoffwechsellleistungen benötigt werden.

Die Säurekatalyse ist ein Vorgang, auf den verschiedene chemische Reaktionen angewendet werden können. Enzyme sind in der Regel jedoch so spezialisiert, dass sie nur auf ein bestimmtes Substrat wirken, während ein ähnlich strukturiertes Molekül keine Wirkung erfährt. Amylase katalysiert beispielsweise lediglich die Spaltung von Stärke und nicht die von Cellulose. Beide Stoffe bestehen aus Ketten von Glucose, die jedoch auf unterschiedliche Weise miteinander verbunden sind. Diese Eigenschaft, nur auf spezielle Ausgangsstoffe zu wirken nennt man Substratspezifität.

Die Wirkspezifität (Reaktionsspezifität) besteht darin, dass - auch für den Fall, dass verschiedene Stoffe als Substrat akzeptiert werden - eine festgelegte Reaktion katalysiert wird. Hierbei kann es sich um Redoxreaktionen; Übertragung von funktionellen Gruppen; Hydrolysen; Spaltung oder Synthese komplexerer Produkte aus einfachen Substraten; Bildung von Substanzen, die chemisch komplexer sind als die benutzten Substrate unter ATP-Spaltung oder auch die Umwandlung von chemischen Isomeren handeln. Sind Enzyme hierbei in der Lage zum Teil sehr unterschiedliche Reaktionen zu katalysieren, dann spricht man von multifunktionellen Enzymen. Um Enzymspezifität nachzuweisen. Enzymspezifität kann leicht erkannt werden, indem man zu der entsprechenden Reaktion ein unpassendes Substrat gibt (Schlüssel-Schloss-Prinzip).

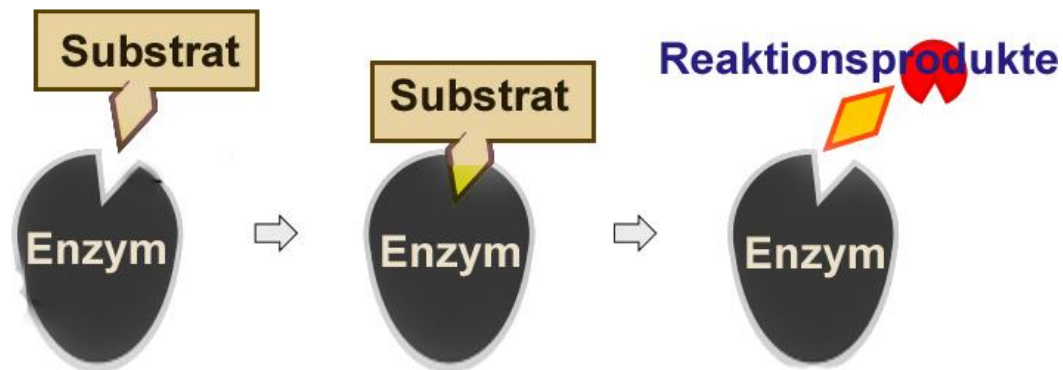


Abbildung 2: Schlüssel-Schloss-Prinzip zur Darstellung der Wirkspezifität von Enzymen

Enzyme arbeiten nicht unabhängig von ihrer Umgebung. Daraus ergibt sich für jedes Enzym eine Milieu-Spezifität mit einem Optimum hinsichtlich pH-Wert, Temperatur (Schnittmenge“ zwischen Reaktionsbeschleunigung, Umwelt und Körpertemperatur des jeweiligen Lebewesens sowie der Denaturierungs-Temperatur des Enzyms) und der Konzentration an Enzym und Substrat.

Die vorliegenden empfohlenen Anleitungen zu Produkten von CONATEX zielen auf Schülerversuche in einem arbeitsteiligen Gruppenunterricht mit (halb)quantitativen Ergebnissen ab. Hierbei handelt es sich um zwei zu vergleichenden Aufgabenstellungen sowohl zum Kohlehydrat-Abbau durch Amylase als auch zum Eiweiß-Abbau durch Trypsin (Enzymwirkung und Einflussgrößen).

Der Versuch zum enzymatischen Kohlenhydrat-Verdau (Amylase) setzt Amylase aus Speichel ein, deren Konzentration nicht genau bestimmt ist. Die Speichelamylase katalysiert die Stärkehydrolyse zu Maltose. In diesem Versuch werden die Hydrolyse-Produkte nachgewiesen. Dabei wird nicht nur die Wirkweise der Amylase gezeigt, sondern auch im Vergleich zur Säurekatalyse ihre Milieuspezifität bzw. die Temperaturabhängigkeit ihrer Funktion gemessen. Die Bestimmung des gebildeten Produkts (Maltose) erfolgt mittels Fehling-Reaktion.

Zum enzymatischen Eiweiß-Verdau wird das Enzym Trypsin eingesetzt, welches im Pankreatin vorkommt. Dieses Enzym ist für die Eiweißhydrolyse aus Polypeptiden und Aminosäuren zuständig und katalysiert generell die Hydrolyse an Stellen, wo auf Carbonylgruppen die Aminosäuren Lysin oder Arginin folgen. Die erfolgreiche Hydrolyse des Albumins wird durch das Verschwinden einer zuvor herbeigeführten Ausflockung gezeigt. Mittels Dialyse an einer Zellophanmembran, die lediglich für Wasser und kleine Moleküle permeabel ist werden die Hydrolyseprodukte getrennt und per Ninhydrin-Test nachgewiesen.

**Methodische und didaktische Organisation der Katalyse-Experimente –
 Vergleich der Wirkweisen der Enzyme**

Vorab ist selbstverständlich zu bemerken, dass die beiden Teil-Experimente auch unabhängig voneinander durchgeführt werden können – wobei der vergleichende Lerninhalt wegfällt.

Lerninhalt	Umsetzung	Durchführung
Wirkweise von Enzymen: Biokatalysatoren	„Nullprobe“/ Reaktion in Abwesenheit des Enzyms	Versuch zum Reaktionsablauf (Abbau) mit/ ohne Enzym; Zugabe von Enzym zur „Nullprobe“ nach Versuchsende (Wirknachweis)
Wirkweise von Enzymen: Abhängigkeit von Enzymkonzentration/ Substratkonzentration	Variation der Konzentrationen von Enzym und Substrat in parallel arbeitenden Gruppen	2 Versuchsreihen parallel; jede Versuchsreihe zu dem entsprechenden Enzym wird variiert, indem eine Gruppe „nach Plan“ arbeitet, eine zweite mit verdoppelter Enzymkonzentration, eine weitere mit verdoppelter Substratkonzentration
stoffliche Qualität von Enzymen: Polypeptide	Denaturierung von Eiweißen	Erweiterung der Versuchsreihen, Experiment mit denaturiertem Enzym (verschiedene Möglichkeiten): Erhitzen des Enzyms vor Zugabe, Zufügung einer hoch konzentrierten Salzlösung
Spezifität von Enzymen: Substratspezifität	Gebundenheit der Enzymwirkung an das entsprechende Substrat	Erweiterung der Versuchsreihen, Experiment mit inadäquatem Substrat
Spezifität von Enzymen: Milieu/ Temperatur	Gebundenheit der Enzymwirkung an das entsprechende Milieu: Temperaturoptimum	Variation der Temperatur im Experiment, Messung des Wirkgrades
Spezifität von Enzymen: Milieu/ pH	Gebundenheit der Enzymwirkung an pH-Optimum	Variation des pH-Wertes im Experiment, Messung des Wirkgrades

Vergleichend werden Gemeinsamkeiten von Enzymen hinsichtlich ihrer Wirkweise als Biokatalysatoren, ihrer Milieuspezifität (Temperatur, pH-Wert), Konzentrationsspezifität (Korrelation Enzym – Substrat) sowie ihrer Natur als Eiweiße erarbeitet.

Gleichzeitig kann durch eine kleine Erweiterung der Versuche zu den jeweiligen Enzymen auch die Unterschiedlichkeit der Wirkung beider Enzyme dargestellt werden: das Enzym der parallel durchgeführten Versuchsreihe wird dabei zu dem „falschen“ Substrat gegeben und die Reaktion beobachtet. Obwohl es sich bei beiden Reaktionen um Hydrolysen handelt, belegt eine negative Nachweisreaktion die Spezifität der Enzyme hinsichtlich der Substrate.

Durch Bildung dreier parallel arbeitender Gruppen je Versuchsreihe (Stärke-Abbau bzw. Eiweiß-Abbau) können insgesamt sechs Schülergruppen eigenständig und selbsttätig ihre Ergebnisse erarbeiten, die nach Abschluss ausgewertet werden und den anderen Gruppen vorzustellen sind.

Enzymatischer Kohlenhydrat-Verdau (Amylase)

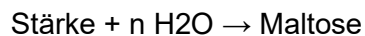
Im Versuch werden folgende Stoffe eingesetzt:

Lösliche Stärke, Iodhaltiges Wasser / Iod-Wasser-Lösung (oder Lugol'sche Lösung), Fehlingreagenz, Zellophanpapier für die Dialyse, Pufferlösung, Essigsäure.

Die Amylase stammt aus Speichel.

Soll eine vergleichende Versuchsreihe zur Wirkweise von Enzymen erfolgen, werden auch die Materialien aus dem Versuch zum enzymatischen Eiweiß-Verdau benötigt.

Die Speichelamylase katalysiert die Stärkehydrolyse zu Maltose:



Aufgrund der Einlagerung von Iod in das schraubenförmige Stärkemolekül nimmt Iod-Wasser (rot-braun gefärbt) bei Anwesenheit von Stärke eine blau-violette Farbe an; diese Farbgebung verschwindet bei der Stärkehydrolyse. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit wird bei 37 °C und einem nahezu neutralen pH-Wert (pH= 7) erreicht.

Die molekulare Aufspaltung der Stärke wird durch Dialyse nachgewiesen: Eine für Wasser und kleine Moleküle permeable Membran trennt einen mit destilliertem Wasser gefüllten Bereich von der Stärkelösung, der die Enzyme zugegeben werden. Maltose, zu der die Stärke hydrolysiert wird, kann die Membran durchdringen. Sie wird beiderseits der Membran durch Fehlingreagenz nachgewiesen.

Die mit Trypsin durchgeführten Versuche analog auf Reaktivität getestet.

**Pipettierschema und Auswertungsblatt
Enzymatischer Kohlenhydrat-Verdau (Amylase) „Standard“**

2 ml Stärkelösung

2 ml Pufferlösung

Amylase aus 0,5 ml Speichel 37°C, pH = 7

Vergleichswerte: H₂O dest. (0,5 ml) – „Nullabgleich“

Trypsin (0,5 ml) – Nachweis der Substrat-/ Wirkspezifität

Reagenz-glas Nr.	Stärke-lösung (2 ml)	Puffer-lösung (2 ml)	Amylase (0,5 ml)	H ₂ O dest. (0,5 ml)	Trypsin (0,5 ml)	Entnahme nach t = [min]	Verfärbung (Zugabe von Jod)
1	X	X	X			5	
2	X	X	X			10	
3	X	X	X			15	
4	X	X	X			20	
5	X	X	X			25	
6	X	X	X			30	
7	X	X		X		5	
8	X	X		X		10	
9	X	X		X		15	
10	X	X		X		20	
11	X	X		X		25	
12	X	X		X		30	
13	X	X			X	10	
14	X	X			X	30	
15	*	X	X			10	**
16	*	X	X			30	**

* Zugabe von 2 ml Albuminlösung (aus Versuch „Eiweiß-Verdau“) an Stelle der Stärkelösung

** Test mit Biuret-Reagenz und nach Dialyse mit Ninhydrin-Reagenz

**Pipettierschema und Auswertungsblatt
Enzymatischer Kohlenhydrat-Verdau (Amylase) „Milieu“**

2 ml Stärkelösung

2 ml Pufferlösung

Amylase aus 0,5 ml Speichel

Vergleichswerte H₂O dest. (0,5 ml) – „Nullabgleich“

pH-Abhängigkeit (HCl-Zugabe)

Temperaturabhängigkeit (Kühlung)

Denaturierung durch Hitze: Nachweis von Enzymen als Polypeptide

Reagenz- glas Nr.	Stärke- lösung (2 ml)	Puffer- lösung (2 ml)	Amylase (0,5 ml)	H ₂ O dest. (0,5 ml)	Entnahme nach t = [min]	Verfärbung (Zugabe von Jod)
1	X	X	X		10	
2	X	X	X		30	
3 + HCl	X	X	X		10	
4 + HCl	X	X	X		30	
5 denat.	X	X	erhitzt 80°C		10	
6 denat.	X	X	erhitzt 80°C		30	
7 Eis	X	X	gekühlt		10	
8 Eis	X	X	gekühlt		30	
9	X	X		X	10	
10	X	X		X	30	
11 + HCl	X	X		X	10	
12 + HCl	X	X		X	30	
13 denat.	X	X		erhitzt 80°C	10	
14 denat.	X	X		erhitzt 80°C	30	
15 Eis	X	X		gekühlt	10	
16 Eis	X	X		gekühlt	30	

**Pipettierschema und Auswertungsblatt
Enzymatischer Kohlenhydrat-Verdau (Amylase) „Konzentration“**

1 ml bzw. 2 ml Stärkelösung

1 ml bzw. 1,5 ml oder 3 ml Pufferlösung

Amylase aus 0,5 ml bzw. 1 ml Speichel 37°C, pH = 7

Vergleichswerte: H₂O dest. (0,5 ml bzw. 1 ml) – „Nullabgleich“

Halbierung der Konzentration der Stärkelösung

Verdoppelung der Enzymkonzentration

Halbierung der Konzentration der Stärkelösung und Verdoppelung der Enzymkonzentration

Reagenzglas Nr.	Stärke- lösung [ml]	Puffer- lösung [ml]		Amylase [ml]	H ₂ O dest. [ml]		Entnahme nach t = [min]	Verfärbung (Zugabe von Jod)
1	1	3		0,5			10	
2	1	3		0,5			20	
3	1	3		0,5			30	
4	2	1,5		1			10	
5	2	1,5		1			20	
6	2	1,5		1			30	
7	1	3		1			10	
8	1	3		1			30	
9	1	3			0,5		10	
10	1	3			0,5		20	
11	1	3			0,5		30	
12	2	1,5			1		10	
13	2	1,5			1		20	
14	2	1,5			1		30	
15	1	3			1		10	
16	1	3			1		30	

Wirkweise der Amylase

Einer Stärkelösung wird gemäß Anleitung (Lieferumfang) hergestellt und in die Reagenzgläser entsprechend dem Pipettierschema verteilt. Die weiteren Reagenzien werden unter festgelegten Bedingungen zugefügt und gemischt. Anschließend werden die Reagenzgläser in ein Wasserbad (37 °C) bzw. Eisbad gestellt und der Zeitpunkt $t = 0$ notiert.

Zum Zeitpunkt $t = 5$ min erfolgt die Entnahme eines Reagenzglases ohne Enzym (Referenz) sowie eines Reagenzglases mit Enzym aus dem jeweiligen Bad zwecks Abgleichs. Anschließend werden mittels Lugolscher Lösung die Hydrolyseprodukte nachgewiesen. Die Lösung im Referenzröhrchen weist eine intensive Blaufärbung auf (keine Hydrolyseungsreaktion) wohingegen die Enzym-Lösung klarer bleibt.

Die Arbeitsschritte werden zu den in den Schemata angegebenen Zeiten wiederholt. Die Referenz-Lösungen weisen weiterhin eine intensive Blaufärbung auf, bei Lösungen, in denen eine Enzymwirkung eingetreten ist, schwächt sich die auf das Iod-Wasser zurückzuführende Verfärbung mit der Zeit immer weiter ab und verschwindet (je nach Enzymkonzentration im Speichel) schließlich vollständig.

Die Nachweisreaktion bleibt aus, wenn das zum Substrat (Stärke) unpassende Enzym (Trypsin) zugesetzt wird. Analog wenn zum Enzym (Amylase) unpassendes Substrat (Albumin) verabreicht wird. Pankreatin ist ein enzymatisch aktiver komplexer Wirkstoff tierischen Ursprungs, der aus verschiedenen Pankreas-Enzymen besteht. Die Hauptinhaltsstoffe sind Lipasen, Amylasen und verschiedene Proteasen (u. a. Trypsin). Eine geringe Reaktion mit Stärke ist daher also nicht ungewöhnlich, da das Trypsin aus Pankreatin entstammt (pH Optimum = 8,3; Temperatur- Optimum = 40 °C; daher Wirkung geringer).

Wurde das Enzym zuvor denaturiert oder erfolgt eine Verschiebung des Milieus z.B. durch Ansäuern der Lösung, so ist keine Reaktion zu erwarten, da das Wirkoptimum der Amylase im basischen Bereich liegt. Wird die Reaktionstemperatur gesenkt, so ist ebenfalls eine verzögerte Reaktion zu erwarten, allerdings ist die Amylase auch bei 0 °C noch geringfügig aktiv.

Sowohl eine verringerte Substratkonzentration bei gleichbleibender Enzymkonzentration, als auch eine Erhöhung der Enzymkonzentration bei gleichbleibender Substratkonzentration führen zu einer schnelleren Entfärbung der Nachweis-Lösung. Bei synchroner Änderung beider Parameter sind die Zeiten bis zur vollständigen Entfärbung gleich.

Vergleich mit der Säurekatalyse bei 100 °C

Eine Gruppe sollte die Säurekatalyse mit variablen Konzentrationen durchführen. Dazu wird Stärkelösung in einem Erlenmeyer-Kolben mit etwa 5 ml konzentrierter HCl versetzt und in ein kochendes Wasserbad gegeben. Probenentnahmen erfolgen in Zeitintervallen von je 5 min, jeweils Zugabe von Iod-Wasser. Bei dieser Reaktion entstehen Dextrine. Je nach Zerlegungsgrad dieser Produkte (Molekülgrößen zwischen Stärke und Glucose), ergeben sich bei Zusatz von Iod-Wasser Verfärbungen von blau über violett und rot zu farblos.

Nachweis der molekularen Aufspaltung durch Dialyse

Zur Durchführung der Dialyse werden zwei Petrischalen zur Hälfte mit Wasser gefüllt und nach Zugabe von 2 ml iodiertem Wasser mit dem zuvor befeuchteten Zellophanpapier bedeckt. Anschließend wird eine Stärkelösung hergestellt und zusammen mit Puffer (Reagenzglas 1), sowie mit Puffer und Speichel (Reagenzglas 2) für 30 min in einen Wasserbad (37 °C) inkubiert. Der Inhalt des Reagenzglases 1 wird auf die Membran der ersten Petrischale, der Inhalt des Reagenzglases 2 auf die zweite Membran überführt und bleibt über Nacht stehen. Ein Kontakt zwischen Zellophanpapier und den Flüssigkeiten muss hierbei bestehen. Am nächsten Tag ist in der ersten Petrischale eine Blaufärbung im oberen Teil festzustellen, in der zweiten Petrischale fällt diese Reaktion negativ aus.

Zum Nachweis der Hydrolysierungsprodukte werden jeweils Proben von oberhalb und unterhalb der Membran entnommen und mittels Fehling-Probe getestet. Ein rotes Reaktionsprodukt zeigt die Anwesenheit eines reduzierten Zuckers an (in diesem Fall Maltose).

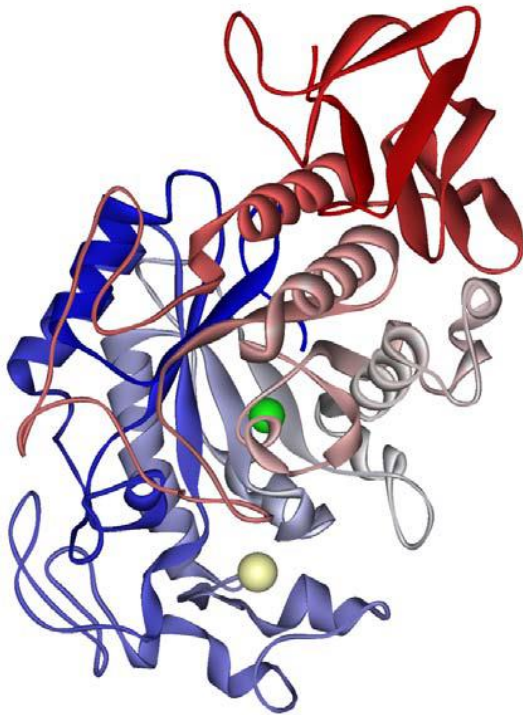


Abbildung 3:

Speichelamylase:
grün=Chlorid-Ion
gelb=Calcium-Ion

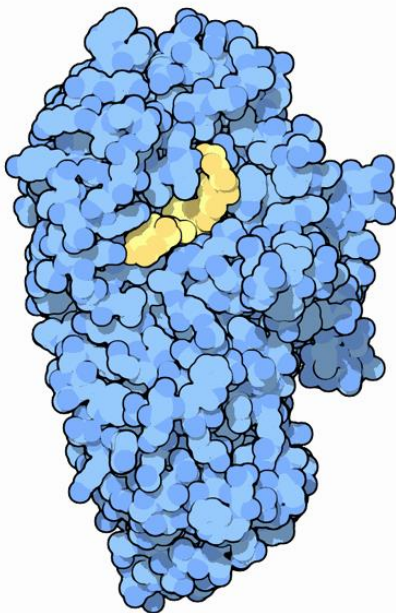


Abbildung 4:

α -Amylase (blau) mit gebundenem
Pentasaccharid (gelb)

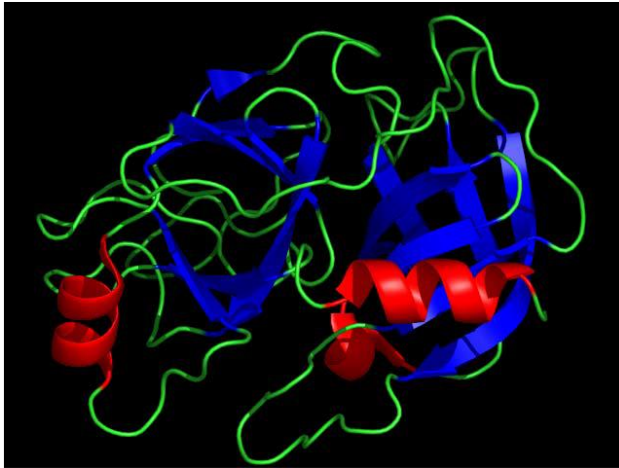


Abbildung 5:

Quartärstruktur von Trypsin

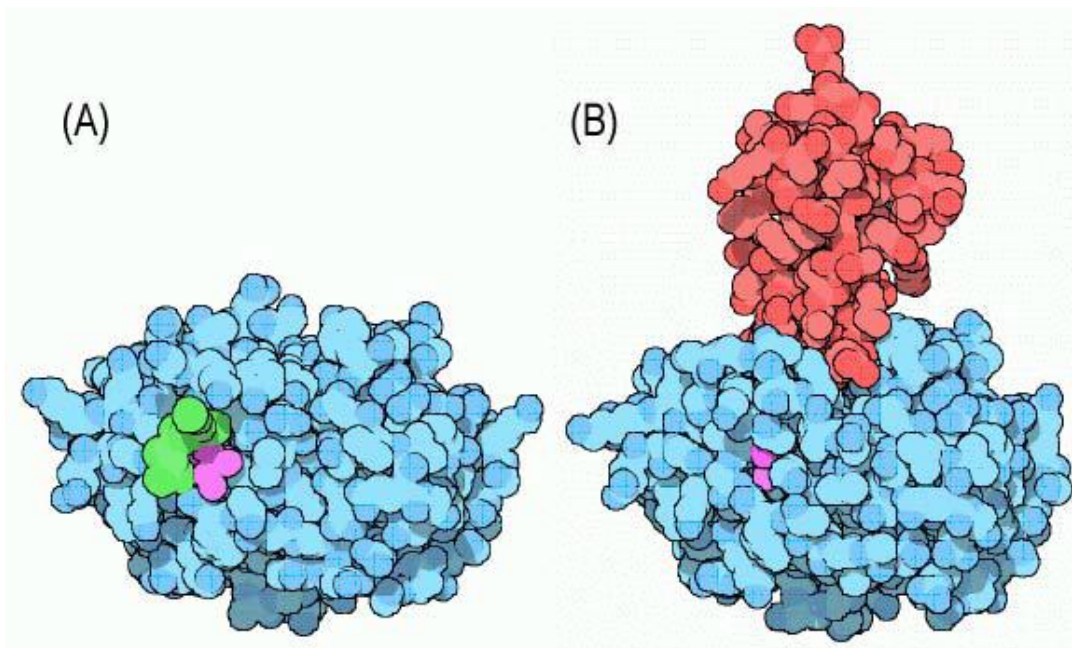


Abbildung 6:

Trypsin (A) und Trypsinogen (B)

Enzymatischer Eiweiß-Verdau

Die Eiweißverdauung wird hier experimentell an der Hydrolyse von Albuminen durch das Enzym Pankreatin (Trypsin) in wässriger Lösung bei 40°C und einem pH-Wert von 8,3 dargestellt. Dazu werden zwei Vergleichsproben V1 (ohne das Substrat) und V2 (ohne das Enzym) unter gleichen physiochemischen Bedingungen betrachtet.

Variiert werden die Versuche durch folgende Parameter:

- Zugabe von denaturiertem Enzym
- Zugabe von Amylase an Stelle von Pankreatin/ Trypsin
- Erhöhung bzw. Erniedrigung der Temperatur
- Veränderung des pH-Wert (z. Bsp. Ansäuerung)
- Veränderung der Konzentrationen

Die Hydrolyse von Albuminen durch Pankreatin wird durch das Verschwinden der Ausflockung gezeigt. Der Nachweis der Aufspaltung der Eiweißmoleküle erfolgt mittels Dialyse an einer Zellophanmembran (permeabel für Wasser und kleine Moleküle, nicht permeabel für große Moleküle wie Proteine): Dazu bedeckt man destilliertes Wasser in einer Petrischale mit einer Zellophanmembran und gibt das Hydrolyse-Produkt darauf. Die hydrolysierten Proteine passieren die Membran in Form von Aminosäuren und befinden sich nun in der Petrischale unterhalb der Membran. Ihr Vorkommen wird mittels Ninhydrin-Test nachgewiesen.

Der Nachweis von Eiweißen erfolgt mit der Biuret-Reaktion, womit auch das Ausbleiben der Enzymwirkung belegt wird.

Für die Versuche werden folgende Stoffe benötigt: lösliche Albumine, Pankreatin (Pulver), Biuret-Reagenz, Ninhydrin-Reagenz, Pufferlösung, HCl.

**Pipettierschema und Auswertungsblatt
Enzymatischer Eiweiß-Verdau (Trypsin) „Standard“**

3 ml Albumin-Lösung

3 ml Pufferlösung

Trypsin aus 1 ml Pankreatinlösung 40°C, pH = 8,3

Vergleichswerte H₂O dest.– „Nullabgleich“

Amylase (1 ml) – Nachweis der Substrat-/ Wirkspezifität

Reagenz- glas Nr.	Eiweiß- lösung (3 ml)	Puffer- lösung (3 ml)	Trypsin (1 ml)	H ₂ O dest. [ml]	Amylase (1 ml)	Entrübung nach t = [min]	Biuret -Test
1 - A	X	X	X				
2 - V1	X	X		1			
3 - V2		X	X	3			
4	*	X			X		
5	X	X	X				**

* Zugabe von 2 ml Stärkelösung (aus Versuch „Stärke-Verdau“) an Stelle der Albuminlösung

** Test mit Lugolscher Lösung (Iod)

**Pipettierschema und Auswertungsblatt
Enzymatischer Eiweiß-Verdau (Trypsin) „Milieu“**

3 ml Albumin-Lösung

3 ml Pufferlösung

Trypsin aus 1 ml Pankreatinlösung 40°C, pH = 8,3

Vergleichswerte H₂O dest.– „Nullabgleich“

pH-Abhängigkeit (HCl-Zugabe)

Temperaturabhängigkeit (Kühlung)

Denaturierung durch Hitze: Nachweis von Enzymen als Polypeptide

Reagenz- glas Nr.	Eiweiß- lösung (3 ml)	Puffer- lösung (3 ml)	Trypsin (1 ml)	H ₂ O dest. [ml]	Enttrübung nach t = [min]	Biuret-Test
1	X	X	X			
2	X	X		1		
3 + HCl	X	X	X			
4 Eis	X	X	gekühlt			
5 denat.	X	X	erhitzt 80°C			

**Pipettierschema und Auswertungsblatt
Enzymatischer Eiweiß-Verdau (Trypsin) „Konzentration“**

1,5 ml bzw. 3 ml Albumin-Lösung

2 ml oder 3,5 ml bzw. 4,5 ml Pufferlösung

Trypsin aus 1 ml bzw. 2 ml Pankreatinlösung 40°C, pH = 8,3

Vergleichswerte H₂O dest. (0,5 ml bzw. 1 ml) – „Nullabgleich“

Halbierung der Konzentration der Stärkelösung und Verdoppelung der Enzymkonzentration

Reagenzglas Nr.	Eiweißlösung [ml]	Pufferlösung [ml]	Trypsin [ml]	H ₂ O dest. [ml]	Enttrübung nach t = [min]	Biuret-Test
1 *	1,5	4,5	1			
2 *	1,5	4,5		1		
3 *	3	2	2			
4 *	3	2		2		
5 **	1,5	3,5	2			
6 **	1,5	3,5		2		

* Entnahme/ Test nach halber Zeit i. Vgl. zu anderen Versuchen

** Entnahme/ Test nach gleicher Zeit i. Vgl. zu anderen Versuchen

Nachweis der molekularen Aufspaltung durch Dialyse

Petrischalen werden mit Zellophanpapier abgedeckt, welches mit einem Gummiband fixiert ist. Der Inhalt der passenden Reagenzgläser (Beschriftung) wird in die entsprechenden Petrischalen gegeben und einige Stunden dialysiert (idealerweise über Nacht). Kleine Moleküle wie Aminosäuren können als Resultate der Proteinhydrolyse die Zellophanmembran passieren und so auch in den anderen Bereich (unterer Teil der Petrischale) gelangen. Aus jeder Petrischale werden Proben entnommen, und auf die Abwesenheit von Proteinen (negativer Biuret-Test) und die Anwesenheit von Aminosäuren (positiver Ninhydrin-Test) getestet. In diesem Fall war die Enzymwirkung erfolgreich: Der Biuret-Test ermöglicht den Nachweis von Proteinen oder Peptiden in einer Lösung. Bei Reaktion von Proteinen mit Biuret-Reagenz wechselt der Indikator von blau-violett. Der Ninhydrin-Test ermöglicht Aminosäuren in einer Lösung nachzuweisen. Eine Orangefärbung zeigt die Reaktion von Ninhydrin-Reagenz mit Aminosäuren an.

Wirkweise von Trypsin

Die Biuretreaktion ist für alle 3 Dialysate negativ, da die großen Moleküle (Peptide, Proteide, Proteine) die Zellophanmembran nicht passieren können.

Die Ninhydrin-Reaktion ist für Dialysate positiv, in denen Trypsin aktiv war:

- Versuch 1 („Standard“) - Reagenzglas 1
- Versuch 2 („Milieu“) - Reagenzgläser 1 & 4 (schwach)
- Versuch 3 („Konzentration“) – Reagenzgläser 1, 3 & 5

Trypsin kann Stärke nicht zersetzen. Achtung: Eine Reaktion ist zwar möglich, aber weniger wahrscheinlich, da Pankreatin dem das Trypsin entstammt, auch Amylase enthält. Amylase hat jedoch ein pH-Optimum von pH = 7 und ein Temperatur-Optimum von 37 °C; daher einen geringeren Wirkungsgrad. Ebenso kann Amylase keine Eiweiße zerlegen, obwohl beide Enzyme Hydrolasen sind (Substrat-/ Wirksamkeit).

Die geringe Temperatur in Versuch 2 setzt die Geschwindigkeit des Enzyms herab, wenngleich eine Reaktivität weiterhin gegeben ist. Gleiches ist bei dem sauren pH-Wert zu erwarten. Die Erhitzung des Enzyms denaturiert dieses aber – eine Eiweißzerlegung ist unmöglich.

Veränderungen in den Konzentrationen verändern die Zeiten, die zur Zerlegung benötigt werden.

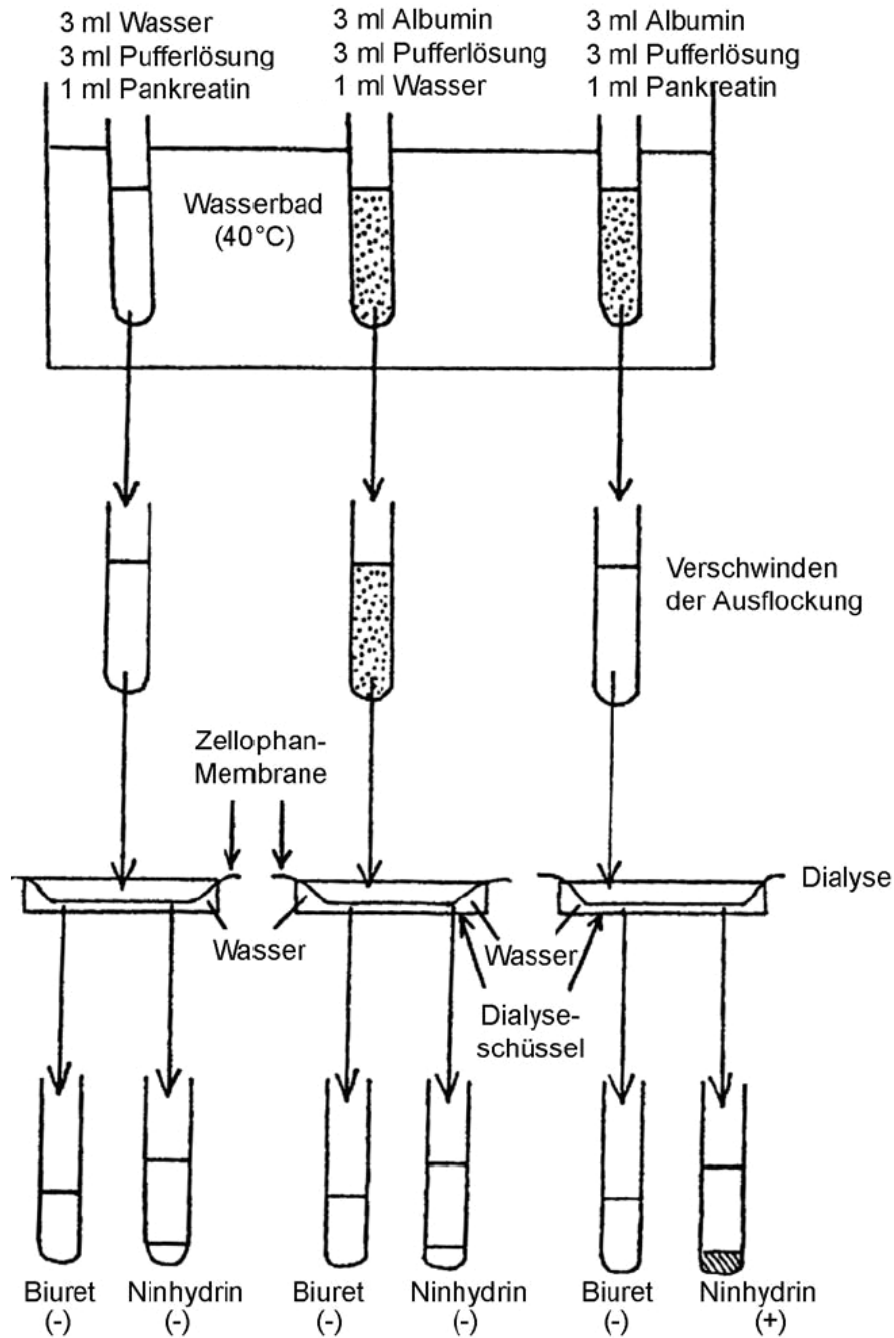


Abbildung 7: Reaktionsschema



Abbildung 8:
Iod-Test auf Stärke



Abbildung 9:
Iod-Test auf Stärke

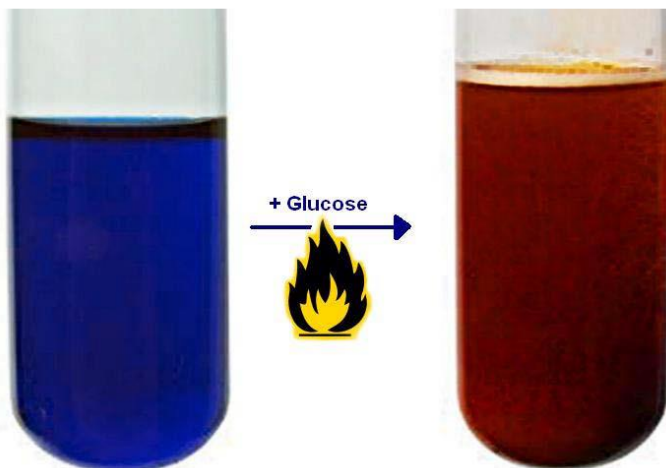


Abbildung 10:
Farbumwandlung bei der
Fehling-Reaktion



Abbildung 11:

Biuret-Test
negativ hell, positiv violett



Abbildung 12: Ninhydrintest

Aminosäuren können mittels Ninhydrin-Reaktion auch in Spuren sichtbar gemacht werden (Purpurfärbung).

Autor: Magnus Mauer