

**Anna Lorenc**Szkoła Festiwalu Nauki | ul. Ks. Trojdena 4
02-109 Warszawa | E-mail: sfn@iimcb.gov.pl

Ureaza – jak nasz mocz pomaga rosnać roślinom

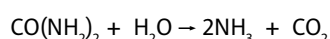
Hydroliza mocznika przez ureazę z ziaren soi

Cel

Wykrywanie aktywności ureazy – enzymu, który rozkłada mocznik do amoniaku i dwutlenku węgla.

Wstęp

Ureaza (oznaczenie w międzynarodowej klasyfikacji enzymów I.U.B 3.2.1.81) to enzym, który rozkłada mocznik. W wyniku tej reakcji powstaje amoniak i dwutlenek węgla.



Ureaza z nasion soi rozkłada mocznik do amoniaku i dwutlenku węgla. Amoniak charakterystycznie pachnie, a rozpuszczone jony amonowe podnoszą pH mieszaniny. Zmiana pH powoduje zmianę zabarwienia roztworu.

Czas i organizacja pracy

Doświadczenie można wykonać podczas jednej lekcji z całą klasą. Proponujemy wykonywanie doświadczenia w parach (lub kilkusobowych grupkach).

Pracę można podzielić na trzy etapy:

Etap wstępny: przygotowanie zawiesiny z ziaren soi oraz wywaru z czerwonej kapusty, nauczyciel może je wykonać przed lekcją lub podczas lekcji jako pokaz dla całej klasy. Czas: 10 minut. UWAGA: Co najmniej godzinę przed tym etapem trzeba namoczyć ziarna soi

Etap 1. doświadczenia: Wywar z czerwonej kapusty jako wskaźnik pH, doświadczenie wykonują pary. Czas: 10 minut.

Etap 2. doświadczenia: Działanie ureazy z nasion soi na mocznik, doświadczenie wykonują pary. Czas: 10 minut

Wcześniejsza wiedza uczestników

Pojęcia: pH, enzym, mocznik

Sugerowany wiek uczestników: 14 - 16 lat, doświadczenie dostępne od 12 lat.



Ha, N.-C., et al. Nat. Struct. Biol. v8 pp.505-509, 2001

Struktura ureazy [1egz.pdb]

Przebieg doświadczenia

W zależności od wieku uczestników, czasu, dostępnych środków itp. w części przygotowawczej doświadczenia mogą brać udział wszyscy uczestnicy, lub osoba prowadząca zajęcia może wykonać ją sama. Podana objętość płynów dotyczy szklanych probówek. W razie korzystania z innych naczyń objętość trzeba dostosować i przeliczyć.

Etap wstępny

UWAGA: Najpóźniej godzinę przed doświadczeniem namocz soję (odpowiednią ilość soi zalej wodą).

Czynności wstępne nauczyciel może wykonać przed lekcją, lub podczas lekcji, jako pokaz dla całej klasy.

- 1 Przygotuj soję - namoczoną soję zmiksuj z ok. 200 ml wody (może to być ta sama woda, w której soja się moczyła). Umieść filtr do kawy w lejku, a lejek w naczyniu na roztwór soi. Zmiksowane nasiona przełóż na filtr i zbierz przesączony płyn. Jedna para wykorzysta około 10 ml przesączonego roztworu.
- 2 Przygotuj wskaźnik pH - pokrój 3 duże liście czerwonej kapusty na paski (1-2 cm szerokości), umieść w naczyniu odpornym na wrzątek i zalej ok. 500 ml (2-3 szklanki) gorącej wody. Liście powinny być całkowicie zanurzone. Po 5 min. odlej wywar do naczynia na wskaźnik pH. Każda para potrzebuje ok. 40 ml. Wywar mogą też przygotowywać uczniowie w parach. Proporcje na parę: 1 niewielki liść kapusty + pół szklanki wrzątku.
- 3 Przygotuj roztwór substancji o niskim pH - do naczynia wsyp 2 łyżeczki kwasu cytrynowego, dolej ok. 100 ml (ok. ½ szklanki) wody, rozmieszaj. Każda para potrzebuje ok. 5 ml roztworu.
- 4 Przygotuj roztwór substancji o wysokim pH - do naczynia wsyp 2 łyżeczki sody oczyszczonej, dolej ok. 100 ml (ok. ½ szklanki) wody. Postaraj się wymieszać tak, by rozpuściło się jak najwięcej substancji. Każda para potrzebuje ok. 5 ml roztworu.
- 5 Przygotuj roztwór mocznika - 10 łyżeczek nawozu mocznikowego (30 g) zalej wodą do objętości 300 ml (ok. duży kubek) i wymieszaj, aż do rozpuszczenia. Każda para potrzebuje około 20 ml.

Fig. 1



Fig. 2



Fig. 3

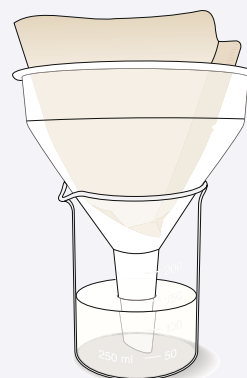


Fig. 4

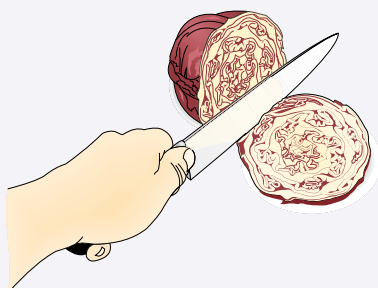
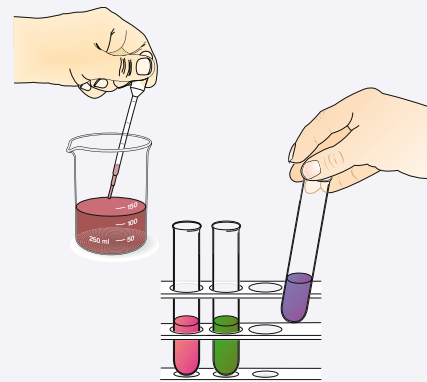


Fig. 5



Fig. 6



Etap 1. doświadczenia - demonstracja działania wywaru z czerwonej kapusty

- 1 Podpisz 3 probówki „K” (odczyn kwaśny), „Z” (odczyn zasadowy), „O” (bez dodatków) – naklej naklejki lub podpisz flamastrem.
- 2 Do wszystkich 3 probówek nalej do 1/3 wysokości wywaru z czerwonej kapusty.
- 3 Do probówki oznaczonej „K” dodawaj zakraplaczem lub słomką po kropli roztworu kwasu cytrynowego – obserwuj zmianę koloru.
- 4 Do probówki oznaczonej „Z” dodawaj po kropli roztworu sodы oczyszczonej – obserwuj zmianę koloru.
- 5 Porównaj barwy roztworów we wszystkich 3 probówkach.

Etap 2. doświadczenia - działanie ureazy z nasion soi na mocznik

- 1 Podpisz 3 probówki: „M” (mocznik), „U” (ureaza z soi), „M+U” (mocznik i ureaza z soi) – naklej naklejki lub podpisz flamastrem.
- 2 Do wszystkich trzech probówek nalej wywaru z czerwonej kapusty - do 1/5 wysokości probówki.
- 3 Do probówek „M”, „M+U” nalej roztworu mocznika – do 2/5 wysokości probówki. Zaobserwuj barwę – jakie jest pH roztworu mocznika?
- 4 Do probówek „U” i „M+U” dodaj zawiesiny soi – tyle samo, co mocznika lub nieco mniej.
- 5 Porównaj zabarwienie i zapach roztworów w naczyniach „M+U”, „U i M”.
- 6 Poczekaj 3 minuty i porównaj je z probówkami „K”, „Z” i „O” z poprzedniej części doświadczenia.

Fig. 7

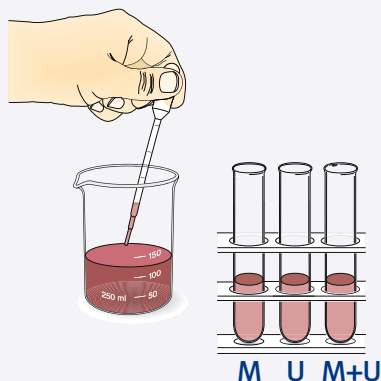


Fig. 8

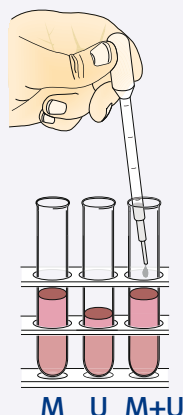
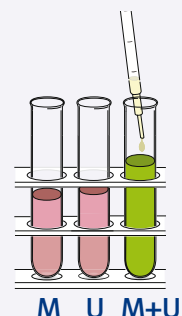
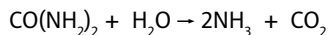


Fig. 9



Oczekiwane wyniki doświadczenia

Podczas doświadczenia enzym ureaza, zawarty w nasionach soi, rozkłada mocznik do amoniaku i dwutlenku węgla. Jony amonowe rozpuszczone w wodzie podnoszą pH roztworu, zmieniając barwę wskaźnika pH. Można również wyczuć zapach amoniaku.



Zmianę barwy można zauważyć porównując kolor wskaźnika w roztworze zawierającym mocznik i ureazę z kolorem wskaźnika w roztworach samego mocznika i samej ureazy.



Proponowane wykorzystanie doświadczenia

Obieg azotu w przyrodzie – jak azot zawarty w moczu może być przyswojony przez inne organizmy (tu jako substratu warto użyć moczu)?

Organizmy, a środowisko – jak organizmy przekształcają swoje środowisko. Wywołująca wrzody żołądka bakteria *Helicobacter pylori* podwyższa pH soku żołądkowego za pomocą ureazy. Naczynie reakcyjne to żołądek, a zawiesina z soi imituje enzym wydzielany przez bakterie.

Przystosowania zwierząt – żołądek przeżuwaczy. Ureaza wydzielana przez bakterie pozwala im korzystać z azotu w żołądku zwierzęcia. Naczynie reakcyjne to żołądek, a zawiesina soi imituje enzym wydzielany przez bakterie.

Na przykładzie ureazy omówienie enzymów - białek przeprowadzających reakcje chemiczne. Czynniki wpływające na aktywność enzymu (wpływ temperatury, pH, dostępności enzymu, substratu, produktu).

Pomysły na dodatkowe doświadczenia

Spróbuj przeprowadzić doświadczenie wrzucając nierozdrobnione, ale namoczone 2-3 nasiona soi do niewielkiej objętości mieszaniny roztworu mocznika i wywaru z czerwonej kapusty. Odczekaj minimum 20 minut. Jak zmieni się kolor mieszaniny?

Jak pH wpływa na aktywność ureazy?

Czy potraktowanie soi wysoką temperaturą wpływa na działanie enzymu? Spróbuj przeprowadzić doświadczenie z gotowaną soją (wystarczy kilka minut gotowania).

Wypróbuj doświadczenie z innymi źródłami mocznika (mocz, nawóz zwierzęcy).

Sprawdź czy inne rośliny też zawierają ureazę – wypróbuj inne strączkowe, pestki dyni (trudno u nas dostępna w handlu fasolka „czarne oczko” *Canavalia ensiformis* zawiera ureazę, również zawierają ją pestki dyni – ważne, aby suszone były w temperaturze pokojowej).

Wypróbuj alternatywne wskaźniki pH, o różnym zakresie działania.

Rozwiązywanie problemów

Brak zmiany barwy wskaźnika pH.

Może oznaczać, że soja została poddana obróbce cieplnej (np. suszeniu w gorącym powietrzu). Należy spróbować soi z innego źródła.

Może wskazywać na niewystarczający zakres pH wskaźnika pH. Zalecamy użycie wywaru z czerwonej kapusty jako wskaźnika pH.

Przy wykorzystaniu moczu jako źródła mocznika – brak zmiany barwy wskaźnika.

Mocz zdrowej osoby może mieć pH 4,8-8,0 w zależności od diety itp. Sprawia to, że trudno przewidzieć wyjściowe pH roztworu moczu i ureazy i dobrać odpowiedni laboratoryjny wskaźnik pH. W takim wypadku zalecamy użycie wywaru z czerwonej kapusty jako wskaźnika pH.

Powolna zmiana barwy wskaźnika pH.

Może oznaczać zbyt małą powierzchnię uwalniania enzymu do roztworu – być może soja została zbyt słabo rozdrobniona lub jest jej za mało.

W przypadku użycia moczu jako źródła mocznika, reakcja przebiega zwykle wolniej, niż dla roztworu samego mocznika.

Przy wykorzystaniu fenoloftaleiny lub błękitu bromotymolowego – przedwczesna zmiana barwy wskaźnika pH w roztworze mocznika.

Ze względu na obecność śladów soli amonowych w dostępnym w handlu moczniku, może się okazać, że roztwór samego mocznika ma wystarczająco wysokie pH do wywołania zmiany barwy wskaźnika. Dlatego takie doświadczenie należy przeprowadzić wcześniej i ewentualnie obniżyć nieco pH mocznika za pomocą np. kilku kropli roztworu kwasu cytrynowego.

Uwagi i alternatywne składniki

• Soja

Soję przed doświadczeniem trzeba namoczyć (60 minut to minimalny czas, najlepiej moczyć ją przez noc). Podczas namaczania nasiona zmieniają kształt z kulistego na podłużny. Soja musi być surowa – nasiona dostępne w sklepie spożywczym zwykle spełniają ten warunek, ale przed pierwszym wykorzystaniem nasion z danego źródła radzimy przeprowadzić wcześniej doświadczenie próbne. Zamiast soi można użyć fasoli „czarne oczko”, *Canavalia ensiformis*. Do rozdrobnienia ziaren można użyć miski i widelca, zamiast miksera, lecz jest to pracochłonne.

• Mocznik

Zamiast mocznika-nawozu można posłużyć się moczem jako źródłem mocznika. Ludzki mocz zawiera około 6% mocznika i nie trzeba go rozcieńczać. Należy zwrócić uwagę na przestrzeganie zasad bezpieczeństwa – osoba wykonująca doświadczenie nie powinna zetknąć się z moczem innej osoby, a wszystkie naczynia wykorzystywane podczas doświadczenia trzeba po zakończeniu dokładnie umyć gorącą wodą i detergentem lub wykorzystać naczynia jednorazowe. Do obserwacji zmiany pH zalecamy w takim wypadku użycie wywaru z czerwonej kapusty.

• Wskaźniki pH

Wywar z czerwonej kapusty można sporządzić również z kapusty zamrożonej (2-3 liście można przechowywać w zamrażarce, na czas, gdy trudno dostać czerwoną kapustę – wiosna, lato). Daje się wykorzystać również płyn pozostający po odsączeniu sałatki z czerwonej kapusty sprzedawanej w sklepie. W tym wypadku – ze względu na dodatek octu, lub innego zakwaszacza – trzeba zobojętnić roztwór przed doświadczeniem, dodając do niego roztworu sody oczyszczonej, aż płyn z sałatki przyjmie kolor granatowo-fioletowy zamiast czerwonego.

Można również skorzystać z laboratoryjnych wskaźników pH – fenoloftaleiny, błękitu bromotymolowego czy papierków lakmusowych. Fenoloftaleina zmienia kolor przy pH 8,2-10, błękit bromotymolowy przy pH 6,2-7,6.

• Zmiany pH

Kwasek cytrynowy i sodę można zastąpić innymi substancjami o pH wyższym, niż 8 i niższym, niż 6 (np. ocet). W takim przypadku należy zwrócić uwagę na bezpieczeństwo pracy z tymi substancjami.

Przechowywanie odczynników

Namoczone nasiona soi można przechować w temperaturze pokojowej przez noc, lub w lodówce przez dobę. Wywar z czerwonej kapusty można przechować w temperaturze pokojowej przez noc, w lodówce przez 2-3 doby, w zamrażarce przynajmniej z miesiące. Można również przechowywać zamrożone liście kapusty.

Dostawcy

Nasiona soi, kapusta, kwasek cytrynowy i soda oczyszczona – sklep spożywczy i/lub warzywnicy. Mocznik – nawóz – sklepy ogrodnicze, producenci to np. Puławy (najmniejsze opakowanie, 2 - kilogramowe, kosztowało w 2005 r. około 5 zł).

Odpady i ponowne wykorzystanie materiałów.

Podczas doświadczenia w wersji standardowej nie powstają żadne niebezpieczne odpady. Wszystkie resztki można wyrzucić do normalnych śmieci, płyny do zlewu/ubikacji. W przypadku użycia ludzkiego moczu należy użyć jednorazowych naczyń, lub dokładnie wymyć naczynia gorącą wodą z detergentem i wyłączyć płyny po doświadczeniu do ubikacji (przestrzegając zasady, że z moczem styka się jedynie osoba, która go oddała).

ABC ureazy

- **Czy ureaza w soi jest szkodliwa?**

Ureaza nie jest szkodliwa, ale surowe nasiona soi zawierają wiele innych, szkodliwych związków - na przykład białko, które hamuje enzym trawienny trypsynę i czyni surową soję niejadalną. Aktywność tego enzymu nie jest tak łatwo sprawdzić jak aktywność ureazy, ale oba enzymy są w podobnym stopniu wrażliwe na podgrzewanie. Przy przemysłowej obróbce soi (wytworzenie mąki sojowej, przygotowywane ziarno), aby się upewnić, czy szkodliwy enzym został unieczynniony, sprawdza się aktywność ureazy - w taki sam sposób jak w tym doświadczeniu.

- **Po co soi ureaza?**

Na razie tego nie wiadomo. Liście soi również zawierają ten enzym, ale w znacznie niższym stężeniu (100-1000 razy mniej niż nasiona). Ureaza w liściach pomaga odzyskać azot z białek rozłożonych do mocznika, ureaza w nasionach działa tak samo podczas kiełkowania. Wydaje się, że amoniak chroni kiełkujące nasiona przed szkodnikami.

- **Ureaza - pierwszy enzym, który skrzystalizowano.** Ureaza z nasion fasoli *Canavalia ensiformis* to pierwszy enzym, który udało się oczyścić i skrzystalizować. Dokonał tego Jack B. Sumner w 1926 roku. W tych czasach powszechnie uważano, że nie da się skrzystalizować enzymów. Jack B. Sumner otrzymał za to nagrodę Nobla w 1946 roku. Dziś krystalizacja białek pomaga odkrywać ich budowę, badać ich działanie i projektować substancje zmieniające ich działanie, np. leki przeciwko enzymom wirusa HIV.

- **Co to jest mocznik?**

Mocznik to pierwszy związek organiczny, który udało się zsyntetyzować ze związków nieorganicznych. Dokonał tego w 1828 r. Friedrich Wöhler. Do tego momentu uważano, że jedynie żywe organizmy potrafią wytwarzać związki organiczne, że związki organiczne mają specjalne właściwości i do ich wytworzenia potrzebna jest tajemnicza „siła życiowa”. Friedrich Wöhler nie otrzymał nagrody Nobla, gdyż w jego czasach nagroda jeszcze nie istniała. Dziś mocznik wytwarza się w olbrzymich ilościach w skali przemysłowej i wykorzystuje do wyrobu tworzyw sztucznych oraz jako tani nawóz azotowy.

- **Po co roślinom azot i jak go mogą zdobyć?**

Azot to pierwiastek niezbędny roślinom do wzrostu i rozwoju - wchodzi w skład m.in. białek, kwasów nukleinowych. Większość roślin może pobierać azot z gleby tylko w postaci jonów amonowych lub azotanów.

Jedynie sinice i rośliny motylkowe, żyjące w symbiozie z bakteriami, korzystają z azotu atmosferycznego. Wiele zwierząt wydalają mocznik. Mikroorganizmy glebowe wytwarzają ureazę, która przekształca mocznik w łatwo dostępne jony amonowe. W ten sposób azot jest w ciągłym obiegu w organizmach żywych.

- **Gdzie jeszcze można znaleźć ureazę?**

Wiele różnych bakterii wytwarza ureazę. Również *Helicobacter pylori*, bakteria powodująca wrzody żołądka, wykorzystuje ją do podniesienia pH soku żołądkowego (optimum pH dla *H. pylori* to 7, normalne pH w żołądku to około 3).

Również trawiące celulozę bakterie, które żyją w pierwszym przedziale żołądka przeżuwaczy (m. in. krowy, owce) wydzielają ureazę. Przeżuwacze wydzielają do wnętrza żwacza mocznik, który bakterie wykorzystują jako źródło azotu do własnego wzrostu. Potem zwierzę trawi masę bakteryjną. Wiele innych bakterii również wydzielają ureazę, dlatego bezwonny mocznik po jakimś czasie zaczyna intensywnie pachnieć.

- **Wywar z czerwonej kapusty - wspaniały wskaźnik pH.**

Wywar z czerwonej kapusty zawiera antocyjany. Te związki są bardzo wrażliwe na pH roztworu i w zależności od niego przyjmują różną barwę. W pH 7 roztwór jest fioletowo-niebieski, gdy roztwór staje się bardziej kwasowy - czerwienieje. Gdy pH rośnie powyżej 7 i roztwór robi się bardziej zasadowy, wywar z czerwonej kapusty zielenieje. Te zmiany barwy są odwracalne - sprawdź, jak działa na wywar z kapusty dodawanie roztworu kwasu cytrynowego i sody na przemian!

Bibliografia

Acta Biochim Pol. 2000;47(4):1189-95; Plant ureases: roles and regulation. A. Sirko, R. Brodzik
Mikrobiol Rev. 1989 Mar;53(1):85-108; Microbial ureases: significance, regulation and molecular characterization. H.L. Mobley, R.P. Hausinger

Podziękowania

Protokół został zainspirowany doświadczeniami opisanymi przez Tomasza Plucińskiego, <http://www.chem.univ.gda.pl/~tomek>. Dziękujemy! Adaptacja protokołu została wykonana w ramach projektu VOLVOX, finansowanego przez Komisję Europejską w 6. Programie Ramowym.



Sprzęt i materiały

Sprzęt - etap wstępny

Sprzęt	Wykorzystanie	Uwagi
Mikser z końcówką tnącą i pojemnikiem, 1 szt.	do przygotowania zawiesiny soi	sugerujemy, aby tę część wykonała osoba prowadząca dla całej klasy
Filtr do kawy oraz lejek, 1 szt.	do odciedzenia zawiesiny z soi od grubych pozostałości	
Nóż i deseczka, 1 szt.	do pocięcia liści czerwonej kapusty	
Litrowe naczynie (słoik lub zlewka), 2 szt.	do przygotowania wywaru z czerwonej kapusty i na gotowy wywar	naczynia muszą być odporne na wrzątek
Zlewki lub kubki, 3 szt.	do przygotowania roztworów mocznika, kwasu cytrynowego i sody oczyszczonej	
łyżeczki, 3 szt.	do odmierzenia mocznika, kwasu i sody	

Sprzęt - etapy doświadczalne

Ilości podane na jedną parę

Sprzęt	Wykorzystanie	Uwagi
Zakraplacze lub pipetki, 2 szt.	do pobierania roztworów kwasu cytrynowego i sody oczyszczonej	można wykorzystać słomki do napojów lub łyżeczki
Kubeczki plastikowe, 5 szt.	na przygotowane roztwory kwasu, sody, mocznika, zawiesiny soi i wywaru z kapusty	naczynia te muszą być przezroczyste i nieduże
Szklane probówki lub przezroczyste kieliszki, 6 szt.	do części 1. i 2. doświadczenia	
łyżeczka lub gruba słomka, 1 szt.	do nabierania zawiesiny soi	
Naklejki (np. metki) lub flamastry wodoodporne, 1 komplet	do oznakowania naczyń przed doświadczeniem	

Ilość materiałów niezbędnych do wykonania doświadczenia dla 30-osobowej klasy, podzielonej na dwuosobowe zespoły

Materiały	Ilość materiałów niezbędnych do wykonania eksperymentu		Wykorzystanie	Uwagi
	przez jeden zespół	przez klasę		
Surowe ziarna soi	ok 6 szt.	ok. 20 gramów (100 szt.)	źródło enzymu ureazy	ziarna przed doświadczeniem trzeba namoczyć (minimum 1 godz., najlepiej całą noc)
Mocznik - nawóz	20 ml 10% roztworu	300 ml 10% roztworu (30 g mocznika)	źródło mocznika	alternatywnie: moc (patrz: alternatywne składniki)
Surowa czerwona kapusta	40 ml wywaru	500 ml wywaru z 3 liści	wskaźnik pH	patrz: alternatywne składniki
Gorąca woda	-	ok 500 ml	wywar z kapusty	
Kwasek cytrynowy	5 ml	100 ml 10% roztworu (2 tyżeczki suchego kwasku)	roztwór o niskim pH	patrz: alternatywne składniki
Soda oczyszczona	5 ml	100 ml 10% roztworu (2 tyżeczki suchej sody)	roztwór o wysokim pH	