

Experimente zur Immobilisierung von Carboanhydrase

Praktische Biotechnologie im Unterricht der Sekundarstufe II

Ute Rikus und Manfred Sieger

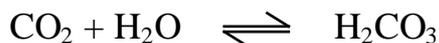
Kurzfassung

Das in biologischen Systemen weit verbreitete Enzym Carboanhydrase katalysiert die Einstellung des Kohlenstoffdioxid-Kohlensäure-Gleichgewichtes. Diese bedeutsame Enzymwirkung ist auch im Schulversuch zugänglich. Durch eine Immobilisierung der Carboanhydrase, einem biotechnologischen Verfahren, lässt sich die experimentelle Unterrichtspraxis effektiver gestalten. So kann z. B. nur mit einem immobilisierten Enzym gezeigt werden, dass sich Katalysatoren bei der Reaktion nicht verbrauchen.

Nach einem Überblick über verschiedene Immobilisierungsmethoden und dem industriellen Einsatz immobilisierter Biokatalysatoren wird ein Weg aufgezeigt, das Enzym Carboanhydrase im Schulunterricht zu immobilisieren und seine Aktivität nachzuweisen. Darüber hinaus wird vorgeschlagen, auch die in der Medizin angewendete Hemmung der Carboanhydrase beispielhaft im Experiment nachzuvollziehen.

1 Einleitung

In biologischen Systemen spielt das Kohlenstoffdioxid-Kohlensäure-Gleichgewicht für zahlreiche physiologische Prozesse eine wichtige Rolle. Die Bildung von Kohlensäure aus Kohlenstoffdioxid und Wasser sowie umgekehrt ihr Zerfall verlaufen gemäß der chemischen Gleichung



Katalysiert von einem bestimmten Enzym, der Carboanhydrase, erfolgt die Gleichgewichtseinstellung 10^7 -mal schneller als unkatalysiert. Von allen bis heute bekannt gewordenen Enzymen ist Carboanhydrase damit eines der schnellsten Enzyme überhaupt; pro Sekunde kann es die Reaktion von $6 \cdot 10^5$ CO_2 -Molekülen katalysieren (STRYER, 1996, S.205). Wie generell bei Katalysatoren wird auch durch Carboanhydrase ausschließlich die Geschwindigkeit beeinflusst, mit der das Reaktionsgleichgewicht erreicht wird, nicht die Gleich-

gewichtslage. Die Reaktionsrichtung hängt von der jeweiligen CO_2 -Konzentration bzw. dem CO_2 -Partialdruck ab.

Die Biokatalyse durch Carboanhydrase hat bei verschiedenen Organismen wie auch bei verschiedenen Geweben oder Organen desselben Organismus unterschiedliche physiologische Auswirkungen. Sie betreffen vorrangig den CO_2 -Transport, die Sekretion von HCO_3^- sowie die Sekretion von H^+ (DODGSON et al., 1991; BOTRÉ et al., 1991). Hierdurch werden so unterschiedliche physiologische Mechanismen wie beispielsweise der CO_2 -Transport im Blut, die Alkalisierung des Pankreassekrets oder die Bildung der Magensäure ermöglicht (Übersicht mit weiteren Beispielen siehe bei MAREN, 1991). Dass sich eine einzige chemische Reaktion physiologisch dermaßen multifunktional auswirkt, ist vor allem auf die anschließende Dissoziation der gebildeten Kohlensäure zurückzuführen, bei der H^+ und HCO_3^- -Ionen entstehen.

Der großen Bedeutung und weiten Verbreitung von Carboanhydrase sollte auch der Biologieunterricht in angemessener Weise Rechnung tragen. Als methodischer Vorteil tritt hierbei noch der günstige Umstand hinzu, dass sich die Aktivität der Carboanhydrase ohne viel Aufwand experimentell demonstrieren lässt. Ein ausführliches Unterrichtsmodell zur Theorie und Praxis der Carboanhydrasewirkung ist für die Sekundarstufe II in jüngster Zeit veröffentlicht worden (RIKUS, 1998).

Ergänzend zu diesem Unterrichtsmodell wird nachfolgend über die Möglichkeit berichtet, Carboanhydrase zu immobilisieren und enzymatische Versuche mit dem Immobilisat durchzuführen.

Die Immobilisierung von Enzymen ist ein biotechnologisches Verfahren, das zunehmend an Bedeutung gewinnt (HARTMEIER, 1986; STEIN, 1996). Hierbei werden die normalerweise wasserlöslichen Enzyme mit einer wasserunlöslichen Substanz verknüpft, sodass sie ihre freie Beweglichkeit verlieren. Solche immobilisierten Enzyme lassen sich mitsamt ihrer Trägersubstanz durch einfache Methoden wieder von der Reaktionslösung trennen und daher mehrfach verwenden, was zum Beispiel bei sehr teuren Enzymen hilft, die Unkosten zu senken.

Die hier vorgeschlagene Immobilisierung von Carboanhydrase wird zwar großtechnisch nicht eingesetzt, da es derzeit keine industrielle Verwendung für dieses Enzym gibt. Für den Unterricht bedeutet sie aber eine willkommene Bereicherung, wofür es verschiedene Gründe gibt:

1. Anhand immobilisierter Carboanhydrase lässt sich experimentell leicht erarbeiten, dass auch Biokatalysatoren wie allgemein die Katalysatoren zwar in den Reaktionsmechanismus eingreifen, dabei aber selber nicht ver-

braucht werden. Es wäre ungleich aufwendiger und unterrichtlich kaum zu leisten, dies mit einem mobilen Enzym zeigen zu wollen.

2. Die Immobilisierung von Carboanhydrase ist wegen ihrer Einfachheit besonders geeignet, einen anschaulichen Einblick in ein gängiges biotechnologisches Arbeitsprinzip zu geben.
3. Nicht zuletzt sind finanzielle Erwägungen maßgebend. Käufliche Carboanhydrase ist sehr teuer¹, ein Problem, das bei der mehrfachen Verwendungsmöglichkeit des Enzyms durch dessen Immobilisierung beträchtlich reduziert wird. Die Isolierung von Carboanhydrase aus Schlachttierblut bietet zwar ebenfalls einen Ausweg aus der finanziellen Situation; sie ist aber recht umständlich und zeitaufwendig (nähere Angaben hierzu bei BRAUN, 1990 und HELBLING, 1996). Experimentell leichter zugängliche Enzymquellen wie eine Hefesuspension oder Rohextrakte aus Äpfeln oder Kartoffeln (BANNWARTH et al., 1995) halten einer näheren Prüfung nicht stand² und scheiden daher als Alternative aus.

2 Immobilisierungsmethoden

2.1 Überblick

Lange bevor die Immobilisierungstechniken als solche bekannt waren, wurden bereits immobilisierte Biokatalysatoren³ in der Praxis eingesetzt. Um 1815 konnte man effektiv Essig herstellen, indem man alkoholhaltige Lösungen über Holzspäne rieseln ließ. Dies geschah rein empirisch. Man wusste nicht, dass hierdurch ein Anhaften von Essigsäurebakterien auf den Holzspänen eingeleitet

¹ 100 mg kosteten 1998 um die 100,- DM (Serva).

² Bei Überprüfung der Enzymaktivität verwenden BANNWARTH et al. (1995) 5 ml eines sehr gering konzentrierten Barbituratpuffers ($c = 0,9 \text{ mmol/l}$) (versehen mit dem Indikator Bromthymolblau) und fügen nur wenig Mineralwasser als Kohlenstoffdioxidquelle hinzu ($V = 0,2\text{-}0,6 \text{ ml}$). Unter diesen Bedingungen führt die Zugabe von Hefesuspension, Apfel- oder Kartoffelrohextrakt zu einer Beschleunigung des Farbumschlags. Fügt man diese Suspensionen dagegen zu einem höher konzentrierten Carbonatpuffer ($c = 0,3 \text{ mol/l}$; $V = 0,5 \text{ ml}$) und setzt wesentlich mehr Mineralwasser ein ($V = 5 \text{ ml}$), wie es der von BRAUN (1990) und HELBLING (1996) publizierte Methode zur Demonstration der Carboanhydraseaktivität entspricht, bleibt eine Beschleunigung des Farbumschlages aus. Da in allen vorgeschlagenen Suspensionen CO_2 nachgewiesen werden konnte und alle einen pH-Wert unter 7 haben, liegt die Vermutung nahe, dass die Beschleunigung des Farbumschlags bei der Versuchsdurchführung nach BANNWARTH et al. auf die Erhöhung der Substrat- und Protonenkonzentration zurückzuführen ist. RIKUS, unveröffentlichte Ergebnisse.

³ Da nicht nur einzelne Enzyme, sondern auch ganze Zellen und Mikroorganismen immobilisiert werden können, spricht man summarisch von Biokatalysatoren (DELLWEG, 1987).

wurde – nach heutigem Verständnis eine Immobilisierung von Essigsäurebakterien auf dem Holz.

Bis in die 60er Jahre unseres Jahrhunderts fanden die spärlichen Publikationen zur Enzymimmobilisierung wenig Beachtung. Das dann einsetzende industrielle Interesse änderte jedoch die Situation tiefgreifend, was sich nicht zuletzt in einem sprunghaften Anstieg entsprechender Publikationen zeigte. Zur ersten industriellen Anwendung kam es 1969, als eine japanische Firma immobilisierte L-Amino-Acylase zur Trennung eines Gemisches aus L- und D-Aminosäuren nutzte. 1971 wurde in den USA bei der ersten „Enzyme Engineering Conference“ u. a. eine Klassifizierung für immobilisierte Enzyme geschaffen (HARTMEIER, 1986); s. Abb. 1.

Nach dieser heute noch gängigen Einteilung werden gebundene und eingehüllte Biokatalysatoren unterschieden.

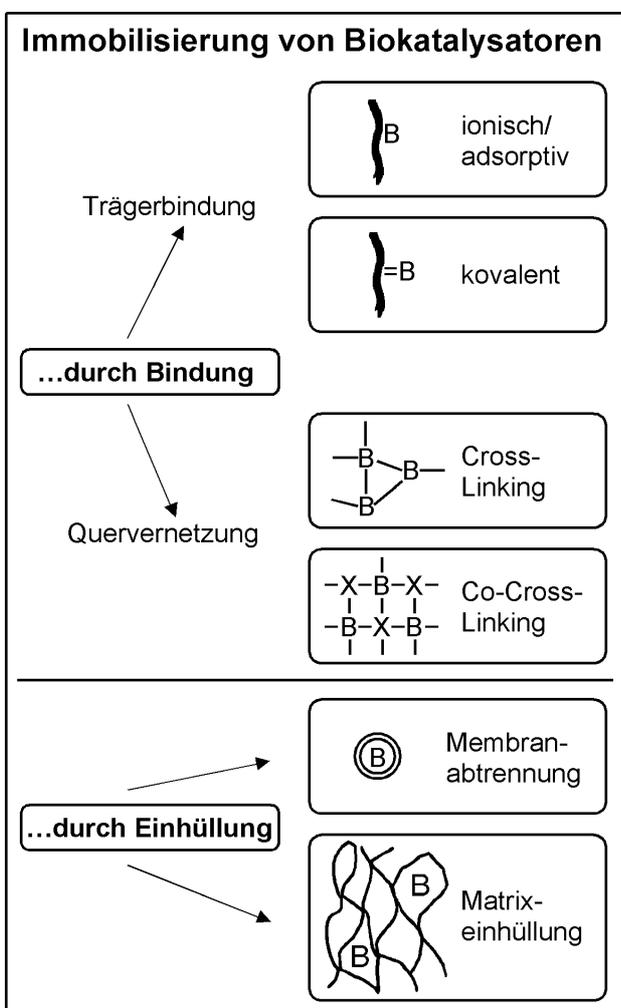


Abb. 1: Einteilung der Immobilisierungsmethoden für Biokatalysatoren mit schematischer Darstellung der verschiedenen Methoden. B = Biokatalysator; X = inaktives Molekül. Verändert nach HARTMEIER, 1986 und BULLOCK, 1989.

Gebundene Biokatalysatoren können entweder durch ionisch/adsorptive oder durch kovalente Bindung an ein Trägermaterial fixiert werden. Sie können mit geeigneten Reagenzien untereinander quer vernetzt werden (engl. cross-linking). Von „Co-Cross-Linking“ spricht man, wenn katalytisch inaktive Moleküle hinzugegeben werden, die die Eigenschaften der Immobilisate verbessern sollen. Eingehüllte Biokatalysatoren sind entweder von einer permeablen Membran umgeben (Membranabtrennung) oder in die Matrix eines Polymers eingehüllt (Matrixeinhüllung). Dazu werden künstliche Polymere wie Polyacrylamid und Polystyrol und natürliche Polymere wie Alginat, Gelatine, Agar-Agar und Carrageenan verwendet (HARTMEIER, 1986; STEIN, 1996). Im Folgenden wird die Immobilisierung durch

Einschluss in ein Alginatgel erläutert, da sie die methodische Grundlage der in Kapitel 5 beschriebenen Schulversuche darstellt.

2.2 Enzymimmobilisierung mit Alginatgelen

Alginat (Salze der Alginsäure) sind Polysaccharide, die aus Braunalgen gewonnen werden. Sie bestehen aus den Monomeren D-Mannuronsäure und L-Guluronsäure (s. Abb. 2), die über 1,4-glycosidische Bindungen verknüpft sind, was zu einem linearen Aufbau des Biopolymers führt. Die Alginat verschiedener Algenarten unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Monomerzusammensetzung und damit in ihren Eigenschaften. Je größer das Polymer, umso höher die Viskosität des Alginates. Die Fähigkeit, Gele zu bilden, steigt mit zunehmendem Anteil an Guluronsäure. Zur Gelbildung sind zwei- oder mehrfach geladene Kationen wie z. B. Ca^{2+} erforderlich, die ionische Bindungen zwischen den Säurerestgruppen von zwei Guluronsäuren eingehen. Dadurch werden die ursprünglich linearen Polymere vernetzt (ionotrope Gelbildung) (HARTMEIER, 1986; SCHARF, 1987). Die entstehende Gelstruktur wird mit dem „Eierkartonmodell“ erklärt: Kationen befinden sich danach zwischen den Polysaccharidketten wie Eier in einem Kartongerüst. LUTZ & MÜLLER (1991) merken zu dieser Modellvorstellung an, dass so zwar die räumlichen Beziehungen innerhalb des Gels wiedergegeben werden, die zugrunde liegenden Bindungen aber unberücksichtigt bleiben. Außerdem dürfe nicht übersehen werden, dass sich das geordnete anionische Grundgerüst erst im Moment der Kationeneinlagerung bildet.

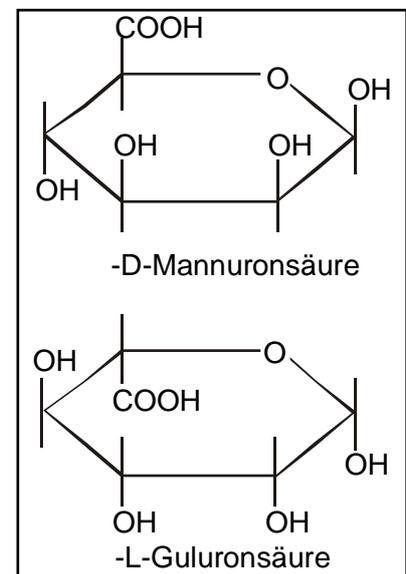


Abb. 2: Struktur von Mannuronsäure und Guluronsäure.

In die Poren der Alginatgele können Enzyme oder auch ganze Zellen eingelagert werden. Da sie nicht mit dem Gel reagieren, sind die enzymatischen Aktivitätsverluste gering, zumal diese schonende Methode bei Raumtemperatur durchgeführt werden kann. Allerdings können die eingelagerten Biokatalysatoren ausgewaschen werden. Auch die Gele verlieren bei längerem Kontakt mit destilliertem Wasser oder mit alkalischsalzreichen Lösungen ihre Stabilität, da die gelbildenden Calciumionen verdrängt werden und die Alkalisalze wasserlöslich sind (HARTMEIER, 1986; SCHARF, 1987).

3 Anwendungsbereiche für immobilisierte Biokatalysatoren

Das praktische Interesse an immobilisierten Biokatalysatoren konzentriert sich vor allem auf ihren Einsatz in der Lebensmittelanalytik und der klinisch-diagnostischen Analytik sowie in der industriellen Synthese. Seit 1988 übertrifft die Zahl der zur biochemischen Analytik erschienenen Publikationen, die sich auf immobilisierte Enzyme beziehen, zunehmend diejenigen, in denen mit nicht-immobilisierten Enzymen gearbeitet wird (STEIN, 1996).

Die analytische Verwendung immobilisierter Enzyme lässt sich in zwei Kategorien einteilen: Entweder werden die durch enzymatische Katalyse gebildeten Produkte mit herkömmlichen Methoden (z. B. Spektroskopie, Indikatoren) bestimmt. Oder in einem Biosensor⁴ wird das Enzym in unmittelbarer Nähe eines Messwertumformers immobilisiert, der physikalische oder chemische Änderungen in seiner nächsten Umgebung registriert und in ein elektrisches

Tab.1: Biosensoren mit immobilisierten Enzymen (nach BULLOCK, 1989; GACESA & HUBBLE, 1992).

Substrat	Enzym
Glucose	Glucose-Oxidase
Laktose; Galaktose	Laktase (Galactose-Oxidase)
Penicillin	Penicillin-Oxidase
Ethanol	Alkohol-Oxidase
Lactat	Lactat-Dehydrogenase
Harnsäure	Harnsäure-Oxidase
Harnstoff	Urease

Signal umwandelt. Zum Beispiel wird beim Glucosenachweis mit Glucose-Oxidase entstehendes Wasserstoffperoxid registriert, was den Rückschluss auf vorhandene Glucose erlaubt (GACESA & HUBBLE, 1992). Einige Enzyme, die in Biosensoren eingesetzt werden, sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

In der industriellen Synthese haben immobilisierte Enzymsysteme dann eine kommerzielle Bedeutung, wenn hohe Spezifität, geringe Giftigkeit und katalytische Effektivität unter milden Bedingungen gefragt sind. Manche enzymkatalysierten Umwandlungen sind auf chemischem Weg extrem schwierig zu erreichen. Wenn in diesem Fall die benötigten Enzyme zudem noch sehr teuer sind, lohnt sich eventuell deren Immobilisierung (BULLOCK, 1989). Weitere Vorteile sind die Vereinfachung der Produktreinigung durch erleichterte Enzy-

⁴ Die Terminologie ist uneinheitlich. Neben der hier erwähnten Bedeutung, die der von STEIN, 1996 und BULLOCK, 1989 entspricht, kann der Begriff „Biosensor“ auch im Sinne eines Oberbegriffes für den analytischen Einsatz von immobilisierten Enzymen verwendet werden (GACESA & HUBBLE, 1992).

mentfernung sowie die Möglichkeit zur kontinuierlichen Reaktionsführung im Bioreaktor⁵ (DELLWEG, 1994).

Produktionsprozesse, bei denen immobilisierte Biokatalysatoren eingesetzt werden, können Tabelle 2 entnommen werden.

Tab. 2: Beispiele für den technischen Einsatz von immobilisierten Biokatalysatoren (nach DELLWEG, 1994; TOSA & SHIBATANI, 1995).

Produktionsprozess	Immobilisiertes Enzym
Gewinnung von fructosehaltigem Flüssigzucker aus Stärke (HFCS = High fructose corn syrup)	Glucose-Isomerase
Produktion von 6-Amino-Penicillansäure bei der semisynthetischen Penicillinherstellung	Penicillin-Acylase
Gewinnung von L-Aminosäuren aus chemisch hergestellten racemischen Gemischen	Acylasen
Herstellung von Milch mit reduziertem Laktosegehalt	Laktase

Nur die beiden in der Tabelle 1 zuerst genannten Enzyme werden in größerem Maßstab immobilisiert. Jährlich dürften mehr als 1000t immobilisierte Glucose-Isomerase und 15-30t immobilisierte Penicillin-Acylase hergestellt werden (DELLWEG, 1987; 1994).

4 Immobilisierte Biokatalysatoren im Unterricht

Als verbreitetes biotechnologisches Prinzip hat die Immobilisierung von Biokatalysatoren schon seit mehreren Jahren Eingang in den schulischen Experimentalunterricht gefunden. In Tabelle 3 sind die Quellen einiger der bisher veröffentlichten Versuchsanleitungen aufgelistet.

Lange Zeit wurde die Verwendung von Alginatgelen zur Enzymimmobilisierung abgelehnt, da die verhältnismäßig kleinen Enzyme von der relativ grobporigen Gelmatrix nur unzureichend zurückgehalten und folglich schnell ausgewaschen würden. Alginatgele wurden vor allem für die Einhüllung lebender Zellen oder Zellorganellen empfohlen (HARTMEIER, 1986). In jüngster Zeit werden Alginat zur Enzymimmobilisierung nicht mehr kategorisch abgelehnt, da die Porengröße durch Wahl des Alginattyps und der Alginatkonzentration

⁵ Ein auch als Fermenter bezeichneter Behälter zur Durchführung biologischer Stoffumwandlungen mit Biokatalysatoren.

Tab. 3: Publikationen zur Biokatalysatorimmobilisierung im Unterricht.

Art der Immobilisierung (s. Abb. 1)	Durchführung	Literatur
adsorptive Bindung	Adsorption von Saccharase an Aktivkohle	WENK & MAERZ (1987)
ionische Bindung	Bindung von Katalase an CM-Cellulose	WENK & MAERZ (1987)
	Bindung von Amyloglucosidase an Ionenaustauscher	WENK & MAERZ (1989)
kovalente Bindung	Bindung von Trypsin an Glas	DEJONG & KUMLER (1974)
Co-Cross-Linking	Vernetzung von Laktase mit Albumin	WENK & MAERZ (1987)
Matrizeinhüllung	Einschluss von Bäckerhefe in Alginatgel	SCHARF (1987) GRUNWALD (1986)
	Einschluss von Laktase in Alginatgel	LABAHN-LUCIUS (1991)
	Einschluss von Urease in Alginatgel	HAWCROFT (1997)

variierbar ist und so Auswaschverluste minimiert werden können (ORTEGA et al., 1998).

Für den Schulunterricht wird die Immobilisierung von Enzymen in Alginatgelen von mehreren Autoren empfohlen, die unterschiedlich mit der Auswaschproblematik umgehen. Sie wird entweder nicht erwähnt (LABAHN-LUCIUS, 1991) oder die Immobilisierung in einem Alginatgel wird durch Verwendung eines besonders großen Enzyms gerechtfertigt (HAWCROFT, 1997).

5 Experimente zur Immobilisierung von Carboanhydrase

Die hier vorgeschlagene Immobilisierung von Carboanhydrase erfolgt durch Einhüllung in ein Alginatgel. Hierbei wird in Kauf genommen, dass Carboanhydrase als relativ kleines Proteinmolekül⁶ bei wiederholter Anwendung in Enzymversuchen teilweise wieder ausgewaschen wird. Wenn immobilisierte Carboanhydrase 24h in einer 0,5%igen CaCl₂-Lösung aufbewahrt wird, so zeigt anschließend die filtrierte Lösung enzymatische Aktivität. Dieser Nachteil wird jedoch durch die einfache Versuchsdurchführung mit vergleichsweise ungefährlichen Chemikalien aufgewogen, zumal sich durch geeignete Versuchsbedingungen und sachgemäße Behandlung der Immobilisate die Auswaschverluste minimieren lassen.

⁶ Carboanhydrase aus Rindererythrozyten, wie sie von der Firma Serva bezogen werden kann, hat ein Molekulargewicht von ca. 29 000.

5.1 Herstellung des Alginatgels

Eine genaue Vorschrift zur Immobilisierung von Carboanhydrase mit einem Alginatgel findet sich in Arbeitsmaterial 1. Die beschriebene Methode ist geeignet, sowohl käufliche Carboanhydrase als auch einen aus Schlachttierblut gewonnenen Enzymextrakt zu immobilisieren. Verständlicherweise ist die erstgenannte Alternative schneller, sauberer und effektiver, aber eben auch wesentlich teurer. Möchte man lieber den billigeren, wenngleich umständlicheren Weg wählen und selber einen Enzymextrakt isolieren, kann vorteilhaft auf eine von BRAUN (1990) sowie von HELBLING (1996) publizierte Methode zurückgegriffen werden. In Bezug auf Enzymisolierung und Aktivitätsbestimmung sind beide Vorschriften identisch, doch erweitert HELBLING die Versuchsanleitung um den Einsatz eines Carboanhydrase-Inhibitors. Beide übernehmen nahezu unverändert die von LECHNER (1976) publizierte Vorschrift zur Enzymisolierung und Aktivitätsbestimmung, in der die von MELDRUM & ROUGHTON (1933) entwickelte Methode zur Isolierung von Carboanhydrase aus Ochsenblut angewendet wird.

Die Mengenangaben in Arbeitsmaterial 1 beziehen sich auf die Verwendung des käuflichen Enzyms. Wird demgegenüber Carboanhydrase aus Schlachttierblut isoliert, bleibt die erreichbare Enzymkonzentration niedriger, sodass der Versuchsansatz zur Immobilisierung quantitativ angepasst werden muss. Die Alginatlösung wird daher aus 19 ml aqua dest. und 0,75 g Alginat hergestellt (anstelle von 23 ml und 0,75 g) und es werden 3 ml Carboanhydrase-Extrakt aus Schlachttierblut zu Becherglas A und 3 ml aqua dest. zu Becherglas B gegeben (anstelle von jeweils 1 ml).

Für das fertige Gel ist eine 3%ige Alginatkonzentration optimal. Sie führt zu einer hinreichenden Vernetzung des Gels mit einer entsprechend geringen Porengröße bei noch ausreichender Viskosität (ORTEGA et al., 1998). Anzustreben ist ein homogenes Gel, das möglichst wenig oder keine Klümpchen enthält, da hierdurch beim Einspritzen in die CaCl_2 -Lösung gleichmäßigere Alginatkugeln entstehen. Doch hat die Gelkonsistenz keinen beobachtbaren Einfluss auf die Enzymaktivität. Steht wenig Zeit zur Verfügung, kann darauf verzichtet werden, die Alginatlösung wie in der Arbeitsvorschrift angegeben noch 30 Min. quellen zu lassen. Es empfiehlt sich, Alginat und aqua dest. nicht mit einem Magnetrührer, sondern besser mit einem Glasstab von Hand zu rühren, da das Gel ziemlich rasch viskos wird. Beim längeren Bewegen der fertigen Alginatkugeln in der CaCl_2 -Lösung ist dagegen ein Magnetrührer angebracht.

Sauberer Arbeiten ist unerlässlich. Jeder Kontakt zwischen Geräten, die mit dem enzymhaltigen Gel in Berührung gekommen sind, und dem enzymfreien

Gel ist unbedingt zu vermeiden, um das Ergebnis der Aktivitätsbestimmung nicht zu verfälschen.

5.2 Überprüfung der Enzymaktivität

Die enzymatische Aktivität der Carboanhydrase lässt sich anhand der Geschwindigkeit der durch sie katalysierten Kohlensäurebildung erfassen. Hierbei vergleicht man die entsprechende Reaktionszeit unter Katalyse von Carboanhydrase mit derjenigen Reaktionszeit, die ohne Enzym benötigt wird (LECHNER, 1976; BRAUN, 1990; HELBLING, 1996). Als CO₂-Quelle eignet sich Mineralwasser. Die Reaktion lässt man in einem alkalischen Puffer-Indikator-Gemisch ablaufen. CO₂ reagiert mit Wasser zu Kohlensäure, wodurch sich nach Erschöpfen der Pufferkapazität durch die pH-Wert-Erniedrigung die Indikatorfarbe ändert. Ungepuffert ließe sich der Enzymeinfluss nicht beobachten, da die Farbänderung des Indikators zu schnell eintreten würde. Eine genaue Versuchsvorschrift findet sich in Arbeitsmaterial 2.

Um die enzymatische Wirkung der auf Alginat immobilisierten Carboanhydrase zu prüfen, ist es keineswegs belanglos, welches enzymfreie Vergleichssystem gewählt wird. Auch Alginatkugeln ohne Carboanhydrase beschleunigen die Gleichgewichtseinstellung im Vergleich zu einem alginat- und enzymfreien Reaktionsansatz (s. Abb. 3). Um daher den allein auf das Alginat zurückzuführenden Einfluss ausschließen zu können, sollte man die Reaktionszeiten bei Zugabe von carboanhydrasehaltigen und carboanhydrasefreien Alginatkugeln vergleichen.

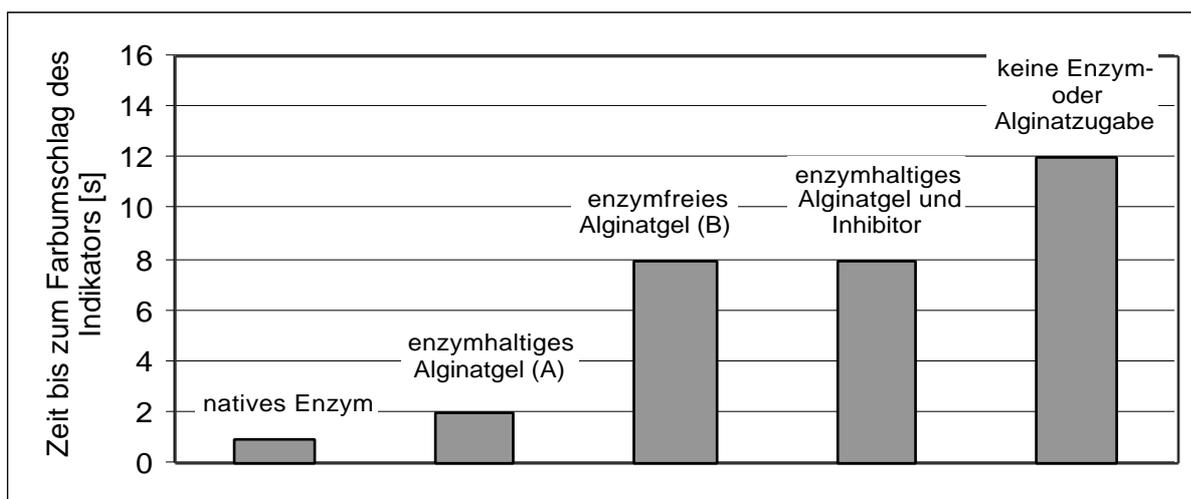


Abb. 3: Untersuchung des Enzym- und Alginat einflusses auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Eingezeichnet ist die bis zum Farbumschlag des Indikators beobachtete Zeit unter den in Arbeitsmaterial 2 beschriebenen Versuchsbedingungen. Untersucht wurden die in der Abbildung angegebenen Enzym-/Alginatkombinationen. Einem Ansatz wurde zusätzlich zu dem enzymhaltigen Alginatgel ein Inhibitor zugegeben.

Die Reaktionsgeschwindigkeit und auch die Löslichkeit von CO_2 in Wasser sind temperaturabhängig. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, muss mit gekühlten, gleichmäßig temperierten Lösungen gearbeitet werden. Daher bietet sich die Lagerung im Kühlschrank an. Die angegebenen Konzentrations- und Mengenangaben beziehen sich auf die Verwendung des Mineralwassers „Bon Aqua®“ aus einer frischen, gekühlten Flasche. Da der CO_2 -Gehalt der Mineralwassermarken variiert, sind die Versuchsbedingungen bei Verwendung einer anderen Marke unbedingt zu überprüfen. Zu hohe CO_2 -Konzentrationen haben einen sofortigen Farbumschlag zur Folge, der keinen Rückschluss auf die beschleunigende Wirkung des Enzyms erlaubt. Bei sehr niedrigen Konzentrationen erfolgt kein Farbumschlag. Der Einsatz eines Magnetrührers ist unerlässlich, um für eine gleichmäßige Verteilung des CO_2 zu sorgen und damit eine ungleiche Diffusion des Gases als limitierenden Faktor der Kohlensäurebildung ausschließen zu können.

5.3 Hemmung der Enzymaktivität

Aufgrund des großen Anwendungsbezuges sollte auch die Hemmung der Enzymaktivität demonstriert werden. Inhibitoren für Carboanhydrase sind seit 1940 bekannt. Damals entdeckten MANN und KEILIN (1940), dass bestimmte Sulfonamide die Carboanhydraseaktivität hemmen, was seitdem in der Medizin genutzt wird. Der am meisten verwendete Inhibitor ist Acetazolamid, eine aromatische Sulfonamidverbindung, die zunächst unter dem Handelsnamen Diamox® vor allem als Diuretikum eingesetzt wurde. Acetazolamid hemmt die Kohlensäurebildung in den Tubuluszellen der Niere, wodurch die Protonenabgabe in das Tubuluslumen blockiert wird. Dies führt zu einer vermehrten Ausscheidung von Na^+ , HCO_3^- und Wasser, die allerdings aufgrund verschiedener Kompensationsmechanismen nur wenige Stunden anhält. Durch die vermehrte HCO_3^- -Abgabe mit dem Harn kommt es zu einer metabolischen Acidose. Mittlerweile sind allerdings wirkungsvollere Diuretika entwickelt worden und Acetazolamid spielt als Diuretikum nur noch eine geringe Rolle (MUTSCHLER, 1981; FORTH et al., 1996; HELBLING, 1996).

Wesentlich größer ist die Bedeutung von Carboanhydrase-Inhibitoren bei der Glaukombehandlung. Die Hemmung von Carboanhydrase reduziert die HCO_3^- -Bildung im Ziliarkörper des Auges. Da hierdurch weniger Kammerwasser sezerniert wird, sinkt auch der bei einem Glaukom erhöhte Augeninnendruck. Eine andere Indikation für die Anwendung von Acetazolamid ist eine akute Pankreatitis. In diesem Fall wird ebenfalls durch Carboanhydrasehemmung das HCO_3^- -reiche Pankreassekret vermindert (FORTH et al., 1996). Unterrichtsmaterial, mit dem der Einfluss von Carboanhydrase auf die beiden hier

erwähnten Sekretionsprozesse erarbeitet werden kann, findet sich bei RIKUS (1998).

Da eine Carboanhydrasehemmung wie oben beschrieben die Nierenfunktion in Richtung einer metabolischen Acidose zu ändern vermag, wird Acetazolamid auch erfolgreich bei Epileptikern eingesetzt, bei denen eine Acidose die Krampfneigung herabsetzt (FORTH et al., 1996). Die Induktion einer metabolischen Acidose eröffnet natürlich auch die Möglichkeit, mit Acetazolamid eine bestehende Alkalose zu kompensieren, was sich beispielsweise bei der sog. Höhenkrankheit bewährt, die bei einem Aufenthalt in Höhen über 3500 m eintreten kann (FORTH et al., 1996). Aufgrund des in großen Höhen wesentlich geringeren Luftdrucks ist die Sauerstoffaufnahme pro Atemzug geringer als auf Meereshöhe, wohingegen die CO_2 -Abgabe konstant bleibt. Acetazolamid verursacht darüber hinaus eine verstärkte Lungenventilation, wodurch die arterielle Sauerstoffsättigung zunimmt (SUTTON et al., 1979). Dieser Effekt ist unbestritten, die Ursache aber noch nicht vollständig geklärt. Wahrscheinlich wirkt Acetazolamid direkt im zentralen Nervensystem, wo durch Hemmung von Carboanhydrase eine erhöhte intrazelluläre CO_2 -Spannung erzeugt wird (COOTE, 1995).

Des Weiteren können Carboanhydrase-Inhibitoren bei manchen medikamentösen Vergiftungen eingesetzt werden, da durch Hemmung von Carboanhydrase bei gleichzeitiger Gabe von HCO_3^- der Harn alkalisiert werden kann. Schwache Säuren, wie z. B. Barbiturate, sind in alkalischem Harn besser löslich, sodass die Resorption verringert wird. Dadurch können Medikamente forciert ausgeschwemmt werden (FORTH et al., 1996; SCHMIDT & THEWS, 1997).

In Arbeitsmaterial 3 wird ein Versuch beschrieben, mit dem im Unterricht die durch Acetazolamid bewirkte Carboanhydrasehemmung demonstriert werden kann. In der Apotheke ist Acetazolamid unter dem Handelsnamen Diamox[®] als Diuretikum erhältlich, das pro Tablette 250 mg des Wirkstoffes enthält. Da Diamox[®] verschreibungspflichtig ist, wird hier der vom Chemikalien-großhandel zu beziehende Reinstoff verwendet. Unterrichtsmaterial zur Erarbeitung des Reaktionsmechanismus und darauf aufbauend auch der Inhibitorwirkung findet sich bei HELBLING (1996).

5.4 Aufbewahrung der Alginat

Um Enzymverluste durch Auswaschen zu minimieren, sollte generell die Kontaktzeit der Alginat mit wässrigen Lösungen gering gehalten werden. Die Alginat müssen nach dem Versuch schnell wieder aus der Lösung entfernt, kurz mit destilliertem Wasser abgespült und mit einem Papiertuch getrocknet wer-

den. Durch zu langen Kontakt mit destilliertem Wasser oder alkalisch-reichen Lösungen werden außerdem die gelbildenden Ca^{2+} -Ionen ausgewaschen, wodurch sich die Alginatgels auflösen. Wird dies beobachtet, sollten die Alginatgels auf dem Magnetrührer 10 Minuten in einer 1%igen CaCl_2 -Lösung regeneriert werden.

In einem Filmdöschen tiefgefroren, behalten die Immobilisate monatelang ihre enzymatische Aktivität. Zur Versuchsdurchführung können sie nach ca. zweistündigem Auftauen entnommen und ohne weitere Vorbereitung direkt eingesetzt werden. Die zu beobachtende Konsistenzänderung des Gels – durch das Einfrieren verhärtet es – ist experimentell ohne Bedeutung. Werden die Alginatgels wie oben beschrieben behandelt, steht einer häufigen Verwendung nichts im Wege.

Zitierte Literatur

- BANNWARTH, H., B. KREMER & D. MASSING (1995): Stoffe und Stoffwechsel. Quelle & Meyer, Heidelberg.
- BOTRÉ, F., G. GROS & B. STOREY (Hrsg.) (1991): Carbonic anhydrase: from biochemistry and genetics to physiology and clinical medicine. VCH, Weinheim New York.
- BRAUN, T.M. (1990): Portrait eines Biokatalysators: Carboanhydrase A. PdN-Ch **39** (3), 8-10.
- BULLOCK, C. (1989): Immobilised enzymes. Edu. Chem. **26** (6), 179-182.
- COOTE, J. H. (1995): Medicine and mechanisms in altitude sickness. Sports Med. **20** (3), 148-159.
- DEJONG, P. & P. KUMLER (1974): Preparation of immobilized enzymes, and determination of their pH-activity profile. J. Chem. Edu. **51** (3), 200-201.
- DELLWEG, H. (1987): Biotechnologie: Grundlagen und Verfahren. VCH, Weinheim New York.
- DELLWEG, H. (1994): Biotechnologie verständlich. Springer, Berlin Heidelberg New York.
- DODGSON, S. J., R. E. TASHIAN & G. GROS (Hrsg.) (1991): The carbonic anhydrase: cellular physiology and molecular genetics. Plenum Press, New York.
- FORTH, W., D. HENSCHLER, W. RUMMEL & K. STARKE (1996): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Spektrum, Heidelberg Berlin Oxford.
- GACESA, P. & J. HUBBLE (1992): Enzymtechnologie. Springer, Berlin Heidelberg New York.
- GRUNWALD, P. (1986): Enzyme technology: A practical topic in basic chemical education. J. Chem. Edu. **63** (9), 775-776.
- HARTMEIER, W. (1986): Immobilisierte Biokatalysatoren. Springer, Berlin Heidelberg New York.
- HAWCROFT, D. (1997): Simple studies on an immobilized enzyme. J. Biol. Edu. **31** (2), 141-145.
- HELBLING, F. (1996): Arzneimittel als Enzymhemmer. PdN-B **45** (4), 10-15.
- LABAHN-LUCIUS, C. (1991): Milch – ein Nahrungsmittel für alle? UB **15** (170), 32-37.
- LECHNER, K. (1976): Zum Kohlendioxidtransport im Säugerblut. Biuz **6** (5), 156-158.
- LUTZ, B. & V. MÜLLER (1991): Alginate – Schleimiges aus Braunalgen. PdN-Ch **40** (2), 26-30.
- MANN, T. & D. KEILIN (1940): Sulfanilamide as a specific inhibitor of carbonic anhydrase. Nature **146**, 164-165.
- MAREN, T. (1991): The links among biochemistry, physiology and pharmacology in carbonic anhydrase mediated systems. In: BOTRÉ, F., G. GROS & B. STOREY (Hrsg.): a.a.O., S. 186-207.
- MELDRUM, N. & F. ROUGHTON (1933): Carbonic anhydrase. Its preparation and properties. J. Physiol. **80**, 113-142.
- MUTSCHLER, E. (1983): Arzneimittelwirkungen. Wiss. Verlagsgesellschaft, Stuttgart.

- ORTEGA, N., M. D. BUSTO & M. PEREZ-MATEOS (1998): Optimisation of β -Glucosidase entrapment in alginate and polyacrylamide gels. *Bioresource Technology* **64**, 105-111.
- RIEDEL, E. (1988): *Anorganische Chemie*. de Gruyter, Berlin New York.
- RIKUS, U. (1998): Carboanhydrase – ein Enzym, viele Wirkungen. *UB* **22** (238), 41-47.
- SCHARF, K.-H. (1987): Trägerfixierte Zellen. *PdN-B* **36** (6), 37-38.
- SCHMIDT, R. & G. THEWS (1997): *Physiologie des Menschen*. Springer, Berlin Heidelberg New York.
- STEIN, K. (1996): Enzyme – Werkzeuge in der analytischen Chemie. *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **44**, 886-890.
- STRYER, L. (1996): *Biochemie*. Spektrum, Heidelberg Berlin Oxford.
- SUTTON, J., C. HOUSTON, A. MANSSELL & M. MCFADDEN (1979): Effect of acetazolamide on hypoxemia during sleep at high altitude. *New england journal of medicine* **301** (24), 1329-1331.
- TOSA, T. & T. SHIBATANI (1995): Industrial application of immobilized biocatalysts in japan. In: LEGOY, M.-D. & D. THOMAS (Hrsg.) : *Enzyme engineering XII*. *Annals of the New York Academy of Science* **750**, New York.
- WENK, H. & U. MAERZ (1987): Schulgeeignete Experimente zur Immobilisierung von Enzymen. *PdN-B* **36** (6), 16-21.
- WENK, H. & U. MAERZ (1989): The industrial use of enzymes – some classroom experiments. *Biotechnology Education* **1** (1), 23-27.

Verfasser: Ute Rikus und Prof. Dr. Manfred Sieger, Institut für Didaktik der Biologie,
Westfälische Wilhelms-Universität, Fliegerstr. 21, 48149 Münster.
E-mail: u.rikus@uni-muenster.de

Arbeitsmaterial 1

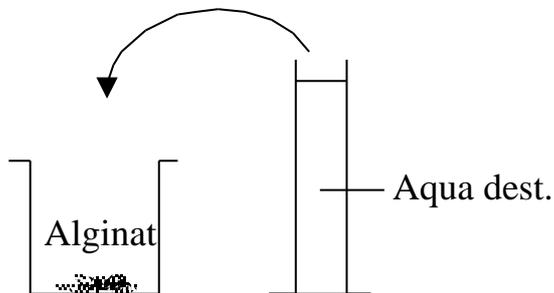
Immobilisierung von Carboanhydrase

Chemikalien

- 100ml 2%ige CaCl_2 -Lösung
- 0,75g Natriumalginat (z.B. Sigma)
- 0,25mg käufliche Carboanhydrase (z.B. Serva) in 1ml aqua dest.

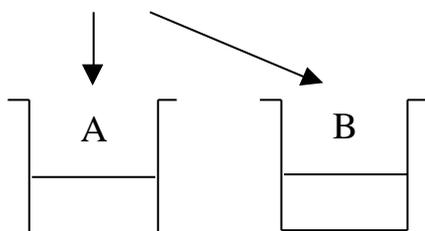
Geräte

- Messzylinder à 50ml
- 4 Bechergläser à 100ml
- 2 Siebe (z.B. Teesiebe)
- 2 Glasstäbe
- 2 Spatel
- 2 Einwegspritzen à 20ml
- Magnetrührer mit Rührfisch

Durchführung

23 ml aqua dest. zügig zu 0,75 g Alginat geben, mit dem Glasstab ca. 10 Minuten verröhren, 30 Min. quellen lassen und anschließend eventuell vorhandene Klumpen verröhren.

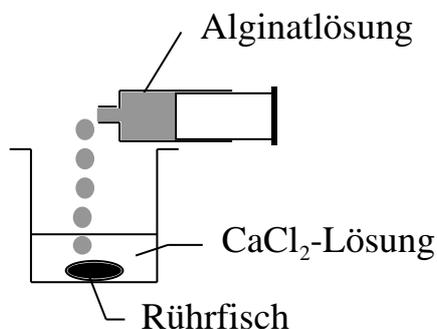
Das Alginatgel auf zwei Bechergläser verteilen und von nun an die beiden Lösungen getrennt behandeln.



Becherglas A: 1 ml Enzymlösung zugeben und einröhren

Becherglas B: (dient als enzymfreie Kontrolle): 1 ml aqua dest. zugeben und ebenfalls einröhren

Enzymfreie Alginatlösung nicht in Kontakt mit enzymhaltigen Geräten oder Lösungen bringen.



Die Gele jeweils in eine Spritze ohne Kanüle füllen und langsam in ein Becherglas mit CaCl_2 -Lösung tropfen lassen. Dabei die Spritze waagrecht halten, um die Bildung von größeren Tropfen zu begünstigen. Alginatkugeln 30 Min. auf dem Magnetrührer in der CaCl_2 -Lösung röhren lassen.

Anschließend die Alginatkugeln in jeweils ein Teesieb gießen und mehrmals mit aqua dest. abspülen.

Arbeitsmaterial 2 Bestimmung der Enzymaktivität von Carboanhydrase

Chemikalien

- **Substrat:** CO₂-reiches Mineralwasser, z. B. Bon Aqua®
- **Indikator:** Phenolrot-Lösung; bei pH-Wert < 6,8 gelb und bei pH-Wert > 8,4 rotviolett; 12,5 mg Phenolrot und 22 mg NaHCO₃ in 100 ml destilliertem Wasser auflösen
- **Puffer:** Hydrogencarbonat-Carbonat-Puffer-Lösung: 1,9 g NaHCO₃ und 4 g Na₂CO₃ mit destilliertem Wasser auf 100 ml auffüllen
- **Enzym:** Alginatkugeln mit Carboanhydrase
- **Kontrolle:** Enzymfreie Alginatkugeln

Herstellung der Alginatkugeln: s. Arbeitsmaterial 1

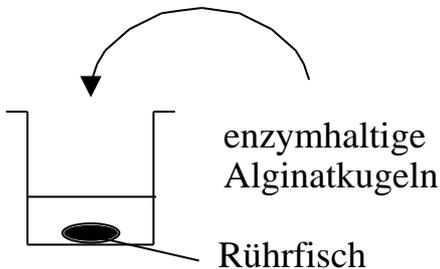
Geräte

- 2 Bechergläser à 100 ml
- Magnetrührer mit zwei Rührfischen
- Stoppuhr
- 2 Messpipetten à 5 ml
- Messzylinder à 50 ml

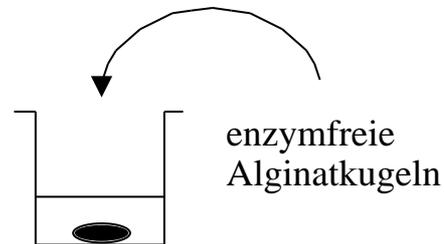
Vorbereitung

In 2 Bechergläser (A und B) jeweils 5 ml Phenolrotlösung und 2,5 ml Pufferlösung geben und einen Rührfisch hinzufügen. Anschließend beide Ansätze getrennt behandeln und die entsprechenden Alginatkugeln zugeben.

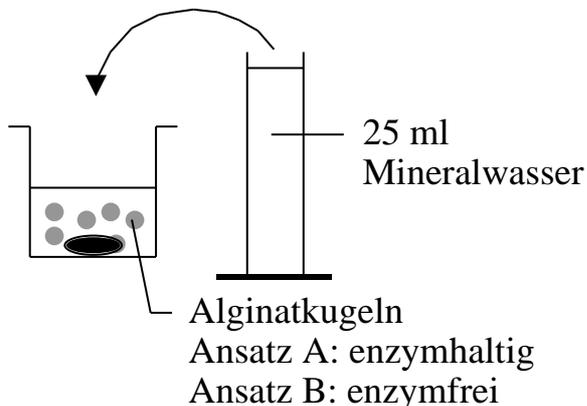
Becherglas A:



Becherglas B:



Durchführung



In die Bechergläser auf dem Magnetrührer nacheinander unter Rühren jeweils 25 ml Mineralwasser einfließen lassen und die Zeit von Beginn der Mineralwasserzugabe bis zum Farbumschlag stoppen.

Arbeitsmaterial 3**Hemmung der Carboanhydraseaktivität****Chemikalien**

- **Substrat:** CO₂-reiches Mineralwasser, z. B. Bon Aqua®
- **Indikator:** Phenolrot-Lösung
- **Puffer:** Hydrogencarbonat-Carbonat-Puffer-Lösung,
- **Inhibitor:** 1 ml 0,025 %ige Acetazolamid-Lösung
- **Enzym:** 2fache Menge der carboanhydrasehaltigen Alginatkugeln (s. Arbeitsmaterial 1)

Herstellung der Indikator- und Pufferlösung:
s. Arbeitsmaterial 2

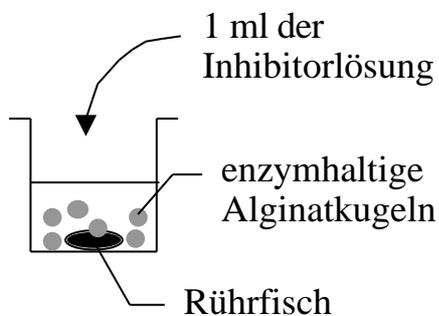
Geräte

- 2 Bechergläser à 100 ml
- Magnetrührer mit zwei Rührfischen
- Stoppuhr
- 2 Messpipetten à 5 ml
- Messzylinder à 50 ml

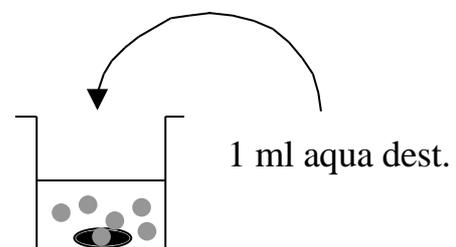
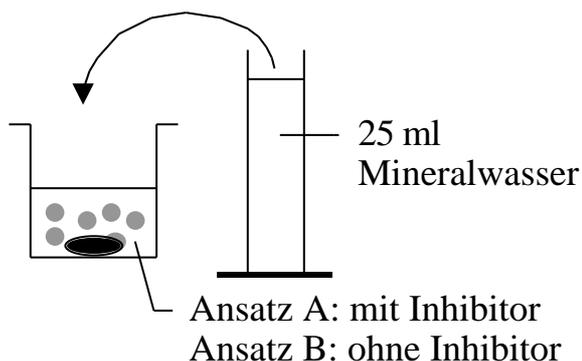
Vorbereitung

In 2 Bechergläser (A und B) jeweils 5 ml Phenolrotlösung und 2,5 ml Pufferlösung geben und einen Rührfisch hinzufügen. Nun die enzymhaltigen Alginatkugeln gleichmäßig auf beide Ansätze verteilen. Anschließend entsprechend der Darstellung beide Ansätze getrennt behandeln.

Becherglas A:



Becherglas B:

**Durchführung**

In die Bechergläser auf dem Magnetrührer nacheinander unter Rühren jeweils 25 ml Mineralwasser einfließen lassen und die Zeit von Beginn der Mineralwasserzugabe bis zum Farbumschlag stoppen.