

Einige einfache Enzymversuche

Enzyme sind die Katalysatoren nahezu aller Stoffwechselfvorgänge. Es sind stets Proteine (Eiweißkörper). In jeder einzelnen Zelle ist eine Vielzahl von Enzymen enthalten. Der Stoffwechsel ist Grundlage des gesamten Zellgeschehens, auch der Teilung und Differenzierung von Zellen, und liefert damit letztlich die Basis für das Verständnis morphologischer Vorgänge. Daraus erhellt die außerordentliche Bedeutung der Untersuchung von Enzymen. Auch im Unterricht sollten Versuche mit Enzymen einen gebührenden Platz einnehmen. Nun sind zahlreiche relativ einfache Enzymversuche beschrieben worden. Dennoch gibt es manche Gebiete der Enzymchemie, für die

bisher kaum einfache, auch für Schülerübungen geeignete Experimente vorliegen. Im Folgenden seien daher einige Versuche dargestellt, die teils nicht allgemein bekannt sind, teils neu entwickelt wurden, und die möglicherweise eine Lücke im Angebot einfacher Experimente schließen können. Die einzelnen Versuche stehen in keinem ursächlichen Zusammenhang miteinander.

Enzymtest mit Hilfe des Geschmackssinnes

Zur Einführung in die Untersuchung von Enzymen ist ein Versuch ganz ohne Geräte geeignet, der hier in Anlehnung an die An-

gaben von TANG beschrieben wird. Erforderlich sind nur Papaya-Früchte (*Carica papaya*), die bei uns in Delikateswaren-Geschäften häufig zu erhalten sind. Eine Frucht enthält bis zu mehrere hundert Samen. In diesen ist ein Senfölglycosid enthalten, das Glucotropaeolin genannt wurde. Dieselbe Verbindung kommt nämlich auch in der Kapuzinerkresse (*Tropaeolum maius*) vor. Senfölglycoside oder Glucosinolate treten in verschiedenen Pflanzenfamilien auf. Besonders bekannt sind in dieser Hinsicht die Kreuzblütler, deren charakteristischer Geruch, wie er vor allem beim Zerreiben von Pflanzenteilen auftritt, durch die Spaltung der Senfölglycoside zustande kommt. Dabei wird der Zuckerrest der Verbindung abgespalten und das Senföl freigesetzt. Diese Reaktion wird durch ein Enzymgemisch katalysiert, das man als Myrosin bezeichnet hat (s. unten).

In den Papaya-Samen ist das Senfölglycosid vor allem im Endosperm, dem Speichergewebe im Innern des Samens, enthalten. Myrosin findet sich dagegen vorwiegend im äußeren, gelatinösen Teil der Samenschale. Unter dem Mikroskop erkennt man den zweischichtigen Aufbau der Samenschale (vgl. Bild 1): der äußere Teil besteht aus parenchymatischen, dünnwandigen Zellen. Er entsteht aus Teilen des äußeren Integuments und wird als Sarkotesta bezeichnet. Der innere Teil ist wesentlich härter. Er heißt Sklerotesta oder Endotesta. Diese besteht aus mehreren Schichten, die äußerste ist kleinzellig und in der Regel dunkel gefärbt. Darunter liegen große Zellen mit Calciumoxalat-Kristallen und eine Steinschicht (LINDNER).

Versuchsdurchführung

Man entnimmt aus dem Fruchtfleisch einen Papaya-Samen, entfernt den äußeren Teil der Samenschale (die Sarkotesta) und spült gut mit Wasser ab. Dann zerschneidet man den Samen und stellt den Geschmack des Sameninnern (Endosperm) mit der Zungenspitze fest. Er ist mit süßlich bis schwach bitter zu beschreiben. Beim Kauen eines Endosperm-Stückchens tritt ganz langsam der scharfe Geschmack des Senföls auf, da auch im Endosperm geringe Mengen von Myrosin enthalten sind. Nach diesem ersten Versuchsteil wird der Mund gut ausgespült. Dann bringt man einen neuen, diesmal vollständigen Samen (also mit der Sarkotesta) in den Mund und bricht die gelatinöse Schicht mit den Schneidezähnen auf. Diese

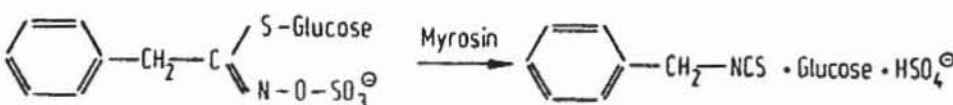
Schicht erweist sich als nahezu geschmacklos. Nun beißt man den Samen durch. Sehr rasch tritt ein brennend scharfer Senfölgeschmack auf, da jetzt das Enzym der Samenschale unmittelbar mit dem Senfölglycosid zusammenkommt.

Erhitzt man intakte Papaya-Samen zwei Minuten lang in kochendem Wasser, so beobachtet man beim Kauen eines intakten Samens praktisch keinen Senfölgeschmack mehr. So kann die Hitzelabilität des Enzyms nachgewiesen werden.

Nebenbei sei erwähnt, daß die Papaya-Pflanze in ihrem Milchsaft ein Enzym führt, das technisch gewonnen wird. Es handelt sich um das Papain, das proteinspaltend wirkt. Papain dürfte unter allen Enzymen höherer Pflanzen das am genauesten untersuchte sein.

Isolierung eines einzelnen Enzyms

Die Isolierung bzw. Anreicherung eines Enzyms war bis vor wenigen Jahren nicht als einfacher Versuch durchzuführen. Dies hat sich mittlerweile geändert durch die Möglichkeit, die Methode der Gelchromatographie anzuwenden. Hierzu werden hier zwei Experimente beschrieben, eines davon geht auf eine Arbeit von MELIUS zurück. An Geräten werden nur eine kleine Zentrifuge und eine 50 ml-Bürette benötigt. Ferner ist Sephadex-Gel erforderlich. Hierbei handelt es sich um ein Polysaccharid (Dextran-)Gel mit Poren. Läßt man ein Gemisch von Makromolekülen, wie es alle Proteine sind, durch das Gel hindurchwandern, so werden kleine Moleküle rasch in die Poren eindiffundieren, größere langsamer, ganz große gar nicht (sie werden „ausgeschlossen“). Spült man dann mit Puffer durch die Gelschicht hindurch, so wandern die ganz großen Moleküle am raschesten, kleinere folgen entsprechend ihrem Molekulargewicht (genauer: entsprechend dem Logarithmus des Molekulargewichts) jeweils langsamer. Käuflich sind nun verschiedene Sephadexgele in trockenem Zustand¹. Sie unterscheiden sich durch die Porengröße. Die im Folgenden untersuchten Enzyme haben sehr hohe Molekulargewichte, daher sind Gele mit großen Poren erforderlich. Dies sind die Sorten G-150 und G-200. Gearbeitet wird jeweils beim pH-Optimum des gewünschten Enzyms mit Hilfe eines für dieses Enzym geeigneten Puffers.



Senfölglycosid

hier: Glucotropaeolin

Senföl

Als erstes Beispiel diene die Anreicherung von Invertase aus Hefezellen. Die Invertase ist an der Oberfläche der Zellen lokalisiert, ihre Aufgabe ist es, Saccharose (Rohrzucker) des Nährmediums der Hefe zu spalten, um die Spaltprodukte Glucose und Fructose zum Abbau bereitzustellen. Die Hefe-Invertase hat ein Molekulargewicht von ca. 270 000.

Versuchsdurchführung

Zunächst muß eine funktionsfähige Gel-Säule hergestellt werden. Hierzu läßt man 1–1,5 g Sephadex G-200 in 0,1 molarem Natriumacetatpuffer von pH 4,8 3 Tage lang quellen. (Herstellung des Puffers: 60 ml 1 n-NaOH mit 100 ml 1 n-Essigsäure versetzen, mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen.) Dann schwemmt man das Gel mit Hilfe von Puffer möglichst luftblasenfrei in eine 50 ml-Bürette ein. An die Basis der Bürette bringt man zuvor einen Glaswollestopfen. Über dem eingeschwemmten Gel (Gelbett) sollen etwa 1–2 ml Puffer stehen bleiben. Wichtig ist, daß man die Säule oder Teile davon nie trocken laufen läßt, da sonst das Gelbett reißt und die Säule neu hergestellt werden muß.

Mittlerweile hat man einen Hefeextrakt hergestellt. Hierzu werden 1 g Trockenhefe mit 5 ml etwa 0,8%iger Natriumbicarbonatlösung zu einem Brei verrührt. Dann läßt man 24 Stunden lang bei 30–35° C stehen und zentrifugiert danach scharf ab. Die Invertase befindet sich in dem bräunlichen Überstand.

Nun läßt man den Puffer der Säule genau bis zur Geloberfläche abtropfen und bringt 2–3 ml Hefeextrakt mit einer kleinen Pipette vorsichtig so auf das Gel auf, daß dieses nicht aufgerührt wird. Man läßt den Extrakt eindringen und hält dann während des Versuchs durch periodische Pufferzugabe den Pufferspiegel jeweils etwa 2–3 ml über der Geloberfläche. Die von der Säule abtropfende Flüssigkeit wird in Fraktionen von 2 bis 4 ml aufgefangen. Nach einer Zeit von 1½ bis 3 Stunden tritt die Invertase aus. In der Regel ist dies an einer leichten Trübung oder einem Opaleszieren des Eluats² zu erkennen. Danach folgen andere Proteine mit zum Teil bräunlicher Farbe. Wenn bräunliche Lösung austritt, ist die Invertase bereits vollständig eluiert, so daß der Versuch beendet werden kann. Die ganze Gelchromatographie kann bei Zimmertemperatur ausgeführt werden, da die Invertase ein wenig temperaturempfindliches Enzym ist.

Die Invertase muß nun nachgewiesen werden. Eine relativ einfache, wenn auch nicht sehr genaue Möglichkeit ist die Durchführung der Fehling-Reaktion auf reduzierende Zucker³. Man entnimmt aus den einzelnen Fraktionen je 0,1 ml und pipettiert diese zu testende Lösung in je 2 ml ver-

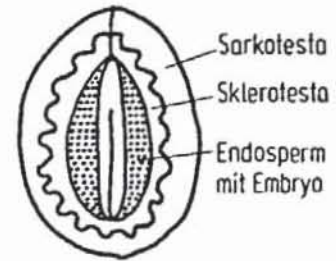
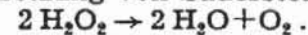


Bild 1: Längsschnitt durch einen Samen der Papaya (*Carica papaya*).

dünnte Saccharoselösung. Dann läßt man bei Zimmertemperatur 20 Minuten stehen und führt anschließend die Fehling-Probe durch. Zum Vergleich ist jeweils eine Blindprobe mit destilliertem Wasser anstelle der Saccharoselösung anzusetzen, da viele Proteine eine schwache Fehling-Reaktion zeigen. In den Fraktionen, die Invertase enthalten, tritt eine sehr starke positive Reaktion auf.

Natürlich kann das Entstehen von Glucose und Fructose auch durch beliebige andere Nachweise gezeigt werden, so etwa durch Papier- oder Dünnschichtchromatographie, durch Farbreaktion mit Dinitrosalicylsäure usw. — Die angereicherte Invertase kann zu weiteren Experimenten mit Enzymen herangezogen werden (z. B. Stabilität gegen Hitze, Kälte, pH-Wert-Veränderung, Ionen; Messung der Geschwindigkeit der enzymkatalysierten Reaktion usw.).

Ebenso wie Invertase kann das Enzym Katalase aus Kartoffelknollen leicht angereichert werden. Die Katalase besitzt ein Molekulargewicht von etwa 250 000 und ein pH-Optimum von 7. Sie tritt beim Auspressen von Kartoffelstückchen zu einem erheblichen Teil in den Preßsaft über, da sie in sehr kleinen Zellpartikeln, den Peroxisomen, enthalten ist. Allerdings ist das Enzym insgesamt weniger stabil als die Invertase. Um eine gute Ausbeute an Katalase zu erhalten, sollte man daher die Gelchromatographie bei möglichst tiefer Temperatur (optimal sind +4° C) durchführen. Wir haben aber auch bei Zimmertemperatur noch brauchbare Ergebnisse erhalten. Eine Funktion der Katalase besteht in der Spaltung von Wasserstoffperoxid unter Freisetzung von Sauerstoff:

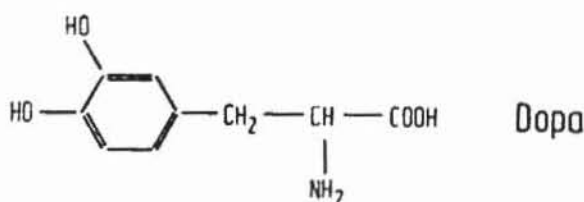


Dadurch kann das bei einigen Stoffwechselfvorgängen entstehende Wasserstoffperoxid — ein starkes Zellgift — rasch unschädlich gemacht werden. Zur Durchführung des Versuchs stellt man zunächst eine Sephadex-G-200-Säule mit Hilfe von 1/15 molarem Phosphatpuffer von pH=7 her. Dieser Puffer dient dann auch zur Elution nach dem Aufbringen von ca. 3 ml Kartoffelpreßsaft. Zur Herstellung gebrauchsfertigen Puffers mischt man von den käuflichen Phosphatpuffer-Stammlösungen 1 Teil

KH_2PO_4 mit 1,55 Teilen Na_2HPO_4 . Der Nachweis der eluierten Katalase in den aufgefundenen Fraktionen kann mit verdünntem Wasserstoffperoxid erfolgen. Man setzt zu 2 ml etwa 0,3%iger Wasserstoffperoxidlösung 0,2 ml der jeweiligen Fraktion zu. Befindet sich aktive Katalase im Eluat, so tritt infolge der Sauerstoffentwicklung ein deutliches Schäumen auf. In manchen Fällen hört dieses allerdings bald wieder auf, insbesondere wenn die Wasserstoffperoxid-Konzentration relativ hoch war.

Syntheseleistung eines Enzyms

Die meisten leicht zu demonstrierenden Enzymreaktionen sind Spaltungsreaktionen, so auch alle bisher hier beschriebenen. Daher mag es von Interesse sein, eine Synthese-Reaktion näher zu betrachten. Das erforderliche Enzym — oder richtiger Enzymgemisch — ist im Kartoffelpreßsaft enthalten. Es handelt sich um die Phenoloxidase(n). Diese Enzyme wirken, wie der Name ausdrückt, oxidierend auf Phenole. (Phenole sind aromatische Verbindungen, die mindestens eine OH-Gruppe am aromatischen Ring aufweisen.) Dabei entstehen höher oxidierte Verbindungen, die dann häufig durch Kondensationsreaktionen gefärbte Polymere bilden. Dadurch kommt die braune Verfärbung an Schnittflächen bei Kartoffeln, Äpfeln und vielen anderen pflanzlichen Materialien, häufig auch von Herbarpflanzen, zustande. Die braun bis schwarz gefärbten Verbindungen werden als Melanine bezeichnet. Diese Polymere enthalten in der Regel ungepaarte Elektronen, besitzen also Radikalcharakter. Damit hängt ihre intensive Farbe zusammen. Bei den meisten höheren Pflanzen erfolgt die Melaninbildung ausgehend von komplizierten Phenolkörpern, die als Catechine bezeichnet werden. Die gebildeten Polymeren heißen daher Catechin-Melanine. Daneben gibt es Melanine, die vorwiegend von der Aminosäure Dihydroxyphenylalanin = Dopa aus gebildet werden:



(Im Formelbild sind die beiden phenolischen OH-Gruppen am Ring zu sehen.) Diese Dopa-Melanine treten vor allem bei Tieren auf; sie sind wichtige Farbstoffe der dunkelgefärbten Chitinpanzer vieler Insekten. Bei Pflanzen können sie naturge-

mäß nur bei Arten vorkommen, die Dopa enthalten. Es sind dies vor allem einige Hülsenfrüchtler, die auch dadurch auffallen, daß sie im Herbarium eine intensive Schwarzfärbung annehmen (*Cytisus nigricans*, der Schwarzwerdende Geißklee, führt danach sogar seinen Namen). Mit Hilfe von käuflichen Dopa⁴ läßt sich die Melaninbiosynthese leicht im Reagenzglas durchführen.

Versuchsdurchführung

Man stellt eine verdünnte Dopa-Lösung her und setzt frischen Kartoffelpreßsaft zu. Nach wenigen Minuten beobachtet man eine tiefrote Farbe. Sie kommt zustande durch die beginnende Polymerisation unter Ausbildung freier Radikale. Nach einigen Stunden beginnt die Abscheidung schwarzer Flocken von hochpolymerem und daher nicht mehr löslichem Dopa-Melanin. — Apfelpreßsaft, der ebenfalls Phenoloxidasen enthält, ist für den Versuch nicht geeignet, da der hohe Säuregehalt in diesem Fall die Reaktionen stört.

Literaturhinweise:

1. LINDNER, M. W.: Deutsche Apotheker-Ztg. 111, 1086—89 (1971).
2. MELIUS, P.: J. Chem. Educ. 48, 765—766 (1971).
3. TANG, C. S.: J. Chem. Educ. 47, 692 (1970).

Erläuterungen:

- ¹ Sephadex ist in der BRD erhältlich bei der Deutschen Pharmacia GmbH, 6 Frankfurt 50, Kurhessenstraße 95. Sephadex liefert auch die Firma CARL ROTH, Karlsruhe, Postfach 210 980. 25 g G 200 kosten ca. 50,— DM.
- ² Eluat: durch Elution herausgelöster Stoff in Lösung. Eluieren heißt, einen Stoff von einem Adsorbens ablösen.
- ³ Fehlingsche Lösung: Reagenz zum Nachweis von Traubenzucker und Aldehyden.
Lösung I: In 500 cm³ destilliertem Wasser löst man 17,5 g blaue Kupfersulfatkristalle.
Lösung II: In 500 cm³ destilliertem Wasser löst man 90 g Selignettsalz und 30 g festes Natriumhydroxid.
Die beiden Stammlösungen sind jahrelang haltbar. Vor einem Nachweis gleßt man gleiche Teile der Lösungen I und II zusammen, wobei eine tiefblaue Lösung entsteht. Zum Traubenzuckernachweis mischt man mit der zu prüfenden Substanz oder Lösung und erhitzt. Enthält sie Traubenzucker, so entsteht ein gelbroter bis rotbrauner Niederschlag von Kupfer(I)oxid.
- ⁴ Dopa kann ebenfalls von CARL ROTH bezogen werden. 5 g kosten ca. 11,— DM.

Verfasser: Doz. Dr. Ulrich Kull, Biologisches Institut der Universität Stuttgart, 7 Stuttgart 60, Ulmer Straße 227.