

# Enzymkinetik, Ligandenbindung und Enzymtechnologie

Labor- und Praktikumsversuche

**Hans Bisswanger, Rainer Figura, Klaus Möschel, Meryem Nouaimi**

**2. überarbeitete Auflage**

Shaker Verlag  
Aachen 2001

---

## Inhaltsverzeichnis

	<b>Vorwort</b>	vi
	<b>Abkürzungen und Symbole</b>	vii
<b>1</b>	<b>Einführung</b> <b>(Hans Bisswanger)</b>	<b>1</b>
1.1	Analyse von Enzymreaktionen	2
1.2	Analyse komplexer Reaktionsmechanismen	4
1.3	Prinzip von Bindungsmessungen	5
1.4	Auswertung von Bindungsmessungen	7
1.5	Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit, Optimierung und Fehlerquellen	11
1.6	Apparative Aspekte	16
1.7	Protokolle	17
1.8	Laborsicherheit	18
1.9	Literatur	18
<b>2</b>	<b>Bindungsmessungen und spektroskopische Titrationsen</b> <b>(Hans Bisswanger)</b>	<b>19</b>
2.1	Gleichgewichtsdialyse	19
2.2	Differenzspektroskopie	23
2.3	Fluoreszenzspektroskopie	27
<b>3</b>	<b>Kinetische Methoden</b> <b>(Hans Bisswanger)</b>	<b>31</b>
3.1	Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit	31
3.2	Irreversible Hemmung	34
3.3	Bisubstratkinetik	36
3.4	Hemmkinetik	39
3.5	pH- und Temperatur-Abhängigkeit	41
3.6	Kooperativität	44
3.7	Stopped-Flow-Kinetik	46
<b>4</b>	<b>Enzymatische Verfahren in der Biotechnologie</b>	<b>51</b>
4.1	Kovalente Immobilisierung an synthetische Polymere (Klaus Möschel, Meryem Nouaimi)	52
4.1.1	Kovalente Immobilisierung von Enzymen an Polyamid	52
4.1.2	Immobilisierung an Polyamid durch O-Alkylierung der Säureamidgruppe	53
4.1.3	Immobilisierung an Polyamid über die partiell hydrolysierte	

Aminogruppe	56
4.1.4 Immobilisierung an Polyamid über die partiell hydrolysierte Carboxylgruppe	58
4.1.5 Kovalente Immobilisierung von Enzymen an Polyester	58
4.1.6 Immobilisierung über saure Hydrolyse und Aktivierung mit Dicyclohexylcarbodiimid	59
4.1.7 Aktivierung über Tosylchlorid	60
4.1.8 Aktivierung über Carbonyldiimidazol	61
4.2 Analytik immobilisierter Enzyme (Klaus Möschel)	62
4.2.1 Proteasetests	62
4.2.2 Anson-Test	63
4.2.3 Caseintest	64
4.2.4 Azocaseintest	65
4.2.5 Trypsintest mit N-Benzoyl-L-arginin-p-nitroanilid (BAPNA)	65
4.2.6 Thermolysintest mit N-(3-[2-Furyl]-acryloyl)-glycin-L-leucinamid (FAGLA)	66
4.2.7 Bestimmung von löslichem und immobilisierten Protein	67
4.2.8 BCA-Test	67
4.2.9 Ninhydrintest	69
4.2.10 Modifizierter Ninhydrintest zur Proteinbestimmung ohne Hydrolyse	70
4.2.11 Proteinbestimmung mit 2-Hydroxy-1-naphthaldehyd	71
4.2.12 Charakterisierung immobilisierter Enzyme	71
4.2.13 Bestimmung der Aktivität immobilisierter Enzyme im Enzymreaktor	73
4.3 Kovalente Bindung an Glas (Rainer Figura)	75
4.3.1 Kovalente Bindung an kontrolliert poröses Glas	75
4.3.2 Kovalente Bindung an nichtporöses, natürliches Glas	80
4.4 Einlagerung in Polyacrylamid (Rainer Figura)	86
4.5 Einschluss in Nylon (Rainer Figura)	90
4.6 Adsorption an kontrolliert poröses Glas (Rainer Figura)	93
<b>5 Biotechnologische Anwendungen (Rainer Figura)</b>	<b>95</b>
5.1 Racematspaltung und Kinetik	95
5.1.1 Einführung	95
5.1.2 Veränderung der Enzymkinetik durch das stereochemisch „falsche“ Substrat	95
5.1.3 Produkthemmung	96
5.1.4 Strukturabhängigkeit der Enzym-Substrat-Wechselwirkung	97

5.1.5	Beeinflussung der Enzymkinetik durch die Zusammensetzung des Lösungsmittels	98
5.1.6	Auswirkungen von Reaktionsparametern, wie pH und Temperatur	99
5.1.7	Abhängigkeit der Standzeit von der Immobilisierungsmethode und der Reaktionsführung	99
5.2	Alkohol-Dehydrogenase-abhängige Synthesen in Bioreaktoren	101
5.2.1	Einführung	101
5.2.2	Durchführung	102
5.2.3	Auswertung	102
6	<b>Assays (zu Abschn. 4.3-4.6 und 5.1-5.2) (Rainer Figura)</b>	104
6.1	Aminoacylase	104
6.2	Formiat-Dehydrogenase	106
6.3	Alkohol-Dehydrogenase und Lactat-Dehydrogenase	106