

Zur Beeinflussung der Aktivität von adsorptiv auf eloxierten Aluminiumblechen immobilisierter Urease durch die Anodisier-Bedingungen

The Influence of Anodizing Conditions on the Activity of Urease Immobilized to Anodized Sheet Aluminium

P. Grunwald, W. GunBer, K. P. Pfaff, R. Krause und K. Lutz

Institut für Physikalische Chemie der Universität Hamburg, Laufgraben 24, D-2000 Hamburg 13

Z. Naturforsch. **35 c**, 819–823 (1980); eingegangen am 15. Februar/6. Mai 1980

Immobilized Enzymes, Urease, Anodized Sheet Aluminium, Surface Structure, Scanning Electron Microscopy

The activity of urease immobilized by adsorption on anodized sheet aluminium strongly depends on the method chosen for preparation of these carriers. If oxalic acid is applied as electrolyte, only the anodizing temperature significantly influences the activity of the preparations. In case of the well-known GS process, however, the activity is not only affected by the temperature, but also by other conditions of anodizing, for example the current density and the electrolyte concentration. For both methods the correlation between the topography of the carrier surfaces and the activity of enzyme immobilized to the surface is described.

Einleitung

Die Bedeutung trägergebundener Enzyme hat in den letzten Jahre ständig zugenommen [1]. Als Trägermaterialien werden neben solchen organischer Natur auch Metalloxide wie ZnO, MgO, NiO, SiO₂ sowie Aluminiumhydroxide [2, 3] eingesetzt. Die Fixierung von Proteinen an wasserunlöslichen Trägern geschieht entweder über eine unter schonenden Bedingungen durchzuführende chemische Reaktion zwischen Enzym und Träger oder aber adsorptiv [4]. Neben der präparativen Fragestellung sind – z. B. im Zusammenhang mit der „Biologisierung nicht biologischen Materials“ [5] – Kenntnisse über die Art der Wechselwirkung zwischen Protein und Festkörper von Interesse, die wesentlich auch von der Beschaffenheit der Oberfläche des Adsorbens bestimmt wird. Eloxierete Aluminiumbleche, die sich als Träger für Enzyme eignen [6], sind bezüglich ihrer Oberflächeneigenschaften besser definiert als Oxid- oder Hydroxidpulver. Andererseits reagieren diese Präparate in ihren katalytischen Eigenschaften empfindlich auf die Oberflächenstruktur der Eloxalschicht, die insbesondere von der Elektrolytsorte, dessen Konzentration, den Stromspannungsbe-

dingungen während des Eloxierens, der Eloxierdauer, der Eloxieretemperatur und nicht zuletzt auch von der Vor- und Nachbehandlung der Aluminiumbleche sowie ihrer Reinheit abhängig ist.

Experimentelles

Als Ausgangsmaterial verwendeten wir Bleche aus Reinstaluminium (Fa. Merck, p. A.), die nach Reinigen mit Aceton zwei Minuten lang in 15%iger NaOH gebeizt wurden. Nach gründlichem Wässern wurden sie in Oxalsäurelösungen unterschiedlicher Konzentration bzw. in 26%iger Schwefelsäurelösung [6] nach dem Gleichstrom/Schwefelsäure(G/S)-Verfahren [7] 30 Minuten lang eloxiert. Als Kathoden benutzten wir Graphit- und Glaskohleelektroden.

Für die Adsorptionsuntersuchungen erwies sich ein Präparat von Merck (Art. 8479) wegen seiner vollständigen Wasserlöslichkeit als am geeignetsten. Die Belegung der ca. 12 cm² großen, zylindrisch gebogenen Bleche wurde unter Rühren bei 25 °C in 20 ml einer Enzymlösung, die 0,5 mg Urease/ml bidestilliertes Wasser enthielt, durchgeführt. Diese Enzymkonzentration gewährleistete eine Gleichgewichtseinstellung im Sättigungsbereich der Adsorptionsisotherme. Die Adsorptionsdauer betrug in allen Fällen 30 Minuten. Längere Adsorptionszeiten hatten auf die Aktivität des Adsorbats keinen er-

Sonderdruckanforderungen an Dr. P. Grunwald.

0341-0382/80/0900-0819 \$ 01.00/0



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

kennbaren Einfluß mehr. Unmittelbar danach wurden die belegten Bleche 2 Stunden lang in bidestilliertem Wasser gewässert, wobei das Wasser in jeweils gleichen Zeitabständen fünfmal erneuert wurde. Die auf den eloxierten Al-Blechen danach noch vorhandene Urease ist möglicherweise irreversibel gebunden; entsprechende Hinweise für eine derartige Wechselwirkung von Aluminiumhydroxiden und Silikaten mit Urease und anderen Proteinen finden sich auch in der Literatur [2, 8, 9].

Die Aktivität der mit Urease belegten Al-Bleche bestimmten wir konduktometrisch [10] mit Hilfe von Leitfähigkeitsmeßbrücken (LF 39 der Fa. WTW bzw. PW 9501 der Fa. Philips) in einem thermostatisierten Meßgefäß bei einer Temperatur von 25 °C. Die verwendeten Pt-Doppelelektroden hatten eine Zellkonstante von $0,6 \text{ cm}^{-1}$. Die Substratkonzentration betrug $0,05 \text{ mol/l}$, das Reaktionsvolumen 50 ml. Die Bleche tauchten während der Messung ortsfest und in ca. 1 cm Abstand von der Elektrode in die Lösung. Von einer Pufferung des Reaktionsmilieus während der Aktivitätsbestimmung der Bleche wurde abgesehen, da die Anwesenheit von Fremdionen die Eigenschaften des Adsorpts beeinflussen kann. Ein weiteres Argument für eine solche Vorgehensweise ist die Tatsache, daß auch die kinetischen Daten der gelösten Urease stark von der Ionenstärke und Ionenkonzentration des jeweils verwendeten Puffers abhängig sind, wie u. a. die vielen publizierten und voneinander abweichenden Michaeliskonstanten verdeutlichen [11]. Für das von uns verwendete Urease-Präparat erhielten wir mit der Methode der konduktometrischen Aktivitätsbestimmung einen K_M -Wert von $2,75 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$. Dieser Wert stimmt praktisch überein mit Untersuchungen von Harmon

et al. [12], die mit Phosphatpuffern verschiedener Kapazität gearbeitet hatten und für den auf die Phosphatkonzentration $c = 0$ extrapolierten K_M -Wert $3 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ erhielten.

Die Auswertung der Umsatz/Zeit-Schreiberkurven liefert die auf die Zeit $t = 0$ extrapolierte Zunahme der Produktkonzentration je Zeiteinheit. Sie ist direkt proportional zur Anfangsreaktionsgeschwindigkeit v_0 ; die Aktivitäten sind deshalb in $\mu\text{S/min}$ angegeben und auf 1 cm^2 des Adsorbens bezogen.

Ergebnisse und Diskussion

Um die bezüglich ihrer Eignung als Träger für Urease optimalen Darstellungsbedingungen der nach dem Oxalsäure-Verfahren eloxierten Al-Bleche zu bestimmen, wurde für die drei Variablen Elektrolytkonzentration, Eloxier Temperatur und Stromdichte eine faktorielle Versuchsplanung durchgeführt. Bei der Prüfung der Parameter auf Signifikanz zeigte sich bereits, daß nur die Temperatur mit 95% Wahrscheinlichkeit die Aktivität der nach dem Eloxieren mit dem Enzym belegten Bleche beeinflusst. Die Optimierung des Verfahrens nach der Methode des steilsten Anstiegs [13] ergibt, daß – ausgehend vom Basisversuch (7,5 Gew.-% Oxalsäure, 33,5 °C, $3,05 \text{ A/dm}^2$) – eine stetige Temperaturerhöhung bei abnehmender Stromdichte und geringfügig sich verringender Oxalsäurekonzentration zu Präparaten mit maximaler Enzymaktivität führt. Dieser Sachverhalt ließ sich experimentell bestätigen. Ein Auszug der Ergebnisse ist in Tab. I dargestellt. Mit den in Zeile 4 der Tabelle angeführten Versuchsbedingungen erhält man für die Aktivität rechnerisch

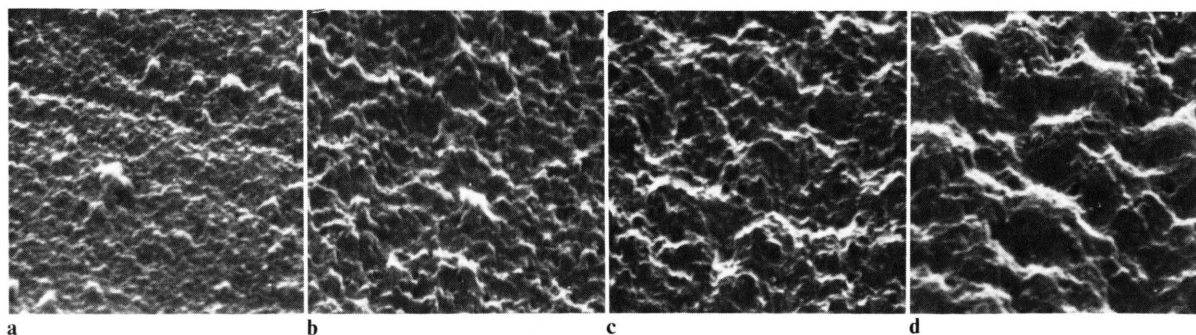


Abb. 1. REM-Aufnahmen von Eloxalschichten, die unter Verwendung von Oxalsäure als Elektrolyt hergestellt wurden. Versuchsbedingungen: siehe Tabelle I. Vergrößerung: $10\,000\times$.

Tab. I. Versuchsbedingungen für einige unter Verwendung von Oxalsäure als Elektrolyt hergestellte Eloxalschichten.

Messung Nr.	i [A/dm ²]	T_E [°C]	c_{H^+} [Gew. %]	Aktivität [μS/min]	REM (Abb.)
1	5,1	21	5,0	0,012	1 a
2	1,0	21	10,0	0,033	1 b
3	1,0	46	10,0	0,119	1 c
4	2,2	63	7,2	0,160	1 d
5	1,0	21,4	3,0	0,038	
6	5,1	22,4	3,0	0,002	
7	3,05	33,5	7,5	0,09	

Tab. II. Versuchsbedingungen für einige nach dem GS-Verfahren hergestellte Eloxalschichten.

Messung Nr.	i [A/dm ²]	T_E [°C]	Aktivität [μS/min]	REM (Abb.)
1	2,36	39	2,53	3 a
2	3,0	39,4	3,3	
3	3,9	40,1	5,74	3 b
4	5,0	39,8	4,56	
5	5,9	40,6	6,25	
6	7,0	41,4	10,11	3 c
7	8,1	41,2	19,6	
8	9,1	42	9,5	3 d
9	5,0	25	0,26	3 e
10	5,0	34,3	5,56	3 f
11	5,0	40,4	2,5	3 g
12	5,0	43	4,16	3 h

einen Wert von 0,15 μS/min. Eine Erhöhung der Stromdichte von 1 A/dm² auf 5 A/dm² bei einer mittleren Badtemperatur von 22 °C und einer Oxalsäurekonzentration von 3 Gew.-% führt dementsprechend zu einer Abnahme der Aktivität der mit Urease belegten Bleche von 0,038 auf 0,002 μS/min (s. Tab. I, Zeile 5 und 6). Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen in Abb. 1 a–d weisen auf einen Zusammenhang zwischen der Oberflächenbeschaffenheit der Präparate und deren Aktivität insofern hin, als hier Oberflächenvergrößerung und Aktivitätszunahme parallel verlaufen.

Im Gegensatz dazu ist die Aktivität der nach dem GS-Verfahren dargestellten und mit Urease belegten eloxierten Al-Bleche stark abhängig von der Stromdichte, wie dies in Abb. 2 zum Ausdruck kommt. Aktivitäten und Stromdichten eines jeden Meßpunktes sind Mittelwerte aus mehreren bei der jeweiligen Stromdichte eloxierten Al-Bleichen. Die mittlere Eloxier Temperatur betrug 40 ± 1 °C.

Oberhalb einer Stromdichte von 8,5 A/dm² nehmen die Aktivitäten der belegten Al-Bleche zu-

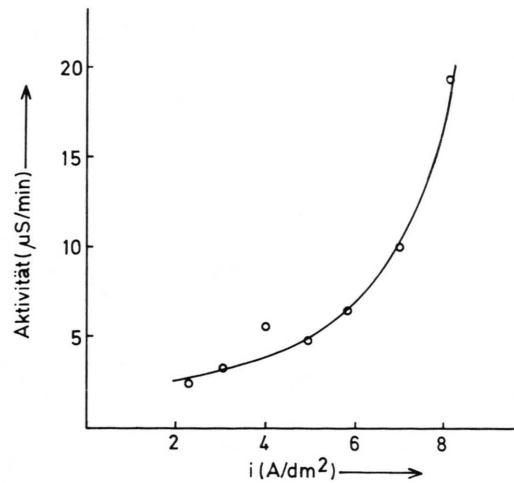


Abb. 2. Die Aktivität von mit Urease belegten Al-Bleichen, die bei verschiedenen Stromdichten nach dem GS-Verfahren eloxiert wurden.

nächst stark ab, um dann mit weiterer Erhöhung der Stromdichte erneut anzusteigen und einem Sättigungswert zuzustreben. Bei diesen hohen Stromdichten treten jedoch einige experimentelle Schwierigkeiten auf, weshalb gesicherte Aussagen auf den graphisch dargestellten Stromdichtebereich beschränkt sind. Aus Abb. 3 a–d ist der Einfluß der Stromdichte auf die Topographie der Hydroxidschichten zu erkennen; eine Erhöhung der Stromdichte (s. Tab. II, Messung Nr. 1–8) bewirkt bis hin zu i -Werten von 6 A/dm² eine Vergrößerung des Oberflächenmusters. Die bei tiefen Eloxier Temperaturen in Form von parallel zueinander verlaufenden äquidistanten Hydroxiderhebungen [6] noch gut erkennbare Walztextur ist bei 40 °C bereits stark aufgelockert. Beim Übergang zu höheren Stromdichten treten diese Hydroxiderhebungen zunehmend miteinander in Wechselwirkung und wachsen zu hohlraumähnlichen Zellen mit großporigem Zugang zusammen. Dieser Vorgang ist mit einer Verbesserung der Bindungseigenschaften dieser Bleche für das Enzym Urease verknüpft (s. Tab. II und Abb. 2). Da bereits die bei niedrigen Stromdichten dargestellten Eloxalschichten eine starke Strukturierung aufweisen, ist die Zunahme der enzymatischen Aktivität vermutlich weniger in einer Veränderung der Enzym/Festkörper-Wechselwirkung als vielmehr durch eine Erhöhung der Proteinkapazität über die auf der Oberfläche neu geschaffenen Hohlräume verursacht.

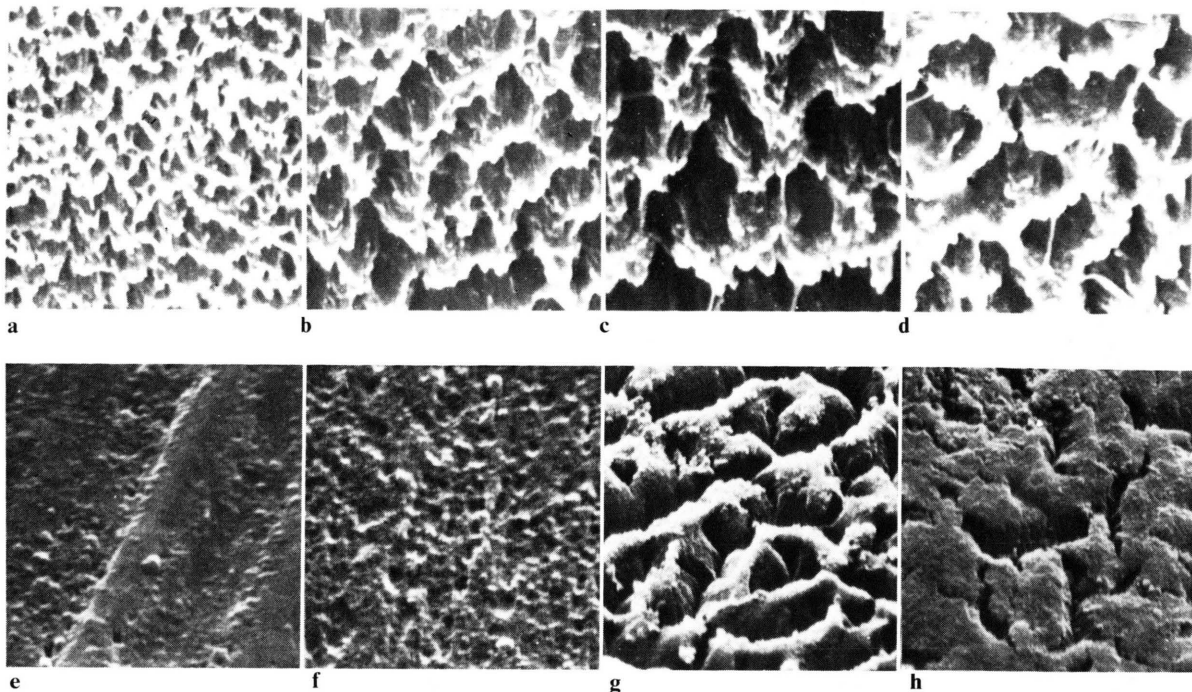


Abb. 3. REM-Aufnahmen von Eloxalschichten, die nach dem GS-Verfahren hergestellt wurden. Versuchsbedingungen: siehe Tabelle II. Vergrößerungen: 20 000 \times (3 a–d), 10 000 \times (3 e–g) und 3 000 \times (3 h).

Die für Stromdichten $i > 8,5 \text{ A/dm}^2$ zunächst signifikant abnehmende Enzymaktivität geht, wie auf Abb. 3d gut zu erkennen ist, mit der Vernetzung dieser Hohlräume einher, ein Befund, der erneut auf den Zusammenhang der Topographie des Adsorbens mit der Aktivität des Adsorpts verweist.

In Tabelle II (Messung Nr. 9–11) sind die Ergebnisse für den Einfluß der Eloxier Temperatur auf die Aktivität der mit der Urease belegten Bleche anhand von vier Beispielen exemplarisch wiedergegeben. Danach liegt die optimale Eloxier Temperatur unter den genannten Versuchsbedingungen bei etwa 35 °C. Der Unterschied in der Aktivität bei T_E -Werten von 25 °C und 34,5 °C hebt die Bedeutung dieses Parameters für das GS-Verfahren hervor. Die Rasteraufnahmen solcher Bleche lassen erkennen, daß im Gegensatz zu Stromdichteänderungen eine Variation der Temperatur deutliche Veränderungen der Oberflächenstruktur zur Folge hat. Die Abb. 3g stimmt im Grundmuster mit dem Oberflächentypus aus der 40 °C-Meßreihe überein (Abb. 3a–d). Die Oberflächenstruktur mit der größten resultierenden enzymatischen Aktivität (Abb. 3f) weist, ver-

glichen mit den anderen Blechen, keine ausgedehnten, sich teilweise periodisch wiederholenden Strukturelemente auf. Vielmehr besteht die Oberfläche aus einer Hydroxidschicht, die regelmäßig von Poren durchsetzt ist. Diese rasterelektronenmikroskopisch noch darstellbaren Poren haben Durchmesser zwischen $200 \text{ nm} > r_p > 20 \text{ nm}$, wobei solche mit einem Radius von $r_p < 50 \text{ nm}$ überwiegen.

Im Rahmen der gewählten Versuchsbedingungen lassen sich die beiden Eloxierverfahren wie folgt miteinander vergleichen: Das Oxalsäureverfahren liefert nur bei höheren Temperaturen Hydroxidoberflächen, die sich zur Adsorption von Urease eignen, die Aktivitäten sind jedoch verhältnismäßig niedrig. Der Einfluß der Parameter Stromdichte und Elektrolytkonzentration ist gering. Das nach dem GS-Verfahren dargestellte Adsorbens erweist sich dagegen nach Belegen mit dem Enzym in seiner katalytischen Aktivität stark abhängig von den Parametern Stromdichte, Temperatur sowie Elektrolytkonzentration [6], deren Variation z. T. mit erheblichen Veränderungen in der Oberflächenstruktur einhergeht, die ihrerseits zu einer Veränderung der

Enzym/ $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Wechselwirkung führen können und/oder die Kapazität der Adsorbens-Oberfläche beeinflussen. Um diesbezüglich zu eindeutigen Aussagen zu kommen, ist die Bestimmung von Adsorptionsisothermen für die verschiedenen Oberflächentypen vorgesehen. Der Zusammenhang zwischen den Darstellungsbedingungen solcher Adsorbentien und ihrer Eignung als Trägermaterial für Enzyme ist

bei der Anwendung des GS-Verfahrens außerordentlich komplex; es ist daher auch nicht auszuschließen, daß z. B. eine andere als die hier gewählte Schwefelsäurekonzentration unter anderen Bedingungen ebenfalls zu guten Ergebnissen führt. Unter dem Gesichtspunkt maximal erhaltbarer enzymatischer Aktivität ist das GS-Verfahren dem Oxalsäureverfahren vorzuziehen.

- [1] K. Mosbach, *FEBS Lett.* **62**, (Suppl.), E 80 (1976).
- [2] H. H. Weetall u. R. A. Messing, *The Chemistry of Biosurfaces* (Hrsg. M. Hair), 563 ff., Dekker, New York 1972.
- [3] P. Grunwald, W. Gußner, F. R. Heiker u. W. Roy, *Anal. Biochem.* **100**, 54 (1979).
- [4] H. D. Orth u. W. Brümmer, *Angew. Chem.* **84**, 319 (1972).
- [5] M. Schaldach, *Klin. Wochenschrift* **53**, 1029 (1975).
- [6] P. Grunwald, W. Gunßer u. S. Scheer, *Angew. Chem.* **89**, 761 (1977).
- [7] D. Altenpohl, *Aluminium und Aluminiumlegierungen*, Springer-Verlag, Berlin 1965.
- [8] J. M. Nelsson u. D. I. Hitchcock, *J. Am. Chem. Soc.* **43**, 1956 (1921).
- [9] R. A. Messing, *Enzymologia* **39**, 12 (1970).
- [10] M. Hanns u. A. Rey, *Biochim. Biophys. Acta* **227**, 630 (1971).
- [11] F. J. Reithel, *The Enzymes* (Hrsg. P. D. Boyer), **Bd. 4**, 1–26, Academic Press, New York 1971.
- [12] K. M. Harmon u. C. Nieman, *J. Biol. Chem.* **137**, 601 (1948).
- [13] G. E. Box, *Evolutionary Operation*, Wiley, New York 1969.