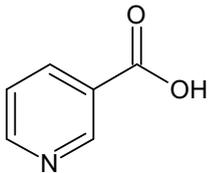


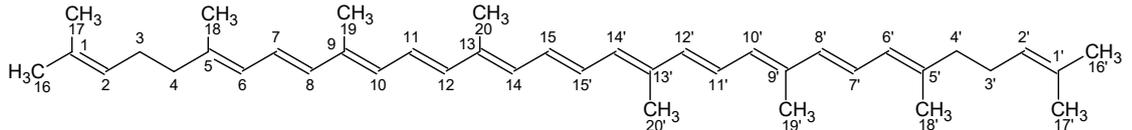
Diese Aufgaben decken mehrere Themenfelder ab, wie es auch typischerweise bei Prüfungsaufgaben der Fall ist.

## Nr. 1. Analytik von Inhaltsstoffen der Tomaten

Bei einem Tomatensafthersteller, der mit dem hohem Gesundheitswert seines Produkts wirbt, werden die Tomatenlieferungen auf ihren Lycopin- und Nicotinsäuregehalt untersucht. Beide Stoffe sind von großer ernährungsphysiologischer Relevanz: Lycopin zählt zu den Antioxidantien und gilt als Radikalfänger, d.h., es kann bestimmte reaktionsfreudige Moleküle im menschlichen Körper unschädlich machen. Ein Nicotinsäuremangel in der Nahrung, kann zu zahlreichen Krankheitssymptomen führen.



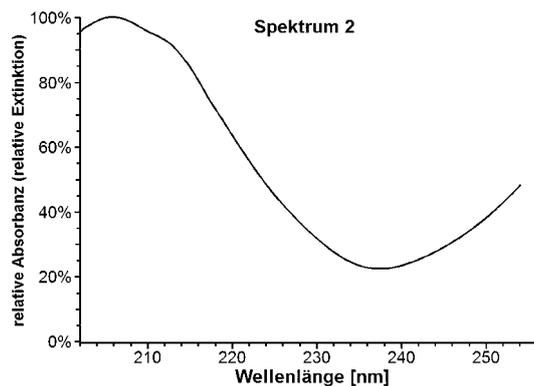
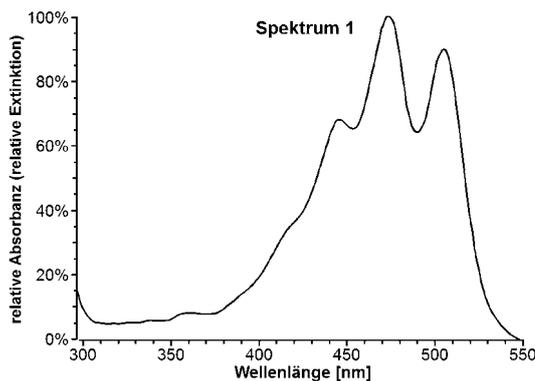
Nicotinsäure



Lycopin

**1.1** Aus der wässrigen Phase, die aus dem Tomatensaft hergestellt wurde, soll Lycopin unter Verwendung eines Scheidetrichters heraus extrahiert werden. Nennen Sie ein geeignetes Extraktionsmittel und begründen Sie die Eignung.

**1.2** Der gewonnene Extrakt wird anschließend chromatografisch aufgetrennt. Der Nicotinsäure- und der Lycopin-Peak zeigen dabei folgende UV/VIS-Spektren:



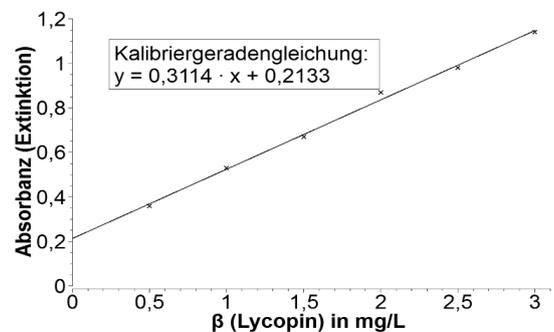
Ordnen Sie den beiden Spektren die passende Verbindung zu und begründen Sie stichwortartig Ihre Zuordnung.

**1.3** Weshalb sind für eine fotometrische Bestimmung der Verbindung, die das Spektrum 2 besitzt, herkömmliche Einmalküvetten aus Kunststoff nicht geeignet?

**1.4** Zur Quantifizierung von Lycopin wurde eine Kalibrierkurve aufgenommen. Es ergab sich das Diagramm rechts:

Geben Sie eine mögliche Erklärung dafür an, dass es sich bei der Kalibriergerade nicht um eine Ursprungsgerade handelt.

Berechnen Sie die Massenkonzentration an Lycopin in der Probelösung, wenn 10 mL Probelösung nach Verdünnen auf 25 mL eine Absorbanz bei  $A = 0,729$  aufweisen.

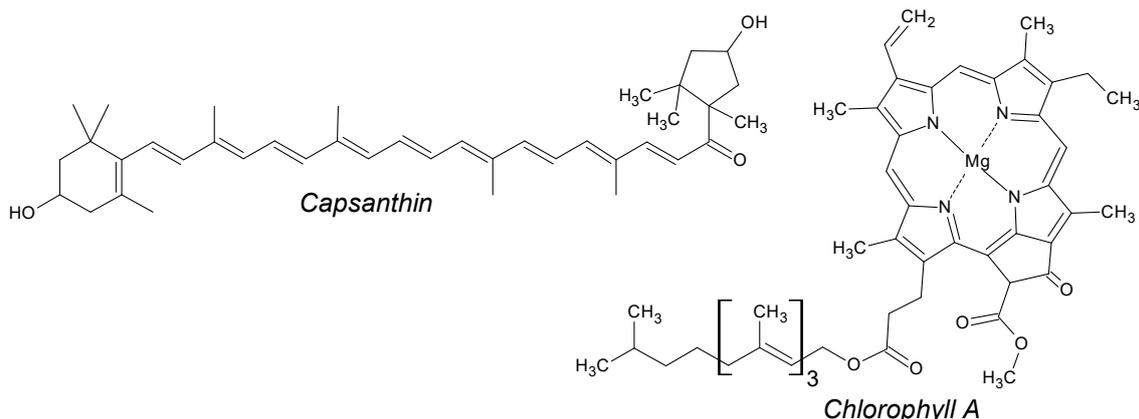


**1.5** Von welchem Coenzym (Abkürzung genügt) ist Nicotinsäure ein struktureller Bestandteil? Geben Sie auch an, welche Aufgabe bei enzymatischen Reaktionen dieses Coenzym besitzt.

**1.6** Alle enzymatischen Reaktionen, die das bei e) erwähnte Coenzym nutzen, lassen sich bequem fotometrisch verfolgen (optischer Test, .z.B. zur Bestimmung der Enzymaktivität). Erläutern Sie kurz, weshalb dies möglich ist.

## Nr. 2 HPLC und UV/VIS-Spektroskopie von Paprika-Farbstoffen

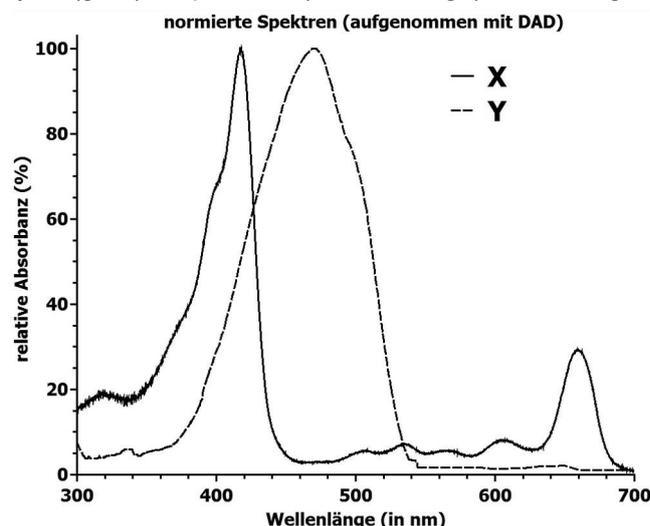
Die Farbstoffe Chlorophyll A und Capsanthin sind unter anderem für die Farbe von grüner und roter Paprika verantwortlich. Beide Verbindungen sind auch als Lebensmittelfarbstoffe zugelassen.



2.1 Begründen Sie kurz anhand des molekularen Baus der Verbindungen, welches gemeinsame Strukturmerkmal bei beiden Verbindungen für die Farbigkeit verantwortlich ist.

2.2 Die mit einem Diodenarray-Detektor aufgenommenen UV/VIS-Spektren wurden versehentlich nicht beschriftet.

Ordnen Sie mithilfe unten stehender Tabelle die beiden UV/VIS-Spektren (X und Y) den beiden Farbstoffen Chlorophyll A (grün), Capsanthin (rötlich-orange) zu und begründen Sie kurz Ihre Zuordnung.



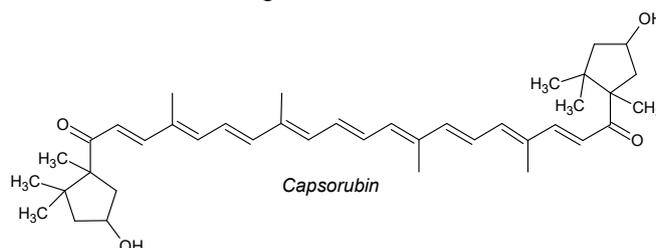
Farbe	Wellenlängenbereich
rot	700 – 630 nm
orange	630 – 590 nm
gelb	590 – 560 nm
grün	560 – 490 nm
blau/indigo	490 – 450 nm
violett	450 – 400 nm

2.3 Über eine Flüssig-Flüssig-Extraktion soll Capsanthin aus wässrigem Paprikasaft extrahiert werden. Schlagen Sie ein passendes Lösungsmittel (Extraktionsmittel) vor und begründen Sie kurz Ihren Vorschlag.

2.4 Zur Aufnahme von UV/VIS-Signalen werden in chromatografischen Systemen häufig Diodenarray-Detektoren (DAD) eingesetzt. Nennen Sie einen bedeutenden Vorteil gegenüber gewöhnlichen UV/VIS-Detektoren.

2.5 Das *Europäische Arzneibuch* definiert die „spezifische Absorption“ ( $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ ) einer Verbindung, als die rechnerische Absorption, die die Lösung bei einem Gehalt von 1 g pro 100 mL Lösung („1%“) besitzt. Berechnen Sie die spezifische Absorption ( $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ ) eines Farbstoffs mit der molaren Masse  $M = 695,72 \text{ g/mol}$ , wenn der molare Absorptionskoeffizient beim Absorptionsmaximum  $\epsilon = 21915 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  beträgt.

2.6 Eine dem Capsanthin ähnliche Verbindung ist das Capsorubin (siehe Strukturformel rechts). Beide Verbindungen können über unterschiedliche Retentionszeiten in der RP-HPLC getrennt werden.

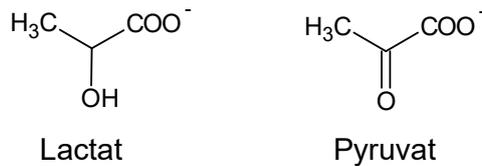


Beschreiben Sie kurz, was mit RP-HPLC gemeint ist und geben sie zwei Lösungsmittel an, die häufig in großen Mengen als mobile Phase eingesetzt werden. Begründen Sie anschließend ob Capsanthin oder Capsorubin in der RP-HPLC die größere Retentionszeit besitzt.

Nr. 3: Enzymatik
------------------

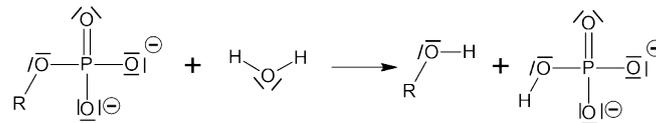
Folgende vier Enzyme besitzen eine große physiologische oder/und labordiagnostische Bedeutung:

*Lactat-Dehydrogenase*: Dieses Enzym katalysiert (u.a.) die Umwandlung von Lactat in Pyruvat.



*Phosphofruktokinase*: Dieses Enzym katalysiert die Umwandlung von D-Fruktose-6-Phosphat in D-Fruktose-1,6-Diphosphat.

*alkalische Phosphatasen* hydrolysieren organische Phosphorsäureester zu freiem Phosphat und Alkoholen. Sie arbeiten am effektivsten in leicht alkalischer Umgebung und kommen in nahezu allen Pflanzen und Tieren vor.



*Peroxidasen*: Diese Enzyme können Wasserstoffperoxid oder organische Peroxide (ROOH) mit Hilfe von Elektronendonoren vernichten. Bei der Umsetzung von Wasserstoffperoxid (H-O-O-H) entsteht dabei Wasser (H-O-H).

**3.1** Begründen Sie, welche der angegebenen Enzyme als Cosubstrat ATP oder ADP oder NAD<sup>+</sup> oder NADH/H<sup>+</sup> benötigen.

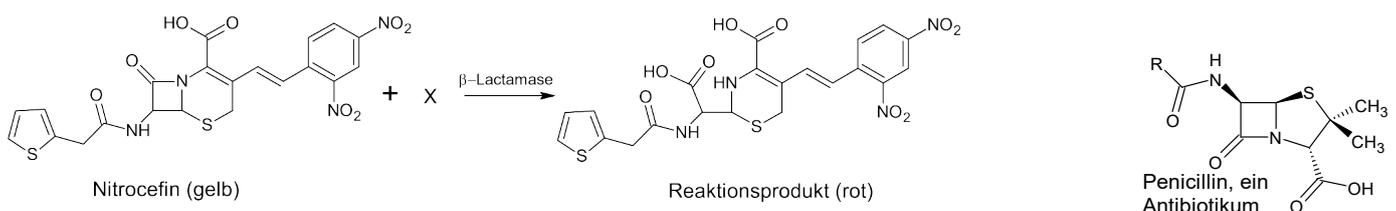
**3.2** Welche der oben aufgeführten Enzyme besitzen große analytische Bedeutung bei immunologischen Nachweisverfahren? Nur Benennung!

**3.3** Die spezifische Enzymaktivität eines käuflich erworbenen Präparats an alkalischer Phosphatase beträgt 1600 units/g. Das Enzym katalysiert beispielsweise die hydrolytische Spaltung von *para*-Nitrophenolphosphat (*pNpp*) in Nitrophenol und Phosphat:  $pNpp + H_2O \rightarrow \text{Nitrophenol} + \text{Phosphat}$ . Welche Masse an Enzympräparat wird benötigt, wenn sich in 3 Minuten 35 mg Nitrophenol bilden sollen? ( $M(pNpp) = 219,1 \text{ g/mol}$ ;  $M(\text{Nitrophenol}) = 139,1 \text{ g/mol}$ ;  $M(\text{Phosphat}) = 96,0 \text{ g/mol}$ ;  $M(H_2O) = 18,0 \text{ g/mol}$ )

**3.4** Das Enzym Lactat-Dehydrogenase kann durch Oxalat-Ionen ( $^-OOC-COO^-$ ) kompetitiv gehemmt werden. Erklären Sie den Begriff „kompetitive Hemmung“ und beschreiben Sie das Prinzip eines Experiments, mit dem man einen solchen Hemmmechanismus nachweisen kann.

Nr. 4: Nitrocefin und $\beta$ -Lactamasen
---

Aus einigen pathogenen Bakterienstämme können  $\beta$ -Lactamasen isoliert werden. Ein künstliches Substrat, das von diesen  $\beta$ -Lactamasen umgesetzt werden kann und in der Medizin diagnostisch genutzt werden kann, ist das Nitrocefin (*siehe Strukturformel in Reaktionsgleichung unten*). Bei der Umsetzung von Nitrocefin entsteht ein anders gefärbtes Reaktionsprodukt.



**4.1** Erklären Sie kurz und unter Zuhilfenahme der Strukturformel des Penicillins, welche Bedeutung  $\beta$ -Lactamasen für die Bakterienstämme haben. Gehen Sie auch darauf ein, worin der diagnostische Nutzen von Nitrocefin liegen könnte.

**4.2** Welche Gemeinsamkeiten zeigt Nitrocefin bzgl. seiner Strukturformel mit den natürlichen Substraten von  $\beta$ -Lactamasen? Geben Sie den entsprechenden Strukturformelausschnitt an und benennen Sie diesen.

**4.3** Leiten Sie aus der Reaktionsgleichung ab, zu welcher Enzymklasse  $\beta$ -Lactamasen gehören. Geben Sie auch an um welche Verbindung es sich bei „X“ (*siehe Reaktionsgleichung*) handelt. Begründen Sie Ihre Entscheidung kurz.

**4.4** Zur Aktivitätsmessung in 100 mL einer  $\beta$ -Lactamase-haltigen Lösung, wurde sie mit einem großen Überschuss an Nitrocefin versetzt. Innerhalb von 3 Minuten nahm die Absorbanz von  $A = 0,815$  auf  $A = 0,141$  ab ( $d = 1$  cm). Der Absorptionskoeffizient von Nitrocefin beträgt bei der Messwellenlänge  $\epsilon = 15000$  L/(mol·cm), das Reaktionsprodukt absorbiert bei der gewählten Messwellenlänge nicht. Berechnen Sie die umgesetzte Stoffmenge Nitrocefin und die ungefähre mittlere Enzymaktivität der  $\beta$ -Lactamase im gesamten Ansatz in *Enzyme Units*.

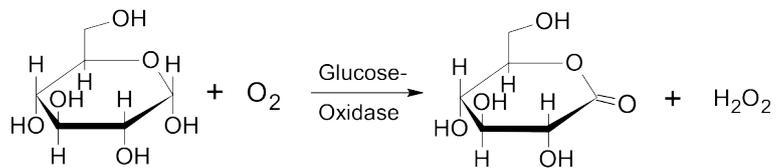
#### Nr. 5: Analytik und molekularer Bau von Naturstoffen

**5.1** Die meisten Bakterienstämme betreiben Glykolyse, einige von ihnen sind zur Milchsäuregärung befähigt.

Erklären Sie kurz jeweils die biochemische Bedeutung beider Stoffwechselwege und geben Sie jeweils die

Stoffbilanzen an (Edukte, Produkte, Cosubstrate). **[Anm: Wenn diese Stoffwechselwege nicht in meinem Unterricht behandelt wurden, ist diese Teilaufgabe hier nicht relevant]**

**5.2** Die quantitative Glucosebestimmung kann mithilfe des Glucoseoxidase-Tests (GOD-Test) erfolgen. Dabei ist folgende enzymatische Reaktion wichtig:

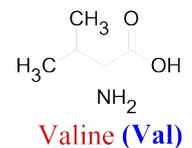
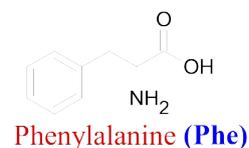
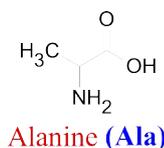


Begründen Sie mithilfe der Oxidationszahlen, dass es sich bei Glucose-Oxidase um eine Oxidoreduktase handelt

Beschreiben Sie auch, wie das entstandene  $H_2O_2$  quantifiziert werden kann.

**5.3** Eine Glucose-Stammlösung wurde hergestellt, indem 10 g Glucose-Monohydrat ( $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$ ) gelöst und im Messkolben auf ein Gesamtvolumen von 1 L gebracht wurden. Welches Volumen an Stammlösung wird benötigt, um 100 mL einer Verdünnung mit  $\beta(\text{Glucose}) = 750$  mg/L herzustellen?

**5.4** Erläutern Sie kurz den Bau von Proteinen und geben Sie den Strukturformelausschnitt folgender Primärstrukturausschnitts eines Proteins an: ...Ala-Val-Phe-... (*siehe Strukturformeln rechts*)



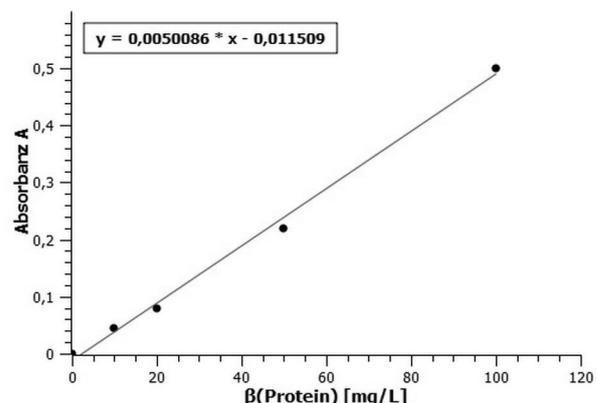
#### Nr. 6 Proteine und Enzyme

Bei einer Proteinbestimmung nach LOWRY wurde aus einer BSA-Stammlösung mit  $\beta(\text{BSA}) = 1$  g/L jeweils 1,5 mL folgender Kalibrierlösungen hergestellt: 10 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L

**6.1** Welches Volumen an Stammlösung ist einzusetzen, um 1,5 mL der Verdünnung mit 20 mg/L zu bekommen?

**6.2** Trägt man die gemessenen Absorbanzen der Verdünnungen gegen  $\beta(\text{Protein})$  in mg/L auf, erhält man unten stehende Kalibriergerade (incl. Kalibriergeradengleichung). 150  $\mu$ L einer Probelösung wurden auf 2,5 mL verdünnt und die Absorbanz anschließend mit  $A = 0,351$  bestimmt. Berechnen Sie  $\beta(\text{Protein})$  in der Probelösung.

**6.3** Berechnen Sie den spezifischen Absorptionskoeffizienten in L/(g·cm).



**6.4** In verschiedenen Bakterien und Pflanzen findet sich ein Enzym, das die Umwandlung von Nitrat-Ionen ( $NO_3^-$ ) in Nitrit-Ionen ( $NO_2^-$ ) katalysiert. Das Enzyme wird durch Iodat-Ionen ( $IO_3^-$ ) kompetitiv gehemmt.

**6.4.1.** Zeichnen Sie in einem vollständig beschrifteten Diagramm die Substratsättigungskurve des ungehemmten Enzyms und die Substratsättigungskurve für das gleiche Enzym bei Anwesenheit von Iodat-Ionen ein. Erklären Sie kurz in Worten den jeweiligen Verlauf der Kurven.

**6.4.2.** Begründen Sie, zu welcher Enzymklasse das vorgestellte Enzym gehört und welche Cosubstrate durch diese Enzyme benötigt werden bzw. in Frage kommen.

**6.4.3.** Nennen Sie zwei weitere Enzymklassen und jeweils ein dazugehöriges Beispiel für ein Enzym.

## 7. Gewinnung von Antikörperfragmenten

**Papain ist ein Enzym, das in hoher Konzentration in unreifen Papaya-Früchten vorkommt.** Das Enzym wird im Labor genutzt, um als Endopeptidase von IgG-Antikörpern (AK) die beiden Seitenarme (Fab) vom Rest (Fc) abspalten. Die beiden abgespaltenen Seitenarme besitzen nur 1 Paratopregion. Sie können bei Immunassays eingesetzt werden.

**7.1** Zu welcher Enzymklasse gehört Papain? Beschreiben Sie kurz die Wirkung auf die AK auf molekularer Ebene.

**7.2** Zur Aufreinigung wird das Gemisch aus Papain und den Produkten des Enzymverdaus der hydrophoben Interaktionschromatographie (HIC) unterzogen. Erläutern Sie das Trennprinzip der HIC.

**7.3** Es ergibt sich bei der HIC folgendes

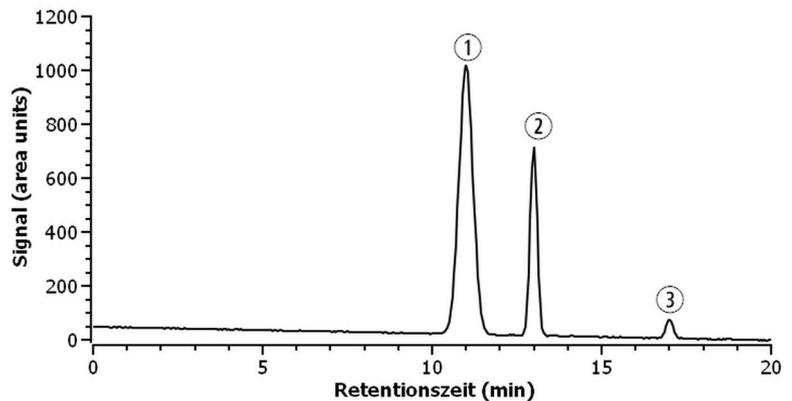
Chromatogramm. Hinweis: Der genutzte Fotometer detektiert die Komponenten mit gleicher Empfindlichkeit (gleiche Peakfläche pro Proteinmasse für alle drei Komponenten).

**7.3.1** Ordnen Sie den Peaks 1-3 folgende Komponenten mit kurzer Begründung zu:

\* Papain:  $M = 25,3$  kDa.

\* Reststück (Fc):  $M = 49,9$  kDa.

\* Seitenarm-Fragment (Fab): Fab.  $M = 50,1$  kDa.



**7.3.2** Ordnen Sie den Peaks 1-3 folgende Ammoniumsulfat-Lösungen zu.

a)  $c(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 15$  mM

b)  $c(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 0,5$  mol/L

c)  $c(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 1,5$  mol/L

**7.4** Eine Ammoniumsulfat-Stammlösung besitzt einen Massenanteil von  $w(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 35\%$ . Wie können daraus 2 Liter einer Lösung mit  $c(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 2$  mol/L hergestellt werden (Rechnung + Herstellungsschritte)?

**7.5.** Durch einen Fehler, wurde die Probe direkt zu einem kleinen Volumen an Ammoniumsulfat-Stammlösung mit  $w=35\%$  gegeben. Erklären Sie die Folge für die Proteinmoleküle.

## Lösungen – ohne Gewähr – häufig auch nur Lösungswörter

### 1. Analytik von Inhaltsstoffen der Tomaten

**1.1** Lycopin ist als Kohlenwasserstoff unpolar und kann somit unpolaren Lösungsmitteln extrahiert werden. Das Lösungsmittel darf sich dabei nicht mit Wasser mischen, so dass eine Extraktion mit einem Scheidetrichter möglich ist (Phasengrenze muss vorhanden sein). Dies schließt z.B. Ethanol, Aceton etc. aus. Ein geeignetes Extraktionsmittel ist z.B. n-Hexan oder Dichlormethan.

**1.2** Lycopin besitzt ein ausgedehntes konjugiertes Elektronensystem, wie z.B. auch Chlorophyll, Hämoglobin etc. Solche Stoffe sind farbig, absorbieren also im sichtbaren Bereich (grob: 400 – 800 nm) des Lichts. Spektrum 1 muss also zu Lycopin gehören. Nicotinsäure hingegen ist ein Aromat und absorbiert im UV-Bereich (also Spektrum 2).

**1.3** Herkömmliche Kunststoffküvetten absorbieren im hohem Maß UV-Licht, und sind so für eine genaue Bestimmung in diesem Bereich nicht geeignet.

**1.4** Eine mögliche Erklärung ist, dass im Lösungsmittel weitere Stoffe enthalten sind, die bei der Messwellenlänge absorbieren und gleichzeitig auf das Messen eines Nullwerts (Referenz, „blank“) verzichtet wurde. Dies ist auch nicht zwangsläufig erforderlich.

$$y = 0,3114 \cdot x + 0,2133 \Rightarrow x = 1,65607 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

Berücksichtigung der Verdünnung:  $\beta(\text{Lyc}) = \frac{25 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \cdot 1,65607 \frac{\text{mg}}{\text{L}} = 4,14 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$

e) Nicotinsäure ist struktureller Bestandteil von Nicotinsäureamidadeninnucleotid (NAD<sup>+</sup>) oder von Nicotinsäureamidadeninnucleotidphosphat (NADP<sup>+</sup>) bzw. deren reduzierter Varianten. Dieses Cosubstrat fungiert als Elektronendonator bzw. Elektronenakzeptor, also immer wenn Substrate oxidiert oder reduziert werden müssen. Es ist das typische Cosubstrat von Oxidoreductasen.

f) NAD<sup>+</sup> und NADH unterscheiden sich in ihrem UV-Spektrum. Während der enzymatischen Reaktion nimmt also die Absorbanz bei bestimmten Wellenlängen im UV-Bereich zu oder ab, weil NAD<sup>+</sup> zu NADH umgewandelt wird oder umgekehrt.

### 1. HPLC und UV/VIS-Spektroskopie von Paprika-Farbstoffen

1.1 Beide Verbindungen besitzen ein ausgedehntes konjugiertes Doppelbindungssystem.

1.2 Verbindung Y lässt hauptsächlich das Licht ab der Wellenlänge 540 nm und aufwärts durch, also gelb-orange-rot. Dies stimmt mit dem Farbeindruck von Capsanthin (rötlich-orange überein). Verbindung X lässt hauptsächlich das Licht im Bereich 460 nm – 640 nm durch (blau, grün, gelb, orange). Die blauen und gelben Anteile ergeben in der Mischung auch einen grünen Farbeindruck. Der Gesamtfarbeindruck ist also grünlich, was mit dem Chlorophyll A-Farbeindruck übereinstimmt.

Verbindung X = Chlorophyll A

Verbindung Y = Capsanthin

1.3. Es muss sich um eine unpolare Flüssigkeit handeln, damit sie mit der wässrigen Phase eine Phasengrenze ausbildet und das unpolare Capsanthin in diese Phase übertritt. Beispiele: Benzin, Cyclohexan, n-Hexan, Diethylether. Nicht geeignet, da keine Phasentrennung mit wässriger Phase: niedere Alkohole (Ethanol, Methanol, Isopropanol), Aceton

1.4 DAD-Detektoren nehmen das gesamte Spektrum in Sekundenbruchteilen auf, da sie nicht jede einzelne Messwellenlänge einzeln durchscannen müssen.

$$1.5. \quad \varepsilon_{\text{spez}} = \frac{\varepsilon}{M} = \frac{21915 \frac{L}{\text{mol} \cdot \text{cm}}}{695,72 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} \approx 31,4887 \frac{L}{\text{g} \cdot \text{cm}}. \text{ Eine Lösung mit 10 g pro Liter absorbiert rechnerisch also das}$$

$$\text{Zehnfache, also ca. } A_{1\text{cm}}^{1\%} = 315 \quad (A = \beta \cdot d \cdot \varepsilon_{\text{spez}} = 10 \frac{\text{g}}{\text{L}} \cdot 1\text{cm} \cdot 31,4997 \frac{L}{\text{g} \cdot \text{cm}} \approx 315)$$

1.6.1 RP-HPLC: unpolare stationäre Phase und eine im Vergleich dazu polare mobile Phase. Lösungsmittel: Wasser, Ethanol, Acetonitril

1.6.2. Bei der RP-HPLC eluieren die polarsten Verbindungen zuerst. Je unpolarer die Verbindung desto später eluiert sie und desto höher ist die Retentionszeit, da diese Verbindungen besonders gut mit stationären Phase bindend wechselwirken können. Durch die fehlende 4. Sauerstofffunktion ist Capsanthin noch etwas unpolarer als Capsorubin und eluiert etwas später => Längere Retentionszeit.

## Aufgabe 2

$$2.5 \quad \varepsilon = \frac{\varepsilon_{\text{spez}}}{M} = \frac{21915 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}}{695,75 \text{ g/mol}} = 31,498 \text{ L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

„1%“ meint 10 g/L.  $A = \varepsilon_{\text{spez}} \cdot \beta \cdot d = 31,498 \text{ L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot 10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot 1\text{cm} \approx 315,0$ .  $A_{1\text{cm}}^{1\%} \approx 315,0$

## Aufgabe 3

### 3.1

Lactat-Dehydrogenase: Eine Hydroxylgruppe wird zu einer Carbonylgruppe aufoxidiert. Dem Molekül werden also Elektronen am mittleren C-Atom entzogen. Es wird ein Cosubstrat benötigt, dass Elektronen aufnehmen kann, also NAD<sup>+</sup>.

Phosphofruktokinase: Kinasen sind Transferasen für Phosphat. Phosphat-Donor ist ATP. Es wird also ATP gespalten.

alkalische Phosphatase: Hydrolase. kein Cosubstrat nötig.

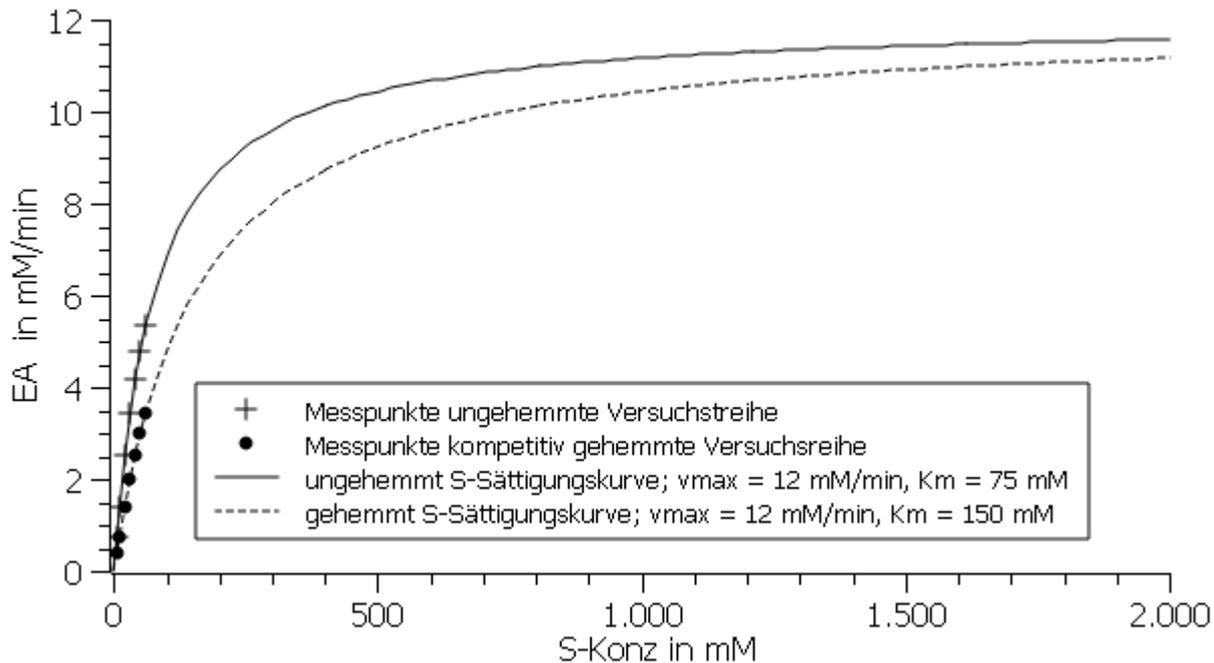
Peroxidasen: Wie in der Beschreibung steht, benötigen sie Elektronendonoren. Das ist eben typischerweise NADH/H<sup>+</sup> (bzw. NADPH/H<sup>+</sup> oder FADH<sub>2</sub>)

**3.2** Peroxidasen (vor allem Meerrettichperoxidase) und alkalische Phosphatase. Beides Markerenzyme bei Immunassays.

**3.3** 35 mg Nitrophenol  $\hat{=}$  0,0002516 mol = 251,6  $\mu$ mol. Pro Minute sollen sich also 83,87  $\mu$ mol Nitrophenol bilden. Die EA soll also 83,87 units betragen. Da EA<sub>spez</sub> = 1600 u/g, werden also 0,052 g (52 mg) Enzym benötigt.

**3.4** S und Hemmstoff konkurrieren um die Bindungsstelle am Enzym. Die hemmende Wirkung kann durch einen S-Überschuss beseitigt werden.

**Experiment:** Zwei Versuchsreihen unter gleichen Reaktionsbedingungen, die jeweils aus mehreren Ansätzen mit aufsteigender S-Konzentration bestehen. In allen Ansätzen wird dieselbe E-Portion eingesetzt. Die zweite Versuchsreihe unterscheidet sich von der ersten, dass zusätzlich zu S und E auch noch ein Hemmstoff (H) vorhanden ist, in jedem Ansatz mit der gleichen Konzentration. Man misst mit geeigneten Mitteln die E-Aktivität, z.B. die Produktbildung in den ersten paar Sekunden. Man erhält so zwei Substratsättigungskurven. Wird in der Versuchsreihe in der zu jedem Ansatz Hemmstoff zugesetzt wurde, v<sub>max</sub> erreicht, allerdings erst bei höheren S-Konzentrationen und ist der K<sub>M</sub>-Wert höher, so muss es sich um einen kompetitiven H handeln. mit mit aufsteigenden



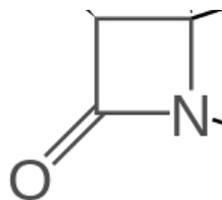
zum Diagramm: Man beachte, dass man experimentell nur relativ geringe S-Konzentrationen einsetzt um  $K_m$  und  $V_{max}$  (und damit die S-Sättigungskurve) zu modellieren. Es kann auch sein, dass sich das S gar nicht so gut löst, als das an solche Ansätze wählen könnte, die in der Nähe von  $v_{max}$  sind. Sie Substratsättigungskurven sind Näherungskurven die mithilfe der Michaelis-Menten-Gleichung modelliert wurden. (vgl. Versuch aus dem Praktikum!). In jedem Fall muss man die Reaktionsgeschwindigkeit in der ersten paar Sekunden messen, da die S-Konz. sofort zu sinken beginnt: Jeder Ansatz wird nach einigen Sekunden abgestoppt.

#### Aufgabe 4

4.1 Vermitteln eine Resistenz gegen beta-Lactam-Antibiotika. Dies ist Selektionsvorteil. Bei einem hohen Umweltdruck durch die Anwesenheit von solchen Antibiotika haben die Stämme einen Vorteil, die in der Lage sind  $\beta$ -Lactamasen zu bilden. Während andere Bakterien-Stämme zugrunde gehen, können sie sich vermehren und haben darüber hinaus auch weniger Konkurrenz im Lebensraum durch andere Bakterienstämme. So können Bakterienresistenzen entstehen.

Diagnostischer Nutzen: Nachweis von entsprechenden Resistenzen in klinisch relevanten Keimen.

4.2 Beide Stoffe verfügen über einen  $\beta$ -Lactam-Ring:



4.3. Wie die allermeisten Spaltungsenzymen handelt es sich um eine Hydrolase. Das erkennt man an der Reaktionsgleichung, denn X ist  $\text{H}_2\text{O}$ . Im Produkt ist ein H-Atom und eine OH-Gruppe ( $\text{H} + \text{OH} = \text{H}_2\text{O}$ ) zusätzlich vorhanden.

4.4. In 3 Minuten ändert sich die Absorbanz um  $\Delta A = 0,674$ , d.h. die Nitrocefinmenge ändert sich nach dem L-B-Gesetz um  $0,00004933 \text{ mol/L}$  ( $44,93 \mu\text{M}$ ). In den  $0,1 \text{ L}$  Reaktionsansatz ändert sich die Nitrocefin-Stoffmenge also um  $4,493 \mu\text{mol}$ . D.h. pro Minute ändert sich die Stoffmenge um  $n(\text{Nitrocefin}) = 1,4978 \mu\text{mol}$ .  $\text{EA} \approx 1,50 \text{ units}$ .

#### Aufgabe 5

## 5.1

Glykolyse: Stoffwechselweg zur Bereitstellung von ATP und NADH (vor allem) aus Glucose

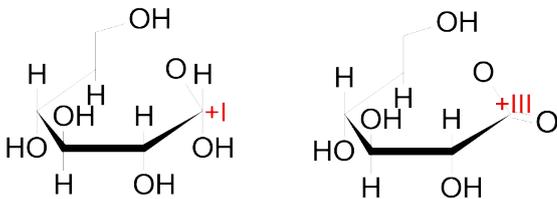
Eingang: Pro eingehende Glucose: wenig (2 Moleküle)  $\text{NAD}^+$ , wenig (2 Moleküle) ADP

Ausgang: Pro Glucose: Pyruvat ( $\text{C}_3$ , 2 Moleküle), wenig (2 Moleküle)  $\text{NADH}/\text{H}^+$ , wenig ATP

Für die Glykolyse wird kein  $\text{O}_2$  benötigt. Zwar kann die Zelle durch die Glykolyse ATP für ihren Energiehaushalt gewinnen, allerdings wird der  $\text{NAD}^+$ -Pool geschmälert, weil es zu  $\text{NADH}/\text{H}^+$  reagiert. Dies wird zwar auch an vielen anderen Stellen benötigt und dort wieder zu  $\text{NAD}^+$  regeneriert, allerdings nicht in dem Maß, wie es für den weiteren Ablauf der Glykolyse zur ATP-Bereitstellung nötig wäre. Es mangelt an  $\text{NAD}^+$  um die Elektrolyse längere Zeit aufrecht erhalten zu können.

Deshalb gibt es die Gärung, deren Aufgabe es ist aus  $\text{NADH}$  wieder  $\text{NAD}^+$  zu regenerieren. Eine Möglichkeit hierfür ist, mit dem  $\text{NADH}/\text{H}^+$ -Überschuss das Pyruvat selbst enzymatisch zur Milchsäure zu reduzieren. Bei dieser Reaktion wird nämlich das Cosubstrat  $\text{NADH}$  in  $\text{NAD}^+$  umgeandelt.

## 5.2

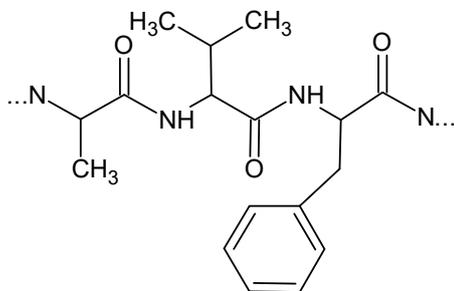


Der Ausgangsstoff wird oxidiert: Die Oxidationszahl nimmt am relevanten C-Atom von +I auf +III zu.

$\text{H}_2\text{O}_2$  kann mithilfe der Meerrettichperoxidase (HRP) quantifiziert werden. HRP kann ein chromogenes Substrat mittels  $\text{H}_2\text{O}_2$  aufoxidieren. Je mehr Farbstoff sich bildet, desto mehr  $\text{H}_2\text{O}_2$  war vorhanden.

5.3  $\beta(\text{Gluc}) = 9090,9 \text{ mg/L}$  (!!!). Es müssen 8,25 mL eingesetzt werden.

5.4 Primär- Sekundär, Tertiär und Quartärstruktur: siehe Unterrichtsunterlagen!



## Aufgabe 6

6.1 30  $\mu\text{L}$  BSA-Stamm. ad 1500  $\mu\text{L}$  Gesamtvolumen

6.2  $0,351 = 0,0050086 \cdot x - 0,011509 \Rightarrow x = 72,3773 \text{ mg/L}$ .

In 2,5 mL sind also  $m(\text{Prot}) = 72,3773 \text{ mg/L} \cdot 0,0025 \text{ L} = 0,1809 \text{ mg}$  Protein enthalten.

Diese Masse war auch in 150  $\mu\text{L}$  (0,15 mL) der ursprünglichen Proteinlösung enthalten:

$\beta(\text{Prot}) = m/V = 0,1809 \text{ mg} / 0,15 \text{ mL} = 1,206 \text{ mg/mL} \approx 1,206 \text{ g/L} \approx 1206 \text{ mg/L} \approx 1206 \mu\text{g/mL}$

6.3 Der Absorptionskoeffizient entspricht der Steigung! Hierbei ist die Einheit der x-Achse zu beachten!

$\epsilon = 0,0050086 \text{ L} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \approx 5,0086 \text{ L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

6.4.1 siehe Antwort und Diagramm bei der Musterlösung zu 3.4

6.4.2 Da die Umwandlung von Nitrat in Nitrit eine Reduktion darstellt (OZ des N-Atoms ändert sich von + V zu + III), handelt es sich um eine *Oxidoreduktase*. Es werden *Reduktionsäquivalente* benötigt, d.h.  $\text{NADH}/\text{H}^+$  (bzw.  $\text{NADPH}/\text{H}^+$  oder  $\text{FADH}_2$ )

6.4.3

- Hydrolase: z.B. *Alkalische Phosphatase* (Markerenzym bei ELISA!).

- Transferasen: z.B. Glucose-6-Phosphat-Kinase (Kinasen sind diejenigen E, die ATP als Cosubstrat bei der Phosphat-Übertragung nutzen).

Aufgabe 7: Antikörper, Enzyme und Hydrophobe Interaktionschromatographie
--

7.1 Hydrolase. Es werden die Peptidbindungen zwischen den kettenförmig verbundenen Aminosäuren gespalten.

### 7.2 Erläuterung

7.3.1 Die Zuordnung kann hier nur aufgrund der Massen erfolgen.

Vom Enzym **Papain** wurden nur sehr kleine Mengen eingesetzt, wie bei enzymatischen Analysen üblich. Das Enzym geht ja aus der Reaktion unverändert hervor. So werden nur kleine Mengen benötigt. ⇒ kleinster Peak, Nr. 3

Pro AK werden 2 identische **Seitenarm-Fragmente** abgespalten, in der Summe also 100,2 kDa. Der entsprechende Peak ist also der massenreichste, d.h. der größere Peak. ⇒ Peak Nr.1

Das **Reststück** hat eine molare Masse von ca. 49,9 kDa. Der Peak ist deshalb bezüglich der Fläche halb so groß, wie der Peak Nr. 1. ⇒ Peak Nr. 2

7.3.2 siehe HIC-Theorie auf Arbeitsblatt

7.3 selber rechnen

7.4. Proteine fallen aus. Aussalzung von Proteinen durch Entzug deren Hydrathüllen. siehe auch Praktikumsunterlagen.