Ziele unserer Forschungsarbeit

Primärziele:

- Eine **kostengünstige Herstellung** von L-Äpfelsäure aus Fumarsäure
- Chemisch: Durch **enzymatische Kalayse** (Fumarase) lässt sich

  L-Äpfelsäure kostengünstig herstellen

Sekundärziele:

- Extraktion und Aufreinigung der Fumarase
- Bestimmung der optimalen Enzymaktivität
- Synthesereaktion und Nachweise

Kosten – Nutzen Rechnung

Hefe:

- Günstig und einfach zu beschaffen und aufzubewahren.

Äpfelsäure (Informationen):

- Imprägniermittel gegen Schimmel
- Ansäuerungsmittel für Lebensmittel.
- Mittel zur Racemattrennung
- Natürliches Vorkommen ist L(-)-Äpfelsäure
- Optisch reine L-Äpfelsäure ist Grundbaustein bei der Herstellung verschiedener Antibiotika, Fungizide, Cholesteriensenker und Cancerostatika

Fumarase:

- Benötigt keine Cofaktoren
- Vorkommen: Mitochondrien der Hefe

Fumarsäure

- Techn. Gewinnung in der Industrie aus Glucose

Kosten – Nutzen Rechnung

- Techn. Gewinnung von L–Äpfelsäure durch Wasseranlagerung an Maleinsäure aufwendig (P,T). Zudem entsteht D-/L-Äpfelsäure.
- Gewinnung von Äpfelsäure aus Fumarsäure durch enzym. Katalyse durch Fumarase günstig.
- Fumarsäure ist günstig

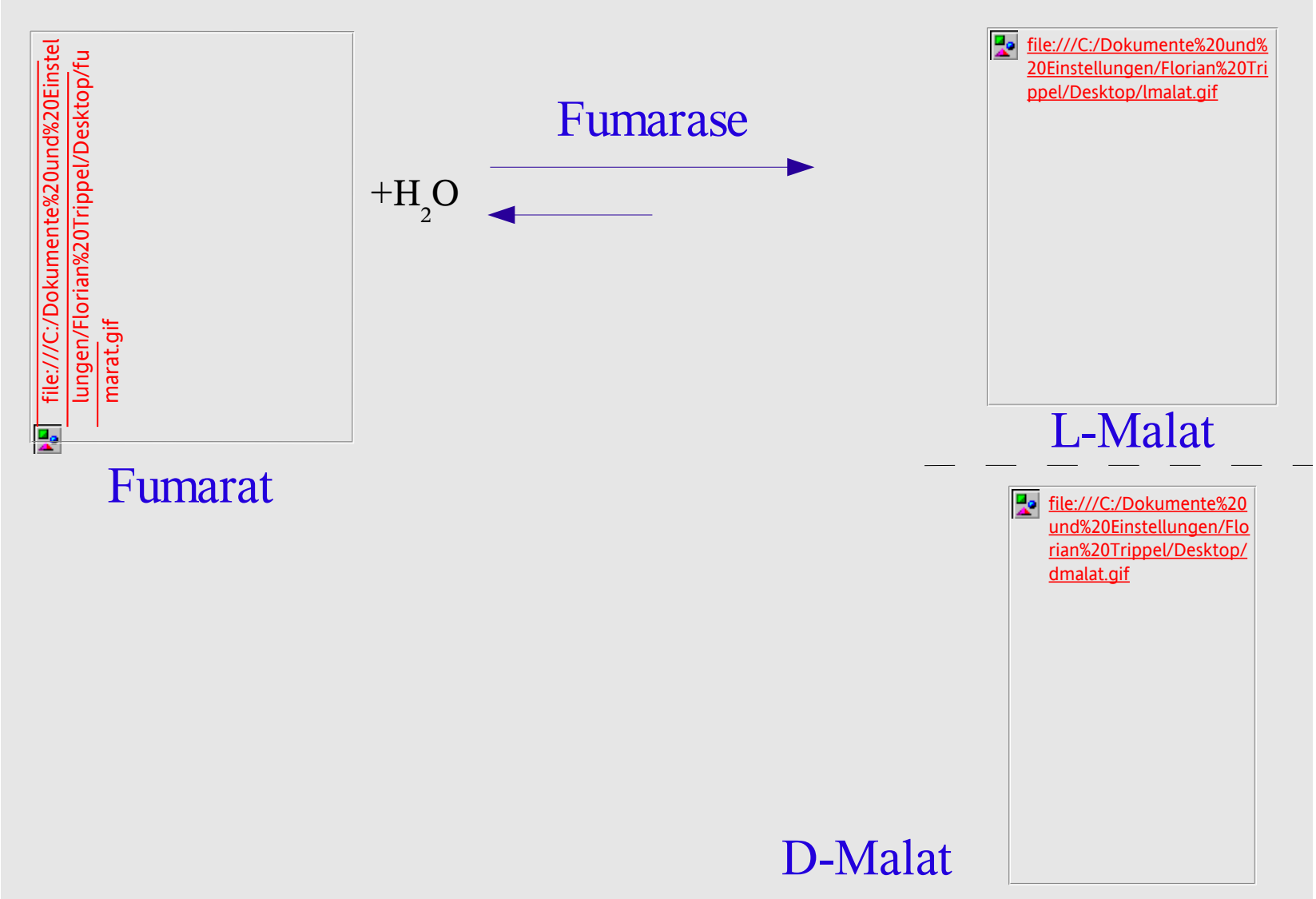
Gekaufte Fumarase ist teuer, daher wird Fumarase aus Hefe gewonnen !

Der Kauf von 100g L–Malat kostet normalerweise 374€ .

Die Materialkosten für die L-Malat Synthese durch die Fumarase sind ca. 43€.

Unser Verfahren zur L–Malat Gewinnung ist im Vergleich zur technischen Herstellung L–Malat um ca. **88,64% günstiger.**

Die enzymatische Synthesereaktion



Gleichgewichtskonstante

Reaktion von Fumarat zu Malat:

$$K = \frac{c\,(\text{Malat})}{c\,(\text{Fumarat})} = \frac{0{,}281}{0{,}119} = 2{,}4$$

Im Gleichgewicht liegt Fumarat und Malat im **Verhältnis 1: 2** vor.

Extinktionskoeffizient

- Messungen im UV-Bereich bei $\lambda = 240nm$ und $\lambda = 300nm$ (Vorteil hier: Messung ohne UV-Küvetten möglich)
- Bestimmung von ε durch Messung von E für eine Fumarat Lösung mit bekanntem c.

Nach Lambert-Beerschem Gesetz gilt:

Extinktion (E) = Schichtdicke (d) · Exktinktionskoeffizient (ε) · Konzentration (c)

λ=240 c=0,5mM → 2,2cm²/ µmol

λ=300 c=10mM → 0,0465cm²/ µmol

ε = **Extinktionskoeffizient** (molare Extinktion); dieser hat für jede Stoffart eine spezifische Größe(wellenlängenabhängig)

Berechnung der Enzymaktivität

$$Enzymaktivität[U/ml] = \frac{\Delta E}{\min .* d[cm] * \varepsilon[cm^2/\mu mol]} * \frac{Volumen(Test)[\mu l]}{Volumen(Einsatz)[\mu l]}$$

Konz.Änderung pro Zeit ***Verdünnungsfaktor***

Zellaufschluss - Methoden

Zellaufschluss mit Mörser: Unter Druck des Pistills und mithilfe von Seesand werden Hefezellen zu Pulver aufgerieben

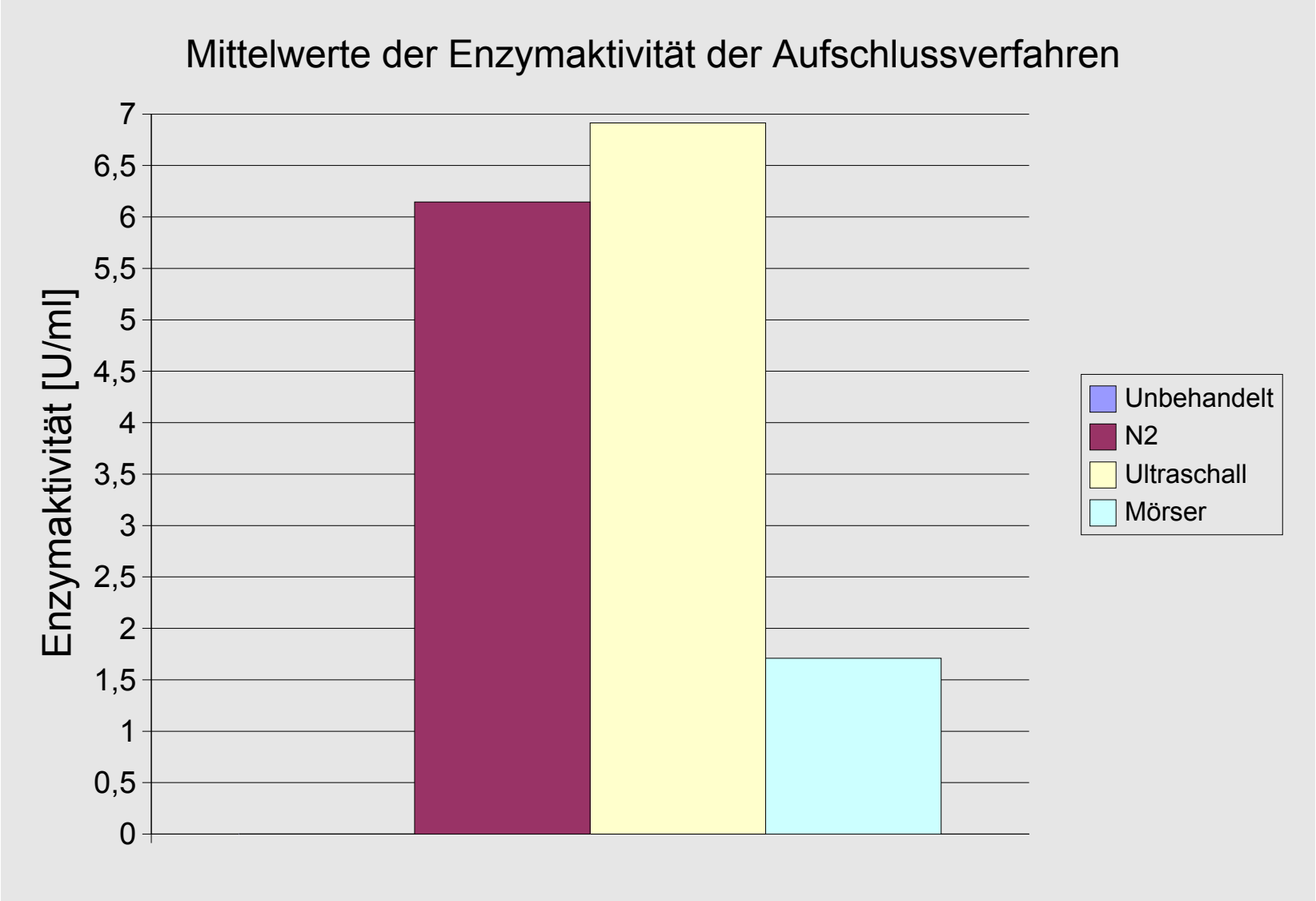
N_2

Zellaufschluss mit flüssigem N_2: Zellen mit N_2 schockgefroren und danach pulverisiert

Ultraschall

Zellaufschluss durch Ultraschall

Zellaufschluss - Verfahren



Ammoniumsulfatfällung

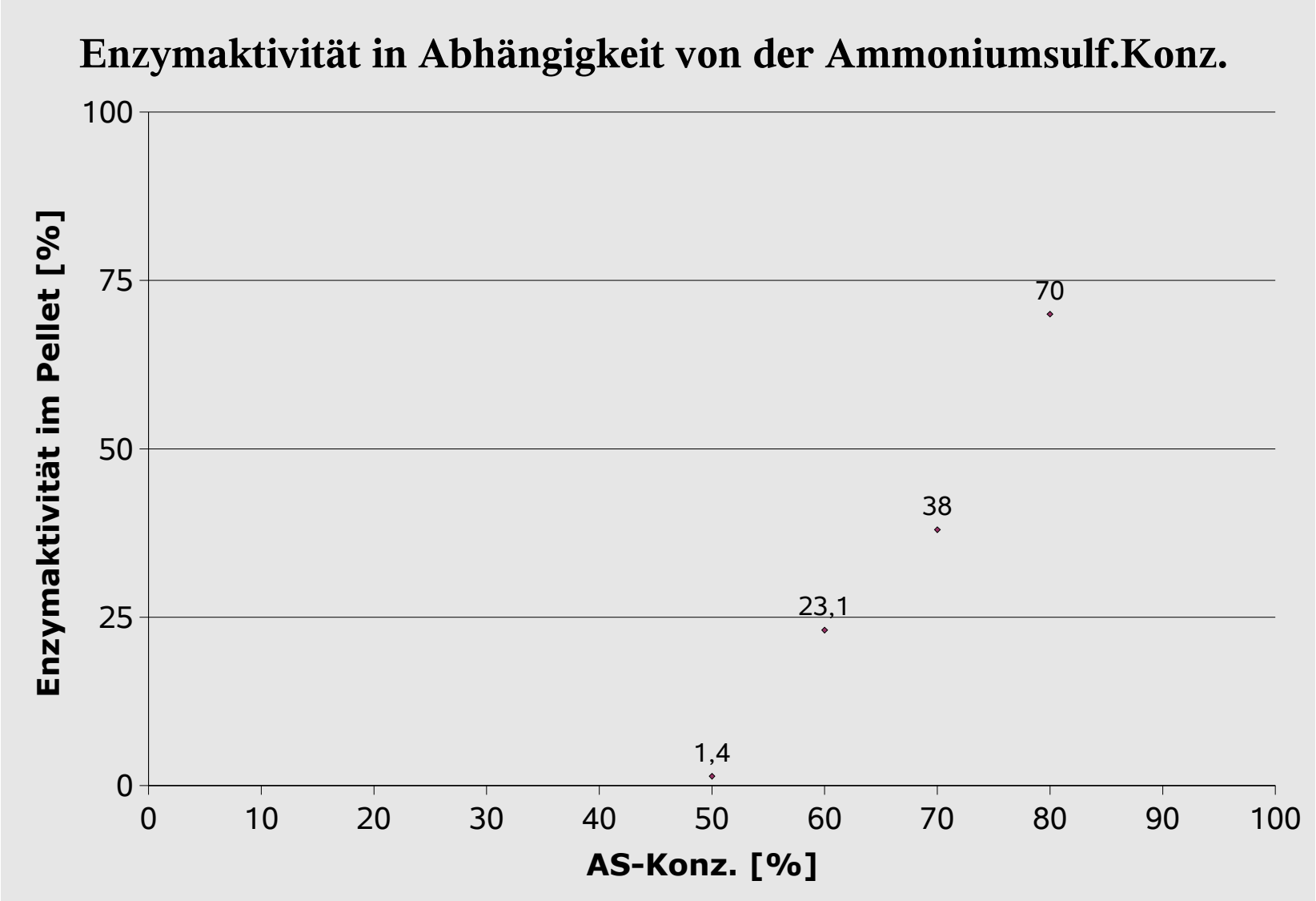
Aufreinigung - Wozu?

- Fumarase soll zu Messungen mit dem Photometer tauglich sein
- Versehentlich mit extrahierte Schwebstoffe beeinflussen den Extinktionswert und verfälschen dadurch die Messwerte.

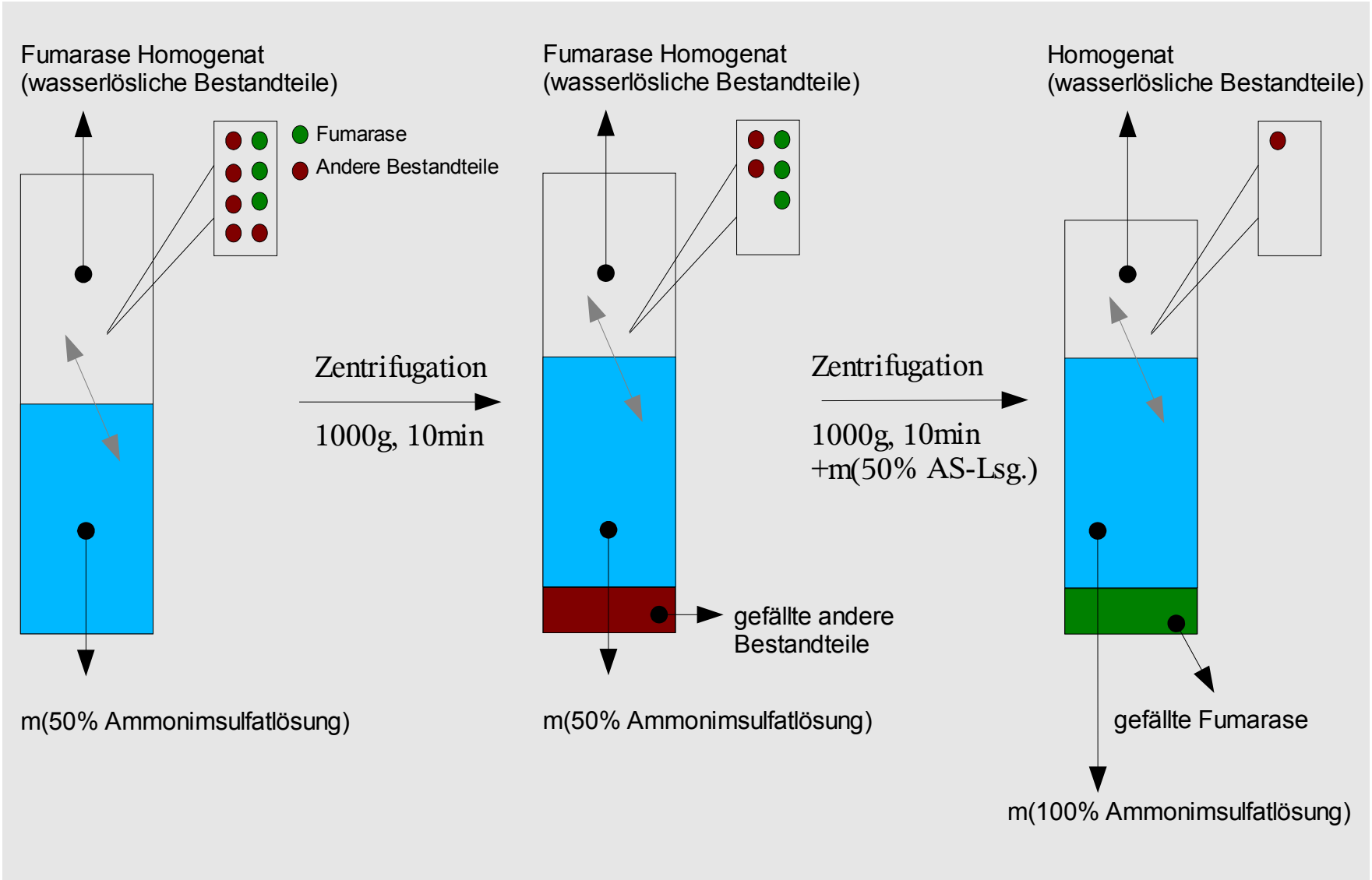
Fällungseigenschaften der Fumarase:

- Bei ca. 70% gesättigter AS-Lösung ist die Hälfte der Fumarase gefällt.
- Bei 80% gesättigter AS-Lösung fällt der Hauptteil der Fumarase aus.
- Bis zu einer Sättigung von 50% fällt kaum Fumarase aus - diese Eigenschaft soll bei der Aufreinigung berücksichtigt werden!

Ammoniumsulfatfällung



Ammoniumsulfatfällung



Optimum - Substratkonzentration

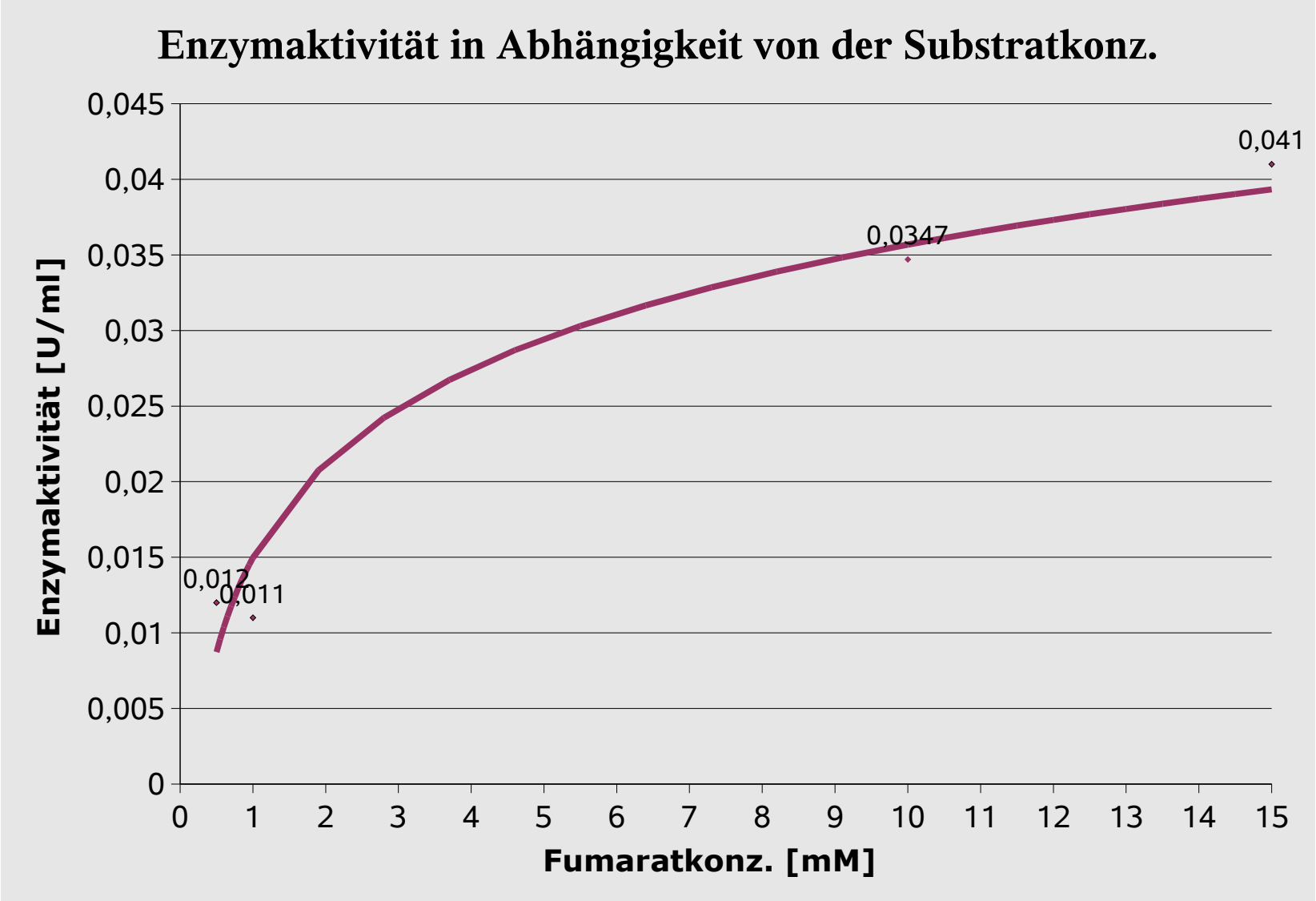
Optimale Substratkonzentr. - Warum?

- Für eine maximale Enzymaktivität, d.h. Umsatz an Fumarat, muss eine Mindestmenge an dem Substrat vorhanden sein.
- Verbessert Messergebnisse durch Minimierung des technischen Fehlers

Deutung der Enzymaktivität-Substratkonzentrations-Kurve:

- Die Asympthote der Kurve ist die maxmimale Umsatzgeschwindigkeit des Enzyms.
- Die Konzentr. an Fumarat bei dem Plateau liegt bei ca. 15 mM.
- Die Enzymaktivität lässt sich darüberhinaus nicht durch zusätzliche Zugabe von Fumarat erhöhen.

Optimum - Substratkonzentration

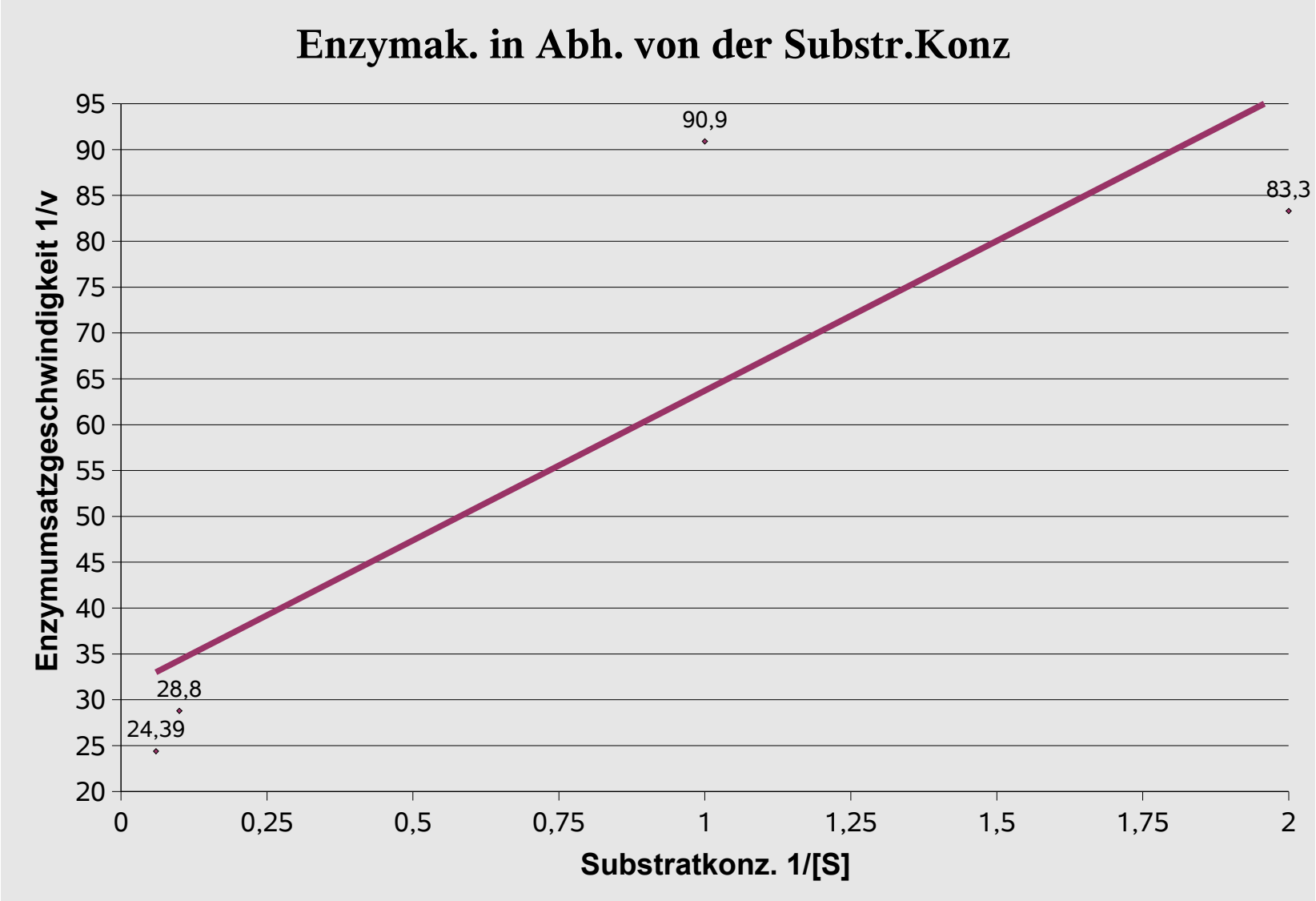


Michaeliskonstante

- Da zu wenige Messwerte zur Berechnung der Michaeliskonstante nach der Michaelis – Menten – Kinetik vorhanden sind, wird diese Konstante nach der Lineweaver-Burk-Auftragung berechnet.
- Mit statistischer Regression kann man die Steigung und den Y-Achsenabschnitt einer Geraden bestimmen.

Es ergibt sich, dass K_m = 1,1mM ist.

Michaeliskonstante



Optimum - Temperatur

Temperaturoptimum – Warum ?

• Die Messung wird in einem beheizbaren Photometer durchgeführt.

• Die Anfangsgeschwindigkeit der Enzymaktivität mit Hilfe des Photometers bestimmt.

• Die gemessenen Enzymaktivitäten werden in Abhängigkeit von der Temperatur auf einen Graphen aufgetragen.

• Die Temperatur, bei der die höchste Enzymaktivität gemessen wurde, stellt die optimale Temperatur dar.

Beobachtungen:

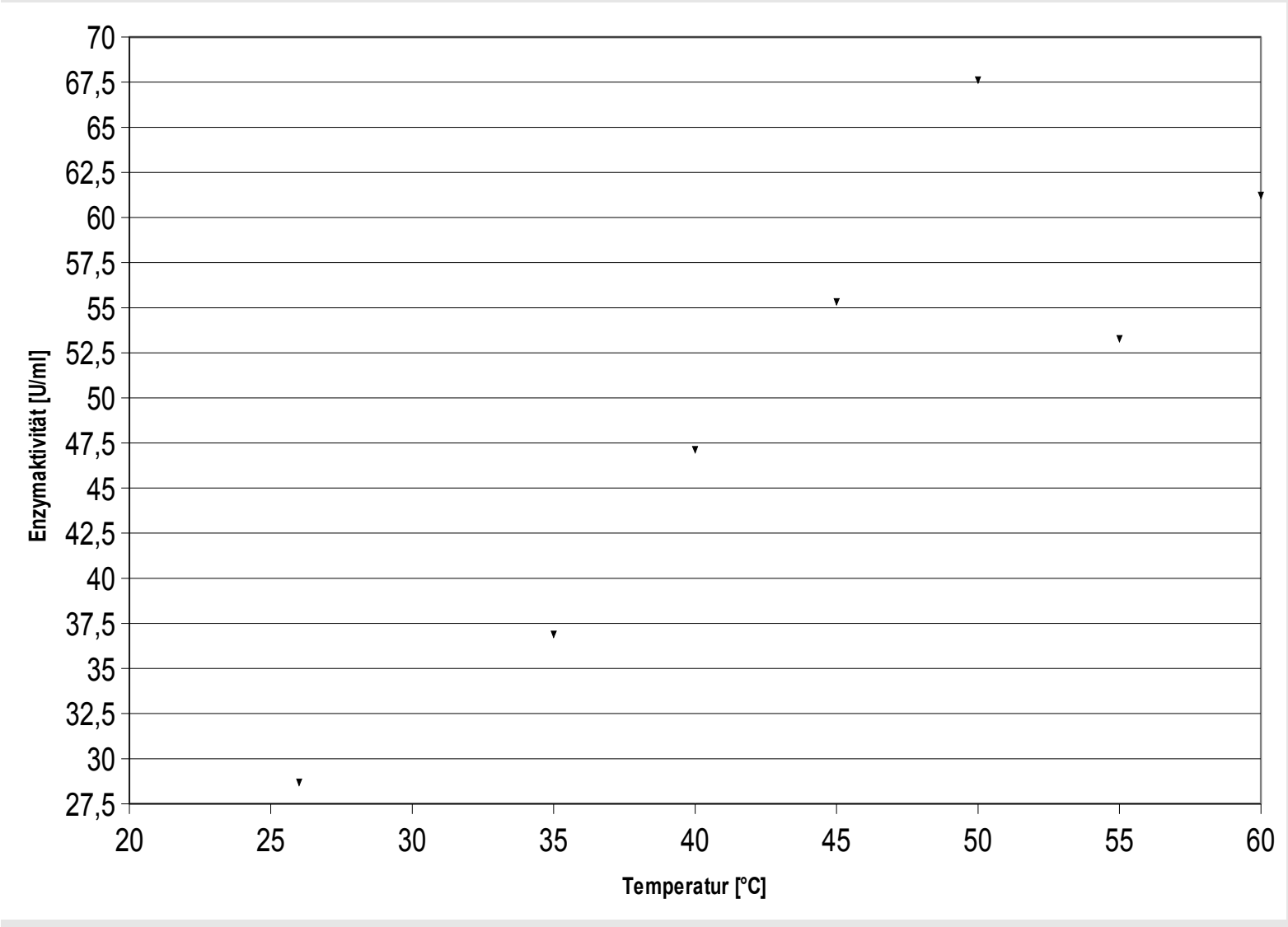
• Ab einer Temperatur von 70°C entstehen Schwebstoffe.

Erkenntnisse:

• Ab 70°C denaturiert das Enzym sehr schnell (es wird also in "seine Einzeiteile zerlegt".)

• Die optimale Temperatur sind 50°C.

Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Temperatur



pH – Optimum

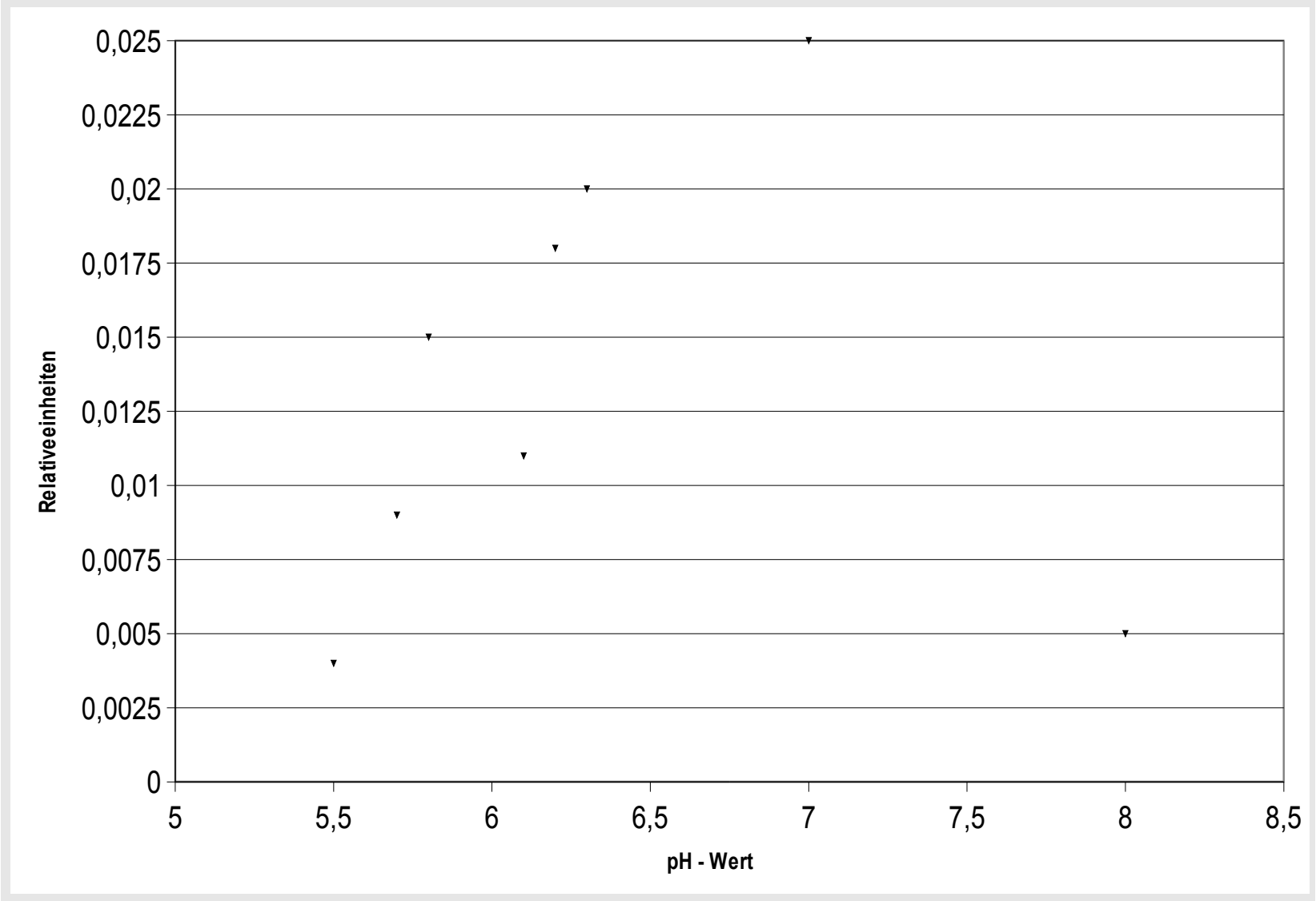
Durchführung der pH -Optimumsbestimmung:

- Der pH – Wert des Puffers wird variiert, indem KH_2PO_4 Lsg. und Na_2HPO_4 Lsg. in bestimmten Verhältnissen zusammengegeben werden.
- Von jedem Puffer werden nun 2ml zusammen mit Enzym und Fumaratlösung in eine Küvette getan.
- Dann wird die Enzymaktivität für jeden Puffer gemessen.
- Der optimale pH – Wert für die Fumarase ist derjenige, bei dem die größte Enzymaktivität gemessen wird.

Erkenntnisse:

- Aus der Kurve kann man erkennen, dass die Fumarase in einen neutralen Medium am besten arbeitet.
- Es scheint einen Pipettierfehler gegeben zu haben, da sonst die Enzymaktivität bei einem pH von 6,1 wesentlich höher wäre.

Enzymaktivität in Abhängigkeit vom pH - Wert



Enzymatische Herstellung von Äpfelsäure aus Fumarat

Durchführung des Versuchs:

- Es soll Äpfelsäure aus der Fumarsäure hergestellt werden.
- Dazu wird eine Fumaratlösung von 1,25 mol/l benutzt.
- Optimale Bedingungen.
- Nach der Reaktion ist noch Fumarsäure vorhanden.

Aufreinigung:

- Die restliche Fumarsäure soll aus der Lösung entfernt werden.
- Fumarsäure ist im Vergleich zu Äpfelsäure und Fumarat schlecht wasserlöslich.
- Konz. Salzsäure wird hinzugegeben, bis der pH bei 3 liegt. Dadurch wird Fumarat zu Fumarsäure protoniert und Malat zu Äpfelsäure.
- Die Fumarsäure fällt aus und wird abfiltriert.
- Es ist nur noch wenig Fumarsäure in Lösung (Löslichkeitsprodukt).
- Aus der Lösung werden nun Kristalle hergestellt

Nachweis der Äpfelsäure

Polarimetrischer Nachweis:

- Nur linksdrehende Äpfelsäure sollte entstanden sein.
- Andere Stoffe drehen das Licht nicht.
- Mit einem Handpolarimeter wird der Winkel, um den die hergestellte Lösung das Licht dreht, überpüft. (Messung ergibt 0,3°, Theorie sagt 0,26°)
- Es scheint also tatsächlich nur linksdrehende Äpfelsäure entstanden zu sein.

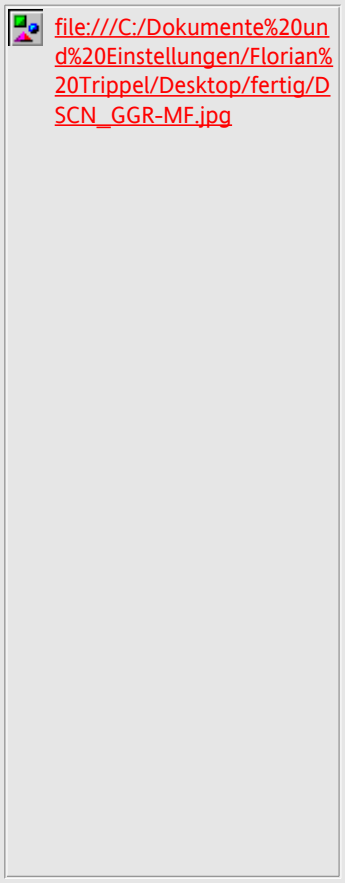
Chromatographischer Nachweis:

- Es wird mit je einem Tropfen Äpfelsäure und Fumarsäure eine Chromatographie durchführt. (Erkenntniss: Äpfelsäure läuft langsamer als Fumarsäure)
- Als Färbemittel zum Sichtbarmachen der Säuren wird ein Indikator verwendet, Stellen, an denen sich Säure befindet, bleiben hell, der Rest wird blau gefärbt.
- Führt man eine Chromatographie mit einer Probe aus der Lösung durch, dann erkennt man einen kleinen Fleck oben an der Laufmittefront (die Fumarsäure) und einen großen Schweif weiter unten (die Äpfelsäure).

Chromatographischer Nachweis der Äpfelsäure

Fumarsäure
(rechts, RF=0,88)

Äpfelsäure
(links, RF=0,63).



Fumarsäure
(oben, RF=0,89)

Äpfelsäure
(unten, RF=0,60).

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

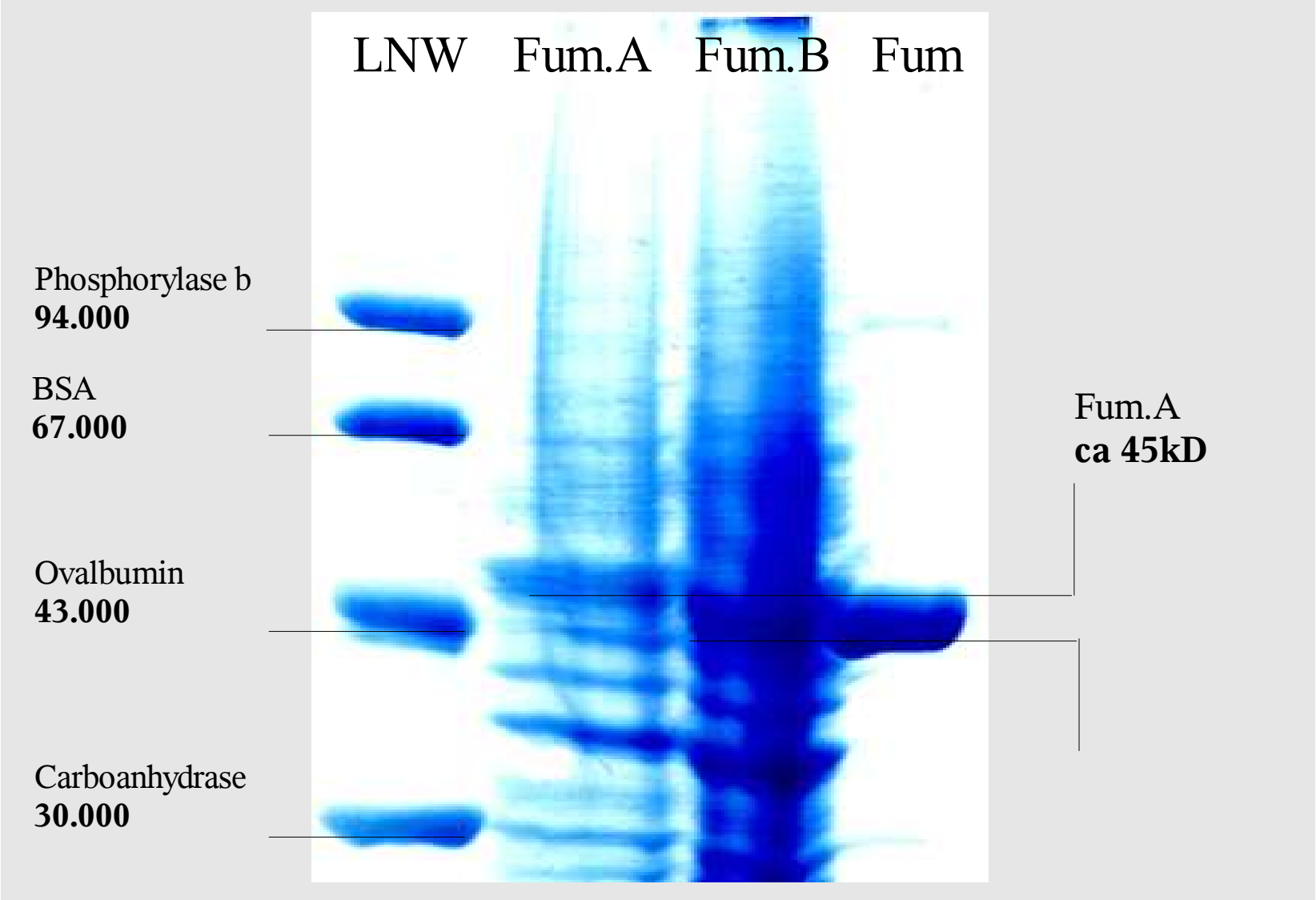
Wozu?

- Bestimmung des Proteingewichts von Fumarase
- Nachweis für Fumarase
- Quasi weiterer Aufreinigungsschritt von Fumaraselösung (Reinheit ca. 95%)

Durchführung (SDS-PAGE nach Luemmli)

- Vorübung: Proteinbestimmung nach Mikrobioret (Eichkurve mit Eiweiß: Pepton 0,25g/ml) - Resultat: 20 µg/ml Fumarase für Elektrophorese
- LNW-Marker (Polypeptide mit bekanntem Molekulargewicht)
- Elektrophoresepuffer (pH 8.3)
- Färben mit Wollfarbstoff

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese



Bewertung und Ausblick

- Uns bei unseren Versuchsreihen nicht die Mittel eines Institutes zur Verfügung, so dass unsere Messungen und Ergebnisse einen gewissen Fehleranteil enthalten.
- Der größte Fehler liegt höchst wahrscheinlich in der Ungenauigkeit der Pipettierung von wenigen Mikrolitern, sowie in den uns zur Verfügung stehenden Waagen.
- Dort, wo wir es als wichtig erachteten, wurden Versuche zur Minimierung eben dieser Fehlerquellen mehrfach durchgeführt.
- Man noch einen Weg findet, nach der Herstellung die Äpfelsäure komplett von der Fumarsäure zu trennen, damit die Äpfelsäure in noch reinerer Form vorliegt (z.B. Per Ionentauscher).
- Auch weiteres Auffinden von biologischen Quellen zur Fumarasegewinnung wäre möglich.

Danksagung & Sponsoren ...

Unseren Betreuungslehrer: Dr. Paul Schlöder

Prof. Dr. G. Wegener der Abt. Stoffwechselphysiologie des Institut für Zoologie in der Johannes Gutenberg Universität in Mainz für die Erlaubnis, das Labor zu benutzen

Für die kostenlose Bereitstellung der Entwicklungsumgebung (IDE)
Delphi 7 Enterprise