

## 1. EnzymeLab kennenlernen

V 2.2; Dez 17

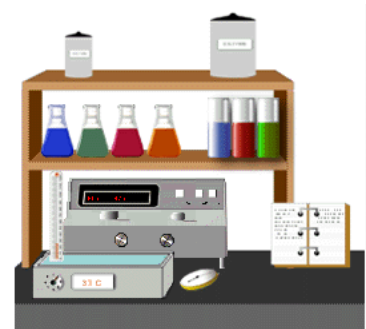
- 1 Starten** Sie einen Browser und gehen Sie zu der obigen Internetadresse!  
 Klicken Sie in der Liste der Labore auf den Button „EnzymeLab“!  
 Auf der Informationsseite klicken Sie auf „Start“; Das Applet wird heruntergeladen.  
 Falls nicht, gehen Sie zu „technical requirments“ und beachten Sie die Hinweise.

- 2 Auf der Startseite** sehen Sie das Labor:

Klicks auf die verschiedenen Gefäße oder Geräte liefern Erklärungen

Links sehen sie ein Bedienungsmenü:

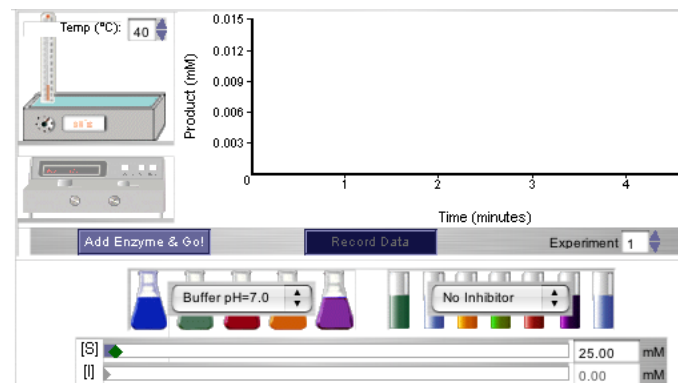
Laboratory	zeigt das Labor (wie rechts)
Experiment	startet ein Experiment
Plot Data	zeichnet die Grafik zum Experiment



- 3 Starten Sie ein Experiment!**

Hier sehen Sie die verschiedenen Parameter, die man verändern kann:

Temperatur und pH-Wert,  
 Substrat- und Inhibitorkonzentration  
 ([S]; [I])

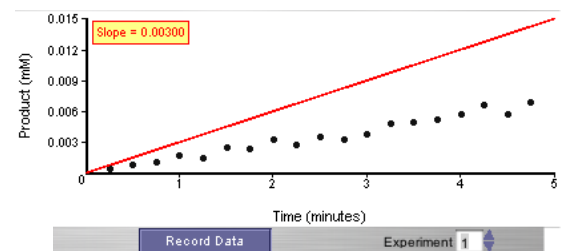


- 4 Führen Sie ein Experiment durch!**

- Parameter wählen, **Add Enzyme & Go!** klicken und laufen lassen.

- Das Ergebnis ist eine Serie von Messpunkten:  
 Außerdem wird eine rote Ausgleichsgerade gezeigt, die man mit der Maus ziehen kann, bis sie zu den Messwerten passt.

- Ihre Steigung ("slope") liefert **einen** der gesuchten Werte für die Geschwindigkeit  $v$  der Reaktion!



- Bestimmen Sie weitere  $v$ -Werte; jeweils vorher „Record Data“ und „Clear Experiment“ anklicken.

- 5 Auswertung:** **Plot Data**

## 2. Anwendung: Optimierung industrieller Fermenter

V 2.2; Dez 17

### 1 Problem

Die Invertase soll industriell eingesetzt werden um in einem großen Fermenter aus Rübenzucker (Saccharose) Traubenzucker (Glucose) und Fruchtzucker (Fructose) zu gewinnen.

Dazu müssen die optimalen Bedingungen für die Funktion der Invertase bestimmt werden.

**Sie sollen herausfinden,  
bei welchem pH-Wert und welcher Temperatur  
der Fermenter „gefahren“ werden muss!**

### 2 Arbeitsmethode

Am besten arbeiten Sie in 2 Gruppen:

Gruppe A sucht das Temperaturoptimum in neutralem Medium (pH 7.0).

Gruppe B sucht das pH-Optimum bei der „default“-Temperatur 40°C.

### 3 Datensicherung

„Exportieren“ (= speichern) bzw. drucken Sie die Ergebnisse für die weitere Arbeit aus.

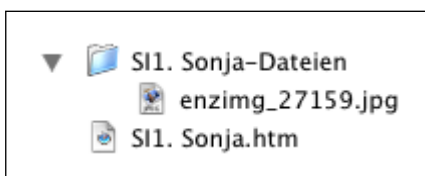
Am einfachsten fügen Sie die Grafik in ein eigenes WORD-Dokument ein.

Endergebnisse, d.h. kommentierte Versuchsprotokolle laden Sie auf classlink hoch.

*Das Programm speichert eine .htm-Seite (hier: S11.Sonja.htm), die Ihre eingegebenen Ergebnisse enthält (hier: Versuchsnummer und Best Temp) sowie einen Verweis auf das Bild.*

*Auf derselben Ebene wird ein Ordner „Dateiname-Dateien“ (hier: S11.Sonja-Dateien)*

*mit den Grafiken im .jpeg-Format abgelegt (mit automatischem Namen, hier: „enzimg\_27159.jpg“)*



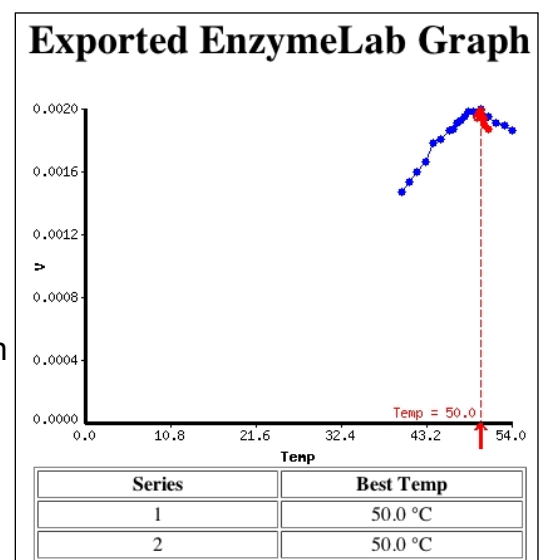
### 4 Validierung der Ergebnisse

Tauschen Sie die Ergebnisse zwischen den Gruppen aus und überprüfen Sie, bei welchen Werten das **gemeinsame** Optimum für beide Faktoren liegt!!

### 5 Abschlussgutachten

Formulieren Sie ein „Gutachten“, in dem auch angegeben wird, welche „Ertragseinbuße“ (als Prozent der Produktmenge) die Firma hat, wenn die Temperatur um 1° (oder 5°) bzw. der pH-Wert um 0,5 schwankt.

Welche Regelungspräzision würden Sie den Technikern also vorgeben?



### 3. Theorie: Michaelis – Menten – Kinetik

V 2.2; Dez 17

#### 1 Problem

Die Invertase gibt es in verschiedenen Versionen aus verschiedenen Organismen. Außerdem kann man sie gentechnisch verändern bzw. „verbessern“.

Aber was ist eine „besseres“ oder „schlechteres“ Enzym?

#### 2 Literatur

Stryer 1996: Biochemie. Spektrum-Verlag 1996 (4.Auflage) S.201ff

Bickel 1995: Natura 3. Klett-Verlag 1995

Bayrhuber, Kull 1998: Linder Biologie. Metzler/Schroedel 1998 (21.Auflage)

Weber 2002: Biologie Oberstufe Gesamtband. Cornelsen 2002

**Sie sollen herausfinden, wie gut die hier vorgestellte Invertase ist!**


#### 3 Arbeitsmethode

Arbeiten Sie wieder in 2 Gruppen:

Beide Gruppen variieren die Substratkonzentration.

(Schieber benutzen oder besser rechts Zahlen eingeben und mit „enter“ bestätigen)

Gruppe A arbeitet bei den „default“ - Einstellungen 40° und pH 7,0

[S]  25.00 mM

Gruppe B arbeitet mit den vom Kurs erarbeiteten Optima.

#### 4 Grafische Auswertung („plot data“)

Wählen Sie den Diagrammtyp „ $v_o$  vs. [S]“!

Mit den Schiebern (Pfeilen) an **beiden** Achsen können Sie eine Ausgleichskurve finden. Ergänzen Sie Ihre Versuchsdaten, so dass eine möglichst genaue Übereinstimmung mit einer der einstellbaren Kurven erzielt werden kann.

Lesen Sie die Werte von  $v_{max}$  und  $K_m$  ab!

Versuchen Sie eine Interpretation! *Notfalls* befragen Sie Ihr Schulbuch!

#### 5 Interpretation

$v_{max}$  liegt bei ..... und bedeutet: .....

$K_m$  liegt bei ..... und bedeutet: .....

Erläuterung der Enzymabhängigkeit von der Substratkonzentration auf die Rückseite!

#### 6 Ergebnis

Vergleichen Sie die gemessenen Zahlen mit denen anderer Enzyme aus dem Internet oder der Literatur.

Für einen noch besseren Vergleich benötigte man die „Wechselzahl“ der Invertase.

Die Wechselzahl der hier simulierten Invertase wird von den Autoren leider nicht gegeben.

## 4. Experiment: Inhibitoren

### 1 Problem

Enzyme werden durch „Inhibitoren“ in ihrer Aktivität behindert oder gesteuert.

Schwermetalle hemmen viele Enzyme, Medikamente wie Penicillin sollen es gezielt tun.

Die Inhibitoren wirken auf ganz verschiedene Weise.

**Sie sollen die in EnzymeLab angebotenen Inhibitoren auf ihre Wirkungsweise testen.**

### 2 Vorgehensweise

Bilden Sie 3 Gruppen; jede Gruppe beschäftigt sich mit einem der Inhibitoren: Acarbose, DRI-Inhibitor B und I-Arabinose.

Ein Versuch besteht in der Erstellung eines Lineweaver-Burk-Diagramms mit **einer** Konzentration Ihres Inhibitors.

Sie müssen also das ganze Spektrum geeigneter Substratkonzentrationen durchmessen. Die pH- und Temperaturwerte sollten von allen Kursteilnehmern einheitlich verwendet werden: Entweder Sie nehmen die „default“-Werte (pH=4,0; t=40°) oder die von Ihnen vorher bestimmten Optima.

Sie sollten ca. 4 solche Versuche durchführen, und zwar einen ohne Inhibitor und drei zu verschiedenen Inhibitorkonzentrationen.

Plotten Sie die 4 resultierenden Kurven mit 4 Farben in ein Diagramm:

Die jeweiligen Daten werden in der Ergebnistabelle markiert, eine Kurvennummer eingegeben und dann geplottet.

### 3 Sicherung zur Auswertung

Berechnen Sie für jedes Diagramm aus den mit den Schiebern eingestellten Werten für  $1/v_{\max}$  und  $1/K_m$  mit dem „Calculator“ des EnzymeLab oder Ihrem Taschenrechner die Werte für  $v_{\max}$  und  $K_m$  und tragen Sie sie in die entsprechenden Felder ein.

Speichern Sie das Kombinationsdiagramm unter einem sprechenden Namen!  
(z.B. Inh.Aca0,5.Vorname)

Wichtig: Alle Kursteilnehmer sollten sich strikt an die Namenskonvention halten!!!}

### 4 Auswertung

Vergleichen Sie die Diagramme sowie die Werte von  $v_{\max}$  und  $K_m$  untereinander!

Was ändert sich?

Informieren Sie sich (noch einmal) über die Modellvorstellung einer Enzym geförderten Reaktion und erarbeiten Sie Vermutungen, wie und wo die Inhibitoren eingreifen!

Vergleichen Sie mit den Hemmungstypen, die in der Literatur beschrieben sind!

## 4a. Theorie: Mathematik und Lineweaver- Burk- Diagramm

V 2.2; Dez 17

### 1 Die Michaelis-Menten-Gleichung

(verändert nach Stryer 1996)

Bei vielen Enzymen variiert die Katalysegeschwindigkeit  $v$  mit der Substratkonzentration  $[S]$ .  $V$  ist definiert als die Anzahl der pro Sekunde entstehenden Mole des Produktes.

Für sehr kleine  $[S]$  wächst  $v$  annähernd linear mit  $[S]$

Für sehr große  $[S]$  ist  $v$  praktisch von  $[S]$  unabhängig

Durch diverse Überlegungen über die Einzelgeschwindigkeiten der Bildung und des Zerfalls der Enzym-Substratkomplexes kommt man zu der Gleichung:

$$\star \quad V = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad \text{oder vereinfacht} \quad V = \frac{V_m \cdot S}{S + K_M}$$

Dabei hängt  $K_M$ , die Michaelis-Menten-Konstante, von Bildungs- und Zerfalls-geschwindigkeit des Enzym-Substrat-Komplexes ab und  $V_{\max}$  ist die Maximalgeschwindigkeit.

Es folgt daraus:

1.  $[S] \ll K_M \Rightarrow V \approx \frac{V_{\max}}{K_M} \cdot [S]$   $V$  ist proportional zu  $[S]$

2.  $[S] = K_M \Rightarrow V = \frac{1}{2} V_{\max}$  Damit bekommt  $K_M$  eine Bedeutung!!

3.  $[S] \gg K_M \Rightarrow V \approx V_{\max}$

Also werden oben genannte Beobachtungen durch die Gleichung gut modelliert.

### 2 Das Lineweaver-Burk-Diagramm - eine „doppelt reziproke“ Darstellung

Das Schaubild der Funktion  $\star$  ist ein Hyperbel-Ast, der anschaulich schwer zu interpretieren ist. Durch eine geeignete Umformung erhält man eine lineare Funktion:

Man trägt die Kehrwerte von den beiden Größen  $V$  und  $[S]$  im Diagramm auf.

$$V = \frac{V_m \cdot S}{S + K_M} \Leftrightarrow \frac{1}{V} = \frac{S + K_M}{V_m \cdot S} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_M}{V_m} \cdot \frac{1}{S}$$

Das ist eine Geradengleichung mit „ $x = 1/S$ “ und „ $y = 1/V$ “ !!

Dabei ist  $1/V_m$  der „y-Achsenabschnitt“;

$K_M/V_m$  ist die Steigung,  $-1/K_M$  der „x-Achsenabschnitt“ der Geraden.

Die beiden Größen können also direkt aus dem Schaubild abgelesen werden.

Man muss nur noch den Kehrwert bilden (bzw. das Vorzeichen wechseln) und erhält  $V_m$  und  $K_M$

## 4b. Theorie: Inhibition und Lineweaver- Burk- Diagramm

V 2.2; Dez 17

### 1 Allosterische und kompetitive Hemmung

Die beiden Grundkonzepte sollten bekannt sein (vgl. diverse Schulbücher)

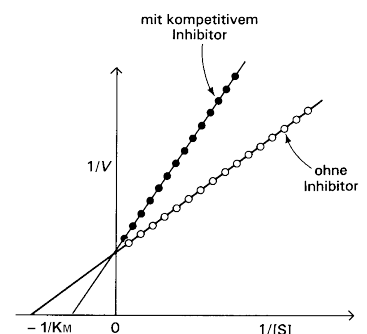
Es muss herausgearbeitet werden, dass es sich bei allen Reaktionen um statistische Prozesse handelt, bei denen bestimmte Zustände ( $[E]+[S]$ ;  $[ES]$ ;  $[E]+[P1]+[P2]$  usw.) mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit vorkommen, die von Affinitäten abhängen.

- Eine kompetitive Hemmung ist dadurch gekennzeichnet, dass das Substrat etwas seltener bzw. kürzer einen Komplex mit dem Enzym bildet als ohne Inhibitoren. Bei kleinen Substratkonzentrationen ( $[S] \ll [I]$ ) wird die Reaktionsgeschwindigkeit  $V$  also durch  $I$  verringert. Wenn  $[S]$  aber sehr groß ist ( $[S] \gg [I]$ ), spielen die Inhibitoren aber keine Rolle mehr.  $V_{\max}$  bleibt also unverändert - auch wenn sie erst bei höherem  $[S]$  erreicht wird.
- Die allosterische Hemmung ist dadurch gekennzeichnet, dass ein nennenswerter Prozentsatz der Enzymmoleküle keinen  $[ES]$ -Komplex bilden können. Die Gesamtzahl aktiver Enzyme ist kleiner; die Maximalgeschwindigkeit also verringert.

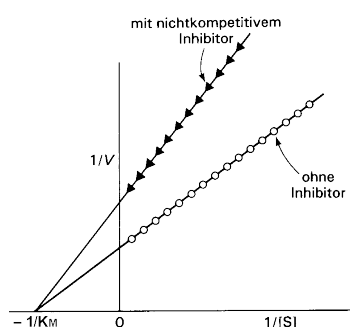
### 2 Auswirkungen im Lineweaver-Burk-Diagramm

Daraus ergeben sich Vermutungen bzgl. der Veränderungen der Lineweaver-Burk-Diagramme eines Enzyms in Abhängigkeit von der Inhibitorenkonzentration (bei gleicher Enzymkonzentration - die hier durch das Programm vorgegeben ist.)

- Die Gerade sollte mit einem **kompetitivem** Inhibitor gegenüber der ohne Inhibitor um den „y-Achsen-Schnittpunkt“  $\left(0 \mid \frac{1}{V_{\max}}\right)$  gedreht und steiler sein.



- Die Gerade sollte mit einem **allosterischem** Inhibitor gegenüber der ohne Inhibitor um den „x-Achsen-Schnittpunkt“  $\left(\frac{1}{-KM} \mid 0\right)$  gedreht und ebenfalls steiler sein.



### 3 Kooperative bzw. allosterische Enzyme folgen nicht der Michaelis-Menten-Kinetik.

Die Kinetiken sind nicht hyperbolisch, sondern sigmoid. Die Bindung eines Substrates, Aktivators oder Inhibitors an eines der aktiven Zentren beeinflusst die Bindungsstärke an dem anderen.

Entsprechendes gilt für die Sauerstoff-Bindungskurven:

- bei Myoglobin hyperbolisch,
- bei Hämoglobin jedoch sigmoid.

## 5. Informationen Invertase

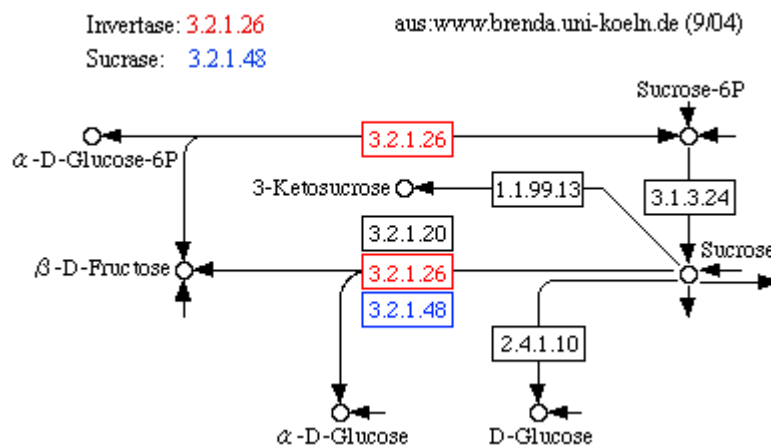
V 2.2; Dez 17

### 1 Nomenklatur

**Invertase (EC 3.2.1.26)** kommt in Pilzen (z.B. Hefe), Bakterien und Pflanzen vor.  
 = beta-fructofuranosidase, Acid sucrose-6-phosphate hydrolase u.v.a.m.  
 Sigma: 1 unit corresponds to the amount of enzyme which hydrolyzes  
 1  $\mu\text{mol}$  saccharose per minute at pH 4.65 and 25°C  
 wissenschaftlicher Name: Beta-fructofuranosidase

**Sucrase (EC 3.2.1.48)** ist das entsprechende Enzym bei Vertebraten (u.a.)  
 = Saccharase = sucrase-isomaltase = sucrose alpha-D-glucohydrolase  
 hydrolysis of sucrose and maltose by an alpha-D-glucosidase-type action

### 2 Stoffwechselgrafik (i.w. reduziert auf die beiden Enzyme)



### 3 Eigenschaften der Invertasen - es gibt sehr viele mit unterschiedlichen Optima usw.

3.1 Beispiele aus [www.brenda.uni-koeln.de](http://www.brenda.uni-koeln.de);  
 alle Angaben beziehen sich auf Saccharose / Sucrose) als Substrat:  
 Die Originalautoren geben leider nicht immer alle Daten an.

Organismus	Mol-Gewicht	Temp-Opt.	pH-Opt	Wechselzahl	spez. Aktivität $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	Km
Azotobacter chroococcum	57000	45	6,5	6000	0,02	—
Thermotoga maritima	—	90	4,2-7,1	156000 (Sucrose) 8400 (Raffinose)	2390	15
aus Gesamttabelle:	55000-74000	30 - 50	3 - 5,5		2560 - 4700	7,2 - 41,2

3.2 Saccharose kann in großen Konzentrationen auch als Inhibitor wirken.  
 (Substratinhibition)

## 4 Anwendungen

- 4.1 Invertase wird für Süßwaren (z.B. in Pralinen, Marzipan, Kunsthonig) verwendet, um den Gehalt an Saccharose zu verringern. Das erzeugte Gemisch „Invertzucker“ aus Glucose und Fructose kristallisiert nicht (so leicht) aus und hält die Süßwaren cremig.  
Als Lebensmittel-Zusatzstoff hat die Invertase die Nummer E1103.
- 4.2 aus: **DURDAVASIC-RACKI: History of Industrial Biotransformations – Dreams and Realities.** Faculty of Chemical Engineering and Technology; University of Zagreb.

Invertase was probably the first immobilized enzyme to be used commercially for the production of Golden Syrup by Tate & Lyle during World War II, because sulfuric acid as the preferred reagent was unavailable at that time.

Yeast cells were autolysed and the autolysate clarified by adjustment to pH 4.7, followed by filtration through a calcium sulphate bed and adsorption into bone char. A bone char layer containing invertase was incorporated into the bone char bed, which was already used for syrup decolorisation. The scale of operation was large, the bed of invertase-char being 60 cm deep in a 610 cm deep bed of char. The preparation was very stable since the limiting factor was microbial contamination or loss of decolorising power rather than the loss of enzymatic activity. The process was cost-effective but the product did not have the flavor quality of the acid-hydrolysed material. This is the reason why the immobilized enzyme was abandoned once the acid became available again.

vgl.: Nelson, J.M., Griffin E.G. (1916) Adsorption of invertase, J. Am. Chem. Soc. 38, 1109–1115

### 4.3 Das INVERTASE Projekt

aus: **Forschungsbericht 1997-98 Uni Münster**

gefunden 2/04

Fachbereich 18, Arbeitsbereich Prof. B.M.Moerschbacher

<http://www.uni-muenster.de/Rektorat/Forschungsberichte-1997-1998/fo18cb06.htm>

Hat der Pilz eine Wirtszelle erfolgreich penetriert und ist ihm ohne Elicitierung induzierbarer Resistenzreaktionen die Bildung eines reifen Haustoriums im periplasmatischen Raum der Wirtszelle gelungen, so muß er im folgenden die **Kontrolle über den Primärstoffwechsel** seiner Wirtspflanze übernehmen. Dies gilt zumindest für biotrophe Pathogene wie die Rostpilze, die ihr Wirtsgewebe nicht abtöten dürfen, da sie - aus noch unbekanntem Gründen - nicht in der Lage sind, sich von der Substanz toten Wirtsgewebes zu ernähren. Diese Pathogene sind daher zwingend auf die **photosynthetischen Assimilate** ihres Wirtsgewebes als Nahrungsquelle angewiesen. Diese werden in gesunden ausdifferenzierten "Source" -Blättern fast quantitativ über das Phloem in die "Sink"-Gewebe exportiert. Das Pathogen muß also diesen Phloemexport der Assimilate verhindern und selbst als "**Sink**" auftreten. Um diese Umsteuerung des Primärstoffwechsels im infizierten Gewebe zu analysieren, haben wir umfangreiche Untersuchungen zu Photosynthese, Assimilaten, Respiration und Phloemexport unternommen. Kurz zusammengefaßt läßt sich feststellen, daß der Hexosenpool in infizierten Blättern trotz verringerter Photosynthese und erhöhter Respiration unverändert hoch bleibt, auf Kosten eines stark verringerten Saccharosepools und eines fast vollständig zum Erliegen kommenden Phloemexports.

**Als verantwortlich für all diese Veränderungen haben wir eine extrazelluläre pilzliche Invertase identifiziert.** Unsere derzeitige Arbeitshypothese geht davon aus, daß der Rostpilz durch Sekretion dieser Invertase in den Apoplasten des infizierten Gewebes die Saccharose auf ihrem Weg von den Mesophyllzellen ins Phloem hydrolysiert. Da die phloembeladenden Geleitzellen jedoch nur Saccharose aufnehmen können, verbleiben die Hexosen im infizierten Gewebe und stehen dem Pilz für seine Ernährung zur Verfügung. Laufende Arbeiten befassen sich mit der Verifizierung dieser Hypothese, derzufolge wir die pilzliche Invertase als einen "späten Pathogenitätsfaktor" bezeichnet haben.



## **5 Invertase - Information aus TransGen** (leicht verändert, Du)

**10.10.04**

### **Wirkung**

Modifikation von Zuckern

### **Anwendungsbereiche**

Süßwaren, Marzipan

### **gentechnische Herstellung**

möglich

### **Kennzeichnung Lebensmittel**

nein

### **Wirkung**

Invertasen sind in der Natur weit verbreitet. Sie kommen etwa im Verdauungstrakt von Säugetieren und Menschen vor. Sie spalten gewöhnlichen Zucker (Saccharose) in Fruchtzucker (Fruktose) und Traubenzucker (Glukose). Dabei wird die rechtsdrehende Saccharose in die linksdrehende Fruktose überführt. Die bei dieser enzymatischen Aufspaltung entstehende Mischung wird als Invertzucker bezeichnet. Die Invertasen der Bienen sind für den Gehalt an Invertzucker im Honig verantwortlich.

### **Verwendung**

Invertase bzw. der damit erzeugte Invertzucker wird vor allem bei Süßwaren eingesetzt, um die unerwünschte Bildung von Zuckerkristallen bei Marzipan, Pralinenfüllungen oder Lebkuchenmassen zu verhindern. Anders als gewöhnlicher Zucker besitzt die durch die Wirkung der Invertase gebildete Fruktose ein schlechtes Kristallisationsverhalten. Invertase kann auch in feste Zuckermassen injiziert werden, um sie nachträglich zu verflüssigen. Diese Eigenschaft der Invertase wird etwa bei Pralinen mit flüssigen Füllungen benutzt.

### **Gentechnik**

Invertase wird in der Regel biotechnisch mit Hilfe von Hefen gewonnen. Der Einsatz gentechnisch veränderter Hefen ist möglich. Derzeit wird in Europa ein Invertase-Präparat hergestellt. Die dabei verwendeten Hefestämme gelten im Sinne gesetzlicher Definitionen nicht als gentechnisch verändert.

### **Kennzeichnung**

Lebensmittel-Enzyme werden nicht auf der Zutatenliste aufgeführt. Eine Kennzeichnung im Hinblick auf die Herstellung mit gv-Mikroorganismen ist daher nicht erforderlich bzw. zu erwarten.

## 6. Literatur und Internetquellen

V 2.2; Dez 17

- Wild 1999 Wild,A. (1999): Pflanzenphysiologische Versuche in der Schule. 1.Aufl., Quelle&Meyer, Wiebelsheim
- Stryer 1996 Stryer,L. (1996): Biochemie. 4.Aufl., Spektrum, Heidelberg
- ergiebige Schulbücher:**
- Bickel 1995 Bickel,H. u.a. (1995): Natura 3 (Oberstufe). 1.Aufl., Klett, Stuttgart
- Bayrhuber, Kull 1998 Bayrhuber,H.; Kull,U. (Hrsg.) (1998): Linder Biologie. 21.Aufl., Metzler/Schroedel, Hannover
- Weber 2002 Weber,U. (Hrsg.) (2002): Biologie Oberstufe Gesamtband. 1.Aufl., Cornelsen, Berlin
- Internet:**
- BRENDA Datenbank Umfassendes Enzym Informations System;  
<http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.2.1.26>
- EXPASY Datenbank Enzym-Datenbank mit kompletter Nomenklatur und Literaturverweisen  
<http://enzyme.expasy.org/EC/3.2.1.26>
- Brocksieper, Fetz 2003 Brocksieper,U., Fetz,S. (2003): EnzymeLab - ein Unterrichtsvorschlag (unveröffentlicht)
- Durst 2004 Durst,B. (2004): EnzymeLab - das Blitzlabor im Computer (unveröffentlicht; z.T. unter [www.azul-online.de](http://www.azul-online.de))
- TransGen <http://www.transgen.de/lebensmittel/1051.lebensmittelenzyme-gentechnisch-hergestellt.html>