

Hinweise

Dies sind Protokolle zum Praktikum „Pflanzenphysiologie“ an dem ich im WS 2001 / 2002 teilgenommen habe. Allerdings enthält dieses Dokument nur die Protokolle zu den Versuchen, die ich selber verfasst habe. Die übrigen Versuche wurden von den anderen Gruppenmitgliedern beschrieben. Natürlich haben meine Protokolle keinen Anspruch auf Vollständigkeit und Fehlerlosigkeit. Sie basieren auf dem Skript zum Praktikum, auf das auch zahlreiche Verweise gemacht werden. Die Korrekturen der Assistenten habe ich noch nachträglich eingefügt. Diese Version wurde also von den Praktikumsleitern als geeignet anerkannt.

Wasserhaushalt

Versuch 6: Isotonische Koeffizienten einiger Salze

Einleitung:

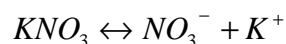
Dieser Versuch gehört zum Oberthema Osmose. Allgemein gesagt ist Osmose die Nettobewegung von Wasser (Diffusion) durch semipermeable Membranen vom Ort der niedrigeren Konzentration des Stoffes, der nicht permeabel ist, zum Ort seiner höheren Konzentration, also dem der niedrigeren Wasserkonzentration. Die Osmose ist neben der Quellung in der Pflanze ein wichtiger Mechanismus zur Wasseraufnahme und – abgabe in den Zellen und zum Wassertransport in der Pflanze. Dabei strömt das Wasser spontan nur von Orten mit höherem Wasserpotential ψ_w zu Orten mit niedrigerem ψ_w , also entlang eines fallenden ψ_w - Gradienten. Zwischen Orten mit gleichem ψ_w - Wert findet kein Nettostrom von Wasser statt. ψ_w berechnet sich folgendermaßen:

$$\psi_w = \psi_p + \psi_\pi$$

Dabei ist ψ_p das Druckpotential und ψ_π das osmotische Potential. Wasser strömt also solange, bis sich der hydrostatische Druck und das Diffusionsbestreben ausgleichen.

Gibt man eine Zelle in eine Lösung, die ein kleineres ψ_w als das Zellinnere aufweist, tritt das „Plasmolyse“ genannte Phänomen auf, dass sich der Protoplast von der Zellwand ablöst. Dies liegt daran, dass Wasser aus der Vakuole ausströmt und die Vakuole kleiner wird. Dadurch wird der Turgor geringer und damit auch $\psi_{w(\text{Zelle})}$, d.h. das Bestreben Wasser aufzunehmen wird größer. In der Zellumgebung wird $\psi_{w(\text{Lsg.})}$ größer, d.h. das Bestreben Wasser aufzunehmen wird kleiner. Das Wasser strömt solange aus, bis sich ψ_w des Außenraumes (mit Zellwandraum) und in der Vakuole ausgeglichen haben. Auf beide Systeme wirkt „nur“ der (gleiche) atmosphärische Druck. Weil der Tonoplast nicht mehr gegen die Zellwand drückt und dem Druck derselben entgegenwirkt, schrumpft die Zelle. Durch Deplasmolyse kann dieser Zustand (meist) wieder rückgängig gemacht werden, nämlich indem die Außenlösung durch Wasser ersetzt wird.

Der isotonische Koeffizient k_i gibt an, in wie viele Teilchen ein Molekül in wässriger Lösung dissoziiert. Ein Stoff, dessen Moleküle gar nicht dissoziieren hat also einen k_i von 1, wie dies im Versuch bei Rohrzucker (RZ) der Fall ist. Für KNO_3 ist $k_i \leq 2$, denn es dissoziiert in K^+ - Ionen und NO_3^- - Ionen. Weil aber nicht immer alle Moleküle dissoziiert sind, denn ständig passiert in wässriger Lösung folgendes, auch im Lösungsgleichgewichtes und bei dessen Einstellung:



Daher liegen die Moleküle z.T. in dissoziierter Form vor und zum anderen Teil nicht. Der ist k_i von $CaCl_2$ ist demnach ist $k_i \leq 3$. k_i beeinflusst direkt das Wasserpotential der Lösung, denn

je mehr Teilchen im Wasser gelöst sind, desto niedriger ist das Wasserpotential. Im Versuch wollen wir k_i genau ermitteln.

Zunächst ermitteln wir die osmotische Wirksamkeit der Salze durch Untersuchung auf Grenzplasmolyse. Grenzplasmolyse tritt auf, wenn $\psi_w(\text{Zelle}) = \psi_w(\text{umgebende Lsg.})$. Dann ist der Nettostrom des Wassers gleich Null und im Zellinneren und in der Umgebung der Zelle liegen gleiche Konzentrationen vor. Unter diesen Bedingungen zeigt der Tonoplast erste Anzeichen der Ablösung von der Zellwand. Im Versuch soll als Grenzplasmolyse der Zustand gelten, in dem 50% aller Zellen die beginnende Ablösung der Protoplasten zeigen, weil die Grenzplasmolyse selber sehr schwer nachzuweisen ist. Mit der Konzentration bei dem Grenzplasmolyse auftritt, ergibt sich folgende Rechnung für den isotonischen Koeffizient der Salze:

$$\psi_{w(\text{Zelle})} = \psi_{w(\text{Lsg})} = \psi_{p(\text{Lsg})} \quad \text{weil } \psi_{p(\text{Lsg})} = 0 \text{ bei Grenzplasmolyse}$$

$$\Rightarrow \psi_{p(\text{Rohrzucker})} = \psi_{p(\text{KNO}_3)} = \psi_{p(\text{CaCl}_2)} \quad \text{weil nur der atmosphärische Druck wirkt}$$

$$\Rightarrow -k_{i(\text{RZ})} * c_{\text{RZ}} * R * T = -k_{i(\text{Salz})} * c_{\text{Salz}} * R * T \quad \text{nach Vant Hoff}$$

$$\Rightarrow k_{i(\text{RZ})} * c_{\text{RZ}} = k_{i(\text{Salz})} * c_{\text{Salz}} \quad \text{kürzen}$$

$$\Rightarrow k_{i(\text{Salz})} = \frac{c_{\text{RZ}}}{c_{\text{Salz}}} \quad \text{weil } k_{i(\text{RZ})} = 1$$

Die Konzentration bei der 50% aller Zellen plasmolysiert sind, ermitteln wir graphisch, indem wir den Prozentanteil der plasmolysierten Zellen gegen die Konzentration auftragen, eine Ausgleichsgerade durch die Punkte legen und ablesen, bei welcher Konzentration 50% der Zellen plasmolysiert vorliegen. Dies machen wir, weil die geschätzten Prozentzahlen sehr ungenau sind und wir z.T. auch keine Konzentration getestet haben, bei der 50% der Zellen plasmolysiert sind. So werden wir allen Messwerten gerecht.

Allgemein erwarten wir bei allen drei Lösungen bei niedrigen Konzentrationen einen geringeren Prozentanteil an plasmolysierten Zellen als bei höheren Konzentrationen. Dies liegt daran, dass mit der Zunahme an gelösten Teilchen (d.h. bei höheren Konzentrationen) das ψ_w der Lösung abnimmt, also die Differenz $\psi_w(\text{Zelle})$ und $\psi_w(\text{umgebende Lsg.})$ größer wird. Beim Vergleich der Lösungen untereinander erwarten wir, dass RZ – Lösung die höchste Konzentration von allen benötigen wird, um die gleiche Prozentzahl an plasmolysierten Zellen hervorzurufen wie die anderen. Die zweithöchste Konzentration wird KNO_3 benötigen. und die niedrigste wird CaCl_2 benötigen.

Material und Methoden:

Die Flächenschnitte von *Rhoeo discolor* wurden nicht nach einer halben Stunde, wie im Skript angegeben, sondern

- a) in Rohrzuckerlösung : nach 20 min
- b) in KNO₃ – Lösung : nach 10 min
- c) in CaCl₂ – Lösung : nach 15 min ausgewertet.

sonstige Durchführung: s. Skript

Resultate:

zu Aufgabe 1 i):

Tabelle 1: Auswertung der Flächenschnitte

c(Ca Cl₂) in Mol/l	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09	0,10
% der plasmolysierten Zellen	10	20	35	50	70	80
c(KNO₃) in Mol/l	0,10	0,11	0,12	0,13	0,14	0,15
% der plasmolysierten Zellen	05	13	24	38	49	87
c(Rohrzucker) in Mol/l	0,10	0,12	0,14	0,18	0,20	0,22
% der plasmolysierten Zellen	00	05	10	60	75	90

sonstige Resultate: s. Diagramm 2

zu Aufgabe 2):

$$i) \quad k_{i(KNO_3)} = \frac{c_{RZ}}{c_{KNO_3}} \Rightarrow k_{i(KNO_3)} = \frac{0,172 \frac{Mol}{l}}{0,146 \frac{Mol}{l}} = 1,178$$

$$ii) \quad k_{i(CaCl_2)} = \frac{c_{RZ}}{c_{CaCl_2}} \Rightarrow k_{i(CaCl_2)} = \frac{0,172 \frac{Mol}{l}}{0,078 \frac{Mol}{l}} = 2,205$$

Diskussion:

Die Ergebnisse waren wie erwartet. Der k_i von RZ ist am geringsten, der von KNO_3 am zweithöchsten und der von CaCl_2 am höchsten. Dass bei niedrigen Konzentrationen der Lösungen ein geringerer Prozentanteil an plasmolysierten Zellen als bei höheren Konzentrationen vorliegt, liegt daran, dass mit der Zunahme an gelösten Teilchen (d.h. bei höheren Konzentrationen) das ψ_w der Lösung abnimmt, also die Differenz $\psi_w(\text{Zelle})$ und $\psi_w(\text{umgebende Lsg.})$ größer wird. Es strömt mehr Wasser aus der Vakuole, bis $\psi_w(\text{Zelle}) = \psi_w(\text{umgebende Lsg.})$ ist. Je mehr Wasser ausströmt, umso mehr löst sich der Protoplast von der Zellwand. Je größer der ψ_w Unterschied zwischen Medium und Zellen ist, desto mehr Zellen plasmolysieren.

Dass RZ – Lösung die höchste Konzentration von allen Lösungen benötigt, um die gleiche Prozentzahl an plasmolysierten Zellen hervorzurufen wie die anderen Lösungen, liegt daran, dass RZ den geringsten k_i aufweist. Werden gleiche Mengen der drei Stoffe in gleichen Volumina Wasser gelöst, sind also in der RZ – Lösung weniger Teilchen als in der KNO_3 – Lösung und in dieser wiederum weniger Teilchen als in der CaCl_2 – Lösung. Damit in gleichen Volumina der Lösungen gleiche Teilchenmengen vorliegen, muss also die RZ – Lösung am höchsten konzentriert sein, die KNO_3 – Lösung am zweithöchsten und CaCl_2 – Lösung am geringsten von diesen drei Lösungen. Dann rufen gleiche Volumina die gleiche Anzahl an plasmolysierten Zellen hervor.

Es sei noch angemerkt, dass diese Methode sehr ungenau ist. Der Anteil plasmolysierter Zellen ist nur sehr grob abgeschätzt, da auch in einem „kleinen“ Ausschnitt des Blattes unter dem Lichtmikroskop immer noch wenigstens hundert Zellen sind. Zudem ist es nicht möglich die Lösungen exakt zu pipettieren und vor allem die Zellen in der RZ – Lösung zeigten nicht immer das erwartete Resultat.

zu Aufgabe 1 ii):

Ein Osmotikum ist umso osmotisch wirksamer, in je mehr Teilchen es in wässriger Lösung dissoziiert. Denn so braucht nur eine geringe Menge des Osmotikums in Wasser gelöst zu werden, um eine hohe Konzentration, d.h. Teilchendichte, zu erzeugen. Je höher die Konzentration der Lösung ist, umso kleiner ist ψ_w , d.h. das Bestreben Wasser aufzunehmen, um die Konzentration zu verringern, ist umso größer. Umso osmotisch wirksamer ein Osmotikum ist, umso geringer ist die Grenzkonzentration, die Grenzplasmolyse hervorruft. Damit nämlich in gleichen Volumina der Lösungen gleiche Teilchenmengen (Konzentrationen) vorliegen, muss die RZ – Lösung am höchsten konzentriert sein, die KNO_3 – Lösung am zweithöchsten und die CaCl_2 – Lösung am geringsten von diesen drei Lösungen. Dann rufen sie die gleiche Anzahl an plasmolysierten Zellen hervor. Das CaCl_2 ist also das wirksamste Osmotikum der drei Stoffe aus dem Versuch. danach kommt das die KNO_3 als zweitwirksamstes Osmotikum und zuletzt der RZ.

zu Aufgabe 3):

Durch Dissoziation von je 100 Salzmolekülen entstehen

- i) $100 * 2,205 = 220,5$ osmotisch wirksame Teilchen im Falle von CaCl_2
- ii) $100 * 1,178 = 117,8$ osmotisch wirksame Teilchen im Falle von KNO_3

**Versuch 8: Einfluss des pH – Wertes auf die Quellung von Proteinen
(isoelektrischer Punkt IEP)**

Einleitung:

Dieser Versuch gehört zum Oberthema Quellung. Die Quellung ist ein weiterer Mechanismus den Pflanzen, neben der Osmose, zur Wasseraufnahme nutzen. Als Quellung wird die Aufnahme von Flüssigkeiten durch „Stoffe“ (Gele) bezeichnet, die zu einer Volumenzunahme (und natürlich Gewichtszunahme) der Stoffe ohne Aggregatzustandsänderung führt. Bei der Quellung dringt das Quellmittel in die plastisch und elastisch deformierbare Struktur des Quellkörpers ein (d.h. es bilden sich Hydrathüllen um polare Gruppen) und drängt sie auseinander, wodurch sich die Volumenzunahme erklären lässt. Der wesentliche Unterschied der Quellung zur Wasseraufnahme poröser Körper besteht in genau dieser Volumenzunahme. Bei letztgenannter füllen sich Kapillaren (vorgebildete Hohlräume) mit Flüssigkeit, was aber das Volumen nicht beeinflusst, sondern nur zu einer Gewichtszunahme führt. Die Quellung lässt sich (meist) rückgängig machen, wenn dem Quellkörper das Wasser wieder entzogen wird.

Wie bereits die Überschrift sagt, geht es im Versuch um Quellung von Proteinen. Proteine sind Makromoleküle aus Aminosäuren mit polaren Gruppen. Dies sind hauptsächlich die Aminogruppe (NH_2) mit basischen Eigenschaften und die Carboxylgruppe (COOH) mit sauren Eigenschaften. Man sagt, Proteine sind amphoter, denn wegen ihrer basischen und sauren Gruppen, die beide hydrophil sind, können sie sich sowohl in sauren als auch basischen Lösungsmitteln (mehr oder weniger gut) lösen. In wässriger Lösung dissoziieren diese Gruppen in verschiedenem Maß (abhängig vom pH- Wert) und werden zu Ladungsträgern. Um diese Ladungen lagern sich die Wasser – Dipol – Moleküle mit ihrem entsprechend entgegengesetzt geladenen „Pol“, so dass Hydratationshüllen entstehen. Von deren Zahl und Größe hängt der Quellungsgrad des Proteins ab, denn mit ihnen ändert sich die Menge des gebundenen Wassers. Die Ladung von Proteinen hängt, wie schon erwähnt, vom pH – Wert des Lösungsmittels ab. In einer Lösung mit hohem pH – Wert, liegt größtenteils die COOH – Gruppe in dissoziierter Form (COO^-) vor und in einer Lösung mit niedrigem pH – Wert, liegt größtenteils die NH_2 – Gruppe in protonierter Form (NH_3^+) vor. Jedes Protein besitzt einen IEP, der pH – Wert bei dem die Nettoladung des Proteins gleich Null ist. Er liegt für die meisten Proteine im (leicht) sauren Bereich, weil das Dissoziationsvermögen der COOH – Gruppe meist stärker ist, als das der NH_2 – Gruppe. Den IEP vom Protein Gelatine wollen wir experimentell ermitteln. Dabei machen wir uns zunutze, dass im IEP die Affinität des Proteins zu Wasser geringer ist als bei allen anderen pH – Werten. Wenn also das Wasser entzogen wird, flockt das Protein aus der Lösung aus, weil der Wert der Hydratationshüllen, die nötig sind, damit es in Lösung bleibt, unterschritten wird. Den Wasserentzug realisieren wir mit dem org., amphipolaren Lösungsmittel Aceton. Da dieses polare Eigenschaften aufweist, kann es Wasser an sich binden. Wir messen, wieviel Aceton zutitriert werden muss, bis Ausflockung auftritt. Da im IEP die wenigsten Hydrathüllen vorliegen, müssen wir also am wenigsten Aceton zutitrieren. Den IEP ermitteln wir graphisch, indem wir bei verschiedenen pH – Werten den Acetonverbrauch messen, eine Ausgleichsparabel durch die Punkte legen und den niedrigsten Punkt bestimmen. Dies machen wir, weil wir nicht genug Messwerte für eine exakte Bestimmung messen.

Material und Methoden:

s. Skript

Resultate:

Tabelle 1: Acetonverbrauch in Abhängigkeit vom pH - Wert

pH	03,8	04,1	04,7	05,3	05,6
Acetonverbrauch in ml	16,5	14,2	13,0	13,2	13,3

weitere Resultate: s. Diagramm 1

Diskussion:

Die Ergebnisse sind wie erwartet. Mit höher werdendem pH – Wert bis zum IEP müssen wir weniger Aceton zutitrieren, da weniger Hydrathüllen vorliegen, denn die Nettoladung des Proteins sinkt, weil weniger polare Gruppen vorhanden sind. Der IEP liegt im pH – Wert – Bereich von 4,7 bis 5,3, denn bei Messungen mit einem pH – Wert größer als 4,7 nimmt die Menge des Acetons, die zutitriert werden muss, wieder zu. Dies liegt daran, dass das Protein wieder mehr Ladungen aufweist, also mehr Hydratationshüllen. Seine Affinität zum Wasser ist höher, daher kommt es nicht so schnell zu einer Ausflockung.

Die Auswertung des Graphen ergibt als IEP einen pH – Wert von ca. 4,9, wie erwartet im (leicht) sauren Bereich.

Literatur:

Biologie
Pflanzenphysiologie

Neill A. Campbell
Schopfer, Mohr

4.Auflage

Spektrum
Springer

Photosynthese

Versuch 4: Isolierung der Photosynthesepigmente aus Spinatblättern

Hinweis:

Versuch 4 und Versuch 5 wurden zusammen ausgewertet, daher sind Abkürzungen und schon beschriebene Sachverhalte aus Versuch 4 in Versuch 5 nicht mehr erwähnt.

Einleitung:

In diesem Versuch werden aus Spinatblättern die Photosynthesepigmente isoliert. Es sind die in höheren Pflanzen vorkommenden Pigmente Chlorophyll (Chl.)a [blaugrün], Chl. b [gelbgrün], Lutein und β - Carotin. Dieser Versuch wird vorbereitend auf Versuch 5 durchgeführt, in dem dann die Absorptionsspektren der einzelnen Pigmente ermittelt werden.

Die Photosynthesepigmente sind die Lichtrezeptoren der Pflanzen. Sie „wandeln“ die bei den Lichtreaktionen benötigte Lichtenergie in chem. Energie (in Form von energiereichen Elektronen) um. Bei Pflanzen sind die Chloroplasten der Ort der Photosynthese. Auf den Thylakoidmembranen der Chloroplasten, insbesondere denen der Grana, befinden sich die Photosynthesepigmente. Dort sind sie in sog. Photosystemen (PS) organisiert. Der größte Teil der Pigmente hat dort die Funktion von Antennenpigmenten, die photochemisch inaktiv sind. So kann das Licht auf einer größeren Oberfläche und über ein breiteres Spektrum absorbiert werden. Jeder Antennenkomplex besteht aus mehreren hundert Chl.a, Chl.b und Carotinoidmolekülen. Sie sind jeweils um ein Chl.a – Dimer, das mit versch. Proteinen assoziiert ist und photochemisch aktiv ist, herum organisiert. Das mittlere Verhältnis von Antennenpigmenten zu Reaktionszentren (RZ) ist 300 : 1. Zusammen mit einem primären Elektronenakzeptor bildet das Chl.a – Dimer das RZ. Es gibt zwei PS:

1.PS I:

- mit P700 im RZ, ein Chl. a – Dimer, das am besten Licht mit der Wellenlänge 700 nm (dunkelrot) absorbiert
- primärer Elektronenakzeptor ist unbekannt

2.PS II:

- mit P680 im RZ, ein Chl.a – Dimer, das am besten Licht mit der Wellenlänge 680 nm (rot) absorbiert
- primärer Elektronenakzeptor ist Pheophytin

Der geringfügige Unterschied im Absorptionsverhalten der beiden Chl.a – Dimere beruht darauf, dass die Bindung an unterschiedliche Proteine in der Thylakoidmembran das Absorptionsverhalten der völlig gleich gebauten Chl.a – Moleküle beeinflusst.

Das Antennenpigment Carotin, kann zusätzlich auch eine Schutzfunktion übernehmen. Die Moleküle nehmen überschüssige Lichtenergie auf, die nicht an das RZ abgegeben werden kann, weil dieses z.B. saturiert ist oder weil es sich gerade in der Regenerationsphase befindet. So schützen sie den Photosyntheseapparat vor Beschädigungen.

Wenn die Antennenpigmente ein Photon absorbieren, wird die Energie nahezu verlustfrei zum RZ weitergeleitet, wo dann die erste lichtgetriebene Reaktion der Photosynthese stattfindet. Die Elektronen des Chl.a – Dimers werden aufgrund der aufgenommenen Energie auf ein höheres Energieniveau angehoben. Man sagt, das Molekül befindet sich im angeregten Zustand. Bevor die Elektronen aber wieder auf ihren Grundzustand zurückfallen können, werden sie vom primären Elektronenakzeptor in einer Redoxreaktion aufgenommen. Die im Anschluss daran durchlaufene Elektronentransportkette liefert Energie, die dann als chem. Energie in Form von ATP und NADPH zur Verfügung steht. Die in den Lichtreaktionen erzeugte chem. Energie wird anschließend im Calvin - Zyklus zur Zuckersynthese aus CO_2 benutzt.

Material und Methoden:

Wir haben nicht Tiefkühlspinat verwendet, wie im Skript angegeben, sondern frischen. Sonstiges Material und genaue Durchführung: s. Skript

Zunächst wird der Spinat mit Zugabe von CaCO_3 (Calciumcarbonat) und Quarzsand trocken gemörsert und mit Aceton und Petroleumbenzin weiter zerrieben. Anschließend wird der Blätterbrei abgenutscht und das Filtrat in einen Scheidetrichter zusammen mit NaCl – Lösung gegeben, mehrmals gewaschen und jeweils die H_2O – Phase verworfen. Die Benzinphase wird mit Na_2SO_4 (Natriumsulfat) getrocknet, was zum Schluss noch abfiltriert wird. Der dunkelgrüne Pigmentextrakt wird im Dunkeln aufbewahrt.

Resultate:

Wir erhalten einen Pigmentextrakt, der eine dunkelgrüne Färbung besitzt. Er besteht aus Petroleumbenzin, in dem die Pigmente gelöst sind. Es handelt sich um die typischen Pigmente der höheren Pflanzen: Chl.a, Chl.b, β - Carotin und Lutein. Dies wird in Versuch 5 noch nachgewiesen.

Diskussion:

Durch das Mörsern werden die Pflanzenzellen aufgebrochen. Dabei soll zugegebenes CaCO_3 die aus der zerstörten Vakuole freiwerdenden Pflanzensäuren neutralisieren, da ansonsten das Chl. zu Pheophytin umgewandelt wird. Dadurch würde dann Versuch 5 negativ beeinflusst. Diese Reaktion lässt sich natürlich nicht ganz vermeiden, wie wir auch in Versuch 5 sehen. Durch Zugabe von Petroleumbenzin wird erreicht, dass sich die Pigmente lösen. Durch das Aceton (ein org., amphipolares Lösungsmittel, d.h. es kann sich sowohl in polaren als auch unpolaren Lösungsmitteln lösen) kommt es dann zu einer Zwei – Phasen – Bildung zwischen dem polaren Lösungsmittel (Aceton und H_2O) und dem unpolaren Petroleumbenzin (ein Kohlenwasserstoff), das auch die Pigmente enthält. Die NaCl – Lösung wird zugegeben, um die H_2O – Phase noch polarer zu machen, also eine bessere Trennung der Phasen zu erreichen. In der H_2O – Phase sind auch Pigmente gelöst, allerdings nur zu einem geringen Teil. Das

kann man natürlich nicht ganz vermeiden, da Stoffe sich nicht entweder im Lösungsmittel lösen oder nicht, sondern nur mehr oder weniger gut löslich sind. Hydrophobe Stoffe z.B. lösen sich also nur zu einem geringen Teil in der (hydrophilen) Wasserphase und zum großen Teil in einem lipophilen Lösungsmittel. Die Pigmente weisen zwar auch gewisse Polaritäten auf, aber der Anteil der sich im Wasser löst, ist gering genug, um ihn zu verwerfen. Das β - Carotin ist sehr hydrophob, weil es keine polaren Gruppen besitzt, da es ein Kohlenwasserstoff (KW) mit hydrophoben Eigenschaften ist. Es besteht nur aus C – und H – Atomen, deren Elektronegativität nicht stark genug ist, um Polaritäten hervorzurufen. Chl.b besitzt eine Aldehydgruppe (CHO) mit polaren Eigenschaften am Porphyrinring. Allerdings ist das Phytol ein Kohlenwasserstoff (KW). Das Chl.a enthält anstelle der CHO – Gruppe wie beim Chl.b eine Methylgruppe (CH₃), ebenfalls unpolar wie das Phytol. Das Lutein besitzt zwei OH – Gruppen, an jedem Ende eine, so dass sich wegen des stark elektronegativen O – Atoms Polaritäten ausbilden. Es ist von allen Pigmenten am besten wasserlöslich. Da aber alle Pigmente auch hydrophobe Abschnitte, die zudem größer sind als die hydrophilen, besitzen, werden sie sich zum größten Teil im Petroleumbenzin lösen. Das anschließende mehrmalige Waschen dient dazu, Reste des Acetons und der Salzlösung zu entfernen. Die Wasserphase wird dabei immer zähflüssiger. Dies wird durch Pflanzenproteine hervorgerufen, die sich in der Lösung befinden. Der Pigmentextrakt muss im Dunkeln aufbewahrt werden, da ansonsten die Pigmente photooxidativ ausbleichen würden.

Versuch 5: Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Photosynthesepigmente und Aufnahme des Absorptionsspektrums der einzelnen Pigmente

Einleitung:

In diesem Versuch werden die Photosynthesepigmente aus dem Pigmentextrakt, der in Versuch 4 hergestellt wird, dünn-schichtchromatographisch aufgetrennt. Anschließend werden sowohl von jedem einzelnen Pigment als auch vom Pigmentgemisch die Absorptionsspektren ermittelt.

Teil i):

Das Prinzip der Dünnschichtchromatographie beruht darauf, dass versch. Stoffe aufgrund ihres chem. Aufbaus unterschiedlich stark hydrophob bzw. lipophil sind. Das aufzutrennende Gemisch wird auf eine Trägerphase aufgetragen. Im Versuch ist dies Wasser an Kieselgel gebunden, so dass das Lösungsmittel Wasser stationär ist. Wasser löst hydrophile Stoffe gut. Darüber wird ein mobiles Lösungsmittel geleitet, das gut lipophile Stoffe löst. Dies ist im Versuch Petroleumbenzin, ein org. Lösungsmittel. Die am stärksten hydrophoben Stoffe aus dem aufzutrennenden Gemisch wandern weiter mit dem Lösungsmittel als die weniger hydrophoben, weil sie nicht so stark vom Wasser festgehalten werden. So bilden sich versch. Banden, da die versch. Stoffe versch. weit vom Lösungsmittel „mitgeschwemmt“ werden. Das erwartete Ergebnis ist, wie im Skript beschrieben, dass β - Carotin am weitesten wandert, dann Chl.a, Chl.b und zuletzt Lutein.

Teil ii):

Die Absorptionsspektren werden mit einem Photometer ermittelt. Das Gerät strahlt durch eine Küvette gefüllt mit der jeweiligen Pigmentlösung und durch eine Vergleichsküvette mit Ethanol Licht der gleichen Intensität, das den Spektralbereich des sichtbaren Lichts umfasst. In dem es die aus den Küvetten austretenden Lichtstrahlen vergleicht, ermittelt das Gerät wieviel Licht jeder Wellenlänge das Pigment absorbiert und stellt dies graphisch dar. Dieses sog. Absorptionsspektrum ergibt sich aus der Absorption aufgetragen gegen die eingestrahnten Wellenlängen. So ergibt sich für jedes Pigment eine typische Kurve. Die Absorption beruht darauf, dass Pigmente (Photorezeptoren für sichtbares Licht) sog. π - Elektronensysteme besitzen, die durch elektroenergetische Wellen mit Wellenlängen im Bereich des sichtbaren Lichts angeregt werden und dabei die Energie teilweise absorbieren. Dabei wird aber nur soviel Energie aufgenommen, wie die Differenz zwischen Grundzustand und angeregtem Zustand des Pigmentmoleküls entspricht. Weil jeder Wellenlänge eine bestimmte Quantenenergie zugeordnet werden kann, kann jedes Pigment also Licht best. Wellenlängen absorbieren. Durch Quanten aus einem ganz best. Spektralbereich wird das Pigment elektronisch angeregt, wodurch dann delokalisierte Außenelektronen (π - Elektronen) auf höhere Orbitale (Singulettzustände) angehoben werden. Es gibt mehrere Singulettzustände pro Pigmentmolekül, auf die die π - Elektronen je nach absorbierter Energie von einem Quantum angehoben werden. Das Pigmentmolekül befindet sich jetzt im angeregten Zustand. Weil die Singulettzustände nicht sehr stabil sind, vor allem die, zu deren Erreichen die π - Elektronen eine große Energie aufnehmen mussten, fallen die π - Elektronen nach kurzer Zeit wieder auf den Grundzustand zurück.

Material und Methoden:

s. auch Skript

Teil i):

Der Pigmentextrakt aus Versuch 4 wird als Linie auf das Kieselgel aufgetragen. Dabei sind gewisse Vorsichtsmaßnahmen zu treffen. Die Zugabe von Ascorbinsäure soll verhindern, dass die Pigmente oxidativ abgebaut werden. Das saure Reagieren der Schicht soll durch $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (Calciumhydroxid) – Zugabe verhindert werden, da ansonsten die Chl. zu Pheophytinen umgewandelt werden. Ebenfalls ist Lichteinstrahlung zu vermeiden, da die Pigmente ansonsten photooxidativ ausbleichen würden. Das Laufmittel wird dazugegeben und nach ca. 45 min kann das Chromatogramm ausgewertet werden. Danach werden die einzelnen Banden vom Kieselgel gekratzt und mit Ethanol werden von selbigem die Pigmente abgelöst. Durch Zentrifugieren erhält man die Pigmentlösungen als Überstand. Sie werden in Küvetten gefüllt und bis zur photometrischen Untersuchung im Dunkeln aufbewahren.

Teil ii):

Mit dem Photometer werden dann die Absorptionsspektren ermittelt.

Resultate:

Teil i):

Die Resultate waren wie in der Einleitung beschrieben.

Bande	Laufweite in cm	R_F
Laufmittel	15,2	1
gelbe Bande	10,2	1,5
graue Bande	4,1	3,7
hellgrüne Bande	3	5,0
dunkelgrüne Bande	2	7,6
gelbe Bande	1,4	10,9

$R_F = \text{Gesamtlaufstrecke} / \text{Laufstrecke des Pigments}$

Teil ii):

s. beigelegte Ausdrucke

Die Beschreibung der Absorptionskurven wurde zusammen mit der Diskussion durchgeführt (s.u.)

Diskussion:

Teil i):

Das verwendete mobile Lösungsmittel Petroleumbenzin löst gut hydrophobe Stoffe, denn es ist selber hydrophob, da es ein KW ist. Also wird das hydrophobste Pigment am weitesten mitgeschwemmt. Dies ist β - Carotin, denn es besteht nur aus C - und H - Atomen, d.h. es weist keine Polarität auf, die das Lösen in Wasser, welches aus polaren Dipol- Molekülen besteht, möglich machen. Das β - Carotin ist die am weitesten gelaufene gelbe Bande. Die graue Bande besteht aus Pheophytin, das entstanden ist, weil die Umwandlung von Chl. in Pheophytin durch Säure nicht vollständig zu unterdrücken ist. Es können nicht alle sauren Moleküle neutralisiert werden und außerdem liegen im Wasser aufgrund der Autoprotolyse ständig Oxoniummionen (H_3O^+) vor, die saure Eigenschaften haben. Zudem liegt Pheophytin auch natürlicherweise in der Thylakoidmembran vor, als primärer e^- - Akzeptor des PS II. Das Chl.a ist, wie erwartet, das am zweitweitesten gewanderte Pigment, die hellgrüne Bande. Es ist etwas hydrophober als Chl.b, da dieses am Porphyrinring eine Aldehydgruppe (CHO) gebunden hat, so dass sich aufgrund des sehr elektronegativen O - Atoms eine Polarität ausbildet, die das Anlagern vom negativen Pol eines Wasser - Dipols ermöglicht. Chl.a hat an dieser Stelle eine Methylgruppe (CH_3), die keine polaren Eigenschaften hat. Chl.b bildet die kurz hinter Chl.a gewanderte dunkelgrüne Bande. Das Lutein ist das hydrophilste Pigment aus dem Gemisch. Es besitzt nämlich an jedem Ende eine Hydroxidgruppe, so dass es an beiden Enden vom Wasser „festgehalten“ wird, anders als beim Chl.b, das nur an einem Ende festgehalten wird. Das Lutein ist dann die gelbe Bande, die kaum gewandert ist.

Teil ii):

Bei der Auswertung dieses Versuches bedeuten % - Angaben folgendes:

Der Absorptionsfaktor von Ethanol wird auf 0% gesetzt. Relativ dazu wird dann der Wert die Pigmentlösung ermittelt.

Ergebnisse:

Das Absorptionsspektrum (AS) 1 zeigt die Absorption von Lutein. Bei 360 nm (UV - Licht) liegt eine Absorption von 10% vor. Mit zunehmender Wellenlänge nimmt auch die Absorption stark zu. Bei 430 nm (violett) liegt eine kleine Schulter in der Absorptionskurve vor, die die starke Zunahme kurz unterbricht. Das Lutein zeigt nur ein Absorptionsmaximum im blauen Spektralbereich mit zwei Peaks (Maxima). Bei 450 nm (blau - violett) wird eine max. Absorption von 60% erreicht, die aber mit längeren Wellenlängen wieder leicht abfällt auf 45%, allerdings noch einmal zunimmt bei 460 nm (blau - violett) mit einem Maximum von 50%. Bis 500 nm (blau) sinkt die Absorptionsrate mit größer werdenden Wellenlängen stark ab bis auf 5%. Dort bleibt sie dann nahezu konstant mit länger werdender Wellenlängen, bis auf einen sehr geringen Anstieg bei 650 nm (hellrot). Das AS von Lutein ist identisch mit dem in der Literatur, bis auf den kleinen Anstieg bei 650 nm.

Das AS 2 zeigt das Absorptionsspektrum von Chl.b. Man kann zwei deutliche Absorptionsmaxima erkennen. Bei 360 nm (UV - Licht) [dies liegt im Versuch noch nicht im UV - Licht - Bereich] liegt die Absorption bei 20%. Mit länger werdender Wellenlängen fällt sie ab, steigt aber ab 390 nm (violett) stark an, bis auf den ersten Maximalwert von 60% bei 455 nm (blau - violett). Mit zunehmender Wellenlänge

kommt es dann zu einem starken Abfall der Absorptionsrate auf 5% bei 510nm (blau – grün). Ab diesem Punkt steigt die Absorption wieder leicht an mit einem geringen „Maximum“ bei 590 nm (gelb), von dem an sie aber weiter zunimmt, bis zum zweiten Maximum von 20% bei 650nm (hellrot). Im Vergleich mit dem Spektrum aus dem Lehrbuch fällt auf, dass bei dem Anstieg der Absorption von 380 nm bis 460 nm die Absorptionskurve aus dem Versuch keine Schulter aufweist.

Das AS 3 zeigt die Absorption von Chl.a. Auch in diesem Spektrum erkennt man zwei deutliche Absorptionsmaxima. Bei 360 nm (UV – Licht) beträgt die Absorption 43%. Mit zunehmender Wellenlänge nimmt auch die Absorption weiter zu und erreicht bei 420 nm (violett) ein Maximum von 80% mit einem zweiten Gipfel bei 425 nm (violett) von ca. 78%. Mit zunehmender Wellenlänge nimmt die Absorption stark ab und fällt auf einen Wert von 6%. Dort bleibt sie mit zunehmender Wellenlänge konstant bis ab 560 nm (blau – grün) ein langsamer Anstieg der Absorption erfolgt bis zu 17% bei 600 nm (gelb), ab dem dann mit zunehmender Wellenlänge ein starker Anstieg auf das zweite Maximum von 63% bei 660 nm (hellrot) erfolgt. Mit zunehmender Wellenlänge nimmt dann die Absorption stark ab bis auf einen Wert von ca. 3% bei 720 nm (dunkelrot). Das Spektrum stimmt mit dem aus dem Lehrbuch überein.

Das AS 4 zeigt die Absorption von β - Carotin. Bei 360 nm (UV – Licht) liegt die Absorption bei 16%. Mit zunehmender Wellenlänge nimmt die Absorption stark ab bis auf 6% bei 380 nm (violett). Ab dort erfolgt mit zunehmender Wellenlänge ein starker Anstieg der Absorption bis bei 17% bei 440 nm (violett – blau) das einzige Absorptionsmaximum von β - Carotin erreicht wird. Die Absorption nimmt dann mit zunehmender Wellenlänge wieder stark ab, mit einer kleinen Schulter in der Absorptionskurve bei 460 nm (blau – violett) bis auf 2% bei 510 nm (grün – blau), ab wo sie dann, abgesehen von sehr geringen Schwankungen, konstant bleibt mit zunehmender Wellenlänge. Beim Vergleich mit dem Spektrum aus dem Lehrbuch fällt hier auf, dass der hohe Absorptionswert bei 360 nm untypisch für β - Carotin ist.

Das AS 5 zeigt die Absorption des Pigmentgemisches mit Chl.a, Chl.b, Lutein und β - Carotin. Man erkennt zwei deutliche Absorptionsmaxima. Bei 360 nm (UV – Licht) liegt die Absorption bei 40%. Mit zunehmender Wellenlänge nimmt auch die Absorption zu. Bei 380 nm (violett) zeigt die Absorptionskurve eine große Schulter. Bis zum Maximum von 110%. Ab dem mit zunehmender Wellenlänge die Absorption dann stark abfällt auf 5% bei 500nm (grün – blau). Mit zunehmender Wellenlänge nimmt dann die Absorption langsam zu mit kleineren Schwankungen bis sie dann ab 630 nm (orange) stark zunimmt bis auf den zweiten Maximalwert bei 650 nm (hellrot) von 70%. Dann fällt die Absorption mit zunehmender Wellenlänge stark ab.

Diskussion:

Im Vergleich der Absorptionsspektren des Pigmentgemisches und dem Wirkungsspektrum (WS) der Photosynthese aus dem Lehrbuch, stellt man fest, dass diese übereinstimmen. Die Photosyntheseleistung ist im hellroten Bereich um 650 nm und im blau – violetten Bereich um 410 nm maximal, wie auch das AS aus dem Versuch 4 zeigt. Im Vergleich mit dem groben Spektrum aus Versuch 3 lässt sich dies ebenfalls feststellen. Im Vergleich der AS der einzelnen Pigmente aus dem Versuch 4 mit dem Wirkungsspektrum der Photosynthese aus dem Lehrbuch fällt auf, dass jedes Pigment ein Maximum im Bereich zwischen 380 nm und

500 nm (violett bis blau) hat. Diese Maxima überlagern sich beim WS der Photosynthese zu einem breiteren Maximum in ebendiesem Bereich. So erklärt sich auch die Schulter im AS des Pigmentgemisches bei 380 nm. Dies ist die sog. Carotinoide Schulter. Bei dieser Wellenlänge absorbieren Chl.a und Chl.b nicht, sondern nur β - Carotin. Da dieses Hilfspigment nicht so effektiv die Energie an Chl.a und Chl.b weiterleitet, d.h. nicht alle absorbierte Energie weiterleitet, kann die Energie nicht optimal genutzt werden. Auch das Hilfspigment Lutein ist nicht so effektiv wie Chl.a und Chl.b. Diese beiden Pigmente vergrößern nur die Breite des für die Photosynthese nutzbaren Spektralbereiches. Das zweite Maximum der Photosynthese beruht nur auf der Absorption von Chl.a und Chl.b, die beide im Bereich um 650 nm ein Absorptionsmaximum aufweisen, daher ist es schwächer als das andere Maximum. Alle AS zeigen bei 720 nm einen extremen Abfall der Absorption auf 0%. Dies ist der sog. „red – drop“ – Effekt. Im dunkelroten, langwelligen Lichtbereich besitzen die Quanten nicht genügend Energie, um die Elektronensysteme anregen zu können. Die Pigmente, bei denen bei 360 nm (UV – Licht) die Absorption hoch ist, liegt die Fähigkeit vor, die spezifische, hohe Energie dieser Quanten auszunutzen.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse des Versuches weitgehend mit denen in der Literatur präsentierten übereinstimmen. Leichte Abweichungen beruhen darauf, dass die Pigmentgemische im Versuch nicht „absolut“ rein waren, sondern auch noch Reste anderer Stoffe und Pigmente enthielten, die dann die AS zusätzlich beeinflussten.

Das im Versuch verwendete Verfahren von Dünnschichtchromatographie und anschließender Photometrie wird in der Praxis dazu verwendet, unbekannte Pigmente zu bestimmen. Nachdem man sie isoliert hat, kann man dann aufgrund des Absorptionsspektrums im Vergleich mit Literaturwerten feststellen, um welches Pigment es sich handelt. Im Versuch war uns schon vor der Photometrie bekannt, um welches Pigment es sich handelt.

Literatur:

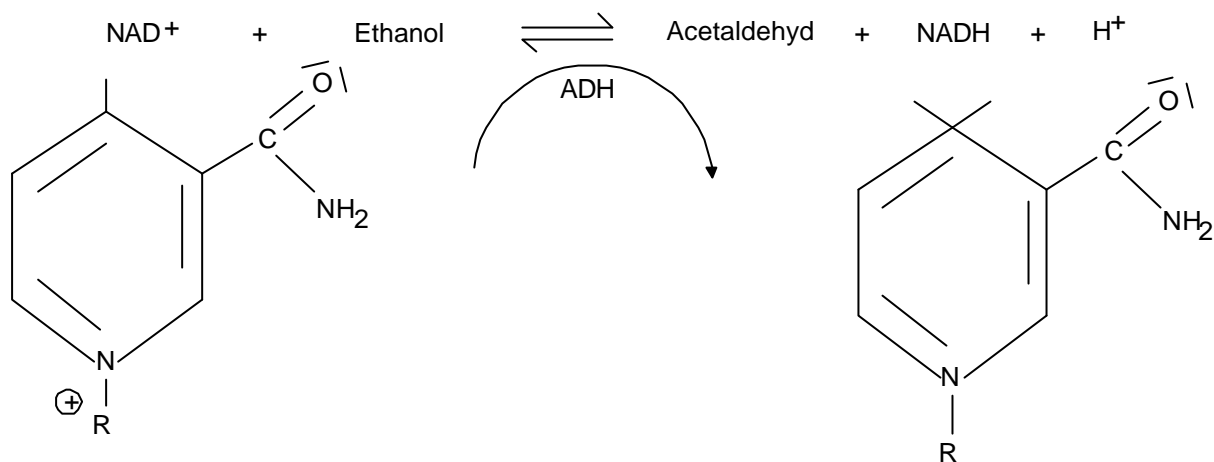
Biologie	Neill A. Campbell		Spektrum
Pflanzenphysiologie	Schopfer, Mohr	4.Auflage	Springer
Pflanzenphysiologie	Schopfer, Brennicke	5.Auflage	Springer

Enzymatik

Versuch 4: Bestimmung der Michaeliskonstanten K_m von NAD^+ der Alkoholdehydrogenase (ADH)

Einleitung:

Auf folgender Redoxreaktion, die das Enzym ADH katalysiert, baut der Versuch 4 auf:



- Ethanol : einwertiger, gesättigter Alkohol
- Acetaldehyd : oxidierte Form des Ethanols
- NAD^+ : Nicotinsäureamid – Adenin - Dinucleotid
- $NADH$: (eigentlich: $NADH_2$) reduzierte Form des NAD

Das Substrat Ethanol wird zu Acetaldehyd oxidiert und das Co – Substrat NAD^+ wird zu $NADH$ und H^+ reduziert. Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt auf der Seite des Ethanols. Da wir aber K_m von NAD^+ der ADH ermitteln wollen, müssen wir erreichen, dass die Reaktion in die andere Richtung verläuft. Durch die Hinzugabe von Semicarbazid können wir dieses Problem lösen. Das Acetaldehyd bindet an das Semicarbazid, so dass das Acetaldehyd aus dem Gleichgewicht herausgenommen wird. Also wird weiterhin Ethanol mit NAD^+ durch ADH zu Acetaldehyd oxidiert, weil die Einstellung des Gleichgewichts verhindert ist. Bei dieser Reaktion wird eine best. Menge des Alkohols Ethanol, die äquivalent ist zur eingesetzten Menge des Co – Substrats NAD^+ , in Acetaldehyd umgesetzt. Das Ziel des Versuches ist die Bestimmung der Michaeliskonstanten K_m von NAD^+ der ADH. K_m ist die Substratkonzentration, die im Fließgleichgewicht das Enzym mit halbmaximaler Geschwindigkeit arbeiten lässt, d.h. die Substratkonzentration bei der die Reaktionsgeschwindigkeit $v_{max}/2$ beträgt. Dabei ist v_{max} die Reaktionsgeschwindigkeit, die maximal erreicht werden kann. Wenn nämlich alle aktiven Zentren des Enzyms saturiert sind (d.h. sobald sie frei sind, wieder ein Substratmolekül an sie bindet), kann die Reaktionsgeschwindigkeit, außer durch Enzymzugabe, nicht mehr erhöht werden, da das Enzym bereits den maximalen Umsatz leistet. Ein hoher Wert für K_m bedeutet demnach, dass

das Enzym eine hohe Substratkonzentration benötigt, um $v_{\max}/2$ zu erreichen. Das bedeutet wiederum, dass das Enzym eine geringe Substrataffinität besitzt. Umgekehrt bedeutet natürlich ein geringer K_m – Wert, dass das Enzym eine hohe Substrataffinität besitzt.

Eine Methode K_m zu ermitteln ist die Michaelis – Menten – Methode (graphisch). Die Michaelis – Menten – Gleichung lautet:

$$v = \frac{v_{\max} * [S]}{K_m + [S]}$$

- v := Reaktionsgeschwindigkeit
- [S] := Konzentration des in den Klammern stehenden Stoffes S
- S := Substrat

In einem Graph trägt man v gegen [S] auf. Man erhält eine Sättigungskurve, an der man v_{\max} ablesen kann. Anschließend kann man also auch $v_{\max}/2$ ermitteln und die bei dieser Reaktionsgeschwindigkeit vorliegende Substratkonzentration ablesen. Diese ist K_m . Im Versuch verwenden wir eine andere Methode. Die Gründe dafür sind in der Diskussion beschrieben.

Zunächst müssen wir v ermitteln. Als Maß für v nehmen wir die Konzentrationsänderung über die Zeit von NADH, eines der Reaktionsprodukte (P) in der Lösung, die im Verlauf der Reaktion zunimmt, da NAD^+ reduziert wird. Die Konzentration ermitteln wir (indirekt) über Messungen mit dem Photometer, da NADH bei 340 nm (UV – Licht) ein Absorptionsmaximum aufweist. Wir messen die NADH – Absorption aber bei 366 nm, weil auch das NAD^+ im Bereich des UV – Lichtes, bei ca. 260 nm, ein Absorptionsmaximum aufweist, aber im Bereich von 366 nm nicht absorbiert, so dass es nicht zu störenden Einflüssen durch das NAD^+ kommt. Da im Verlauf der Reaktion die NADH – Konzentration zunimmt, erwarten wir auch eine Zunahme der gemessenen Absorptionswerte, denn je mehr NADH vorhanden ist, desto mehr Licht wird absorbiert. Ebenso erwarten wir, dass bei höherer NAD^+ - Konzentration die Absorptionswerte für NADH höher liegen, da pro Zeiteinheit mehr NADH gebildet werden kann, da mehr Co – Substrat vorliegt. Mit Hilfe des Lambert – Beer – Gesetzes können wir die Konzentration ausrechnen. Es lautet:

$$\Delta E = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon * \Delta c * d$$

- E := Extinktion bzw. Absorption
- I_0 := Intensität, des von der Lichtquelle abgestrahlten Lichtes
- I := Intensität, des durch die Messküvette strahlenden Lichtes
- ϵ := molarer Extinktionskoeffizient des Stoffes in der Messküvette
- c := Konzentration des Stoffes in der Messküvette
- d := Schichtdicke der Küvette

Durch Umformungen des Lambert – Beer – Gesetzes erhalten wir eine Formel für die Konzentration des absorbierenden Stoffes in der Küvette, also im Versuch NADH:

$$\Delta E = \epsilon * \Delta c * d \Leftrightarrow \Delta c = \frac{\Delta E}{\epsilon * d}$$

Nun können wir v errechnen, als entstehendes Produkt (NADH) pro Zeit, indem wir für Δc die Umformung des Lambert – Beer – Gesetzes einsetzen:

$$v = \frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{\Delta[NADH]}{\Delta t} = \frac{\Delta E}{\Delta t * d * e}$$

Dann trägt man $1/v$ gegen $1/[S]$ in einem Graphen auf (doppeltreziproke Darstellung von Michaelis – Menten). Diese sog. Lineweaver - Burk – Methode beruht auf einer linearisierten Form der Michaelis – Menten - Gleichung:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m + [S]}{v_{max} * [S]} = \frac{K_m}{v_{max}} * \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}}$$

Der Schnittpunkt der Geraden, die diese Form angibt, mit der y – Achse ist der Wert $1/v_{max}$ und ihr Schnittpunkt mit der x – Achse ist der Wert $-1/K_m$, woraus sich direkt v_{max} und K_m berechnen lassen.

Material und Methoden:

UV – Absorption von NADH (bei $\lambda = 366$ nm) mittels Photometer
Rest: s. Skript

Durchführung: s. Skript

Resultate:

Tabelle 1: Ergebnisse der photometrischen Messung

Zeit in s	t ₀	t ₁₅	t ₃₀	t ₄₅	t ₆₀	t ₇₅	t ₉₀	t ₁₀₅	t ₁₂₀
Ansatz									
1	0,000	0,006	0,010	0,016	0,020	0,020	0,024	0,036	0,037
2	0,000	0,011	0,021	0,030	0,038	0,046	0,053	0,059	0,066
3	0,000	0,024	0,036	0,052	0,069	0,081	0,089	0,096	0,106
4	0,000	0,012	0,029	0,040	0,054	0,065	0,078	0,089	0,100
5	0,000	0,018	0,041	0,065	0,085	0,105	0,124	0,141	0,156
6	0,000	0,047	0,085	0,119	0,152	0,182	0,210	0,236	0,261
7	0,000	0,016	0,007	0,046	0,086	0,127	0,158	0,211	0,270
8	0,000	0,053	0,099	0,138	0,180	0,220	0,261	0,297	0,333

Die Werte in den Spalten sind die mit dem Photometer ermittelten Absorptionswerte.

Tabelle 2: Auswertung der Ergebnisse aus Tabelle 1

Ansatz	[S] NAD ⁺ in Mol/l	DE / min	v in mmol / (min*ml)	1 / [S]	1 / v
1	0,0000550	0,020	0,0061	18181,81	163,93
2	0,0000825	0,034	0,0103	12121,21	097,08
3	0,0001100	0,066	0,0200	09090,90	050,00
4	0,0001650	0,050	0,0151	06060,60	066,22
5	0,0002200	0,088	0,0266	04545,45	037,59
6	0,0003300	0,134	0,0406	03030,30	024,63
7	0,0006600	0,158	0,0478	01515,15	020,92
8	0,0008800	0,162	0,0490	01136,36	020,40

Beispielrechnung zu Ansatz 1:

Nötige Werte:

$$d = 1 \text{ cm}$$
$$\epsilon = 3,3 * 10^6 \text{ cm}^2 / \text{Mol}$$

1.) [S]: 22,8 mg NAD⁺ / 10 ml H₂O ⇒ c(NAD⁺) ≈ 3,3 μMol / ml
also:
c(NAD⁺) = 0,165 μMol / 0,05 ml

Diese Stoffmenge n(NAD⁺) = 0,165 μMol aus den 0,05 ml der zum Ansatz 1 pipettierten NAD⁺ - Lösung verteilt sich dann im Gesamtvolumen der Lösung (V), welches sich ergibt als:

$$V = (1,5 + 0,1 + 0,05 + 1,05 + 0,2 + 0,1) \text{ ml}$$

Damit ergibt sich die Konzentration c von NAD⁺ in Ansatz 1 als:

$$c(NAD^+) = \frac{n}{V}$$
$$\Rightarrow c(NAD^+) = \frac{0,165 \text{ mMol}}{3 \text{ ml}} = \frac{0,165 * 10^{-6} \text{ Mol}}{3 * 10^{-3} \text{ l}} = 0,000055 \frac{\text{Mol}}{\text{l}}$$

[n := Stoffmenge]

2.) DE: ΔE / min = (E₆₀ - E₃₀) * 2

$$\Rightarrow \Delta E / \text{min} = (0,02 - 0,01) * 2 = 0,02$$

3.) v:

$$v = \frac{\Delta[P]}{\Delta t} = \frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{\Delta E}{e * d * \Delta t}$$
$$\Rightarrow \frac{\Delta E}{3,3 * 10^6 \frac{cm^2}{Mol} * 1cm * 1min} = \frac{\Delta E * mMol}{3,3 * min * ml}$$
$$\Rightarrow v = \frac{0,02 * mMol}{3,3 * min * ml} = 0,061 \frac{mMol}{min * ml}$$

4.) $1 / [S]$ und $1 / v$ ergeben sich als die Kehrwerte von $[S]$ bzw. v :

$$[S] = 0,000055 \Rightarrow \frac{1}{[S]} = 18181,81$$

$$v = 0,0061 \Rightarrow \frac{1}{v} = 163,93$$

weitere Resultate: s. Graph1 und Graph 2

Diskussion:

Zur graphischen Bestimmung von K_m benutzen wir die Lineweaver – Burk – Methode, weil wir bei der Michaelis – Menten – Methode Probleme haben, v_{max} exakt zu bestimmen. Wir erhalten zwar eine Sättigungskurve, aber mit steigender Substratkonzentration steigt auch die Kurve noch weiter leicht an bzw. wir erhalten einige, um den Sättigungswert alternierende Werte. Daraus resultierend können wir natürlich auch K_m nicht exakt bestimmen.

Indem wir die Lineweaver – Burk - Methode benutzen, können wir v_{max} und damit auch K_m genauer bestimmen, soweit dass die verwendeten Mittel zulassen. Es kommt immer zu Ungenauigkeiten wegen des Auftretens von diversen Fehlern. Dazu gehören z.B. dass die Küvette von außen feucht war, dass eine Luftblase im Strahlengang des Photometers war, dass falsche Mengen der Lösungen pipettiert wurden oder die klare Seite der Küvette angefasst wurde. All dies beeinflusst die Messungen mit dem Photometer negativ.

Die Auswertung von Graph 2 ergibt als Wert für $- 1 / K_m$ ca. $- 800 \frac{l}{Mol}$, also hat K_m einen

Wert von $0,00125 = 1,25 * 10^{-3} \frac{Mol}{l}$. Das Ergebnis liegt also im Literaturbereich von 10^{-2} bis $10^{-5} \frac{Mol}{l}$.

Literatur:

Biologie
Pflanzenphysiologie

Neill A. Campbell
Schopfer, Mohr

Spektrum
4.Auflage
Springer

Enzymatik