

Protokoll Praktikum Biochemie

Jakob Then, Maren Schneider – Gruppe 23
09.06.2022

Inhalt

Abkürzungen	2
Einleitung – Zielsetzung der Versuche	3
Methoden.....	5
Ergebnisse	6
Diskussion.....	20
Anhang	24
Quellen	29

Abkürzungen

Probe M/MA Übernachtskultur	Medium vom y486+pGenActGFP Hefestamm, aerobe Übernachtskultur
Probe MAn	Medium vom y486+pGenActGFP Hefestamm, anaerobe Übernachtskultur
Probe MI	Medium vom immobilisierten y486+pGenActGFP Hefestamm, anaeroben Übernachtskultur
Probe ME	medium of empty alginate pellets
Probe B	Biomassen Pellet des y486+pGenActGFP Stamms
Probe H/EK erhalten wurde	Proteinhaltiger Überstand, der nach Homogenisierung von Probe B erhalten wurde
Probe S	flüssige Fraktion nach dem Aussalzen
Probe P	GFP angereicherte Fraktion
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
OD	Optische Dichte
BSA	Bovine Serumalbumin
G6P	Glucose-6-Phosphat
G6PDH	Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase
ATP	Adenosintriphosphat

Einleitung – Zielsetzung der Versuche

Tag 1: An Tag 1 wurden zuerst die Fluoreszenzeigenschaften der im Praktikum verwendeten Hefestämme untersucht um somit auf die Expression vom Green fluorescent protein (GFP) Rückschlüsse zu ziehen und die Arbeit mit dem Fluoreszenzmikroskop kennenzulernen. Das Ziel war es, zu bestätigen, dass die y486+pGenActGFP Zellen GFP produzieren, während die y486+p426 empty vector Zellen kein GFP produzieren. Im nächsten Versuchsteil wurden die Optische Dichte (OD) beider Stämme mit einem Fotometer gemessen um daraus Anzahl der Zellen/ml beider Kulturen zu bestimmen.

Im nächsten Schritt wurden die Kulturen für die Messung der Stoffwechselaktivität vorbereitet, um am nächsten Tag den Glucoseverbrauch und die Ethanolproduktion der y486+pGenActGFP Zellen zu charakterisieren.

Außerdem wurde die Biomasse für die Extraktion und Reinigung von GFP aus einer Kultur der pGenActGFP Zellen geerntet (Probe B, MA und M).

Tag 2: Zielsetzung des zweiten Versuchstages war es die Stoffwechselaktivität des y486+pGenActGFP-Stammes in Immobilisierter- und Suspensionskultur quantitativ zu bestimmen. Hierzu wurden sowohl Glucose- als auch Ethanolkonzentration mittels Enzym-gekoppelter Assays bestimmt (vgl Abb. 1).

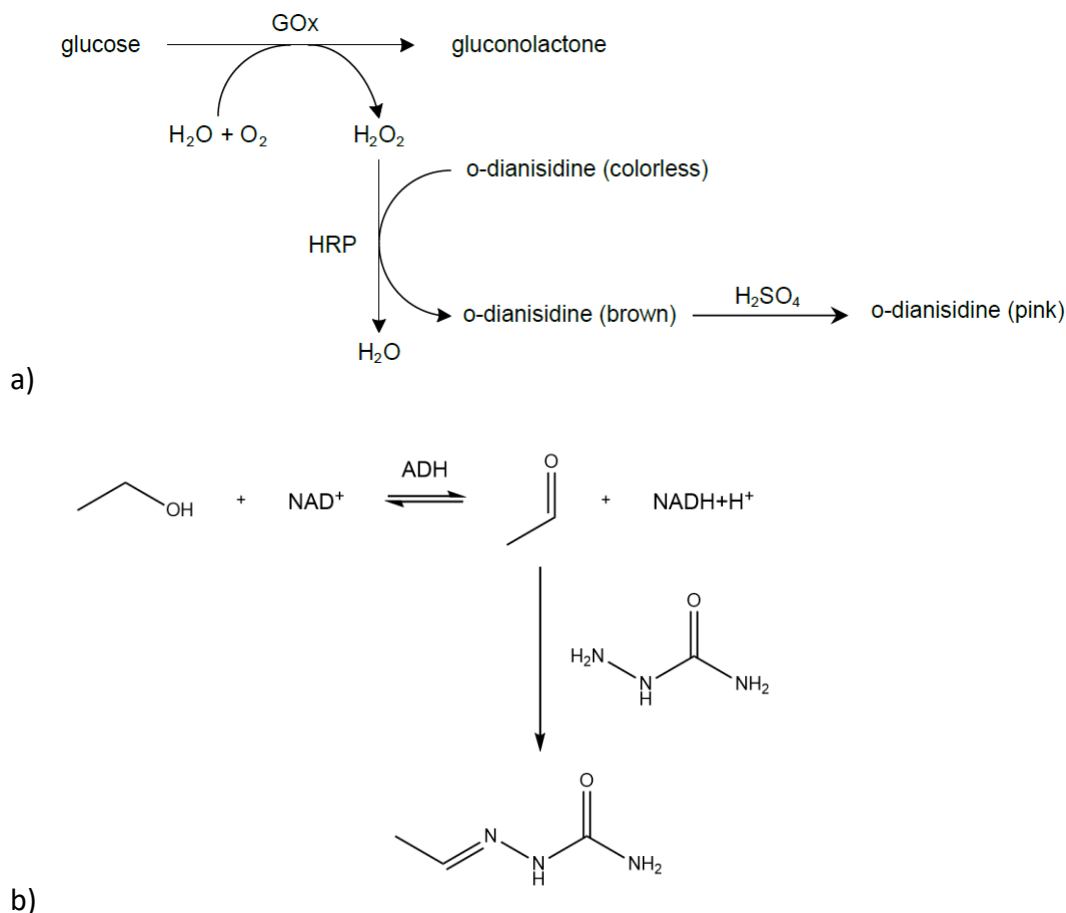


Abb. 1 | Enzym-gekoppelte Assays. a) GOx Assay zur Bestimmung der Glucosekonzentration über Absorption durch o-Dianisidin (Quelle: Praktikumsskript). b) ADH Assay zur Bestimmung der Ethanolkonzentration über Absorption durch NADH (Quelle: Eigene Abbildung, Erstellt mit ChemDraw)

Um anschließend die Effizienz der Glucoseumsetzung zur Ethanolproduktion in verschiedenen Kulturformen bewerten zu können, wurde die Ethanolausbeute in Bezug auf das Substrat (Glucose) Y_{EtOH} bestimmt.

$$Y_{EtOH} = \frac{c_{EtOH}}{\Delta c_{Glucose}} \quad (1)$$

c = Konzentration in g/l

Neben der Stoffwechselanalyse wurden an Tag 2 die ersten Schritte zur Extraktion und Reinigung des GFP aus der geernteten Biomasse (Probe B) vorgenommen. Um phosphatfreies und korrekt gefaltetes GFP zu erhalten wurden die Hefezelle zunächst mechanisch lysiert. Als erster Reinigungsschritt wurden einschließend hydrophobe Proteine durch hohe Ammoniumsulfatkonzentration ausgesalzen und der GFP-haltige Überstand zur weiteren Reinigung gelagert (Probe S).


Tag 3: An Tag 3 wurde eine Hydrophobic Interaction Chromatography (HIC) durchgeführt, um das an den vorherigen Tagen gewonnene und ausgesalzene GFP weiter aufzureinigen. Die Probe mit der höchsten GFP-Konzentration wurde durch UV-Licht bestimmt.


Die dadurch bestimmte Lösung wurde als Probe P bezeichnet. Mittels Bradford Assay wurde die Proteinkonzentration in den Proben S, P, H und M bestimmt, um somit die erfolgreiche Aufreinigung zu bestätigen und die GFP-Ausbeute zu bestimmen. Mithilfe einer Bovine Serumalbumin (BSA)–Verdünnungsreihe wurde ein Standard generiert, um diesen als Kalibrierungslinie zu verwenden.

Tag 4: Zielsetzung des letzten Versuchstages war es die vorgenommenen Aufreinigungsschritte des GFP qualitativ und quantitativ mittels Native-PAGE zu analysieren. Zudem wurde die Enzymkinetik des in einer Zelllysatsprobe vorliegenden Enzyms Glucose-6-phosphat Dehydrogenase (G6PDH) untersucht. Mittels dieser Daten wurden die maximale Reaktionsgeschwindigkeit sowie die Michaelis-Menten-Konstante ermittelt. Inhibition der G6PDH mit ATP erlaubte die Berechnung der Inhibitionskonstante.

Methoden

Die Methoden können dem Skript zum Praktikum Biochemie für molekulare Biotechnologen entnommen werden.

Tag 1: Zur Vorbereitung der Untersuchung der Ethanolproduktion von Hefezellen wurde eine Lösung mit einer Konzentration von etwa $3,61 \cdot 10^6$ Zellen/ml verwendet ($OD_{600} = 0,515$). 

Für den letzten Versuch von Tag wurde das benötigte Volumen der Hefekultur mit der folgenden Formel berechnet: 

$$V_{NaCl} = 10 \cdot V_{Hefe} (OD_{600} - OD_{600}(Hefe)) / (-OD_{600}) \quad (2)$$

Tag 2: Zelllyse, Aussalzen sowie Glucose- und Ethanol-Assays wurden nach den Anweisungen des Praktikums Skripts durchgeführt.

Tag 3: HIC und der Protein-Assay wurden nach den Anweisungen der Praktikums Skriptes durchgeführt.

Tag 4: G6PDH kinetic assay und Native PAGE wurden nach den Anweisungen des Praktikums Skripts durchgeführt.

Für die Durchführung der Native PAGE wurden 60 µl Probe M, 60 µl **Probe S**, 6,9 µl Probe H und 13,8 µl **Probe S** aufgetragen. Dies entspricht einer Proteinmenge von 61,44 µg für die Proben P, S und H. Eine Positivkontrolle mit 24 µg GFP wurde ebenfalls aufgetragen.

Die Michaelis-Menten Konstante K_m und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} wurden mittels *GraphPad Prism* bestimmt. Beide Werte wurden zusätzlich aus der Steigung m und dem y-Achsenabschnitt t des Hanes-Woolf Graphen wie folgt bestimmt:

$$v_{max} = m^{-1} \quad (3)$$

$$K_m = t \cdot v_{max} \quad (4)$$

Anschließend wurde die Inhibitionskonstante K_i wie folgt berechnet:

$$K_i = \frac{[ATP]}{\left(\frac{v_{max}[ATP]}{v(K_m + [G6P])} - 1 \right)} \quad (5)$$

Ergebnisse

Untersuchung der Fluoreszenzeigenschaften beider Hefestämme

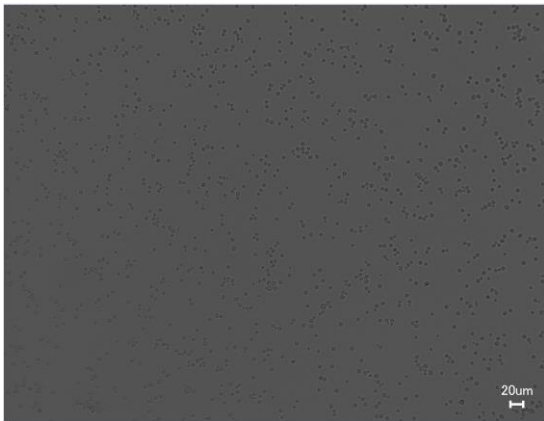


Abbildung 2 | Ergebnisse vom ersten Versuch: Betrachtung der y486+p426 empty vector Hefezellen im Brightside-Modus.

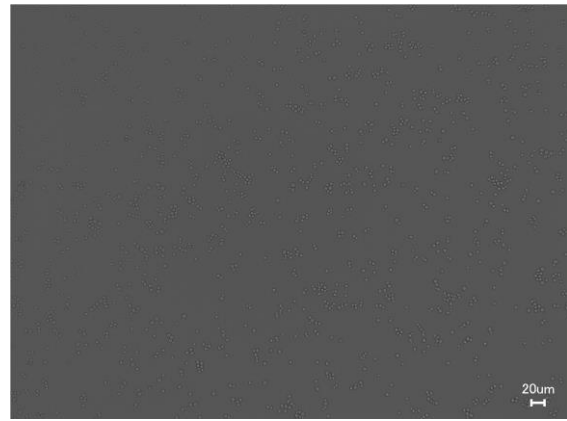


Abbildung 3 | Ergebnisse vom ersten Versuch: Betrachtung der y486+pGenActGFP Hefezellen im Brightside-Modus.

Abbildung 2 und 3 zeigen die Ergebnisse aus Versuch 1 unter dem Mikroskop im Brightfield-Modus. In Abbildung 2 sind die mit dem y486+p426 empty vector Hefezellen zu erkennen, in Abbildung 3 die y486+pGenActGFP Zellen. Es sind wie erwartet keine wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden Zelltypen zu erkennen.

Im Gegensatz dazu sind die Bilder im Fluoreszenz-Modus wie erwartet unterschiedlich. Abbildung 5 zeigt den y486+pGenActGFP Stamm, der aufgrund der Expression von GFP durch Bestrahlung mit UV-Strahlung grün fluoresziert. Abbildung 4 zeigt dagegen den empty vector Stamm, welcher kein GFP exprimiert und deswegen nicht fluoresziert.

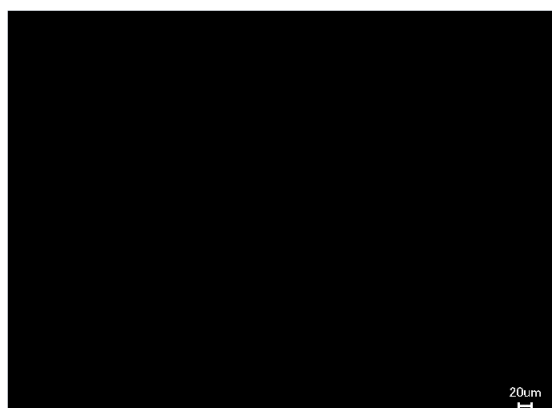


Abb. 4 | Ergebnisse vom ersten Versuch: Betrachtung der y486+p426 empty vector Hefezellen im GFP-Modus.

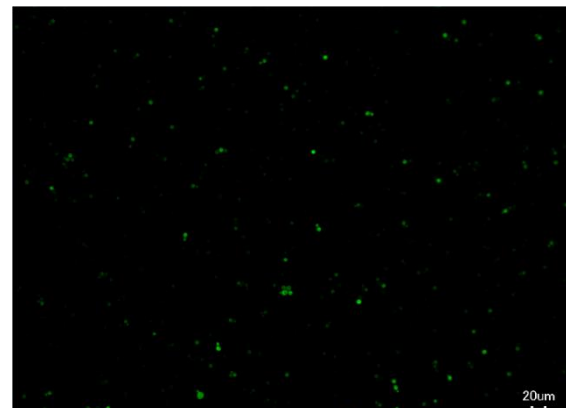


Abb 5 | Ergebnisse vom ersten Versuch: Betrachtung der y486+pGenActGFP Hefezellen im GFP-Modus.

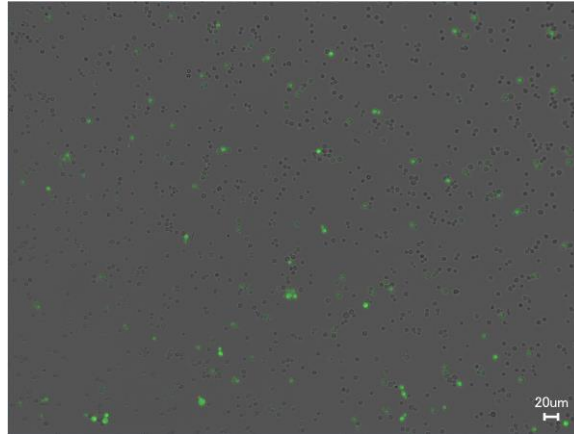


Abb. 6 | Überlapp von Abbildung 2 und 4.

Abbildung 6 zeigt die Überlappung von Abbildung 3 und 5, es ist zu sehen, dass nicht alle Zellen gleich stark oder teilweise gar nicht fluoreszieren, obwohl alle überlebenden Zellen GFP produzieren sollten.

Bestimmung der optischen Dichte beider Hefestämme

Im nächsten Versuch wurden die OD der beiden Hefestämme bei $\lambda = 600 \text{ nm}$ gemessen, um daraus die Zelldichte zu bestimmen. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt. Aus der optischen Dichte wurde die Zelldichte berechnet, da OD und Zelldichte proportional zueinander sind. Es wurde angenommen, dass sich bei einer optischen Dichte von 0.1 OD_{600} etwa $7 \cdot 10^5$ Zellen in einem ml befinden.

Die Zelldichte der GFP-exprimierenden Zellen beträgt $5.05 \cdot 10^6$ Zellen/ml und ist somit wie erwartet niedriger als die der nicht-GFP-exprimierenden Zellen (5.26 Zellen/ml).

Tabelle 1 | Messwerte von Versuch 2 zu beiden Zellkulturen, Optische Dichte und daraus berechnete Zelldichte

	Optische Dichte [OD ₆₀₀]	Optische Dichte [OD ₆₀₀]	Optische Dichte [OD ₆₀₀]	Mittelwert [OD ₆₀₀]	Zelldichte [Zellen/ml]
Y466+p426 empty vector	0.753	0.751	0.750	0.751	$5.26 \cdot 10^5$
Y486+pGenActGFP	0.724	0.728	0.712	0.721	$5.05 \cdot 10^5$

Vorbereitung der Messungen zu Stoffwechselaktivität

Mit Gleichung 2 wurden die benötigten Volumina Hefe und NaCl-Lösung berechnet, um eine OD₆₀₀ von etwa 0,5 zu erhalten:

$$V_{\text{Hefe}} = 0.35 \text{ ml}, V_{\text{NaCl}} = 4.65 \text{ ml}$$

Bestimmung der Stoffwechselaktivität

Die Messungen der Stoffwechselaktivität zeigten gute Ergebnisse. Die Daten des angesetzten Glucosestandards zeigten sich linear und wurde somit für die Regressionsanalyse verwendet (Abb. 7).

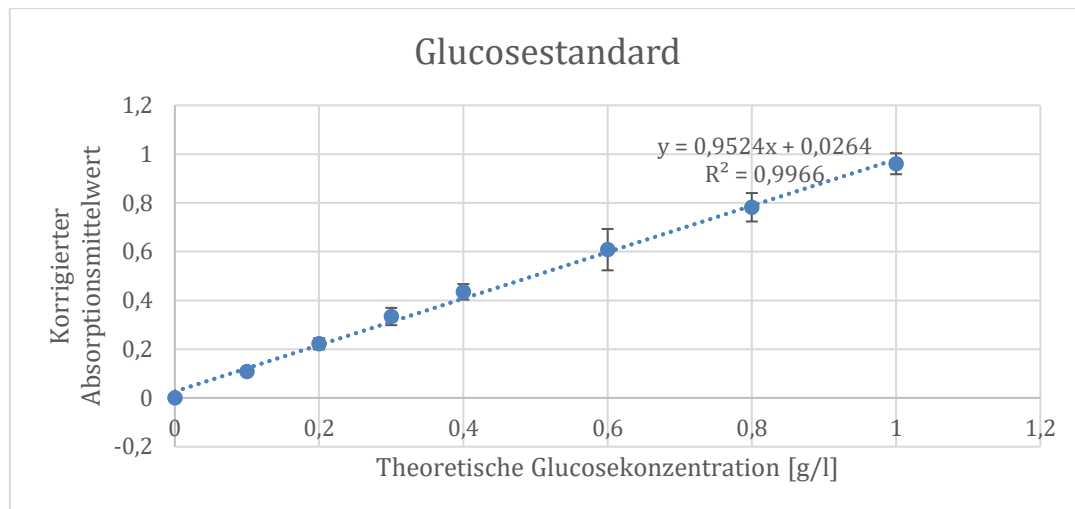


Abb. 7 | Regressionsanalyse des Glucosestandards

Mittels der Regressionsgrade wurde die Glucosekonzentrationen im Medium der Aeroben Suspensionskultur (MA), der Anaeroben Suspensionskultur (MAn) sowie der Immobilisierten Anaeroben Kultur (MI) bestimmt. Als Negativkontrolle wurde ebenfalls das Medium zellfreier Alginat-Pellets (ME) analysiert (vgl. Tabelle 2):

Tabelle 2 | Glucosekonzentrationen verschiedener Mediumsproben:

Sample	theo. conc. [g/l]	mean conc. [g/l]
MA, 50-fold	16,15561496	13,37657452
MA, 10 fold	11,41329392	
MAn, 50 fold	13,71059711	11,81534047
MAn, 10 fold	10,38042363	
MI, 50 fold	12,99283136	10,91777309
MI, 10 fold	9,414243668	
ME, 50 fold	19,87993184	13,83310854
ME, 10 fold	10,60685202	



Werte der Absorptionsrohdaten können Tabelle 11 und 12 im Anhang entnommen werden. Auch die Absorptionswerte des Ethanolstandards zeigt sich linear und konnten so analog zum Glucose-Assay zur Regressionsanalyse verwendet werden (Abb. 8).

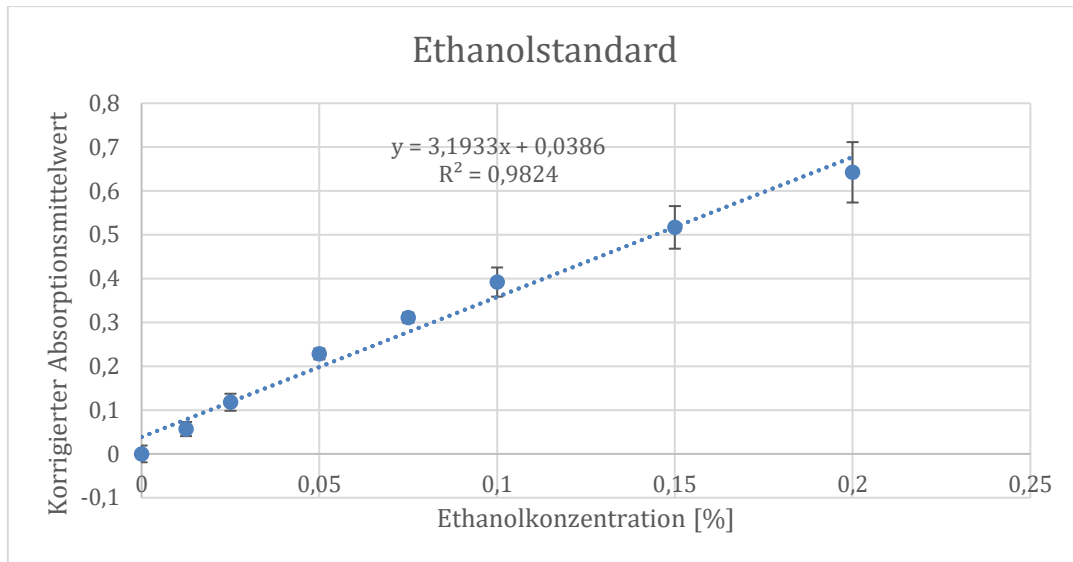


Abb. 8 | Regressionsanalyse des Ethanolstandards

Mittels der Regressionsgeraden wurden so die Ethanolkonzentrationen der obigen Mediumsproben berechnet (vgl. Tabelle 3):

Tabelle 3 | Ethanolkonzentrationen verschiedener Mediumsproben

Probe	theo. conc. [%]	theo.conc. [g/l]	mean theo conc. [%]	mean theo conc. [g/l]
MA, 10-fold	1,483964877	11,70848288	0,55870047	4,40814675
MA	0,344131581	2,715198176		
MAn, 10-fold	1,591339581	12,5556693	0,5986907	4,72366961
MAn	0,368701416	2,909054169		
MI, 10-fold	1,342841009	10,59501556	0,53864874	4,24993852
MI	0,336892594	2,658082564		
ME, 10-fold	0,855419706	6,749261482	0,15299287	1,20711376
ME	0,084008992	0,662830946		

Werte der Absorptionsdaten können Tabelle 13 und 14 im Anhang entnommen werden. Anschließend konnte so die Ethanolausbeute mittels Formel (1) und den bestimmten Konzentrationen berechnet werden (Ursprüngliche Glucosekonzentration entsprach 20 g/l, vgl. Tabelle 4):

Tabelle 4 | Ethanolausbeute verschiedener Mediumsproben

Probe	Ethanolausbeute
MA	8,44%
MAn	7,31%
MI	5,93%
ME	2,48%



Extraktion und Aufreinigung des GFP

In Abbildung 9 ~~ist~~ sind die verschiedenen Fraktionen zu erkennen, die durch die Aufreinigung von Probe S durch HIC entstanden sind, sie sind in aufsteigender Reihenfolge sortiert (Fraktion 1 links, Fraktion 8 rechts). Fraktion 3 fluoresziert am stärksten und hat somit den höchsten GFP-Gehalt, weshalb sie im weiteren Verlauf als Probe P verwendet wurde.

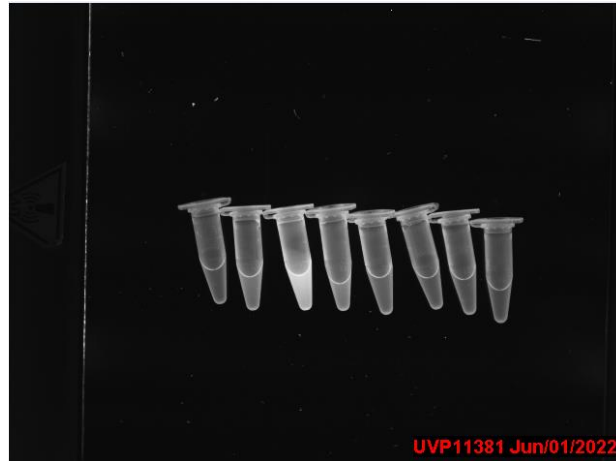


Abb. 9 | Fraktionen der HIC unter UV-Licht. In aufsteigender Reihenfolge sortiert, Fraktion 1 links, Fraktion 8 rechts.

Protein-Assay zu Bestimmung der Proteinkonzentration

Im weiteren Verlauf wurden mit verschiedenen Verdünnungen von Probe P, S, M und H und ein Bradford Assay durchgeführt. Parallel wurden dieser auch für verschiedene Verdünnungen von BSA durchgeführt und die korrigierten Mittelwerte (Absorptionswert der leeren Probe abgezogen) der Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen die Proteinkonzentration in Abbildung 10 aufgetragen.

Rohdaten der Absorptionsmessung sind in Tabelle 15 bis 19 im Anhang dargestellt. Ein Wert der Messung von Probe S wurde für weitere Berechnungen ausgelassen, da er stark von den anderen Werten abweicht. Er ist in der Tabelle rot markiert.

Aus der durch lineare Regression erstellten Geraden wurden die totalen Proteinkonzentrationen der Proben berechnet:

$$y = 0.1879x + 0.0083$$

$$y = \text{korrigierte Mittelwerte der Absorption und } x = \text{Proteinkonzentration}$$

$$R^2 = 0,9891$$

x kann durch Umstellen dieser Gleichung berechnet werden:

$$x = (y - 0.0083)/0.1879$$

In Abbildung 10 ist die Konzentration von BSA auf der x-Achse gegen die korrigierten Mittelwerte der gemessenen Absorption aufgetragen. Die Absorption nimmt mit steigender Proteinkonzentration linear zu, was zu erwarten war. Die Daten können für die folgende lineare Regression verwendet werden.

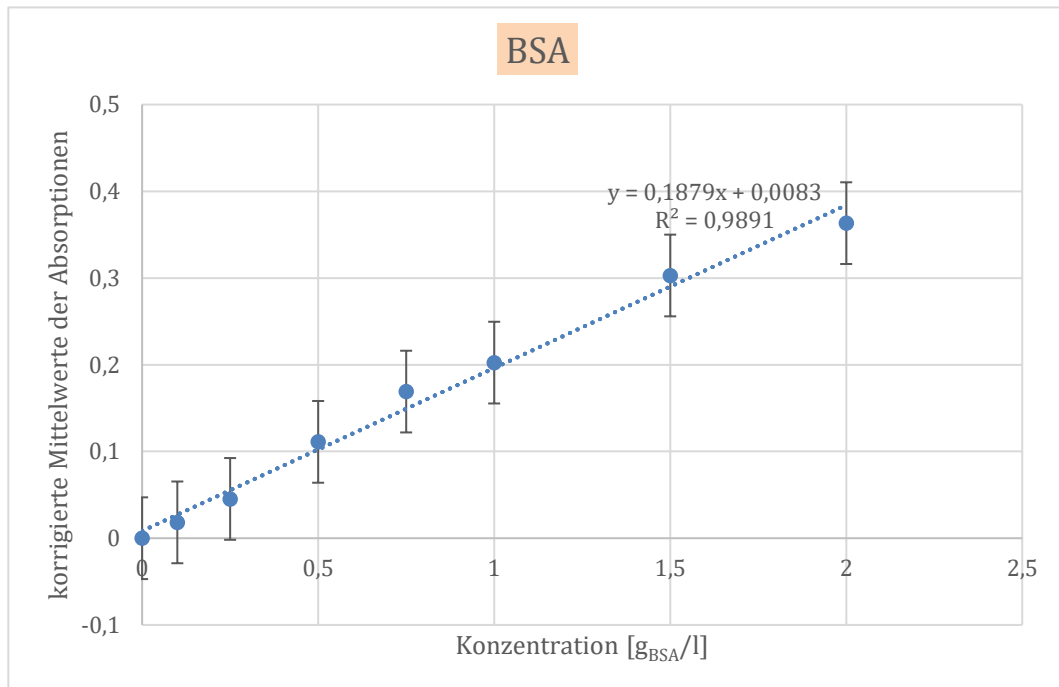


Abb. 10 | Ergebnisse des Bradford-Assays von BSA. Konzentration gegen korrigierte Mittelwerte der Absorption aufgetragen und Regressionsgerade aufgetragen.

Durch lineare Regression ergeben sich die Werte der Proteinkonzentrationen, die in Tabelle 5 angegeben sind. Diese wurden noch um die jeweilige Verdünnung erhöht.

Tabelle 5 | Berechnete Proteinkonzentrationen der Proben M, S, H und P in den jeweiligen Verdünnungen. Rot markierte Werte wurden nicht in die weitere Berechnung mit einbezogen.

Verdünnung	Proteinkonzentration Probe M [g/l]	Proteinkonzentration Probe S [g/l]	Proteinkonzentration Probe H [g/l]	Proteinkonzentration Probe P [g/l]
1:100	-5,0204006	4,41723944	7,55721044	5,67677747
1:50	-1,7473848	9,52634551	13,1985103	2,42149855
1:10	-0,2802911	8,55951758	12,8685475	0,60315742
1	0,09136067	3,78215371	4,97356745	0,82756786

Die rot markierten Werte wurden nicht in die weitere Berechnung mit einbezogen. Bei Probe M liegt das daran, dass eine negative Proteinkonzentration nicht sinnvoll ist. Bei den weiteren Proben wurde die Standardabweichung und der 1 σ -Bereich berechnet. Werte außerhalb des 1 σ -Bereichs wurden nicht in die weitere Berechnung mit einbezogen und sind deshalb rot markiert.

Auffällig ist, dass manche Werte sehr stark schwanken oder negativ sind.

Aus den berechneten Daten der Proteinkonzentrationen wurden nun die totale Proteinkonzentration der Proben berechnet und in Tabelle 6 dargestellt. Probe M hat die niedrigste Proteinkonzentration von 0,091 g/l. Probe H hat die höchste Proteinkonzentration von 11,208 g/l. Probe S hat die zweithöchste Proteinkonzentration von 5,586 g/l und Probe P hat eine geringere Proteinkonzentration von 1,284 g/l.

Tabelle 6 | Errechnete totale Proteinkonzentration der Proben M, S, P, H

Probe	Proteinkonzentration [g/l]
M	0,091360674
H	11,20808939
S	5,586303579
P	1,284074611

Daraus konnte die vermutliche GFP-Ausbeute in Probe P berechnet werden:

$$GFP\text{-Ausbeute} = g_{GFP}/g_{total\ protein}$$

Dafür wurde die Masse von Probe H und Probe P berechnet:

$$m_H = c * V = 11,21\text{ g/l} * 500 * 10^{-6}\text{ l} = 5,61\text{ mg}$$

$$m_P = c * V = 1,28\text{ g/l} * 500 * 10^{-6}\text{ l} = 0,64\text{ mg}$$

$$GFP\text{-Ausbeute} = m_P/m_H = 0,1141 = \mathbf{11,42\%}$$



Die GFP-Ausbeute liegt bei 11,42 %.

Qualitative und quantitative Analyse mittels Native PAGE

Um die Ergebnisse des Bradford Assays zu verifizieren, wurden die Proben P, S, M und H mittels Native PAGE analysiert. (vgl. Abb. 11)

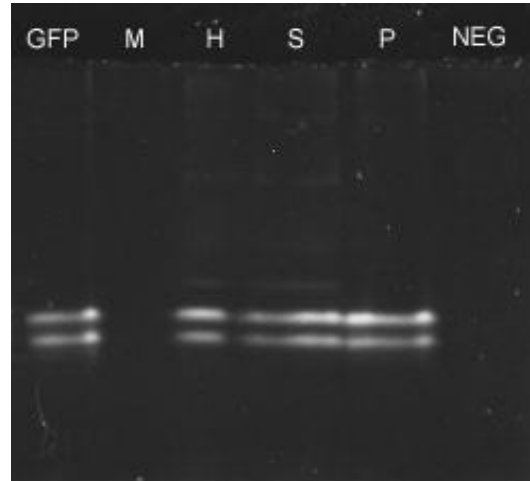


Abb. 11 | Ergebnisse der Native PAGE. GFP: GFP-Positivkontrolle, NEG: Negativkontrolle
Die Native-PAGE zeigt die erwarteten Ergebnisse. Alle Proben mit Ausnahme der Negativkontrolle und der Mediumsprobe M enthielten GFP. Aus den Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Banden wurden mittels *ImageJ* die GFP-Konzentrationen berechnet (vgl. Tabelle 7). Wie zu erwarten, steigt die GFP-Konzentration mit fortschreitender Aufreinigung an. Aus diesen Ergebnissen berechneten wir eine absolute GFP-Ausbeute von 325 µg für Probe P. Somit handelt es sich bei 50,78% aller Proteine in Probe P um GFP.

Tabelle 7 | Bandenintensitäten und Konzentrationen der Native PAGE

Probe	Intesität	Konzentration [g/l]
Positivkontrolle	12107	0,40
M	443	0,01
H	8479	0,28
S	15932	0,53
P	19551	0,65
Negativkontrolle	515	0,02



G6PDH Enzymkinetik Messung

Alle Messungen des Kinetik Assays wurden in Triplikaten durchgeführt. Zur Bestimmung der G6PDH Aktivität wurde die Absorption des stöchiometrisch vorliegenden Kofaktors NADPH bei 340 nm und verschiedenen Substrat- (G6P; 0mM, 0,25mM, 0,5mM, 1mM, 2mM, 5mM, 7mM, 10mM) sowie Inhibitor- (ATP; 0mM, 6mM, 12mM) Konzentrationen bestimmt. Absorptionsrohdaten (siehe Tabelle 20) wurden mittels der Nullprobe (0mM G6P, 0mM ATP)



korrigiert, um Interferenzen durch weitere Zellkomponenten zu vermeiden. Wie erwartet zeigt die NADPH-Absorption einen linearen Anstieg über die Zeit (vgl. Abb. 12).

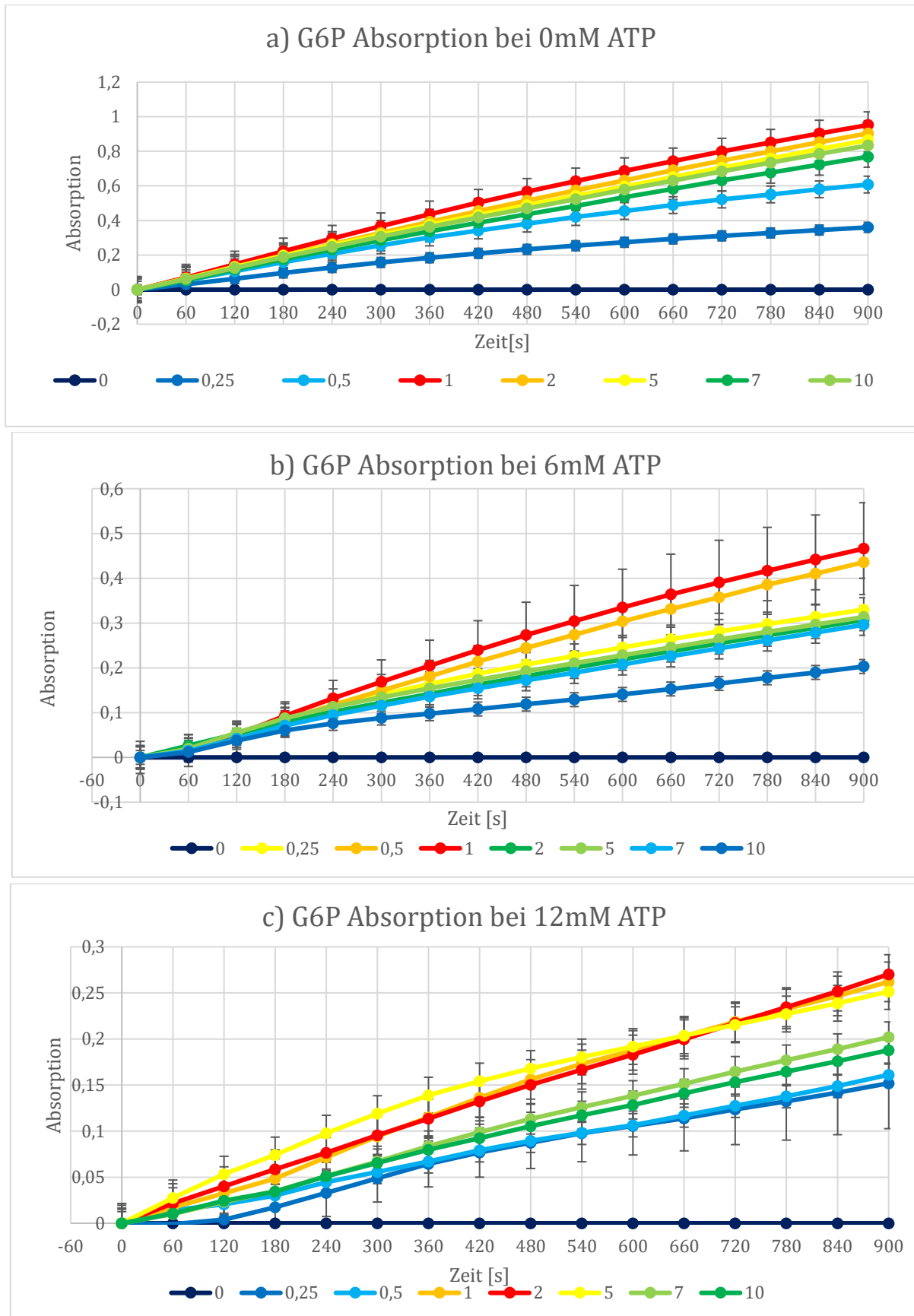


Abb. 12 | NADPH-Absorption über Reaktionszeit. a) Kein Inhibitor b) 6mM ATP als nicht-kompetitiver Inhibitor c) 12mM ATP als nicht-kompetitiver Inhibitor. Die Daten wurden nach der Nullprobe bei 0mM G6P korrigiert. Legende in mM G6P-Konzentration.

Mittels des Lambert-Beer'schen-Gesetzes wurden die NADPH-Absorptionsdaten in NADPH-Konzentrationen umgerechnet (vgl. Abb. 13).

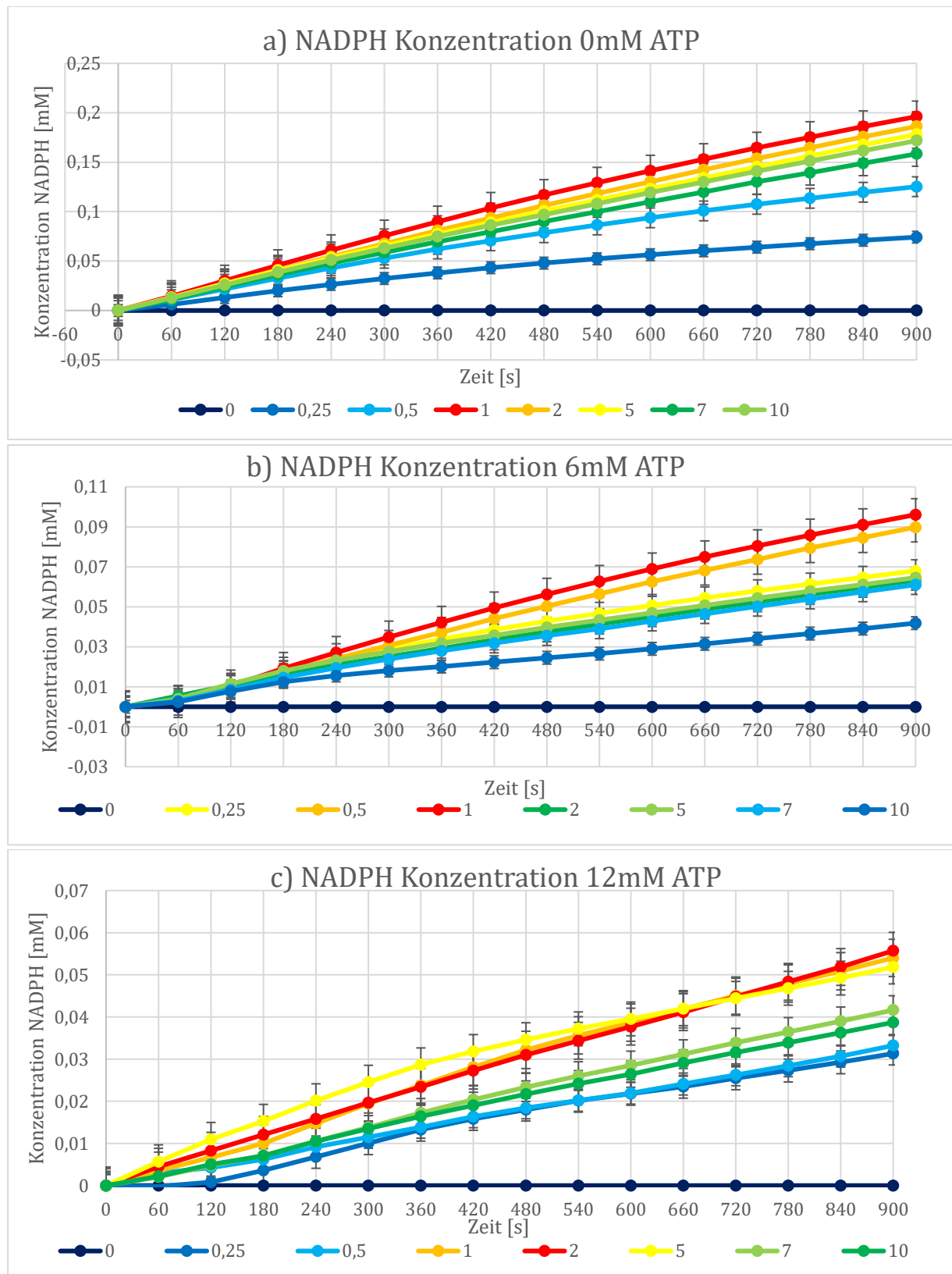


Abb. 13 | NADPH-Konzentration über Reaktionszeit. a) Kein Inhibitor b) 6mM ATP als nicht-kompetitiver Inhibitor c) 12mM ATP als nicht-kompetitiver Inhibitor. Die Daten wurden nach der Nullprobe bei 0mM G6P korrigiert. Legende in mM G6P-Konzentration.

Mittels linearer Regression wurden aus den NADPH-Konzentrationsdaten die NADPH-Reaktionsraten für alle Substrat- und Inhibitorkonzentrationen berechnet (vgl. Tabelle 8). Die Steigung der Regressionsgraden entspricht hierbei der Reaktionsrate. Die Reaktionsrate steigt mit wachsender Substratkonzentration an und sinkt mit wachsender Inhibitorkonzentration. Abweichungen in diesen Trends werden in der Diskussion behandelt.



Tabelle 8 | NADPH-Reaktionsraten für alle Substrat- und Inhibitorkonzentrationen. Fehler können nicht angegeben werden, da dieses Experiment nur einmal durchgeführt wurde.

NADPH-Reaktionsrate [mM/s]			
G6P [mM]	0mM ATP	6mM ATP	12mM ATP
0	0,0000000	0,0000000	0,0000000
0,25	0,0000823	0,0000764	0,0000377
0,5	0,0001388	0,0001033	0,0000364
1	0,0002193	0,0001114	0,0000618
2	0,0002080	0,0000689	0,0000611
5	0,0001965	0,0000705	0,0000553
7	0,0001752	0,0000677	0,0000476
10	0,0001901	0,0000442	0,0000437

Anschließend wurden aus den Reaktionsraten die Michaelis-Menten-Konstante K_m , die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} sowie die Inhibitionskonstante K_i berechnet. Hierzu führten wir nicht-lineare Regression auf Grundlage einer Michaelis-Menten-Sättigungskurve in *GraphPad Prism* durch (vgl. Abb. 14).

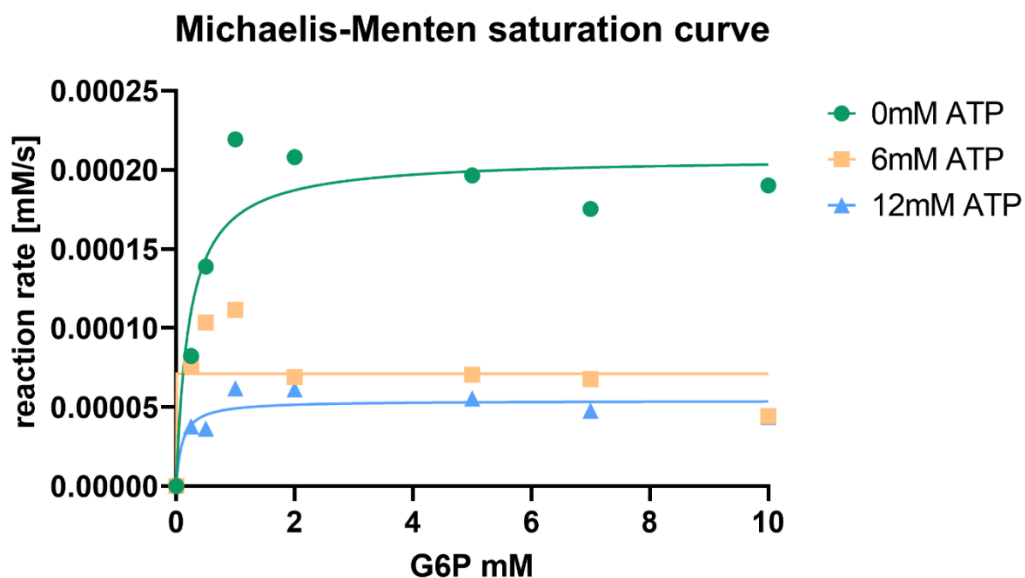


Abb. 14 | Michaelis-Menten-Sättigungskurven. Gezeigt sind Substrat-Reaktionsraten gegen die Substratkonzentration für alle Inhibitorkonzentrationen (0 mM, 6 mM, 12 mM) sowie entsprechenden Regressionskurven.

Die Werte der Reaktionsrate bei einer Inhibitorkonzentration von 0mM entsprechen in etwa dem erwarteten Kurvenverlauf. Höhere Inhibitorkonzentrationen zeigen jedoch ein unerwartetes Maximum bei ca. 1mM Substratkonzentration auf welches wir in der Diskussion eingehen werden.

Um die Regressionswerte zu verifizieren, wurde eine zweite, lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Hierzu wurden die Reaktionsraten zunächst in einem Hanes-Woolf-Plot linearisiert (Abb. 15) und anschließend K_m , K_i und v_{max} gemäß den Formeln (3), (4) und (5) bestimmt. Alle Daten zeigen einen linearen Verlauf und wurden somit für die Berechnung verwendet. Durch beide Methoden bestimmte Konstanten lassen sich Tabelle 9 und Tabelle 10 entnehmen. Mitunter große Unterschiede zwischen den Ergebnissen werden in der Diskussion diskutiert.

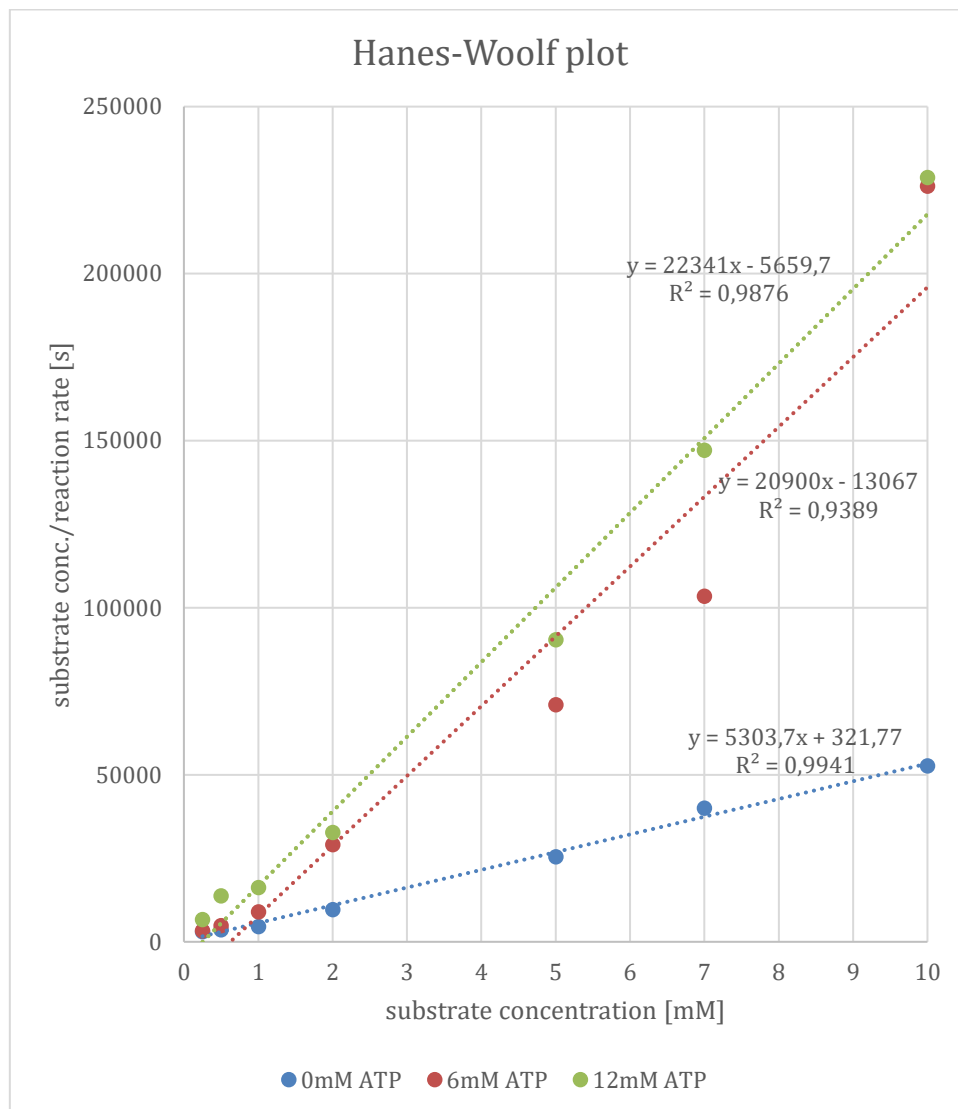


Abb. 15 | Hanes-Woolf-Plot. Gezeigt sind Substratkonzentration/Reaktionsrate gegen die Substratkonzentration für alle Inhibitorkonzentrationen (0 mM, 6 mM, 12 mM) sowie entsprechenden Regressionsgraden.

Tabelle 9 | Werte für K_m , und v_{max}

Methode	Konstante	0mM ATP	6mM ATP	12mM ATP
lineare Regression	v_{max} [mM/s]	1,885E-04	4,785E-05	4,476E-05
	K_m [mM]	6,067E-02	-6,252E-01	-2,533E-01
nicht-lineare Regression	v_{max} [mM/s]	2,078E-04	7,096E-05	5,404E-05
	K_m [mM]	2,219E-01	7,759E-09	1,007E-01
Differenz	dv_{max} [mM/s]	0,0000193	0,0000231	0,0000093
	dK_m [mM]	0,1612311	0,6251937	0,3540287

Tabelle 10 | Werte für K_i

	ATP [mM]			Methode
G6P [mM]	0	6	12	
0	0,0000	0,0000	0,0000	lineare Regression
0,25	0,0000	7,1146	14,2292	
0,5	0,0000	28,3468	56,6937	
1	0,0000	-31,6782	-63,3564	
2	0,0000	-49,9658	-99,9315	
5	0,0000	-115,4259	-230,8517	
7	0,0000	89,4337	178,8674	
10	0,0000	-422,2501	-844,5002	
-	4,5540	4,5540	4,5540	nicht-lineare Regression



Methode	Konstante	0mM ATP	6mM ATP	12mM ATP
lineare Regression	v_{max} [mM/s]	1,885E-04	4,785E-05	4,476E-05
	K_m [mM]	6,067E-02	-6,252E-01	-2,533E-01
nicht-lineare Regression	v_{max} [mM/s]	2,078E-04	7,096E-05	5,404E-05
	K_m [mM]	2,219E-01	7,759E-09	1,007E-01
Differenz	dv_{max} [mM/s]	0,0000193	0,0000231	0,0000093
	dK_m [mM]	0,1612311	0,6251937	0,3540287

Diskussion

Tag 1

Die Ergebnisse sind in allen drei Versuchen des ersten Tages wie erwartet ausgefallen. Zuerst wurde bestätigt, dass die y486+p426 empty vector Zellen zwar überleben, aber kein GFP produzieren. Sie überleben im SD-Medium, da sie erfolgreich transformiert wurden, fluoreszierten aber nicht, da im Plasmid kein Gen zur GFP-Produktion vorhanden war.

Im Gegensatz dazu konnten die Fluoreszenz der y486+pGenActGFP Zellen nachgewiesen werden, da diese das Gen zur GFP-Produktion im Plasmid haben. Es wurde deutlich, dass nicht alle dieser Zellen gleich stark oder teilweise gar nicht fluoreszierten, obwohl alle überlebenden Zellen GFP produzieren sollten, da durch den Uracil-Mangel im Medium nur erfolgreich transformierte Zellen überleben können.

Ein möglicher Grund dafür ist, dass nicht alle Zellen erfolgreich transformiert wurden und trotzdem durch Aufnahme von Uracil von bereits abgestorbenen Zellen überleben konnten. Außerdem ist es möglich, dass die Zellen bisher weniger oder kaum GFP produzieren, sodass die Fluoreszenz schlechter, bis gar nicht zu erkennen ist.

Im nächsten Versuchsteil wurde die optische Dichte beider Zelllinien bestimmt, um daraus Rückschlüsse auf die Anzahl der Zellen pro ml zu bestimmen. Die Zelldichte war bei der nicht-GFP-produzierenden Zelllinie höher als bei der GFP-produzierenden Zelllinie. Das liegt daran, dass die GFP-exprimierenden Zellen weniger Biomasse zum Wachstum zur Verfügung stehen haben, da sie neben den wirtseigenen Proteinen noch GFP exprimieren.

Tag 2

Die Ergebnisse der Stoffwechselaktivitätsmessung zeigten gemischte Ergebnisse. Die erstellten Glucose- und Ethanolstandrads waren durchweg linear und zeigten den erwarteten Verlauf. Sie konnten somit sehr gut durch eine lineare Funktion approximiert werden ($R^2 = 0,99$ bzw. $0,98$).

Der Glucoseverbrauch entspricht dagegen nicht unseren Erwartungen. Die Negativkontrolle ME mit zellfreien Alginat-Pellets zeigt einen Glucoseverbrauch von $6,2 \text{ g/l}$, was signifikant von unserem Erwartungswert 0 g/l abweicht (außerhalb des 3σ -Bereichs). Eine mögliche Erklärung für diese Abweichung wären größere Pipettierfehler in der Probenpräparation oder eine Kontamination der Negativkontrolle mit Hefe. Leider können daher weitere Kontaminationen der anderen Proben nicht vollständig ausgeschlossen werden. Weiterhin spricht der ähnliche Glucoseverbrauch der Aeroben Probe MA von $6,7 \text{ g/l}$ für eine Kontamination der Negativkontrolle. Trotz dieses Fehlers lässt sich ein signifikanter Unterschied zwischen dem Glucoseverbrauch der Aeroben Probe MA und den Anaeroben Proben MI und MAn feststellen. Diese zeigen einen höheren Verbrauch von $9,1 \text{ g/l}$ bzw. $8,2 \text{ g/l}$. Wir vermuten, dass dies der ineffizienten Energiegewinnung unter anaeroben Bedingungen geschuldet ist, weshalb Zellen unter diesen Bedingungen mehr Glucose zur Aufrechterhaltung ihres Stoffwechsels benötigen. Dieser Vermutung widersprechen leider die berechneten Ethanolausbeuten. Sie liegt in den Anaeroben Kulturen mit $5,93 \%$ bzw.

7,31 % niedriger als die Ethanolausbeute der aeroben Kultur (8,44 %). Zu erwarten, wäre eine höhere Ethanolausbeute unter anaeroben Bedingungen als bei Aeroben, da vor allem unter anaeroben Bedingungen Ethanol als Produkt der Fermentation anfällt. Ist Sauerstoff im Medium vorhanden, wechseln Hefezellen vorzugsweise auf eine vollständige Oxidation im Zitratzyklus, bei der kein Ethanol gebildet wird. Eine mögliche Erklärung für diese Abweichung wären wie zuvor Pipettierfehler oder eine unvollständige Verdrängung des Sauerstoffs aus dem Reaktionsgefäß.

Tag 3

An Tag 3 wurde die an Tag 2 genommene und ausgesalzene Probe S der GFP-exprimierenden Hefezellen durch HIC aufgereinigt und die GFP-reichste Fraktion durch UV-Strahlung bestimmt. Die Aufreinigung war erfolgreich und die Fraktion konnte eindeutig bestimmt werden. Durch den Bradford-Assay und anschließende mit dem BSA-Standard und der einzelnen Proben konnten die Proteinkonzentrationen durch lineare Regression bestimmt werden. Da der R^2 -Wert nahezu bei 1 liegt und die Regressionsgerade innerhalb der 1σ -Bereiche liegt, konnte die Regressionsgerade für die Berechnung der Proteinkonzentrationen verwendet werden. Die Schwankungen sind auf kleinere statistische Abweichungen oder Ungenauigkeiten in der Durchführung und Messung zurückzuführen.

Aus den verbesserten Mittelwerten der Absorption wurden die Proteinkonzentrationen durch lineare Regression berechnet. Die erhaltenen Werte weichen stark voneinander ab und sind teilweise negativ, was nicht den Erwartungen entspricht. Mit Hilfe der Standardabweichung wurden die zuverlässigen Werte ausgesucht. Die negativen Werte könnten entstanden sein, da durch die hohe Verdünnung kaum Proteinmenge in der Probe vorhanden war und der Wert durch die Korrektur der Mittelwerte und die anschließende lineare Regression negativ wurden. Die weiteren starken Abweichungen sind auf Fehler in der Verdünnung, ungenügende Durchmischung oder Fehler bei der Auftragung und Messung zurückzuführen. Außerdem wurde die Platte versehentlich von unten berührt, was die Messung verfälscht haben könnte. Trotzdem konnten durch Auslassen dieser Werte totale Proteinkonzentrationen bestimmt werden, die unseren Erwartungen entsprechen. Es wurde der erwartete Trend beobachtet: Probe M hat die niedrigste Proteinkonzentration, da es sich dabei nur um gesammeltes Medium handelt, da die Zellen zu dem Zeitpunkt noch nicht lysiert wurden. Probe H hat den höchsten Proteingehalt, da sie direkt nach der Lyse genommen wurde und noch ungereinigt ist. Probe S wurde nach dem Aussalzen genommen und hat deswegen eine niedrigere Konzentration als Probe H. Probe P hat die niedrigste Konzentration der proteinhaltigen Proben, da sie nach dem letzten Reinigungsschritt, der HIC, genommen wurde und demnach auch die höchste Reinheit hat. Es wurde eine GFP-Ausbeute von 11,42 % erzielt. In diesem Versuchsteil gehen wir davon aus, dass es sich bei allen Proteinen in Probe P um GFP handelt. Am nächsten Versuchstag wurde der tatsächliche GFP-Anteil in Probe P mittels native PAGE bestimmt.



Tag 4

Die Ergebnisse der Nativ-PAGE waren durchgehend zufriedenstellend. Mit Ausnahme der Probe M enthielt jede Probe der Aufreinigungsschritte GFP. In Probe M wurde kein GFP nachgewiesen, da zum Entnahmezeitpunkt der Probe die Zellen noch nicht lysiert wurden und somit kein GFP im Medium enthalten war. Auch die quantitative Messung des GFP entspricht unseren Erwartungen. Die GFP-Konzentration stieg mit fortschreitender Reinigung immer weiter auf 0,65 g/l in Probe P an. Somit konnten ca. 50% der in Probe P enthaltenen Proteine als GFP nachgewiesen werden (gesamte Proteinmenge wurde mittels des Bradford-Assays bestimmt). Zum Erreichen eines noch höheren Reinheitsgrades, müsste vermutlich eine rein GFP selektive Chromatografie durchgeführt werden, beispielsweise mittels eines immobilisierten Anti-GFP-Antikörpers.

Im Gegensatz zur Native-PAGE fielen die Ergebnisse des Enzymkinetik-Assays mäßig aus. Davon lieferte die Bestimmung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit v_{\max} die besten Resultate. Ihre Werte schwanken nur gering zwischen den beiden Bestimmungsmethoden (lineare und nicht-lineare Regression). Bei fehlendem Inhibitor beträgt der Wert 188 nM/s bzw. 208 nM/s. Er ist somit eine Größenordnung vom Sollwert 20 nM/s¹ entfernt. Leider wurden alle Enzymkinetikmessungen lediglich einmal durchgeführt, weshalb keine Standardabweichung für die Werte bestimmt werden können. Somit lässt sich nicht angeben, ob diese Abweichung signifikant ist. Dennoch zeigen die Geschwindigkeitswerte für erhöhte Inhibitorkonzentrationen einen wie erwartet abnehmenden Trend und stimmen gut mit der um 75% (6mM ATP) bzw. um 85% (12mM ATP) reduzierten Aktivität überein³. Deutlich schlechtere Ergebnisse zeigen die bestimmten Michaelis-Menten Konstanten K_m . Ihre Werte unterscheiden sich sehr stark zwischen beiden Regressionsmodellen, mitunter um zwei Größenordnungen (vgl. Tabelle 10). Zudem sind die vorhandenen negativen Werte nicht mit der Theorie vereinbar. Auch innerhalb einer Methode gibt es sehr große Schwankungen. Nahezu alle Werte unterscheiden sich um eine Größenordnung vom Erwartungswert 83,87 μM^{-1} . Eine Erklärungsmöglichkeit hierfür wäre die Wahl eines falschen Inhibitionsmodells. Zwar stellt ATP einen nicht-kompetitiven Inhibitor für G6PDH dar, was ein Michaelis-Menten Modell rechtfertigt, jedoch ist dies als alleiniges Modell ungenügend. Ab einer Substratkonzentration von ca. 0,5 mM G6P tritt für G6PDH Substratinhibition auf². Somit kann eine Michaelis-Menten Sättigungskurve nicht mehr zur geeigneten Beschreibung der Reaktionsgeschwindigkeit verwendet werden, da diese das beobachtete Maximum bei ca. 0,5 mM G6P (vgl. Abb. 14) und die anschließende Abnahme der



¹Jung S. H. *Et al.* (2016) Real-time monitoring of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity using liquid droplet arrays and its application to human plasma samples. *Biosensors and Bioelectronics* 79, 930-937, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.01.034>.

²Fonovich de Schroeder, T. M. (2005) The effect of Zn²⁺ on glucose 6-phosphate dehydrogenase activity from *Bufo arenarum* toad ovary and alfalfa plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60, 123-131, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.07.008>.

Reaktionsgeschwindigkeit nicht abzubilden vermag. In dieser Folge kann auch kein Hanes-Woolf Graph als Grundlage einer linearen Regression verwendet werden.

Da K_m und v_{max} zur Berechnung der Inhibitionskonstante K_i verwendet wurden zeigten sich hier vergleichbar schlechte Ergebnisse. Mittels nicht-linearer Regressionsanalyse wurde K_i auf 4,554 mM bestimmt. Dieser Wert unterscheidet sich um eine Größenordnung vom Literaturwert 0,39 mM³. Bei der Berechnung von K_i aus den Werten der linearen Regression des Hanes-Woolf Graphen erhielten wir nahezu unbrauchbare Daten. Nahezu alle Werte weichen um mindestens eine Größenordnung vom Literaturwert ab. Auch innerhalb einer Inhibitorkonzentration schwanken die Werte sehr stark. Pipettierfehler können daher nicht ausgeschlossen werden und stellen wahrscheinlich einen der Hauptgründe für die Schwankungen dar. Jedoch könnte auch die Substratinhibition eine Rolle in den besonders großen Abweichungen bei hohen G6P-Konzentrationen (5 mM, 7 mM, 10mM) spielen. Sie würde eine stärkere Inhibition suggerieren als tatsächlich vorliegt und so den Wert für K_i fälschlich erhöhen. Leider können für keine Bestimmungen der Konstanten Fehlerwerte angegeben werden. Somit lässt sich die Signifikanz der Abweichungen nicht überprüfen. In Zukunft sollten die Versuche zur Enzymkinetik mehrfach wiederholt werden, um eindeutige Ergebnisse zu liefern.

³Richard N. Horne, N. H. *et al.* (1970) Glucose dehydrogenase activity of yeast glucose 6-phosphate dehydrogenase. Inhibition by adenosine 5'-triphosphate and other nucleoside 5'-triphosphates and diphosphates. *Biochemistry* 9, 610-616

Anhang

Rohdaten zur Bestimmung der Stoffwechselaktivität

Tabelle 11 | Rohdaten der Absorption bei Bestimmung des Glucoseverbrauchs, Glucosestandard, mit Mittelwerten, korrigierten Mittelwerten und Standardabweichung (sd)

Konzentration [g/l]	Glucosestandard-Triplikate			Mittelwert	Korr. Mittelwert	sd
0	0,0515	0,0518	0,0502	0,051157164	0	0,00085049
0,1	0,169699997	0,1584	0,1496	0,158811031	0,107653868	0,01007588
0,2	0,298900008	0,2705	0,25409999	0,273275896	0,222118732	0,02266628
0,3	0,417499989	0,3962	0,3484	0,385136231	0,333979067	0,03538677
0,4	0,521200001	0,4835	0,458	0,486199418	0,435042254	0,03179565
0,6	0,74879998	0,6717	0,5794	0,659318439	0,608161275	0,08481357
0,8	0,90259999	0,79509997	0,80940002	0,833079474	0,78192231	0,05837662
1,0	1,052700043	1,01830006	0,9673	1,011540847	0,960383683	0,04296807

Tabelle 12 | Rohdaten der Absorptionsmessung, Glucose, Probe MA, Man, MI, ME, bei 2 verschiedenen Verdünnungen

Verdünnung	Probe MA	Probe Man	Probe MI	Probe ME
50-fold	0,35910001	0,3175	0,29750001	0,44260001
	0,34330001	0,2978999	0,27500001	0,38789999
	0,3048	0,25470001	0,25279999	0,38929999
Mittelwerte	0,33573334	0,290033303	0,275100003	0,406599997
Sd	0,02792962	0,03213056	0,02235018	0,03118478
10-fold	1,18359995	1,02170002	1,08220005	1,16069996
	1,19400001	1,08010001	0,91799998	1,14779997
	0,98809999	0,9515	0,80849999	0,86110002
Mittelwerte	1,121899983	1,017766677	0,93623334	1,056533317
sd	0,11599081	0,0643902	0,13775802	0,16937306

Tabelle 13 | Rohdaten der Absorption bei Bestimmung der Ethanolproduktion, Ethanolstandard, mit Mittelwerten, korrigierten Mittelwerten und Standardabweichung (sd)

Konzentration [g/l]	Ethanolstandard-Triplikate			Mittelwert	Korr. Mittelwert	sd
0	0,289000005	0,2809	0,317200005	0,29490468	0	0,01905492
0,0125	0,346300006	0,3396	0,370099992	0,35152338	0,056618699	0,01602903
0,025	0,400999993	0,40329999	0,435799986	0,4127717	0,117867016	0,01946184
0,05	0,516099989	0,51590002	0,537299991	0,52290983	0,228005146	0,01229796
0,075	0,618600011	0,60280001	0,596400023	0,6057907	0,310886016	0,01142686
0,1	0,703700006	0,71069998	0,649900019	0,68699849	0,392093806	0,03326678
0,15	0,759500027	0,85329998	0,828400016	0,81174921	0,51684452	0,04858952
0,2	0,861500025	0,97610003	0,985099971	0,93738967	0,642484985	0,06890949

Tabelle 14 | Rohdaten der Absorptionsmessung, Ethanol, Probe MA, Man, MI, ME, bei 2 verschiedenen Verdünnungen

Verdünnung	Probe MA	Probe Man	Probe MI	Probe ME
10-fold	0,47749999	0,52179998	0,4621	0,32640001
	0,50480002	0,55320001	0,4637	0,30210000
	0,56220001	0,56730002	0,4767	0,30779999
Mittelwert	0,5124745	0,54676247	0,46740942	0,31176117
Sd	0,01930404	0,02220317	0,00113137	0,0171827
1	1,01129997	1,28849995	1,14020002	0,30720001
	1,24469995	1,22870004	1,06719995	0,3028
	1,18330002	1,13999999	1,13900006	0,3028
Mittelwert	1,13751538	1,21597423	1,11439912	0,30686591
Sd	0,16503871	0,04228492	0,05161884	0,00311128

Rohdaten zum Bradford-Assay

Tabelle 15 | Rohdaten der Absorptionsmessung des Bradford-Assays an Tag 3, Probe M

	Absorption			Mittelwerte	Korrigierte Mittelwerte	Standardabweichung
1:100	0,2476	0,2441	0,2438	0,24516667	-0,0011333	0,00211266
1:50	0,24529999	0,24879999	0,25	0,24803333	0,00173333	0,002442
1:10	0,2441	0,2529	0,25099999	0,24933333	0,00303333	0,00463069
1	0,25330001	0,2507	0,31130001	0,27176667	0,02546667	0,03426155

Tabelle 16 | Rohdaten der Absorptionsmessung des Bradford-Assays an Tag 3, Probe S

	Absorption			Mittelwerte	Korrigierte Mittelwerte	Standardabweichung
1:100	0,26589999	0,2599	0,60250002	0,26289999	0,01659999	0,00424263
1:50	0,25350001	0,2983	0,31940001	0,29040001	0,04410001	0,03365278
1:10	0,40110001	0,38319999	0,46200001	0,41543334	0,16913334	0,04130913
1	0,86830002	0,90310001	1,12440002	0,96526668	0,71896668	0,13890761

Tabelle 17 | Rohdaten der Absorptionsmessung des Bradford-Assays an Tag 3, Probe P

	Absorption			Mittelwerte	Korrigierte Mittelwerte	Standardabweichung
1:100	0,2467	0,24339999	0,3057	0,26526667	0,01896666	0,03505515
1:50	0,25389999	0,24699999	0,2902	0,26369999	0,01739999	0,02320754
1:10	0,25659999	0,2483	0,2929	0,26593333	0,01963333	0,02371968
1	0,3265	0,5104	0,39340001	0,4101	0,1638	0,09308045

Tabelle 18 | Rohdaten der Absorptionsmessung des Bradford-Assays an Tag 3, Probe H

	Absorption			Mittelwerte	Korrigierte Mittelwerte	Standardabweichung
1:100	0,27419999	0,2674	0,26480001	0,2688	0,0225	0,00485386
1:50	0,29370001	0,30500001	0,31389999	0,3042	0,0579	0,01012373
1:10	0,48030001	0,48840001	0,5205	0,49640001	0,25010001	0,02126052
1	1,3233	0,9461	1,29799998	1,18913333	0,94283332	0,21085285

Tabelle 19 | Rohdaten der Absorptionsmessung des Bradford-Assays an Tag 3, BSA-Standard

	Absorption			Mittelwerte	Korrigierte Mittelwerte	Standardabweichung
0	0,238900006	0,250200003	0,2498	0,246300002	0	0,0064117
0,1	0,255800009	0,266200006	0,27169999	0,26456667	0,018266668	0,00807485
0,25	0,279399991	0,296099991	0,29929999	0,291599989	0,045299987	0,01068597
0,5	0,341800004	0,362399995	0,368	0,3574	0,111099998	0,0137971
0,75	0,392199993	0,429399997	0,42449999	0,41536666	0,169066658	0,02021196
1	0,447600007	0,419499993	0,47920001	0,448766669	0,202466667	0,0298671
1,5	0,530300021	0,559899986	0,5575	0,549233337	0,302933335	0,01644058
2	0,569800019	0,6347	0,62419999	0,609566669	0,363266667	0,0348368

Rohdaten zur Messung der Enzymkinetik

Tabelle 20 | Rohdaten der Absorptionsmessung

Cycle Nr.	Raw data															
Time [s]	0	60	120	180	240	300	360	420	480	540	600	660	720	780	840	900
A1	0,23199999	0,2405	0,2454	0,24950001	0,253800005	0,2579	0,261500001	0,264200002	0,267199993	0,269600004	0,270999998	0,27200001	0,27329999	0,274899989	0,275599986	0,278200001
A2	0,2101	0,2123	0,21269999	0,215	0,217999995	0,220899999	0,2236	0,226699993	0,229900002	0,232600003	0,234799996	0,236399999	0,2386	0,2412	0,242899999	0,245499998
A3	0,2217	0,2299	0,2324	0,2334	0,235200003	0,236200005	0,238000005	0,239600003	0,2421	0,244100004	0,2456	0,246699999	0,2491	0,251599997	0,253699988	0,256500006
A4	0,24429999	0,2622	0,27540001	0,2863	0,298000008	0,308600008	0,318599999	0,3301	0,340200007	0,349599987	0,35769999	0,3646	0,3714	0,379000008	0,384999999	0,391799986
A5	0,2375	0,26930001	0,27939999	0,28909999	0,300599992	0,312099993	0,323100001	0,331499994	0,33919999	0,345899999	0,351500005	0,3563	0,3608	0,364800006	0,368499994	0,372500002
A6	0,2379	0,26190001	0,27079999	0,2784	0,290399998	0,303600013	0,315800011	0,325300008	0,334699988	0,343100011	0,350499988	0,35749999	0,3644	0,371199995	0,377299994	0,384099999
A7	0,3346	0,3522	0,3784	0,40290001	0,416399986	0,426200002	0,431600004	0,437599987	0,441799998	0,447400004	0,451299995	0,45519999	0,457399999	0,460799992	0,461600006	0,462900013
A8	0,2016	0,2456	0,25369999	0,27039999	0,282799989	0,293099999	0,300799996	0,309199989	0,318300009	0,325599998	0,331800014	0,33759999	0,3436	0,349799991	0,355800003	0,362399995
A9	0,22400001	0,23800001	0,2445	0,2559	0,264200002	0,274599999	0,284799993	0,293700001	0,303900003	0,3116	0,321099997	0,32789999	0,3348	0,340999991	0,347099999	0,353500009
B1	0,33840001	0,39250001	0,4411	0,48750001	0,532000005	0,572700024	0,610599995	0,645500004	0,676599979	0,704699993	0,730199993	0,753899999	0,77600002	0,797399998	0,817300022	0,835699975
B2	0,2089	0,2318	0,25549999	0,27860001	0,300999999	0,324400008	0,345200002	0,365999997	0,385500014	0,403400004	0,421700001	0,438800001	0,4562	0,473899999	0,4921	0,510399997
B3	0,2358	0,26769999	0,30410001	0,34130001	0,377600014	0,408899993	0,440200001	0,468400002	0,494199991	0,518700004	0,540199995	0,56129998	0,58069998	0,599099994	0,616299987	0,633499998
B4	0,25669999	0,27990001	0,31240001	0,34940001	0,382400006	0,409500003	0,432799995	0,454100013	0,472999999	0,490500003	0,506600022	0,52240002	0,53710002	0,551800013	0,565900028	0,581099987
B5	0,2608	0,29620001	0,3364	0,3813	0,423999995	0,453999996	0,487599999	0,518299997	0,548200011	0,581799984	0,607599974	0,6372	0,66070002	0,687600017	0,709299982	0,726400018
B6	0,26050001	0,3179	0,3721	0,4233	0,472299993	0,523199975	0,570299983	0,614099979	0,654500008	0,691500008	0,727699995	0,76099998	0,79290003	0,823099971	0,852100015	0,880699992
B7	0,26480001	0,27520001	0,2949	0,3294	0,360500008	0,391400009	0,419299999	0,444200009	0,465999991	0,487199992	0,504100025	0,52200001	0,539600001	0,557500005	0,573700011	0,590399981
B8	0,28380001	0,3292	0,3531	0,3732	0,394400001	0,417400002	0,436100006	0,454899997	0,470699996	0,484200001	0,494500011	0,505299999	0,5169	0,529299974	0,538900018	0,548699975
B9	0,20919999	0,22849999	0,25170001	0,27970001	0,301600009	0,32249999	0,341199994	0,356000006	0,370000005	0,382499993	0,395000011	0,404000001	0,41499999	0,424499989	0,434199989	0,445300013
C1	0,33039999	0,3845	0,43309999	0,48050001	0,523800015	0,563000023	0,598100007	0,627600014	0,654699981	0,679400027	0,700699985	0,72070003	0,7403	0,757799983	0,775699973	0,792200029
C2	0,33750001	0,4149	0,48469999	0,55260003	0,618300021	0,681299984	0,742299974	0,794700027	0,849099994	0,900399983	0,946900001	0,99119997	1,03410006	1,073400021	1,112300038	1,148599982
C3	0,26499999	0,3114	0,35980001	0,41	0,459399998	0,508700013	0,557399988	0,603600025	0,649600029	0,694800019	0,737200022	0,7791	0,81910002	0,857200027	0,894200027	0,931400001
C4	0,24150001	0,27149999	0,30680001	0,34720001	0,383399993	0,421299994	0,458400011	0,497599989	0,532700002	0,565800011	0,600899994	0,63200003	0,665199999	0,695599973	0,724099994	0,754899979
C5	0,2296	0,27880001	0,31920001	0,3626	0,403499991	0,4454	0,483500004	0,51910001	0,550700009	0,579900026	0,603999972	0,62910002	0,65270001	0,676599979	0,698400021	0,721400023
C6	0,2396	0,2897	0,33559999	0,39160001	0,444700003	0,494700015	0,542699993	0,5898	0,633300006	0,675199986	0,71420002	0,750500002	0,78579998	0,820500016	0,851400018	0,883599997
C7	0,26899999	0,30050001	0,3211	0,34439999	0,366400003	0,384799987	0,403200001	0,420899987	0,43689999	0,450899988	0,464300007	0,479	0,49259999	0,506600022	0,519900024	0,534200013
C8	0,2207	0,26179999	0,28130001	0,3019	0,317400008	0,331900001	0,344099998	0,3565	0,366899997	0,37650001	0,38440001	0,3917	0,39950000	0,406899989	0,413399994	0,422100008
C9	0,23630001	0,2651	0,29010001	0,3211	0,349900007	0,373899996	0,394199997	0,415499985	0,434500009	0,451999992	0,467599988	0,48460001	0,50129998	0,517799973	0,533599973	0,551299989
D1	0,3251	0,3901	0,45680001	0,52539998	0,593100011	0,660000026	0,723800004	0,786700001	0,846499979	0,903299987	0,958500028	1,01189995	1,066300003	1,11559999	1,167000055	1,21449995
D2	0,3678	0,43920001	0,5133	0,61110002	0,676500022	0,743700002	0,811399996	0,876100004	0,938000023	0,996100008	1,052000046	1,10599995	1,15699995	1,205700004	1,253200054	1,299000025
D3	0,36129999	0,44870001	0,5388	0,62709999	0,712300003	0,7949	0,874000013	0,950100005	1,022300005	1,091199994	1,157600004	1,22019994	1,28190005	1,34070003	1,398200035	1,452900052
D4	0,2617	0,31029999	0,36719999	0,42770001	0,487699986	0,544799984	0,599099994	0,65170002	0,700399995	0,744799972	0,78609997	0,82499999	0,861	0,895299971	0,926800013	0,958599985
D5	0,2701	0,29319999	0,31810001	0,37549999	0,416599989	0,456999987	0,494800001	0,529799998	0,563000023	0,595000029	0,625100017	0,65579998	0,68419999	0,712899983	0,739899993	0,766799986
D6	0,259	0,29879999	0,3484	0,4005	0,450800002	0,500899971	0,549099982	0,595399976	0,640699983	0,681999981	0,722599983	0,759800002	0,79439998	0,827600002	0,860099971	0,8926
D7	0,2834	0,3272	0,377	0,42030001	0,461400002	0,499599993	0,532100022	0,560699999	0,585699975	0,608699977	0,627799988	0,6462	0,66350001	0,680299997	0,694400012	0,708899975
D8	0,2597	0,29789999	0,32440001	0,35530001	0,38499999	0,413800001	0,437900007	0,46329999	0,487699986	0,509599984	0,529999971	0,5521	0,57270002	0,591199994	0,610499978	0,630400002
D9	0,25909999	0,2757	0,2951	0,32249999	0,353700012	0,38530001	0,414400011	0,446099997	0,477899998	0,505300011	0,527899981	0,549499999	0,573200002	0,593299985	0,615200012	0,635800004
E1	0,29300001	0,3321	0,38049999	0,42469999	0,467099994	0,507799983	0,549700022	0,589200002	0,627300024	0,665499985	0,701200008	0,741900003	0,78039998	0,816299975	0,853799999	0,893400013
E2	0,32980001	0,4122	0,48800001	0,56010002	0,628700018	0,696399987	0,762799978	0,826300025	0,888100028	0,946699977	1,003700018	1,06079996	1,11469996	1,167299986	1,219799995	1,272600055
E3	0,3299	0,41999999	0,5068	0,59719998	0,690299988	0,783699989	0,877499998	0,967100024	1,057399988	1,143700004	1,231299996	1,31270003	1,39310002	1,468000054	1,544199944	1,613399982
E4	0,2897	0,3416	0,3743	0,40439999	0,428900003	0,453200012	0,478500009	0,503799975	0,527899981	0,550999999	0,573899984	0,597	0,620129998	0,643599987	0,667800009	0,691799998
E5	0,28580001	0,33770001	0,37459999	0,41530001	0,450899988	0,485300004	0,518100023	0,552399993	0,584699988	0,614099979	0,641300023	0,66869998	0,694500003	0,720700026	0,744700015	0,770399988
E6	0,30000001	0,34940001	0,39019999	0,43090001	0,470800012	0,507499993	0,541599989	0,572899997	0,602100015	0,630500019	0,656099975	0,67949998	0,701900003	0,723699987	0,743200004	0,763000011
E7	0,31760001	0,3682	0,40619999	0,44220001	0,471100003	0,499900013	0,524200002	0,549899995	0,574199975	0,595300019	0,616999984	0,63819999	0,6591	0,680700004	0,700699985	0,721700013
E8	0,2438	0,26980001	0,30230001	0,34290001	0,374300003	0,404199988	0,431600004	0,458200008	0,484899998	0,509299994	0,534099996	0,55720001	0,58020002	0,603200018	0,624599993	0,647700012
E9	0,26710001	0,303	0,33799999	0,36919999	0,396200001	0,424299985	0,450100005	0,476399988								

Tabelle 21 | Mittelwerte der Absorptionsrohdaten, korrigiert mit Nullprobe

	0	60	120	180	240	300	360	420	480	540	600	660	720	780	840	900
A1-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A4-6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A7-9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B1-3	0	0,02999999	0,06363333	0,09673333	0,12809998	0,15723333	0,18453333	0,21003337	0,23259998	0,25373332	0,27379999	0,29309998	0,31086666	0,32779999	0,34473338	0,360033308
B4-6	0	0,01623333	0,04885	0,08355	0,112816662	0,140049979	0,164183314	0,186933324	0,207516665	0,226600001	0,245716676	0,26403333	0,28126668	0,297583317	0,31386669	0,329899992
B7-9	0	-0,00095	0,00390001	0,01745	0,033050016	0,04885	0,064349994	0,07675001	0,087449998	0,097649992	0,105650023	0,11375003	0,1235	0,132400006	0,141900003	0,151949987
C1-3	0	0,053	0,106	0,15870001	0,208466679	0,256300007	0,301866656	0,342100024	0,381700004	0,419733341	0,454766676	0,48883333	0,52113336	0,550533349	0,580300023	0,607633337
C4-6	0	0,01548332	0,04534999	0,08415	0,117066659	0,149249993	0,180733326	0,214083321	0,24431667	0,273649993	0,303666674	0,33113336	0,35751665	0,385733319	0,410166673	0,435799989
C7-9	0	0,01435	0,02055001	0,02999999	0,044500016	0,055599995	0,067150004	0,079199992	0,089500003	0,098149993	0,106400006	0,11690002	0,12749999	0,137950011	0,149050005	0,161199994
D1-3	0	0,0699	0,14570001	0,22168331	0,295100003	0,367183343	0,435933337	0,502966672	0,566066658	0,626549984	0,685650036	0,74231661	0,79850004	0,850316678	0,903266718	0,951699997
D4-6	0	0,01259998	0,05023333	0,09293333	0,131666655	0,169099972	0,204799985	0,239633327	0,272966668	0,304033324	0,334333325	0,3637	0,39063332	0,416566645	0,441633329	0,46616666
D7-9	0	0,01706667	0,03236668	0,04853334	0,071633349	0,094400009	0,115166689	0,136283338	0,156149993	0,17293333	0,187599992	0,20295002	0,21863336	0,232600008	0,246683344	0,262066657
E1-3	0	0,06423332	0,13196666	0,19839998	0,263399988	0,327999974	0,392666653	0,454400013	0,514900004	0,57356664	0,631966665	0,69036666	0,74609998	0,798333332	0,852233311	0,903433338
E4-6	0	0,02649999	0,05256665	0,08033333	0,101933325	0,121966655	0,141633327	0,162133311	0,18159999	0,20039999	0,21859999	0,23699998	0,25473333	0,272399987	0,289700006	0,306999996
E7-9	0	0,0217	0,04013333	0,0585	0,076700007	0,095533326	0,113566677	0,132316664	0,15034999	0,16670001	0,182999998	0,19965	0,21743333	0,234500021	0,251616657	0,27033332
F1-3	0	0,06343331	0,13109999	0,19579998	0,257699976	0,31690001	0,37576666	0,432099978	0,487866665	0,542166685	0,596766656	0,65056666	0,70573334	0,757966692	0,812566668	0,864566629
F4-6	0	0,01916667	0,05553334	0,08723334	0,112833346	0,133999998	0,154300009	0,173433339	0,192333336	0,210000013	0,227866684	0,24570002	0,26339998	0,280266667	0,296500022	0,313333328
F7-9	0	0,02749999	0,05326666	0,07406666	0,097733344	0,119000003	0,139033337	0,154350008	0,167983328	0,180466667	0,191833337	0,20351666	0,21553334	0,227100015	0,238816679	0,251533329
G1-3	0	0,05369999	0,11653333	0,17549999	0,231566668	0,284833347	0,336899981	0,386599978	0,436166669	0,484333331	0,533733313	0,58183331	0,63163334	0,677633343	0,725233335	0,768600012
G4-6	0	0,01463332	0,04163332	0,0709	0,094399994	0,115533317	0,13546667	0,15426666	0,172333335	0,188733324	0,207599983	0,22566665	0,24346665	0,261099969	0,278533344	0,296066687
G7-9	0	0,0099	0,0231	0,03486667	0,051200007	0,067066674	0,083700011	0,098816668	0,113283341	0,12606667	0,138266673	0,15128336	0,16446668	0,176900019	0,189083338	0,202033331
H1-3	0	0,06133332	0,12506666	0,18793333	0,247899999	0,305766677	0,362933323	0,417866667	0,470033333	0,52320001	0,578566675	0,63073332	0,68323334	0,733899986	0,78429998	0,833433355
H4-6	0	0,01173333	0,03753333	0,06023333	0,075833331	0,087766667	0,097533335	0,108033339	0,118900001	0,128900001	0,140566677	0,1528	0,16509999	0,177666654	0,189700007	0,202933331
H7-9	0	0,01050001	0,02446668	0,03426668	0,050866688	0,065399999	0,079700013	0,092316682	0,105316674	0,117233341	0,12833335	0,14105001	0,15330001	0,16443335	0,175949991	0,187866678

Tabelle 22 | Standardabweichung der Absorptionsrohdaten

	0	60	120	180	240	300	360	420	480	540	600	660	720	780	840	900
A1-3	0	0,004	0,0056205	0,00630661	0,00699357	0,00787041	0,00854478	0,00865583	0,00872315	0,008747	0,00849647	0,00821362	0,00772722	0,00718424	0,00647868	0,00641561
A4-6	0	0,01	0,0081829	0,00851703	0,00820893	0,00790062	0,00816374	0,00614708	0,00441436	0,00257294	0,00099333	0,00106145	0,00288906	0,00555937	0,00744625	0,00971904
A7-9	0	0,023	0,02277381	0,0299267	0,03372397	0,03343562	0,03049504	0,02924869	0,02701716	0,02636564	0,02353736	0,02270434	0,02225669	0,02267216	0,02396011	0,02606005
B1-3	0	0,016	0,02884153	0,04026082	0,0512332	0,05992816	0,0684852	0,07549839	0,08127154	0,08635625	0,08991056	0,0931768	0,09547374	0,09726858	0,09806477	0,09811489
B4-6	0	0,018	0,02848419	0,03535523	0,0430859	0,05542121	0,06729079	0,0784521	0,08903082	0,09883511	0,10838326	0,11697626	0,12558167	0,13331607	0,14080529	0,14761866
B7-9	0	0,024	0,02570532	0,02481223	0,0257425	0,02579341	0,02487643	0,02673511	0,02801082	0,03086168	0,03152312	0,03518427	0,03814722	0,04217567	0,04575646	0,04926383
C1-3	0	0,017	0,02880381	0,03958885	0,05065929	0,0617526	0,07357345	0,08349596	0,09600602	0,10836395	0,12028397	0,13203464	0,14355897	0,15453731	0,16524765	0,17562111
C4-6	0	0,013	0,01719893	0,02404025	0,03212953	0,03807415	0,04362724	0,04790307	0,05280385	0,05825179	0,06263526	0,06707023	0,07198246	0,0754438	0,07905528	0,08263487
C7-9	0	0,018	0,01671985	0,02168633	0,02569195	0,02752932	0,02786402	0,03015105	0,03235934	0,03495248	0,0376969	0,0418522	0,04589392	0,05032119	0,05508117	0,05985094
D1-3	0	0,012	0,02415788	0,03387267	0,04208769	0,05020564	0,05805875	0,0649237	0,07138022	0,0777866	0,08378207	0,08872584	0,09319568	0,09854096	0,10256813	0,10693243
D4-6	0	0,015	0,02289765	0,03107368	0,04029917	0,04858693	0,05688537	0,06563447	0,07354196	0,07987771	0,08581947	0,09009199	0,09409302	0,09708072	0,09970299	0,10256048
D7-9	0	0,022	0,03299646	0,04248844	0,04845488	0,05178261	0,05324169	0,05232558	0,04961041	0,04895626	0,04631494	0,04425001	0,0417615	0,04032745	0,03801496	0,03525586
E1-3	0	0,028	0,04748699	0,07037633	0,09518267	0,12120214	0,1467854	0,17158435	0,19742822	0,22124864	0,24699262	0,26721953	0,28805704	0,30750905	0,32681726	0,34161059
E4-6	0	0,007	0,00647867	0,01080941	0,01781394	0,02409445	0,02877069	0,03257489	0,03613955	0,03937499	0,04134534	0,04270662	0,04336759	0,04406662	0,04316534	0,04333012
E7-9	0	0,021	0,02211167	0,02533877	0,02750224	0,02730593	0,02491078	0,02395091	0,02232785	0,02123802	0,0192669	0,01867441	0,01791434	0,01843918	0,01929007	0,02019249
F1-3	0	0,015	0,02890036	0,03862146	0,04744133	0,05522279	0,06229473	0,06890679	0,07498175	0,08187922	0,08750506	0,09166554	0,09381127	0,09652254	0,09627169	0,09794256
F4-6	0	0,015	0,01409267	0,01058741	0,00845202	0,01661626	0,02766617	0,03923115	0,04954157	0,06084721	0,07106504	0,08170987	0,09133059	0,09998828	0,10898774	0,11761927
F7-9	0	0,017	0,02218933	0,03427166	0,04703632	0,05726324	0,06814792	0,0782631	0,08772585	0,0971274	0,10607006	0,11502972	0,12268532	0,13055936	0,13826897	0,14536838
G1-3	0	0,012	0,0210027	0,03120812	0,04021546	0,04770715	0,05599522	0,063386	0,06827195	0,07242299	0,07703946	0,08214138	0,08538077	0,08842099	0,09596892	0,09674416
G4-6	0	0,009	0,0092376	0,00977547	0,0118624	0,01392168	0,01599022	0,01775771	0,01974758	0,02073241	0,0224131	0,02265429	0,02361024	0,02456862	0,02515289	0,02652042
G7-9	0	0,016	0,01637172	0,02156425	0,02426444	0,02433256	0,02265687	0,02220915	0,02182995	0,02274196	0,02260369	0,02325568	0,02554572	0,02806427	0,03052354	0,03306337
H1-3	0	0,009	0,02271898	0,03276375	0,03996896	0,04977514	0,06103999	0,07167506	0,08019425	0,08974537	0,10201817	0,11153903	0,12164721	0,13321287	0,14345134	0,15321638
H4-6	0	0,009	0,0131447	0,01655939	0,01832995	0,01738601	0,01665634	0,01337623	0,01043009	0,00593129	0,0026483	0,00381661	0,007628	0,01132681	0,01561716	0,01922818
H7-9	0	0,017	0,01797044	0,02288683	0,02696688	0,02888149	0,02937113	0,0312299	0,0334019	0,03619582	0,03957532	0,04333027	0,04687983	0,0510887	0,05531052	0,05900414

Quellen

²Fonovich de Schroeder, T. M. (2005) The effect of Zn²⁺ on glucose 6-phosphate dehydrogenase activity from *Bufo arenarum* toad ovary and alfalfa plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60, 123-131, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.07.008>

¹Jung S. H. *Et al.* (2016) Real-time monitoring of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity using liquid droplet arrays and its application to human plasma samples. *Biosensors and Bioelectronics* 79, 930-937, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.01.034>.

³Richard N. Horne, N. H. *et al.* (1970) Glucose dehydrogenase activity of yeast glucose 6-phosphate dehydrogenase. Inhibition by adenosine 5'-triphosphate and other nucleoside 5'-triphosphates and diphosphates. *Biochemistry* 9, 610-616