

Grüne Bioraffinerie Phase III - ANNEX

Chromatographie, Chemische und physikalische
Eigenschaften von Aminosäuren

M. Mandl, S. Novalin, M. Reinhofer, D. Astleitner, Vu H.T.,
S. Kromus, T. Zwickmair, M. Tauber, H. Böchzelt, H. Schnitzer

Berichte aus Energie- und Umweltforschung

2b/2011

Impressum:

Eigentümer, Herausgeber und Medieninhaber:
Bundesministerium für Verkehr, Innovation und Technologie
Radetzkystraße 2, 1030 Wien

Verantwortung und Koordination:
Abteilung für Energie- und Umwelttechnologien
Leiter: DI Michael Paula

Liste sowie Downloadmöglichkeit aller Berichte dieser Reihe unter
<http://www.nachhaltigwirtschaften.at>

Grüne Bioraffinerie Phase III - ANNEX

Chromatographie, Chemische und physikalische Eigenschaften von Aminosäuren

Ao. Univ.-Prof. DI Dr. Hans Schnitzer, DI Michael Mandl,
Dr. Michael Lukas, Mag. Dr. Marion Reinhofer, Dr. Michael Tauber,
Dr. Herbert Böchzelt (Institut für Nachhaltige Techniken und Systeme;
JOANNEUM RESEARCH Forschungsgesellschaft mbH.)

Ao. Univ.-Prof. DI Dr. Senad Novalin, Dr. Vu H. Thang (Universität für Boden-
denkultur Wien, Department f. Lebensmittelwissenschaften u. –technologie)

DI Doris Astleitner, Univ. Prof. Dr. Florin Florineth (Universität für Bodenkul-
tur Wien, Institut für Ingenieurbiologie und Landschaftsbau)

Dr. Stefan Kromus (Biorefinery Systems)

Dr. Markus Neureiter (IFA-Tulln, Abteilung Umweltbiotechnologie)

DI Wolfgang Glasl (VTU Engineering GmbH)

Helmut Gössler (PDC Verfahrenstechnische Entwicklungsges. mbH)

Mag. Patricia Novalin-Canoy (Gradient process technology GesmbH)

Sabine Herneth (Herneth Gartenbau)

Ing. Walter Retschek (Aquasol Handelsges. mbH)

Hr. J. Derhaschnig, DI M. Fürnsinn (Hydrogreen Landschaftsbau GmbH)

Graz, Februar 2010

Ein Projektbericht im Rahmen der Programmlinie



Impulsprogramm Nachhaltig Wirtschaften

Im Auftrag des Bundesministeriums für Verkehr, Innovation und Technologie

Vorwort

Der vorliegende Bericht dokumentiert die Ergebnisse eines Projekts aus der Programmlinie FABRIK DER ZUKUNFT. Sie wurde im Jahr 2000 vom Bundesministerium für Verkehr, Innovation und Technologie im Rahmen des Impulsprogramms Nachhaltig Wirtschaften als mehrjährige Forschungs- und Technologieinitiative gestartet. Mit der Programmlinie FABRIK DER ZUKUNFT sollen durch Forschung und Technologieentwicklung innovative Technologiesprünge mit hohem Marktpotential initiiert und realisiert werden.

Dank des überdurchschnittlichen Engagements und der großen Kooperationsbereitschaft der beteiligten Forschungseinrichtungen und Betriebe konnten bereits richtungsweisende und auch international anerkannte Ergebnisse erzielt werden. Die Qualität der erarbeiteten Ergebnisse liegt über den hohen Erwartungen und ist eine gute Grundlage für erfolgreiche Umsetzungsstrategien. Anfragen bezüglich internationaler Kooperationen bestätigen die in FABRIK DER ZUKUNFT verfolgte Strategie.

Ein wichtiges Anliegen des Programms ist es, die Projektergebnisse – seien es Grundlagenarbeiten, Konzepte oder Technologieentwicklungen – erfolgreich umzusetzen und zu verbreiten. Dies soll nach Möglichkeit durch konkrete Demonstrationsprojekte unterstützt werden. Deshalb ist es auch ein spezielles Anliegen die aktuellen Ergebnisse der interessierten Fachöffentlichkeit zugänglich zu machen, was durch die Homepage www.FABRIKderZukunft.at und die Schriftenreihe gewährleistet wird.

Dipl. Ing. Michael Paula
Leiter der Abt. Energie- und Umwelttechnologien
Bundesministerium für Verkehr, Innovation und Technologie

INHALTSVERZEICHNIS

1	ANNEX A: ANHANG CHROMATOGRAPHIE	3
1.1	Ergebnistabelle Chromatographie XAD 1600; pH = 2,0; Aminosäuren	4
1.2	Ergebnistabelle Chromatographie XAD 1600; pH = 7,0; Aminosäuren	7
1.3	Tabelle Chromatographie UBK 530, K ⁺ -konditioniert; pH = 4,2; Aminosäuren	10
1.4	Tabelle Chromatographie UBK 530, K ⁺ -konditioniert; pH = 10,5; Aminosäuren	13
1.5	Tabelle Chromatographie MDS 4368 SO ₄ ²⁻ -konditioniert; pH = 4,0; Aminosäuren ..	15
1.6	Tabelle Chromatographie YMC-ODS-A; pH = 7,0; Aminosäuren	17
1.7	Tabelle Chromatographie MDS 1368; Ca ²⁺ -konditioniert; pH = 7,0; Aminosäuren..	19
1.8	Tabelle Chromatographie MDS 1368-Lewatit; Ca ²⁺ -konditioniert; pH = 3,5; Aminosäuren; unterschiedliche Flussraten	21
1.9	Tabelle Chromatographie MDS 1368-Lewatit; Ca ²⁺ -konditioniert; pH = 3,8; Aminosäuren.....	23
1.10	Sezifikationen zu den verwendet Harzmaterialien der Chromatographieversuche.	25
2	ANNEX B: CHEMISCHE UND PHYSIKALISCHE EIGENSCHAFTEN VON AMINOSÄUREN	26
2.1	Allgemeines	26
2.2	Strukturelle Charakterisierung der Aminosäuren	26
2.3	Säure-Base-Eigenschaften	29
2.4	Komplexbildungseigenschaften von Aminosäuren	35
2.4.1.1	<i>HSAB-Theorie</i>	35
2.4.1.2	<i>Weiche Metallionen und Liganden</i>	36
2.4.1.3	<i>Harte Metallionen und Liganden</i>	37
2.5	Löslichkeitsverhalten.....	38
3	VERZEICHNISSE	41
3.1	Abbildungsverzeichnis	41
3.2	Tabellenverzeichnis	41



1 Annex A: Anhang Chromatographie

Dieser Anhang enthält

1. Ergebnistabellen: Auswertungen der einzelnen chromatographischen Versuche
2. Spezifikationen / Links zu den verwendeten Harzmaterialien

1.1 Ergebnistabelle Chromatographie XAD 1600; pH = 2,0; Aminosäuren

Exceltabelle: Massenbilanz und Berechnung der Recovery

Flow: 10 ml * min ⁻¹			initial conc. Feed		5,41	2,49	3,97	3,17	0,07		8,56		0,75	6,83	6,51	1,36	5,06	3,71	3,70	6,51	5,40	3,09	0,76
			20 ml feed		0,11	0,05	0,08	0,06	0,00	0,00	0,17	0,00	0,01	0,14	0,13	0,03	0,10	0,07	0,07	0,13	0,11	0,06	0,02
Sample	Sample Name	Time, min	Volume, ml	Bed Volume	Asp	Glu	Asn	Ser	Gln	His	Gly	Thr	Arg	Ala	Gaba	Tyr	Val	Met	Ile	Leu	Lys	Phe	Trp
10	F 1	20	200	0,45															0,00	0,00			
11	F 2	22	220	0,50															0,00	0,00			
12	F 3	24	240	0,55									0,00	0,00					0,00	0,00			
13	F 4	26	260	0,59					0,00		0,00		0,00	0,00			0,00		0,00	0,00			
14	F 5	28	280	0,64	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00			0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00			
33	F 6	30	300	0,68	0,26	0,08	0,20	0,16	0,05	0,06	0,09	0,08	0,04	0,20	0,06				0,01	0,02	0,11		
34	F 7	32	320	0,73	0,30	0,08	0,24	0,14	0,05	0,08	0,15	0,09	0,04	0,22	0,06				0,02	0,04	0,13		
39	F 8	34	340	0,77	0,67	0,16	0,66	0,62		0,12	0,88		0,06	0,45	0,19		0,08			0,07	0,40		
40	F 9	36	360	0,82	1,10	0,32	1,02	0,91		0,17	0,95	0,26	0,13	0,86	0,38		0,13			0,08	0,64		
41	F 10	38	380	0,86	1,33	0,57	1,13	0,99		0,24	0,77	0,59	0,22	1,39	0,98		0,18			0,06	0,70		
42	F 11	40	400	0,91	1,15	0,63	0,90	0,60		0,19	0,45	0,66	0,26	1,67	2,04		0,14			0,03	0,37		
43	F 12	42	420	0,95	0,72	0,55	0,51	0,29		0,11	0,16	0,41	0,15	1,09	1,84						0,08		
44	F 13	44	440	1,00	0,43	0,23	0,27	0,12		0,08	0,04	0,18	0,06	0,46	0,70		0,09		0,01		0,01		
45	F 14	46	460	1,05	0,01	0,00	0,01	0,01		0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,02		0,00				0,00		
46	F 15	48	480	1,09	0,02	0,01	0,01	0,01		0,00	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01		0,00			0,00	0,00		
80	F 16	50	500	1,14	0,01		0,00	0,00				0,02	0,04		0,01	0,02	3,71	0,88	0,04	0,07			
81	F 17	52	520	1,18	0,02		0,01	0,00				0,01	0,04		0,01	0,02	0,93	0,19	0,06	0,11	0,05		
82	F 18	54	540	1,23	0,01		0,00	0,00				0,01	0,03		0,01	0,04	0,44	0,10	0,08	0,13	0,06		
83	F 19	56	560	1,27	0,01	0,00	0,00	0,00			0,02			0,01	0,01	0,09	0,26	0,15	0,11	0,15			
84	F 20	58	580	1,32	0,01		0,00	0,00				0,01	0,01		0,00	0,07	0,06	0,13	0,11	0,18	0,17		
85	F 21	60	600	1,36	0,01		0,00	0,00		0,04			0,02		0,01	0,16	0,03	0,20	0,20	0,22	0,09		
86	F 22	62	620	1,41	0,01		0,01	0,00		0,03			0,03		0,01	0,19	0,06		0,31	0,34	0,12		
87	F 23	64	640	1,45	0,04	0,01	0,02	0,02		0,14			0,10		0,02	0,21	0,06	0,12	0,43	0,48	0,17		

88	F 24	66	660	1,50	0,01		0,01	0,01			0,01			0,01	0,01	0,19	0,05	0,06	0,58	0,60				
89	F 25	68	680	1,55	0,01		0,01	0,01			0,02			0,01	0,01	0,15	0,07	0,04	0,60	0,79				
90	F 26	70	700	1,59	0,01						0,01			0,01	0,01	0,20	0,07	0,03	0,96	1,65				
91	F 27	72	720	1,64	0,01						0,01			0,01	0,00	0,07	0,20	0,02	0,37	0,81				
92	F 28	74	740	1,68	0,01						0,01			0,01		0,05	0,07		0,29	0,79				
66	F 29	76	760	1,73	0,01		0,00	0,00		0,01	0,00		0,02		0,01	0,04	0,02	0,01	0,18	0,60	0,09			
67	F 30	78	780	1,77	0,01	0,01	0,01	0,01		0,02	0,01		0,03		0,01	0,04	0,02	0,01	0,18	0,68	0,11			
68	F 31	80	800	1,82	0,01		0,01	0,00				0,01	0,02		0,01	0,07	0,02	0,01	0,31	0,84	0,13			
69	F 32	82	820	1,86	0,01	0,00	0,01	0,01		0,01	0,00		0,03		0,01	0,03	0,02	0,01	0,13	0,48	0,09			
70	F 33	84	840	1,91	0,01		0,00	0,00				0,01	0,02		0,01	0,04	0,04	0,01	0,15	0,45	0,07			
71	F 34	86	860	1,95	0,01		0,00	0,01		0,02			0,02		0,01	0,03	0,03	0,01	0,14	0,41	0,08			
72	F 35	88	880	2,00	0,01	0,00	0,00	0,00		0,02			0,02		0,01	0,03	0,04	0,01	0,10	0,31	0,07			
73	F 36	90	900	2,05	0,01	0,00	0,00	0,00				0,01	0,03		0,01	0,02	0,03	0,01	0,08	0,26	0,05			
74	F 37	92	920	2,09	0,15	0,06	0,05	0,06				0,07	0,31		0,05	0,01	0,02		0,03	0,09				
75	F 38	94	940	2,14	0,01	0,00	0,00	0,00		0,01	0,01		0,02		0,01	0,02	0,02	0,02	0,07	0,12	0,12			
76	F 39	96	960	2,18	0,01		0,00	0,00			0,01		0,02		0,00	0,02	0,03	0,01	0,06	0,14	0,11			
77	F 40	101	1010	2,30	0,00		0,00	0,00				0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00			
78	F 41	111	1110	2,52	0,00		0,00	0,00				0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00			
79	F 42				0,00		0,00	0,00				0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00			
					0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
					0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
					0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
					0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
					0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
					0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
					0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
					0,01	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01		
					0,02	0,01	0,02	0,02	0,00	0,00	0,02	0,01	0,00	0,02	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01		
					0,03	0,01	0,02	0,02	0,00	0,00	0,02	0,01	0,00	0,03	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01		
					0,02	0,01	0,02	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,03	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01		
					0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,02	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
					0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
					0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
					0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
					0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00		
					0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		

1.2 Ergebnistabelle Chromatographie XAD 1600; pH = 7,0; Aminosäuren

Exceltabelle (Massenbilanz und Berechnung der Recovery)

Cond.	Time	Sample Name																					
[mS/cm]	[min]		g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	0	0							
			Asp	Glu	Asn	Ser	Gln	His	Gly	Thr	Arg	Ala	Gab a	Tyr	Val	Met	Trp	Phe	Ile	Leu	Lys	Glu- cose RI_1	Fruct ose RI_1
		unser Std 2,5*10-3 µMol/mL																					
		unser Std 5*10- 3 µMol/mL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,30	0,55
		unser Std 12,5*10-3 µMol/mL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,28	1,07
		unser Std 25*10-3 µMol/mL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,66	1,95
		AS model solution 1:10000	8,58	n.a.	3,31	8,72	3,79	0,00	6,71	10,6 5	n.a.	15,1 9	n.a.	1,55	20,2 5	4,47	0,66	n.a.	8,44	16,4 7	14,5 8	38,5 9	33,8 9
0	10	F1																					
0	11,5	F2																					
0	13	F3																					
0	14,5	F4																					
0	16	F5																					
0	17,5	F6																					
0	19	F7																					
0	20,5	F8																					
0,1	22	F9																					
0,1	23,5	F10																					
0,1	25	F11																					
0,1	26,5	F12																					
0,3	28	F13	0,06																				
0,3	29,5	F14	0,45		0,02	0,08	0,02					0,13			0,12					0,07			
0,7	31	F15	0,92		0,10	0,29	0,07					0,69			0,18					0,14			
2,2	32,5	F16	1,40		0,25	0,73	0,20					1,86			0,19					0,50		0,25	0,29

4,3	34	F17	2,07		0,55	1,55	0,49					4,47			0,20				0,71		0,75	1,21	
6,2	35,5	F18	2,44		0,82	2,23	0,79					6,94			0,21				1,04		1,37	2,69	
7	37	F19	2,25		0,98	2,58	1,03					8,57			0,46				1,16		1,93	4,45	
6,3	38,5	F20	1,74		1,00	2,54	1,15					9,03			0,25				0,98		2,30	6,20	
3,3	40	F21	0,92		0,77	2,00	0,98					7,13		0,16	0,54				0,61		2,29	7,27	
0,9	41,5	F22	0,32		0,44	1,17	0,64					4,35		0,16	0,70				0,27		1,81	6,84	
0,4	43	F23	0,10		0,11	0,40	0,21					1,49		0,10	0,89				0,12		1,16	5,15	
0,3	44,5	F24				0,14	0,12		0,53			0,99		0,08	7,85				0,30	0,37	0,67	3,48	
0,2	46	F25					0,02		0,26			0,33		0,10	6,29				0,16	0,60	0,41	0,32	1,94
0,2	47,5	F26							0,11			0,12		0,10	4,45				0,20	0,75	0,32	0,13	0,96
0,1	49	F27							0,09			0,06		0,09	3,14				0,10	0,25	0,16	0,05	0,40
0,1	50,5	F28							0,07			0,21		0,21	1,36	0,51			0,49	1,83	0,24		0,14
0,1	52	F29							0,04			0,08		0,16	0,50	0,65			0,42	0,97	0,18		
0,1	53,5	F30							0,03			0,09		0,17	0,18	0,48			0,47	0,91	0,16		
0,1	55	F31												0,19	0,08	0,52			0,62	0,28	0,18		
0,2	56,5	F32												0,18		0,45			0,74	0,40	0,18		
0,2	58	F33												0,21		0,41			0,99	0,65	0,21		
0,2	59,5	F34												0,19		0,33			1,09	0,89	0,24		
0,2	61	F35												0,17		0,20			1,11	1,18	0,22		
0,2	62,5	F36												0,17		0,17			1,22	1,59	0,25		
0,2	64	F37												0,14		0,15			1,23	2,02	0,28		
0,1	65,5	F38												0,12		0,11			0,97	1,94	0,29		
0,1	67	F39												0,10		0,08			0,88	2,22	0,30		
0,1	68,5	F40												0,05		0,03			0,69	2,15	0,28		
0,1	70	F41												0,03					0,30	1,34	0,16		
0,1	71,5	F42																	0,14	0,75	0,10		
0,1	73	F43																	0,13	0,92	0,11		
0,1	74,5	F44																	0,11	0,94	0,13		
0,1	76	F45																	0,08	0,83	0,11		
0,1	77,5	F46																	0,07	0,88	0,12		
0,1	79	F47																	0,03	0,50	0,06		
0	80,5	F48																	0,02	0,37	0,06		
0	82	F49																	0,01	0,25	0,05		
0	83,5	F50																	0,01	0,16	0,03		

		recovered amount [g]	0,14	0,00	0,06	0,15	0,06	0,00	0,01	0,00	0,00	0,52	0,00		0,31	0,05	0,00	0,00	0,14	0,35	0,06	0,15	0,46
		original amount [g]	0,17	-	0,07	0,17	0,08	0,00	0,13	0,21	-	0,30	-	0,03	0,40	0,09	0,01	-	0,17	0,33	0,29	0,77	0,68
		% recoverd	82,7 0	-	85,2 1	88,0 9	84,7 1	-	9,45	-	-	171, 59	-		76,3 2	51,4 3	0,00	-	81,4 7	106, 97	20,1 0	18,9 1	67,7 9
		arith. Mittel c(Fraktion)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,74	-	-	1,53	-	-	-	0,47	0,85	-	-	-
		Dilution-factor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,55	-	-	13,2 1	-	-	-	17,8 7	19,3 7	-	-	-
		Dilution-factor gruppiert																	18,8 3	18,8 3			

1.3 Tabelle Chromatographie UBK 530, K+-konditioniert; pH = 4,2; Aminosäuren

Excelltabelle (Massenbilanz und Berechnung der Recovery)

Cond.	Time	Sample Name																					
[mS/cm]			g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l
			Asp	Glu	Asn	Ser	Gln	His	Gly	Thr	Arg	Ala	Gab a	Tyr	Val	Met	Trp	Phe	Ile	Leu	Lys	Glc	Frc
		unser Std 2.5*10-3 µMol/mL	0,00	0,00	0,00	n.a.	n.a.	0,00	n.a.	n.a.	0,00	n.a.	0,00	0,00	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0,00	n.a.		
		unser Std 5*10- 3 µMol/mL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	n.a.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
		unser Std 12,5*10-3 µMol/mL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
		unser Std 25*10-3 µMol/mL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
		AS model solution 1:10000	10,0 7	n.a.	3,80	11,9 2	4,40	n.a.	13,0 0	10,3 1	n.a.	18,2 1	n.a.	3,00	15,7 3	8,21	4,10	n.a.	12,0 4	19,7 5	19,8 2		
2,9	35	F1	0,00																				
5,9	37	F2	0,10																				
8,8	39	F3	0,26																				
11,6	41	F4	1,15																				
4,8	43	F5	6,14																				
0,4	45	F6	3,94																				
0,1	47	F7	0,22																				
0,1	49	F8	0,01																				
0,1	51	F9	0,01																				
0,1	53	F10	0,01																				
0,1	55	F11	0,01																				
0,1	57	F12	0,01																				
0,1	59	F13	0,01																				
0,1	61	F14	0,01																				
0,2	63	F15	0,00																				
0,2	65	F16					0,01															2,41	1,12

0,2	67	F17					0,06		0,05			0,01			0,01						3,83	1,23	
0,2	69	F18					0,49		0,49			0,18			0,11							4,14	1,88
0,2	71	F19				0,14	1,20		1,60			1,22			0,54							4,30	3,52
0,2	73	F20					1,21	6,86				4,20			2,86		0,91		0,36	1,01	1,10	3,28	5,88
0,2	75	F21			0,61	1,38	0,75		1,88			5,19			3,68		0,80					1,82	7,70
0,2	77	F22			0,55	1,56	0,34		1,28			3,81			3,34				0,31	0,41		0,80	8,20
0,2	79	F23			0,80	2,72	0,22	5,35				3,93			3,99				0,62	0,41		0,29	5,76
0,2	81	F24			0,45	1,64	0,05	3,67				1,14			1,54				0,40	0,29		0,05	1,98
0,1	83	F25			0,47	1,75	0,03	5,09				0,53			1,19				0,69	0,57		0,06	1,19
0,1	85	F26			0,30	1,14			1,66			0,16			0,49	0,16			0,83	0,78		0,02	0,38
0,1	87	F27			0,12	0,48			1,03			0,06			0,24	0,32			1,01	1,18		0,01	0,08
0,1	89	F28			0,05	0,21			0,70							0,77			1,08	1,46		0,01	0,06
0,1	91	F29				0,13			0,34							1,16			1,33	1,86		0,01	0,03
0	93	F30							0,13							0,75			0,93	1,74		0,01	0,02
0	95	F31							0,08							0,78			0,87	1,88		0,01	0,02
0	97	F32														0,53			0,71	1,54		0,00	0,01
0	99	F33														0,47			0,44	1,06			0,01
0	101	F34														0,42			0,32	0,87			0,01
0	103	F35														0,37			0,26	0,76			0,01
0	105	F36														0,26			0,19	0,54			0,01
0	107	F37														0,30			0,18	0,52			0,00
0	109	F38														0,31			0,17	0,49			0,00
0	111	F39														0,23			0,15	0,44			0,00
0	113	F40														0,22			0,15	0,45			
0	115	F41														0,23			0,12	0,34			
0	117	F42														0,25			0,12	0,33			
0	119	F43														0,04			0,05	0,21			
0	121	F44																					
0	123	F45																					
0	125	F46																					
0	127	F47																					
0	129	F48																					
0	131	F49																					
0	133	F50																					

		recovered amount [g]	0,21	0,00	0,06	0,20	0,08	0,38	0,17	0,00	0,00	0,37	0,00	0,00	0,32	0,14	0,03	0,00	0,20	0,34	0,02	0,38	0,70
		original amount [g]	0,20		0,08	0,24	0,09	0,00	0,26	0,21		0,36		0,06	0,31	0,16	0,08		0,24	0,40	0,40	0,00	0,00
		% recoverd	105,83		78,81	83,92	88,89	0,00	63,77	0,00		100,45		0,00	102,52	82,66	37,19		84,07	86,69	4,96	0,00	0,00
		arith. Mittel c(Fraktion)	1,08		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,42	-	-	0,50	0,82	-	-	-
		Dilution-factor	9,33													19,51			24,23	24,01			

1.4 Tabelle Chromatographie UBK 530, K⁺-konditioniert; pH = 10,5; Aminosäuren

Exceltabelle (Massenbilanz und Berechnung der Recovery)

Cond. [mS/ cm]	Time	Sample Name																						
			g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l
			Asp	Glu	Asn	Ser	Gln	His	Gly	Thr	Arg	Ala	Gab a	Tyr	Val	Met	Trp	Phe	Ile	Leu	Lys	Glucose RI_1	Fructose RI_1	
		unser Std 2.5*10-3 µMol/mL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	n.a.	0,00	0,00	0,00	0,74	0,55	
		unser Std 5*10-3 µMol/mL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,07	1,00	
		unser Std 12,5*10-3 µMol/mL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	n.a.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,91	1,99	
		unser Std 25*10-3 µMol/mL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	n.a.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	n.a.	0,00	0,00	0,00			
		AS model solution 1:10000	9,57	n.a.	3,80	11,9 2	4,40	n.a.	13,0 0	10,3 1	n.a.	18,2 1	n.a.	3,00	15,7 3	8,21	4,10	n.a.	12,0 4	19,7 5	19,8 2			
0,00	23	F1																						
0,00	25	F2																						
0,00	27	F3																						
0,00	29	F4																						
0,00	31	F5																						
0,10	33	F6																						
1,70	35	F7	0,01																					
3,90	37	F8	0,93																					
4,30	39	F9	4,43																					
4,70	41	F10	3,07																					
7,40	43	F11	0,52		1,56	1,55	1,34		1,16															
13,10	45	F12	0,06		1,20	6,06	1,69		1,52			0,35		0,22	1,66	1,17						0,02		
1,10	47	F13			0,08	1,05	0,15		0,37		1,83	0,00		0,21	3,38	0,00	0,19	0,88	0,28	0,44		0,02		
0,80	49	F14			0,04	0,41	0,06		0,00		3,15	0,00		0,21	2,45	0,00	0,00	0,00	0,39	0,58		0,03		
0,70	51	F15			0,02	0,22	0,04		0,29		0,00	1,32		0,10	1,27	0,00	0,00	0,00	0,35	0,55		0,03		
0,60	53	F16			0,03	0,25	0,05		0,38		0,00	1,61		0,12	1,28	0,00	0,00	0,09	0,50	0,81		0,03		
0,60	55	F17			0,02	0,16	0,04		0,28		0,00	1,13		0,09	0,89	0,00	0,00	0,00	0,42	0,67		0,04		
0,50	57	F18			0,03	0,19	0,05		0,34		0,00	1,37		0,13	1,19	0,00	0,15	0,00	0,67	1,05		0,04		
0,50	59	F19			0,02	0,14	0,03		0,29		2,37	0,00		0,08	0,92	0,00	0,00	0,00	0,55	0,92		0,07		
0,40	61	F20			0,01	0,16	0,03		0,33			1,37			0,00	1,11	0,00	0,04	0,62	1,10		0,19		
0,40	63	F21				0,09	0,02		0,24			1,04			0,00	0,85	0,00	0,06	0,48	0,84		0,52		
0,40	65	F22				0,08			0,17			0,82			0,60	0,00	0,00	0,08	0,39	0,68		1,39	0,16	
0,30	67	F23				0,08			0,22			1,10			0,75	0,00	0,00	0,09	0,50	0,89		2,59	0,61	
0,30	69	F24				0,05			0,16			0,78			0,51	0,00	0,00	0,08	0,38	0,68		3,55	2,08	

1.5 Tabelle Chromatographie MDS 4368 SO₄²⁻-konditioniert; pH = 4,0; Aminosäuren

Exceltabelle: Massenbilanz und Berechnung der Recovery

Cond. [mS/cm]	Time	Sample Name	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l										
			Asp	Glu	Asn	Ser	Gln	His	Gly	Thr	Arg	Ala	Gab a	Tyr	Val	Met	Trp	Phe	Ile	Leu	Lys	Glucose	Fructose
		unser Std 2,5*10 ⁻³ μMol/mL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	n.a.	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,21	0,19
		unser Std 5*10 ⁻³ μMol/mL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,49	0,47
		unser Std 12,5*10 ⁻³ μMol/mL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,98
		unser Std 25*10 ⁻³ μMol/mL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	2,02
		AA model solution 1:10000	5,35	4,13	4,73	5,93	n.a.	7,96	5,51	4,95	0,89	0,51		0,98	10,5 7	2,36	3,15	8,03	4,25	9,62	8,50	19,9 3	36,7 2
0,2	40	F1																					
0,2	43	F2																					
0,2	46	F3																					
0,2	49	F4																					
0,2	52	F5																					
0,2	55	F6																					
0,3	58	F7																				0,13	
0,7	61	F8																				0,33	
1,8	64	F9			0,05	0,02					0,04				0,11						0,05	0,86	
4,1	67	F10			0,26	0,04		0,17	0,23		0,11	0,00			0,46				0,12	0,25	1,58	0,56	1,45
6,0	70	F11			0,68	0,17		0,69	0,56		0,20	0,00			1,15				0,38	0,81	1,43	1,61	3,72
3,4	73	F12			0,99	0,47		1,29	0,96		0,17	0,00			1,66				0,78	1,65	0,53	2,77	5,74
0,5	76	F13			0,77	0,78		1,58	0,95		0,02	0,00			1,10	0,30		0,07	0,87	1,80		2,79	4,73
0,3	79	F14			0,36	0,81		1,10	0,56						0,46	0,31		0,22	0,58	1,21		1,68	2,58
0,2	82	F15				0,44		0,50	0,22						0,14	0,17		0,45	0,21	0,43		0,69	0,79
0,2	85	F16				0,23		0,21							0,05	0,07		0,72				0,20	0,21
0,2	88	F17				0,06												0,79					
0,2	91	F18				0,02								0,02				0,59					
0,2	94	F19				0,01								0,03				0,31					
0,2	97	F20				0,01								0,04				0,15					
0,2	100	F21		0,01		0,01								0,05				0,05					
0,2	103	F22		0,01										0,05									
0,2	106	F23		0,02										0,03									
0,2	109	F24		0,03										0,02									
0,2	112	F25		0,05										0,01									
0,2	115	F26		0,08																			

0,2	118	F27		0,13																			
0,2	121	F28		0,17																			
0,2	124	F29		0,21																			
0,2	127	F30		0,23																			
0,2	130	F31		0,24																			
0,2	133	F32		0,21																			
0,2	136	F33		0,17																			
0,2	139	F34		0,16																			
0,2	142	F35		0,12																			
0,2	145	F36		0,09																			
0,2	148	F37		0,06																			
0,2	151	F38		0,04																			
0,2	154	F39		0,03																			
0,2	157	F40		0,02													0,02						
0,2	160	F41		0,01													0,03						
0,2	163	F42		0,01													0,05						
0,2	166	F43		0,01													0,03						
0,2	169	F44															0,04						
0,2	172	F45															0,05						
0,2	175	F46															0,08						
0,2	178	F47															0,05						
0,2	181	F48															0,06						
0,2	184	F49															0,07						
0,2	187	F50															0,01						
0,2	190	F51															0,03						
0,2	193	F52	0,08														0,03						
0,2	196	F53	0,11														0,04						
0,2	199	F54	0,09																				
0,2	202	F55	0,12																				
0,2	205	F56	0,16																				
		recovered amount [g]	0,02	0,07	0,10	0,10	0,00	0,19	0,12	0,00	0,02	0,00	0,00	0,01	0,17	0,03	0,02	0,11	0,10	0,21	0,16	0,35	0,65
		original amount [g]	0,11	0,08	0,09	0,12	-	0,16	0,11	0,10	0,02	0,01	-	0,02	0,21	0,05	0,06	0,16	0,09	0,19	0,17	0,40	0,73
		% recoverd	17,5 7	86,2 1	110, 45	87,3 2	0,00	117, 28	105, 91	0,00	101, 80	3,51	-	41,8 8	81,4 0	60,8 5	31,6 3	70,0 6	115, 89	108, 35	96,1 8	86,9 4	87,9 3
		arith. Mittel c(Fraktion)	0,11	0,09	0,52	0,24	-	0,79	0,58	-	0,11	0,00	-	0,03	0,64	0,21	0,04	0,37	0,49	0,89	0,81	1,47	2,75
		Dilution-factor	47,8 2	44,8 2	9,13	25,0 1	-	10,0 3	9,52	-	8,25	191, 55	-	32,0 9	16,5 1	11,0 4	74,3 5	21,5 8	8,70	10,8 5	10,4 8	13,5 3	13,3 7

1.6 Tabelle Chromatographie YMC-ODS-A; pH = 7,0; Aminosäuren

Exceltabelle : Massenbilanz und Berechnung der Recovery

Time	Sample Name																						
[min]		g/l		g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l									
		Asp	Glu	Asn	Ser	Gln	His	Gly	Thr	Arg	Ala	Gaba	Tyr	Val	Met	Trp	Phe	Ile	Leu	Lys	Glucose	Fructose	
																					RI_1	RI_1	
	unser Std 2,5*10-3 µMol/mL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	n.a.	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,21	0,19	
	unser Std 5*10-3 µMol/mL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,49	0,47	
	unser Std 12,5*10-3 µMol/mL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,98	
	unser Std 25*10-3 µMol/mL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	2,02	
	AA model solution 1:10000	5,35	4,13	4,73	5,93		7,96	5,51	4,95	0,89	0,51		0,98	10,57	2,36	3,15	8,03	4,25	9,62	8,50	19,93	36,72	
0	F1																						
2	F2																						
4	F3	0,14	0,11	0,12	0,12			0,09	0,12	0,02										0,21	0,30	0,40	
6	F4	0,13	0,10	0,14	0,13		0,06	0,10	0,16	0,03				0,29	0,08					0,18	0,55	0,91	
8	F5	0,09	0,07	0,10	0,09		0,04	0,07	0,12	0,02				0,29				0,06	0,08	0,13	0,14	0,12	
10	F6																	0,07	0,24				
12	F7												0,01						0,02				
14	F8																						
16	F9																						
18	F10																						
20	F11																						
22	F12																						
24	F13																	0,07					
26	F14																	0,11					
28	F15																	0,04					
30	F16																	0,01					
32	F17																						
34	F18																						
36	F19																						
38	F20																						

1.7 Tabelle Chromatographie MDS 1368; Ca²⁺-konditioniert; pH = 7,0; Aminosäuren

Exceltabelle Massenbilanz und Berechnung der Recover

Cond.	Time	Sample Name																					
[mS/cm]	[min]		g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	0	0										
			Asp	Glu	Asn	Ser	Gln	His	Gly	Thr	Arg	Ala	Gab a	Tyr	Val	Met	Trp	Phe	Ile	Leu	Lys	Glucose RI_1	Fructose RI_1
		unser Std 2.5*10-3 µMol/mL	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0,22	0,22										
		unser Std 5*10-3 µMol/mL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,56	0,55
		unser Std 12,5*10-3 µMol/mL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,99
		unser Std 25*10-3 µMol/mL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,98	1,99
		AA model solution 1:10000	6,30	n.a.	2,23	6,41	2,67	0,00	5,90	7,23	0,00	6,81	n.a.	1,76	7,00	10,4 8	3,66	n.a.	6,67	13,5 4	12,5 7	13,7 6	27,5 1
0,1	25	F1																					
0,1	27	F2																					
0,1	29	F3																					
0,1	31	F4																					
0,1	33	F5																					
0,1	35	F6																					
0,1	37	F7																					
0,1	39	F8																					
0,1	41	F9																					
0,1	43	F10																					
0,5	45	F11																					
1,8	47	F12																					
3,2	49	F13																					
5	51	F14																					
6,5	53	F15	0,08																				
1,1	55	F16	1,50																				
1,1	57	F17	1,96																				
0,6	59	F18	1,33																				
0,2	61	F19	0,18																				
0,1	63	F20																				0,13	
0,1	65	F21																				0,54	
0,1	67	F22																				1,30	
0,1	69	F23																				1,99	
0,1	71	F24							0,05													2,59	

0,1	73	F25							0,18											0,23		2,45	0,46
0,2	75	F26							0,23											0,17		1,90	0,84
0,2	77	F27					0,05		0,45											0,17		1,41	1,61
0,2	79	F28					0,10		0,47											0,22		0,78	2,41
0,2	81	F29			0,02	0,18	0,04		0,52											0,20		0,45	3,27
0,3	83	F30			0,02	0,26	0,06		0,51											0,22		0,25	3,95
0,3	85	F31			0,03	0,49	0,10		0,67			0,05								0,25			3,55
0,3	87	F32			0,03	0,46	0,12		0,55			0,10											3,69
0,3	89	F33			0,03	0,38	0,10		0,38														2,42
0,3	91	F34			0,01	0,39	0,06		0,18			0,02		0,14	0,06					0,16			1,80
0,3	93	F35			0,01	0,22	0,05		0,15			0,04		0,20	0,14					0,23			1,21
0,3	95	F36			0,02	0,33	0,09		0,23			0,13		0,47	0,22					0,38			0,71
0,3	97	F37			0,02	0,27	0,07		0,18			0,16		0,33	0,29					0,39			0,04
0,3	99	F38			0,02	0,27	0,08		0,18			0,21		0,38	0,35					0,46			0,23
0,3	101	F39			0,02	0,22	0,07		0,13			0,20		0,37	0,27				0,37	0,58			0,12
0,3	103	F40			0,03	0,24	0,07		0,14			0,25		0,44					0,49	0,61			
0,3	105	F41			0,03	0,22	0,06		0,11			0,25		0,41	0,38				0,47	0,69			
0,3	107	F42			0,03	0,23	0,08		0,12			0,28		0,46	0,37				0,52	0,75			
0,3	109	F43			0,03	0,20	0,06		0,11			0,27		0,49	0,42				0,59	0,78			
0,3	111	F44			0,04	0,21	0,08		0,10			0,30		0,58	0,42				0,86	0,82			
0,3	113	F45			0,05	0,21	0,10		0,11			0,31	0,12	0,75					1,54				
0,3	115	F46			0,04	0,18	0,09		0,08			0,29		0,77					1,99				
0,3	117	F47			0,03	0,14	0,07		0,06			0,28		0,81	0,99				2,16				
0,3	119	F48			0,04	0,16	0,08		0,07			0,30		0,64	0,78				1,78				
0,3	121	F49			0,05	0,17	0,09		0,08			0,32		0,72	0,74				1,79				
0,3	123	F50			0,05	0,14	0,09		0,10			0,32		0,83	0,73				1,64				
		recovered amount [g]	0,09	0,00	0,01	0,10	0,03	0,00	0,11	0,00	0,00	0,07	0,00	0,00	0,16	0,11	0,00	0,00	0,06	0,33	0,00	0,25	0,47
		original amount [g]	0,13	-	0,04	0,13	0,05	0,00	0,12	0,14	0,00	0,14	-	0,04	0,14	0,21	0,07	-	0,13	0,27	0,25	0,28	0,55
		% recoverd	71,80	-	25,88	79,88	56,65	-	92,92	0,00	-	53,77	-	5,91	112,33	52,82	0,00	-	44,39	120,50	0,00	89,80	85,70
		arith. Mittel c(Fraktion)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,00	-	-	0,00	-	-	-	0,13	0,49	-	-	-
		Dilution-factor	6,24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	x	-	-	x	-	10,98	15,68
		Dilution-factor gruppiert													16,11		16,11		16,11				

1.8 Tabelle Chromatographie MDS 1368-Lewatit; Ca²⁺-konditioniert; pH = 3,5; Aminosäuren; unterschiedliche Flussraten

Excelltabelle (Massenbilanz und Berechnung der Recovery)

Cond.	Time	Sample Name	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l
[mS/cm]			Asp	Glu	Asn	Ser	Gln	His	Gly	Thr	Arg	Ala	Gab a	Tyr	Val	Met	Trp	Phe	Ile	Leu	Lys	Glucose	Fructose
		unser Std 2.5*10-3 µMol/mL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,23	0,23
		unser Std 5*10-3 µMol/mL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,51
		unser Std 12,5*10-3 µMol/mL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,01	1,01
		unser Std 25*10-3 µMol/mL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	1,99	1,99
		AA model solution 1:10000	16,5 4	15,4 4	6,31	19,5 5		14,7 5	15,6 0	20,5 6	2,52	2,10		2,76	26,4 1	8,28	1,51	17,8 9	15,2 6	31,0 0	18,9 2	19,0 3	34,7 7
0,3	48	F1; Flussrate 6 ml * min ⁻¹																					
0,3	51	F2																					
0,3	54	F3																					
0,3	57	F4																					
0,3	60	F5																					
0,7	63	F6																					
1,6	66	F7																					
3,5	69	F8																					
6,6	72	F9																					
8,9	75	F10																					
1,8	78	F11																				0,16	
0,6	81	F12																				0,65	
0,4	84	F13																				1,65	
0,4	87	F14																				2,00	
0,3	90	F15																				3,91	
0,3	93	F16																				3,43	0,24
0,3	96	F17																				2,45	0,54
0,3	99	F18																				1,48	1,15
0,3	102	F19																				0,92	2,23
0,3	105	F20																				0,45	3,54
0,3	108	F21																				0,26	4,52
0,3	111	F22																				0,12	4,69
0,3	114	F23																				0,07	4,48
0,3	117	F24																				0,04	3,67

1.9 Tabelle Chromatographie MDS 1368-Lewatit; Ca²⁺-konditioniert; pH = 3,8; Aminosäuren

Exceltabelle Massenbilanz und Berechnung der Recovery

Cond.	Time	Sample Name																					
[mS/cm]	[min]		g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l										
			Asp	Glu	Asn	Ser	Gln	His	Gly	Thr	Arg	Ala	Gab a	Tyr	Val	Met	Trp	Phe	Ile	Leu	Lys	Gluc ose	Fruct ose
		unser Std 2,5*10 ⁻³ µMol/mL	n.a.		n.a.	0,23	0,19																
		unser Std 5*10 ⁻³ µMol/mL	0,00	n.a.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,53	0,50
		unser Std 12,5*10 ⁻³ µMol/mL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,01	0,99
		unser Std 25*10 ⁻³ µMol/mL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	1,98	2,01
		AA model solution 1:10000	4,80	3,21	4,24	4,73	n.a.	1,57	4,05	5,11	0,28	0,28		0,62	6,71	2,07	0,91	4,89	4,27	9,36	4,37	14,4 5	26,2 0
0,10	60,00	F1; Flussrate 5 ml * min ⁻¹																					
0,10	65,00	F2																					
0,30	70,00	F3																					
0,90	75,00	F4																					
5,00	80,00	F5																					
8,30	85,00	F6																					
2,70	90,00	F7																				0,25	
0,20	95,00	F8																				1,13	
0,10	100,00	F9																				2,95	
0,10	105,00	F10																				4,07	
0,10	110,00	F11																				3,08	0,13
0,10	115,00	F12																				1,24	1,28
0,10	120,00	F13																				0,34	2,92
0,10	125,00	F14																				0,12	4,38
0,10	130,00	F15																					5,03
0,10	135,00	F16	0,01																				4,10
0,10	140,00	F17	0,02																				2,51
0,10	145,00	F18	0,03																				1,27
0,10	150,00	F19	0,07																				0,52
0,20	155,00	F20	0,20																				0,20
0,30	160,00	F21	0,40																				
0,40	165,00	F22	1,13	0,01																			
0,40	170,00	F23	0,80	0,05																			
0,40	175,00	F24	0,67	0,08																			
0,20	180,00	F25	0,29	0,16																			
0,20	185,00	F26	0,06	0,26																			
0,20	190,00	F27	0,01	0,38																			

0,20	195,00	F28		0,45																				
0,20	200,00	F29		0,27																				
0,20	205,00	F30		0,28																				
0,20	210,00	F31		0,22																				
0,10	215,00	F32		0,08																				
0,10	220,00	F33		0,07								0,02												
0,10	225,00	F34		0,08		0,05						0,28												
0,10	230,00	F35		0,02		0,18						0,71												
0,10	235,00	F36				0,38						0,99												
0,10	240,00	F37				0,55						0,88												
0,10	245,00	F38				0,65						0,68												
0,10	250,00	F39				0,60						0,43												
0,10	255,00	F40				0,53			0,02			0,25					0,04							
0,10	260,00	F41				0,41			0,08			0,14					0,18							
0,10	265,00	F42			0,02	0,20			0,22			0,06					0,45							
0,10	270,00	F43			0,04	0,06			0,36								0,66							
0,10	275,00	F44			0,07	0,03			0,43								0,74			0,01		0,01		
0,10	280,00	F45			0,09	0,01			0,38								0,58			0,01		0,01		
0,10	285,00	F46			0,11				0,33								0,46			0,01		0,01		
0,10	290,00	F47			0,14				0,28								0,37			0,02		0,02		
0,10	295,00	F48			0,17				0,25								0,31			0,02		0,02		
0,10	300,00	F49			0,24				0,25								0,31			0,02		0,02		
0,10	305,00	F50			0,27				0,20								0,26			0,02		0,02		
0,10	310,00	F51			0,31				0,16								0,23			0,02		0,03		
0,10	315,00	F52			0,17				0,07								0,10			0,01		0,01		
0,10	320,00	F53			0,16				0,05								0,08			0,01		0,01		
0,10	325,00	F54			0,35				0,07								0,16			0,01		0,03		
0,10	330,00	F55			0,19				0,03								0,08			0,01		0,02		
0,10	335,00	F56			0,16				0,02								0,07			0,01		0,01		
0,10	340,00	F57			0,14				0,02								0,06			0,01		0,02		
0,10	345,00	F58			0,12				0,01								0,06			0,01		0,02		
0,10	350,00	F59			0,07												0,05			0,02		0,03		
		recovered amount [g]	0,10	0,07	0,08	0,10	0,00	0,00	0,09	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,37	0,63	
		original amount [g]	0,10	0,06	0,08	0,09	0,00	0,03	0,08	0,10	0,01	0,01	0,00	0,01	0,13	0,04	0,02	0,10	0,09	0,19	0,09	0,29	0,52	
		% recoverd	107,96	105,27	92,39	108,11	-	-	111,44	121,70	-	-	-	-	109,56	-	-	-	6,91	4,32	-	127,77	119,33	
		arith. Mittel c(Fraktion)	0,31	0,17	0,16	0,30	-	-	0,17	0,44	-	-	-	-	0,26	-	-	-	0,01	0,01	-	1,65	2,23	
		Dilution-factor	15,56	18,62	27,28	15,54	-	-	23,87	11,50	-	-	-	-	25,56	-	-	-	324,35	648,25	-	8,77	11,73	

1.10 Spezifikationen zu den verwendeten Harzmaterialien der Chromatographieversuche

Harz XAD 1600

http://www.rohmhaas.com/ionexchange/pharmaceuticals/Bioprocessing_doc/english/AmberliteXAD_brochure.PDF [30.04.2010]

Harz UBK 530 K+ konditioniert

http://www.diaion.com/Diaion_Tables/Diaion_CationTable_R_E.htm [30.04.2010]

Harz MDS 4368 Lewatit SO42

<http://lanxess.at/de/> [30.04.2010]

Harz ODS-A

<http://www.ymc-europe.com/ymceurope/files/technicaldatasheets/ODS-A.pdf> [30.04.2010]

MDS 1368 Lewatit: Ca²⁺-konditioniert

<http://lanxess.at/de/> [30.04.2010]

2 ANNEX B: Chemische und physikalische Eigenschaften von Aminosäuren

2.1 Allgemeines

Naturgemäß sind die Eigenschaften von Aminosäuren von besonderer Bedeutung bezüglich ihres Trennverhaltens – aus diesem Grund seien nachfolgend die wichtigsten chemisch-physikalischen Eigenschaften von Aminosäuren zusammengefasst.

Aminosäuren sind die Bausteine der Proteine. Eine α -Aminosäure besteht aus einem zentralen C-Atom, dem α -Kohlenstoff, an den eine Aminogruppe, eine Carboxylgruppe, ein Wasserstoffatom und ein charakteristischer „Rest“ R gebunden sind. Diese R-Gruppe wird häufig als Seitenkette bezeichnet. Da an das zentrale Kohlenstoffatom vier verschiedene Gruppen binden, sind die somit tetraedrisch gebauten Aminosäuren chiral. Die beiden spiegelbildlich gebauten Formen bezeichnet man als D- und L-Isomere (*Berg, Tymoczko, Stryer*).

Nur L-Aminosäuren sind Bestandteile von Proteinen. Bei fast allen Aminosäuren nimmt das L-Isomer die S-Konfiguration (und nicht die R-Konfiguration) ein. Trotz beträchtlichen Aufwands konnte man die Frage, warum die Aminosäuren in Proteinen nur die eine der beiden möglichen absoluten Konfigurationen aufweisen, bisher nicht befriedigend klären. Es scheint plausibel, dass die Bevorzugung der L-Form gegenüber der D-Form ein Zufall war, der, einmal geschehen, sehr früh in der Evolution festgelegt wurde (*Berg, Tymoczko, Stryer*).

2.2 Strukturelle Charakterisierung der Aminosäuren

Der einfachste Vertreter der Aminosäuren, Glycin, besitzt als Seitenkette lediglich ein Wasserstoffatom. Mit zwei Wasserstoffatomen am zentralen α -Kohlenstoffatom bildet Glycin die achirale Ausnahme unter den Aminosäuren. Alanin, die zweit-einfachste Aminosäure trägt eine Methylgruppe ($-\text{CH}_3$) als Seitenkette.

Größere Kohlenwasserstoffseitenketten findet man bei Valin, Leucin und Isoleucin (siehe *Abbildung 2-1*). Methionin enthält eine weitgehend aliphatische Seitenkette, mit einer Thioether-Gruppe ($-\text{S}-$). Die Seitenkette des Isoleucins weist ein zusätzliches Chiralitätszentrum auf; nur das in *Abbildung 2-1* dargestellte Isomer ist in Proteinen zu finden. Die längeren aliphatischen Seitenketten sind hydrophob – das heißt, sie haben den Hang, sich eher untereinander zusammenzufinden, als mit Wasser in Kontakt zu treten. Durch diese Tendenz, die man auch als hydrophoben Effekt bezeichnet, wird die dreidimensionale Struktur wasserlöslicher Proteine stabilisiert. Die unterschiedlichen Größen und Formen dieser Kohlenwasserstoffseitenketten versetzen diese in die Lage, sich zu kompakten Strukturen mit nur wenigen Zwischenräumen zusammenzulagern. Auch Prolin besitzt eine aliphatische Seitenkette, unterscheidet sich jedoch von den anderen 19

Aminosäuren dadurch, dass seine Seitenkette sowohl mit dem α -Kohlenstoffatom als auch mit dem Stickstoffatom verbunden ist (Aminosäure). Prolin beeinflusst die Architektur eines Proteins in hohem Maße, da es durch seine Ringstruktur in seiner Konformation stärker eingeschränkt wird als die anderen Aminosäuren (Berg, Tymoczko, Stryer).

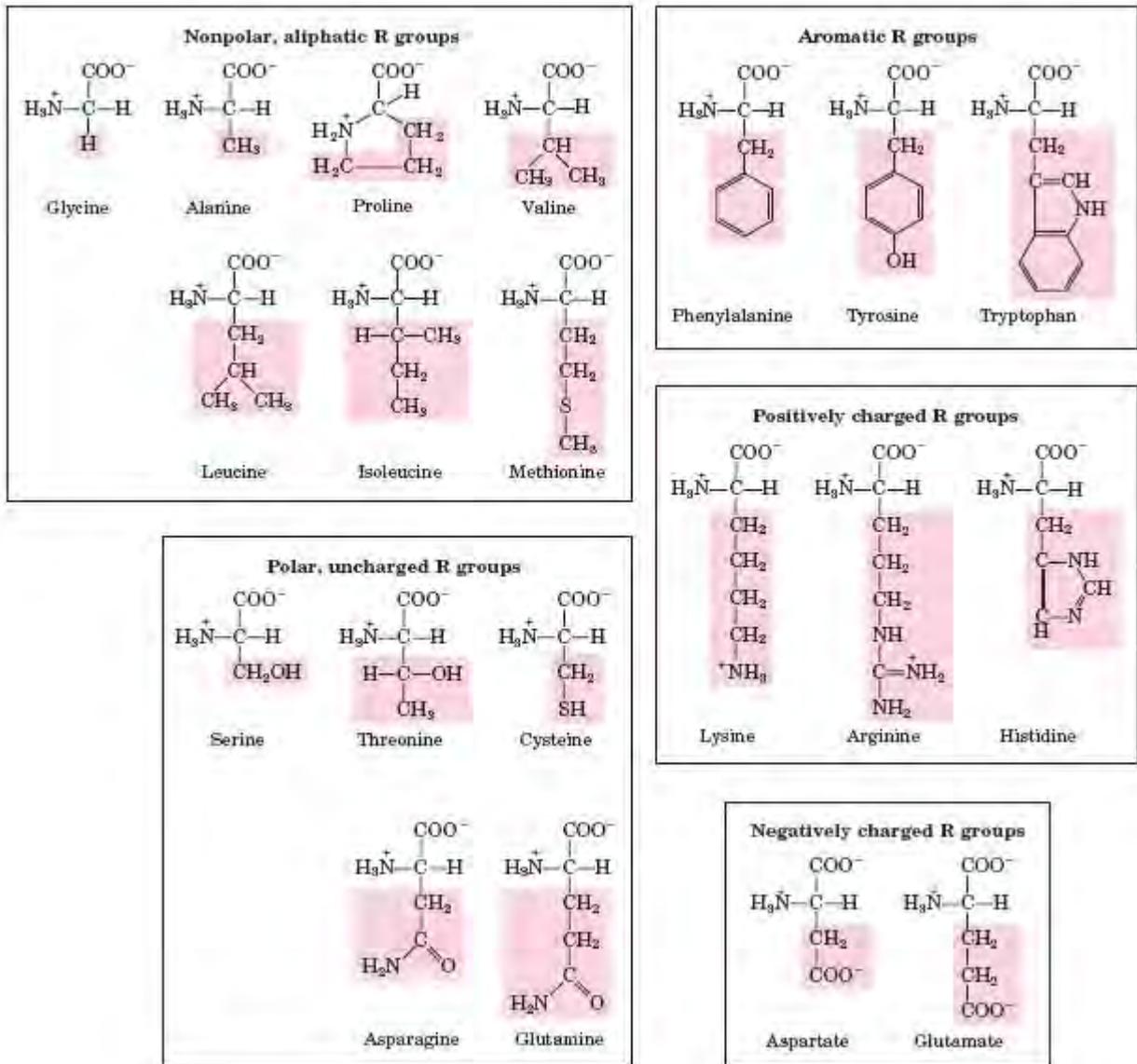


Abbildung 2-1: Die 20 proteinogenen Aminosäuren nach Gruppen angeordnet (Nelson D., Cox M.).

Drei Aminosäuren mit relativ einfachen aromatischen Seitenketten sind ebenfalls Teil des Grundrepertoires. Phenylalanin besitzt, wie der Name schon sagt, einen Phenylring anstelle des Wasserstoffes im Alanin. Der aromatische Ring von Tyrosin enthält eine Hydroxylgruppe, die im Gegensatz zu den recht inaktiven Seitenketten der bisher besprochenen Aminosäuren relativ reaktionsfreudig ist. Tryptophan hat einen über eine Methylgruppe ($-\text{CH}_2-$) verbundenen Indolring; wobei dieser aus zwei Ringen und einer NH-Gruppe aufgebaut ist. Phenylalanin ist leicht hydrophob, Tyrosin und Tryptophan wegen ihrer Hydroxyl- beziehungsweise NH-Gruppen weniger. Der aromatische Ring von Tryptophan und Tyrosin besitzt delokalisierte π -Elektronen, die sehr stark ultraviolettes Licht absorbieren.

Zwei Aminosäuren, Serin und Threonin, enthalten aliphatische Hydroxylgruppen. Serin lässt sich als hydroxylierte Version von Alanin verstehen, Threonin entspricht einem Valin, bei dem eine der Methylgruppen durch eine Hydroxylgruppe ersetzt wurde. Die Hydroxylgruppen machen Serin und Threonin sehr viel hydrophiler und reaktiver als Alanin und Valin. Threonin enthält genau wie Isoleucin ein zusätzliches Asymmetriezentrum und wiederum ist nur eines der Isomere in Proteinen zu finden. Cystein ähnelt seiner Struktur nach dem Serin, enthält jedoch eine Sulfhydryl- oder Thiolgruppe (-SH-) anstelle der Hydroxylgruppe (-OH) (siehe *Abbildung 2-1*), wobei die Sulfhydrylgruppe sehr viel reaktionsfreudiger ist. Je zwei dieser Gruppen können sich zu einer Disulfidbrücke vereinigen, die eine besonders wichtige Rolle bei der Stabilisierung von Proteinen spielen (siehe *Abbildung 2-1*).

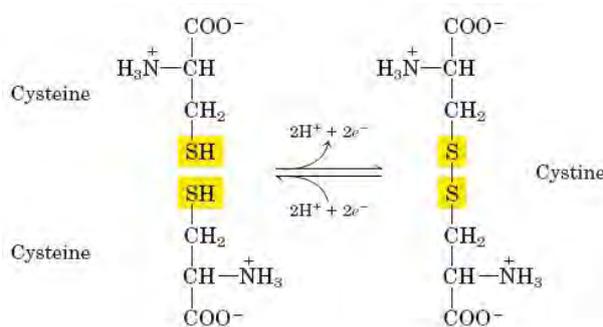


Abbildung 2-2: Oxidation von zwei Cysteinen zu Cystin (Nelson, Cox)

Lysin und Arginin sind Aminosäuren mit sehr polarem Charakter; sie besitzen vergleichsweise lange Seitenketten, deren Endgruppen bei neutralem pH-Wert positiv geladen sind. Lysin wird von einer primären Aminogruppe, Arginin von einer Guanidiniumgruppe abgeschlossen. Histidin enthält eine Imidazolgruppe, einen aromatischen Ring, der ebenfalls positiv geladen sein kann. Histidin findet sich in der Tat sehr häufig im aktiven Zentrum eines Proteins, wo der Imidazolring im Verlauf enzymatischer Reaktionen Protonen je nach Bedarf binden oder freisetzen kann.

Die Reihe der Aminosäuren enthält auch zwei Vertreter mit sauren Seitenketten, nämlich Asparaginsäure und Glutaminsäure. Diese beiden Aminosäuren nennt man häufig auch Aspartat und Glutamat, um zu betonen, dass ihre Seitenketten bei physiologischem pH-Wert gewöhnlich negativ geladen sind. Dennoch akzeptieren diese Seitenketten bei manchen Proteinen Protonen, wobei diese Fähigkeit häufig von funktioneller Bedeutung ist. Ergänzt wird das Repertoire durch ungeladene Derivate von Aspartat und Glutamat – Asparagin und Glutamin-, bei denen ist jeweils die endständige Carboxylgruppe durch ein Carboxamid ersetzt.

Sieben der 20 Aminosäuren verfügen über leicht ionisierbare Seitenketten. Diese Aminosäuren sind in der Lage, Protonen abzugeben oder aufzunehmen, um Reaktionen zu ermöglichen oder Ionenbindungen einzugehen.

Tabelle 2-1 zeigt die Gleichgewichte und typischen pKs-Werte für die Ionisierung der Seitenketten von Tyrosin, Cystein, Arginin, Lysin, Histidin, Asparagin- und Glutaminsäure in

Proteinen. Noch zwei weitere Gruppen können in einem Proteinmolekül ionisiert werden: die endständige α -Aminogruppe und die endständige α -Carboxylgruppe.

Ein Polypeptid besteht aus sich regelmäßig wiederholenden Einheiten, welche die Hauptkette oder das Rückgrat bilden, und einem variablen Anteil, den einzelnen Seitenketten. Das Polypeptidrückgrat verfügt über ein hohes Potential zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken. Jeder Rest enthält eine Carbonylgruppe, die ein ausgezeichneter Protonenakzeptor ist, sowie – mit Ausnahme von Prolin – eine NH-Gruppe, die einen guten Protonendonator darstellt. Diese Gruppen interagieren sowohl miteinander als auch mit den funktionellen Gruppen der Seitenketten und vermögen so spezielle Strukturen zu stabilisieren (*Berg, Tymoczko, Stryer, sowie Nelson, Cox*).

Der Seitenrest von Cystein wirkt zwar noch als schwache Säure, Cystein wird aber nicht zu den sauren Aminosäuren gezählt, da sie unter physiologischen Bedingungen als Base (d.h. protoniert) vorliegt. Analoges gilt für Tyrosin. ¹

2.3 Säure-Base-Eigenschaften

Aminosäuren in Lösung liegen bei neutralem pH-Wert vorwiegend als dipolare Ionen (oder Zwitterionen) vor. Im dipolaren Zustand ist die Aminogruppe protoniert ($-\text{NH}_3^+$) und die Carboxylgruppe dissoziiert ($-\text{COO}^-$); die Nettoladung ist gleich Null ($+1 -1 = 0$; isoelektrischer Punkt). Der Dissoziationsgrad einer Aminosäure ändert sich mit dem pH-Wert, siehe *Abbildung 2-3*. (*Berg, Tymoczko, Stryer*)

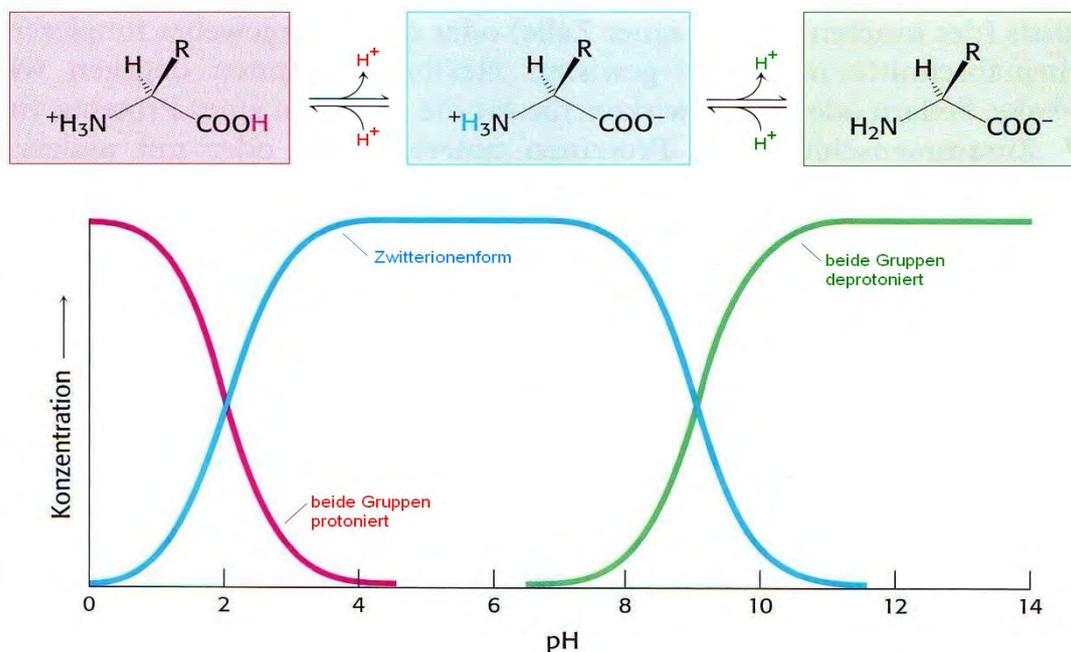


Abbildung 2-3: Zwitterionenform einer Aminosäure in Abhängigkeit vom pH-Wert

¹ <http://www.sciencedirect.com/>, Stand: 14.11.2007

In saurer Lösung ist die Aminogruppe protoniert ($-NH_3^+$) und die Carboxylgruppe nicht dissoziiert ($-COOH$). Wird der pH erhöht, ist die Carboxylgruppe die erste, die ein Proton abgibt, liegt doch ihr pKs-Wert bei 2. Dieser Dipolzustand bleibt erhalten, bis sich der pH dem Wert 9 nähert, wo auch die protonierte Aminogruppe ein Proton verliert. In *Abbildung 2-4* ergibt sich in Abhängigkeit von der vorliegenden Aminosäure ein bestimmter Zusammenhang zwischen Anteil an Zwitterionenform und pH-Wert.

Abhängig von der betrachteten Aminosäure liegt bei einem fest vorgegebenen pH-Wert ein variabler Anteil an Zwitterionenform vor. Bei Aminosäuren, die Seitenketten tragen, die nicht protoniert werden können, lassen sich folgende Trenneigenschaften ableiten (*Jungbauer 2004*):

A) positiv geladene Aminosäuren (pH-Wert liegt unterhalb des isoelektrischen Punktes; Carboxyl- und Aminogruppe ist protoniert, weshalb sich insgesamt eine positive Ladung von +1 ergibt) können mit einem Kationentauscher getrennt werden bzw.

B) negativ geladene Aminosäuren (pH-Wert liegt oberhalb des isoelektrischen Punktes; Carboxyl- und Aminogruppe sind deprotoniert, weshalb sich insgesamt eine negative Ladung von -1 ergibt) können mit einem Anionentauscher getrennt werden.

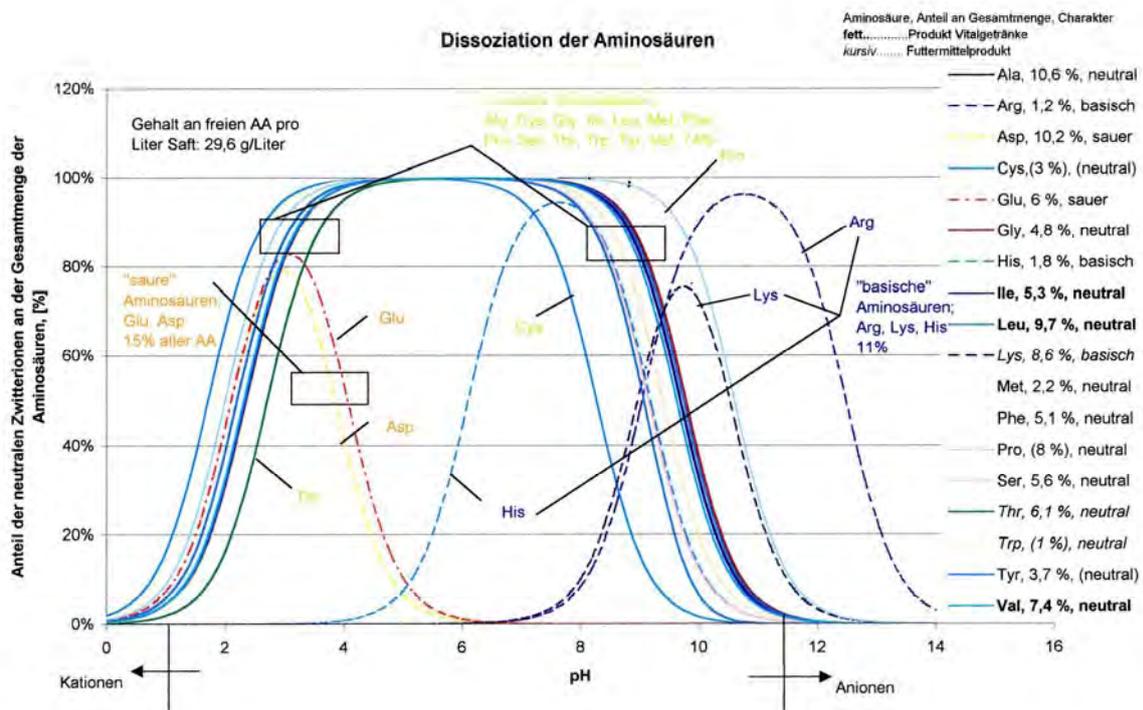


Abbildung 2-4: Zusammenhang zwischen Anteil an Zwitterionenform und pH-Wert

Bei Aminosäuren deren Seitenketten protoniert werden können ergibt sich ein komplexerer Zusammenhang (siehe *Abbildung 2-8*).

Insgesamt können die besprochenen Trenneigenschaften in *Abbildung 2-5* wie folgt zusammengefasst werden:

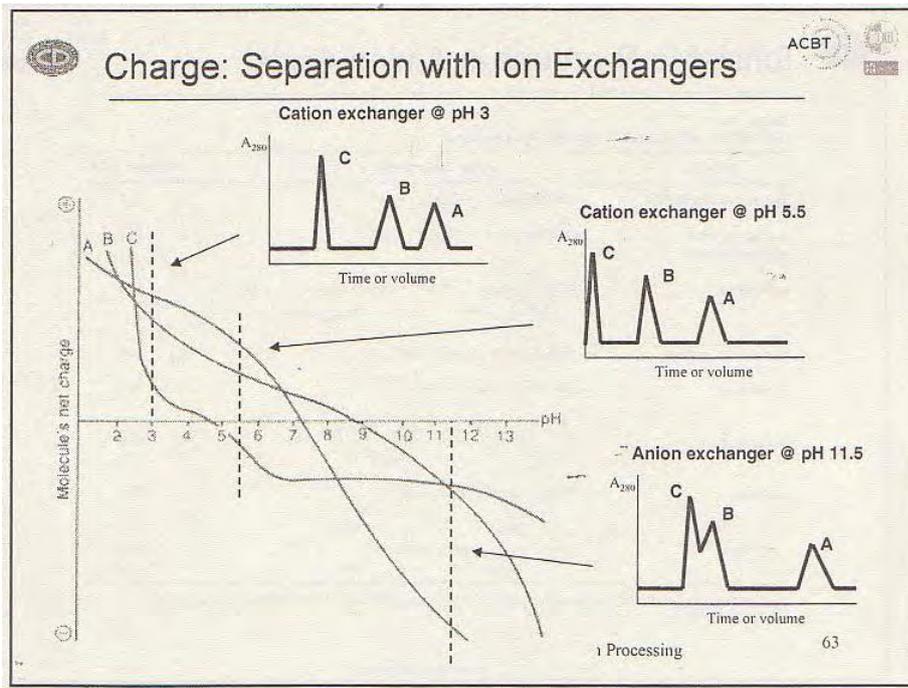


Abbildung 2-5: Trenneigenschaften von Aminosäuren in Abhängigkeit vom pH-Wert (nach Jungbauer 2004)

Transformiert man den Sachverhalt aus *Abbildung 2-3* in eine Darstellung Nettoladung vs. pH-Wert und legt alle erhaltenen Kurven für die einzelnen Aminosäuren übereinander, so erhält man folgende Darstellung:

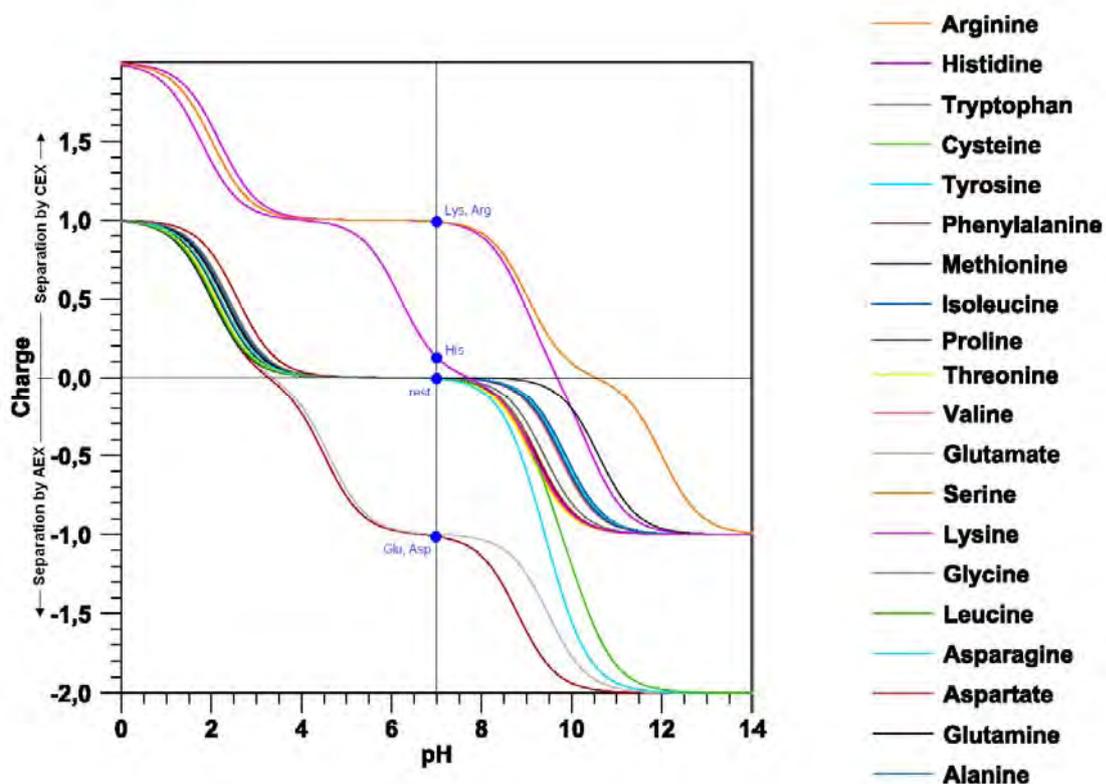


Abbildung 2-6: Trenneigenschaften von Aminosäuren in Abhängigkeit vom pH-Wert; CEX... Kationenaustausch; AEX... Anionenaustausch

Abbildung 2-6 zeigt, dass bei Verwendung von Ionenaustauschchromatographie bei pH=7,0 theoretisch eine Trennung des vorliegenden Aminosäuregemisches in die Gruppen Lys, Arg, His; Glu, Asp und den Rest der proteinogenen Aminosäuren (Trp, Cys, Tyr, Phe, Met, Ile, Pro, Tyr, Val, Ser, Gly, Leu, Asp, Ala, Gln) möglich ist. Basierend auf *Abbildung 2-6* kann nun eine einfache Interpretation des in **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** dargestellten Ionenaustausch-Trennschemas vorgenommen werden.

Aufgrund des pH-Wertes ist die Ladung einer Aminosäure und deren Adsorptionseigenschaften im Ionentauschprozess berechenbar; dies liefert – nach einer persönlichen Mitteilung von A. Jungbauer – einen Ansatzpunkt zur Vorausberechnung des Nernstschen Verteilungskoeffizienten.

Titriert man eine Aminosäure, z.B. Glycin, dann zeigt die Titrationskurve einen typischen Verlauf, wie in *Abbildung 2-7* dargestellt ist. Aus der erhaltenen Titrationskurve können nun unterschiedliche Parameter abgelesen werden, wie z.B. die pKs-Werte der einzelnen ionisierbaren Gruppen, das Pufferplateau oder auch jener pH-Wert, in dem sich eine Nettoladung der Aminosäure von Null ergibt (isoelektrischer Punkt). Außerdem ist es möglich mit Hilfe der Titrationskurve das Äquivalentgewicht der titrierten Aminosäure zu bestimmen (*Hofinger et al. 2004; Flickinger; Encyclopedia of Biomass Technology*).

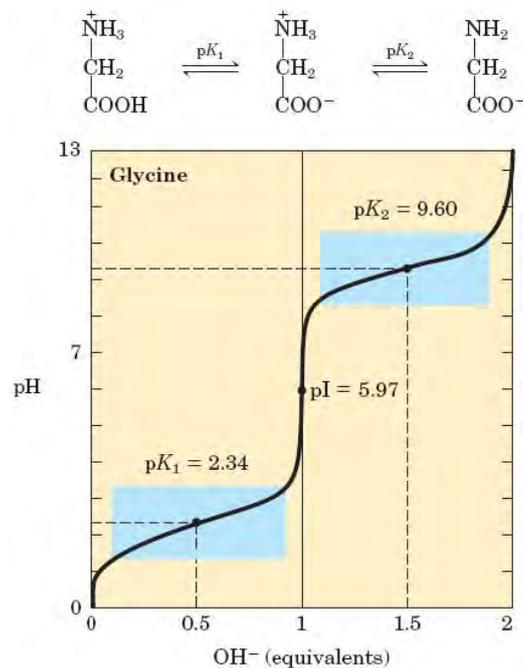


Abbildung 2-7: Titrationskurve der Aminosäure Glycin (Berg, Tymoczko, Stryer)

Aus dem typischen Verlauf der Titrationskurve ist der isoelektrische Punkt, jener Punkt in dem die Nettoladung gleich Null ist, berechenbar, indem das arithmetische Mittel der pK_s-Werte der beiden protonierbaren Gruppen berechnet wird:

$$pI = 0,5 * (pK_{s_1} + pK_{s_2}) \quad (\text{Gl. 2})$$

Mit Hilfe der Henderson-Haselbalch-Gleichung ist es möglich, eine Abschätzung des Verhältnisses der vorhandenen Ionenspezies in Abhängigkeit vom pH-Wert zu geben. Die Henderson-Haselbalch-Gleichung leitet sich wie folgt ab, wobei anzumerken ist, dass sie der pH-Berechnung einer Pufferlösung, die aus einer Säure HA und ihrer konjugierten Base A^- hergestellt wird, zugrunde liegt (*Berg, Tymoczko, Stryer*).

Ausgehend von Gleichung



wird das Massenwirkungsgesetz angeschrieben;

$$K_s = \frac{c(H^+) * c(A^-)}{c(HA)} \quad (\text{Gl. 4})$$

nach einer einfachen Äquivalenzumformung wird $c(H^+)$ explizit gesetzt;

$$c(H^+) = K_s * \frac{c(HA)}{c(A^-)} \quad (\text{Gl. 5})$$

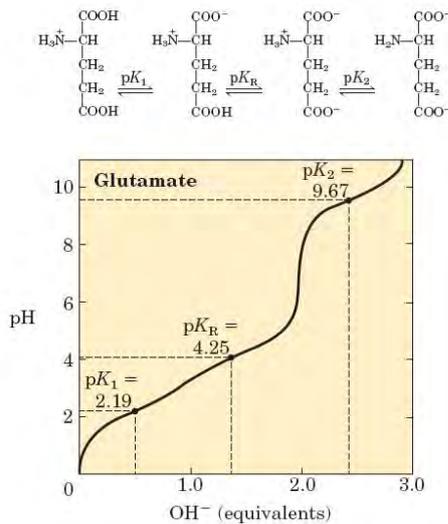
abschließend wird der Ausdruck logarithmiert, was die Henderson-Haselbalch-Gleichung ergibt (*Mortimer, Müller*):

$$pH = pK_s - \log \frac{c(HA)}{c(A^-)} \quad (\text{Gl. 6})$$

Gleichung 6 zeigt, dass bei gleichem Verhältnis der Ionenspezies der gemessene pH-Wert gleich dem entsprechenden pK_s -Wert der betrachteten protonierbaren Gruppe ist.

Die pK_s -Werte der einzelnen ionisierbaren Gruppen der 20 proteinogenen Aminosäuren sind in zusammengefasst. Abhängig von den vorgegebenen pK_s -Werten lässt sich nun folgende Voraussage treffen (*Berg, Tymoczko, Stryer*).

Bei Betrachtung der Aminosäure L-Glutaminsäure, die über eine titrierbare Seitenkette verfügt, sind die pK_s -Werte der einzelnen Gruppen mit pK_{s1} ($-\text{COOH}$) = 2,19; pK_{s2} ($-\text{NH}_3^+$) = 9,67 und pK_{sR} ($-\text{COOH}$) = 4,25 festgelegt. (Nelson, Cox). Liegt nun die Aminosäure L-Glutaminsäure bei einem pH-Wert von ca. 1,0 vor, so sind alle titrierbaren Gruppen protoniert; Nettoladung +1 aufgrund der protonierten Aminogruppe. Werden die vorhanden Protonen durch Zugabe von z.B. NaOH abgefangen und von den einzelnen protonierbaren Gruppen abgezogen, so ergibt sich aufgrund der vorgegebenen pK_s -Werte folgende Reihenfolge:



Ausgehend von pH = 1,0 werden zuerst die Protonen von der pK_{S1} (-COOH) Gruppe abgezogen; liegt diese Gruppe nun vollständig deprotoniert vor, werden die Protonen von der Gruppe mit dem nächsthöheren pK_S -Wert, d.h. der pK_R (-COOH)-Gruppe abgezogen. Wird die Titration mit NaOH fortgesetzt, so werden nun die Protonen von der pK_{S2} ($-NH_3^+$)-Gruppe abgezogen, bis dass sich eine Nettoladung von -2 ($-1 + -1 = -2$) ergibt.

Dieser geschilderte Zusammenhang wird durch *Abbildung 2-8* verdeutlicht.

Abbildung 2-8: Titrationskurve der Aminosäure Glutaminsäure; titrierbare Seitenkette (Nelson, Cox)

Tabelle 2-1: Physikalische Eigenschaften der proteinogenen Aminosäuren (Nelson, Cox)

TABLE 3-1 Properties and Conventions Associated with the Common Amino Acids Found in Proteins

Amino acid	Abbreviation/ symbol	M_r	pK_a values			pI	Hydropathy index*	Occurrence in proteins (%) [†]
			pK_1 (-COOH)	pK_2 ($-NH_3^+$)	pK_R (R group)			
Nonpolar, aliphatic R groups								
Glycine	Gly G	75	2.34	9.60		5.97	-0.4	7.2
Alanine	Ala A	89	2.34	9.69		6.01	1.8	7.8
Proline	Pro P	115	1.99	10.96		6.48	1.6	5.2
Valine	Val V	117	2.32	9.62		5.97	4.2	6.6
Leucine	Leu L	131	2.36	9.60		5.98	3.8	9.1
Isoleucine	Ile I	131	2.36	9.68		6.02	4.5	5.3
Methionine	Met M	149	2.28	9.21		5.74	1.9	2.3
Aromatic R groups								
Phenylalanine	Phe F	165	1.83	9.13		5.48	2.8	3.9
Tyrosine	Tyr Y	181	2.20	9.11	10.07	5.66	-1.3	3.2
Tryptophan	Trp W	204	2.38	9.39		5.89	-0.9	1.4
Polar, uncharged R groups								
R groups								
Serine	Ser S	105	2.21	9.15		5.68	-0.8	6.8
Threonine	Thr T	119	2.11	9.62		5.87	-0.7	5.9
Cysteine	Cys C	121	1.96	10.28	8.18	5.07	2.5	1.9
Asparagine	Asn N	132	2.02	8.80		5.41	-3.5	4.3
Glutamine	Gln Q	146	2.17	9.13		5.65	-3.5	4.2
Positively charged R groups								
R groups								
Lysine	Lys K	146	2.18	8.95	10.53	9.74	-3.9	5.9
Histidine	His H	155	1.82	9.17	6.00	7.59	-3.2	2.3
Arginine	Arg R	174	2.17	9.04	12.48	10.76	-4.5	5.1
Negatively charged R groups								
R groups								
Aspartate	Asp D	133	1.88	9.60	3.65	2.77	-3.5	5.3
Glutamate	Glu E	147	2.19	9.67	4.25	3.22	-3.5	6.3

*A scale combining hydrophobicity and hydrophilicity of R groups; it can be used to measure the tendency of an amino acid to seek an aqueous environment (- values) or a hydrophobic environment (+ values). See Chapter 11. From Kyte, J. & Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105-32.

[†]Average occurrence in more than 1,150 proteins. From Doolittle, R.F. (1989) Redundancies in protein sequences. In *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation* (Fasman, G.D., ed.), pp. 599-623, Plenum Press, New York.

2.4 Komplexbildungseigenschaften von Aminosäuren

Die d-Block Elemente sind Metalle, die sich durch folgende Eigenschaften auszeichnen: elektrisch leitend, Wärmeleiter, verformbar, silbrig glänzend außer Cu und Au und hohe Schmelz- und Siedepunkte mit Ausnahme von Hg. Die Übergangsmetalle verlieren bei der Verbindungsbildung ihre Valenz-s-Elektronen und zum Teil ihre d-Elektronen und können in mehreren Oxidationszuständen vorkommen, was die biochemische Reaktivität signifikant beeinflusst (nach Obinger 2007).

The image shows a periodic table with the transition metals highlighted in blue. The transition metals are the d-block elements, including Sc, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Y, Zr, Nb, Mo, Tc, Ru, Rh, Pd, Ag, Cd, Hf, Ta, W, Re, Os, Ir, Pt, Au, Hg, Tl, Pb, Bi, Po, At, Rn, and the lanthanide and actinide series. The table is labeled 'Transition metals' at the top center. The groups are numbered 1 through 18, and the periods are numbered 1 through 7. The elements are arranged in rows and columns, with the transition metals forming a central block between groups 2 and 12.

Abbildung 2-9: Periodensystem der Elemente; Übergangselemente farblich hervorgehoben

Zusammenfassung der periodischen Eigenschaften der d-Blockelemente:

- 1 Hohe Schmelz- und Siedetemperaturen (Ausnahme Zn)
- 2 Geringe Schwankungen der Atomradien bzw. Ionenradien innerhalb der 3d-Reihe.

2.4.1.1 HSAB-Theorie

Sehr häufig erfolgt die Bindung von Metall-Ionen in der Biologie an Donorliganden nach der Theorie der harten und weichen Säuren und Basen (HSAB; hard-soft-acid-base) (Obinger 2007; Williams 1990)

Aussage: Es bilden sich stabile Komplexe, wenn sich „harte“ Kationen mit „harten Liganden“ und „weiche“ Kationen mit „weichen“ Liganden umgeben.

Eine mögliche Quantifizierung des HSAB-Konzepts basiert auf der Korrelation des Verhältnisses Ladung/Ionenradius eines Metall-Dikations mit der Messgröße 2. Ionisierungsenergie (Williams 1990).

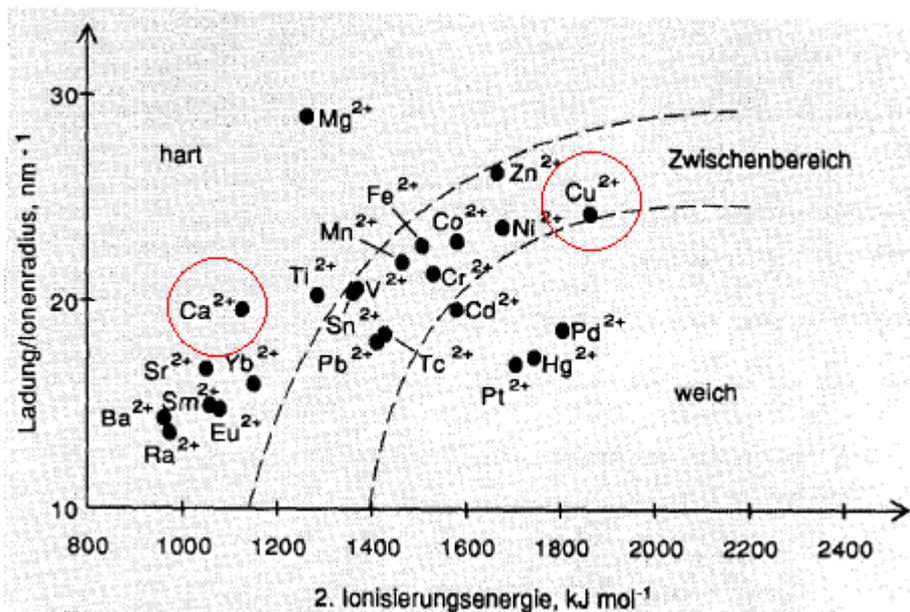


Abbildung 2-10: Mögliche Quantifizierung des HSAB-Konzeptes

Die Bindung zwischen Zentralatom und Liganden kann durch unterschiedliche Modelle mehr oder weniger umfassend erklärt werden.²

- 1 *Valenzstrukturtheorie (Valence-Bond-Theory, VB-Theorie):* Ligandenorbitale überlappen mit unbesetzten Hybrid-Orbitalen des Zentralatoms. Die VB-Theorie erklärt die Geometrie recht gut, aber z.B. nicht die Farbigkeit von Komplexen.
- 2 *Kristallfeldtheorie:* Sie geht von reinen elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Liganden und dem Zentralatom aus. Sie erklärt die Farbigkeit der Komplexe.
- 3 *Ligandenfeldtheorie:* Sie ist eine Erweiterung der Kristallfeldtheorie. Sie untersucht den Einfluss der punktförmigen Liganden auf die Energien der d-Orbitale des Zentralmetalls.
- 4 *Molekülorbitaltheorie:* Sie liefert die beste Beschreibung von Komplexverbindungen, da sie sowohl das Zentralatom als auch die Liganden quantenmechanisch behandelt.

2.4.1.2 Weiche Metallionen und Liganden

Es sind dies große Spezies mit typischerweise leicht polarisierbaren Elektronenwolken. Sie „teilen“ sich Elektronendichte in einem viel größeren Ausmaß mit entsprechenden Bindungspartnern. Eine gleichsinnige Wechselwirkung im Sinne weich/weich ist also in großem Ausmaß eine Teilung bindender Elektronen (kovalenter Charakter) und führt zu einem scheinbar stabilen Komplex. Typisch weiche Elektronenpaar-Donatoren sind vor allem Thiolate (RS⁻), Sulfide (S²⁻), Thioetherbrücken und Selenide.

Cu²⁺ [Elektronenkonfiguration: [Ar] 3d¹⁰ 4s¹] fällt in den Grenzbereich zwischen hartes/weiches Metallion und komplexiert bevorzugt mit Liganden wie z.B. Thiol- und

² <http://de.wikipedia.org/wiki/Hauptseite> , Stand 14.11.2007

Imidazolgruppen. Als Beispiel sei hier die *Cu-A-Domäne* angeführt (Obinger 2007). Aminosäuren können mit einem Kupferion zu einem Komplex folgenden Typs reagieren (Flickinger; *Encyclopedia of Biomass Technology*).

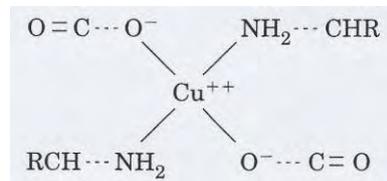


Abbildung 2-11: Bildung des Aminosäure-Kupferkomplexes

Die Bildung des in *Abbildung 2-11* dargestellten Kupferkomplexes ist die Basis zur qualitativen Bestimmung einer Aminosäure. L-Glu ist fähig, mit einer Vielzahl verschiedener Kationen, insbesondere mit Metallionen, zu reagieren und korrespondierende Komplexe auszubilden (Flickinger; *Encyclopedia of Biomass Technology*; Schwabe 2000).

Tabelle 2-2: Komplexbildungskonstanten von L-Glu

Kation	log K_s
Ni ²⁺	10,3
Zn ²⁺	8,5
Co ²⁺	8,1
Fe ²⁺	4,6
Mn ²⁺	3,0

L-Glu reagiert einerseits mit Natrium-Ionen zu Mononatrium-Glu, andererseits als Base mit schwefeliger Säure unter Bildung von Diglutamat-Sulfat-Kristallen.

2.4.1.3 Harte Metallionen und Liganden

Prinzipiell können alle Metallionen in Biomolekülen als Lewis-Säuren (d.h. Elektronenmangelverbindungen) angesehen werden.

Harte Metallionen sind durch einen kleinen Ionenradius und/oder eine hohe Ladung charakterisiert und können nur geringe Elektronendichten an den Liganden abgeben.

Harte Liganden wiederum geben ebenso wenig Elektronendichte an Partner ab, sodass eine Kombination dieser beiden einfach durch elektrostatische Wechselwirkung zustande kommt. Eine gleichsinnige Wechselwirkung im Sinne hart/hart entspricht also mehr einer klassischen ionischen Bindung³

Ca²⁺ [Elektronenkonfiguration: [Ar] 4s²] zählt zu den harten Metallionen und komplexiert aufgrund dessen mit harten Liganden wie z.B. Carboxylat-, Carbonyl-Sauerstoff-Gruppen.

³ <http://de.wikipedia.org/wiki/Hauptseite> , Stand 14.11.2007

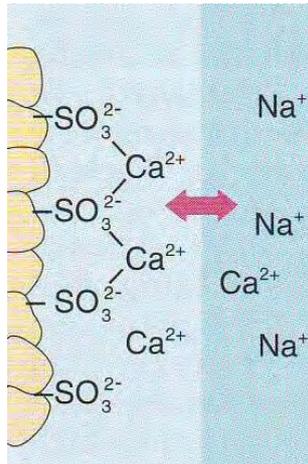
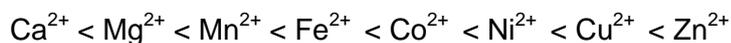


Abbildung 2-12: Komplexbildung von Kationenaustauschern mit Ca^{2+} zwecks Ionenaustausch

Die Bindungspräferenz zweiwertiger Metallionen der ersten Übergangsmetalle folgt der sogenannten Irving-Williams-Stabilitäts-Reihe: Für einen gegebenen Liganden ändert sich die Stabilität von Metallkomplexen folgendermaßen:



Kleinere Ionenradien führen zu stärkeren Metall-Ligand-Bindungen; Ca^{2+} ist ein besonders harter Ligand: hohe positive Ladung und kleiner Atomradius begründen z.B. eine hohe Affinität zu Sulfonsäuregruppen. Durch Sulfonsäuregruppen gebundenes Ca^{2+} kann durch z.B. einen Überschuss an Na^+ -Ionen von der funktionellen Gruppe verdrängt werden (Koschuh 2005).

2.5 Löslichkeitsverhalten

Eng verknüpft mit dem Säure- Base- Verhalten der Aminosäuren sind deren Löslichkeitseigenschaften⁴. Für die einzelnen Aminosäuren ergibt sich in Abhängigkeit von der Temperatur bei konstantem pH-Wert folgendes Löslichkeitsverhalten; wobei die einzelnen Löslichkeitskurven empirisch erfasst wurden.

Die titrierbaren Seitenketten beeinflussen zum Beispiel das Löslichkeitsverhalten der entsprechenden Aminosäure.

In polaren Lösungsmitteln z.B. Wasser gilt: geladene Seitenketten machen die Aminosäure löslicher, ungeladene Seitenketten machen die Aminosäuren unlöslicher. Nachdem der pH-Wert in *Abbildung 2-13* und *Abbildung 2-14* konstant gehalten wurde, ist die Löslichkeit der einzelnen Aminosäuren nur von der Temperatur abhängig. Zu beachten ist außerdem, dass auf der y-Achse die Löslichkeit der Aminosäuren in der Dimension von $[\text{g} \cdot 100 \text{ ml H}_2\text{O}^{-1}]$ erfasst wurde, weshalb die Kurven der einzelnen Aminosäuren untereinander nur bedingt vergleichbar sind. Um eine bessere Vergleichbarkeit sicherstellen zu können, müsste auf der y-Achse die Stoffmenge der gelösten Aminosäure pro Volumseinheit des Lösungsmittels in der Dimension $[\text{mol} \cdot 100 \text{ ml H}_2\text{O}^{-1}]$ aufgetragen werden.

⁴ <http://de.wikipedia.org/wiki/Hauptseite>, Stand 14.11.2007

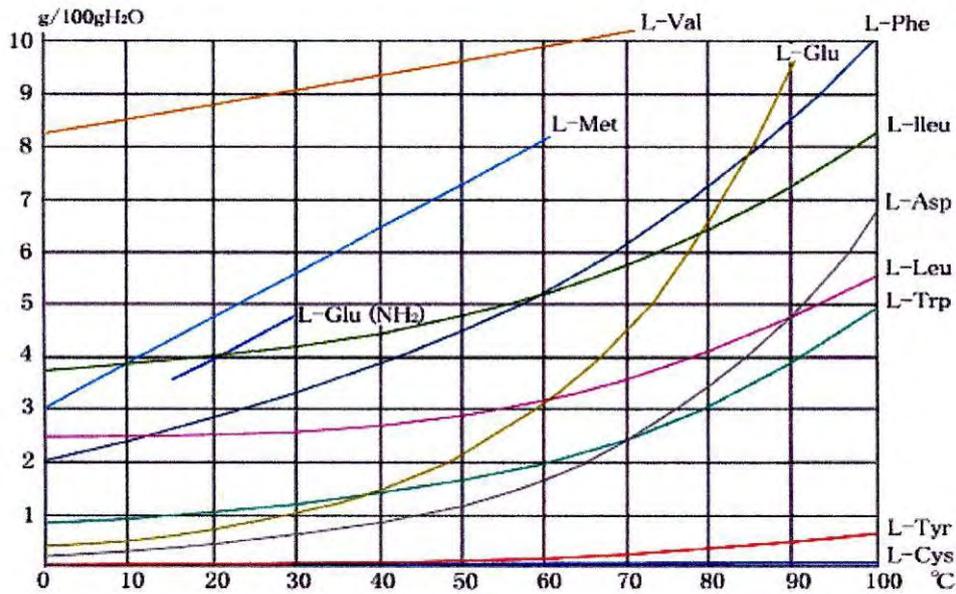


Abbildung 2-13: Löslichkeit einzelner Aminosäuren in Abhängigkeit von der Temperatur bei konstantem pH-Wert

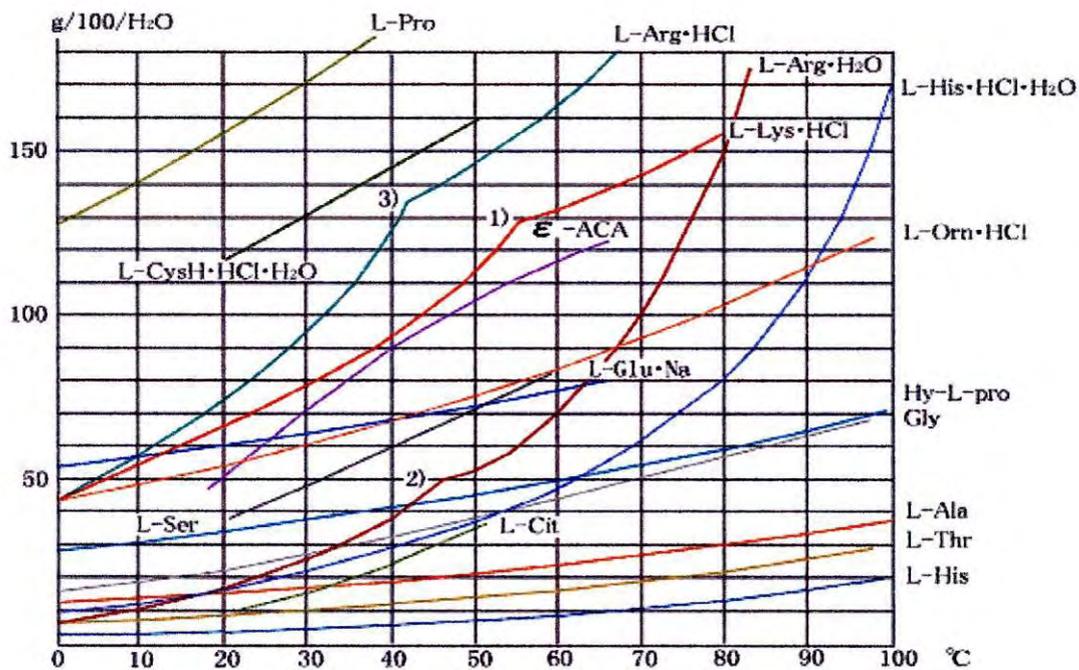


Abbildung 2-14: Löslichkeit einzelner Aminosäuren in Abhängigkeit von der Temperatur bei konstantem pH-Wert

In *Abbildung 2-13* bzw. *Abbildung 2-14* ist auffällig, dass die Löslichkeit von L-Cystein und L-Tyrosin (*Abbildung 2-13*) am geringsten von allen Aminosäuren ist. Der leicht acide Charakter der Sulfhydryl- bzw. Hydroxylgruppe scheint am Löslichkeitsverhalten nicht maßgeblich beteiligt zu sein; wieder erwarten lösen sich hydrophobe Aminosäuren wie L-Leucin oder L-Isoleucin erheblich besser als L-Cystein bzw. L-Tyrosin. In der Regel ist die Löslichkeit am isoelektrischen Punkt minimal (siehe *Abbildung 2-15 a.*), das ist jener pH-Wert, bei dem das Molekül eine Nettoladung von Null besitzt und es deshalb zu einer

insgesamt minimalen Interaktion zwischen gelöstem Molekül und polarem Lösungsmittel (z.B. H₂O) kommt.

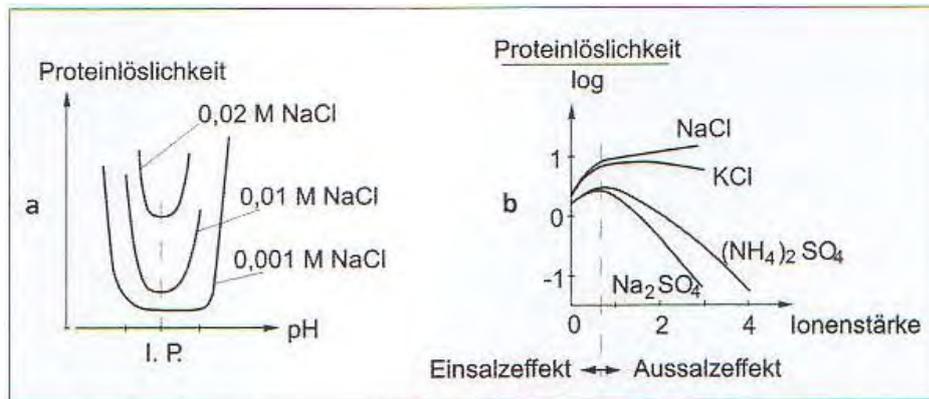


Abbildung 2-15 a (links) und b (rechts): Zusammenhang Proteinlöslichkeit in Abhängigkeit vom isoelektrischen Punkt (a) und von der Ionenstärke (b) (Chmiel)

Die Löslichkeit einzelner Aminosäuren ist weiters von der Ionenstärke abhängig. Sie ist definiert als:

$$I = 0,5 * \sum c_i * z_i^2 \quad (\text{Gl. 8})$$

c_i ... Konzentration des Ions i ; z_i ... Ladung des Ions i .

Bei niedrigen Ionenstärken beobachtet man häufig, wie auch in *Abbildung 2-15 b* gezeigt, einen so genannten Einsalzeffekt (*salting in*), bei hoher Ionenstärke einen Aussalzeffekt (*salting out*).

Abbildung 2-15 b zeigt aber auch, dass in manchen Fällen Salze (hier NaCl) selbst bei hoher Ionenstärke keinen Aussalzeffekt bewirken.

Für die Löslichkeit eines Proteins gilt, wie die *Abbildung 2-15 b* zeigt, für höhere Ionenstärken in erster Näherung folgende empirische Beziehung (Chmiel).

$$\log S = \beta - K * I \quad (\text{Gl. 9})$$

S ... Löslichkeit des Proteins; β ... Konstante (abhängig von Temperatur und pH-Wert; Logarithmus der hypothetischen Löslichkeit bei einer Ionenstärke von $I = 0$); K := Aussalzkonstante; I := Ionenstärke.

3 Verzeichnisse

3.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 0-1: Die 20 proteinogenen Aminosäuren nach Gruppen angeordnet (Nelson D., Cox M.).....	27
Abbildung 0-2: Oxidation von zwei Cysteinen zu Cystin (Nelson, Cox)	28
Abbildung 0-3: Zwitterionenform einer Aminosäure in Abhängigkeit vom pH-Wert	29
Abbildung 0-4: Zusammenhang zwischen Anteil an Zwitterionenform und pH-Wert	30
Abbildung 0-5: Trenneigenschaften von Aminosäuren in Abhängigkeit vom pH-Wert (nach Jungbauer 2004)	31
Abbildung 0-6: Trenneigenschaften von Aminosäuren in Abhängigkeit vom pH-Wert; CEX... Kationenaustausch; AEX... Anionenaustausch	31
Abbildung 0-7: Titrationskurve der Aminosäure Glycin (Berg, Tymoczko, Stryer)	32
Abbildung 0-8: Titrationskurve der Aminosäure Glutaminsäure; titrierbare Seitenkette (Nelson, Cox)	34
Abbildung 0-9: Periodensystem der Elemente; Übergangselemente farblich hervorgehoben	35
Abbildung 0-10: Mögliche Quantifizierung des HSAB-Konzeptes	36
Abbildung 0-11: Bildung des Aminosäure-Kupferkomplexes	37
Abbildung 0-12: Komplexierung von Kationentauschern mit Ca^{2+} zwecks Ionenaustausch	38
Abbildung 0-13: Löslichkeit einzelner Aminosäuren in Abhängigkeit von der Temperatur bei konstantem pH-Wert	39
Abbildung 0-14: Löslichkeit einzelner Aminosäuren in Abhängigkeit von der Temperatur bei konstantem pH-Wert	39
Abbildung 0-15 a (links) und b (rechts): Zusammenhang Proteinlöslichkeit in Abhängigkeit vom isoelektrischen Punkt (a) und von der Ionenstärke (b) (Chmiel)	40

3.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 0-1: Physikalische Eigenschaften der proteinogenen Aminosäuren (Nelson, Cox) ..	34
Tabelle 0-2: Komplexbildungskonstanten von L-Glu	37