



HECTOR SEMINAR

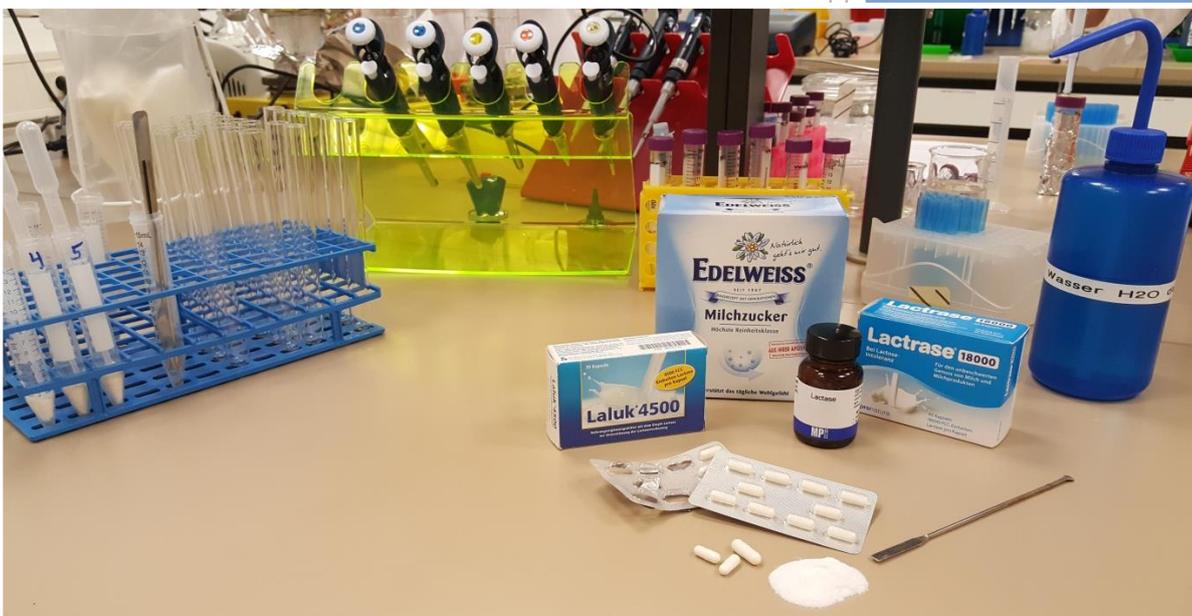


Karlsruher Institut für Technologie

Abschlussbericht der
Kooperationsphase 2016/17

Lactase

Enzymversuche aus dem Drogeriemarkt



Evalotte Mohren
Sophia Russeck
Lena Wagner
Franziska Zell

Dr. Julia Ehlermann
Fortbildungszentrum für
Technik und Umwelt (FTU)

Inhaltsverzeichnis

Abstract	4
1 Einleitung	5
1.1 Hintergrund	5
1.2 Zielsetzung	6
2 Material und Methoden	7
2.1 Herstellung der Enzymlösungen	7
2.2 Alginateinhüllung	8
2.3 Ansetzen der Zuckerlösungen	8
2.4 Verdünnungsreihe	9
2.5 Nachweisversuch mit DNS	10
2.6 Fotometrische Messung	10
2.6.1 Kalibriergerade	11
2.7 Glucosetest	12
3 Ergebnisse	13
3.1 Erster Testdurchlauf	13
3.2 Problemstellung	13
3.2.1 Lösungsansatz zur Bestimmung der Stoffmengenkonzentration	15
3.3 Vorversuche	16
3.3.1 Ermittlung des Messbereichs	16
3.3.2 Vergleich der reduzierenden Wirkung	17
3.3.3 Erstellung einer Kalibriergeraden	20
3.4 Variation verschiedener Parameter	21
3.4.1 Alginateinhüllung	21
3.4.2 Konzentration der <i>Lactase</i>	23
3.4.3 Alginatkügelchen aus der Suspension	24
3.4.4 pH-Wert	26
3.4.5 Reine <i>Lactase</i>	27
4 Diskussion	31
4.1 Deutung	31
4.1.1 Deutung der Vorversuche	31
4.1.1.1 Ermittlung des Messbereichs	31
4.1.1.2 Vergleich der reduzierenden Wirkung	32

4.1.1.3 Erstellung einer Kalibriergeraden	32
4.1.2 Deutung der modifizierten Versuche	33
4.2 Fehlerdiskussion	35
4.3 Fazit und Ausblick	37
5 Danksagung	38
6 Quellen.....	38
7 Anhang	39
7.1 Chemikalien, Geräte und Produkte	39
7.2 Weitere Messreihen und Bilder	40
7.3 Versuchsskript: Immobilisierung von Dextranucrase	45
8 Selbstständigkeitserklärung.....	47

Abstract

Enzymes play a central role in most metabolic processes and are therefore very important for living organisms. An existing experiment at the KIT students' laboratory demonstrates their functional principle and an immobilisation technique. Students assay the enzymatic activity of *dextranucrase* during the decomposition of sucrose in different pH-values by measuring the reaction products using a photometer. Since *dextranucrase* is relatively expensive, the institute has come up with the idea of trying to replace the employed substances with a different sugar and enzyme in order to make the experiment more affordable. One option could be the use of lactose and *lactase* as the enzyme is considerably cheaper than *dextranucrase*. In addition, it is easily available in drugstores because many people with lactose intolerance consume *lactase* capsules. The goal of this project was thus to find out whether it was possible to perform the original experiment in a modified way with the substituted sugar and enzyme. This task required an adapted detection test for the reaction products as well as different experiments with varying reaction conditions.

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

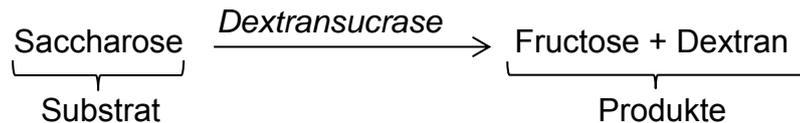
Enzyme sind Proteine mit biokatalytischer Wirkung. Erst indem sie die benötigte Aktivierungsenergie herabsetzen, können viele Stoffwechselprozesse in unserem Körper ablaufen. Sie beschleunigen die Reaktion. Die Umsatzrate des Ausgangsstoffs pro Zeit gibt Auskunft über die Enzymaktivität, also die erreichte Reaktionsgeschwindigkeit bei den jeweiligen Bedingungen. Reaktionsbedingungen wie Temperatur und pH-Wert beeinflussen diese; weichen Temperatur und pH-Wert von den enzymespezifischen Optima ab, nimmt die Aktivität der Enzyme ab bis diese schließlich denaturieren und nicht mehr arbeiten. Grund dafür ist, dass es zu einer Änderung der räumlichen Struktur des Enzyms kommt, sodass das Substrat nicht mehr an dieses binden kann; es entsteht kein Enzym-Substrat-Komplex. Das Enzym kann nicht wirken, die Reaktion findet nicht statt und das Produkt wird nicht gebildet.

Enzyme können nur bestimmte Reaktionen katalysieren (Wirkungsspezifität). Sie binden spezifische Substratmoleküle, die sie zu Produkten umsetzen (Substratspezifität). Enzyme beschleunigen die Reaktion und gehen, obwohl sie an der Reaktion teilhaben, unverändert aus ihr hervor. Sie werden also nicht verbraucht und können wiederverwertet werden. In der Praxis ist es jedoch schwer, die Enzyme wieder zu isolieren, nachdem sie beispielsweise einer Lösung zugesetzt wurden. Bei der Immobilisierung werden die Biokatalysatoren an einen Träger gebunden oder auf andere Weise in ihrer Mobilität eingeschränkt, um dieses Problem zu umgehen. Dies kann mit verschiedenen physikalischen oder chemischen Methoden erreicht werden; eine davon ist die Matrixeinhüllung. Bei dieser Vorgehensweise werden Enzymmoleküle im Netzwerk einer zumeist gelartigen Matrix eingeschlossen. Die Maschen der gebildeten Polymerhülle, welche die Enzyme einschließt, sind zwar für Substrat und Produkt durchlässig, das Enzym selbst kann aber nicht durch diese nach außen gelangen.

Ein Praktikum am Helmholtz-Schülerlabor des Karlsruher Instituts für Technologie veranschaulicht für Schülerinnen und Schüler der Kursstufe die Funktionsweise von Enzymen und das Prinzip der Immobilisierung am Beispiel der *Dextransucrase*. Dieses Schülerpraktikum (s. 7.3) liegt der Projektarbeit zugrunde und bildet den Ausgangspunkt der im Folgenden beschriebenen Versuche.

1.2 Zielsetzung

In dem Schülerversuch zur Immobilisierung von Enzymen (s. 7.3) untersuchen die teilnehmenden Schülerinnen und Schüler die Enzymaktivität von *Dextranucrase* bei der Spaltung von Saccharose. Dazu wird das Enzym zunächst in einer Alginateinhüllung immobilisiert. Sobald die dabei entstandenen Kügelchen in eine Saccharoselösung gegeben werden, beginnt die *Dextranucrase* damit, den Zucker in Fructose und Dextran zu spalten.



Um die Aktivität des Enzyms zu messen, werden zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Start der Reaktion Proben genommen. Dabei verbleiben die in den Alginatkügelchen eingeschlossenen Enzyme in der Ausgangslösung, sodass die Reaktion gestoppt wird. Der Nachweis der zum jeweiligen Zeitpunkt entstandenen Menge des Reaktionsprodukts Fructose erfolgt mithilfe einer Farbreaktion mit DNS (3,5-Dinitrosalizylsäure) und anschließender fotometrischer Messung. Dieses Experiment wird bei unterschiedlichen pH-Werten wiederholt und somit die pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität untersucht. Um eine quantitative Aussage über die Aktivität der immobilisierten *Dextranucrase* machen zu können, muss zunächst eine Kalibriergerade mit bekannten Fructose-Konzentrationen erstellt werden. Mithilfe der Kalibriergerade kann nun die jeweilige Fructose-Konzentration aus den zuvor gemessenen Ergebnissen bestimmt werden. Trägt man die Fructose-Konzentration nach jeweils 60 Minuten (= Enzymaktivität) für alle Ansätze gegen den pH-Wert auf, kann man anhand dieser Kurve das pH-Optimum der *Dextranucrase* bestimmen.

Da *Dextranucrase* vergleichsweise teuer¹ und schwer erhältlich ist, bestand das Interesse, diese durch ein preiswertes, leicht verfügbares Enzym, wie zum Beispiel *Lactase*, zu ersetzen. *Lactase* spaltet im Körper Lactose (Milchzucker) in Glucose und Galactose. Die Zahl der laktoseintoleranten Menschen, deren Körper die nötige *Lactase* nicht selbst herstellen kann, wächst ständig. *Lactase*-Präparate können daher in Form von Nahrungsergänzungsmitteln vergleichsweise preiswert² in der Apotheke oder dem

¹ Sigma-Aldrich: 339,50 € pro 10 UN

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d9909?lang=de®ion=DE>

² Laluk® 4500: 9,98 € pro 100 Kapseln: <https://www.shop-apotheke.com/arzneimittel/9608223/laluk-4500.htm>
Lactase® 18000: 11,74 € pro 40 Kapseln: <https://www.shop-apotheke.com/arzneimittel/9608223/laluk-4500.htm>

Drogeriemarkt erworben werden. Die Verwendung dieses Enzym würde den Versuch somit kostengünstiger und praktikabler machen.

Das Ziel des Projekts bestand darin herauszufinden, ob der bestehende Schülerversuch nach dem gleichen Prinzip mit Lactose und handelsüblicher *Lactase* anstelle von Saccharose und *Dextranucrase* durchgeführt werden kann. Um den Versuch entsprechend zu modifizieren, waren eine Anpassung der Nachweisreaktion für die Reaktionsprodukte und die Durchführung verschiedener Versuche mit variierenden Bedingungen zur Bestimmung der benötigten Reaktionsbedingungen erforderlich.

2 Material und Methoden

2.1 Herstellung der Enzymlösungen

Im Ursprungsversuch wird eine *Dextranucrase*-Lösung mit einer Umsatzrate von 4 U/ml verwendet.

Für die modifizierten Versuche wurden verschiedene *Lactase*-Kapseln eingesetzt, einerseits das Präparat „Laluk[®] 4500“³ und andererseits das Präparat „Lactase[®] 18000“⁴, die in der Apotheke erhältlich sind. Die Menge an enthaltener *Lactase* ist jeweils in FCC (Food Chemical Codex)-Einheiten angegeben; beim ersten Produkt „Laluk[®] 4500“ mit einem Wert von 4500 FCC-Einheiten, beim zweiten Produkt „Lactase[®] 18000“ mit 18000 FCC-Einheiten. Den Packungsbeilagen zufolge kann die *Lactase*-Menge einer Kapsel der „Laluk[®] 4500“-Kapseln 10 – 20 g, der „Lactase[®] 18000“-Kapseln 15 - 35 g Lactose umsetzen.

Die *Lactase*-Lösungen im Versuch wurden hergestellt, indem jeweils das in einer geöffneten Kapsel enthaltene Pulver in 100 ml oder 200 ml destilliertem Wasser gelöst wurde.

In den ersten Ansätzen mit reiner *Lactase* wurden 9 mg Pulver in 10 ml oder 100 ml destilliertem Wasser gelöst, was bezüglich der Umsatzrate in etwa der *Dextranucrase*-Lösung entsprechen sollte. Bei einer späteren Durchführung wurde mit 100 mg in 10 ml Wasser noch eine erheblich höhere *Lactase*-Konzentration gewählt.

³ Strathmann GmbH & Co: <http://www.strathmann.de/index.php/de/laluk-4500-kurzinfo>

⁴ Pro Natura Gesellschaft für gesunde Ernährung mbH: <https://www.sparmedo.de/produktinfo/lactase-18000-fcc-kapseln-09545221/>

2.2 Alginateinhüllung

Im Versuch wird das Enzym in eine Matrix aus dem natürlichen Polymer Natriumalginat eingeschlossen und dadurch immobilisiert. Hierzu wird ein Gemisch aus je 3 g einer 3%-igen Alginatlösung und einer Enzymlösung hergestellt und unter Rühren durch eine Spritze in eine Calciumchlorid (CaCl_2)-Lösung mit $c = 0,2 \text{ mol/l}$ getropft. Dabei bilden sich gelartige Kügelchen, die Immobilisate. Diese werden abgeseibt, mit Ca-Ac-Puffer pH 5,5 abgespült und im weiteren Versuchsverlauf den Zuckerlösungen zugegeben.

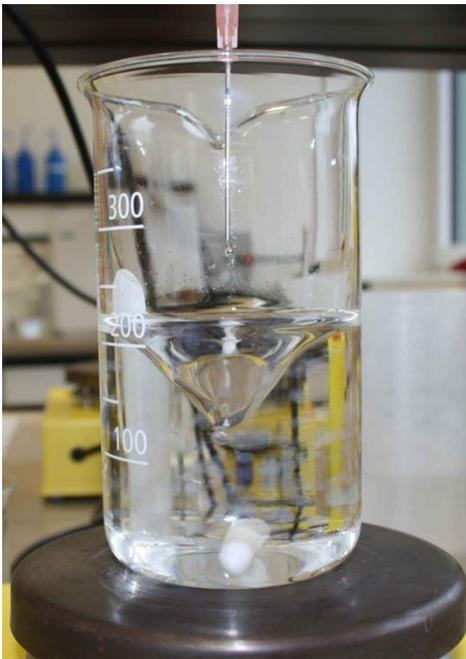


Abb. 1: Herstellung der Immobilisate



Abb. 2: Alginatkügelchen

2.3 Ansetzen der Zuckerlösungen

Im Ausgangsversuch wird eine Saccharose-Lösung der Konzentration $c = 100 \text{ mmol/l}$ ($\hat{=} 0,1 \text{ mol/l}$) verwendet. Anstelle des Zuckers Saccharose wird im modifizierten Versuch Lactose benötigt; die Reaktionsprodukte sind Glucose und Galactose. Da alle drei Zucker eine reduzierende Wirkung haben, muss von jedem eine Kalibriergerade erstellt werden (s. 2. 6. 1). Dazu werden zunächst Stammlösungen der verschiedenen Zucker angesetzt. Wie im Ausgangsversuch haben die Zuckerlösungen die Konzentration $c = 0,1 \text{ mol/l}$ des jeweiligen Zuckers.

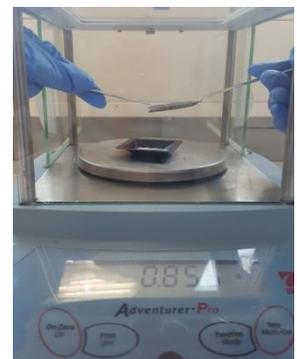


Abb. 3: Alginatkügelchen

Aus der molaren Masse von Lactose, Glucose und Galactose ergeben sich folgende Zuckermassen für 50 ml einer Lösung der Konzentration 100 mmol/l:

	M [g/mol]	Volumen [ml]	Masse [g]
Lactose	342,300	50	1,7115
Glucose	180,156	50	0,9008
Galactose	180,156	50	0,9008

Tabelle 1: Zuckermengen für 50 ml einer Lösung der Konzentration $c = 100 \text{ mmol/l}$

Der abgewogene Zucker wird jeweils in einer pH-Lösung des je nach Versuchsansatz variierenden pH-Wertes gelöst.

2.4 Verdünnungsreihe

Eine Verdünnungsreihe wird benötigt, um aus der Stammlösung ($c = 100 \text{ mmol/l}$) (s. 2. 3) verdünnte Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen herzustellen. Dazu wird der Stammlösung eine bestimmte Menge entnommen und mit destilliertem Wasser auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Von diesem Ansatz wird wieder eine Probe genommen und der Vorgang wiederholt, wobei sich von Ansatz zu Ansatz die Zuckerkonzentration reduziert.

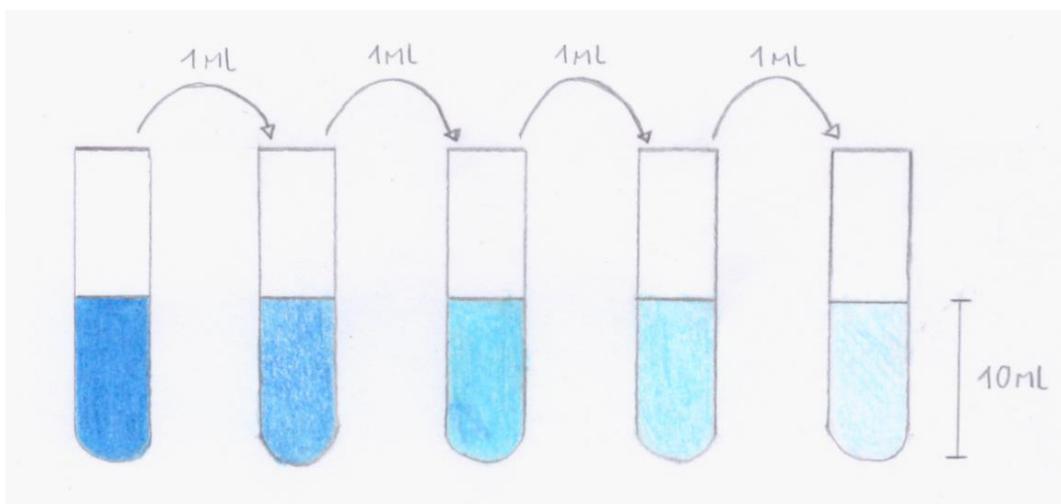


Abb. 4: Ansetzen einer Verdünnungsreihe

Konzentration [mmol/l]	100	10	1	0,1	0,01	0,001
m (Lactose) [mg/10 ml]	342,3	34,23	3,423	0,3423	0,03423	0,003423

Tabelle 2: Masse an Lactose einer Verdünnungsreihe in 10 ml dest. Wasser

2.5 Nachweisversuch mit DNS

Im bestehenden Versuch mit *Dextranucrase* wird Saccharose unter anderem in Fructose (s. 2. 2), einen reduzierenden Zucker abgebaut. Eine quantitative Methode zum Nachweis solcher reduzierender Stoffe ist die Reaktion mit 3,5-Dinitrosalicylsäure (DNS).

Die freie Aldehydgruppe des Zuckers wird beim Erhitzen zu einer Carboxygruppe oxidiert ($-\text{CHO} \rightarrow -\text{COOH}$) und die Nitrogruppe der DNS reduziert ($-\text{NO}_2 \rightarrow -\text{NH}_2$); es entsteht 3-Amino-5-nitrosalicylsäure, ein roter Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei etwa 540 nm. Je mehr Zuckermoleküle nun also vorliegen, die die DNS reduzieren können, desto mehr 3-Amino-5-nitrosalicylsäure entsteht- erkennbar an einem Farbumschlag von gelb über orange nach rot.



Abb. 5: Farbumschlag von DNS bei unterschiedlichen Konzentrationen

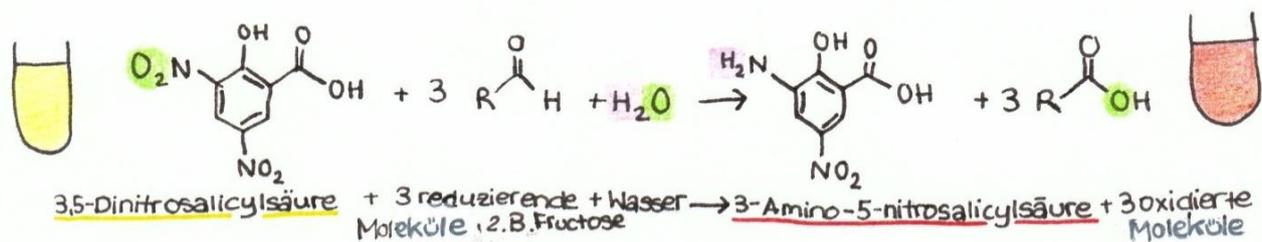


Abb. 6: Reaktionsgleichung des DNS-Nachweises

2.6 Fotometrische Messung

Die Konzentration der bei der Reaktion entstandenen 3-Amino-5-nitrosalicylsäure wird fotometrisch bestimmt. Das Fotometer misst die Stärke der Absorption der Lösung, indem zunächst weißes Licht durch Blenden auf einen Monochromator geleitet wird (Abb.7). Dieser lässt nur Licht mit der gewünschten Wellenlänge durch, in diesem Fall $\lambda = 540 \text{ nm}$. Trifft das monochromatische Licht auf die Probe, wird es von den Molekülen absorbiert, sodass die ursprüngliche Lichtintensität (I_0) verringert wird. Die Intensität des ausfallenden Lichts (I) ist demnach geringer als die des einfallenden Lichts (I_0). Ein Detektor misst diese Extinktion, also die reduzierte Lichtmenge. Das Lambert-Beersche Gesetz beschreibt die Abhängigkeit der Extinktion des durchgehenden Lichts durch ein Medium von der Konzentration des absorbierenden Stoffes, dessen spezifischen Extinktionskoeffizienten und der Schichtdicke:

$$E_{\lambda} = \lg \cdot (I_0/I) = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$$

Dementsprechend gilt, je höher die Konzentration an absorbierenden Molekülen ist, desto mehr Licht wird absorbiert und die Extinktion wird größer. Über eine Kalibriergerade kann man von der Extinktion der untersuchten Probelösung auf die Konzentration schließen.

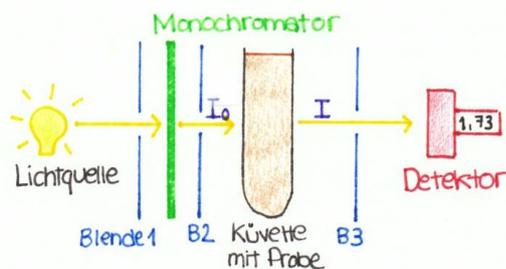


Abb. 7: Prinzip der Fotometrie



Abb. 8: Fotometer

2.6.1 Kalibriergerade

Bei der quantitativen Bestimmung der Edukte und Produkte mittels eines kolorimetrischen Nachweises wird zunächst mit Standardproben, deren Gehalt an reduzierenden Zuckern bekannt ist, eine Kalibriergerade erstellt. Hierfür werden Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen an reduzierenden Zuckern mit 0,5 ml 3,5-Dinitrosalizylsäure (DNS) angefärbt. Anschließend wird die jeweilige Absorption bei 540 nm gemessen.

Die in Abb. 9 und Tabelle 4 angeführten Ergebnisse beziehen sich auf den Ausgangsversuch mit *Dextranucrase*, bei welchem Saccharose zu Fructose gespalten wird.

Probe	S-0	S-0,4	S-0,8	S-1,2	S-1,6	S-2
Konzentration Fructose [g/l]	0	0,4	0,8	1,2	1,6	2
Fructose [g]	0	0,0002	0,0004	0,0006	0,0008	0,001
Dest. Wasser [ml]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Tabelle 3: Mischverhältnis der Standardproben

Fructose [g/l]	0	0,4	0,8	1,2	1,6	2
Fructose [mmol/l]	0	2,22	4,44	6,66	8,88	11,1
A_{540nm}	0	0,268	0,443	0,964	1,416	1,961

Tabelle 4: Absorption der Standardproben

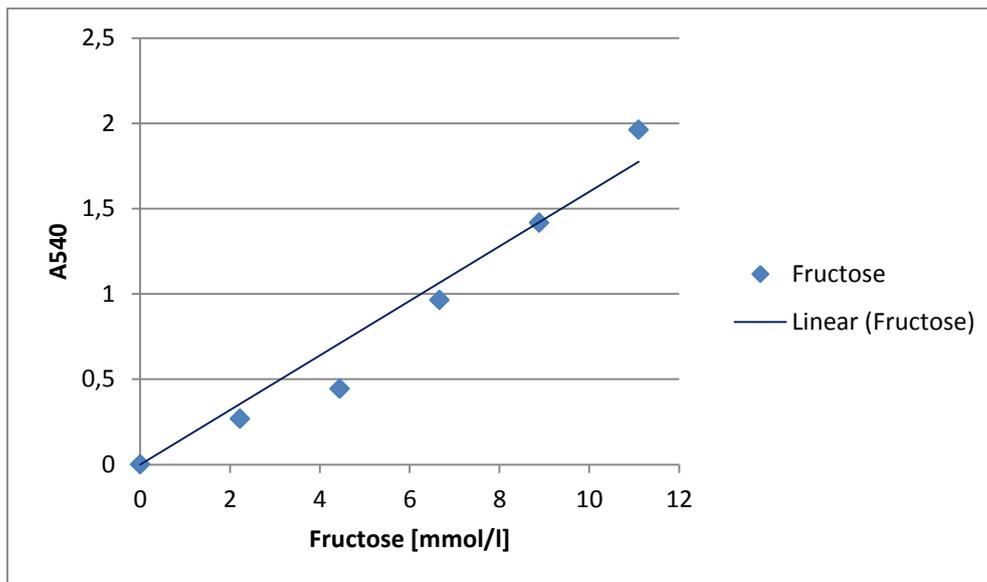


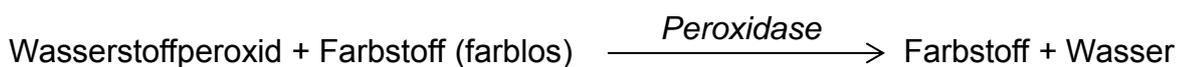
Abb. 9.: Kalibriergerade

2.7 Glucosetest

Der Glucose-Oxidase-Test (GOD-Test) ist eine Nachweismethode für Glucose. Die Wirkungsweise beruht auf der Oxidation der Glucose mithilfe des Enzyms Glucose-Oxidase unter Bildung von Gluconsäure und Wasserstoffperoxid.



In einer nachgeschalteten Farbreaktion wird Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu Wasser (H_2O) reduziert und ein Farbstoff entsteht.



Je mehr Glucose vorhanden ist, desto intensiver ist die Färbung. Bei handelsüblichen Teststreifen ist ein Farbumschlag von gelb zu grün zu beobachten.

Bei dieser Methode kann die Glucosemenge ungefähr bestimmt werden, eine exakte Quantifizierung ist jedoch nicht möglich. Die mit Blutzuckermessgeräten übliche quantitative Glucose-Bestimmung im



Abb. 10: Glucosetest⁵

Blut liefert für reine Glucoselösungen keine aussagekräftigen Messwerte und kann daher nicht angewendet werden.

⁵ Schulchemie: <http://www.schulchemie.de/Glucotest.pdf>

3 Ergebnisse

3.1 Erster Testdurchlauf

Für den ersten Test haben wir zunächst die meisten Bedingungen aus dem Ausgangsversuch mit *Dextranucrase* (s. 7.3) übernommen. Wir haben Zuckerlösungen mit einem pH-Wert von 6 angesetzt und im Wasserbad auf 25 °C temperiert, da diese Werte den Optima der *Lactase* entsprechen⁶.

Wie im Ausgangsversuch haben wir eine Zuckerlösung der Konzentration $c = 100 \text{ mmol/l}$ angesetzt. Für weitere Untersuchungen haben wir den Versuch nochmals mit halb so hoher Konzentration ($c = 50 \text{ mmol/l}$) durchgeführt.

Weil wir keinen Anhaltspunkt für die Konzentration der *Lactase*-Lösung hatten, haben wir jeweils eine Kapsel der beiden uns zur Verfügung stehenden Präparate (s. 2.1) in 100 ml destillierten Wasser gelöst.

All diese Versuchsansätze haben wir sowohl mit als auch ohne Alginateinhüllung durchgeführt.

	1 Kapsel <i>Lactase</i> 4500 Fcc in 100 ml destilliertem Wasser	1 Kapsel <i>Lactase</i> 18000 Fcc in 100 ml destilliertem Wasser
Lactose-Lösung ($c = 50 \text{ mmol/l}$) mit Alginateinhüllung	Versuchsansatz A ₀	Versuchsansatz E ₀
Lactose-Lösung ($c = 100 \text{ mmol/l}$) mit Alginateinhüllung	Versuchsansatz B ₀	Versuchsansatz F ₀
Lactose-Lösung ($c = 50 \text{ mmol/l}$) ohne Alginateinhüllung	Versuchsansatz C ₀	Versuchsansatz G ₀
Lactose-Lösung ($c = 100 \text{ mmol/l}$) ohne Alginateinhüllung	Versuchsansatz D ₀	Versuchsansatz H ₀

Tabelle 5: Versuchsansätze erster Testdurchlauf

Die Probennahme erfolgte nach 0, 5, 15, 30 und 60 Minuten. Die Absorptionswerte konnten nicht bestimmt werden, da sie außerhalb des messbaren Bereichs ($> 3,5$) lagen.

3.2 Problemstellung

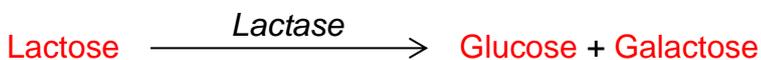
Bei dem ursprünglichen Schülerversuch mit *Dextranucrase* und Saccharose wird mithilfe von 3,5 - Dinitrosalizylsäure (DNS) das Reaktionsprodukt Fructose quantitativ nachgewiesen (s. 2.5). Je intensiver die Färbung ist, desto mehr Fructose ist enthalten. Dieser Test beruht auf der reduzierenden Wirkung von Zuckern.

⁶ <https://de.wikipedia.org/wiki/Lactase>

Im Ursprungsversuch ist nur ein reduzierender Zucker vorhanden, die Fructose. Wenn also die Fructosekonzentration einer Probe ermittelt werden soll zu einem Zeitpunkt, zu dem die *Dextranucrase* die Saccharose noch nicht die vollständig umgesetzt hat, stellt dies kein Problem dar, weil in der Probe zwar sowohl das Edukt Saccharose, als auch die Produkte Dextran und Fructose vorhanden sind, mit DNS aber nur der reduzierende Zucker nachgewiesen wird, die Fructose. Die zwei anderen Stoffe spielen für die Nachweisreaktion keine Rolle.



Für den Projektversuch werden grundsätzlich die Rahmenbedingungen aus dem Ursprungsversuch, insbesondere die Matrixeinhüllung mit Alginat (s. 2.2), die Konzentrationen des Zuckers und die Zeiten bis zur Probennahme als Anhaltspunkte übernommen. Allerdings lässt sich nicht alles unverändert auf den Versuch mit Lactose und *Lactase* übertragen. Da bei der Spaltung der Lactose sowohl das Edukt, als auch beide Produkte, Glucose und Galactose, eine reduzierende Wirkung haben, reagieren alle vorhandenen Zucker mit DNS. Es sind also bei einer noch nicht vollständigen Umsetzung der Lactose drei reduzierende Zucker in der Probe, die alle durch die DNS nachgewiesen werden.



Aufgrund dessen ist es nicht möglich, direkt über die Eichgerade rückzuschließen, wie viel Lactose zu einem bestimmten Zeitpunkt umgesetzt wurde. Die Aktivität der *Lactase* wird anhand der Farbreihe nicht anschaulich, schon qualitativ sind keine Unterschiede erkennbar. Die Nullprobe verfärbt sich beim Erhitzen, sodass schon die Ausgangsprobe der Farbreihe hellrot ist, da auch das Edukt, also die Lactose als reduzierender Zucker mit DNS reagiert und nachgewiesen wird.

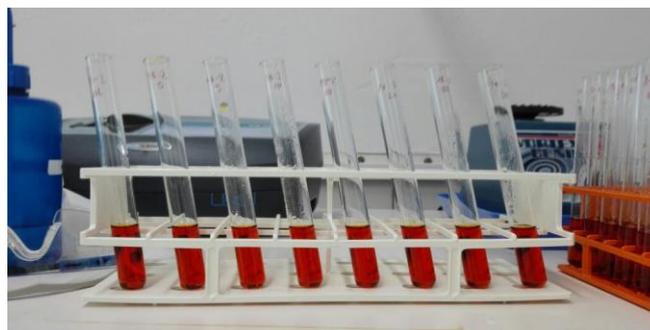


Abb. 11: Versuchsreihe mit unveränderter Farbintensität; Probennahme vor der Zugabe des Enzyms und nach $t = 0, 5, 10, 15, 20, 25$ und 30 min

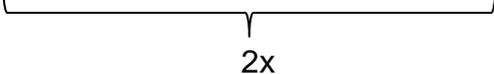
3.2.1 Lösungsansatz zur Bestimmung der Stoffmengenkonzentration

Obwohl beim Verfahren mit DNS (3,5 – Dinitrosalicylsäure) alle drei reduzierenden Zucker nachgewiesen werden, sollte durch Umrechnung die Menge der umgesetzten Lactose bestimmt werden können. Dabei sind folgende Gegebenheiten grundlegend:

1. Die Extinktion ist abhängig von der Konzentration des Farbstoffs (Lambert-Beersches Gesetz s. 3.2).
2. Die Konzentration des Farbstoffs ist abhängig von der Konzentration an reduzierenden Substanzen (z. B. Zuckern).
3. Die Konzentration an reduzierenden Substanzen wird bei vollständiger Umsetzung verdoppelt: 1 Mol Lactose \longrightarrow 1 Mol Glucose + 1 Mol Galactose.

Bei unvollständiger Umsetzung ergibt sich Folgendes:

Zeit	c(Lactose)	c(Glucose)	c(Galactose)
0	A	0	0
t	A-x	x	x



$$c(\text{reduzierende Zucker zur Zeit } t) = A - x + 2x = A + x$$

Nach diesem Ansatz kann auf die Konzentration der umgesetzten Lactose geschlossen werden, indem zunächst die Differenz zwischen der Extinktion zum Zeitpunkt t und der Extinktion zum Zeitpunkt des Starts der Reaktion ermittelt wird. Aus der errechneten Extinktion kann über eine Kalibriergerade auf die Konzentration x rückgeschlossen werden.

$$E(x) = E(t) - E(A)$$

Dabei wird vorausgesetzt, dass die Reduktionswirkung von Lactose, Glucose und Galactose identisch ist. Um dies zu überprüfen, wurden einige Vorversuche durchgeführt.

3.3 Vorversuche

Ziel der im Folgenden beschriebenen Vorversuche war ein Abgleich der reduzierenden Wirkung der am Versuch beteiligten Zucker. Denn nur wenn diese bei Lactose, Glucose und Galactose annähernd gleich ist, kann der unter 2.5 beschriebene Nachweisversuch zur quantitativen Bestimmung der Edukte und Produkte und der unter 3.2.1 erläuterten Rechenansatz verwendet werden.

Um diese Voraussetzung zu überprüfen, haben wir mithilfe eines Fotometers die Farbinintensität verschiedener Zuckerlösungen nach der Reaktion mit 0,5 ml DNS in Abhängigkeit von der Konzentration gemessen.

3.3.1 Ermittlung des Messbereichs

Wie jedes Messgerät kann auch ein Fotometer nur in einem bestimmten Messbereich die Absorption und damit die Konzentration an reduzierenden Zuckern bestimmen. Um diesen Bereich zunächst einzugrenzen, haben wir eine große Spannbreite an unterschiedlich konzentrierten Zuckerlösungen für die erste Messung verwendet. Da uns zu diesem Zeitpunkt noch keine Galactose zur Verfügung stand, haben wir nur mit Lactose und Glucose gearbeitet. Zusätzlich haben wir Saccharose, welche kein reduzierender Zucker ist, als Vergleichs-, bzw. Nullprobe verwendet.

Konzentration in mmol/l	$A_{540\text{nm}}$		
	Lactose	Glucose	Saccharose
100	>3,5 Error	>3,5 Error	0,004
10	1,961	1,26	-0,006
1	0,176	0,08	-0,14
0,1	0,013	0,001	-0,01
0,01	-0,017	-0,05	-0,005
0,001	0,014	-0,004	-0,007

Tabelle 6: Absorption der verschiedenen Zuckerlösungen in Abhängigkeit von ihrer Konzentration (1. Ansatz)

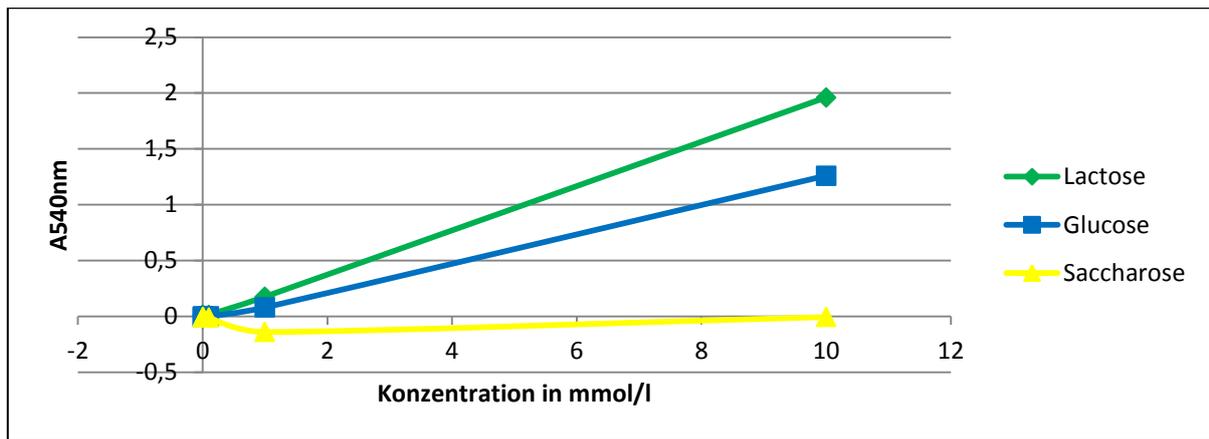


Abb. 12: Absorption der verschiedenen Zuckerlösungen in Abhängigkeit von ihrer Konzentration (1. Ansatz)

Obwohl die Saccharose kein reduzierender Zucker ist, sind die gemessenen Absorptionswerte nicht konstant bei 0, sondern schwanken zwischen -0,1 und 0,1. Daraus kann geschlossen werden, dass mit einer Messungengenauigkeit von $\pm 0,1$ gerechnet werden muss. Die Werte der Lactose und Glucose steigen linear an⁷.

3.3.2 Vergleich der reduzierenden Wirkung

Mithilfe der vorher ermittelten Ergebnisse haben wir den Messbereich für Konzentrationen von 1 mmol/l bis 10 mmol/l festgelegt.

Daraufhin haben wir für die Zucker aus unserem modifizierten Versuch (Lactose, Galactose, Glucose) Verdünnungsreihen mit entsprechenden Konzentrationen erstellt. Zu diesen wurde erneut DNS hinzugegeben und anschließend die Absorption fotometrisch bestimmt.

Konzentration in mmol/l	A _{540nm}		
	Lactose	Glucose	Galactose
1	0,155	0,113	0,111
2	0,425	0,233	0,294
3	0,639	0,355	0,432
4	0,735	0,557	0,635
5	0,882	0,61	0,742
6	1,138	0,813	0,945
7	1,57	0,96	1,135
8	1,815	1,159	1,097
9	1,698	1,304	1,335
10	1,964	1,449	1,608

Tabelle 7: Absorption der verschiedenen Zuckerlösungen in Abhängigkeit von ihrer Konzentration (2. Ansatz)

⁷ In diesem Versuchsansatz wurde nicht berücksichtigt, dass es sich bei den verwendeten Zuckern um Monohydrate handelt. Diese Abweichung haben wir erst ab 3.3.2 berücksichtigt.

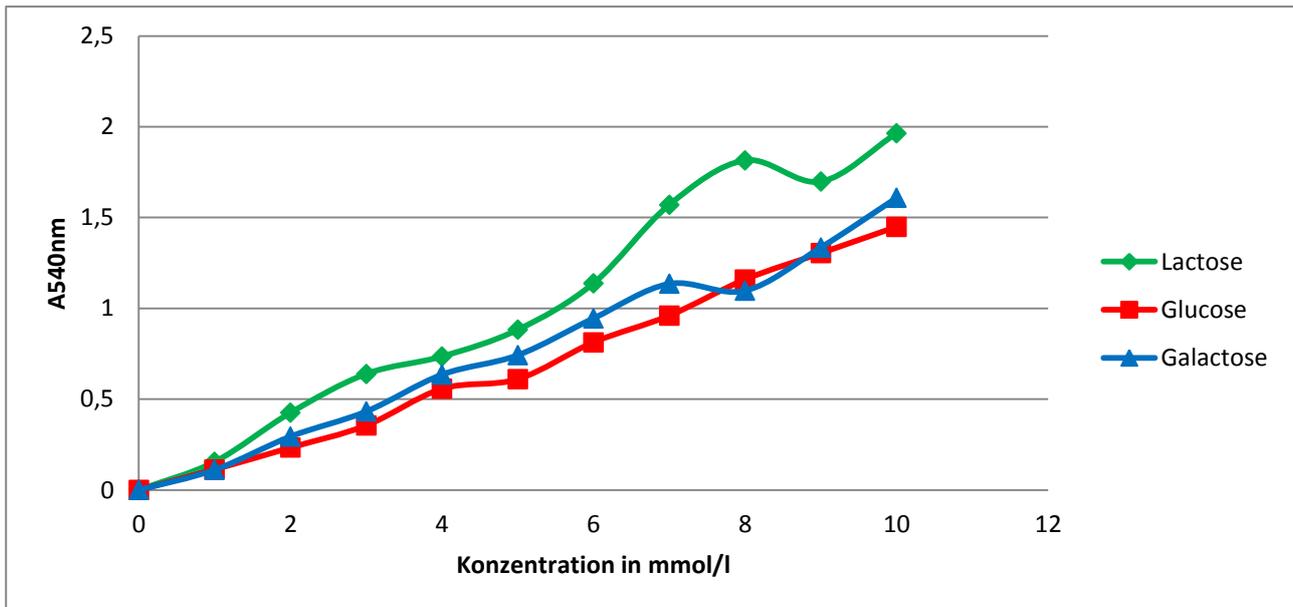


Abb. 13: Absorption der verschiedenen Zuckerlösungen in Abhängigkeit von ihrer Konzentration (2. Ansatz)

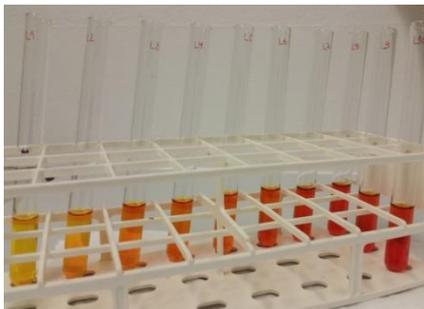


Abb. 14: Farbreaktion Lactose

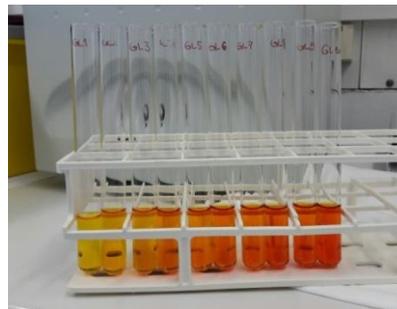


Abb. 15: Farbreaktion Glucose

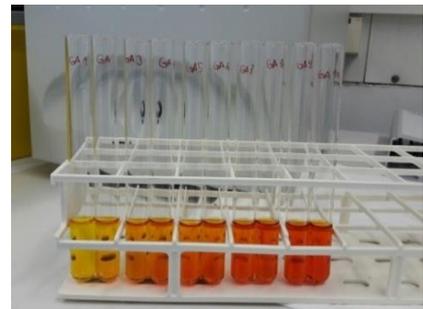


Abb. 16: Farbreaktion Galactose

Aus den Ergebnissen geht hervor, dass die reduzierende Wirkung von Glucose, Galactose und Lactose nahezu gleich ist, wobei die ermittelten Werte für die Lactose leicht über denen von Glucose und Galactose liegen.⁸

Bislang nicht in Betracht gezogen wurde das jeweils an die Zuckermoleküle angehängte Monohydrat. Da unsere verwendeten Stoffe als Monohydrat vorliegen, sollte dies bei der Stoffmengenkonzentration berücksichtigt werden. Weil Lactose ein Disaccharid ist, ist hier der Einfluss deutlich geringer als bei der Glucose.

Während bei Glucose und Galactose das Hydratwasser +10 % der molaren Masse ausmacht, sind es bei Lactose +5 %. Nach der Umrechnung ergeben sich folgende Werte.

⁸ Weitere Versuchsreihen und Bilder zu der reduzierenden Wirkung befinden sich im Anhang

Konzentration in mmol/l	A_{540nm}		
	Lactose	Glucose	Galactose
1	0,163	0,124	0,122
2	0,447	0,256	0,323
3	0,673	0,390	0,475
4	0,774	0,612	0,698
5	0,928	0,670	0,815
6	1,198	0,893	1,038
7	1,653	1,055	1,247
8	1,910	1,274	1,205
9	1,787	1,433	1,467
10	2,067	1,592	1,767

Tabelle 8: Umrechnung ohne Monohydrat

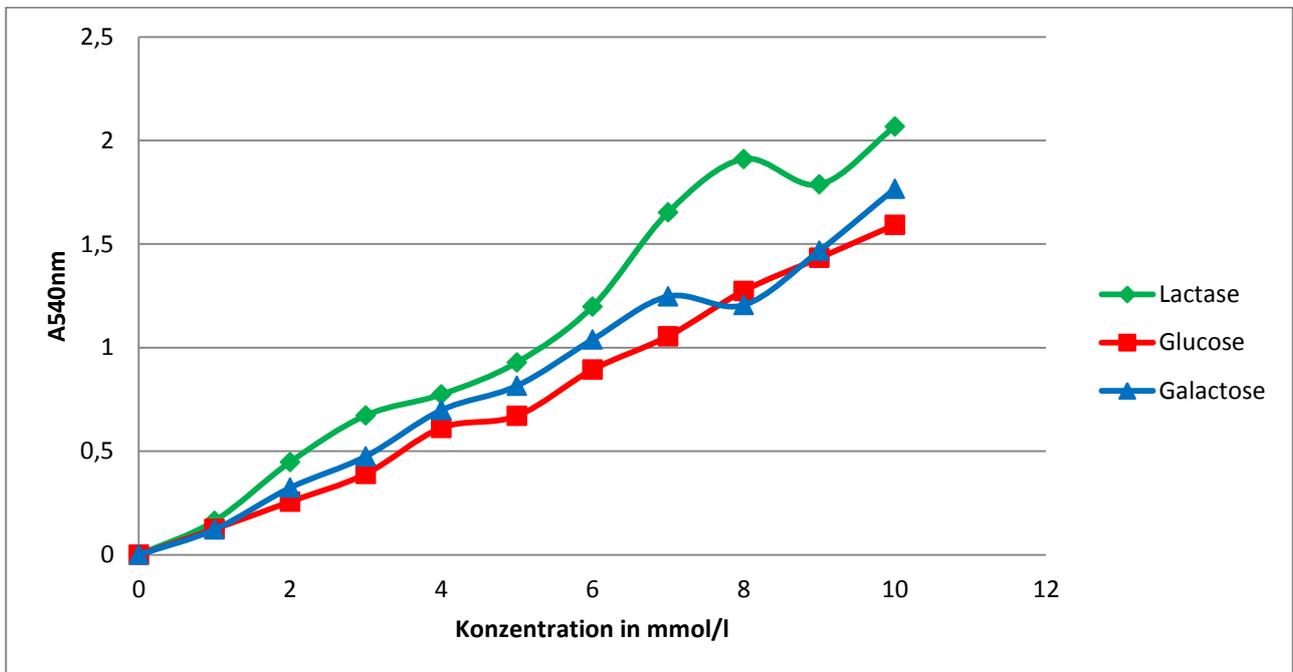


Abb. 17: Umrechnung ohne Monohydrat

3.3.3 Erstellung einer Kalibriergeraden

Neben den reinen Lactose-, Glucose- und Galactose-Lösungen haben wir auch 1:1:1 Gemische aus den drei Zuckern hergestellt, um anschließend, wie unter 3.2.1 beschrieben, die Absorption der verschieden konzentrierten Lösungen zu bestimmen. Die sich aus den Messwerten ergebende Gerade sollte als Kalibriergerade (s. 2.6.1) dienen.

Konzentration in mmol/l	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A_{540nm}	0,112	0,324	0,451	0,607	0,771	0,901	1,169	1,389	1,446	1,724

Tabelle 9: Absorption des Lactose-Glucose-Galactose-Gemischs (1:1:1) (3. Ansatz)

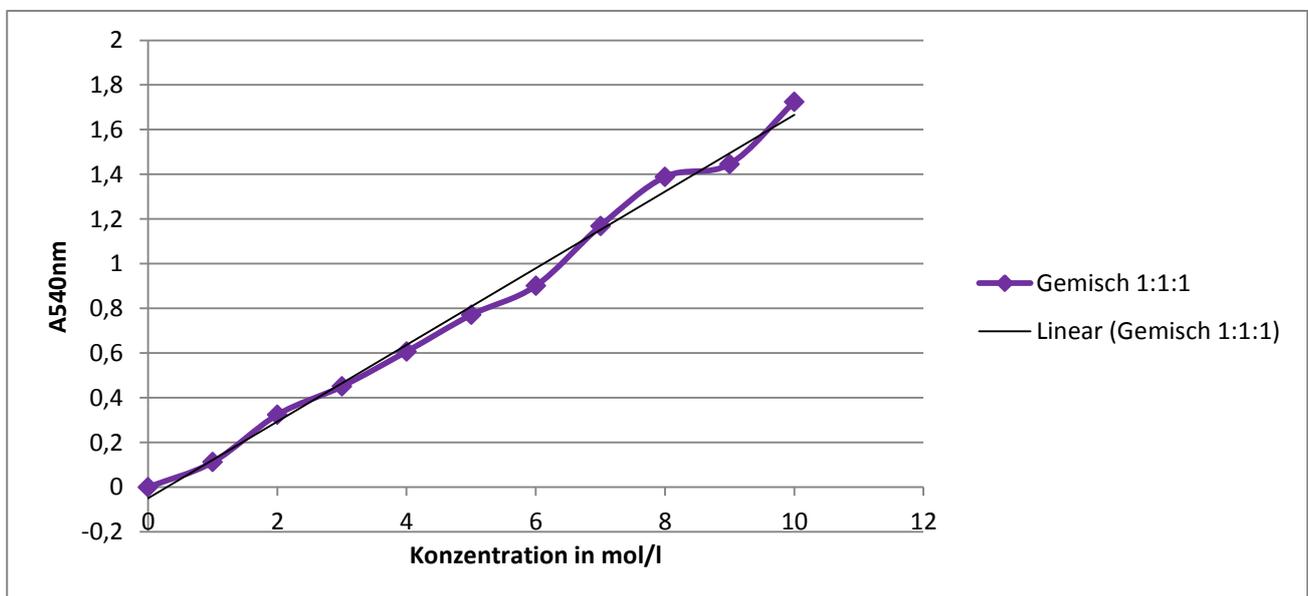


Abb. 18: Absorption des Lactose-Glucose-Galactose-Gemischs (1:1:1) (3. Ansatz)

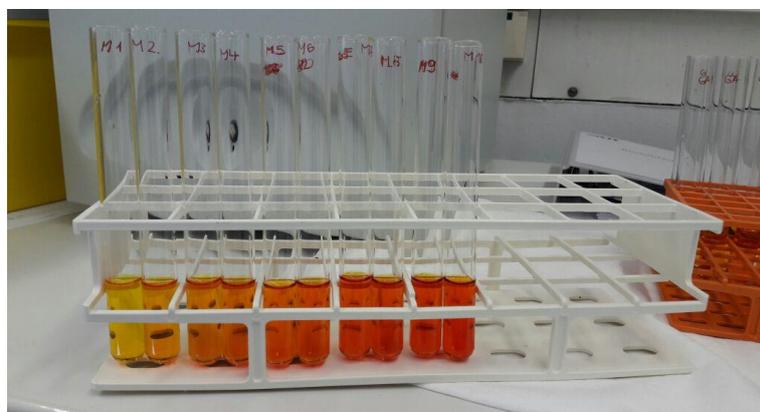


Abb. 19: Farbreaktion des Lactose-Glucose-Galactose-Gemischs (1:1:1)

3.4 Variation verschiedener Parameter

Aufgrund der Tatsache, dass bei einer Umsetzung von Lactose die doppelte Menge an reduzierenden Zuckern entsteht, sollten die gemessenen Absorptionswerte von Probenzeit zu Probenzeit zunehmen (s. 3.2.1). Bei einem ersten Testdurchlauf, in dem die Versuchsbedingungen des ursprünglichen Versuchs übernommen wurden, konnten keine derartigen Ergebnisse gemessen werden (s. 3.1).

Um dem Problem auf den Grund zu gehen haben wir verschiedene Parameter des Versuchs, wie zum Beispiel die Temperatur oder die *Lactase*, sowie die Lactose-Konzentration nacheinander variiert.

3.4.1 Alginateinhüllung

Die Immobilisierung ermöglicht es, eine Probe ohne die in den Alginkügelchen eingeschlossenen Enzyme zu nehmen, so dass die Reaktion gezielt abgebrochen werden kann (s. 2.2). Voraussetzung für die Funktionsfähigkeit der so eingehüllten Enzyme ist, dass Substrat und Produkte der Reaktion die Alginatehülle passieren können. Ist dies nicht der Fall ist, kann kein Substrat von der *Lactase* umgesetzt werden.

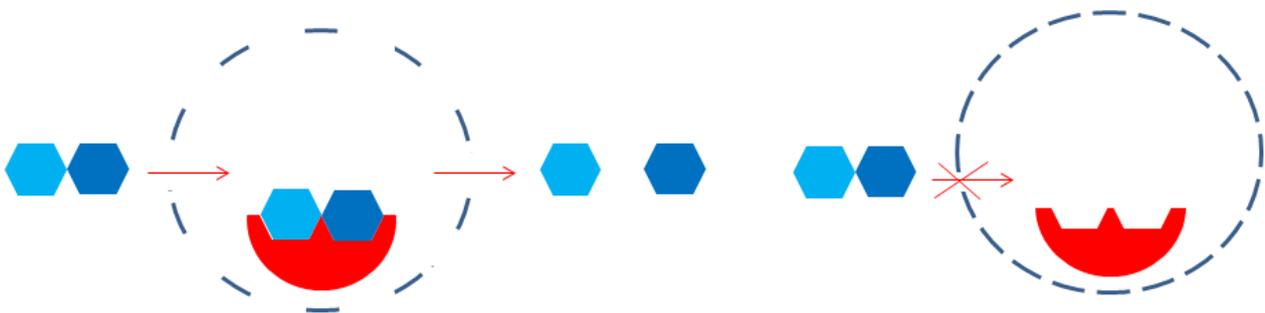


Abb. 20: Funktionsweise Alginateinhüllung

Um dies auszuschließen, haben wir in dem folgenden Versuchsansatz keine Alginateinhüllung, sondern die *Lactase* in freier Form verwendet.

Durch Erhitzen im Wasserbad bei 100 °C wurde das Enzym nach Ende der jeweiligen Probenzeit denaturiert, um eine weitere Umsetzung der Lactose zu verhindern.

In diesem Versuchsansatz haben wir den Versuch mit *Lactase* bei 25 °C und pH 6 durchgeführt, aber auf eine Immobilisierung verzichtet. Die Durchführung erfolgte mit zwei verschiedenen *Lactase*-Konzentrationen. Statt wie im Ausgangsversuch 1 g Alginkügelchen zu der Lactose hinzuzugeben, haben wir nun 1 ml der jeweiligen *Lactase*-Lösung (s. 2.1)

pro Versuchsansatz verwendet. Ebenso haben wir zwei verschiedene Lactose-Konzentrationen eingesetzt und kamen dadurch insgesamt auf vier Versuchsansätze.

	1 Kapsel <i>Lactase</i> 4500 Fcc in 100 ml destilliertem Wasser	1 Kapsel <i>Lactase</i> 4500 Fcc in 200 ml destilliertem Wasser
1 mmol/l Lactose-Lösung	Versuchsansatz A ₁	Versuchsansatz C ₁
10 mmol/l Lactose-Lösung	Versuchsansatz B ₁	Versuchsansatz D ₁

Tabelle 10: Versuchsansätze ohne Alginateinhüllung $\vartheta = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 6

Zeit t in min	A _{540nm} von A ₁	A _{540nm} von B ₁	A _{540nm} von C ₁	A _{540nm} von D ₁
0	0,194	1,824	0,200	1,818
5	0,194	1,790	0,188	1,949
10	0,202	1,867	0,203	1,940
15	0,196	1,822	0,207	1,789
20	0,223	1,824	0,220	1,906
25	0,218	2,068	0,222	1,785
30	0,214	1,707	0,232	1,844

Tabelle 11: Absorption Versuchsansätze ohne Alginateinhüllung $\vartheta = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 6

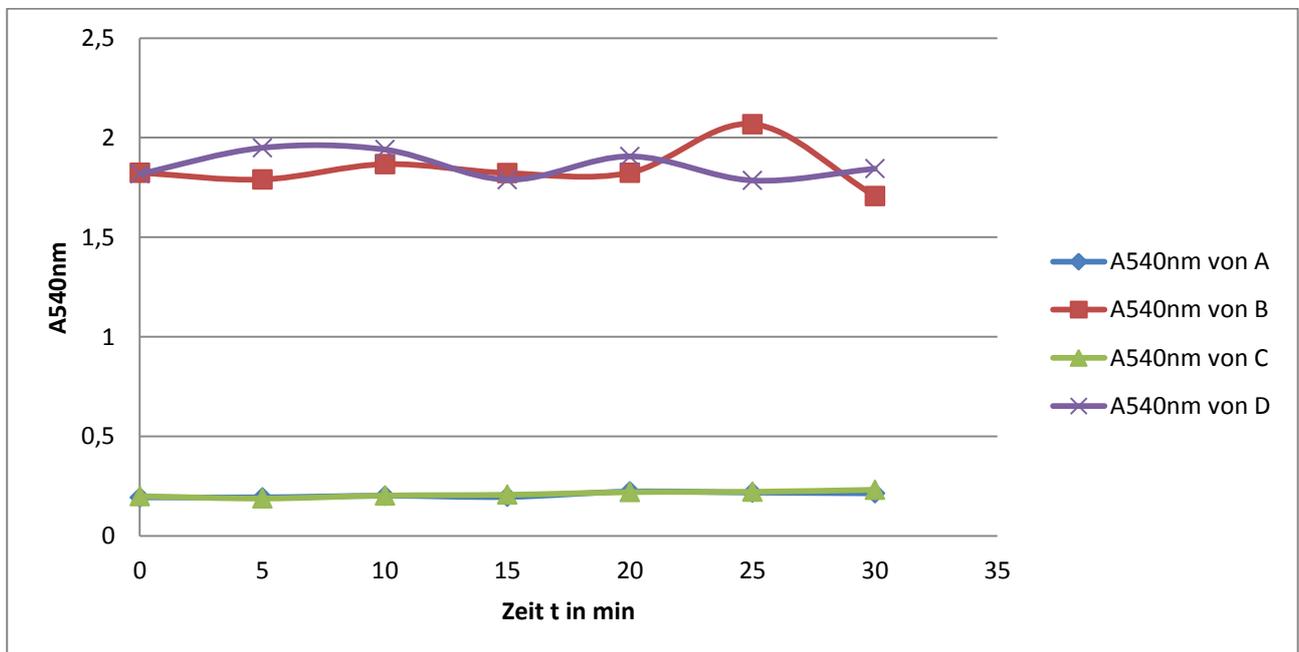


Abb. 21: Absorption Versuchsansätze ohne Alginateinhüllung $\vartheta = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 6

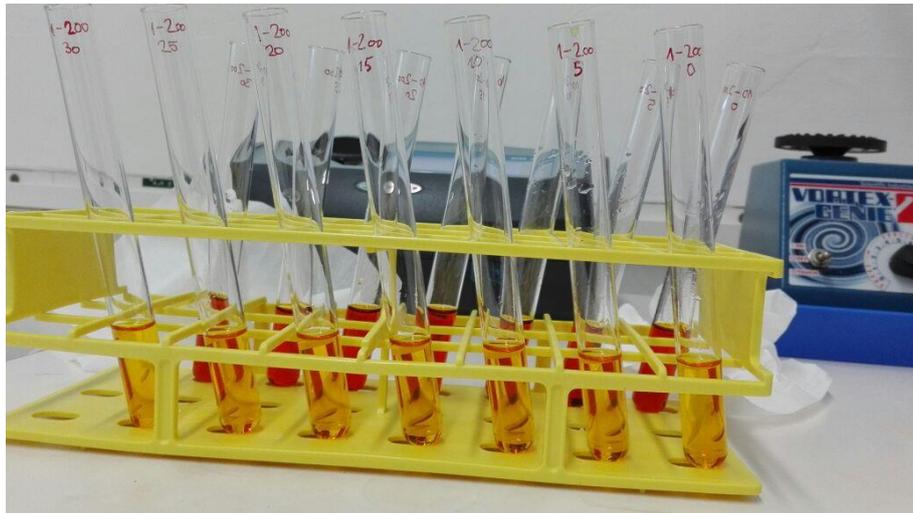


Abb. 22: Farbreaktion Versuchsansatz C₁ (vorne) und D₁ (hinten)

Trotz verschieden langer Probenzeiten waren auch dieses Mal die gemessenen Werte konstant. Die Absorptionwerte aus Versuchsansatz A und C sind sehr niedrig und liegen nahe an der unteren Grenze des messbaren Bereichs des Fotometers. Da dort die Ergebnisse oft ungenau sind, verwenden wir im Folgenden keine Lactoselösung der Konzentration $c = 1 \text{ mmol/l}$ mehr.⁹

3.4.2 Konzentration der *Lactase*

Da wir mit dem ersten Versuchsansatz ohne Alginateinhüllung erneut konstante Messwerte erzielt haben, haben wir nun in einem zweiten Ansatz wieder eine Alginateinhüllung verwendet, jedoch zwei verschiedene Lösungen mit den beiden unterschiedlichen *Lactase*-Konzentrationen (Versuchsansatz B und D) zu dem Alginat hinzugegeben.

Zeit t in min	A _{540nm} von B ₂	A _{540nm} von D ₂
0	1,781	1,793
5	1,726	1,747
10	1,761	1,769
15	1,726	1,638
20	1,751	1,763
25	1,708	1,973
30	1,867	1,798

Tabelle 12: Absorption Versuchsansätze mit unterschiedlichen *Lactase*-Konzentrationen $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 6

⁹ Weitere Bilder zu den Versuchen ohne Alginateinhüllung befinden sich im Anhang

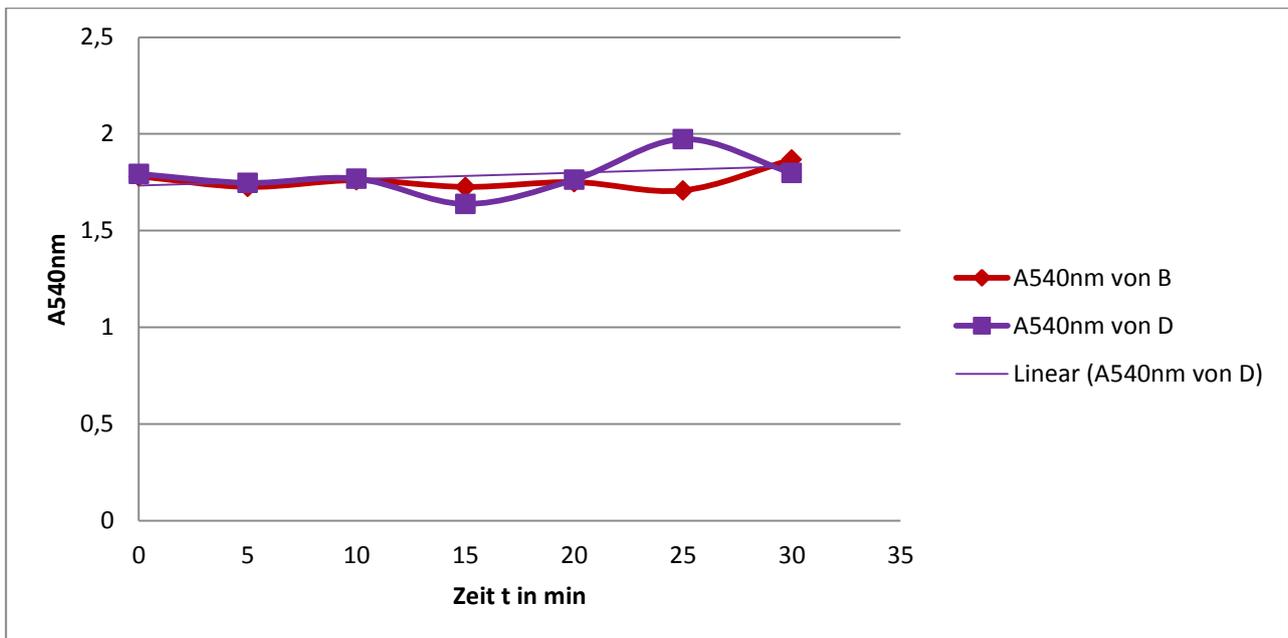


Abb. 23: Absorption Versuchsansätze mit unterschiedlichen *Lactase*-Konzentrationen $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 6$

Auch bei diesem Ansatz haben wir erneut konstante Absorptionswerte gemessen. Um sicher zu stellen, dass nicht schon bei der ersten Probenahme bei $t = 0 \text{ min}$ die komplette *Lactose* umgesetzt ist und daher die Werte konstant bleiben, haben wir ab diesem Versuchsansatz immer eine Probe genommen, unmittelbar bevor die *Lactase* zu der Zuckerlösung hinzugegeben wurde.

Eine weitere Variation der Konzentration der *Lactase* mittels einer höher konzentrierten *Lactase*-Kapsel wird unter 3.4.3 beschrieben.

3.4.3 Alginatekügelchen aus der Suspension

Bei allen bisher durchgeführten Versuchen ist uns aufgefallen, dass sich im Anschluss an das Lösen der *Lactase*-Kapsel ein weißer Bodensatz gebildet hat. Diesen haben wir nie mit zu dem Alginate pipettiert. Die Vermutung liegt nahe, dass sich die *Lactase* in diesem Rückstand befinden könnte. Wenn dieser nicht mitpipettiert wird, kann die *Lactase* folglich nicht in den Alginatekügelchen enthalten sein. Somit kann sie auch nicht zur *Lactose* gelangen und diese spalten. Das würde die konstanten Messwerte erklären.

Daher haben wir im Folgenden den Kolben vor der Entnahme der *Lactase*-Lösung geschüttelt, wodurch die *Lactase* gleichmäßiger verteilt wurde.

In der Literatur finden sich verschiedene Angaben zum Temperaturoptimum; funktionsfähig ist die *Lactase* zwischen $15 \text{ }^\circ\text{C}$ bis $70 \text{ }^\circ\text{C}$. Um zu zeigen, dass die Funktionsunfähigkeit nicht an der zuvor gewählten Temperatur liegt, haben wir das Wasserbad in diesem Ver-

suchsansatz auf 45 °C¹⁰ statt 25 °C temperiert. Des Weiteren haben wir den Versuch wieder mit verschiedenen Konzentrationen der *Lactase*-Lösung sowie unterschiedlich dosierten *Lactase*-Kapseln durchgeführt.

	1 Kapsel <i>Lactase</i> in 100 ml destilliertem Wasser	1 Kapsel <i>Lactase</i> in 200 ml destilliertem Wasser
<i>Lactase</i> 4500 Fcc	Versuchsansatz A ₃	---
<i>Lactase</i> 18000 Fcc	Versuchsansatz B ₃	Versuchsansatz C ₃

Tabelle 13: Versuchsansätze Alginatkügelchen aus der Suspension $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 6

Zeit t in min	A _{540nm} von A ₃	A _{540nm} von B ₃	A _{540nm} von C ₃
Ohne <i>Lactase</i>	1,731	1,647	1,753
0	1,743	1,734	1,729
5	1,548	1,645	1,571
10	1,752	1,642	1,693
15	1,684	1,771	1,680
20	1,908	1,687	1,694
25	1,768	1,758	1,704
30	1,746	1,708	1,731
35	---	1,805	---

- Ungenau, da Probenzeiten nicht genau beachtet wurden

Tabelle 14: Absorption Versuchsansätze mit Alginatkügelchen aus der Suspension $\vartheta = 45 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 6

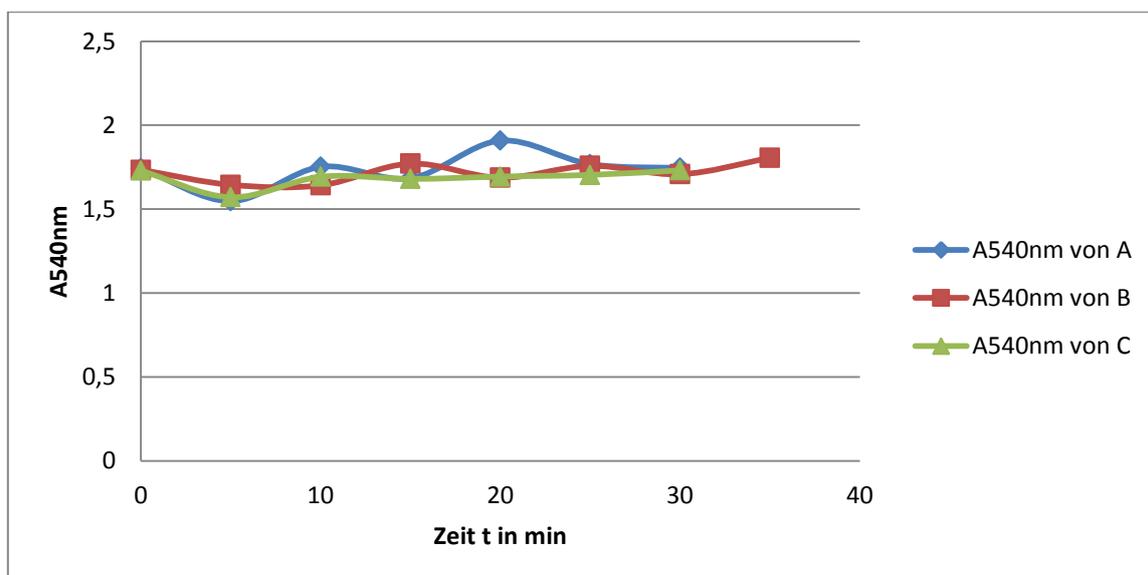


Abb. 24: Absorption Versuchsansätze mit Alginatkügelchen aus Suspension der *Lactase*-Lösung $\vartheta = 45 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 6

¹⁰ Asa-Enzyme: http://www.asa-enzyme.de/files/fertig/Produkte/Enzyme/Techn.%20Enzyme/erl/LactaseL_2050_de.pdf

Auch bei diesem Versuchsansatz haben wir wieder konstante Werte erhalten.¹¹

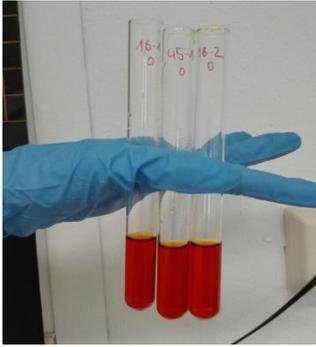


Abb. 25: Probenzeit $t = 0 \text{ min}$



Abb. 26: Probenzeit $t = 30 \text{ min}$

3.4.4 pH-Wert

Als nächsten Versuchsansatz haben wir die pH-Werte der Lösungen, in denen die *Lactase* die Lactose spalten soll, variiert. In allen bisherigen Versuchsansätzen haben wir pH 6 verwendet, nun führen wir den Versuch zusätzlich mit pH 4 durch. Diese Variation wurde aufgrund unterschiedlicher Angaben in der Literatur¹² durchgeführt, um auszuschließen, dass der vorher eventuell falsch gewählte pH-Wert ausschlaggebend für die konstanten Ergebnisse war. Auch bei diesem Ansatz benutzen wir wieder zwei verschieden dosierte *Lactase*-Kapseln.

	1 Kapsel <i>Lactase</i> 4500 Fcc in 100 ml destilliertem Wasser	1 Kapsel <i>Lactase</i> 18000 Fcc in 100 ml destilliertem Wasser
pH 4	Versuchsansatz A ₄	Versuchsansatz C ₄
pH 6	Versuchsansatz B ₄	Versuchsansatz D ₄

Tabelle 15: Versuchsansätze mit unterschiedlichen pH-Werten $\vartheta = 45 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 4 und 6

Zeit t in min	A _{540nm} von A ₄	A _{540nm} von B ₄	A _{540nm} von C ₄	A _{540nm} von D ₄
Ohne <i>Lactase</i>	1,953	2,161	1,735	1,960
0	1,817	2,046	1,666	1,951
5	1,706	2,005	1,773	1,942
10	1,824	1,997	1,822	1,886
15	1,816	1,839	1,826	1,838
20	1,896	1,961	1,769	1,645
25	2,007	1,987	1,848	2,024
30	1,862	2,043	1,924	2,186

Tabelle 16: Absorption Versuchsansätze mit unterschiedlichen pH-Werten $\vartheta = 45 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 4 und 6

¹¹ Weitere Bilder zur Alginatekugelchen aus der Suspension befinden sich im Anhang

¹² *Lactase* des Schimmelpilzes *Aspergillus oryzae*, pH-Optimum: 4-8

<https://www.fishersci.com/shop/products/mp-biomedicals-lactase-i-aspergillus-oryzae-i-5/p-4605366>

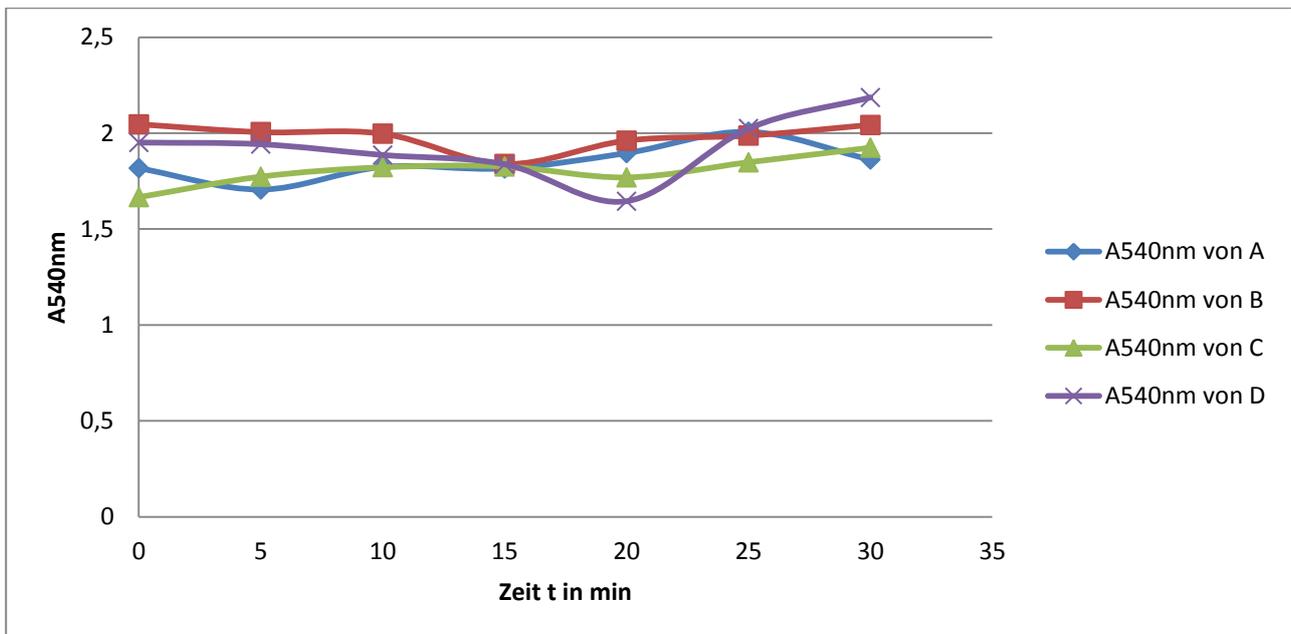


Abb. 27: Absorption Versuchsansätze mit unterschiedlichen pH-Werten $\vartheta = 45^\circ\text{C}$, pH 4 und 6

Auch bei diesen Versuchsansätzen haben wir annähernd konstante Ergebnisse erhalten.

3.4.5 Reine *Lactase*

Die *Lactase*-Kapseln bestehen nicht nur aus reiner *Lactase*, sondern enthalten noch einige Zusatzstoffe wie zum Beispiel Calciumhydrogenphosphat (Dihydrat) und Cellulose.



Abb. 28: Inhaltsangabe „Laluk® 4500“-Kapseln



Abb. 29: Inhaltsangabe „Lactrase® 18000“-Kapseln

Die Auswirkung dieser Stoffe auf die Enzymaktivität ist uns bisher nicht bekannt, wobei wir davon ausgegangen sind, dass diese die Enzymwirkung nicht beeinflussen. Um jedoch einen negativen Einfluss, das bedeutet eine Hemmung der *Lactase* auszuschließen, haben wir den Versuch mit reiner *Lactase* durchgeführt.

Dazu haben wir wieder zwei verschiedene Konzentrationen der *Lactase*-Lösung getestet. Beide Male haben wir 0,009 g *Lactase* eingesetzt und sie in 100 ml destilliertem Wasser gelöst. Diese Menge an *Lactase* hat laut Hersteller die gleiche Umsatzgeschwindigkeit wie die *Dextranucrase*-Menge im Ausgangsversuch (4 U/ml). Bei einem zweiten Versuchsansatz haben wir die gleiche Menge an *Lactase* statt in 100 ml in 10 ml destilliertem Wasser gelöst.

Beide Konzentrationen wurden bei pH 4 und pH 6 untersucht.

	0,009 g <i>Lactase</i> gelöst in 100 ml destilliertem Wasser	0,009 g <i>Lactase</i> gelöst in 10 ml destilliertem Wasser
pH 4	Versuchsansatz A ₅	Versuchsansatz C ₅
pH 6	Versuchsansatz B ₅	Versuchsansatz D ₅

Tabelle 17: Versuchsansätze mit reiner *Lactase* $\vartheta = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 4 und 6

Zeit t in min	A _{540nm} von A ₅	A _{540nm} von B ₅	A _{540nm} von C ₅	A _{540nm} von D ₅
Ohne <i>Lactase</i>	1,538	1,632	1,566	2,062
0	1,749	1,771	1,597	1,681
5	1,807	1,866	1,518	1,511
10	1,673	1,618	1,649	1,526
15	1,590	1,586	1,623	1,469
20	1,349	1,949	1,778	1,245
25	1,857	1,817	1,959	1,517
30	1,823	1,664	1,758	1,166

Tabelle 18: Absorption Versuchsansätze mit reiner *Lactase* $\vartheta = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 4 und 6

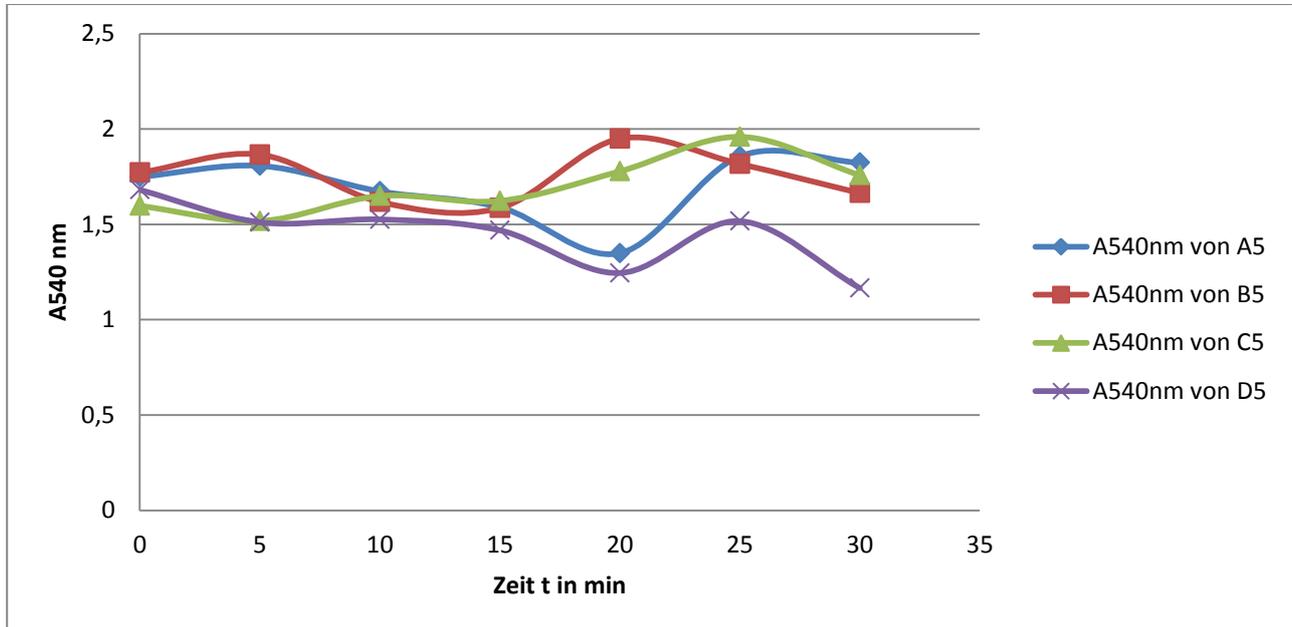


Abb. 30: Absorption Versuchsansätze mit reiner *Lactase* $\vartheta = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 4 und 6

Obwohl die Werte in diesem Ansatz deutlich stärker schwanken, ist auch dieses Mal keine deutliche Tendenz festzustellen. Daher entschlossen wir uns, den Versuch erneut durchzuführen.

Zusätzlich zu den zwei getesteten *Lactase*-Konzentrationen haben wir dieses Mal auch noch eine weitaus höher konzentrierte *Lactase*-Lösung mit 0,1 g *Lactase* pro 10 ml verwendet.

	0,009 g <i>Lactase</i> gelöst in 100 ml destilliertem Wasser	0,009 g <i>Lactase</i> gelöst in 10 ml destilliertem Wasser	0,1 g <i>Lactase</i> gelöst in 10 ml destilliertem Wasser
pH 4	Versuchsansatz C ₆	Versuchsansatz A ₆	Versuchsansatz E ₆
pH 6	Versuchsansatz D ₆	Versuchsansatz B ₆	Versuchsansatz F ₆

Tabelle 19: Versuchsansätze mit reiner *Lactase* $\vartheta = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 4 und 6

Zeit t in min	A _{540nm} von C ₆	A _{540nm} von D ₆	A _{540nm} von A ₆	A _{540nm} von B ₆	A _{540nm} von E ₆	A _{540nm} von F ₆
Ohne <i>Lactase</i>	1,259	1,477	1,399	1,427	1,991	1,755
0	1,297	1,401	1,271	1,330	1,744	1,815
5	1,291	1,489	1,303	1,347	1,776	1,762
10	0,348	1,462	1,338	1,125	1,928	1,842
15	1,824	1,906	1,992	1,797	1,888	1,367
20	1,856	,945	1,826	1,782	1,897	1,185
25	1,881	1,666	2,107	1,858	2,043	1,903
30	1,165	1,766	1,937	1,758	1,622	1,914

- Zu wenig DNS hinzugegeben

Tabelle 20: Versuchsansätze mit reiner *Lactase* $\vartheta = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 4 und 6

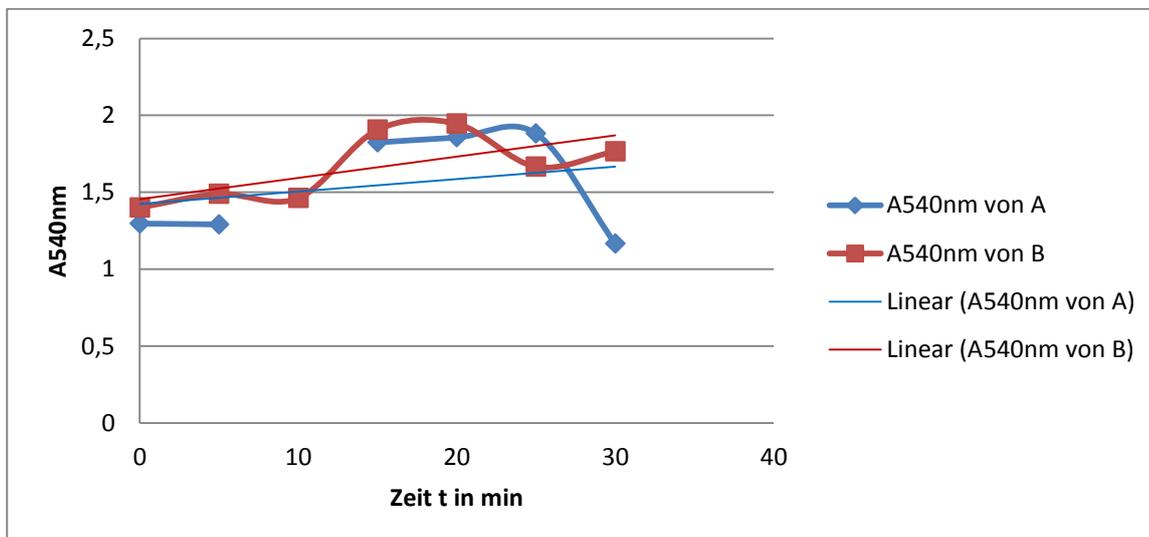


Abb. 31: Absorption Versuchsansätze A₆ und B₆ $\vartheta = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 4 und 6

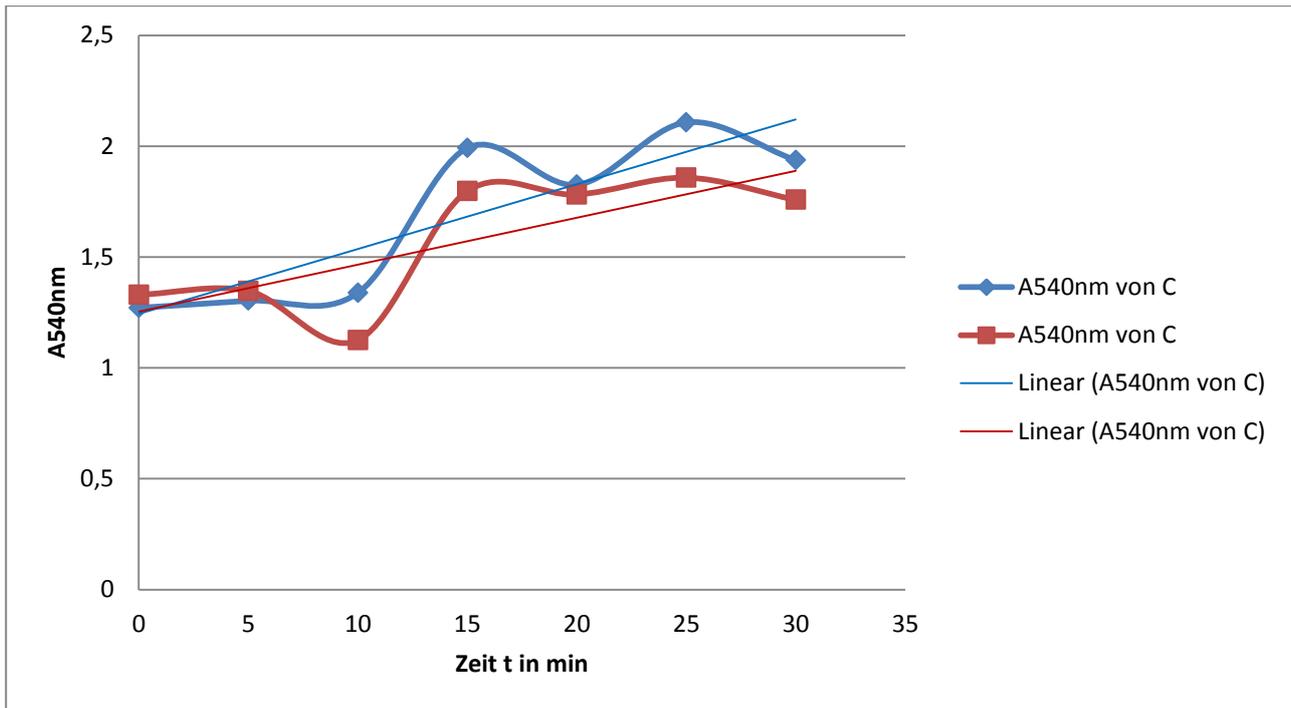


Abb. 32: Absorption Versuchsansätze C_6 und D_6 $\vartheta = 30$ °C, pH 4 und 6

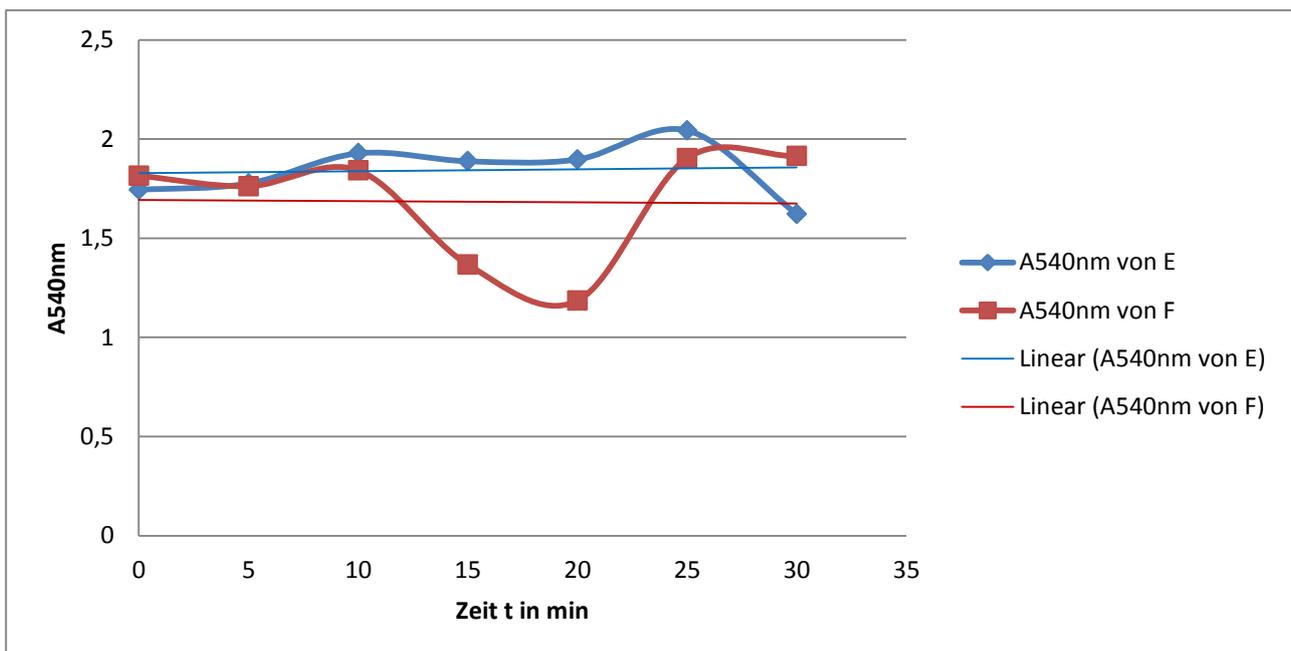


Abb. 33: Absorption Versuchsansätze E_6 und F_6 $\vartheta = 30$ °C, pH 4 und 6

Die Absorptionswerte bei allen Versuchsansätzen bis auf Ansatz F_6 steigen an. Dabei ist auffällig, dass besonders stark die Werte bei einem pH-Wert von 4 ansteigen (Ausnahme: Ansatz A_6/B_6). Im Gegensatz zu Versuchsansatz $A_6 - D_6$ haben wir bei den Versuchsansätzen E_6 und F_6 mit der höher konzentrierten *Lactase* auch höhere Absorptionswerte gemessen.

Zusätzlich haben wir nun auch einige der Versuchsansätze bei der Probenzeit $t = 30 \text{ min}$ mit einem handelsüblichen Glucoseteststreifen getestet.

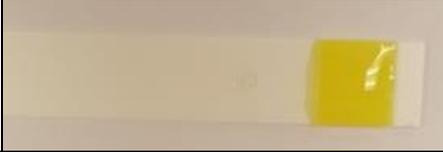
Ansatz	Versuchsbedingungen	Beobachtung	Glucosekonzentration in mg/l
D ₆	$\vartheta = 30 \text{ °C}$, pH 6 0,009 g <i>Lactase</i> in 100 ml		0
E ₆	$\vartheta = 30 \text{ °C}$, pH 4 0,1 g <i>Lactase</i> in 10 ml		100
F ₆	$\vartheta = 30 \text{ °C}$, pH 6 0,1 g <i>Lactase</i> in 10 ml		250

Abb. 34: Glucosetest zu der Probenzeit $t = 30 \text{ min}$ der Versuchsansätze D₆, F₆, E₆ $\vartheta = 30 \text{ °C}$

Bei Versuchsansatz D₆ deutet die gelbe Farbe auf ein negatives Testergebnis hin, es wurde keine Glucose nachgewiesen. In den Proben F₆ und E₆ mit jeweils höherer *Lactase*-Konzentration verfärbte sich der GOD-Test grün, wobei der Farbumschlag bei pH 4 intensiver ausfällt. Der Test zeigt, dass Glucose vorhanden ist und somit eine Umsetzung stattgefunden hat.

4 Diskussion

4.1 Deutung

4.1.1 Deutung der Vorversuche

4.1.1.1 Ermittlung des Messbereichs

Beim ersten Ansatz (s. 3.3.1) wurden Lösungen mit den Zuckern Lactose, Glucose und Saccharose in verschiedenen Konzentrationen mit Hilfe von DNS fotometrisch nachgewiesen. Die Extinktionswerte von Saccharose liegen alle annähernd bei null, was darauf zurückzuführen ist, dass der Zucker nicht reduzierend ist. Aufgrund dessen kann auch die Nachweisreaktion nicht ablaufen, sodass sich die Probe mit DNS beim Erhitzen nicht verfärbt.

Weil Glucose und Lactose im Gegensatz zur Saccharose beides reduzierende Zucker sind, ist bei beiden eine Veränderung der Extinktion zu erkennen. Je höher die Konzentration ist,

desto intensiver verfärben sich die Proben. Bei einer Konzentration von 0,001 mmol/l bis 0,1 mmol/l kann bei beiden Zuckern kein aussagekräftiger Wert gemessen werden, was darauf hindeutet, dass die Konzentration von Lactose bzw. Glucose zu gering ist, um nachgewiesen zu werden. Neben zu geringen Konzentrationen können mit dem Fotometer, das nur einen bestimmten Messbereich hat, auch keine zu hohen Konzentrationen nachgewiesen werden, was bei den Lösungen der Konzentration $c = 100$ mmol/l mit Extinktionswerten von über 3,5 der Fall ist. Ausschließlich die bei 1 mmol/l und 10 mmol/l gewonnenen Messwerten können ausgewertet werden. Mit zwei Messwerten kann jedoch noch keine Aussage über das Verhältnis von Zuckerkonzentration zu Extinktionswert gemacht werden, weshalb weitere Versuche mit Konzentrationen zwischen 1 mmol/l und 10 mmol/l nötig sind.

4.1.1.2 Vergleich der reduzierenden Wirkung

Beim zweiten Ansatz wird die Extinktion von Lactose- und Glucoselösungen mit den Konzentrationen 1 mmol/l bis 10 mmol/l gemessen, jeweils in Schritten von 1 mmol/l. Dabei liegen alle Werte im messbaren Bereich. Zu erkennen ist, dass die gemessenen Werte wie erwartet annähernd auf einer Gerade liegen; die Extinktion steigt proportional zur Konzentration des Zuckers an (s. Lambert-Beersches-Gesetz 2.6).

Dem Ansatz zur Mengenrechnung (s. 3.2.1) wurde zugrunde gelegt, dass alle Zucker die gleiche reduzierende Wirkung haben. Wie in dem Diagramm zu erkennen ist, lag die reduzierende Wirkung der Lactose im Experiment jedoch leicht höher als die der Glucose. Um den Nachweis mit DNS dennoch beibehalten zu können, werden diese Unterschiede zunächst vernachlässigt.

4.1.1.3 Erstellung einer Kalibriergeraden

Die Messwerte der Lösungen, in denen die drei Zucker im Verhältnis 1:1:1 gemischt wurden, bilden eine Gerade, die zwischen denen der einzeln gemessenen Zuckern und dabei näher an der der Glucose und Galactose liegt, da diese zwei Drittel des Gemischs ausmachen. Somit wurde überprüft, dass auch bei einer gemischten Lösung, wie sie im Versuch auftritt, die Absorptionswerte erwartungsgemäß im gleichen Bereich wie die der einzelnen Zucker liegen.

Für die weiteren Versuche kann diese Gerade demnach als Anhaltspunkt zur Bestimmung der Konzentration der Edukte und Produkte verwendet werden.

4.1.2 Deutung der modifizierten Versuche

Die an den ursprünglichen Versuchsaufbau angelehnten Versuche mit Lactose und *Lactase* lieferten alle unabhängig von den jeweils gewählten Versuchsbedingungen konstante Ergebnisse. Trotz zugesetzter Enzyme blieb die Absorption in allen Versuchsansätzen weitgehend unverändert zum Ausgangswert.

Mittels aufeinander aufbauender Variationen wurde nach einer Erklärung für die gleichbleibenden Messwerte gesucht.

Der erste Versuch, in dem keine Alginateinhüllung eingesetzt wurde, zeigt, dass die Absorptionswerte der Lactoselösung mit $c = 10 \text{ mmol/l}$ im messbaren Bereich liegen, jedoch unabhängig von der *Lactase*-Konzentration im jeweiligen Ansatz für alle Probenzeiten konstant sind. Folglich hat entweder eine vollständige oder keine Umsetzung der Lactose stattgefunden. Im ersten Fall würde dies bedeuten, dass das Erhitzen nicht zur Denaturierung und dem damit verbundenen Reaktionsabbruch geführt hat, sondern die Reaktion in den Proben weiter abgelaufen ist.

Da bei der Durchführung mit Alginateinhüllung kein Unterschied zu den vorher gemessenen Werten festzustellen war, kann die fehlende Immobilisierung nicht der Grund für die konstanten Ergebnisse sein. Um zu beurteilen, ob eine vollständige oder keine Umsetzung vorliegt, wurde eine zu hohe oder zu niedrige *Lactase*-Konzentration in Betracht gezogen. Gegen die Annahme, dass zu viel *Lactase* vorhanden ist und die Lactose sofort vollständig umgesetzt wird, spricht die Angabe in der Packungsbeilage der *Lactase*-Präparate, laut der eine Kapsel 10 bis 20 g Lactose spalten kann. Im Versuch wurde eine Kapsel in 100 bzw. 200 ml Wasser gelöst, wovon jeweils 1 ml in eine Lactoselösung gegeben wurde, sodass etwa ein Hundertstel bzw. Zweihundertstel des angenommenen Umsatzes einer ganzen Kapsel möglich wäre. Dies entspricht einer umgesetzten Zuckermenge von 0,1 g. Dennoch ist es unwahrscheinlich, dass 1 ml der 100 ml-*Lactase*-Lösung innerhalb weniger Sekunden die gesamte enthaltene Lactosemenge von 0,086 g spaltet. Endgültig ausgeschlossen wurde die Möglichkeit einer vollständigen Umsetzung durch das Messen einer Probe, die vor der *Lactase*-Zugabe aus der Lactose-Lösung entnommen wurde. In dieser konnte ohne Enzym folglich kein Substrat umgesetzt werden, dennoch lieferte die Messung den gleichen Wert wie für die Proben aus den Lösungen mit *Lactase*. Es muss also von einer zu niedrigen *Lactase*-Konzentration, die eine messbare Umsetzung nicht ermöglicht, ausgegangen werden. Die zunächst angestellte Vermutung, dass die *Lactase* im Bodensatz der *Lactase*-Lösung gebunden ist und daher nicht zur Reaktion in den Alginatkügelchen eingeschlossen war, wurde falsifiziert. Denn auch im Versuch, in dem die Sus-

pension für die Herstellung der Alginatkügelchen pipettiert wurde, kamen die gleichen Werte heraus. Somit sind die konstanten Ergebnisse weder auf einen Überschuss noch auf die Abwesenheit von *Lactase* zurückzuführen. Stattdessen wäre eine mögliche Erklärung, dass sie aus einer Funktionsunfähigkeit der *Lactase*-Kapsel resultieren.

Die Durchführung mit einem zweiten *Lactase*-Präparat zeigt, dass die Ergebnisse nicht vom spezifischen eingesetzten Präparat abhängig sind.

Daraus haben wir geschlossen, dass die *Lactase* unter den gegebenen Bedingungen nicht arbeiten kann. Die Versuche, in denen einzeln der pH-Wert von 4 zu 6 und die Temperatur von 25 °C zu 45 °C variiert wurden, erbrachten allerdings ebenfalls keine abweichenden Ergebnisse, d. h. auch unter veränderten Reaktionsbedingungen war keine Umsetzung festzustellen. Die konstanten Werte können nicht durch Fehlerhaftigkeit dieser Reaktionsbedingungen begründet werden, da diese nahe den für pH-Wert und Temperatur recherchierten Optimalwerten, pH 4 oder 6 und $\vartheta = 25\text{ °C}$ oder 45 °C ¹³, gewählt waren und daher die Reaktion nicht verhindern.

Nachdem sich die Ergebnisse nicht durch die verschiedenen Versuche mit variierenden Parametern erklären ließen, haben wir die Ursache dafür, dass die *Lactase* kein Substrat umgesetzt hat, in den Kapseln selbst angenommen. Im Körper kann die *Lactase*, nachdem sie oral eingenommen wurde und die Kapsel sich im Magen aufgelöst hat, im Dünndarm Lactose spalten. Wir vermuten, dass die Präparate in ihrer Zusammensetzung speziell auf diese physiologischen Bedingungen ausgelegt sind und daher unter den gewählten Laborbedingungen nicht funktionsfähig sind. Der Einfluss der einzelnen Zusatzstoffe auf die Wirkung des Präparats ist nicht eindeutig zu identifizieren. Deshalb wurde der Versuch mit reiner *Lactase* durchgeführt, sodass eine Hemmung der Reaktion durch unbekannte, sich auf die Enzymaktivität auswirkende Faktoren im Präparat ausgeschlossen war.

Die hierbei erzielten Messwerte entsprachen tatsächlich nicht den zuvor aufgetretenen konstanten Werten, waren jedoch nicht eindeutig erklärbar.

Bei allen Ansätzen bis auf Ansatz F₆ zeichnete sich ein Anstieg der Extinktion mit zunehmender Reaktionsdauer ab. Dieser war bei den Ansätzen mit pH 4 am deutlichsten. Daraus lässt sich schließen, dass eine Umsetzung stattgefunden hat, was durch den GOD-Test in den höher konzentrierten Ansätzen bestätigt wurde. Während bei der *Lactase*-Konzentration $\beta = 0,009\text{ g/l}$ keine Färbung, somit keine Umsetzung, festgestellt wurde, war

¹³ <https://de.wikipedia.org/wiki/Lactase>
<https://enzymeeducationinstitute.com/enzyme/lactase/>
http://www.asa-enzyme.de/files/fertig/Produkte/Enzyme/Techn.%20Enzyme/erl/LactaseL_2050_de.pdf

die Grünfärbung bei der höheren Konzentration $\beta = 0,1$ g/l im Ansatz mit pH 4 im Vergleich zu dem mit pH 6 intensiver und der Messwert mit 250 mg/l gegenüber 100 mg/l höher. Dies weist darauf hin, dass bei pH 4 und steigender *Lactase*-Konzentration mehr Lactose umgesetzt wird. Diese These wird jedoch nicht vollständig durch die Extinktionswerte gestützt. Zwar liegen die Werte in den Ansätzen mit pH 4 tendenziell höher, entgegen der Erwartung ist der Anstieg der Absorption jedoch nicht bei der höchsten *Lactase*-Konzentration am stärksten, sondern bei der mittleren Konzentration von $c = 0,009$ g/10 ml. Obwohl eine Umsetzung stattgefunden hat, ist kein linearer Anstieg der Absorptionswerte in Abhängigkeit von der Probenzeit zu beobachten.

Aus den durchgeführten Versuchen mit den verschiedenen Abwandlungen bezüglich der Immobilisierung, der eingesetzten Substanzen sowie der Lactose- und *Lactase*-Konzentration und der Reaktionsbedingungen ergaben sich keine verwertbaren Messwerte. Trotz gemessener Umsetzung bei der Verwendung reiner *Lactase* ist auch der Verlauf dieser Werte nicht nachvollziehbar. Es wurde in beiden Fällen keine Farbreihe mit sichtlich ansteigender Farbintensität ähnlich der, die man im ursprünglichen Versuch erhält, erreicht. Der Ansatz über die Mengenrechnung zur Bestimmung der umgesetzten Zuckermenge ist daher nicht anwendbar.

Somit kann im Versuch mit Lactose und *Lactase* nicht wie erwartet eine Reaktion, vergleichbar mit der im Versuch mit Saccharose und *Dextranucrase*, quantitativ untersucht werden. Dementsprechend lässt sich keine Aussage über die Enzymaktivität treffen; die Ursache dafür, dass die Umsetzung durch die *Lactase*-Präparate nicht funktioniert und auch mit der reinen *Lactase* keine konsistent auswertbare Umsetzung erzielt wurde, konnte nicht abschließend geklärt werden. Daher kann der Ausgangsversuch im Schülerlabor auf der Basis des aktuellen Erkenntnisstandes und der zur Verfügung stehenden technischen Möglichkeiten nicht durch einen günstigeren und in der Durchführung effizienteren abgewandelten Versuch mit Lactose und *Lactase* ersetzt werden.

4.2 Fehlerdiskussion

Da die Versuche auf der Vorgehensweise aus dem Schülerpraktikum basieren und die Schritte größtenteils direkt übernommen wurden, sind bei der Durchführung auftretende Probleme auf die geänderten Substanzen zurückzuführen.

Als mögliche Fehlerquelle kommt zunächst die Alginateinhüllung in Frage. Diese könnte als Immobilisierungsmethode ungeeignet sein, falls die Matrix zu grobmaschig ist, um die *Lactase* einzuschließen. Um dies auszuschließen, müsste man die Struktur der beiden

Enzyme genauer untersuchen und vergleichen, da man zum Molekulargewicht der beiden Enzyme jeweils stark differierende Angaben findet¹⁴. Zudem könnte die Verwendung einer CaCl₂-Lösung bei der Herstellung der Alginatkügelchen unpassend gewesen sein, da dies auf die Immobilisierung von *Dextranucrase* ausgelegt ist. *Lactase* hingegen benötigt Magnesium-Ionen, um aktiv zu sein¹⁵. Bei der eingesetzten *Lactase* handelt es sich um *Lactase* aus dem Organismus *Aspergillus oryzae*¹⁶. Eine nähere Charakterisierung dieser *Lactase* wäre notwendig, um die spezifischen passenden Reaktionsbedingungen für die Versuchsdurchführung mit veränderten Substanzen zu bestimmen.

Eine zu geringe Menge des Enzyms oder des Substrats könnte dazu führen, dass der Anstieg der Absorptionswerte bei der Umsetzung zu gering ist und nicht in der Messung erfasst werden kann. Zusätzlich könnte die eingesetzte Lactose (Lactose-Monohydrat)¹⁷ die Umsetzung verhindern, falls diese nicht gespalten werden kann. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da das Kristallwasser im hydratisierten Feststoff vernachlässigbar sein sollte. Ebenfalls fraglich ist, ob für die Funktionsfähigkeit der *Lactase* die Anwesenheit eines Coenzym oder Cofaktors Voraussetzung ist, welche nur im Körper, allerdings nicht unter den gewählten Versuchsbedingungen gegeben ist.

Zudem kann es bei der Arbeit im Labor immer zu Fehlern in der Durchführung, wie etwa Messungenauigkeiten, kommen. So muss beim Ermitteln der Extinktion mit dem Fotometer mit einer Messungenauigkeit von $\pm 0,1$ gerechnet werden. Auch zu kurze Probenzeiten und die zu geringe Wiederholungszahl der einzelnen Versuche schränken die Gültigkeit der Ergebnisse ein. Allerdings sollte laut Packungsbeilage die *Lactase* erst kurz vor dem Verzehr von Milchzucker eingenommen werden. Daher sollte eine maximale Probenzeit von 60 min ausreichend sein.

Diese möglichen Fehlerquellen könnten in ihrem Zusammenwirken die konstanten Messwerte bedingen. Der Nachweisversuch für reduzierende Zucker mit DNS liefert für unsere Versuchsansätze bis jetzt keine brauchbaren Ergebnisse, auf die der Rechenansatz zur Mengenbestimmung anwendbar ist.

¹⁴ Dextranucrase: http://www.uniprot.org/uniref/UniRef100_A0A191XZA9#sequence; <http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.4.1.5>

Lactase: <https://de.wikipedia.org/wiki/Lactase>; <http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.2.1.108>

¹⁵ http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/2/g5635pis.pdf

¹⁶ <http://www.mpbio.com/product.php?pid=02100780&country=81>

¹⁷ <http://www.caelo.de/suche.html?L=0&sword=25&showform=1&searchmenu=auto&start=20>

4.3 Fazit und Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass der im Schülerpraktikum mit Saccharose und *Dextran-sucrase* durchgeführte Enzymversuch unter den gegebenen Bedingungen nicht auf die Durchführung mit Lactose und *Lactase* übertragen werden kann.

Was genau dafür ausschlaggebend ist, dass die Ergebnisse nicht wie gewünscht eine Auswertung der Enzymaktivität zulassen, ist auch aus den gewonnenen Erkenntnissen zum aktuellen Stand nicht ersichtlich, da der Reaktionsverlauf von vielen Faktoren beeinflusst wird, die ineinander greifen und deren Einwirkung momentan noch nicht konkret beurteilt werden kann.

Die bisherigen Ergebnisse bieten Ausgangspunkte für weitere Versuche. Um die Substanzen im Schülerpraktikum ersetzen zu können, müsste zunächst identifiziert werden, wodurch eine erfolgreiche Durchführung verhindert wird. Daraufhin müssten grundlegende Änderungen in der Vorgehensweise vorgenommen werden.

Es könnten alternative Immobilisierungsmethoden, z. B. unter Verwendung einer Magnesium- anstelle einer CaCl_2 -Lösung, sowie weitere Variationen hinsichtlich der Konzentration und der Versuchsbedingungen getestet werden. Die Veränderungen sollten sich an den spezifischen Eigenschaften der verwendeten *Lactase* orientieren. Um Erkenntnisse über diese zu gewinnen, wäre die Untersuchung mithilfe eines Proteinfingerprints möglich. Bei dieser Methode kann über SDS-Denaturierung die Struktur und Masse von Proteinen untersucht werden.

Besonders interessant wäre es, die Ergebnisse der bisherigen Versuche mit reiner *Lactase* näher zu betrachten und durch weitere Ansätze zu versuchen, diese zu erklären. Mittels des Proteinfingerprints könnte man die *Lactase* in den Kapseln mit der reinen *Lactase* vergleichen. Wenn hierbei Unterschiede zwischen den Eigenschaften der beiden Präparate festgestellt und analysiert würden, könnten die so gewonnenen Erkenntnisse zur Erklärung des unterschiedlichen Verhaltens in den Versuchen beitragen.

Mehrfache Wiederholungen der einzelnen Versuche würden verlässliche Ergebnisse gewährleisten und eine statistische Auswertung der gewonnenen Daten in Bezug auf den Reaktionsverlauf erlauben. Dazu wäre auch ein alternativer, für Lactose oder eines der Reaktionsprodukte spezifischer Nachweisversuch von Vorteil.

Über diese Ansätze könnte möglicherweise darauf geschlossen werden, welche Änderungen notwendig sind, damit der modifizierte Versuch mit Lactose und *Lactase* letztendlich erfolgreich durchgeführt werden kann und als „Enzymversuch aus dem Drogeriemarkt“ künftig preiswert und praktikabel am Schülerlabor angeboten werden könnte.

5 Danksagung

Wir danken Dr. Julia Ehlermann sowie den Mitarbeiterinnen am Fortbildungszentrum für Technik und Umwelt (FTU) am Karlsruher Institut für Technologie für Ihre Betreuung, die stets mit großer Hilfsbereitschaft, einem offenen Ohr für unsere Fragen und interessanten Ideen verbunden war.

Bei unseren Kursleitern Anke Richert und Thomas Knecht möchten wir uns herzlich dafür bedanken, dass sie uns im Verlauf der Kooperationsphase mit viel Engagement hervorragend begleitet und in unserer Projektarbeit immer mit konstruktiven und hilfreichen Anregungen tatkräftig unterstützt haben.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt Dr. Hans-Werner Hector und Josephine Hector, deren Förderung im Rahmen des Hector-Seminars die Durchführung dieses Projekts sowie die zahlreichen einzigartigen Erfahrungen und Projekte der vorangegangenen Jahre ermöglicht hat.

6 Quellen

Sonja Berensmeier und Julia Ehlermann: Praktikumsskript: Immobilisierung von Enzymen. Fortbildungszentrum für Technik und Umwelt, Eggenstein-Leopoldshafen.

- <https://www.abiweb.de/physikalische-chemie/kinetik-rund-um-die-reaktionsgeschwindigkeit/anwendungsbeispiele/fotometrie.html>
- https://de.wikipedia.org/wiki/Lambert-Beersches_Gesetz
- <https://de.wikipedia.org/wiki/3,5-Dinitrosalicyls%C3%A4ure>
- <http://www.mpbio.com/product.php?pid=02100780&country=81>

7 Anhang

7.1 Verwendete Chemikalien, Geräte und Produkte

Chemikalien

- 0,2 mol/l CaCl₂-Lösung
- 3%ige Alginatlösung
- Ca-Ac-Puffer
- Deionisiertes Wasser
- Dextransucraselösung
- DNS-Lösung
- Fructose-Standards
- pH-Lösung

Geräte

- Magnet- und Heizrührer
- Photometer
- Vortex-Mischer
- Wasserbad

Produkte

- Galactose
- Glucose
Hersteller: Caesar & Loretz GmbH
Inhalt: Glucose Monohydrat
PZN: 10087485
- Lactase® 18000
Hersteller: Pro Natura Gesellschaft für gesunde Ernährung mbH
Inhalt: Füllstoffe Dicalciumphosphat, Cellulose; Lactase (40%), Gelatine, Farbstoff E 171
PZN: 09545221
- Lactose
Hersteller: Caesar & Loretz GmbH
Inhalt: Lactose Monohydrat
PZN: 03788916
- Laluk® 4500
Hersteller: Strathmann GmbH & Co. KG

Inhalt: Füllstoff Dicalciumphosphat, Lactasepulver (38%) [Aktivität: 4500 lebensmittelchemische Einheiten Lactase nach FCC], Gelatine, Maisstärke, Trennmittel Magnesiumsalze von Speisefettsäuren, Siliziumdioxid
 PZN: 9608217

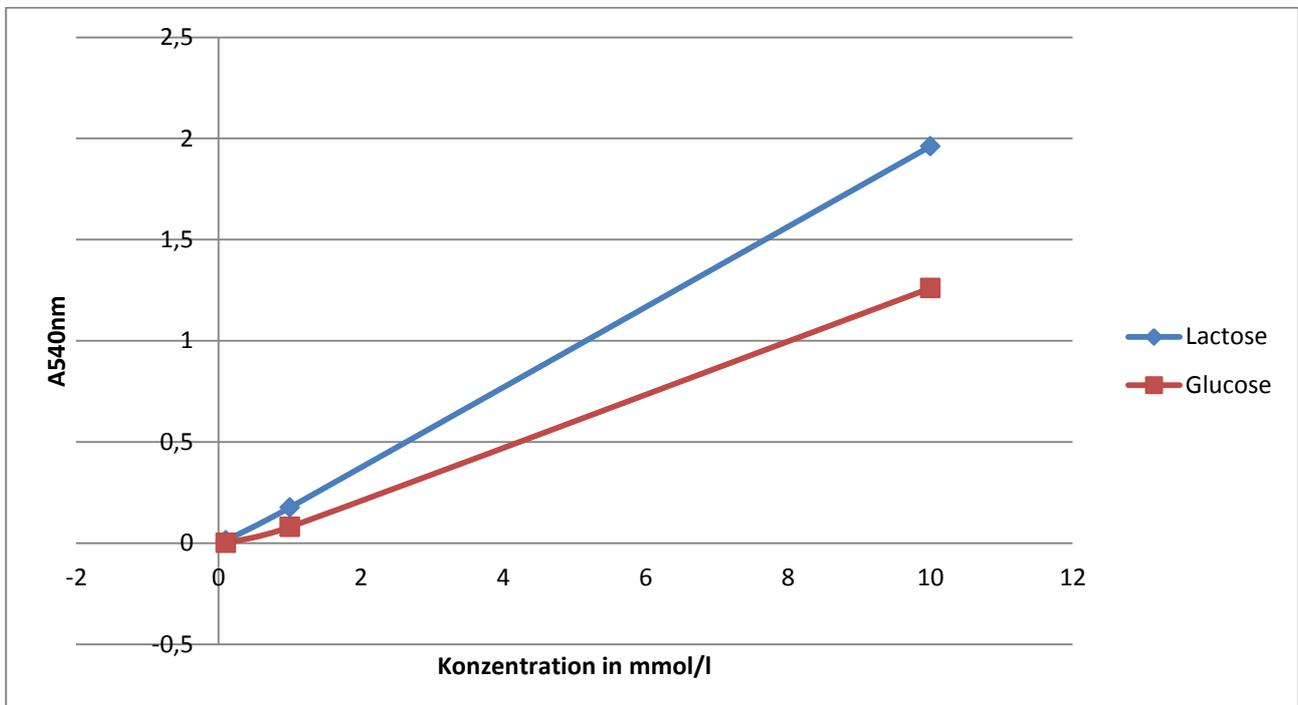
- reine Lactase
- Saccharose

Hersteller: MP Biomedicals Germany
 Inhalt: Lactase from *Aspergillus oryzae*
 SKU: 0210078001

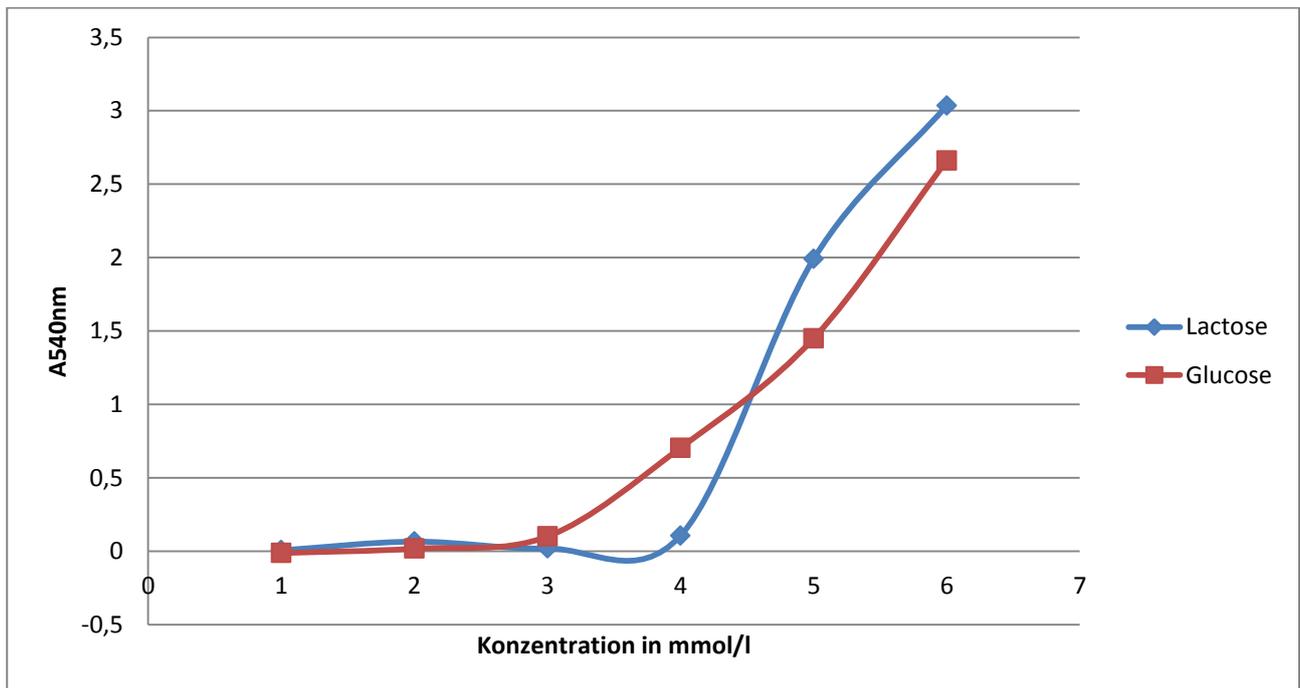
7.2 Weitere Messreihen und Bilder

Vorversuche – Weitere Verdünnungsreihen

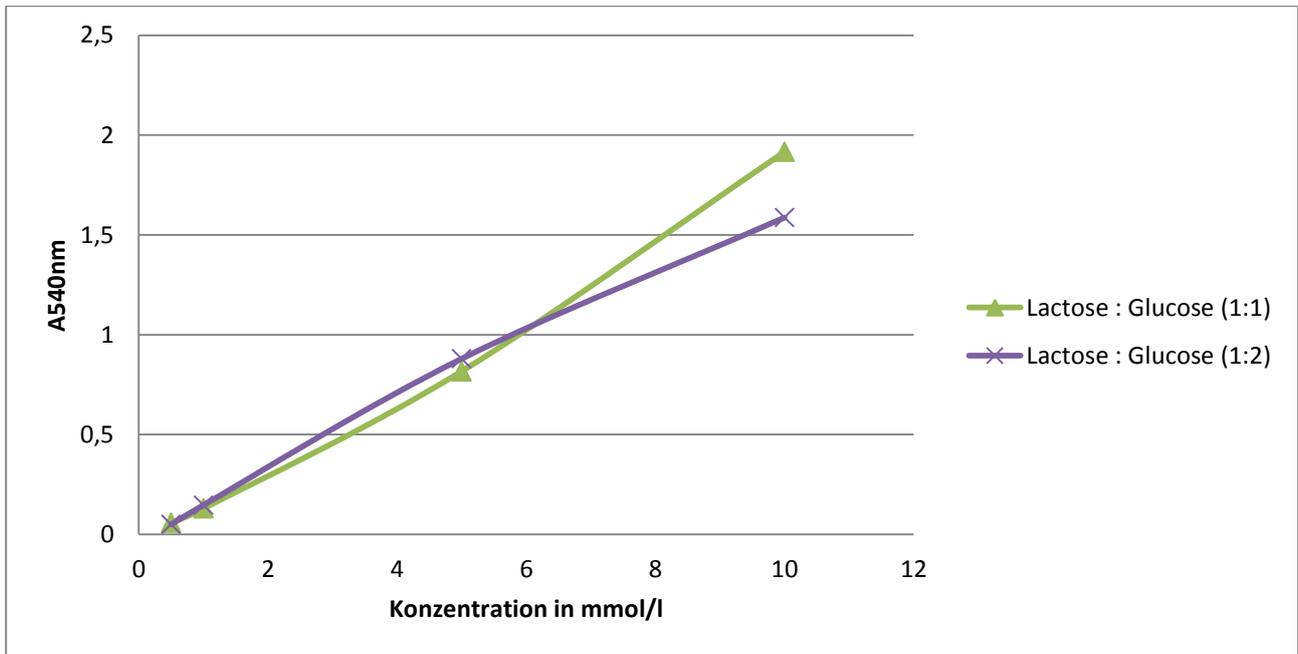
Konzentration in mmol/l	A_{540nm}	
	Lactose	Glucose
0,1	0,013	0,001
1	0,176	0,08
10	1,961	1,26



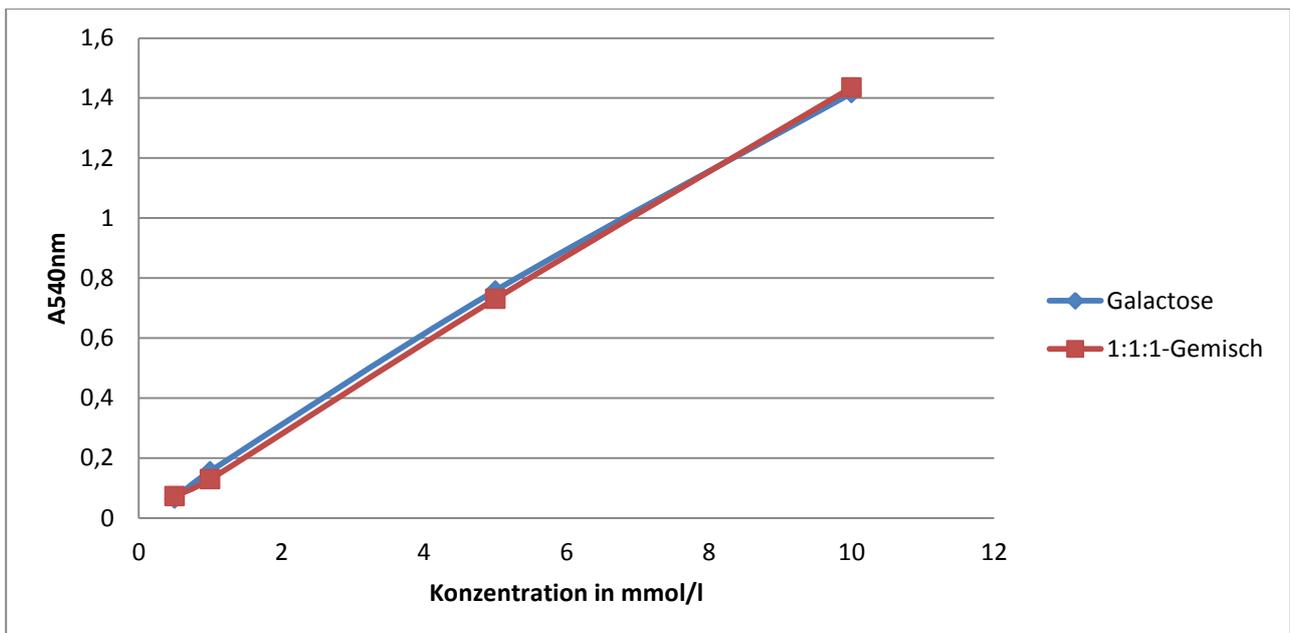
Konzentration in mmol/l	A_{540nm}	
	Lactose	Glucose
1	0,006	-0,013
2	0,065	0,017
3	0,0178	0,1
4	0,1049	0,704
5	1,990	1,449
6	3,035	2,661



Konzentration in mmol/l	A_{540nm}	
	Lactose : Glucose (1:1)	Lactose : Glucose (1:2)
0,5	0,058	0,05
1	0,130	0,147
5	0,817	0,880
10	1,916	1,587

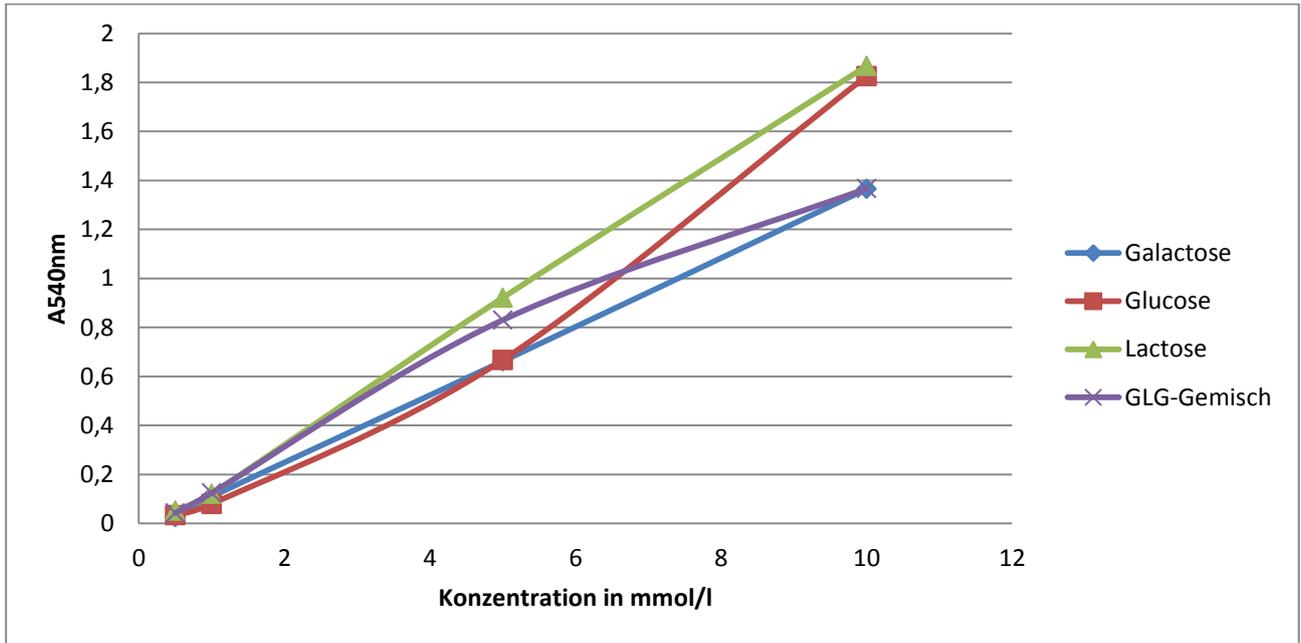


Konzentration in mmol/l	A _{540nm}	
	Galactose	Galactose:Lactose:Glucose (1:1:1)
0,5	0,064	0,073
1	0,156	0,129
5	0,758	0,73
10	1,416	1,435



Konzentration in mmol/l	A_{540nm}			
	Galactose	Glucose	Lactose	1:1:1-Gemisch
0,5	0,026	0,033	0,051	0,042
1	0,110	0,079	0,121	0,124
5	0,662	0,667	0,921	0,830
10	1,365	1,826	1,867	1,367

- Kleine Menge verschüttet



Vorversuche – Farbvergleich Lactose und Glucose gleicher Konzentration



Abb. 35: $c = 0,5 \text{ mmol/l}$

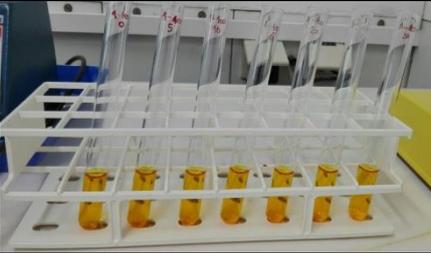
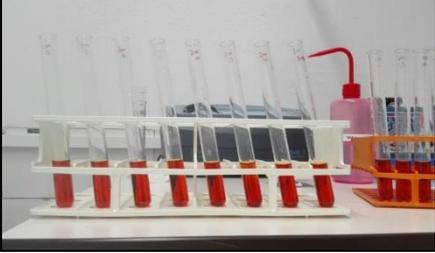


Abb. 36: $c = 1 \text{ mmol/l}$

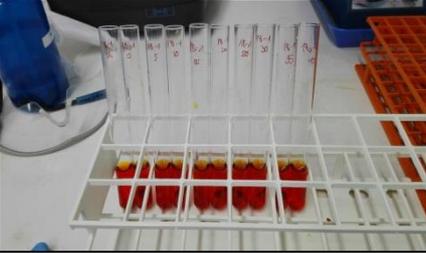


Abb. 37: $c = 5 \text{ mmol/l}$

Alginateinhüllung ($\vartheta = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 6)

	1 Kapsel <i>Lactase</i> 4500 Fcc in 100 ml destilliertem Wasser	1 Kapsel <i>Lactase</i> 4500 Fcc in 200 ml destilliertem Wasser
1 mmol/l Lactose-Lösung		
10 mmol/l Lactose-Lösung		

Alginatekugeln aus der Suspension

	1 Kapsel <i>Lactase</i> in 100 ml destilliertem Wasser	1 Kapsel <i>Lactase</i> in 200 ml destilliertem Wasser
<i>Lactase</i> 4500 Fcc		---
<i>Lactase</i> 18000 Fcc		

7.3 Versuchsskript: Immobilisierung von Dextransucrase

Herstellung der Alginat/Dextransucrase-Kügelchen (Immobilisate)									
1. Je 3 g der 3%igen Alginatlösung und der Dextransucrase-Lösung in ein 25 ml Becherglas abwägen und auf dem Magnetrührer ein paar Minuten mischen									
2. Ca. 200 ml der 0,2 mol/l CaCl ₂ -Lösung in ein 400 ml Becherglas füllen und auf dem Magnetrührer so stark rühren, dass ein Strudel bis zur Hälfte des Füllstandes entsteht									
3. Das Alginat/Dextransucrase-Gemisch in eine 5 mL Plastikspritze füllen und erst danach die Kanüle aufstecken. Achtung Verletzungsgefahr! Kanüle nie zurück in die Schutzhülle stecken, sondern nach Gebrauch in den Kanülenabfallbehälter entsorgen!									
4. Die Mischung langsam senkrecht von oben in die rührende CaCl ₂ -Lösung tropfen und die entstandenen Alginatkügelchen (Immobilisate) für 10 Minuten weiter rühren									
Herstellen der Zuckerlösungen									
5. Je 0,855 g Zucker in Wägeschälchen abwägen und in 25 ml Messkölbchen einfüllen (dies entspricht einer 100 mmol/l Saccharose-Lösung)									
6. Die Messkölbchen beschriften und mit den 3 unterschiedlichen pH-Lösungen bis zur 25 ml Marke auffüllen									
<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">Gruppe grün und blau</th> <th style="text-align: center;">Gruppe rot und gelb</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">pH 3</td> <td style="text-align: center;">pH 5,5</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">pH 4</td> <td style="text-align: center;">pH 6</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">pH 5</td> <td style="text-align: center;">pH 7</td> </tr> </tbody> </table>		Gruppe grün und blau	Gruppe rot und gelb	pH 3	pH 5,5	pH 4	pH 6	pH 5	pH 7
Gruppe grün und blau	Gruppe rot und gelb								
pH 3	pH 5,5								
pH 4	pH 6								
pH 5	pH 7								
7. Gut schütteln bis sich der Zucker gelöst hat und in die ebenfalls beschrifteten Erlenmeyerkölbchen umfüllen und zum Temperieren bei 30 °C ins Wasserbad stellen. Damit sie nicht umkippen mit Bleiringen beschweren									
8. Jetzt die Alginat-Kügelchen absieben, gründlich mit Ca-Ac-Puffer pH 5,5 abspülen und je 3 x 1 g davon in Wägeschälchen abwägen									

Probennahme	
9. Für jeden pH-Wert und jede Probenahmezeit ein Probengefäß beschriften	
10. Nun die abgewogenen Kügelchen zu den temperierten pH-Lösungen zugeben und gleichzeitig die Stoppuhr starten	
11. Sofort die erste Probe nehmen (Zeitpunkt t = 0 min): je 1 ml in die vorbereiteten Probengefäße pipettieren Dabei keine Kügelchen mit entnehmen. Wichtig: Die Erlenmeyerkolben mit den Zuckerlösungen bleiben während der gesamten Reaktion im Wasserbad und werden nur zur Probenahme herausgeholt	
12. Nach 5, 10, 20, 30 und 90 min werden weitere Proben genommen	
13. Zwischen der 30 min und der 90 min Probe ist Mittagspause ☺ ☺ ☺	
Farbreaktion mit DNS und photometrische Messung	
14. Die Reagenzgläser am oberen Rand beschriften (4 x 6 Stück): 3 Probenreihen für die pH-Werte und 1 Kalibrierreihe für die Standards mit 0,4 0,8 1,2 1,6 2,0 g/l Fructose	
15. In alle Reagenzgläser je 0,5 ml DNS-Lösung pipettieren	
16. Je 0,5 ml der genommenen Proben und der Fructose-Standards dazugeben	
17. Jede Reihe für sich 5 min im Wasserbad kochen (Stoppuhr!) und dabei mit Alufolie abdecken	
18. Zum Abkühlen 5 min ins Eisbad stellen, danach genau 5 ml deionisiertes Wasser zugeben und mischen auf dem Vortex-Mischer	
19. Messen der Proben im Photometer bei 540 nm: Kalibrierprobe 0 g/l als Blindwert messen Taste „ Null “ alle anderen Proben mit der Taste „ Messen “	
20. Werte notieren und graphisch auswerten	

8 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichern wir, dass wir die Arbeit unter der Beratung durch Dr. Julia Ehlermann und Anke Richert selbstständig verfasst haben und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt wurden, sowie Zitate kenntlich gemacht haben.

Ort, Datum

Evalotte Mohren

Ort, Datum

Sophia Russeck

Ort, Datum

Lena Wagner

Ort, Datum

Franziska Zell