

Glukometer, Honig und Tee

Schulexperimente zur Bestimmung der Aktivität von Saccharase

I. Heil^{1,2}, K. Koch^{1,2}, J. Bohrmann¹

RWTH Aachen, ¹Institut für Biologie II, Zoologie und Humanbiologie, ²Didaktik der Biologie und Chemie

Am Beispiel der Saccharase können einfache Schulexperimente zum Inhaltsfeld Energiestoffwechsel durchgeführt werden. Das Enzym, auch Invertase genannt, ist in Honig enthalten und katalysiert die Spaltung von Saccharose in Fruktose und Glukose. Unter geeigneten Versuchsbedingungen kann letztere mittels eines herkömmlichen Glukometers gemessen werden und ist ein Maß für die Saccharaseaktivität. Es werden Experimente zu verschiedenen Faktoren, die diese beeinflussen, vorgestellt.

Stichwörter: Enzymatik, Energiestoffwechsel, Enzymaktivität, Substratkonzentration, Reaktionszeit, Temperaturabhängigkeit, nicht-kompetitive Hemmung, Blutzuckermessgerät, Glukometer, Honig, Saccharase, Invertase, Tee, Tannin, Experimentieren

1 Einleitung

Der vorliegende Beitrag stellt Schulexperimente zur Enzymatik vor, bei denen einfach zugängliche Geräte und Materialien, u.a. ein Blutzuckermessgerät (Glukometer) aus der Apotheke, Honig als Saccharasequelle und schwarzer Tee, der Tannine als Hemmstoffe der Saccharaseaktivität enthält, verwendet werden. Die mit dem Glukometer gemessenen Glukosewerte stellen ein Maß für die Enzymaktivität der Saccharase dar, da Glukose eines ihrer Produkte ist. Aus der Veränderung der Glukosewerte kann auf die Saccharaseaktivität geschlossen werden.

Die Experimente, die im Rahmen des Inhaltsfelds Energiestoffwechsel [14] durchgeführt werden können, wurden im Rahmen einer Bachelorarbeit entwickelt [10]. Hierzu wurde u.a. geprüft, welche Messeigenschaften das verwendete Glukometer hat, welche Einflussfaktoren sich damit experimentell bestimmen lassen und welche Bedingungen hierfür gewählt werden sollten (u.a. Lösungsmittel, Konzentrationen, Verdünnungen und Mengen, z.B. von Glukose, Saccharose, Honig und Tee).

Der Beitrag gibt zunächst einen Überblick über Enzyme und Faktoren, die ihre Aktivität beeinflussen (Abschnitt 2.1), sowie über Forschungsergebnisse aus der Literatur in Bezug auf Honig und Saccharase (Abschnitt 2.2). Nachfolgend werden Überlegungen zum Einsatz eines Glukometers zur Bestimmung der Aktivität von Saccharase aus Honig aufgezeigt (Abschnitt 2.3). Zunächst sollten dessen Messeigenschaften bestimmt werden (Abschnitt 3.1). Die

Schulexperimente beziehen sich auf die Abhängigkeit der Saccharaseaktivität von der Saccharosekonzentration und der Reaktionszeit (Abschnitt 3.2), von der Tanninkonzentration (nicht-kompetitive Hemmung, Abschnitt 3.3) sowie von der Temperatur (Abschnitt 3.4).

2 Fachliche Klärung

2.1 Enzyme und Enzymaktivität

Enzyme erhöhen die Geschwindigkeit von Reaktionen, indem sie die Aktivierungsenergie herabsetzen [11, 12]. Die Reaktionsgeschwindigkeit kann jedoch nicht beliebig gesteigert werden, da sich ein Reaktionsgleichgewicht einstellt, wenn das Produkt genauso schnell zurückgebildet wird, wie es entsteht. Das thermodynamische Gleichgewicht einer Reaktion wird durch Enzyme nicht verschoben, sondern nur beschleunigt eingestellt [11, 12].

Bestimmte Faktoren, wie Temperatur, pH-Wert oder Licht, können die Aktivität von Enzymen beeinflussen und diese verringern, hemmen oder steigern. Für solche Faktoren besitzen die Enzyme meist ein Optimum, bei dem die Aktivität am höchsten ist [3, 11, 12]. Im Toleranzbereich des betrachteten Faktors kann das Enzym Reaktionen katalysieren. Außerhalb dieses Bereichs ist das Enzym inaktiv bzw. denaturiert. Für den Faktor Temperatur gilt, dass die Umsatzgeschwindigkeit des Enzyms mit steigender Temperatur bis zum Optimum zunimmt. Bei höheren Temperaturen wird das Enzym durch die Hitzeeinwirkung denaturiert (Experiment s. Abschnitt 3.3). Vergleichbares gilt für den pH-Wert und den Faktor Licht.

Die Enzymaktivität ist außerdem von der Substratkonzentration (Experiment s. Abschnitt 3.1) und von bestimmten Effektoren abhängig [11, 12]. Je mehr Substrat vorhanden ist, desto mehr Produkt kann erzeugt werden. Jedoch kommt es bei hohen Substratkonzentrationen zu einer Sättigung der Enzyme [20].

Die Produktmenge kann grundsätzlich auf zwei Wegen reguliert werden, entweder über die Verfügbarkeit von Enzymmolekülen oder über die Enzymaktivität. Die Menge an vorhandenem Enzym wird über die Geschwindigkeiten der Enzymsynthese und des Enzymabbaus eingestellt. Die katalytische Aktivität des Enzyms wird durch Strukturänderungen reguliert. Dies geschieht durch Effektoren, die die Aktivität erhöhen, indem sie ein allosterisches Zentrum besetzen. Das aktive Zentrum kann dann aufgrund einer Konformationsänderung das Substrat (besser) binden und (schneller) umsetzen [20].

Eine Hemmung der katalytischen Aktivität kann auf zwei Wegen erfolgen. Bei der kompetitiven Hemmung bindet der Inhibitor an das freie Enzym und konkurriert mit dem Substrat um die Bindungsstelle. Die Struktur eines solchen Inhibitors ist der des Substrats sehr ähnlich. Bei der nicht-kompetitiven Hemmung (Experiment s. Abschnitt 3.2) bindet der Inhibitor an den Enzym-Substrat-Komplex, wodurch eine Konformationsänderung des aktiven Zentrums hervorgerufen

und die Enzymaktivität herabgesetzt wird. Die Struktur eines solchen Inhibitors muss der des Substrats nicht ähneln.

2.2 Honig und Saccharase

Die Zusammensetzung von Honig wird in der Deutschen Honigverordnung (2004) beschrieben: Er enthält im allgemeinen Kohlenhydrate (70-80 %), Wasser (16-20 %; vgl. hierzu [21]), Vitamine, Mineralstoffe, Spurenelemente, Säuren und Aminosäuren (7-16 %), sowie Proteine und Aromastoffe [8]. Die Zusammensetzung variiert und ist abhängig von der Herkunft des gesammelten Nektars bzw. Honigtaus. Auch die Wachstumsbedingungen der Pflanzen, das Nektarangebot und die Stärke des Bienenvolkes spielen eine Rolle [15]. Den Hauptanteil der Kohlenhydrate machen die Monosaccharide Glukose und Fruktose aus, zu geringeren Anteilen finden sich Disaccharide, z.B. Saccharose und Maltose, und Oligosaccharide, z.B. Melezidose. Über den Bienenspeichel gelangen Enzyme in den Honig [17], u. a. Saccharase.

Die Saccharase (Invertase) im Honig spaltet Saccharose in Fruktose und Glukose. Sie ist hitzeempfindlicher als beispielsweise die Amylase (Diastase; vgl. hierzu [22]). Die Inaktivierung der Saccharase beginnt bei 50-59 °C, und bei 70-82 °C ist die Denaturierung abgeschlossen. Die Amylase hingegen toleriert Temperaturen von bis zu 90 °C, wobei die Inaktivierung stark von der Dauer der Hitzeeinwirkung abhängt [2]. Bei Tests von insgesamt 39 Honigsorten wiesen alle schon bei 80 °C Hitzeschäden der Saccharase auf [9]. Bei 60 °C konnte hingegen bei ca. einem Drittel der getesteten Honigsorten eine Aktivitätssteigerung beobachtet werden, die bei 70 °C nicht mehr festzustellen war. Der Hitzeschaden der Saccharase wurde in weiteren Experimenten im Bereich um 50 °C genauer untersucht. Es wurden 20 verschiedene Honigsorten über 10 Stunden auf 50, 53 bzw. 56 °C erhitzt. Dabei stellte sich heraus, dass die Saccharaseaktivität bei 50 °C auf 83 %, bei 53 °C auf 71 % und bei 56 °C auf 59 % sank [3]. Das Temperaturoptimum der isolierten Saccharase konnte auf 40-42 °C eingegrenzt werden. Das in Tannen-, Raps- und Zuckerfütterungshonig gemessene Optimum lag hingegen bei 35-40 °C [4], wobei die Aktivität der Saccharase ab 45 °C rasch abnahm. Zu diesem Ergebnis kommt auch das hier vorgestellte Experiment mit dem Glukometer (s. Abschnitt 3.3).

Ein weiterer Faktor, der die Saccharaseaktivität beeinflusst, ist der pH-Wert. Für Tannen-, Raps- und Zuckerfütterungshonig wurde das pH-Optimum bestimmt, dieses lag bei pH 5,9, während die Aktivität ober- und unterhalb des Optimums kontinuierlich abnahm [4]. Auch Licht hat einen Einfluss auf die Saccharase. In einer Langzeituntersuchung wurden Honigproben fünf bis sieben Monate lang in hellen bzw. dunklen, UV-absorbierenden Gläsern dem Tageslicht bei geschlossenen Fenstern ausgesetzt. In den hellen Gläsern wurde der Saccharasegehalt um ca. ein Drittel des Ausgangswertes gemindert, wohingegen er in den dunklen Gläsern nur um ca. ein Sechstel reduziert wurde. Dieser Anteil wird dem Faktor Zeit zugeschrieben [3].

Versuche zum Einfluss der Substratkonzentration auf die Aktivität der Saccharase zeigten, dass die optimale Substratkonzentration bei einem Versuchsansatz mit 0,5 g unerhitztem Honig in 50 mL Acetatpuffer bei 2,5 g Saccharose lag [9]. Diese Werte dienten der Orientierung für eigene Experimente, es wurden vergleichbare Mengen eingesetzt: 1g Honig in 100 mL = 1 dL Lösungsmittel (0,09 %-ige Kochsalzlösung) sowie (u. a.) 5 g Saccharose (s. Abschnitt 3.1).

Eine hemmende Wirkung auf Enzyme haben beispielsweise Tannine (Polyphenole), die im Tee enthalten sind [5]. Hierbei handelt es sich um eine nicht-kompetitive Hemmung [19]. Durchschnittlich enthält 1 g schwarzer Tee ca. 37 mg Tannin [16]. Die Hemmwirkung von Tee wurde u. a. anhand der Amylase (Diastase) untersucht. Werden die Tannine aus dem Tee entfernt, verliert er seine hemmende Wirkung [7]. Auch zur Kariesprävention ist Tee geeignet, da er die Aktivität der Amylase im Speichel hemmt und Stärkereste nicht in kurzkettige Zucker umgewandelt werden [5]. Zudem wird Tee eine krebshemmende Wirkung zugeschrieben, da er Enzyme inhibiert, die die Entstehung mutagener oder kanzerogener Stoffe fördern. Beispielsweise wird die Urokinase durch Tee gehemmt. Dieses Enzym ermöglicht es Krebszellen in fremdes Gewebe einzudringen, wodurch der Krebs metastasieren kann [1]. Für das in diesem Beitrag beschriebene Experiment mit Saccharase aus Honig wurden die o.g. Tanninmenge zugrunde gelegt und verschiedene Verdünnungen getestet (s. Abschnitt 3.2).

2.3 Bestimmung der Saccharaseaktivität mittels Glukometer

Für die Experimente wird ein Glukometer aus der Apotheke eingesetzt, wie es Diabetiker zur Blutzuckermessung verwenden. Das von uns getestete Gerät „Accu-Chek Aviva“ (Fa. Roche; vgl. Kasten 1) kostet fünf bis zehn Euro; die Kosten für 50 Teststreifen liegen bei 15 bis 20 Euro. Für ein Experiment werden nur wenige Teststreifen benötigt; dies hängt von der gewählten Anzahl der Versuchsansätze, Wiederholungen und der Unterrichtsmethodik ab (s. Abschnitt 3).

Das Blutzuckermessgerät „Accu-Chek Aviva“ (Fa. Roche) verwendet Teststreifen, die eine vom Coenzym Pyrrolochinolinchinon (PQQ) abhängige Glukosedehydrogenase (Glukose-Dye-Oxidoreduktase, GlucDOR), enthalten. Diese bewirkt, dass der Sauerstoffgehalt der zu messenden Blutprobe das Messergebnis nicht beeinflusst. Das Glukometer ermittelt den Glukosewert über eine elektrochemische Gleichstrom- bzw. Wechselstrommethode, bei der D-Glukose von der GlucDOR zu Glukonolacton oxidiert wird. Während dieses Reaktionsschrittes wird PQQ zu PQQH₂ reduziert, wobei das Coenzym Elektronen auf den Nitrosoanilin-Mediator überträgt. Dieser Mediator wird über das Chinondiimin zum Phenylendiamin reduziert - ein Reaktionsschritt, der irreversibel ist. An der Anode der Messzelle im Teststreifen wird das Phenylendiamin unter dem Einfluss einer geeigneten Gleichspannung wieder zu Chinondiimin oxidiert. Daraus resultiert ein Elektronenfluss in der Anode, der mit der Glukosekonzentration korreliert. Da die Messungen nicht nur von der Glukosekonzentration in der Blutprobe abhängen, sondern auch von der Umgebungstemperatur und dem Hämatokrit, wird vor der Strommessung die Impedanz der Messzelle bestimmt, wodurch störende Einflüsse reduziert werden. Für die Durchführung der Messung werden geeignete Wechselspannungen definierter Frequenzen an die Messzelle angelegt [6] und die daraus folgenden Wechselströme gemessen. Der in mg/dL angezeigte Glukosewert wird aus allen ermittelten Messwerten mit Hilfe eines systemspezifischen Algorithmus berechnet.

Kasten 1: Messprinzip des Glukometers (vgl. [6]).

Zur Herstellung der Honiglösung wird 0,09 %-ige Kochsalzlösung verwendet (s. Abschnitt 3). Sowohl 0,9 %-ige Kochsalzlösung als auch phosphat-gepufferte Salzlösung (pH 7,4), Leitungswasser oder destilliertes Wasser erwiesen sich als ungeeignet für das Glukometer. Art und Menge des eingesetzten Honigs (5 g Waldhonig auf 1 L 0,09 %-ige Kochsalzlösung) stellen Empfehlungen aufgrund eigener Experimente dar [10].

3 Die Schulexperimente

Einen Überblick über die benötigten Geräte, Chemikalien und Materialien gibt Kasten 2. Spezifische Angaben (Anzahl, Menge, Volumen usw.) finden sich bei den einzelnen Experimenten (Abschnitt 3.1 bis 3.4). Abb. 1 zeigt, welche Lösungen für welche Experimente benötigt werden.

Bechergläser	Honig (z. B. Waldhonig)	Pipettierhilfe
beheizbarer Magnetrührer	Messkolben 1 L	Rührkerne
destilliertes Wasser	Messkolben 100 mL	Saccharose
Eiswürfel	Messkolben 500 mL	Schwarzer Tee
Glukometer „Accu-Chek Aviva“	NaCl	Thermometer
Glukose	Pipette 10 mL	Trichter
Glukoseteststreifen „Accu-Chek Aviva“	Pipette 2 mL	Waage

Kasten 2: Geräte, Chemikalien und Materialien für die Experimente zur Bestimmung der Saccharaseaktivität mittels Glukometer.

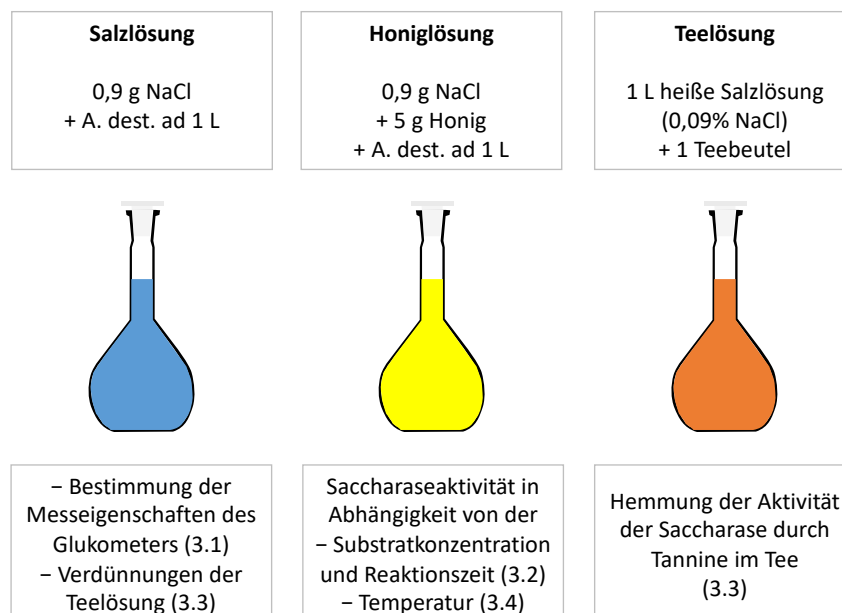


Abb. 1: Jeweilige Ausgangslösungen für die Experimente zur Bestimmung der Saccharaseaktivität mittels Glukometer.

Abb. erstellt unter Verwendung von Elementen aus [13].

3.1 Bestimmung der Messeigenschaften des Glukometers

Zunächst wird 1 L 0,09 %-ige Kochsalzlösung angesetzt (Abb. 1). Dafür werden 0,9 g NaCl abgewogen, in einen 1 L Messkolben überführt und mit destilliertem Wasser aufgefüllt. 300 mL dieser Lösung werden 1,5 g Glukose zugesetzt (Abb. 2). Danach werden unter Verwendung des 100 mL-Messkolbens Verdünnungen hergestellt (Abb. 2), aus denen sich die in Tab. 1 genannten Glukosekonzentrationen ergeben.

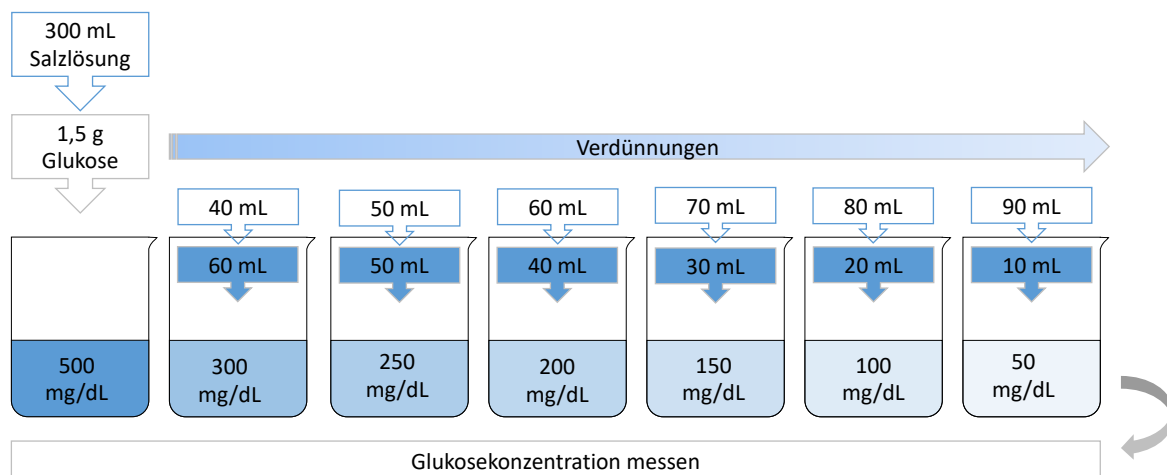


Abb. 2: Herstellung von Glukose-Standardlösungen bekannter Konzentration zur Bestimmung der Messeigenschaften des Glukometers (zur Herstellung der Salzlösung s. Abb. 1). Der Standardlösung mit der Glukosekonzentration 500 mg/dL (dunkelblau) werden die jeweils angegebenen Volumina entnommen und mit der Salzlösung (weiß) auf 100 mL aufgefüllt. Abb. erstellt unter Verwendung von Elementen aus [13].

Nun wird ein Teststreifen in das Glukometer eingeführt und gewartet, bis das Gerät bereit für eine Messung ist. Währenddessen wird mit der 2 mL-Pipette ein wenig Flüssigkeit aus der jeweiligen Glukose-Standardlösung (Abb. 2) entnommen. Sobald das Glukometer bereit ist, wird die Lösung nach Gebrauchsanweisung des Geräts auf den Teststreifen gegeben und eine Messung durchgeführt. Die Ergebnisse werden notiert (Tab. 1) und anschließend graphisch ausgewertet (Abb. 3).

Tab. 1: Bestimmung der Messeigenschaften des Glukometers. Mittelwerte (\pm Standardabweichung; $n = 4$) der mit „Accu-Chek Aviva“-Teststreifen gemessenen Glukosekonzentration in verschiedenen Glukose-Standardlösungen (in mg/dL 0,09 %-iger Kochsalzlösung).

eingewogene Glukosekonzentration I [mg/dL]	50	100	150	200	250	300	500
gemessene Glukosekonzentration c [mg/dL]	43,33 \pm 12,47	87,33 \pm 14,48	136,67 \pm 24,88	198,00 \pm 57,57	237,67 \pm 59,89	300,17 \pm 42,18	484,17 \pm 59,23

Es bietet sich an, dass die hier beschriebenen Messungen vorab von der Lehrkraft durchgeführt werden, so dass anhand der Ergebnisse der Zweck (Beantwortung der Frage "Kann das Gerät die Glukosekonzentration messen, die in der Lösung enthalten ist?") und das prinzipielle Vorgehen dieser Überprüfung verdeutlicht werden können (Vergleich von eingewogenen und gemessenen Glukosekonzentrationen, Bedeutung von Wiederholungsmessungen zur Bildung von Mittelwerten mit Angabe der Standardabweichungen, Erstellung einer Regressionsgeraden – vgl. hierzu z.B. [18]). Die Schülerinnen und Schüler können sodann mit diesen Ergebnissen weiterarbeiten (Division der in den Experimenten gemessenen Werte durch die Steigung der erstellten Regressionsgeraden).

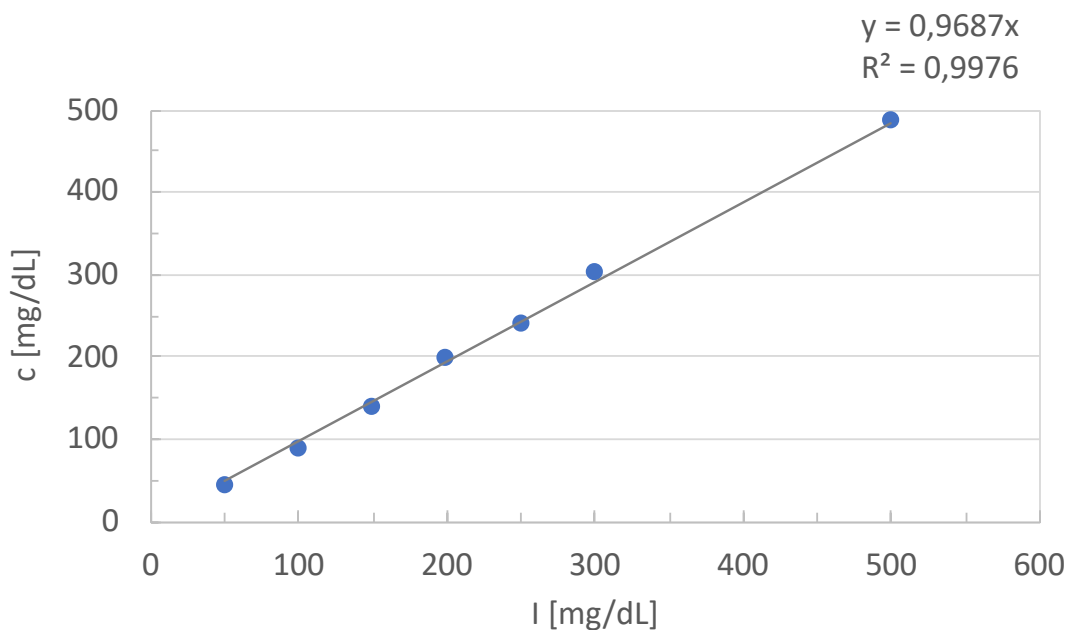


Abb. 3: Bestimmung der Messeigenschaften des Glukometers. Regressionsgerade der mit „Accu-Chek Aviva“-Teststreifen gemessenen Glukosekonzentration c (in mg/dL, Mittelwerte aus Tab. 1) in verschiedenen Standardlösungen der Glukosekonzentration I (in mg/dL 0,09 %-iger Kochsalzlösung). Sowohl der Regressionskoeffizient (0,9976) als auch die Steigung (0,9687) sind annähernd gleich 1. (Zur Erstellung einer Regressionsgeraden s. z.B. [18]).

Natürlich kann die Bestimmung der Messeigenschaften des Glukometers auch im Unterricht durch die Schülerinnen und Schüler selbst erfolgen. Auch ein Verzicht auf eigene Messungen ist denkbar, dann könnten stattdessen die Werte aus Tab. 1 und Abb. 3 zugrunde gelegt werden (oder es werden die gemessenen Werte als reale Werte angenommen).

3.2 Abhängigkeit der Aktivität der Saccharase von der Substratkonzentration und der Reaktionszeit

Es wird 1 L Honiglösung angesetzt (Abb. 1). Dafür werden 5 g Honig und 0,9 g NaCl in einem Becherglas abgewogen und in wenig destilliertem Wasser mithilfe eines Rührkerns und eines

Magnetrührers gelöst. Danach wird die Lösung in einen 1 L Messkolben überführt und mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Nun werden 1 g, 2 g, 3 g und 5 g Saccharose abgewogen. Anschließend werden vier Mal 100 mL der Honiglösung abgemessen und jeweils in ein Becherglas gegeben. Die Glukosekonzentration der Honiglösung wird mit Hilfe des Glukometers gemessen und notiert. Dann werden die verschiedenen Saccharosemengen zu je einem Ansatz gegeben und mithilfe des Magnetrührers gelöst. Ab jetzt wird der Glukosegehalt alle 5 Minuten über einen Zeitraum von 30 Minuten gemessen (Abb. 4).

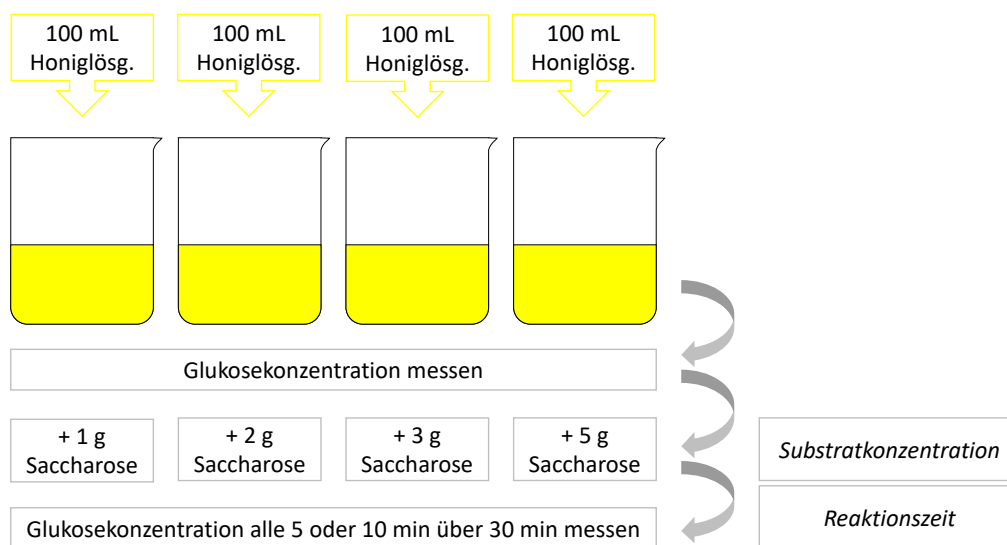


Abb. 4: Vorgehen bei der Bestimmung der Abhängigkeit der Saccharaseaktivität von den Faktoren Substratkonzentration und Reaktionszeit (zur Herstellung der Honiglösung s. Abb. 1). Abb. erstellt unter Verwendung von Elementen aus [13].

Die Ergebnisse werden notiert (Tab. 2) und anschließend graphisch ausgewertet (Abb. 5). Die Anzahl der Messzeitpunkte kann ggf. reduziert werden auf alle 10 Minuten über einen Zeitraum von 30 Minuten (vgl. Tab. 2).

Die Schlussfolgerungen, die aus den ermittelten Werte abgeleitet werden können, könnten z.B. wie folgt formuliert werden (hier bezogen auf die in Tab. 2 und Abb. 5 exemplarisch gezeigten Ergebnisse):

“Je mehr Substrat vorhanden ist (hier also Saccharose), desto mehr Produkt (hier also Glukose) wird gebildet - bis eine Sättigung der Enzymaktivität (hier also die Sättigung der Aktivität des Enzyms Saccharase) erreicht ist - was im durchgeführten Experiment (5 g Saccharose im Ansatz und 30 min Reaktionszeit) jedoch nicht der Fall war.”

“Je länger die Reaktionszeit, desto mehr Produkt wird gebildet - wenn nicht schon vorher kein Substrat mehr vorhanden ist - was im durchgeführten Experiment bei Saccharosekonzentrationen von 1-2 g/dL schon nach 10 min Reaktionszeit der Fall war.”

Tab. 2: Aktivität der Saccharase (als Produktkonzentration) in Abhängigkeit von der Substratkonzentration und der Reaktionszeit. Gemessene Produktkonzentration (Glukose in mg/dL, Mittelwerte \pm Standardabweichung; $n = 3$) in Honiglösungen (500 mg/dL 0,09 %-iger Kochsalzlösung) verschiedener Substratkonzentration (Saccharose in g/dL) in Abhängigkeit von der Reaktionszeit (in min) bei Raumtemperatur. Die Glukosekonzentration der Honiglösung wurde zu Beginn des Experiments ermittelt und von den Messwerten abgezogen.

Substratkonzentration (Saccharose) [g/dL]	1	2	3	5
Reaktionszeit [min]	Produktkonzentration (Glukose) [mg/dL]			
0	0	0	0	0
5	/	5 \pm 5,73	3 \pm 2,83	16 \pm 2,62
10	16 \pm 10,40	13 \pm 5,44	5 \pm 3,56	19 \pm 0,82
15	/	14 \pm 11,05	11 \pm 2,62	26 \pm 2,94
20	15 \pm 4,08	14 \pm 2,36	15 \pm 4,23	28 \pm 3,30
25	/	11 \pm 7,89	20 \pm 4,03	33 \pm 2,09
30	18 \pm 6,18	20 \pm 1,70	26 \pm 5,44	36 \pm 2,94

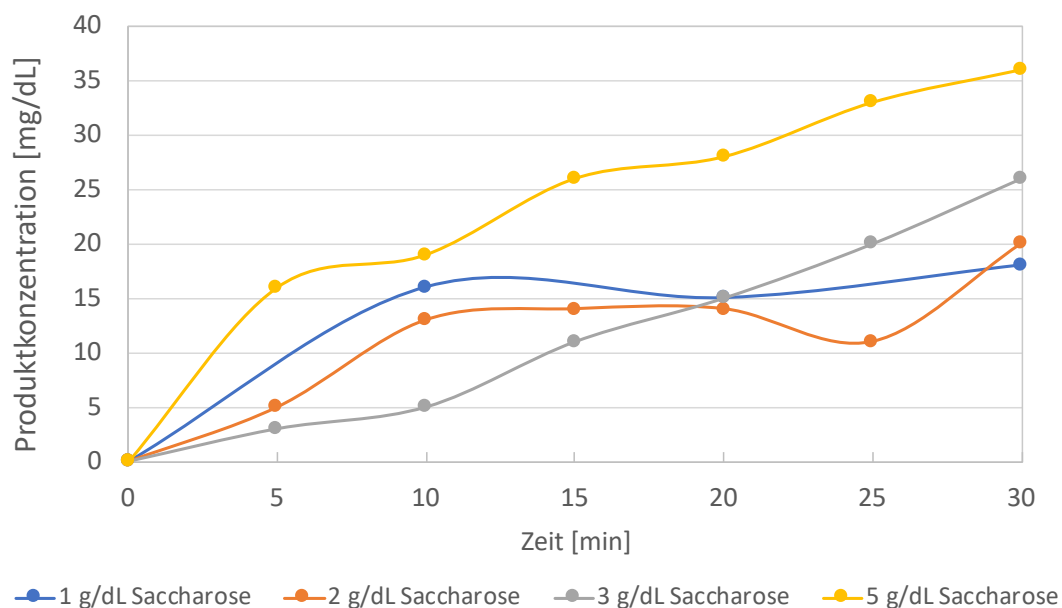


Abb. 5: Aktivität der Saccharase (als Produktkonzentration) in Abhängigkeit von der Substratkonzentration und der Reaktionszeit. Gemessene Produktkonzentration (Glukose in mg/dL, Mittelwerte aus Tab. 2) in Honiglösungen (500 mg/dL 0,09 %-iger Kochsalzlösung) verschiedener Substratkonzentration (Saccharose in g/dL) in Abhängigkeit von der Reaktionszeit (in min) bei Raumtemperatur. Bei Saccharosekonzentrationen von 1 bis 2 g/dL ist bereits nach 10 min ein Substratmangel erkennbar. Auch bei 5 g/dL Saccharose tritt innerhalb von 30 min noch keine Sättigung ein.

3.3 Hemmung der Aktivität der Saccharase durch Tannine im Tee

Es wird 1 L Teelösung angesetzt (Abb. 1). Dafür werden zunächst 1 L destilliertes Wasser aufgeköcht, 0,9 g NaCl abgewogen und in einem 1 L Messkolben zusammengeführt (Salzlösung, s. Abb. 1). Mit der heißen 0,09 %-igen Kochsalzlösung wird ein Beutel schwarzer Tee aufgegossen. Die angegebene Ziehzeit des Tees wird beachtet. Der Tee wird solange stehen gelassen, bis Raumtemperatur erreicht ist. Für die Verdünnungen wird zusätzlich 1 L Salzlösung (s. Abb. 1) benötigt.

Tab. 3: Geschätzte Tanninkonzentration der verwendeten Teelösungen. Ein Teebeutel enthält 2 g Tee; 1 g schwarzer Tee enthält ca. 37 mg lösliche Tannine (vgl. [16]). Mit einem Teebeutel wurde 1 L Tee in 0,09 %-iger Kochsalzlösung hergestellt (Teelösung 100 %) und mit 0,09 %-iger Kochsalzlösung schrittweise verdünnt.

Teelösungen	100 %	50 %	10 %	7,5 %	5 %	1 %
geschätzte Tanninkonzentration [$\mu\text{g/mL}$]	74	37	7,4	5,5	3,7	0,74

Anschließend werden 500 mg Honig in 100 mL des Tees, die in einem 100 mL Messkolben abgemessen wurden, gelöst (Abb. 6). Die Glukosekonzentration dieser Lösung wird gemessen und notiert. Nun werden 5 g Saccharose zu der Lösung gegeben und über einen Zeitraum von 30 min alle 10 min der Glukosegehalt bestimmt. Währenddessen werden fünf verdünnte Teelösungen hergestellt, um die in Tab. 3 angegebenen Tanninkonzentrationen zu erhalten. Die fünf Versuchsansätze werden in gleicher Weise wie der erste Versuchsansatz behandelt. Die Messwerte werden notiert (Tab. 4) und anschließend graphisch gegen die Zeit in Minuten aufgetragen (Abb. 7). Die Anzahl der Verdünnungen kann ggf. reduziert werden.

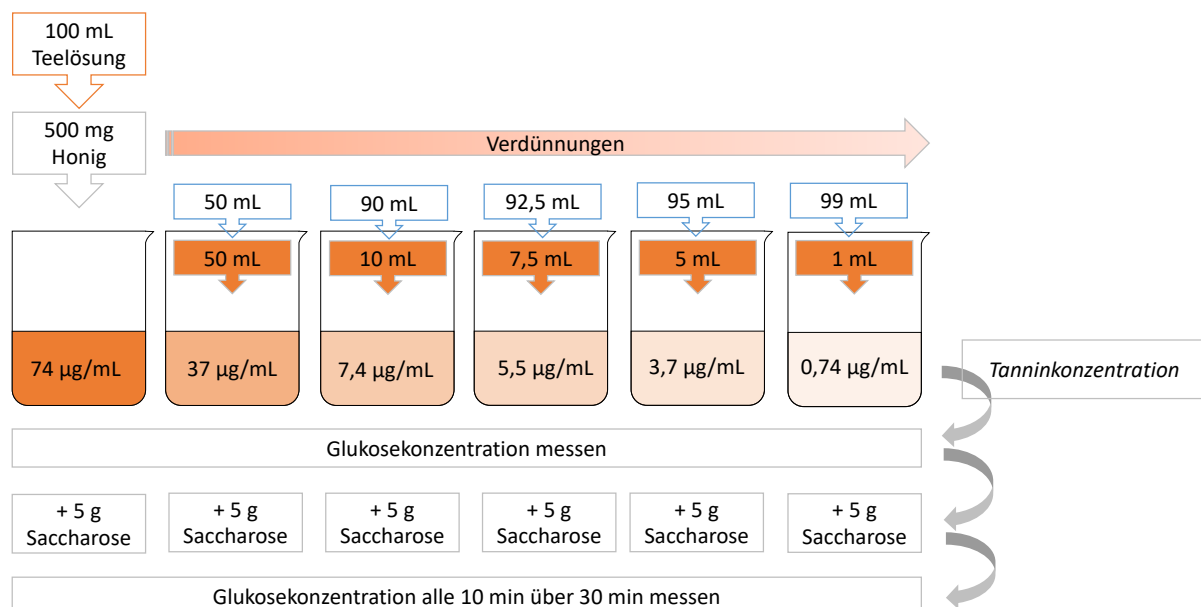


Abb. 6: Vorgehen beim Experiment zur Hemmung der Aktivität der Saccharase durch Tannine im Tee (zur Herstellung der Honiglösung und der Salzlösung für die Verdünnungen s. Abb. 1). Der Lösung mit der Tanninkonzentration 74 $\mu\text{g/mL}$ (dunkelbraun) werden die jeweils angegebenen Volumina entnommen und mit der Salzlösung (weiß) auf 100 mL aufgefüllt. Abb. erstellt unter Verwendung von Elementen aus [13].

Tab. 4: Hemmung der Aktivität der Saccharase in Abhängigkeit von der Tanninkonzentration. Gemessene Produktkonzentration (Glukose in mg/dL, Mittelwerte \pm Standardabweichung; n = 3) in Honiglösung (500 mg/dL 0,09 %iger Kochsalzlösung) mit zugegebenem Substrat (5 g/dL Saccharose) in Abhängigkeit von der Tanninkonzentration (in $\mu\text{g/mL}$) und der Reaktionszeit (in min) bei Raumtemperatur. Die Glukosekonzentration der Honiglösung zu Beginn der Experimente wurde von den Messwerten abgezogen.

Reaktionszeit [min]	0	10	20	30
Tanninkonzentration [$\mu\text{g/mL}$]	Produktkonzentration (Glukose) [mg/dL]			
74	0	22,76 \pm 4,36	23,73 \pm 4,36	23,73 \pm 4,36
37	0	14,53 \pm 2,91	15,49 \pm 1,94	15,49 \pm 2,91
7,4	0	14,53 \pm 5,07	21,31 \pm 6,02	31,48 \pm 1,92
5,5	0	16,95 \pm 4,36	30,51 \pm 0,48	31,97 \pm 0,97
3,7	0	18,08 \pm 2,54	26,80 \pm 3,74	45,21 \pm 8,71
0,74	0	17,44 \pm 6,14	28,58 \pm 2,28	38,75 \pm 1,99

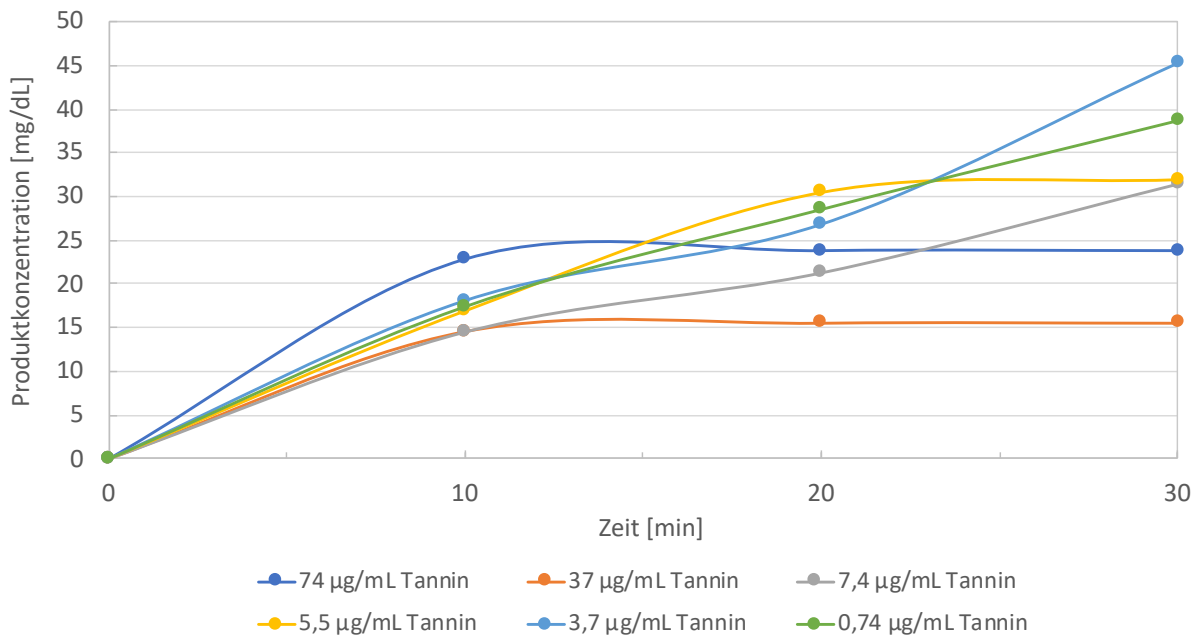


Abb. 7: Hemmung der Aktivität der Saccharase in Abhängigkeit von der Tanninkonzentration. Gemessene Produktkonzentration (Glukose in mg/dL, Mittelwerte aus Tab. 4) in Teelösungen (0,09 %-ige Kochsalzlösung) mit 500 mg/dL Honig und 5 g/dL Saccharose in Abhängigkeit von der Tanninkonzentration (in $\mu\text{g/mL}$) und der Reaktionszeit (in min) bei Raumtemperatur. Die Hemmschwelle der Saccharase liegt bei einer Tanninkonzentration zwischen 3,7 und 5,5 $\mu\text{g/mL}$. Für die Kontrolle vergleiche Abb. 4 (Ansatz mit 5 g Saccharose).

Es bietet sich an, dieses Experiment im Anschluss an das zur Abhängigkeit von Substratkonzentration und Reaktionszeit durchzuführen (s. Abschnitt 3.2 mit Abb. 4), da für die Kontrolle der entsprechende Ansatz von dort herangezogen werden kann (Materialersparnis sowie inhaltlicher Rückbezug). Auch sind die Experimente in Bezug auf abhängige und unabhängige Variablen gut vergleichbar: Gemeinsam ist beiden, dass zur Beurteilung der Aktivität der Saccharase die Produktkonzentration (mg/dL) über die Zeit bestimmt wird (somit auch gleiche Achsenbeschriftungen bei den zu erstellenden Graphen, Anwendung des zuvor Gelernten);

verschieden sind die jeweils variierten Parameter (Saccharosekonzentration bzw. Tanninkonzentration). Im Hinblick auf die hier zusätzlich zu erstellenden Verdünnungen kann wiederum auf das Experiment zur Bestimmung der Messeigenschaften des Glukometers zurückgegriffen werden (s. Abschnitt 3.1 mit Abb. 2).

3.4 Abhängigkeit der Saccharaseaktivität von der Temperatur

Es werden fünf Mal 100 mL der Honiglösung (s. Abschnitt 3.2 und Abb. 4) abgemessen und in Bechergläser überführt. Für jeden Ansatz werden 10 g Saccharose abgewogen. Der Glukosegehalt jedes Ansatzes wird mit dem Glukometer ermittelt und notiert. Anschließend wird ein Ansatz der Honiglösung mit Hilfe von Eis auf 10 °C gekühlt und ein weiterer bei Raumtemperatur (ca. 20 °C) stehen gelassen. Die anderen drei Ansätze werden jeweils in einem Wasserbad (z. B. großes Becherglas) mithilfe des beheizbaren Magnetrührers auf 30 °C, 40 °C bzw. 50 °C unter stetem Rühren erhitzt. Ist die gewünschte Temperatur erreicht, wird die Saccharose hinzugefügt. Nun werden über einen Zeitraum von 30 Minuten alle 10 Minuten die Glukosewerte der Lösungen ermittelt (Abb. 8). Die Temperatur sollte während des Versuches möglichst konstant bleiben, weshalb regelmäßig mit dem Thermometer kontrolliert wird.

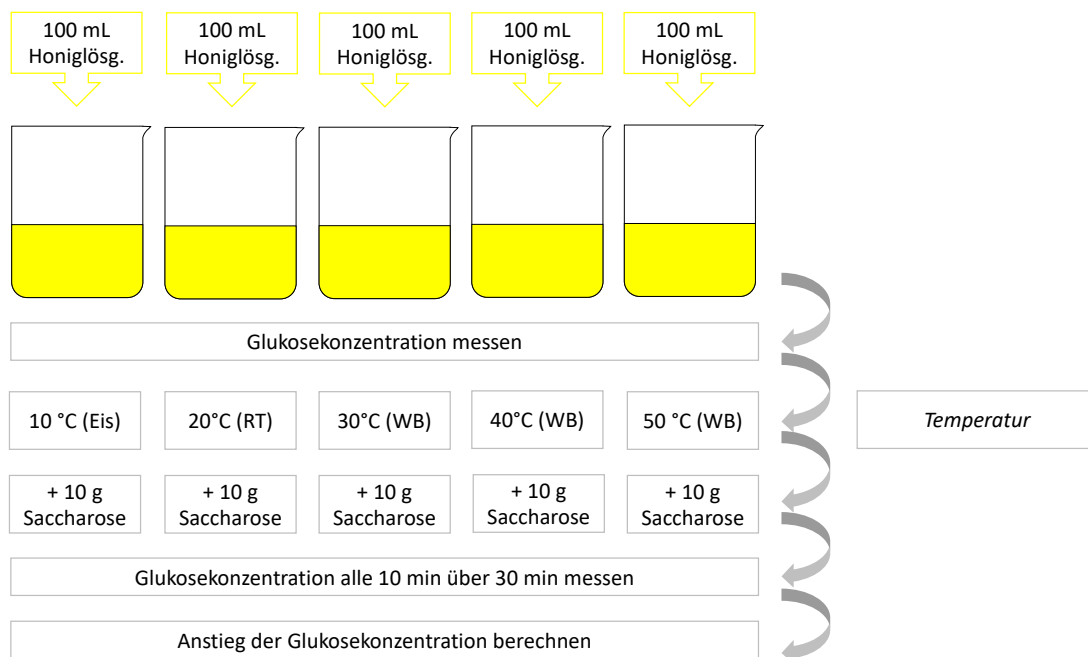


Abb. 8: Vorgehen bei der Bestimmung der Abhängigkeit der Saccharaseaktivität von der Temperatur (zur Herstellung der Honiglösung s. Abb. 1). RT, Raumtemperatur; WB, Wasserbad. Abb. erstellt unter Verwendung von Elementen aus [13].

Abschließend wird die Differenz zwischen den unter Temperatureinfluss ermittelten Werten und dem Glukosewert zu Beginn in $\text{mg/dL}\cdot\text{min}^{-1}$ umgerechnet und notiert (Tab. 5) sowie graphisch gegen die Temperatur aufgetragen (Abb. 9).

Auch dieses Experiment kann im Anschluss an das zur Abhängigkeit von Substratkonzentration und Reaktionszeit durchgeführt werden (s. Abschnitt 3.2 mit Abb. 4), da die erstellten Ansätze und ihre Behandlung gut vergleichbar sind: Gleich sind die verwendeten Ausgangslösungen, variiert wird die Saccharosekonzentration bzw. die Temperatur. Verschieden ist, dass hier die Saccharaseaktivität als Menge an Glukose, die pro Zeiteinheit entsteht, bestimmt wird. Daher muss noch eine Umrechnung in $\text{mg/dL}\cdot\text{min}^{-1}$ erfolgen, und "der Graph sieht anders aus" (Achsenbeschriftungen, Kurvenverlauf). Letzteres wäre auch ein Argument, dieses Experiment vor den beiden anderen durchzuführen (s. Abschnitt 3.2 mit Abb. 4 sowie Abschnitt 3.3 mit Abb. 6), da sich hier eine für die Darstellung der Enzymaktivität typische Optimumskurve ergibt.

Tab. 5: Saccharaseaktivität (als Anstieg der Produktkonzentration) in Abhängigkeit von der Temperatur. Gemessener Anstieg der Glukosekonzentration (in $\text{mg/dL}\cdot\text{min}^{-1}$, Mittelwerte \pm Standardabweichung; $n = 3$) innerhalb von 30 min (Messung alle 10 min) in Honiglösung (500 mg/dL 0,09 %-iger Kochsalzlösung) mit zugegebener Saccharose (10 g/dL) in Abhängigkeit von der Temperatur. Die Glukosekonzentration der Honiglösung zu Beginn der Experimente, d. h. vor Zugabe der Saccharose, wurde von den Messwerten abgezogen.

Temperatur [°C]	10	20	30	40	50
Anstieg der Glukosekonzentration [$\text{mg/dL}\cdot\text{min}^{-1}$]	$0,11 \pm 0,10$	$1,29 \pm 0,41$	$2,10 \pm 0,33$	$2,67 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,48$

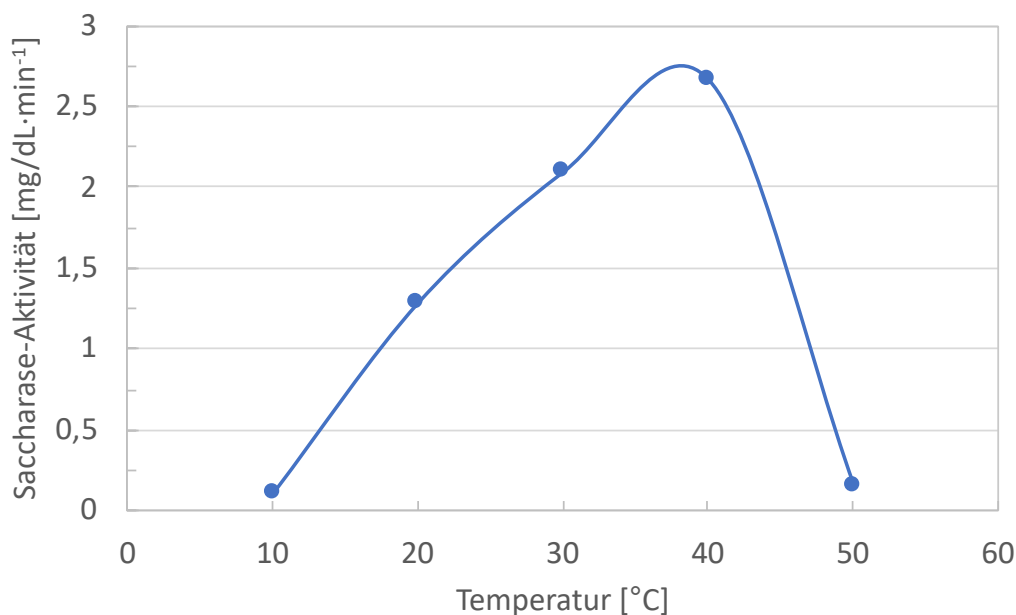


Abb. 9: Saccharaseaktivität in Abhängigkeit von der Temperatur. Die Saccharaseaktivität (Anstieg der Glukosekonzentration in $\text{mg/dL}\cdot\text{min}^{-1}$, Mittelwerte aus Tabelle 3) zeigt ein Maximum bei 38-40 °C.

Hinweis zum Zusatzmaterial

Die Abbildungen zur Durchführung und zur Auswertung der Experimente sind im Zusatzmaterial so zusammengestellt, dass sich ein Überblick über deren Gemeinsamkeiten und Unterschiede ergibt (vgl. Abschnitte 3.3 und 3.4 zur möglichen Reihenfolge der Experimente im Unterricht).

Danksagung

Wir danken Isabell Helbing, M. Ed., für die Bearbeitung der Abbildungen.

Anschrift der Autoren

Prof.-Vertr. Dr. Ingeborg Heil, OStR' i.H.^{1,2}, Kerstin Koch, B.Sc.^{1,2}, Prof. Dr. Johannes Bohrmann¹

RWTH Aachen, ¹Institut für Biologie II, Zoologie und Humanbiologie, ²Didaktik der Biologie und Chemie, Worringerweg 3, 52074 Aachen; Kontakt (für die Autoren): heil@bio2.rwth-aachen.de und bohrmann@bio2.rwth-aachen.de

Literatur

- [1] Bertram, B. (2004): Krebsvorbeugende und krebshemmende Wirkung von Tee. Hamburg: Deutsches Tee-Institut; online: https://www.teeverband.de/fileadmin/Redaktion/WIT/Gesundheit/wit1-98_2.pdf (10.03.2020)
- [2] Duisberg, H., Gebelein, H. (1958): Über die Kontrolle von Erhitzungsschäden bei Honigen, Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung, Band 107, S. 489-501
- [3] Duisberg, H. Warnecke, B. (1959): Erhitzungs- und Lichteinfluss auf Fermente und Inhibine des Honigs, Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung, Band 111, S. 111-119
- [4] Edelhäuser, M., Bergner, K. G. (1987): Proteine des Bienenhonigs. VIII. Honigsaccharase, Isolierung, chromatographisches Verhalten und Eigenschaften, Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung, Band 184, S. 189-194
- [5] Feldheim, W. (2000): Die kariespräventive Wirkung von Tee (II): Die Wirkung der Polyphenole. Hamburg: Deutsches Tee-Institut; online: https://www.teeverband.de/fileadmin/Redaktion/WIT/Sonstige_Inhaltsstoffe/wit2-2000-beitrag1.pdf (10.03.2020)
- [6] Gambke, B., Young, D. (2005): Accu-Chek Aviva. System Evaluierung. Mannheim: Roche Diagnostics GmbH.
- [7] Höner, K., Schnieder, J. (2007): Chemie des Mundes – Kariesprophylaxe durch Enzymhemmung, Praxis der Naturwissenschaften - Chemie in der Schule Band 1/56, S. 50-53
- [8] Honigverordnung (HonigV) vom 16.01.2004, zuletzt geändert 05.07.2017; online: https://deutscherimkerbund.de/userfiles/downloads/satzung_richtlinien/Honigverordnung

- [g_02_18.pdf](#) oder https://www.gesetze-im-internet.de/honigv_2004/BJNR009200004.html (08.05.2020)
- [9] Kiermeier, F., Köberlein, W. (1954): Über die Hitzeinaktivierung von Enzymen in Honig, Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung, Band 98, S. 329-337
- [10] Koch, K. (2017) Entwicklung von Schulexperimenten zur Enzymatik: Bestimmung der Saccharase-Aktivität in Honig mit Hilfe eines Glukometers. Bachelorarbeit, RWTH Aachen
- [11] Kompaktlexikon der Biologie (2001) Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (Lemma: „Enzyme“); online: <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt/enzyme/3715> (08.05.2020)
- [12] Lexikon der Biochemie (1999) Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (Lemma: „Enzyme“); online: <https://www.spektrum.de/lexikon/biochemie/enzyme/1972> (08.05.2020)
- [13] Maisenbacher, P. (o.D.): Zeichen von Versuchsskizzen MS PowerPoint ppt bzw. MS PowerPoint2010 pptx; Download unter: <https://www.schule-bw.de/faecher-und-schularten/mathematisch-naturwissenschaftliche-faecher/chemie/neuer-index.html/nuetzliches-fuer-die-unterrchtstsvorbereitung/skizze> (08.05.2020)
- [14] Ministerium für Schule und Weiterbildung des Landes Nordrhein-Westfalen (2013): Kernlehrplan für die Sekundarstufe II Gymnasium/Gesamtschule in Nordrhein-Westfalen. Biologie; online: <https://www.schulentwicklung.nrw.de/lehrplaene/lehrplannavigator-s-ii/gymnasiale-oberstufe/biologie/biologie-klp/index.html> (12.08.2019).
- [15] Nitschmann, J., Hüsing, J. O. (2000): Lexikon der Bienenkunde, Wien: Tosa
- [16] Savolainen, H. (1992): Tannin content of tea and coffee, Journal of Applied Toxicology, Band 12, S. 191-192
- [17] Seeley, T. D. (1997): Honigbienen - Im Mikrokosmos des Bienenstockes, Basel: Birkhäuser-Verlag
- [18] Sube, M., Heckens, M., Schäfer, S., Ries, K., Sulkowski, J., Heil, I. (2016): Vitalkapazität, Geschlecht und Körpergröße - Messen und Mathematisieren in der Sekundarstufe I. Praxis der Naturwissenschaften - Biologie in der Schule 6/65, S. 4-12; online: <http://www.humanbiologie.rwth-aachen.de/images/stories/downloads/aktuelles/PdN6-65.pdf> (12.08.2019).
- [19] Tamir, M., Alumot, E. (1968): Inhibition of digestive enzymes by condensed tannins from green and ripe carobs, J. Sci. Fd Agric. Band 20, S. 199-202
- [20] Voet, D., Voet, J.G. (1992): Biochemie, Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH
- [21] Weyers, B., Höhne, B., Heil, I., Bohrmann, J. (2015): Reifer Honig oder nicht? Das ist hier die Frage! – Zwei einfache Methoden zur Bestimmung des Wassergehalts von Bienenhonig. Praxis der Naturwissenschaften – Biologie in der Schule 2/64, S. 4-10; online: <http://www.humanbiologie.rwth-aachen.de/images/stories/downloads/WeH%C3%B6HeBo15.pdf>, Zusatzmaterial:

http://www.humanbiologie.rwth-aachen.de/images/stories/downloads/AB_Wassergehalt%20Honig.pdf (12.08.2019)

- [22] Zunftmeister, F., Heil, I., Bohrmann, J. (2018): „Einer für Alles“ - Verwendung von Honig für Schulexperimente zur Enzymatik, BU praktisch 1(1):1; online: <http://www.bu-praktisch.de/index.php/bupraktisch/article/view/1100> (12.08.2019)