Protokoll: Einfluss des pH-Werts auf die Aktivität der Honigdiastase

1 Fragestellung

**\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_**

**\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_**

2 Hypothesen

**\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_**

**\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_**

**\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_**

3 Material

|  |  |
| --- | --- |
| * Lugolsche Lösung 1% (in Tropfflasche) * GHS-pictogram-silhouette.svgStärke * dest. Wasser * Leitungswasser (in Spritzflasche) * Waldhonig * Citronensäure-Phosphat-Puffer-Lösungen nach Mc Ilvaine mit den pH-Werten 3,3; 4,3; 5,3; 6,3 und 7,3 * Spatel * kleiner Löffel * wasserfester Stift * Einmalhandschuhe | * 1 Becherglas 500 mL * Bechergläser 50 mL * Bunsenbrenner * Feuerzeug/Streichhölzer * Dreibein * Feinwaage (d = 0,1 g) * Glaspipette 5 mL mit Pipettierhilfe * 1 Messzylinder 25 mL * 1 Messzylinder 500 mL * 2 Reagenzglasständer * 10 Reagenzgläser * Reagenzglasstopfen * Uhr |

**Sicherheitshinweis:** Lugolsche Lösung ist gesundheitsgefährdend. Bei allen Arbeiten mit dieser Lösung Einmalhandschuhe tragen und Abfälle entsprechend entsorgen!

4 Versuchsaufbau und -durchführung

4.1 Vorbereitungen (vgl. Abb. 1)

* Herstellung einer Stärke-Lösung (1): In ein beschriftetes 500 mL Becherglas werden mit Hilfe des Spatels 1 g Stärke eingewogen und 400 mL dest. Wasser hinzugefügt (c = 0,015 mol/L). Das Stärke-Wasser-Gemisch wird unter Rühren über dem Bunsenbrenner zum Sieden gebracht, bis sich die Stärke vollständig aufgelöst hat und die Lösung klar ist. Dann wird die Stärke-Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt.
* Herstellung der gepufferten Honig-Lösungen (2): In fünf beschriftete 50 mL Bechergläser werden mit Hilfe des Löffels je 4 g Waldhonig eingewogen und in 10 mL Leitungswasser gelöst. Zu jeweils einem der 5 Bechergläser werden je 10 mL einer der Puffer-Lösungen mit den pH-Werten 3,3; 4,3; 5,3; 6,3 und 7,3 hinzugefügt.
* Vorbereitung der Proben (3): Fünf beschriftete Reagenzgläser werden mit jeweils 4 Tropfen Lugolscher Lösung befüllt.

|  |
| --- |
|  |

**Abbildung 1**: Versuch zur Bestimmung der Abhängigkeit der Diastaseaktivität vom pH-Wert mit Stärke-Lösung und Lugolscher Lösung (erstellt unter Verwendung von Elementen von Maisenbacher, 2010: slideplayer.org/slide/4867264/).

4.2 Durchführung (vgl. Abb. 1)

Zu den gepufferten Honig-Lösungen werden nacheinander jeweils 25 mL der Stärke-Lösung hinzugegeben (4). Nach 40 min werden mit der Pipette jeweils 2 mL der Proben entnommen und in die jeweiligen Reagenzgläser überführt (5). Die Reagenzgläser werden bis etwa 1 cm unterhalb des Randes mit Leitungswasser befüllt, mit einem Stopfen versehen und die Lösungen durch Schütteln gleichmäßig durchmischt (6). Die Reagenzgläser werden jeweils mit weiteren 4 Tropfen Lugolscher Lösung versetzt (7).

5 Beobachtung

Die jeweilige Färbung der verschiedenen Lösungen wird anhand von Abb. 2 bestimmt und notiert (Tab. 1).

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| pH 3,3 | pH 4,3 | pH 5,3 | pH 6,3 | pH 7,3 |
|  |  |  |  |  |

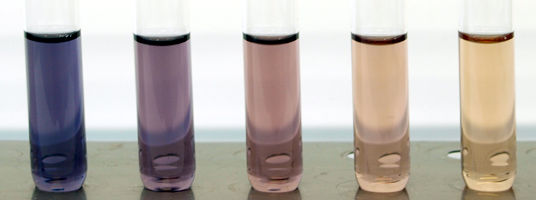
Tabelle 1:Färbungen der gepufferten Honig-Stärke-Wasser-Lösungen (ermittelt von Gruppe \_\_\_\_ anhand von Abb. 2)

Abbildung 2: Typischer Farbverlauf, der unter Verwendung von Lugolscher Lösung beim Abbau von Stärke unter Einfluss des Enzyms Diastase beobachtet werden kann (von links nach rechts: dunkelblau, blau-violett, violett-braun, braun, braun-gelb). (Foto: Zunftmeister)

6 Auswertung

* Den beobachteten Färbungen (Tab. 1) werden Werte von 0-4 als Maß für die relative Enzymaktivität zugeordnet (Tab. 2) und für alle Gruppen notiert (Tab. 3). Für jeden pH-Wert wird der jeweilige Mittelwert der relativen Enzymaktivität errechnet und notiert (Tab. 3).

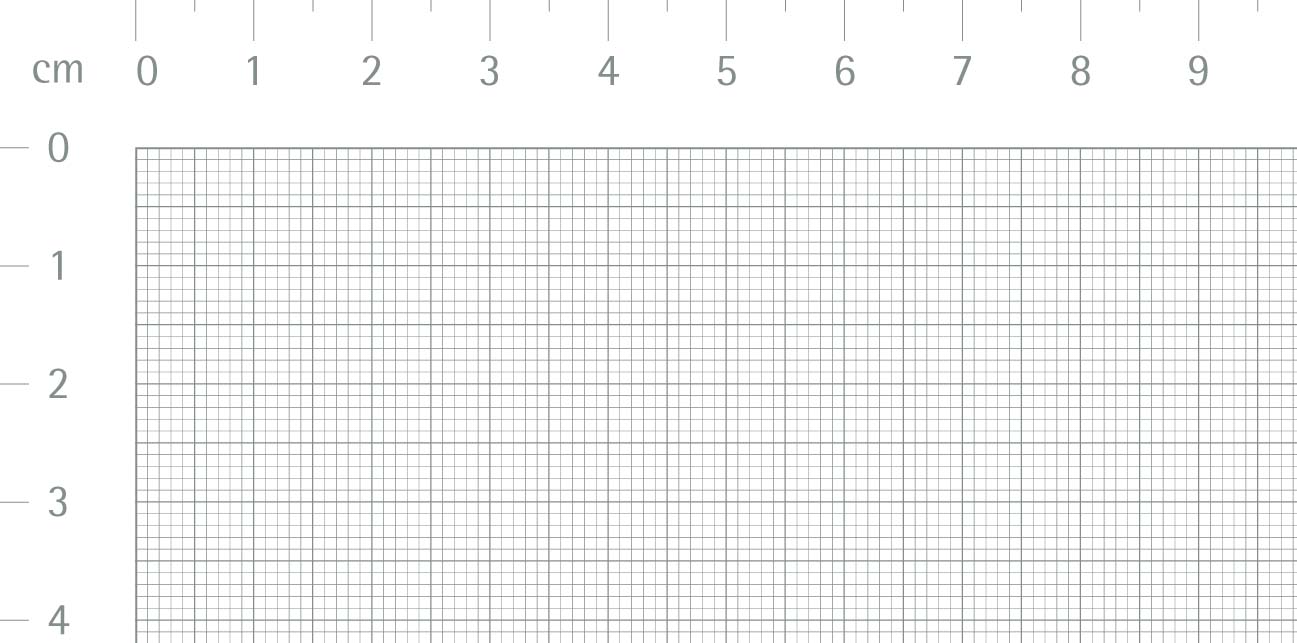
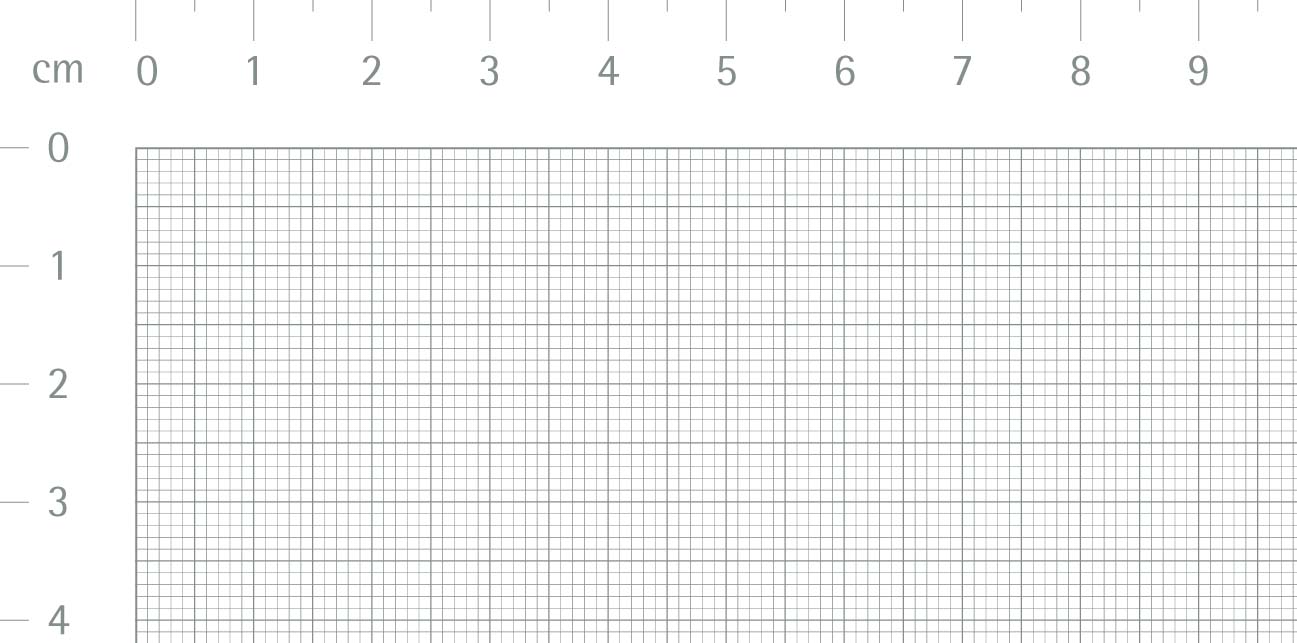
|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| dunkelblau | blau-violett | violett-braun | braun | braun-gelb |
| 0 | **1** | **2** | **3** | **4** |

**Tabelle 2:** Kodierung der Färbungen als Maß für die relative Enzymaktivität.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| pH-  Wert | Gruppe 1 | | Gruppe 2 | | Gruppe 3 | | Gruppe 4 | | Gruppe 5 | | Gruppe 6 | | Mittelwert |
| pH 3,3 |  |  | |  | |  | |  | |  | |  | |
| pH 4,3 |  |  | |  | |  | |  | |  | |  | |
| pH 5,3 |  |  | |  | |  | |  | |  | |  | |
| pH 6,3 |  |  | |  | |  | |  | |  | |  | |
| pH 7,3 |  |  | |  | |  | |  | |  | |  | |

**Tabelle 3**: Auflistung der relativen Enzymaktivitäten (Werte aller Gruppen, ermittelt anhand von Tab. 2).

* Die Mittelwerte der relativen Enzymaktivität werden in einem Koordinatensystem gegen die entsprechenden pH-Werte aufgetragen (Abb. 3). Durch die Punkte im Koordinatensystem wird eine Ausgleichskurve gezeichnet.



6,3

1

2

3

4

3,3

4,3

5,3

**relative Enzymaktivität**

**pH-Wert**



7,3

**Abbildung 3:** Auftragung der ermitteltenden relativen Enzymaktivität gegen den pH-Wert.

* Es wird ein Text (🡪 Heft) formuliert, der folgende Aspekte berücksichtigt:
  + Ermittelte Werte bzw. graphischen Verlauf beschreiben und erklären
  + Hypothesen überprüfen
  + Schlussfolgerungen ziehen
  + Methode beurteilen (Aussagekraft der Ergebnisse, mögliche Fehlerquellen…?)
  + Weiterführende Fragen stellen (Gleiches Ergebnis für andere Enzyme erwartet…?)